



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122558** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/00
A01H 6/20 (2018.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 07747**

(22) Дата подання заявки: **24.11.2010**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **11.12.2020**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **10.12.2013, Бюл.№ 23**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **10.12.2020, Бюл.№ 23**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/US2010/058011,
24.11.2010**

(72) Винахідник(и):

**Чарне Давід Джордж (СА),
Чен Венпін (СА),
Кошелні Чадвік Брюс (СА),
Пател Джейантилал Девабай (СА),
Тунен Фердінанд Джерард (СА),
Тулсирам Ломас (СА),
Чан Янпин (СА),
Лі Жонсен (US)**

(73) Володілець (володільці):

**ПІОНЕР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕТНЛ, ІНК.,
7100 N.W. 62nd Avenue, Johnston, IA 50131-
1014, United States of America (US),
Е. І. ДЮ ПОН ДЕ НЕМУР ЕНД КОМПАНІ,
1007 Market Street, Wilmington, DE 19898,
United States of America (US)**

(74) Представник:

**Олішевич Людмила Анатоліївна, реєстр.
№194**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

**WO 2008/112019 A2, 18.09.2008
GREEN JERRY M ET AL. Response of 98140
Corn with gat4621 and hra Transgenes to
Glyphosate and ALS-Inhibiting Herbicides.
WEED SCIENCE. 03.2009, vol. 57, № 2, P.
142-148
DUKE S ET AL. Glyphosate-Resistant Crops
and Weeds: Now and in the Future.
AGBIOFORUM, UNIVERSITY OF MISSOURI,
COLUMBIA, AGRICULTURE &
ENGINEERING DEPARTMENT, US.
01.01.2009, vol. 12, № 3-4, P. 346-357
CASTLE LINDA A ET AL. Discovery and
directed evolution of a glyphosate tolerance
gene. SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION
FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,
WASHINGTON, DC; US. 21.05.2004, vol. 304,
№ 5674, P. 1151-1154
GREEN JERRY M ET AL. New multiple-
herbicide crop resistance and formulation
technology to augment the utility of
glyphosate. PEST MANAGEMENT SERVICE,
WILEY & SONS, BOGNOR REGIS; GB.
01.04.2008, vol. 64, № 4, P. 332-339**

UA 122558 C2

(54) РОСЛИНА BRASSICA, ЯКА Є СТІЙКОЮ ДО ГЛІФОСАТУ, ТА СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується рослини *Brassica*, стійкої до гліфосату, що містить у своєму геномі полінуклеотид, що включає SEQ ID NO: 12, полінуклеотид, що кодує гліфосат-N-ацетилтрансферазу, і полінуклеотид, що містить SEQ ID NO: 13. Винахід також стосується трансгенного насіння, що містить вказані полінуклеотиди; рослинного матеріалу; виділеного полінуклеотиду, що містить SEQ ID NOs: 12 та 13; набору для детектування ДНК; способу ідентифікації події DP-073496-4 у біологічному зразку.

Посилання на список послідовностей, поданий у вигляді текстового файлу за допомогою EFS-WEB

Офіційна копія списку послідовностей подана одночасно зі специфікацією у вигляді текстового файлу за допомогою EFS-Web, відповідно до American Standard Code for Information Interchange (ASCII), під іменем файлу 399080seqlist.txt з датою створення 24 листопада 2010 р. і з розміром 40 Кбайт. Список послідовностей, поданий за допомогою EFS-Web, є частиною специфікації й включений сюди повністю в якості посилання.

Ділянку техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до ділянки молекулярної біології. Конкретніше, даний винахід відноситься до експресії послідовності, яка забезпечує стійкість до гліфосату.

Рівень техніки, що передує винаходу

Експресія чужорідних генів у рослинах, як відомо, залежить від їхньої локалізації в геномі рослини, можливо, через структуру хроматину (наприклад, гетерохроматину) або від близькості розташування елементів регуляції транскрипції (наприклад, енхансерів) до ділянки інтеграції (Weising, et al., (1988) Ann. Rev. Genet 22:421-477). У той же час, присутність трансгена в різних ділянках генома в цілому різними способами впливає на фенотип рослини. Із цієї причини часто є необхідним здійснювати скринінг великої кількості подій для ідентифікації одного з них, що характеризується оптимальною експресією введеного гена інтересуючого. Наприклад, у рослинах і інших організмах спостерігалось, що може мати місце більша варіація рівня експресії введеного гена серед різних подій уведення. Можуть мати місце відмінності в просторових і тимчасових профілях експресії, наприклад, відмінності у відносній експресії трансгена в різних рослинних тканинах, які можуть не відповідати профілям експресії, очікуваним у результаті дії елементів регуляції транскрипції, присутніх в уведеній генній конструкції. Також спостерігалось, що вставка трансгена може впливати на експресію ендегенних генів. Із цієї причини звичайною практикою є створення сотень або тисяч різних подій і скринінг даних подій для пошуку єдиної події з необхідним рівнем і профілем експресії трансгена для комерційних цілей. Подія, яка характеризується необхідним рівнем або профілем експресії трансгена, може використовуватися для інтрогресії трансгена в інші варіанти генетичного середовища шляхом ауткроссинга з використанням загальноприйнятих способів селекції. Потомство таких гібридів зберігає характеристики експресії трансгена, що були у вихідного трансформанта. Дану стратегію застосовують, щоб гарантувати надійну генну експресію в декількох сортах, добре пристосованих до місцевих умов росту.

Кращою є можливість детектувати присутність конкретної події для визначення того, чи буде потомство схрещування містити інтересуючий трансген. Крім того, спосіб детектування конкретної події може сприяти доданню відповідності з вимогами регуляції для передпродажного дозволу й маркування їжі, отриманої з рекомбінантних культурних рослин, або для застосування в моніторингу навколишнього середовища, моніторингу сортів культур в ділянці моніторингу продуктів, що відбуваються із урожаю культури, а також для застосування при забезпеченні відповідності партій продукції, піддаваних регуляторним або контрактним умовам.

У комерційному виробництві культур потрібно легко й швидко вилучити небажані рослини (тобто, «бур'яни») з поля культурних рослин. Ідеальною обробкою буде та, яка може використовуватися на цілому полі, але знищить тільки небажані рослини, залишивши культурні рослини неушкодженими. Одна така система обробки використовує культурні рослини, стійкі до гербіциду, так що, коли гербіцид розпорошують на поле стійких до гербіциду культурних рослин, вони продовжують активно рости, тоді як не стійкі до гербіциду бур'яни знищуються або значно ушкоджуються.

Внаслідок місцевих і регіональних відмінностей у домінуючих видах бур'янів, а також у кращих видах культурних рослин, існує постійна необхідність у системах захисту культур і керування бур'янами, які можуть адаптуватися до потреб конкретного регіону, конкретної географії й/або місцевості. Потрібен спосіб і композиції, що забезпечують швидку ідентифікацію подій у рослинах, що приводять до появи таких якостей. Наприклад, існує постійна необхідність у способах захисту культур і керування бур'янами, здатних знижувати число обробок гербіцидом, необхідних для контролю бур'янів у полі, знижувати кількість гербіциду, необхідного для контролю бур'янів у полі, знижувати кількість оранок, необхідних для виробництва культури й/або сповільнювати або запобігати розвитку й/або появи стійких до гербіциду бур'янів. Існує постійна необхідність у способах захисту культур і керування бур'янами, що забезпечують спрямоване застосування конкретного гербіциду й ефективне детектування такої події.

Коротка сутність винаходу

Надані композиції й способи, що відносяться до трансгенних, стійких до гліфосату рослинам Brassica. Конкретніше, даний винахід відноситься до рослин Brassica, що містять трансген, що

забезпечує стійкість до гліфосату. Подія може являти собою, наприклад, DP-073496-4. Рослина Brassica, що несе трансген у зазначеній хромосомній локалізації, містить унікальні точки сполучення генома/трансгена, що характеризуються, щонайменше, послідовністю SEQ ID NO: 2, або, щонайменше, послідовністю SEQ ID NO: 12 і/або 13. Крім того, надані насіння, що зберігаються у вигляді патентного депозиту під номером РТА-_____, і рослини, рослинні клітини, продукти насін'я і рослин, що відбуваються з них. Дослідження ділянки геномної вставки DP-073496-4 або будь-якої іншої події, що включає інтеграцію трансгена стійкості до гліфосату, надає підвищену ефективність селекції й забезпечує застосування молекулярних маркерів для відстеження вставки трансгена в підлягаючих селекції популяціях і їх потомстві. Надані різні способи й композиції для ідентифікації, детектування й застосування події трансформації гліфосат-п-ацетилтрансферазою («GAT» або «glyat») в Brassica.

Короткий опис креслень

На фігурі 1 показаний синтез плазмиди PHP28181. Плазмиду PHP28181 застосовували для продукції ліній Brassica GAT.

На фігурі 2 представлена схематична карта плазмиди PHP28181.

На фігурі 3 представлена схематична карта вставки ДНК, фрагмента PHP28181A.

На фігурі 4 показана схематична представлення фрагмента А з PHP28181 (PHP28181A), більш конкретно, схематична карта фрагмента Hind III/Not I (PHP28181A), що містить касету, гена *gat4621*, який використовували для трансформації з одержанням Brassica DP-073496-4. Розмір фрагмента становить 2112 п.о. Розташування специфічних відносно конструкції праймерів 09-0-3290/09-0-3288 зазначене на карті.

Фігура 5. Саузерн-аналіз продуктів специфічної відносно конструкції ПЛР ДНК листів від Brassica DP-073496-4 і не модифікованої генетично контрольної Brassica. Ампліфікації ПЛР із набором праймерів 09-0-3290/09-0-3288, спрямованих на унікальний промотор убіквітину й ділянка сполучення *gat4621*, присутні в канале DP-073496-4. Очікуваний розмір амплікона ПЛР становить 675 п.о.

Фігура 6. Саузерн-аналіз продуктів ПЛР гена *FatA* Brassica на ДНК листів з Brassica DP-073496-4 і не модифікованої генетично контрольної Brassica. Ампліфікація ПЛР ендегенного гена *FatA* Brassica з набором праймерів 09-0-2812/09-0-2813 у якості позитивного контролю ампліфікації ПЛР. Очікуваний розмір амплікона ПЛР становить 506 п.о.

Докладний опис винаходу

Даний винахід буде тепер описаний більш докладно тут і далі з посиланням на супровідні креслення, на яких показані деякі, але не всі варіанти здійснення винаходу. Більше того, даний винахід може здійснюватися в багатьох різних видах, і мається на увазі, що він не обмежений наведеними тут варіантами здійснення; скоріше дані варіанти здійснення надані для того, щоб опис задовольняв застосовним юридичним вимогам. У межах документа подібні номери відносяться до подібних елементів.

Багато модифікацій і інші варіанти здійснення винаходу, наведені в даному документі, можуть бути зрозумілі фахівцям у ділянці, до якої відноситься даний винахід, як і переваги ідей, представлених у наступних описах і асоційованих з ними кресленнях. Тому слід розуміти, що винахід не обмежений конкретними описаними варіантами здійснення, і що модифікації й інші варіанти здійснення, як мається на увазі, включені в обсяг прикладеної формули винаходу. Хоча в даному документі й використовуються конкретні терміни, вони застосовуються лише в загальному й описовому змісті, а не для цілей обмеження.

Надані композиції й способи, що відносяться до трансгенних, стійких до гліфосату рослинам Brassica. Конкретно, даний винахід відноситься до рослин Brassica подією, що характеризується, DP-073496-4 або іншою подією, що містять PHP28181A або його функціональний фрагмент або варіант. Рослина Brassica, що містить подію DP-073496-4, наприклад, модифікована шляхом вставки гена гліфосатуцетилтрансферази (*glyat4621*), що відбувається від *Bacillus licheniformis*. Ген *glyat4621* може функціонально поліпшуватися в процесі тасування генів для оптимізації кінетики активності гліфосатуцетилтрансферази (GLYAT) по ацетилюванню гербіциду гліфосату. Вставка гена *glyat4621* у рослину забезпечує стійкість до активного інгредієнта гербіциду гліфосату за допомогою перетворення гліфосату в нетоксичну ацетилювану форму. Таким чином, рослина Brassica, що характеризується подією DP-073496-4, стійко до гліфосату.

Полінуклеотиди, що забезпечують стійкість до гліфосату, вбудовують у конкретне положення в геномі Brassica, і за рахунок цього відбувається, наприклад, подія DP-073496-4. Рослина Brassica, що несе подію DP-073496-4 у конкретній локалізації в хромосомі, містить ділянки сполучення геном/трансген, що мають унікальну полінуклеотидну послідовність, прикладами якої служить SEQ ID NO: 2, або, щонайменше, полінуклеотидну послідовність SEQ

ID NO: 12 і/або 13; SEQ ID NO: 14 і/або 15; або SEQ ID NO: 16 і/або 17. Дослідження ділянки геномної вставки будь-якої події надає підвищену ефективність селекції й забезпечує застосування молекулярних маркерів для відстеження вставки трансгена в підлягаючих селекції популяціях і їх потомстві. У даному документі надані різні способи й композиції для ідентифікації, детектування й застосування події Brassica DP-073496-4. В одному з варіантів здійснення надана рослина Brassica, що містить у своєму геномі наступний порядок: полінуклеотид , що містить SEQ ID NO: 12, полінуклеотид , що кодує гліфосат-п-ацетилтрансферазу, і полінуклеотид , що містить SEQ ID NO: 13. Термін «специфічний відносно події DP-073496-4» відноситься до полінуклеотидної послідовності, яка є підходящою для ідентифікації, що дискримінує, події DP-073496-4 у рослинах, рослинному матеріалі або в продуктах, у якості необмежуваних прикладів, що представляють собою масло, зроблене з насіння, або харчові або кормові продукти (свіжі або оброблені), що містять рослинний матеріал або, що відбуваються з нього.

Композиції далі включають насіння, що зберігаються у вигляді патентного депозиту під номером РТА-_____, і рослини, рослинні клітини й насіння, що відбуваються з них. Справжній(-ї) заявник(-и) здійснив(-или) депонування щонайменше 2500 насіння Brassica з подією DP-073496-4 в American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA 20110-2209 USA, 24 листопада 2010 року, і депозит буде зберігатися згідно з положеннями Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури. Депонування здійснювали винятково для зручності фахівців у даній ділянці, і це не допускає того, що потрібне депонування згідно 35 U.S.C. §112. Насіння, депоновані в ATCC, узяті з депозиту, який підтримується Pioneer Hi-Bred International, Inc., 7250 NW 62nd Avenue, Johnston, Iowa 50131-1000. Доступ до даного депозиту можливий під час розгляду заявки по запиту для Комісара по патентах і торговельним маркам і для осіб, призначених для цього Комісаром. Згідно з дозволом кожного з пунктів формули винаходу даної заявки, заявник(-и) зводить(-лять) доступним громадськості зразок(-и) з депозиту відповідно до 37 C.F.R. §1808. Депозит насіння, що містять подію Brassica DP-073496-4, буде зберігатися в депозитарії ATCC, який є суспільним, протягом періоду 30 років або протягом 5 років після останнього запиту або протягом законної дії патенту, якщо воно протриває довше, і буде замінений протягом цього періоду, якщо стане нежиттєздатним. Додатково, заявник(-и) задовольнить(-ять) усі вимоги 37 C.F.R. §§1801-1809, включаючи надання ознак життєздатності зразка після депонування. Заявник(-и) не має(-ють) повноважень для відмови від яких-небудь обмежень, що накладають законом на переміщення біологічного матеріалу або його комерційне транспортування. Заявник(-и) не відмовляється(-ються) від своїх прав, отриманих по даному патенту, або прав, відповідних до події DP-073496-4, у випадку їх порушення, згідно із Законом про охорону сорту рослин (7 USC §2321, et seq.). Неавторизоване розмноження насіння заборонене. Застосування насіння може регулюватися.

Застосовуваний у даному документі термін «Brassica» означає будь-яку рослину Brassica і включає будь-які різновиди рослин, які можуть бути вирощені з Brassica. Застосовуваний у даному документі термін «рослина» включає рослинні клітини, рослинні органи, рослинні протопласти, тканеві культури рослинних клітин, з яких можуть регенеруватися рослини, рослинні калуси, кущі рослин і рослинні клітини, які в інтактному виді перебувають у рослинах, або частини рослини, такі як зародки, пілок, семязачатки, насіння, листи, квіти, гілок, плід, стебла, коріння, кореневі кінчики, пільовики, і т.п. Зроблені зрілі насіння можна використовувати в їжу, на корм, для палива або для інших комерційних або промислових цілей, або для цілей вирощування й репродукції виду. Потомство, варіанти й мутанти регенерованих рослин також включені в обсяг винаходу, при забезпеченні того, що ці частини містять подію DP-073496-4.

Трансгенна «подія» продукується шляхом трансформації рослинних клітин гетерологічною(-ими) конструкцією(-ями) ДНК , що включає(-ними) експресуючу касету нуклеїнової кислоти, що містить інтересуючого трансген, регенерації популяції рослин із клітин, кожна з яких містить вбудований трансген, і селекції конкретної рослини, що характеризується вставкою в конкретній локалізації генома. Подія характеризується фенотиповою експресією трансгена(-ів). На генетичному рівні подія являє собою частину генетичної будови рослини. Термін «подія» також відноситься до потомства, продукованому шляхом схрещування між трансформантом і іншим різновидом, який містить гетерологічну ДНК . Навіть після повторного зворотного схрещування з рекурентним батьком, вбудована ДНК і фланкуюча ДНК із трансформованого батька присутні в потомстві схрещування в тій же хромосомній локалізації. Термін «подія» також відноситься до ДНК із вихідного трансформанта, що містить вбудовану ДНК і фланкуючу послідовність, що безпосередньо прилягає до вбудованої ДНК , яка, як очікується, переноситься потомству як результат схрещування однієї батьківської лінії, яка включає вбудовану ДНК (наприклад,

вихідного трансформанта й потомства, що відбувається від самозапилення), і батьківської лінії, яка не містить вбудовану ДНК.

Застосовувана в даному документі «вставка ДНК» відноситься до гетерологічної ДНК в експресуючій касеті, застосовуваної для трансформації рослинного матеріалу, тоді як «фланкуюча ДНК» може включати або геномну ДНК, що присутнює в природі в організмі, наприклад, рослинну, або чужорідну (гетерологічну) ДНК, уведено в процесі трансформації, зовнішньому стосовно вихідної вставки молекули ДНК, наприклад, фрагментами, асоційованими з подією трансформації. «Фланкуюча ділянка» або «фланкуюча послідовність», як даний термін застосовують у даному документі, відноситься до послідовності із щонайменше 20, 50, 100, 200, 300, 400, 1000, 1500, 2000, 2500 або 5000 пар основ або більш, яка розташовується безпосередньо вище й суміжно з вихідною чужорідною вбудованою молекулою ДНК, або безпосередньо нижче й суміжно з нею. Необмежуючі приклади фланкуючих ділянок події DP-073496-4 включають полінуклеотидні послідовності, які наведені в SEQ ID NO: 2, 8 і/або 9, і їх варіанти й фрагменти.

Процедури трансформації, що приводять до випадкової інтеграції чужорідної ДНК, приводять до утвору трансформантів фланкуючі ділянки, що містять різні, характерні й унікальні для кожного трансформанта. Коли рекомбінантну ДНК вводять у рослину шляхом традиційного схрещування, її фланкуючі ділянки, в основному, не змінюються. Трансформанти також можуть містити унікальні ділянки сполучення між фрагментом гетерологічної вставки ДНК і геномної ДНК або двома фрагментами геномної ДНК або двома фрагментами гетерологічної ДНК. «Ділянка сполучення» є точкою, де з'єднуються два специфічні фрагменти ДНК. Наприклад, ділянка сполучення існує там, де вставка ДНК з'єднується із фланкуючими ДНК. Точка сполучення також існує в трансформованому організмі, де два фрагменти ДНК з'єднані разом, так що відбувається модифікація в порівнянні з нативним організмом. Застосовуваний у даному документі термін «ДНК сполучення» відноситься до ДНК, яка містить ділянку сполучення. Необмежуючі приклади ДНК сполучення з події DP-073496-4 наведені в SEQ ID NO: 2, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 і/або 19 або в їхніх варіантах і фрагментах.

Рослина DP073496-4 може вирощуватися шляхом першого полового схрещування першої батьківської рослини Brassica, вирощеного від трансгенної рослини Brassica DP-073496-4 (або його потомства, що відбувається від трансформації експресуючими касетами - варіантами здійснення даного винаходу, які забезпечують стійкість до гербіциду) і другої батьківської рослини Brassica, яке не має фенотип стійкості до гербіциду, з одержанням за рахунок цієї безлічі рослин потомства першого покоління, а потім добору рослини потомства першого покоління, яке характеризується необхідною стійкістю до гербіциду, і самозапилення рослини потомства першого покоління, з одержанням за рахунок цієї безлічі рослин потомства другого покоління, а потім добору з рослин потомства другого покоління тих, які характеризуються необхідною стійкістю до гербіциду. Ці стадії можуть, крім того, включати зворотне схрещування потомства першого покоління, стійкого до гербіциду, або потомства другого покоління, стійкого до гербіциду, із другою батьківською рослиною Brassica або із третьою батьківською рослиною Brassica, з одержанням за рахунок цієї рослини Brassica, яке характеризується необхідною стійкістю до гербіциду. Далі мається на увазі, що аналіз потомства на фенотип не потрібно. Різні способи й композиції, описані тут і далі в даному документі, можна використовувати для детектування й/або ідентифікації DP073496-4 або іншої події.

Два різні трансгенних рослини можуть також зазнати полового схрещування для одержання потомства, яке містить два, що незалежно розщеплюють екзогенних гена. Самозапилення придатного потомства може продукувати рослини, гомозиготні по обох екзогенним генам. Також розглядається зворотне схрещування з батьківською рослиною й зовнішнє схрещування з нетрансгенною рослиною, як і вегетативне розмноження. Опису інших способів селекції, які широко застосовуються для різних ознак і культур, можна знайти в одній з декількох посилань, наприклад, Fehr, in Breeding Methods for Cuitivar Development, Witcos, ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Термін «зародкова плазма» відноситься до будь-якого індивідуума, групи індивідуумів або до клону, що представляє генотип, різновид, вид або культуру або їх генетичний матеріал.

«Лінія» або «сорт» являє собою групу індивідуумів ідентичного походження, які, в основному, інбредні певною мірою і які, загалом, ізогенні або близькі до ізогенності.

Інбредні лінії мають тенденцію до високого ступеня гомогенності, гомозиготності й відтворюваності. Багатьма аналітичними способами можна визначити гомозиготність і фенотипову стабільність інбредних ліній.

Фраза «гібридні рослини» відноситься до рослин, які є результатом схрещування між генетично різними індивідуумами.

Термін «, що схрещується» або «схрещування» у контексті даного винаходу означає злиття гамет, наприклад, шляхом запилення для одержання потомства (тобто, клітин, насіння або рослин) у випадку рослин. Термін охоплює як полове схрещування (запилення одного рослини іншим), так і самозапилення, у випадку рослин (тобто, коли пілок і семязачаток походять від того самого рослини).

Термін «інтрогресія» відноситься до переносу необхідного алеля генетичного локусу від одного генетичного середовища в іншу. В одному зі способів необхідні алелі можуть інтрогресувати шляхом полового схрещування між двома родителями, де щонайменше один з батьків містить необхідний алель у своєму геномі.

У деяких варіантах здійснення полінуклеотиди, що несуть подію Brassica DP-073496-4 по винаходу, конструюють у молекулярну батарею. В інших варіантах здійснення молекулярна батарея додатково містить щонайменше один додатковий полінуклеотид, які забезпечує стійкість до другого гербіциду. В одному з варіантів здійснення послідовність забезпечує стійкість до глүфосинату, і в конкретному варіанті здійснення послідовність містить ген *pat*. В іншому варіанті здійснення додатковий полінуклеотид надає стійкість до гербіцидів-інгібіторам ALS.

В інших варіантах здійснення подія за винаходом містить один або кілька інтересуючих ознак, і в більш конкретних варіантах здійснення рослину постачають якою-небудь поєднанням інтересуючих полінуклеотидних послідовностей для створення рослин з необхідною поєднанням ознак. Ознака, як цей термін застосовують у даному документі, відноситься до фенотипу, що відбувається від конкретної послідовності або групи послідовностей. Наприклад, полінуклеотиди стійкості до гербіциду можуть бути з'єднані з будь-якими іншими полінуклеотидами, що кодують поліпептиди з активністю пестицидів і/або інсектицидів, такі як токсичні білки *Bacillus thuringiensis* (описані в патентах США №№ 5366892; 5747450; 5737514; 5723756; 5593881; Geiser, et al., (1986) *Gene* 48:109; Lee, et al., (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4648-4657 (Vip3A); Galitzky, et al., (2001) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57:1101-1109 (Cry3Bb1) і Herman, et al., (2004) *J. Agric. Food Chem.* 52:2726-2734 (Cry1F)), лектини (Van Damme, et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:825), пентин (описаний у патенті США № 5981722), і т.п. Утворені поєднанням можуть також включати множинні копії якого-небудь одного інтересуючого полінуклеотида.

У деяких варіантах здійснення події за винаходом може бути об'єднане з іншими ознаками стійкості до гербіциду для створення трансгенні рослини за винаходом із ще більш поліпшеними властивостями. Інші полінуклеотиди стійкості до гербіциду, які можуть використовуватися в таких варіантах здійснення, включають ті, які забезпечують стійкість до гліфосату іншими механізмами дії, такі як, наприклад, ген, що кодує фермент гліфосатоксидоредуктазу, як описано більш докладно в патентах США №№ 5776760 і 5463175. Інші ознаки, які можуть сполучатися з подією по винаходу, включають ознаки, що відбуваються від полінуклеотидів, які надають рослині здатність продукуватися більш високий рівень 5-енолпірувилшкімат-3-фосфатсинтетази (EPSPS), наприклад, як більш докладно описане в патентах США №№ 6248876 B1; 5627061; 5804425; 5633435; 5145783; 4971908; 5312910; 5188642; 4940835; 5866775; 6225114 B1; 6130366; 5310667; 4535060; 4769061; 5633448; 5510471; Re. 36449; RE 37287 E і 5491288 і Міжнародних публікаціях №№ WO 97/04103; WO 00/66746; WO 01/66704 і WO 00/66747. Інші ознаки, які можуть сполучатися з подією по винаходу, включають ознаки, що забезпечують стійкість до сульфонілсечовини й/або імідазолінону, наприклад, як більш докладно описане в патентах США №№ 5605011; 5013659; 5141870; 5767361; 5731180; 5304732; 4761373; 5331107; 5928937 і 5378824 і Міжнародної публікації WO 96/33270.

У деяких варіантах здійснення подія за винаходом може бути об'єднане, наприклад, з гідроксифенілпіруватдіоксигеназами, ферментами, які каталізують взаємодію, у якому парі-гідроксифенілпіруват (HPP) перетворюється в гомогентизат. Молекули, які інгібують даний фермент і які зв'язуються з ферментом для інгібування перетворення HPP у гомогентизат, придатні як гербіциди. Ознаки, що забезпечують стійкість до таких гербіцидів у рослинах, описані в патентах США №№ 6245968 B1; 6268549 і 6069115 і Міжнародної публікації № WO 99/23886. Інші приклади підходящих ознак стійкості до гербіциду, які можуть поєднуватися з подією по винаходу, включають полінуклеотиди арилоксіалканоксидогенази (яка, за наявними відомостями, забезпечує стійкість до 2,4-D і іншим гербіцидам на основі феноксіауксину, а також до гербіцидів на основі арилоксифеноксипропіонату, як описано, наприклад, у Міжнародній публікації WO 05/107437) і полінуклеотиди стійкості до дикамбе, як описано, наприклад, в Herman, et al., (2005) *J. Biol. Chem.* 280:24759-24767.

Інші приклади ознак стійкості до гербіциду, які можуть сполучатися з подією, описуваної в даному документі, включають ознаки, забезпечувані полінуклеотидами, що кодують екзогенну

фосфінотрицинацетилтрансферазу, як описано в патентах США №№ 5969213; 5489520; 5550318; 5874265; 5919675; 5561236; 5648477; 5646024; 6177616 і 5879903. Рослини, що містять екзогенну фосфінотрицинацетилтрансферазу, можуть проявляти поліпшену стійкість до гербіцидів на основі глүфосинату, які інгібують фермент глутамінсинтазу. Інші приклади ознак стійкості до гербіциду, які можуть сполучатися з подією, описуваної в даному документі, включають ознаки, забезпечувані полінуклеотидами, що надають змінену активність протопорфіриногеноксидази (protox), як описано в патентах США №№ 6288306 B1; 6282837 B1 і 5767373 і Міжнародної публікації № WO 01/12825. Рослини, що містять такі полінуклеотиди, можуть проявляти поліпшену стійкість до кожного з різноманітних гербіцидів, які спрямовано діють на фермент protox (також позначуваних як «інгібітори protox»).

В інших варіантах здійснення ознака стійкості ALS комбінують із подією, описувану в даному документі. Застосовуваний у даному документі термін «поліпептид стійкості ALS» містить будь-який поліпептид, який при експресії в рослині забезпечує стійкість до щонайменше одному інгібітору ALS. Відомі різноманітні інгібітори ALS, і вони включають, наприклад, сульфонілсечовину, імідазоліон, тріазолопіримідин, піримідинілокси(тіо)бензоати й/або гербіцид сульфоніламінокарбонілтріазоліон. Додаткові інгібітори ALS відомі й описані в інших розділах у даному документі. Відомо в даній ділянці, що мутації ALS розділяються на різні класи щодо стійкості до сульфонілсечовин, імідазоліонів, тріазолопіримідину і піримідиніл(тіо)бензоатів, включаючи мутації, що мають наступні характеристики: (1) широка стійкість до всіх чотирьох із цих груп; (2) стійкість до імідазоліонів і піримідиніл(тіо)бензоатів; (3) стійкість до сульфонілсечовин і тріазолопіримідину; і (4) стійкість до сульфонілсечовин і імідазоліонів.

Можуть використовуватися різні поліпептиди стійкості до інгібітору ALS. У деяких варіантах здійснення полінуклеотиди стійкості до інгібітору ALS містять щонайменше одну нуклеотидну мутацію, що приводить до однієї амінокислотної заміни в поліпептиді ALS. У конкретних варіантах здійснення заміна відбувається в одній із семи по суті консервативних ділянок ацетолактатсинтази. Див., наприклад, Hattori et al. (1995) *Molecular Genetics and Genomes* 246:419-425; Lee et al. (1998) *EMBO Journal* 7:1241-1248; Mazur et al. (1989) *Ann. Rev. Plant Phys.* 40:441-470; і патент США № 5605011, причому кожний із цих джерел включений повністю в якості посилання. Поліпептид стійкості до інгібітору ALS може кодуватися, наприклад, локусом SuRA або SuRB ALS. У конкретних варіантах здійснення поліпептид стійкості до інгібітору ALS включає мутант ALS C3, мутант ALS HRA, мутант S4 або мутант S4/HRA або будь-яка їхня поєднання. Різні мутації в ALS, як відомо, забезпечують стійкість до різних гербіцидів і груп (і/або підгруп) гербіцидів; див., наприклад, Tranel і Wright (2002) *Weed Science* 50:700-712. Див., також, патент США № 5605011, 5378824, 5141870 і 5013659, кожний з яких включений у даний документ повністю в якості посилання. Див., також, SEQ ID NO:65, що містить, послідовність HRA сої; SEQ ID NO:66 утримуючу послідовність HRA кукурудзи; SEQ ID NO:67 утримуючу послідовність HRA *Arabidopsis*; і SEQ ID NO:86 утримуючу послідовність HRA, використовувану в бавовнику. Мутація HRA в ALS знаходить конкретне застосування в одному з варіантів здійснення винаходу. Мутація приводить до продукції поліпептиду ацетолактатсинтази, стійкого до щонайменше одному хімічному інгібітору ALS, у порівнянні з білком дикого типу. Наприклад, рослина, експресуюча поліпептид стійкості до інгібітору ALS, може бути стійким до сульфонілсечовини, імідазоліону, тріазолопіримідину, піримідинілокси(тіо)бензоатів, і/або гербіциду сульфоніламінокарбонілтріазоліону, доза яких у щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 125, 150, 200, 500 або 1000 раз вище, чим доза гербіциду, яка викличе ушкодження відповідної контрольної рослини. У деяких варіантах здійснення поліпептид стійкості до інгібітору ALS містить ряд мутацій. Додатково, рослини, що містять поліпептид стійкості до інгібітору ALS, можна одержувати шляхом селекції природних мутацій, що надають стійкість до гліфосату.

У деяких варіантах здійснення поліпептид стійкості до інгібітору ALS забезпечує стійкість до гербіцидів на основі сульфонілсечовини й імідазоліона. Гербіциди на основі сульфонілсечовини й імідазоліона інгібують ріст вищих рослин шляхом блокування ацетолактатсинтази (ALS), також відомої як синтетаза ацетогідроксикислот (AHAS). Наприклад, рослини, що містять конкретні мутації в ALS (наприклад, мутації S4 і/або HRA), толерантні відносно гербіцидів на основі сульфонілсечовини. Одержання стійких до сульфонілсечовини рослин і стійких до імідазоліону рослин більш докладно описане в патентах США №№ 5605011; 5013659; 5141870; 5767361; 5731180; 5304732; 4761373; 5331107; 5928937; і 5378824; і в міжнародній публікації WO 96/33270, які повністю включені в даний документ як посилання для всіх цілей. У конкретних варіантах здійснення поліпептид стійкості до інгібітору ALS включає стійку до сульфонамиду ацетолактатсинтазу (по-іншому відому, як стійка до сульфонамиду

синтетаза ацетогідроксикислот) або стійку до імідазолінону ацетолактатсинтазу (по-іншому відому, як стійка до імідазолінону синтетаза ацетогідроксикислот).

Інші приклади ознак стійкості до гербіциду, які можуть комбінуватися з подією, описуваному в даному документі, включають ознаки, що забезпечують стійкість рослини до щонайменше одному гербіциду, такого як, наприклад, рослина Brassica або мелкопелюстник канадський. Бур'яни, стійкі до гербіциду, відомі в даній галузі, оскільки є рослинами з мінливістю по стійкості до конкретних гербіцидів. Див., наприклад, Green and Williams, (2004) "Correlation of Corn (Zea mays) Inbred Response to Nicosulfuron and Mesotrione", постер, представлений на WSSA Annual Meeting в Kansas City, Missouri, лютий 9-12, 2004; Green, (1998) Weed Technology 12:474-477; Green and Ulrich, (1993) Weed Science 41:508-516. Ознака(-и), відповідальна(-и) за дані види стійкості, можна комбінувати з подією, описуваним у даному документі, шляхом селекції або іншими способами для надання рослини по винаходу, а також способів його застосування.

Подія, описувана в даному документі, може також сполучатися із щонайменше одним з інших ознак для одержання рослин по даному винаходу, які додатково містять різні необхідні поєднанням ознак, що включають у якості необмежуваних прикладів ознаки, бажані для використання у якості корму для тварин, такі як високий зміст олії (наприклад, патент США № 6232529); збалансований зміст амінокислот (наприклад, гордотіонінів (патенти США №№ 5990389; 5885801; 5885802 і 5703409; патент США № 5850016); високий рівень лізину в ячмені (Williamson, et al., (1987) Eur. J. Biochem. 165:99-106 і WO 98/20122) і високий рівень метіоніну в білках (Pedersen, et al., (1986) J. Biol. Chem. 261:6279; Kirihaara, et al., (1988) Gene 71:359 і Musumura, et al., (1989) Plant Mol. Biol. 12:123); підвищена засвоюваність (наприклад, модифікованих білків, що запасуються (патентна заявка США із серійним № 10/053410, зареєстрована 7 листопада 2001 року) і тіоредоксини (патентна заявка США із серійним № 10/005429, зареєстрована 3 грудня 2001 року); описи яких включені в даний документ як посилання. Необхідні поєднанням ознак також включають LLNC (низький зміст ліноленової кислоти; див., наприклад, Dyer, et al., (2002) Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:224-230) і OLCH (високий зміст олеїнової кислоти; див., наприклад, Fernandez-Moya, et al., (2005) J. Agric. Food Chem. 53:5326-5330).

Подія, описувана в даному документі, може також комбінуватися з іншими необхідними ознаками, такими як, наприклад, гени детоксикації фумонизину (патент США № 5792931), невірулентність і гени стійкості до захворювань (Jones, et al., (1994) Science 266:789; Martin, et al., (1993) Science 262:1432; Mindrinos, et al., (1994) Cell 78:1089) і ознаки, бажані для переробки або продуктів переробки, наприклад, модифіковані олії (наприклад, гени десатурази жирних кислот (патент США Number 5952544; WO 94/11516)); модифіковані крохмалі (наприклад, пірофосфорилази ADPG (AGРази), синтази крохмалю (SS), ферменти утвору розгалуженої структури крохмалю (SBE) і ферменти розщеплення розгалуженої структури крохмалю (SDBE)) і полімери або біопластики (наприклад, патент США № 5602321; бета-кетотіолаза, полігідроксибутиратсинтаза й ацетоацетил-CoA-редуктаза (Schubert, et al., (1988) J. Bacteriol. 170:5837-5847), знижена експресія полігідроксіалканоатів (PHA)); опис яких включені в даний документ як посилання. Також можна поєднувати стійкі до гербіциду полінуклеотиди з полінуклеотидами, що забезпечують агрономічні ознаки, такі як чоловіча стерильність (наприклад, див., патент США № 5583210), сила стебла, час цвітіння, або ознаки, пов'язані з технологією трансформації, такі як регуляція клітинного циклу або спрямована дія на гени (наприклад, WO 99/61619, WO 00/17364 і WO 99/25821), опису яких включені в даний документ в якості посилання.

В іншому варіанті здійснення подія, описувана в даному документі, може також комбінуватися з послідовністю Rcg1 або його біологічно активним варіантом або його фрагментом. Послідовність Rcg1 являє собою ген стійкості до стеблевої гнилі внаслідок антракноза в кукурудзи. Див., наприклад, патентні заявки США із серійним № 11/397153, 11/397275 і 11/397247, кожна з яких включена в даний документ як посилання.

Ці об'єднані поєднанням можуть створюватися будь-яким способом, включаючи в якості необмежуваних прикладів селекцію рослин по будь-якій загальноприйнятій методології або генетичну трансформацію. Якщо послідовності з'єднані генетичною трансформацією рослин, інтересуючі полінуклеотидні послідовності можна комбінувати в будь-який час і в будь-якому порядку. Ознаки можуть вводитися одномоментно по протоколу одночасної трансформації інтересуючими полінуклеотидами, наданими будь-який поєднанням касет для трансформації. Наприклад, якщо будуть уведено дві послідовності, вони можуть утримуватися в роздільних касетах для трансформації (транс) або втримуватися в одній касеті для трансформації (цис). Експресуючі послідовності можуть управлятися одним промотором або різними промоторами. У певних випадках може бути бажаним вводити касету для трансформації, яка буде пригнічувати

експресію інтересуючого полінуклеотида. Це можна поєднувати з будь-якою поєднанням інших експресуючих касет або гіперекспресуючих касет для утвору в рослини необхідної поєднанням ознак. Далі мається на увазі, що полінуклеотидні послідовності можуть поєднуватися в необхідної геномної локалізації з використанням сайт- специфічної системи репоєднанням.

5 Див., наприклад, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 і WO99/25853, кожна з яких включена в даний документ як посилання.

Застосовуваний у даному документі термін «полінуклеотид », як мається на увазі, не обмежує даний винахід полінуклеотидами, що містять ДНК . Фахівцям у даній ділянці зрозуміло, що полінуклеотиди можуть включати рибонуклеотиди й поєднанням рибонуклеотидів і дезоксирибонуклеотидів. Такі дезоксирибо-нуклеотиди й рибонуклеотиди включають природні молекули й синтетичні аналоги. Полінуклеотиди за винаходом також охоплюють усі форми послідовностей, включаючи в якості необмежуваних прикладів, одноланцюгові форми, двохланцюгові форми, шпильки, структури стебло-петля, і т.п.

Рослина Brassica DP-073496-4 містить експресуюча касету, що включає оптимізований полінуклеотид гліфосатуцетилтрансферази. Касета може включати 5'- і 3'-кінцеві регуляторні послідовності, функціонально пов'язані з полінуклеотидами *gluat*. «Функціонально зв'язаний», як передбачається, означає функціональний зв'язок між двома або більш елементами. Наприклад, функціональний зв'язок між інтересуючим полінуклеотидом і регуляторною послідовністю (тобто, промотором) є функціональним зв'язком, який забезпечує експресію інтересуючого полінуклеотида. Функціонально зв'язані елементи можуть бути суміжними або несуміжними. При використанні для посилання на сполучення двох кодуючих білок ділянок, під функціонально зв'язаними слід розуміти, що кодуючі ділянки перебувають в одній рамці зчитування. Касета може додатково містити щонайменше один додатковий ген, яким також трансформується організм. Альтернативно, додатковий(-і) ген(-и) може(-уть) надаватися в множинних експресуючих касетах. Така експресуюча касета надана з безліччю ділянок рестрикції й/або ділянок репоєднанням для вставки полінуклеотида під вплив регуляції транскрипції регуляторними ділянками. Експресуюча касета може додатково містити гени селективних маркерів.

Експресуюча касета в напрямку транскрипції 5'-3' може включати ділянку ініціації транскрипції й трансляції (тобто, промотор) кодувальну ділянку і ділянку, термінації транскрипції й трансляції, функціональні в рослинах. «Промотор» відноситься до нуклеотидної послідовності, здатної контролювати експресію кодуючої послідовності або функціональної РНК. В основному, кодуюча послідовність розташована в 3'-напрямку від промоторної послідовності. Промоторна послідовність може включати проксимальні й більш дистальні вищележачі елементи, причому останні часто позначають як енхансери. Таким чином, «енхансер» являє собою нуклеотидну послідовність, яка може стимулювати активність промотору й може бути елементом, властивим промотору вихідне, або може бути гетерологічним елементом, вбудованим для посилення активності або додання промотору тканинної специфічності. Промотори можуть відбуватися повністю з нативного гена або можуть складатися з різних елементів, що відбуваються з різних промоторів, що перебувають у природі або навіть утримуючих синтетичні нуклеотидні сегменти. Фахівцям у даній галузі слід розуміти, що різні промотори можуть управляти експресією гена в різних тканинах або типах клітин або на різних стадіях розвитку або у відповідь на різні умови навколишнього середовища. Промотори, які викликають експресію фрагмента нуклеїнової кислоти в багатьох типах клітин більшу частину часу, звичайно позначають як «конститутивні промотори». Постійно відкривають нові промотори різних типів, які можуть використовуватися в рослинних клітинах; численні приклади можна знайти в огляді Okamoto and Goldberg, (1989) Biochemistry of Plants 15:1-82. Далі мається на увазі, що оскільки в більшості випадків точні границі регуляторних послідовностей не повністю визначені, фрагменти нуклеїнової кислоти різної довжини можуть мати ідентичну промоторну активність.

Експресуючі касети також можуть містити 5'-кінцеві лідируючі послідовності. Такі лідируючі послідовності можуть діяти, підсилюючи трансляцію. Регуляторні ділянки (тобто, промотори, ділянки регуляції транскрипції, ділянки процесінг а або стабільності РНК, інтрони, сигнали поліаденілювання, ділянки термінації транскрипції й ділянки термінації трансляції) і/або кодувальну ділянку можуть бути нативними/аналогічними стосовно клітини-хазяїнові або друг до друга або можуть бути гетерологічними.

«Лідируюча послідовність трансляції» відноситься до нуклеотидної послідовності, розташованої між промоторною послідовністю гена й кодувальною послідовністю. Лідируюча послідовність трансляції присутня в повністю процесованій мРНК вище послідовності старту трансляції. Лідируюча послідовність трансляції може впливати на багато параметрів, включаючи процесінг первинного транскрипта в мРНК, стабільність мРНК і/або ефективність

трансляції. Описані приклади лідируючих послідовностей трансляції (Turner і Foster, (1995) Mol. Biotechnol. 3:225-236). «3'-Кінцеві не кодувальні послідовності» относятся к нуклеотидним послідовностям, лежачим ниже кодувальної послідовності, и включают послідовності розпознавання поліаденілювання и інші послідовності, кодувальні регуляторні сигнали, способні впливати на процесінг мРНК или на експресію гена. Сигнал поліаденілювання, як правило, характеризується впливом на додавання поліаденілових тяжей на 3'-кінець мРНК-попередника. Застосування різних 3'-кінцевих не кодуювальних послідовностей описано Ingelbrecht., (1989) Plant cell 1:671-680.

Застосовуваний у даному документі термін «гетерологічний» стосовно послідовності являє собою послідовність, яка походить із чужорідного виду, або якщо походить із того ж виду, по суті модифікована в порівнянні зі своєю нативною формою в композиції й/або в геномному локусі за допомогою навмисного втручання людини. Наприклад, промотор, функціонально пов'язаний з гетерологічним полінуклеотидом, походить із виду, відмінного від того, від якого відбувається даний полінуклеотид, або, якщо він походить із того ж аналогічного виду, одна або обидві послідовності по суті модифіковані від їхньої вихідної форми й/або геномного локусу, або промотор не є нативним промотором для функціонально зв'язаного полінуклеотида.

При одержанні експресуючої касети можна маніпулювати різними фрагментами ДНК, так що надаються послідовності ДНК у належній орієнтації й, при необхідності, у належній рамці зчитування. Для цього, при об'єднанні фрагментів ДНК можуть використовуватися адаптери або лінкери, або можуть задіятися інші маніпуляції для забезпечення зручних ділянок рестрикції, видалення зайвої ДНК, видалення ділянок рестрикції, або т.п. Для цієї мети може використовуватися мутагенез *in vitro*, відновлення праймерів, рестрикція, відпал, повторні заміни, наприклад, перестановки й трансверсії. Експресуюча касета також може включати ген селективного маркера для добору трансформованих клітин. Гени селективних маркерів використовують для добору трансформованих клітин або тканин.

Надані виділені полінуклеотиди, які можна використовувати в різних способах детектування й/або ідентифікації події Brassica DP-073496-4. «Виділений» або «очищений» полінуклеотид або його біологічно активна частина є, по суті або в основному, вільним від компонентів, які звичайно супроводжують полінуклеотид у або взаємодіють із ним у його природному оточенні. Таким чином, виділений або очищений полінуклеотид по суті вільний від іншого клітинного матеріалу або середовища для культивування при продукції рекомбінантними способами або по суті вільний від хімічних попередників або інших хімікатів при хімічному синтезі. Оптимально, «виділений» полінуклеотид вільний від послідовностей (необов'язково білок, що кодує, послідовностей), які в природі фланкують полінуклеотид (тобто, послідовностей, розташованих з 5' і 3'-кінців полінуклеотида) у геномній ДНК організму, з якого відбувається полінуклеотид. Наприклад, у різних варіантах здійснення виділений полінуклеотид може містити менш ніж приблизно 5 т.п.н., 4 т.п.н., 3 т.п.н., 2 т.п.н., 1 т.п.н., 0,5 т.п.н. або 0,1 т.п.н. нуклеотидної послідовності, яка в природі фланкують полінуклеотид у геномній ДНК клітин, з яких відбувається полінуклеотид.

У конкретних варіантах здійснення полінуклеотиди за винаходом містять з'єднуючу послідовність ДНК, наведену в SEQ ID NO: 2, або її варіанти й/або фрагменти, або з'єднуючу послідовність ДНК, наведену в SEQ ID NO: 12 і/або 13. В інших варіантах здійснення полінуклеотиди за винаходом містять з'єднуючу послідовність ДНК, наведену в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 і/або 19 або її варіанти й фрагменти. У конкретних варіантах здійснення по способах Детектування, описуваним у даному документі, ампліфікують полінуклеотид ділянку, що містить, сполучення специфічної події DP-073496-4. Фрагменти й варіанти з'єднуючої послідовності ДНК підходять для дискримінуючої ідентифікації події DP-073496-4. Як обговорювалося в іншій частині даного документа, такі послідовності знаходять застосування в якості праймерів й/або зондів.

В інших варіантах здійснення полінуклеотиди за винаходом містять полінуклеотиди, які можуть детектувати подію DP-073496-4 або ділянку, специфічну у відношенні DP-073496-4. Такі послідовності включають будь-який полінуклеотид, наведений в SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, або його варіанти й фрагменти. Фрагменти й варіанти полінуклеотиди, які детектують подію DP-073496-4 або ділянку, специфічну у відношенні DP-073496-4, підходять для дискримінуючої ідентифікації події DP-073496-4. Як обговорювалося в іншій частині даного документа, такі послідовності знаходять застосування в якості праймерів й/або зондів.

«Варіанти», як мається на увазі, означають по суті подібні послідовності. Для полінуклеотидів варіант включає полінуклеотид, що містить делеції (тобто, укорочення) з 5' і/або 3'-кінця; делецію й/або додавання одного або декількох нуклеотидів в один або кілька

внутрішніх ділянок нативного полінуклеотида й/або заміну одного або декількох нуклеотидів в одному або декількох ділянках нативного полінуклеотида.

Застосовуваний у даному документі термін «зонд» являє собою виділений полінуклеотид, до якого приєднана загальноприйнята детектируемая мітка або репортерна молекула, наприклад, радіоактивний ізотоп, ліганд, хемілюмінесцентний засіб, фермент, і т.д. Такий зонд комплементарен ланцюгу полінуклеотида-мишені. У випадку даного винаходу зонд комплементарен ланцюги виділеному ДНК із події Brassica DP-073496-4, з рослини Brassica або зі зразка, який включає ДНК від події. Зонди по даному винаходу включають не тільки дезоксирибонуклеїнову або рибонуклеїнову кислоти, але також поліаміди й інші матеріали зондів, які можуть специфічно детектувати присутність ДНК-послідовності-мишені.

Застосовувані в даному документі «праймери» є виділеними полінуклеотидами, які отжигаются з комплементарної ДНК-ланцюгом-мішенню шляхом гібридизації нуклеїнової кислоти з утвором гібрида між праймером і ДНК-ланцюгом-мішенню, потім продовжуються по ДНК-ланцюги-мишені полімеразой, наприклад, ДНК-полімеразой. Пари праймерів за винаходом відносяться до їхнього застосування для ампліфікації полінуклеотида-мишені, наприклад, шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або інших загальноприйнятих способів ампліфікації нуклеїнової кислоти. «ПЛР» або «полімеразна ланцюгова реакція» є способом, використовуваним для ампліфікації специфічних сегментів ДНК (див., патенти США №№ 4683195 і 4800159, включені в даний документ у якості посилання). Будь-яка поєднання праймерів можна використовувати так, що їх пари забезпечить детектування події DP-073496-4 або ділянки, специфічної для DP-073496-4.

Зонди й праймери мають достатню довжину нуклеотидної ланцюги для зв'язування із ДНК-послідовністю-мішенню й для специфічного детектування й/або ідентифікації полінуклеотида, що містить подію DP-073496-4. Установлене, що умови гібридизації або умови реакції для досягнення даного результату може визначати оператор. Ця довжина може бути будь-який, достатньої для обраного способу детектування. Загалом, використовують 8, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 нуклеотидів або більш або приблизно 11-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800 або більш нуклеотидів. Такі зонди й праймери можуть специфічно гібридизуватися з послідовністю-мішенню в умовах гібридизації з високою твердістю. Зонди й праймери по варіантах здійснення даного винаходу можуть характеризуватися повною ідентичністю послідовності ДНК суміжних нуклеотидів з послідовністю-мішенню, хоча загальноприйнятими способами можна конструювати зонди, які відрізняються від ДНК-послідовності-мишені й зберігають здатність до специфічного детектування й/або ідентифікації ДНК-послідовності-мишені. Таким чином, зонди й праймери можуть характеризуватися приблизно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більшою ідентичністю або комплементарністю послідовності у відношенні полінуклеотида-мишені, або можуть відрізнятися від послідовності-мишені на 1, 2, 3, 4, 5, 6 або більш нуклеотидів. Зонди можна використовувати в якості праймерів, але перші, загалом, сконструйовані для зв'язування із ДНК або РНК-мішенню й не використовуються в процесі ампліфікації. В одному з необмежуваних варіантів здійснення зонд може включати полінуклеотид, що кодує послідовність glyat4621 або будь-який її варіант або фрагмент.

Специфічні праймери можна використовувати для ампліфікації фрагмента інтеграції з утвором амплікона, який можна використовувати в якості «специфічного зонда» або який може сам детектуватися для ідентифікації події DP-073496-4 у біологічних зразках. Альтернативно, зонд за винаходом можна використовувати під час реакції ПЛР для забезпечення детектування події ампліфікації (тобто, зонд Taqman™ або зонд MGB, так звана ПЛР у реальному часі). Коли зонд гібридизується з полінуклеотидами біологічного зразка в умовах, які забезпечують зв'язування зонда зі зразком, дане зв'язування може детектуватися й у такий спосіб забезпечувати вказівку на присутність події DP-073496-4 у біологічному зразку. Така ідентифікація зв'язаного зонда описана в даній ділянці. В одному з варіантів здійснення винаходу специфічний зонд являє собою послідовність, яка в оптимізованих умовах специфічно гібридується з ділянкою в 5' або 3'-кінцевій фланкуючій ділянці події й також містить частина чужорідної ДНК у суміжному положенні стосовно неї. Специфічний зонд може включати послідовність на щонайменше 80%, від 80 до 85%, від 85 до 90%, від 90 до 95% і від 95 до 100% ідентичну (або комплементарну) специфічної ділянки події DP-073496-4.

Застосовуваний у даному документі термін «ампліфікована ДНК» або «амплікон» відноситься до продукту ампліфікації полінуклеотида-мишені, який є частиною матриці нуклеїнової кислоти. Наприклад, для визначення того, чи містить рослина Brassica, яке є результатом полового схрещування, подія DP-073496-4, ДНК, екстрагована зі зразка тканини

рослини Brassica, може зазнати способу полінуклеотидної ампліфікації, з використанням пари праймерів ДНК, яка включає перший праймер, що відбувається із фланкуючої послідовності, що прилягає до ділянки вставки вбудованої гетерологічної ДНК, і другий праймер, що відбувається із вбудованої гетерологічної ДНК для продукції амплікона, діагностичного відносно присутності ДНК події DP-073496-4. У специфічних варіантах здійснення амплікон включає з'єднуючий полінуклеотид DP-073496-4 (тобто, частина SEQ ID NO: 2, яка перекриває ділянку сполучення, таку як, наприклад, SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 і/або 19 або їх варіанти й фрагменти). Під «діагностичним» відносно події DP-073496-4 мається на увазі застосування будь-якого способу або аналізу, який відрізняє наявність або відсутність події DP-073496-4 у біологічному зразку, призначеному для аналізу. Альтернативно, другий праймер може походити із фланкуючої послідовності. В інших варіантах здійснення пари праймерів можуть походити із фланкуючої послідовності із двох сторін вбудованої ДНК, так що буде отриманий амплікон, який включає цілий вбудований полінуклеотид експресуючої конструкції, а також послідовність, що фланкуючу трансгенну вставку. Див., фігуру 3. Амплікон має потрібну довжину й має послідовність, яка також є діагностичною відносно події (тобто, містить з'єднуючу ДНК із події DP-073496-4). Амплікон може змінюватися в довжину від поєднанням пари праймерів плюс один нуклеотид до будь-якої довжини амплікона, який може виходити по протоколу ампліфікації ДНК. Один з пари праймерів, що відбуваються із фланкуючої послідовності, може бути локалізований на відстані від вбудованої послідовності ДНК, причому дана відстань може змінюватися від однієї пари нуклеотидних основ до границь можливостей реакції ампліфікації або приблизно до двадцяти тисяч пар нуклеотидних основ. Застосування терміна «амплікон» специфічно виключає димери праймерів, які можуть утворюватися при термальній реакції ампліфікації ДНК.

Способи одержання й застосування зондів і праймерів описані, наприклад, в Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^{sup}.nd ed, vol. 1-3, ed. Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989 (далі в даному документі, "Sambrook, et al, 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al., Greene Publishing і Wiley-Interscience, New York, 1992 (з періодичними відновленнями) (далі в даному документі, "Ausubel, et al. 1992") і Innis, et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Пари праймерів ПЛР можуть бути обрані з відомої послідовності, наприклад, з використанням комп'ютерної програми, призначеної для цієї мети, такий як інструмент для аналізу праймерів для ПЛР в Vector NTI version 6 (Informax Inc., Bethesda Md.); Primerselect (DNASTAR Inc., Madison, Wis.); і Primer (Version 0.5. COPYRGТ., 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Додатково, послідовність може бути віртуально сканована, а праймери ідентифіковані вручну з використанням вказівок, відомих фахівцеві в даній галузі.

Слід розуміти, що застосовуваний у даному документі термін «трансгенний» включає будь-яку клітину, клітинну лінію, калус, тканина, частину рослини або рослину, генотип якої був змінений присутністю гетерологічної нуклеїнової кислоти, що включає трансгени, змінені спочатку, а також створені шляхом полового схрещування або полового розмноження вихідних трансгенних організмів. Застосовуваний у даному документі термін «трансгенний» не охоплює зміни генома (хромосомні або внехромосомні) шляхом загальноприйнятих способів селекції рослин або шляхом природних подій, таких як випадкове перехресне запилення, інфекція нерекомбінантним вірусом, трансформація нерекомбінантною бактерією, нерекомбінантна транспозиція або спонтанна мутація.

«Трансформація» відноситься до переносу фрагмента нуклеїнової кислоти в геном організму хазяїна, що приводить до генетично стабільного спадкування. Організми-хазяї, що містять трансформовані фрагменти нуклеїнової кислоти, позначають як «трансгенні» організми. Приклади способів трансформації рослин включають опосередковану Agrobacterium трансформацію (De Blaere, et al., (1987) Meth. Enzymol. 143:277) і технологію трансформації прискореними частками або «генною гарматою» (Klein, et al, (1987) Nature (London) 327:70-73; патент США № 4945050, включений у даний документ як посилання). Додаткові способи трансформації описані нижче.

Таким чином, виділені полінуклеотиди за винаходом можуть вбудовуватися в рекомбінантні конструкції, як правило, конструкції ДНК, які здатні до введення в клітину-хазяїна й до реплікації в ній. Така конструкція може бути вектором, який включає систему реплікації й послідовності, здатні до транскрипції й трансляції з кодуєної поліпептид послідовності в даній клітині-хазяїні. Ряд векторів, що підходять для стабільної трансфекції рослинних клітин або для одержання трансгенних рослин, описані, наприклад, в Pouwels, et al., (1985; Supp. 1987) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Weissbach and Weissbach, (1989) Methods for Plant Molecular Biology

(Academic Press, New York) and Flevin, et al., (1990) Plant Molecular Biology Manual (Kluwer Academic Publishers). Як правило, рослинні експресуючі вектори включають, наприклад, один або кілька клонованих генів рослини під транскрипційним контролем 5' і 3'-кінцевих регуляторних послідовностей і доміантний селектируемый маркер. Такі рослинні експресуючі вектори також можуть містити промоторну регуляторну ділянку (наприклад, регуляторну ділянку індукуючої контрольованої або конститутивної, регульованої факторами середовища або розвитку або специфічної для клітини або тканеспецифічної експресії), ділянку старту ініціації транскрипції, ділянку зв'язування рибосоми, сигнал процесінг а РНК, ділянку термінації і транскрипції й/або сигнал поліаденілювання.

Надані різні способи й композиції ідентифікації події DP-073496-4. Такі способи знаходять застосування в ідентифікації й/або детектування події DP-073496-4 у будь-якому біологічному матеріалі. Такі способи включають, наприклад, способи підтвердження чистоти насіння і способи скринінга партії насіння на наявність події DP-073496-4. В одному з варіантів здійснення наданий спосіб ідентифікації події DP-073496-4 у біологічному зразку, і він включає контакт зразка з першим і другим праймером і ампліфікацію полінуклеотида, що містить специфічну ділянку DP-073496-4.

Біологічний зразок може включати будь-який зразок, у якому потрібно визначити, чи присутствует там ДНК, що містить подію DP-073496-4. Наприклад, біологічний зразок мог містити будь-який рослинний матеріал або матеріал, що містить або відбува з рослинного матеріала, необмежувальними прикладами якого являються їстівні або кормові продукти. Застосовуваний у даному документі термін «рослинний матеріал» відноситься до матеріалу, який виходить або походить із рослини або частини рослини. У конкретних варіантах здійснення біологічний зразок являє собою тканину Brassica.

Праймери й зонди, засновані на послідовностях фланкуючої ДНК і вставки, описаних у даному документі, можна використовувати для підтвердження (і якщо необхідно, для корекції) описаних послідовностей загальноприйнятими способами, наприклад, шляхом повторного клонування й секвенування таких послідовностей. Полінуклеотидні зонди й праймери по даному винаходу специфічно виявляють ДНК-послідовність-мішень. Для ідентифікації присутності в зразку ДНК із трансгенної події можна використовувати загальноприйнятий спосіб гібридизації або ампліфікації нуклеїнової кислоти для ідентифікації присутності ДНК від трансгенного рослини в зразку. Під «специфічним детектуванням» слід розуміти, що полінуклеотид можна використовувати в якості праймера для ампліфікації специфічної для DP-073496-4 ділянки, або полінуклеотид можна використовувати в якості зонда для гібридизації в жорстких умовах з полінуклеотидом з події DP-073496-4. Рівень або ступінь гібридизації, які забезпечують специфічне детектування події DP-073496-4 або специфічної ділянки події DP-073496-4, є достатніми для того, щоб відрізнити полінуклеотид зі специфічною ділянкою DP-073496-4 від полінуклеотида, що не містить даної ділянки, і за рахунок цього забезпечується ідентифікація, що дискримінує, події DP-073496-4. Під вираженням «характеризується достатньою ідентичністю або комплементарністю послідовності для забезпечення ампліфікації специфічної для DP-073496-4 події» мається на увазі послідовність, що характеризується щонайменше 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100% ідентичністю або комплементарністю відносно фрагмента або повнорозмірного полінуклеотида зі специфічної ділянки DP-073496-4.

Що стосується ампліфікації полінуклеотида-мішені (наприклад, шляхом ПЛР) з використанням конкретної пари праймерів для ампліфікації, «жорсткі умови» являють собою умови, які забезпечують гібридизацію пари праймерів з полінуклеотидом-мішенню, з яким буде зв'язуватися один праймер, що має відповідну послідовність дикого типу (або комплементарну їй), і інший праймер, що має відповідну до вставки DP-073496-4 послідовність ДНК, і, переважно, буде здійснюватися одержання продукту ампліфікації (амплікона), який можна ідентифікувати при наявності специфічної ділянки DP-073496-4 у термальній реакції ампліфікації ДНК. У підході ПЛР олігонуклеотидні праймери можуть конструюватися для застосування в реакціях ПЛР для ампліфікації специфічної ділянки DP-073496-4. Способи конструювання праймерів для ПЛР і клонування шляхом ПЛР, в основному, відомі в даній галузі й описані в Sambrook, et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York). Див. також, Innis, et al., eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods i Applications (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) PCR Strategies (Academic Press, New York) і Innis and Gelfand, eds. (1999) PCR Methods Manual (Academic Press, New York). Способи ампліфікації далі описані в патентах США №№ 4683195, 4683202 і в Chen, et al., (1994) PNAS 91:5695-5699. Ці способи, а також інші відомі в даній галузі способи ампліфікації ДНК можна використовувати в практичній реалізації варіантів здійснення

даного винаходу. Слід розуміти, що може знадобитися адаптувати ряд параметрів конкретного протоколу ПЛР до конкретних лабораторних умов, і їх можна злегка модифікувати й все-таки забезпечити одержання подібних результатів. Ці зміни можуть бути зрозумілі Фахівцеві в даній галузі.

5 Ампліфікований полінуклеотид (амплікон) може бути будь-якої довжини, яка забезпечує детектування події DP-073496-4 або специфічної ділянки DP-073496-4. Наприклад, амплікон може становити приблизно 10, 50, 100, 200, 300, 500, 700, 100, 2000, 3000, 4000, 5000 нуклеотидів у довжину або більш.

У конкретних варіантах здійснення детектують специфічну ділянку події DP-073496-4.

10 У способах за винаходом може використовуватися будь-який праймер, який забезпечує ампліфікацію й/або детектування специфічної ділянки DP-073496-4. Наприклад, у конкретних варіантах здійснення перший праймер включає фрагмент полінуклеотида з SEQ ID NO: 2 або 3, де перший або другий праймер характеризується достатньою ідентичністю або комплементарністю по послідовності у відношенні полінуклеотида для ампліфікації специфічної ділянки DP-073496-4. Пари праймерів може включати фрагмент SEQ ID NO: 2 або 15 3. В іншому варіанті здійснення пара праймерів містить перший праймер фрагмент, що включає, SEQ ID NO: 8, і другий праймер фрагмент, що включає, SEQ ID NO: 9 або 10; або, альтернативно, пара праймерів включає перший праймер фрагмент, що містить, SEQ ID NO: 9, і другий праймер фрагмент, що містить, SEQ ID NO: 8 або 10. Праймери можуть бути будь-якої 20 довжини, достатньої для ампліфікації специфічної ділянки DP-073496-4, включаючи, наприклад, щонайменше 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 або 30 або приблизно 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 нуклеотидів або більш. Додаткові праймери також наведені в даному документі в таблиці 11.

Як обговорювалося в іншому місці даного документа, може використовуватися будь-який 25 спосіб ампліфікації шляхом ПЛР події або специфічної ділянки DP-073496-4, включаючи, наприклад, ПЛР у реальному часі. Див., наприклад, Livak, et al., (1995a). Олігонуклеотиди із флуоресцентними барвниками на протилежних кінцях надають систему гасіння зондів для детектування продукту ПЛР і гібридизації нуклеїнової кислоти. PCR Methods and Applications. 4:357-362; патент США # 5538848; патент США № 5723591; Applied Biosystems User Bulletin No. 2, "Relative Quantitation of Gene Expression", P/N 4303859 і Applied Biosystems User Bulletin No. 5, "Multiplex PCR with Taqman VIC probes", P/N 4306236, кожний з яких включений у даний 30 документ як посилання.

Таким чином, у конкретних варіанти здійснення наданий спосіб детектування наявності Brassica з подією DP-073496-4 або його потомства в біологічному зразку. Спосіб включає (а) 35 екстракцію зразка ДНК із біологічного зразка; (b) надання пари праймерних молекул ДНК, спрямованих на вставку й/або місце сполучення; (c) надання умов реакції ампліфікації ДНК; (d) проведення реакції ампліфікації ДНК, із продукцією за рахунок цього ДНК-молекули-амплікона; і (e) детектування ДНК-молекули-амплікона, де детектування зазначеної ДНК-молекули-амплікона в реакції ампліфікації ДНК означає присутність події Brassica DP-073496-4. Для того, 40 щоб молекула нуклеїнової кислоти служила праймером або зондом, їй лише необхідно бути досить комплементарною по послідовності, щоб утворювати стабільну двохланцюгову структуру в конкретному використовуваному розчиннику й концентрації солей.

У способах гібридизації використовує весь полінуклеотид або його частина, яка селективно гібридується з полінуклеотидом-мішенню, що містять специфічну подію DP-073496-4. Під « 45 жорсткими умовами» або « жорсткими умовами гібридизації» мається на увазі посилання на умови для полінуклеотидного зонда, у яких зонд гібридується зі своєю послідовністю-мішенню в детектуємої більшій ступені, ніж з іншими послідовностями (наприклад, щонайменше, в 2 рази вище тла). Відносно ампліфікації полінуклеотида-мішені (наприклад, шляхом ПЛР) з використанням конкретної пари праймерів для ампліфікації, « жорсткі умови» є умовами, які 50 забезпечують гібридизацію пари праймерів з полінуклеотидом-мішенню, з яких один праймер характеризується відповідною послідовністю дикого типу, і інший праймер характеризується відповідною послідовністю ДНК вставки DP-073496-4. Жорсткі умови є залежними від послідовності й міняються в різних обставинах. Шляхом контролю твердості умов гібридизації й/або відмивання можуть ідентифікуватися послідовності-мішені, які на 100% комплементарни 55 зонду (гомологічне зондування). Альтернативно, твердість умов може підбиратися з допущенням деякої невідповідності послідовностей, так що будуть детектуватися більш низькі значення (гетерологічне зондування). Загалом, зонд становить менш ніж приблизно 1000 нуклеотидів у довжину або менш ніж 500 нуклеотидів у довжину.

Застосовувана в даному документі, по суті ідентична або комплементарна послідовність 60 являє собою полінуклеотид, який специфічно гібридується з комплементарною молекулою

нуклеїнової кислоти, з якої його порівнюють, в умовах високої твердості. Підходящі умови твердості, які сприяють гібридизації ДНК, наприклад, 6× хлорид натрію/цитрат натрію (SSC) приблизно при 45 °C, з наступним промиванням 2× SSC при 50 °C, відомі фахівцям у даній галузі, або їх можна знайти in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Як правило, жорсткі умови гібридизації й детектування є такими, що концентрація солей становить менш ніж приблизно 1,5 М іона Na, як правило, приблизно від 0,01 до 1,0 М іона Na (або інших солей) при pH від 7,0 до 8,3, і температура становить щонайменше приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, більш ніж 50 нуклеотидів). Жорсткі умови можуть також досягатися додаванням дестабілізаторів, таких як формамід. Типові умови низької твердості включають гібридизацію буферним розчином з концентрацією формаміду від 30 до 35%, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрію) при 37 °C, і промивання при концентрації від 1× до 2× SSC (20× SSC = 3,0 М NaCl/0,3 М трицитрат натрію) при температурі від 50 до 55 °C. Типові умови помірної твердості включають гібридизацію в розчині з концентрацією формаміду від 40 до 45%, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37 °C, і промивання при концентрації від 0,5× до 1× SSC при температурі від 55 до 60 °C. Типові умови з високою твердістю включають гібридизацію в 50% формаміді, 1 М NaCl, 1% SDS при 37 °C і промивання в 0,1× SSC при температурі від 60 до 65 °C. Необов'язково, буфери для промивання можуть включати приблизно від 0,1% приблизно до 1% SDS. Тривалість гібридизації, в основному, становить приблизно менш 24 годин, як правило, від приблизно 4 до приблизно 12 годин. Тривалість промивання становить, щонайменше, час, достатнє до досягнення рівноваги.

У реакціях гібридизації специфічність, як правило, є функцією промивань після гібридизації, причому критичними факторами є іонна сила й температура кінцевого розчину для промивання. Для гібридів ДНК-ДНК T_m може апроксимуватися з рівняння Meinkoth and Wahl, (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5\text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ форм.}) - 500/L$; у якому М являє собою молярність моновалентних катіонів, %GC являє собою процентну частку нуклеотидів гуанозину й цитозину в ДНК, % форм. є процентною часткою формаміду в розчині для гібридизації, і L являє собою довжину гібрида у парах основ. T_m являє собою температуру (при певній іонній силі й pH), при якій 50% комплементарної послідовності-мішені гібридується з повністю відповідним зондом. T_m знижується приблизно на 1 °C на кожен розбіжність; таким чином, T_m , гібридизація, і/або умови промивання можуть бути підібрані для гібридизації послідовностей необхідної ідентичності. Наприклад, якщо маються на увазі послідовності з ідентичністю >90%, T_m може знижуватися на 10 °C. Загалом, жорсткі умови обрані так, що вони на приблизно 5 °C нижче температури термального плавлення (T_m) конкретної послідовності й комплементарної їй послідовності при певній іонній силі й pH. Однак, у дуже жорстких умовах може використовуватися гібридизація й/або промивання при температурі на 1, 2, 3 або 4 °C нижче температури термального плавлення (T_m); у помірковано жорстких умовах може використовуватися гібридизація й/або промивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижче температури термального плавлення (T_m); в умовах низької твердості може використовуватися гібридизація й/або промивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижче температури термального плавлення (T_m). З урахуванням даного рівняння, композицій для гібридизації й промивання й необхідної T_m фахівцям буде зрозуміло, що зміни твердості розчинів для гібридизації й/або промивання по суті описані. Якщо необхідний ступінь розбіжності приводить до T_m менш ніж 45 °C (водяний розчин) або 32 °C (розчин формаміду), оптимально підвищити концентрацію SSC, так що можна буде використовувати більш високу температуру. Докладний посібник з гібридизації нуклеинових кислот наведено в Tijssen, (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry i Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York) i Ausubel, et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing i Wiley-Interscience, New York). Див., Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York) i Haymes, et al., (1985) In: *Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.

Полінуклеотид, як зазначено, є «комплементарним» у відношенні іншого полінуклеотида, якщо він характеризується комплементарністю. Застосовувані в даному документі молекули, як зазначено, проявляють «повну комплементарність», коли кожний нуклеотид однієї полінуклеотидної молекули комплементарен нуклеотиду іншої. Дві молекули зазначені як «мінімально комплементарні», якщо вони можуть гібридуватися одна з іншою зі стабільністю, достатньої для того, щоб вони залишалися гібридизованими один з одним, щонайменше, у загальноприйнятих умовах «низької твердості». Подібним образом, молекули вказуються як «комплементарні», якщо вони можуть гібридуватися одна з іншою зі стабільністю, достатньої

для того, щоб вони залишалися гібридизованими один з одним, щонайменше, у загальноприйнятих умовах « високої твердості».

Далі надані способи детектування присутності в зразку ДНК , відповідної до події DP-073496-4. В одному з варіантів здійснення способу включає (а) приведення біологічного зразка в контакт із поліонуклеотидним зондом, який гібридується в жорстких умови гібридизації із ДНК із події Brassica DP-073496-4 і специфічно детектує подію DP-073496-4; (b) вплив на зразок і зонд жорстких умов гібридизації й (c) детектування гібридизації зонда із ДНК , де детектування гібридизації вказує на присутність події DP-073496-4.

Для детектування специфічної ділянки DP-073496-4 або її амплікона можна використовувати різні способи, включаючи в якості необмежуваних прикладів, аналіз генетичного біта (Nikiforov, et al., (1994) *Nucleic Acid Res.* 22:4167-4175), у якому конструюють олігонуклеотид ДНК , який перекриває як прилягаючу фланкуючу послідовність ДНК , так і вбудовану послідовність ДНК . Олігонуклеотид імобілізують у лунках планшета з мікролунками. Після ПЛР ділянки інтересуючого (з використанням одного праймера із вбудованої послідовності й одного із прилягаючої фланкуючої послідовності) одноланцюговий продукт ПЛР може випалюватися з іммобілізованим олігонуклеотидом і служити в якості матриці для реакції продовження одної основи з використанням ДНК -полімерази й мічених ddNTP, специфічних у відношенні очікуваного наступної основи. Зчитування може бути флуоресцентним або заснованим на ELISA. Сигнал вказує на наявність вставки/фланкуючої послідовності через успішну ампліфікацію, гібридизацію й продовження на одну основу.

Інший спосіб детектування являє собою спосіб піросеквенування, як описано Winge, ((2000) *Innov. PHarma. Tech.* 00:18-24). По даному способу конструюють олігонуклеотид, який перекриває як прилягаючу ДНК , так і сполучення із вбудованої ДНК . Олігонуклеотид відпалюють з одноланцюговим продуктом ПЛР із ділянки інтересуючого (один праймер із вбудованої послідовності й один із фланкуючої послідовності) і інкубують у присутності ДНК -полімерази, АТФ, сульфурілази, люциферази, апірази, аденозин-5'-фосфосульфата й люциферину. dNTP додають індивідуально, і їхнє впровадження приводить до утвору свіфоновго сигналу, який вимірюють. Свіфоновий сигнал вказує на присутність вставки трансгена/фланкуючої послідовності внаслідок успішної ампліфікації, гібридизації й продовження на одне або кілька основ.

Поляризація флуоресценції, описана Chen, et al., ((1999) *Genome Res.* 9:492-498), також є способом, який можна використовувати для детектування амплікона по винаходу. По даному способу конструюють олігонуклеотид, який перекриває як прилягаючу ДНК , так і сполучення із вбудованої ДНК . Олігонуклеотид отжигают з одноланцюговим продуктом ПЛР із ділянки інтересуючого (один праймер із вбудованої послідовності й один із фланкуючої послідовності) і інкубують у присутності ДНК -полімерази й флуоресцентно мічених ddNTP. Продовження на одну основу приводить до вбудовування ddNTP. Вбудовування можна вимірювати як зміну поляризації з використанням флуориметра. Зміна поляризації вказує на присутність вставки трансгена/фланкуючої послідовності внаслідок успішної ампліфікації, гібридизації й продовження на одну основу.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) описаний як спосіб детектування й кількісного аналізу присутності послідовності ДНК , і він може бути повністю зрозумілий з інструкції, наданої виробником. У короткому викладі, конструюють олігонуклеотидний зонд FRET, який перекриває сполучення фланкуючої й вбудованої ДНК . Зонд FRET і праймери для ПЛР (один праймер із вбудованої послідовності й один із фланкуючої геномної послідовності) піддають циклічній реакції в присутності термостабільної полімерази й dNTP. Гібридизація зонда FRET приводить до розщеплення й вивільненню флуоресцентної складеної групи від складеної групи гасіння на зонді FRET. Флуоресцентний сигнал вказує на присутність вставки трансгена/фланкуючої послідовності внаслідок успішної ампліфікації й гібридизації.

Молекулярні бакени запропоновані для застосування при детектуванні послідовностей, як описано в Tyangi, et al., ((1996) *Nature Biotech.* 14:303-308). У короткому викладі, конструюють олігонуклеотидний зонд FRET, який перекриває сполучення фланкуючої й вбудованої ДНК . Унікальна структура зонда FRET забезпечує наявність у ньому вторинної структури, яка тримає флуоресцентну складену групу й складену групу гасіння в безпосередній близькості. Зонд FRET і праймери для ПЛР (один праймер із вбудованої послідовності й один із фланкуючої послідовності) піддають циклічній реакції в присутності термостабільної полімерази й dNTP. Після успішної ампліфікації ПЛР, гібридизація зонда FRET з послідовністю-мішенню приводить до порушення вторинної структури зонда й просторовому поділу флуоресцентної складеної групи й складеної групи гасіння. Результатом цього є флуоресцентний сигнал. Флуоресцентний

сигнал указує на присутність фланкуючої/вбудованої трансгенної послідовності внаслідок успішної ампліфікації й гібридизації.

Реакція гібридизації з використанням зонда, специфічного відносно послідовності, що перебуває усередині амплікона, є ще одним способом, використовуваним для детектування амплікона, продуцируемого в реакції ПЛР.

Застосовуваний у даному документі термін «набір» відноситься до набору реагентів для мети проведення варіантів здійснення способу по винаходу, більш конкретно, для ідентифікації й/або детектування події DP-073496-4 у біологічних зразках. Набір за винаходом можна використовувати для цілей контролю якості (наприклад, чистоти партій насіння), детектування події DP-073496-4 у рослинному матеріалі або матеріалі, що містить рослинний матеріал або, що відбувається з нього, наприклад, у якості необмежуваних прикладів, у харчових або кормових продуктах, а компоненти набору можуть специфічно підбиратися під ці цілі.

У конкретних варіантах здійснення надається набір для ідентифікації події DP-073496-4 у біологічному зразку. Набір включає перший і другий праймер, де перший і другий праймер ампліфікують полінуклеотид, що містить специфічну ділянку DP-073496-4. У додаткових варіантах здійснення набір також включає полінуклеотид для детектування специфічної ділянки DP-073496-4. Набір може включати, наприклад, перший праймер фрагмент, що містить, полінуклеотид SEQ ID NO: 2, 3, 8, 9, або 10, де перший або другий праймер характеризується гомологією або комплементарністю по послідовності, достатньої для ампліфікації зазначеної специфічної ділянки DP-073496-4. Наприклад, у специфічних варіантах здійснення перший праймер включає фрагменти полінуклеотиду SEQ ID NO: 2 або 3, де перший або другий праймер характеризується гомологією або комплементарністю по послідовності, достатньої для ампліфікації зазначеної специфічної ділянки DP-073496-4. В інших варіантах здійснення перший праймер включає фрагмент полінуклеотиду SEQ ID NO: 8, і другий праймер включає фрагмент SEQ ID NO: 9 або 10, де перший або другий праймер характеризуються гомологією або комплементарністю по послідовності, достатньої для ампліфікації зазначеної специфічної ділянки DP-073496-4. Альтернативно, перша пара праймерів містить SEQ ID NO: 9 або її варіант або фрагмент, і другий праймер містить SEQ ID NO: 8 або 10 або їх варіант або фрагмент. В інших варіантах здійснення пари праймерів може містити фрагмент SEQ ID NO: 2 і фрагмент SEQ ID NO: 3. Праймери можуть бути будь-якої довжини, достатньої для ампліфікації ділянки DP-073496-4, включаючи, наприклад, щонайменше 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 або 30 або приблизно 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 нуклеотидів або більш. Далі надані набори для детектування ДНК, що містять щонайменше один полінуклеотид, який може специфічно детектувати специфічну ділянку DP-073496-4 або вставку ДНК DP-073496-4, де зазначений полінуклеотид включає щонайменше одну молекулу ДНК із достатньою довжиною суміжних нуклеотидів, гомологічних або комплементарних у відношенні SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, або 27.

В одному з варіантів здійснення надається набір для ідентифікації події DP-073496-4 у біологічному зразку. Набір включає перший і другий праймер, де перший і другий праймер ампліфікують полінуклеотид, що містить специфічну ділянку DP-073496-4. У додаткових варіантах здійснення набір додатково містить полінуклеотид для детектування специфічної ділянки DP-073496-4. Таким чином, в одному необмежувачому варіанті здійснення, перший праймер включає перший фрагмент SEQ ID NO: 11, і другий праймер включає другий фрагмент SEQ ID NO: 11, де перший і другий праймери фланкують специфічну ділянку DP-073496-4 і характеризуються гомологією або комплементарністю по послідовності, достатньої для ампліфікації зазначеної специфічної ділянки DP-073496-4. Як такий, набір, таким чином, може включати перший праймер фрагмент, що містить, SEQ ID NO: 8, і другий праймер фрагмент, що містить, SEQ ID NO: 9; або перший або другий праймер, що містить щонайменше 8 наступних один за одним полінуклеотидів з SEQ ID NO: 11; або перший або другий праймер, що містить щонайменше 8 наступних один за одним полінуклеотидів з SEQ ID NO: 8 або 9.

У додаткових варіантах здійснення надані способи детектування поліпептиду гліфосат-N-ацетилтрансферази, що включають аналіз тканин рослини Brassica з використанням імунологічного аналізу із застосуванням специфічного антитіла або антитіл проти поліпептиду гліфосат-N-ацетилтрансферази. В інших варіантах здійснення надані способи детектування присутності полінуклеотида, що кодує поліпептид гліфосат-N-ацетилтрансферазу, і вони включають аналіз тканини рослини Brassica з використанням ампліфікації ПЛР. Крім того, надані набори для виконання таких способів.

Будь-які полінуклеотиди і їх фрагменти й варіанти, використовувани в способах і композиціях по винаходу, можуть характеризуватися ідентичністю послідовності відносно ділянки трансгенної вставки події, що з'єднує послідовності події DP-073496-4 або ділянки вставки в

поєднанням з ділянкою фланкуючої послідовності події DP-073496-4. Відомі способи визначення взаємини різних послідовностей. Застосовувана в даному документі «референсна послідовність» являє собою певну послідовність, застосовувану як основу для порівняння послідовностей. Референсна послідовність може бути підмножиною з певної послідовності або цілою певною послідовністю; наприклад, вона може представляти сегмент повнорозмірної послідовності кДНК або гена, або повну послідовність кДНК або гена. Застосовуваний у даному документі термін «вікно порівняння» посилається на суміжний і певний сегмент полінуклеотидної послідовності, у якому полінуклеотидна послідовність у вікні порівняння може включати додавання або делеції (тобто, пропуски) у порівнянні з референсною послідовністю (яка не включає додавання або делеції) для оптимального вирівнювання двох полінуклеотидів. В основному, вікно порівняння становить щонайменше 20 суміжних нуклеотидів у довжину й необов'язково може становити 30, 40, 50, 100 нуклеотидів або більш. Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що щоб уникнути високої подібності з референсною послідовністю внаслідок включення пропусків у полінуклеотидної послідовності, як правило, уводять штраф за пропуск і віднімають із числа збігів.

Способи вирівнювання послідовностей для їхнього порівняння добре відомі в даній галузі. Таким чином, визначення процентної ідентичності послідовності між будь-якими двома послідовностями може виконуватися з використанням математичного алгоритму. Необмежуючі приклади таких математичних алгоритмів являють собою алгоритм Myers and Miller, (1988) CABIOS 4:11-17; алгоритм локального вирівнювання Smith, et al., (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; алгоритм глобального вирівнювання Needleman and Wunsch, (1970) J. Mot. Biol. 48:443-453; спосіб пошуку локального вирівнювання Pearson and Lipman, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; алгоритм Karlin and Altschul, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, модифікований Karlin and Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Комп'ютерні реалізації цих математичних алгоритмів можуть використовуватися для порівняння послідовностей з метою визначення ідентичності послідовності. Такі реалізації як необмежуючі приклади включають: CLUSTAL у програмі PC/Gene (доступна від Intelligentics, Mountain View, California); програму ALIGN (Version 2.0) і GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA і TFASTA в GCG Wisconsin Genetics Software Package, Version 10 (доступний від Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USA). Вирівнювання з використанням цих програм можна проводити, застосовуючи параметри за замовчуванням. Програма CLUSTAL добре описана Higgins, et al., (1988) Gene 73:237-244 (1988); Higgins, et al., (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet, et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang, et al., (1992) CABIOS 8:155-65 і Pearson, et al., (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331. Програма ALIGN заснована на алгоритмі Myers and Miller, (1988) вище. Таблицю ваг залишків PAM120, штраф за продовження пропуску 12 і штраф за пропуск 4 можна використовувати для програмі ALIGN при порівнянні амінокислотних послідовностей. Програмі BLAST від Altschul, et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403 засновані на алгоритмі Karlin and Altschul, (1990) вище. Нуклеотидні пошуки BLAST можна проводити програмою BLASTN, коефіцієнт = 100, довжина слова = 12, для одержання нуклеотидних послідовностей, гомологічних нуклеотидної послідовності, що кодує білок по винаходу. Білкові пошуки BLAST можна проводити програмою BLASTX, коефіцієнт = 50, довжина слова = 3, для одержання амінокислотних послідовностей, гомологічних білку або поліпептиду по винаходу. Для одержання вирівнювань із пропусками з метою порівняння можна використовувати Gapped BLAST (в BLAST 2.0), як описано в Altschul, et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Альтернативно, PSI-BLAST (в BLAST 2.0) можна використовувати для проведення ітеративного пошуку, що виявляє віддалені взаємини між молекулами. Див., Altschul, et al., (1997) вище. При використанні BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST можна використовувати параметри за замовчуванням відповідних програм (наприклад, BLASTN для нуклеотидних послідовностей, BLASTX для білків). Див. www.ncbi.nlm.nih.gov. Вирівнювання також можна проводити вручну шляхом перегляду.

Якщо не зазначене інше, значення ідентичності/подібності послідовності, надані в даному документі, відносяться до значення, отриманого з використанням GAP версії 10 з використанням наступних параметрів: % ідентичності й % подібності для нуклеотидної послідовності з використанням ваги пропуску 50 і ваги довжини 3, і оцінної матриці `pnwsgapdna.cmp`; % ідентичності й % подібності для амінокислотної послідовності з використанням ваги пропуску 8 і ваги довжини 2, і оцінної матриці BLOSUM62, або з використанням будь-якого еквівалента даної програми. Під « еквівалентною програмою» мається на увазі будь-яка програма порівняння послідовностей, яка генерує для будь-яких двох інтересуючих послідовностей вирівнювання, що містить збіг ідентичних нуклеотидів або

амінокислотних залишків і процентної ідентичності послідовності, при порівнянні з відповідним вирівнюванням за допомогою GAP версії 10.

В GAP застосовується алгоритм Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453, для пошуку вирівнювання двох повнорозмірних послідовностей, у якому доведено до максимуму число збігів і до мінімуму число пропусків. GAP урахує всі можливі положення вирівнювання й пропуску й створює вирівнювання з максимальним числом співпадаючих основ і з мінімальним числом пропусків. Це забезпечується наданням штрафу за створення пропуску й штрафу за продовження пропуску в одиницях співпадаючих основ. GAP повинен додавати коефіцієнт за кожне число збігів штрафів за створення пропуску для кожного пропуску, що вбудовується. Якщо обраний штраф за продовження пропуску перевищує нуль, GAP, крім того, повинен додавати коефіцієнт за кожний пропуск, убудований по довжині пропуску з його початку. Значення за замовчуванням штрафу за створення пропуску й штрафу за продовження пропуску у версії 10 GCG Wisconsin Genetics Software Package для білкових послідовностей рівні 8 і 2, відповідно. Для нуклеотидних послідовностей штраф за створення пропуску за замовчуванням рівний 50, тоді як штраф за продовження пропуску за замовчуванням рівний 3. Штрафи за створення пропуску й продовження пропуску можна виражати як ціле число, обране із групи цілих чисел, що полягає від 0 до 200. Таким чином, наприклад, штрафи за створення пропуску й продовження пропуску можуть становити 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 або більш.

GAP є одним із представників групи кращих програм для вирівнювання. У цій групі може бути багато представників, але жоден з них не характеризується кращою якістю. GAP проявляє чотири ознаки добротності вирівнювання: Якість, Відношення, Ідентичність і Подібність. Якість являє собою метрику, доведену до максимуму при вирівнюванні послідовностей. Відношення являє собою Якість, розділене на число основ більш короткого сегмента. Процентна Ідентичність являє собою відсоток символів, які дійсно збігаються. Процентна Подібність являє собою відсоток символів, які подібні. Символи, що лежать напроти пропусків, ігноруються. Подібність налічується, коли значення оцінної матриці для пари символів перевищує або рівно 0,50, що є порогом подібності. Оцінна матриця, застосовувана у версії 10 GCG Wisconsin Genetics Software Package, являє собою BLOSUM62 (див., Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

Застосовуваний у даному документі термін «ідентичність послідовності» або «ідентичність» у відношенні двох полінуклеотидів або поліпептидних послідовностей посиляється на залишки у двох послідовностях, які збігаються при вирівнюванні на максимальну відповідність у межах встановленого вікна порівняння. Коли процентну ідентичність послідовностей використовують по відношенню к білкам, встановлене, що положення залишків, які не ідентичні, часто відрізняються консервативними амінокислотними замінами, де амінокислотні залишки замінені іншими амінокислотними залишками з подібними хімічними властивостями (наприклад, заряд або гідрофобність) і, таким чином, не міняють функціональних властивостей молекули. Коли послідовності відрізняються консервативними замінами, процентна ідентичність послідовності може підвищуватися для корекції консервативної природи заміни. Послідовності, які відрізняються такими консервативними замінами, зазначені, що як володіючи «подібністю послідовності» або «подібністю». Засоби для такого настроювання добре відомі фахівцям у даній галузі. Як правило, вони використовують облік для консервативних заміни, як часткове, а не повна невідповідність, з підвищенням у такий спосіб процентної ідентичності послідовності. Таким чином, наприклад, там де ідентична амінокислота одержує коефіцієнт 1, і неконсервативна заміна одержує коефіцієнт що дорівнює нулю, консервативна заміна одержує коефіцієнт між нулем і 1. Підрахунок коефіцієнтів консервативних заміни розраховується, наприклад, за допомогою реалізації в програмі PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

Застосовуваний у даному документі термін «процентна ідентичність послідовностей» представляє значення, обумовлене порівнянням двох оптимально вирівняних послідовностей за допомогою вікна порівняння, де частина полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може містити додавання або делеції (тобто, пропуски) у порівнянні з референсною послідовністю (яка не містить додавання або делеції) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Процентну частку обчислюють визначенням числа положень, у яких має місце ідентична основа нуклеїнової кислоти або ідентичний амінокислотний залишок в обох послідовностях з одержанням числа співпадаючих положень, ділячи число співпадаючих положень на загальне число положень у вікні порівняння й множаючи результат на 100 з одержанням процентної частки ідентичності послідовності.

Даний винахід відноситься до способів контролю бур'янів на оброблюваних землях, запобігання розвитку або появи на оброблюваних землях бур'янів, стійких до гербіциду, продукції культури й підвищення безпеки. Термін «контроль» і його похідні, наприклад, як «контроль бур'янів» відноситься до одного або декільком з інгібування росту, дозрівання, розмноження й/або поширення й/або зі знищення, видалення, руйнування або іншого способу зменшення зустрічальності й/або активності бур'яну.

Застосовуваний у даному документі термін «оброблювані землі» включає будь-яку ділянку, у якій їсти намір вирощувати рослину. Такі оброблювані землі як необмежуючі приклади включають поле, на якому культивується рослина (наприклад, нива, застава, поле з деревами, керований ліс, поле для культивування фруктів і овочів, і т.д.), теплицю, вегетаційну камеру, і т.д.

Способи за винаходом включають засаджування оброблюваних земель насіннями або рослинами Brassica DP-073496-4 і, у конкретних варіантах здійснення, нанесення на культуру, насіння, бур'яни або на оброблювані землі ефективною кількості інтересуючого гербіциду. Установлене, що гербіцид може наноситися до або після посадки культури на оброблювані землі. Такі нанесення гербіциду можуть включати нанесення гліфосату.

В одному з варіантів здійснення спосіб контролю бур'янів включає посадку на землі насінь або рослин Brassica DP-073496-4 і на нанесення на культуру, частину культивуємих рослин, насіння зазначеної культури або на оброблювані землі з даною культурою ефективною кількості гербіциду, де зазначене ефективна кількість включає кількість, яка не переноситься другою контрольною культурою при нанесенні на другу культуру, частину культивуємих рослин, насіння зазначеної культури або на оброблювані землі з даною культурою, де зазначена друга контрольна культура не експресує полінуклеотид GLYAT.

В іншому варіанті здійснення спосіб контролю бур'янів включає посадку на землі насінь або рослин Brassica DP-073496-4 і на нанесення на культуру, частину культивуємих рослин, насіння зазначеної культури або на оброблювані землі з даною культурою ефективною кількості гербіциду гліфосату, де зазначене ефективна кількість включає рівень, який перебуває вище рекомендованого етикеткою рівня застосування в даній культурі, де зазначене ефективна кількість переноситься при нанесенні на культуру Brassica DP-073496-4, частина культивуємих рослин, насіння або на оброблювані землі з даною культурою.

«Контроль» або «контрольна рослина» або «клітина контрольної рослини» надає референсну точку для виміру змін фенотипу випробуваної рослини або рослинної клітини, і може являти собою будь-яка підходящу рослину або рослинну клітину. Контрольна рослина або рослинна клітина може включати, наприклад: (а) рослину або клітину дикого типу, тобто, того ж генотипу, що й вихідний матеріал для генетичних змін, які привели до утвору випробуваної рослини або клітини; (b) рослину або клітину того ж генотипу, що й вихідний матеріал, але трансформовану нульовою конструкцією (тобто, конструкцією, яка не виявляє відомої дії на інтересуючу ознаку, наприклад, конструкцією утримуючою маркерний ген); (с) рослину або рослинну клітину, яка не трансформована і є результатом розщеплення потомства випробуваної рослини або рослинної клітини; (d) рослину або рослинну клітину, яка генетично ідентична випробуваній рослині, але не піддана тієї ж обробці (наприклад, обробці гербіцидом), як випробувана рослина або рослинна клітина; (е) сама випробувана рослина або рослинна клітина в умовах, у яких не експресується інтересуючий ген, або (f) сама випробувана рослина або рослинна клітина в умовах, у яких воно не піддане конкретній обробці, такий як, наприклад, обробці гербіцидом або поєднанням гербіцидів і/або інших хімікатів. У деяких випадках контрольна підходяща рослина або контрольна рослинна клітина може мати відмінний від випробуваної рослини або рослинної клітини генотип, але може мати подібні властивості чутливості до гербіциду вихідного матеріалу, підданому генетичному(-им) зміні(-ам), результатом чого стала випробувана рослина або клітина (див., наприклад, Green, (1998) Weed Technology 12:474-477; Green і Ulrich, (1993) Weed Science 41:508-516). В інших варіантах здійснення як контролю можна використовувати нульовий результат розщеплення, оскільки такі рослини є генетично ідентичними у відношенні DP-073496-4 за винятком наявності трансгенної вставки ДНК.

Класифікація гербіцидів (тобто, угруповання гербіцидів на класи й підкласи) добре відома в даній галузі й включає класифікацію HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) і WSSA (Weed Science Society of America) (див. також, Retzinger and Mallory-Smith, (1997) Weed Technology 11:384-393). Скорочена версія класифікації HRAC (із замітками щодо відповідних груп WSSA) наведена нижче в таблиці 1.

Гербіциди можуть класифікуватися по їхньому способу дії й/або місцю дії й також можуть класифікуватися за часом, коли їх наносять (наприклад, предвсходові або післявсходові), по

способу нанесення (наприклад, нанесення на листи або нанесення на ґрунт) або по тому, як вони засвоюються або впливають на рослину. Наприклад, тифенсульфурон-метил і трибенурон-метил наносяться на листя культури, і в основному, метаболізуються там, тоді як римсульфурон і хлоримурон-етил, в основному, засвоюються через коріння й листя рослини.

5 «Спосіб дії», загалом, відноситься до метаболічному або фізіологічному процесу усередині рослини, який інгібується або інакше послабляється гербіцидом, тоді як «місце дії», загалом, відноситься до фізичного розташування або біохімічної ділянки в рослині, де діє або безпосередньо взаємодіє гербіцид. Гербіциди можуть класифікуватися різними способами, включаючи спосіб дії й/або місце дії (див., наприклад, таблицю 1).

10 Часто ген стійкості до гербіциду, який забезпечує стійкість до конкретного гербіциду або іншому хімічній речовині в експресуючій його рослині, також забезпечує стійкість до інших гербіцидів або хімічних речовин того ж класу або підкласу, наприклад, класу або підкласу, наведеного в таблиці 1. Таким чином, у деяких варіантах здійснення винаходу трансгенна рослина за винаходом стійка більш ніж до одного гербіциду або хімічній речовині того ж класу або підкласу, такому як, наприклад, інгібітор PPO, сульфонілсечовина або синтетичний ауксин.

15 Як правило, рослини по даному винаходу можуть переносити обробку різними типами гербіцидів (тобто, гербіцидів, що мають різні способи дії й/або різні ділянки дії), а також більш високими кількостями гербіцидів, у порівнянні з раніше відомими рослинами, із забезпеченням за рахунок цього поліпшених стратегій керування бур'янами, які рекомендуються для зниження появи й переваги стійких до гербіциду бур'янів. Конкретні поєднання гербіцидів можуть використовуватися для ефективного контролю бур'янів.

20 Таким чином, винахід надає трансгенна рослина Brassica, яке можна вибирати для застосування у виробництві сільськогосподарських культур, заснованому на перевазі в галузі, де планується вирощувати трансгенну культуру, стійких до гербіцидів бур'янів. У даній галузі відомі способи оцінки стійкості до гербіцидів різних видів бур'янів. У даній галузі також відомі способи керування бур'янами, такі як, наприклад, ротація культур з використанням культури, стійкої до гербіциду, до якого не стійкі місцеві види бур'янів. Ряд організацій займаються моніторингом і повідомляють громадськість про зустрічальність і характеристики стійких до гербіцидів бур'янів, у тому числі Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), Weed Science Society of America і різні державні агентства (див., наприклад, коефіцієнти стійкості до гербіцидів різних широколистих бур'янів від 2004 Illinois Agricultural Pest Management Handbook), і фахівець у даній галузі може застосовувати дану інформацію для визначення комбінацій культур і гербіцидів, які слід використовувати в конкретній місцевості.

30 Ці організації також публікують ради й керівництва для запобігання розвитку й/або появи стійких до гербіцидів бур'янів і контролю їх поширення (див., наприклад, Owen and Hartzler, (2004), 2005 Herbicide Manual for Agricultural Professionals, Pub. WC 92 Revised (Iowa State University Extension, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa); Weed Control for Corn, Brassicas, and Sorghum, Chapter 2 °F "2004 Illinois Agricultural Pest Management Handbook" (University of Illinois Extension, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois); Weed Control Guide for Field Crops, MSU Extension Bulletin E434 (Michigan State University, East Lansing, Michigan)).

Таблиця 1

Скорочена версія класифікації гербіцидів HRAC

I. Інгібітори ALS (група 2 WSSA)

A. Сульфонілсечовини

1. Азимсульфурон
2. Хлоримурон-етил
3. Метсульфурон-метил
4. Никосульфурон
5. Римсульфурон
6. Сульфометурон-метил
7. Трифенсульфурон-метил
8. Трибенурон-метил
9. Амідосульфурон
10. Бенсульфурон-метил
11. Хлорсульфурон
12. Циносульфурон
13. Циклосульфамурон

14. Етаметсульфурон-метил
15. Етокисульфурон;
16. Флазасульфурон
17. Флупірсульфурон-метил
18. Форамсульфурон
19. Імазосульфурон
20. Йодосульфурон-метил
21. Мезосульфурон-метил
22. Оксасульфурон
23. Примисульфурон-метил
24. Просульфурон
25. Піразосульфурон-етил
26. Сульфосульфурон
27. Тріазосульфурон
28. Трифлуксисульфурон
29. Трифлусульфурон-метил
30. Тритосульфурон
31. Галосульфурон-метил
32. Флуцетосульфурон
- В. Сульфоніламінокарбонілтріазолінони
 1. Флукарбазон
 2. Прокарбазон
- С. Тріазолопіримідини
 1. Клорансулам-метил
 2. Флуметсулам
 3. Диклосулам
 4. Флорасулам
 5. Метосулам
 6. Пеноксулам
 7. Піроксулам
- Д. Піримідинілокси(тіо)бензоати
 1. Біспірибак
 2. Пірифталід
 3. Пірибензоксим
 4. Піритіобак
 5. Піримінобак-метил
- Е. Імідазолінони
 1. Імазапір
 2. Імазетапір
 3. Імазаквін
 4. Імазапик
 5. Імазаметабенз-метил
 6. Імазамокс
- II. Інші гербіциди - активні інгредієнти/Додаткові способи дії
- А. Інгібітори ацетил-СоА-карбоксилази (АССази)
(група 1 WSSA)
 1. Арилоксифеноксипропіонати («FOP»)
 - a. Квізалофоп-Р-етил
 - b. Диклофоп-метил
 - c. Клодинафоп-пропаргил
 - d. Феноксапроп-Р-етил
 - e. Флуазифоп-Р-бутил
 - f. Пропаквізафоп
 - g. Галоксифоп-Р-метил
 - h. Цигалофоп-бутил
 - i. Квізалофоп-Р-Етил
 2. Циклогександіони («DIM»)
 - a. Аллоксидим
 - b. Бутроксидим
 - c. Клетодим

- d. Циклоксидим
- e. Сетоксидим
- f. Тепралоксидим
- g. Тралкоксидим
- B. Інгібітори фотосистеми II - група C1 HRAC/група 5 WSSA
- 1. Тріазини
- a. Аметрин
- b. Атразин
- c. Ціаназин
- d. Десметрин
- e. Диметаметрин
- f. Прометон
- g. Прометрин
- h. Пропазин
- i. Симазин;
- j. Симетрин
- k. Тербуметон;
- l. Тербутилазин
- m. Тербутрин
- n. Триетазин
- 2. Тріазинони
- a. Гексазинон
- b. Метрибузин
- c. Метамітрон
- 3. Тріазолінон
- a. Амікарбазон
- 4. Урацили
- a. Бромацил
- b. Ленацил
- c. Тербацил
- 5. Піридазинони
- a. Піразон
- 6. Фенілкарбамати
- a. Десмедифам
- b. Фенмедифам
- C. Інгібітори фотосистеми II - Група C2 HRAC/Група 7 WSSA
- 1. Сечовини
- a. Флуометурон
- b. Лінурон
- c. Хлорбромурон
- d. Хлортолурон
- e. Хлорксурон
- f. Димефурон
- g. Діурон
- h. Етидимурон
- i. Фенурон
- j. Ізопротурон
- k. Ізоурон
- l. Метабензтіазурон
- m. Метобромурон
- n. Метоксурон
- o. Монолинурон
- p. Небурон
- q. Сидурон
- r. Тебутіурон
- 2. Аміді
- a. Пропаніл
- b. Пентанохлор
- D. Інгібітори фотосистеми II - Група 33 HRAC/Група 6 WSSA
- 1. Нітрили

- a. Бромфеноксим
- b. Бромоксиніл
- c. Бромоксиніл

- 2. Бензотіадіазинон (Бентазон)
 - a. Бентазон
- 3. Фенілпіридазини
 - a. Піридат
 - b. Піридафол
- E. Фотосистема-I - відвід електрона (біпіридиліуми)
(Група WSSA 22)
 - 1. Дикват
 - 2. Паракват
- F. Інгібітори PPO (протопорфіриногеноксидази) (Група 14 WSSA)
 - 1. Дифенілефири
 - a. Ацифлуорфен-Na
 - b. Біфенокс
 - c. Хлометоксифен
 - d. Фторглікофен-етил
 - e. Фомесафен
 - f. Галосафен
 - g. Лактофен
 - h. Оксифлуорфен
 - 2. Фенілпразоли
 - a. Флуазолат
 - b. Пірафлуфен-етил
 - 3. N-Фенілфталіміди
 - a. Цинидон-етил
 - b. Флуміоксазин
 - c. Флумиклорак-пентил
 - 4. Тіадіазоли
 - a. Флутіацет-метил
 - b. Тидіазимн
 - 5. Оксадіазоли
 - a. Оксадіазон
 - b. Оксадіаргил
 - 6. Тріазолінони
 - a. Карфентразон-етил
 - b. Сульфентразон
 - 7. Оксазоліндиніони
 - a. Пентоксазон
 - 8. Піримідиндіони
 - a. Бензфендізон
 - b. Бутафеницил
 - 9. Інші
 - a. Піразогил
 - b. Профлуазол
- G. Знебарвлення: інгібування біосинтезу каротиноїдів на стадії фітоіндесатурази (PDS)
(Група 12 WSSA)
 - 1. Піридазинони
 - a. Норфлуразон
 - 2. Піридинкарбоксаміди
 - a. Дифлуфеникан
 - b. Піколинафен
 - 3. Інші
 - a. Бефлубутамід
 - b. Флуридон
 - c. Флурохлоридон
 - d. Флуртамон
- H. Знебарвлення: інгібування

4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази (4-HPPD) (Група 28 WSSA)

1. Трикетони

- a. Мезотріон
- b. Сулькотріон
- c. Топремезон
- d. Темторіон

2. Ізоксазоли

- a. Ізоксахлортол
- b. Ізоксафлутол

3. Піразоли

- a. Бензофенап
- b. Піразоксифен
- c. Піразолінат

4. Інші

- a. Бензобіциклон

I. Знебарвлення: інгібування біосинтезу каротиноїдів (невідома мішень) (Групи 11 і 13 WSSA)

1. Тріазоли (Група 11 WSSA)

- a. Амїтрол

2. Ізоксазолідинони (Група 13 WSSA)

- a. Кломазон

3. Сечовини

- a. Флуометурон

3. Дифенілефир

- a. Аклонифен

J. Інгібування EPSP-Синтази

1. Гліцини (Група 9 WSSA)

- a. Гліфосат

- b. Сульфосат

K. Інгібування глутамінсинтетази

1. Фосфінові кислоти

- a. Глуфосинат-амоній

- b. Біалафос

L. Інгібування DHP (дигідроптероат)синтази (Група 18 WSSA)

1 Карбамати

- a. Азулам

M. Інгібування складання мікротрубочок (Група 3 WSSA)

1. Динітроаніліни

- a. Бенфлуралін

- b. Бутралін

- c. Динтрамін

- d. Еталфлуралін

- e. Оризалін

- f. Пендиметалін

- g. Трифлуралін

2. Фосфороамідати

- a. Ампрофос-метил

- b. Бутаміфос

3. Піридини

- a. Дитіопір

- b. Тіазопір

4. Бензаміди

- a. Пронамід

- b. Тебутам

5. Бензолдикарбонові кислоти

- a. Хлортал-Диметил

N. Інгібування мітозу/організації мікротрубочок (Група 23 WSSA)

1. Карбамати

- a. Хлорпрофам

- b. Профам

- c. Карбетамід
- O. Інгібування розподілу клітин (Інгібування синтезу жирних кислот з дуже довгим ланцюгом, як передбачуваний механізм; група 15 WSSA)
 - 1. Хлорацетаміди
 - a. Ацетохлор
 - b. Алахлор
 - c. Бутахлор
 - d. Диметахлор
 - e. Диметанамід
 - f. Метазахлор
 - g. Метолахлор
 - h. Петоксамід
 - i. Претилахлор
 - j. Пропахлор
 - k. Пропізохлор
 - l. Тенилхлор
 - 2. Ацетаміди
 - a. Дифенамід
 - b. Напропамід
 - c. Напроанілід
 - 3. Оксіяцетаміди
 - a. Флуфенацет
 - b. Мефенацет
 - 4. Тетразолінони
 - a. Фентразамід
 - 5. Інші
 - a. Анілофос
 - b. Кафенистрол
 - c. Інданофан
 - d. Піперофос
- P. Інгібування синтезу клітинної стінки (целюлози)
 - 1. Нітрили (Група 20 WSSA)
 - a. Диклобеніл
 - b. Хлортіамід
 - 2. Бензаміди (ізоксабен (Група 21 WSSA))
 - a. Ізоксабен
 - 3. Тріазолокарбоксаміди (флупоксам)
 - a. Флупоксам
- Q. Росполучення (руйнування мембрани) (Група 24 WSSA)
 - 1. Динітрофеноли
 - a. DNOC
 - b. Диносеб
 - c. Динотерб
- R. Інгібування синтезу ліпідів, відмінне від інгібування ACC
 - 1. Тіокарбамати (Група 8 WSSA)
 - a. Бутилат
 - b. Циклоат
 - c. Димепіперат
 - d. ЕРТС
 - e. Еспрокарб
 - f. Молінат
 - g. Орбенкарб
 - h. Пебулат
 - i. Просульфоккарб
 - j. Бентіокарб
 - k. Тіокарбазил
 - l. Тріаллат
 - m. Вернолат
 - 2. Фосфородитіоати

- a. Бенсулід
 - 3. Бензофурани
 - a. Бенфуресат
 - b. Етофумесат
 - 4. Галогеновані алканові кислоти (Група 26 WSSA)
 - a. ТСА
 - b. Даларон
 - c. Флурпропанат
 - S. Синтетичні ауксини (Iaa-Подібні) (Група 4 WSSA)
 - 1. Феноксикарбонові кислоти
 - a. Кломепроп
 - b. 2,4-D
 - c. Мекопроп
 - 2. Бензойні кислоти
 - a. Дікамба
 - b. Хлорамбен
 - c. ТВА
 - 3. Піридинкарбонові кислоти
 - a. Клопіралід
 - b. Флуроксипір
 - c. Піклорам
 - d. Трициклопір
 - 4. Хінолінкарбонові кислоти
 - a. Хінклорак
 - b. Хінмерак
 - 5. Інші (беназолін-етил)
 - a. Беназолін-етил
 - T. Інгибування транспорту ауксину
 - 1. Фталамати; семикарбазони (Група 19 WSSA)
 - a. Напталам
 - b. Дифлуфензопір-Na
 - U. Інші механізми дії
 - 1. Ариламінопропіонові кислоти
 - a. Флампроп-M-метил I-ізопропіл
 - 2. Піразоліум
 - a. Дифензокват
 - 3. Арсенорганічні сполучення
 - a. DSMA
 - b. MSMA
 - 4. Інші
 - a. Бромбутид
 - b. Цинметилн
 - c. Кумилурон
 - d. Дазомет
 - e. Даїмурон-метил
 - f. Димурон
 - g. Етобензанід
 - h. Фосамін
 - i. Позначкам
 - j. Оксацикломефон
 - k. Олеїнова кислота
 - l. Пеларгонова кислота
 - m. Пірибутикарб
- У деяких способах гліфосат, окремо або в поєднанні з іншим гербіцидом інтересуючого, може наноситися на рослини Brassica DP-073496-4 або на оброблені землі, де вони культивуються. Необмежуючі приклади препаратів гліфосату наведено в таблиці 2. У конкретних варіантах здійснення гліфосат перебуває у формі солі, такий як, сіль амонію, ізопропіламонія, калію, натрію (включаючи полуторанатрієву сіль) або у вигляді тримезіума (альтернативно називається сульфосат).
- 5

Таблиця 2

Порівняння препаратів гліфосату

Гербицид по зареєстрованому товарному знакові	Виробник	Сіль	Активний інгредієнт на галон	Кислотний еквівалент на галон	Нанесення: унцій/акр	Кислотний еквівалент на акр
Roundup Original	Monsanto	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Roundup Original II	Monsanto	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Roundup Original MAX	Monsanto	Калій	5,5	4,5	22	0,773
Roundup Ultramax	Monsanto	Ізопропіламін	5	3,68	26	0,748
Roundup Ultramax II	Monsanto	Калій	5,5	4,5	22	0,773
Roundup Weathermax	Monsanto	Калій	5,5	4,5	22	0,773
Touchdown	Syngenta	Діамоній	3,7	3	32	0,750
Touchdown Hitech	Syngenta	Калій	6,16	5	20	0,781
Touchdown Total	Syngenta	Калій	5,14	4,17	24	0,782
Durango	Dow Agrosiences	Ізопропіламін	5,4	4	24	0,750
Glyphomax	Dow Agrosiences	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Glyphomax Plus	Dow Agrosiences	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Glyphomax XRT	Dow Agrosiences	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Gly Star Plus	Albaugh/Agri Star	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Gly Star 5	Albaugh/Agri Star	Ізопропіламін	5,4	4	24	0,750
Gly Star Original	Albaugh/Agri Star	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Gly-Flo	Micro Flo	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Credit	Nufarm	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Credit Extra	Nufarm	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Credit Duo	Nufarm	Ізопропіламін + моноаммоний	4	3	32	0,750
Credit Duo Extra	Nufarm	Ізопропіламін + моноаммоний	4	3	32	0,750
Extra Credit 5	Nufarm	Ізопропіламін	5	3,68	26	0,748
Cornerstone	Agrilance	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Cornerstone Plus	Agrilance	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Glyphos	Cheminova	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Glyphos X-TRA	Cheminova	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Rattler	Helena	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Rattler Plus	Helena	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Mirage	UAP	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Mirage Plus	UAP	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Гліфосат 41%	Helm Agro USA	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Buccaneer	Tenkoz	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Buccaneer Plus	Tenkoz	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Honcho	Monsanto	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Honcho Plus	Monsanto	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Gly-4	Univ. Crop Prot. Alli	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Gly-4 Plus	Univ. Corp Prot. Alli	Ізопропіламін	4	3	32	0,750

Clearout 41	Chemical Products	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Clearout 41 Plus	Tech. Chemical Products	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Spitfire	Control Solution	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Spitfire Plus	Control Solution	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Glyphosate 4	Fannersaver.com	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
FS Glyphosate Plus	Growmark	Ізопропіламін	4	3	32	0,750
Glyphosate Original	Griffin. LLC	Ізопропіламін	4	3	32	0,750

Таким чином, у деяких варіантах здійснення трансгенна рослина за винаходом використовують у способі вирощування культури Brassica DP-073496-4 шляхом нанесення гербіцидів, до яких ця рослина стійка. Таким чином, описана обробка поєднанням одного або декількох гербіцидів, які в якості необмежуваних прикладів включають: ацетохлор, ацифлуорфен і його натрієву сіль, аклонифен, акролеїн (2-пропенал), алахлор, аллоксидим, аметрин, амікарбазон, амідосульфурон, амінопіралід, амітрол, сульфамат амонію, анілофос, асулам, атразин, азимсульфурон, бифлутамід, беназолін, беназолін-етил, бенкарбазон, бенфлуралін, бенфуресат, бенсульфурон-метил, бенсулід, бентазон, бензобіциклон, бензофенап, біфенокс, біланафос, біспірибак і його натрієву сіль, бромацил, бромобутид, бромофеноксим, бромоксиніл, октаноат бромоксинілу, бутаклор, бутафенацил, бутаміфос, бутралін, бутроксидим, бутилат, кафенстрол, карбетамід, карфентразон-етил, катехин, хлометоксифен, хлорамбен, хлорбромурон, хлорфлуренол-метил, хлоридазон, хлоримурон-етил, хлортолурун, хлорпрофам, хлорсульфурон, хлортал-диметил, хлортіамід, цинидон-етил, цинметилін, циносульфурон, клетодим, клодинафоп-пропаргил, кломазон, кломепроп, клопіралід, клопіралід-оламін, клорансулам-метил, CUN-35 (2-метоксиетил-2-[[[4-хлор-2-фтор-5-[(1-метил-2-пропініл)окси]феніл](3-фторбензоїл)аміно]карбоніл]-1-циклогексен-1-карбоксилат), кумилурон, ціаназин, циклоат, циклосульфамурон, циклоксидим, цигалофоп-бутил, 2,4-D і його бутотилловий, бутиловий, ізоктиловий і ізопропіловий складні ефіри і його солі диметиламонія, діоламіну й троламіну, даимурон, далапон, далапон-натрій, дазомет, 2,4-DB і його солі диметиламонія, калію й натрію, десмедифам, деспетрин, дікамба і її солі дигликольаммонія, диметиламонія, калію й натрію, диклобеніл, дихлорпроп, диклофоп-метил, диклосулам, дифензокват метилсульфат, дифлуфеникан, дифлуфензопір, димефурон, димепіперат, диметаклор, диметаметрин, диметенамід, диметанамід-Р, диметипін, диметиларсинову кислоту і її натрієву сіль, динітрамін, динотерб, дифенамід, дикват дибромід, дитіопір, діурон, DNOC, ендотал, ЕРТС, еспрокарб, еталфлуралін, етаметсульфурон-метил, етофумезат, етоксифен, етоксисульфурон, етобензанід, феноксапроп-етил, феноксапроп-Р-етил, фентразамід, фенурон, фенурон-ТСА, флампроп-метил, флампроп-М-ізопропіл, флампроп-М-метил, флазасульфурон, флорасулам, флаузіфоп-бутил, флаузіфоп-Р-бутил, флукарбазон, флуцетосульфурон, флухлоралін, флуфенацет, флуфенпір, флуфенпір-етил, флуметсулам, флумиклорак-пентил, флуміоксазин, флуометурон, фторглікофен-етил, флупірсульфурон-метил і його натрієву сіль, флуренол, флуренол-бутил, флуридон, флуорохлоридон, флуороксіпір, флуртамон, флутіацет-метил, фомесафен, форамсульфурон, фосамін-амоній, глюфосинат, глюфосинат-амоній, гліфосат і його солі, такі як солі амонію, ізопропіламонія, калію, натрію (включаючи полуторанатрієву сіль) і тримезія (альтернативно названий сульфосат), галосульфурон-метил, галоксифоп-етотил, галоксифоп-метил, гексазинон, НОК-201 N-(2,4-дифторфеніл)-1,5-дигідро-N-(1-метилетил)-5-оксо-1-[(тетрагідро-2H-піран-2-іл)метил]-4H-1,2,4-тріазол-4-карбоксамід), імазаметабенз-метил, імазамокс, імазапін, імазапін, імазаквін, імазаквін-амоній, імазетапін, імазетапін-амоній, імазосульфурон, інданофан, йодосульфурон-метил, іоксиніл, іоксиніл-октаноат, іоксинил-натрій, ізопротурон, ізоурон, ізоксабен, ізоксафлутол, ізоксахлортол, лактофен, ленацил, лінурун, малеїновий гідрозид, МСРА і його солі (наприклад, МСРА-диметиламоній, МСРА-калій і МСРА-натрій, складні ефіри (наприклад, МСРА-2-етилгексил, МСРА-бутотил) і складні тіоефіри (наприклад, МСРА-тіоетил), МСРВ і його солі (наприклад, МСРВ-натрій) і складні ефіри (наприклад, МСРВ-етил), мекопроп, мекопроп-Р, мефенацет, мефлуїдид, мезосульфурон-метил, мезотріон, мета-натрій, метаміфоп, метамітрон, метазахлор, метабентіазурон, метиларсонову кислоту і її кальцієву, моноамонійну, мононатрієву й динатрієву солі, метилдимрон, метобензурон, метобромурон,

метолахлор, S-метолахлор, метозулам, метоксурон, метрибузин, метсульфурон-метил, молинат, монолинурон, напроанілід, напропамід, напталам, небурон, никосульфурон, нофлуразон, орбенкарб, оризалін, оксадіаргил, оксадіазон, оксасульфурон, оксацикломефон, оксифлуорфен, паракват дихлорид, пебулат, пеларгонову кислоту, пендиметалин, пенноксулам, пентанохлор, пентоксазон, перфлуїдон, петоксіамід, фенмедифам, піклорам, пікрорам-калій, піколнафен, піноксаден, піперофос, претилахлор, примисульфурон-метил, продіамін, профоксидим, прометон, прометрин, пропахлор, пропаніл, пропаквізафоп, пропазин, профам, пропізохлор, пропоксикарбазон, пропізамід, просульфокарб, просульфурон, піраклоніл, пірафлуфен-етил, пірасульфотол, піразогил, піразолінат, піразоксифен, піразосульфурон-етил, пірибензоксим, пірибутикарб, піридат, пірифталід, піриминобак-метил, піримисульфам, піритіобак, піритіобак-натрій, піроксулам, квінклорак, квінмерак, хінокламін, хінокламін, квизалофоп-етил, квизалофоп-Р-етил, квизалофоп-Р-тефурил, римсульфурон, сетоксидим, сидурон, симазин, симетрин, сулькотріон, сульфентразон, сульфометурон-метил, сульфосульфурон, 2,3,6-ТВА, ТСА, ТСА-натрій, тебутам, тебутіурон, тебурилтріон, темботріон, тепралоксидим, тербацил, тербуметон, тербутилазин, тербутрин, тенілхлор, тіазопір, тієнкарбазон, тифенсульфурон-метил, тієбенкарб, тієкарбазил, топрамезон, тралкоксидим, триаллат, тріасульфурон, тріазифлам, трибенурон-метил, триклопір, триклопір-бутотил, триклопір-триетиламоній, тридифан, триетазин, трифлорисульфурон, трифлуралін, трифлусульфурон-метил, тритосульфурон і вернолат.

У даній галузі відомі інші підходящі гербіциди й сільськогосподарські хімікати, такі як, наприклад, ті, що описані в WO 2005/041654. Інші гербіциди також включають біогербіциди, такі як *Alternaria destruens* Simmons, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc., *Drechslera monoceras* (MTB-951), *Myrothecium verrucaria* (Albertini & Schweinitz) Ditmar: Fries, *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. і *Puccinia thiaspeos* Schub. Поєднанням різних гербіцидів можуть приводити до більшого, ніж просте додавання (тобто, синергічної), дії на бур'яни, і/або меншому, ніж просте додавання, (тобто, що зберігає) дії на культури або інші потрібні рослини. У деяких випадках поєднанням гліфосату з іншими гербіцидами, що мають подібний спектр контролю, але відмінний спосіб дії будуть, зокрема, кращі для запобігання розвитку стійких бур'янів. Ефективні по гербіцидній дії кількості будь-якого конкретного гербіциду можуть легко визначатися фахівцем у даній галузі за допомогою простого експериментування.

Гербіциди можуть класифікуватися на групи й/або підгрупи, як описано вище в даному документі, з посиланням на спосіб їх дії, або вони можуть класифікуватися на групи й/або підгрупи відповідно до їхньої хімічної структури.

Сульфонамідні гербіциди мають істотну хімічну молекулярну структурну характеристику - складеною групою сульфонамідів ($-S(O)_2NH-$). Як вказується в даному документі, сульфонамідні гербіциди, зокрема, включають сульфонілсечовинні гербіциди, гербіциди на основі сульфоніламінокарбонільтріазолінону й гербіциди на основі тріазолопіримідину. У сульфонілсечовинних гербіцидах складена група сульфонамідів є компонентом у сульфонілсечовинному містку ($-S(O)_2NHC(O)NH(R)-$). У сульфонілсечовинних гербіцидах сульфонільний кінець сульфонілсечовинного містка зв'язаний безпосередньо або через атом кисню або необов'язково заміщену аміногрупу або метиленову групу, із циклічною або нециклічною групою, як правило, заміщеної. На протилежному кінці сульфонілсечовинного містка аміногрупа, яка може містити заступники, такі як метил (R являє собою CH_3), замість водню, з'єднана з гетероциклічною групою, як правило, симетричним піримідиновим або тріазиновим кільцем, що містять один або два замісники, таких як метил, етил, трифторметил, метокси, етокси, метиламіно, диметиламіно, етиламіно й галогени. У гербіцидах на основі сульфоніламінокарбонільтріазолінону складена група сульфонамідів є компонентом сульфоніламінокарбонільного містка ($-S(O)_2NHC(O)-$). У гербіцидах на основі сульфоніламінокарбонільтріазолінону сульфонільний кінець сульфоніламінокарбонільного містка, як правило, з'єднаний із заміщеним фенільним кільцем. Із протилежного кінця сульфоніламінокарбонільного містка карбоніл з'єднаний з 1 положенням кільця тріазолінону, яке, як правило, заміщене групами, такими як алкіл і алкокси. У гербіцидах на основі тріазолопіримідину сульфонільний кінець складеної групи сульфонамідів приєднаний до 2 положення заміщеної циклічної системи [1,2,4]тріазолопіримідину, а кінець із аміногрупою сульфонамідної складової групи приєднаний до заміщеної арильної, як правило, до фенільної групи, або, альтернативно, кінець із аміногрупою сульфонамідної складової групи приєднаний до 2 положення заміщеної циклічної системи [1,2,4]тріазолопіримідину, а сульфонільний кінець сульфонамідної складової групи приєднаний до заміщеної арильної, як правило, піридинильної групи.

Способи додатково містять нанесення на культуру й бур'яни в поле достатньої кількості щонайменше одного гербіциду, до якого стійкі насіння або рослини культури, такого як, наприклад, гліфосат, інгібітор гідроксифенілпіруватдіоксигенази (наприклад, мезотріон або сульфотріон), інгібітор фітоіндесатурази (наприклад, дифлуфеникан), інгібітор синтезу пігменту, сульфонамід, імідазоліон, біалафос, фосфінотрицин, азафенидин, бутафенацил, сульфосат, 5 глуфосинат, триазолопіримідин, піримідинілокси(тіо)бензоат або сульфоніламінокарбонілтриазоліон, інгібітор ацетил-Со-А -карбоксилази, такий як квізалофоп-Р-етил, синтетичний ауксин, такий як квінклорак, KIH-485 або інгібітор protox, для контролю бур'янів без значного ушкодження сільськогосподарської культури.

В основному, ефективну кількість гербіциду, нанесеного на поле, досить для виборчого контролю бур'янів без значного впливу на культуру. «Бур'ян», як цей термін застосовують у даному документі, відноситься до рослини, яка небажана в конкретній місцевості. Навпаки, «сільськогосподарська культура», як цей термін застосовують у даному документі, відноситься до рослини, яка бажана в конкретній місцевості, такої як, наприклад, рослина Brassica. Таким 15 чином, у деяких варіантах здійснення рослина являє собою несільськогосподарську культуру або несільськогосподарський вид, тоді як у деяких варіантах здійснення бур'ян являє собою сільськогосподарський вид, який намагаються елімінувати з конкретної місцевості, такий як, наприклад, малоцінне й/або нетрансгенна рослина Brassica на поле, засадженому Brassica з подією DP-073496-4, або, що не є Brassica сільськогосподарський вид у полі, засадженому DP- 20 073496-4. Бур'яни можуть класифікуватися на дві більші групи: однодольні рослини й двочасткові рослини.

Багато видів рослин можуть контролюватися (тобто, знищуватися або ушкоджуватися) гербіцидами, описуваними в даному документі. Таким чином, способи за винаходом придатні для контролю цих видів рослин там, де останні є небажаними (тобто, де вони є бур'янами). Ці 25 види рослин включають сільськогосподарські культури, а також види, що звичайно вважаються бур'янами, що включають у якості необмежуючих прикладів види, такі як: лисохвіст мишехвостий (*Alopecurus myosuroides*), щетинник гігантський (*Setaria faberi*), росичка кров'яна (*Digitaria sanguinalis*), брахіярія (*Brachiaria decumbens*), дикий овес (*Avena fatua*), дурнишник звичайний (*Xanthium pensylvanicum*), лобода біла (*Chenopodium album*), в'юнок пурпурний (*Ipomoea coccinea*), щириця (*Amaranthus spp.*), канатник Теофраста (*Abutilon theophrasti*), куряче просо (*Echinochloa crus-galli*), свинорий пальчастий (*Cynodon dactylon*), багаття покривельне (*Bromus tectorum*), подмаренник чіпкий (*Eleusine indica*), щетинник зелений (*Setaria viridis*), райграс італійський (*Lolium multiflorum*), сорго алепське (*Sorgo halepense*), канареєчник малий (*Phalaris minor*), метлиця звичайна (*Apera spica-venti*), шерстняк волохатий (*Eriochloa villosa*), сить їстівна 35 (*Cyperus esculentus*), зірочник середня (*Stellaria media*), амброзія полинолистна (*Ambrosia artemisiifolia*), *Kochia scoparia*, мелкопелестник канадський (*Conyza canadensis*), райграс твердий (*Lolium rigidum*), подмаренник чіпкий (*Eleusine indica*), мелкопелестник волохатий (*Conyza bonariensis*), подорожник ланцетolistний (*Plantago lanceolata*), традесканція бенгальська (*Commelina benghalensis*), в'юнок польової (*Convolvulus arvensis*), сить пурпурна (*Cyperus rotundus*), бруннихія (*Brunnichia ovata*), сесбанія росла (*Sesbania exaltata*), сенна туполістна (*Senna obtusifolia*), соняшник реснитчатий (*Helianthus ciliaris*) і пробосцидея луїзіанська (*Proboscidea louisianica*). В інших варіантах здійснення бур'ян включає стійкий до гербіциду райграс, наприклад, стійкий до гліфосату райграс, стійкий до параквату райграс, стійкий до інгібітору Ассази райграс і неселективно стійкий до гербіцидів райграс. У деяких варіантах 45 здійснення небажані рослини є сільськогосподарськими видами, що сусідять.

Під застосовуванням у даному документі вираженням «вибірково контрольований» слід розуміти, що більша частина бур'янів на оброблюваних землях значно ушкоджуються або гинуть, у той час як якщо на поле також присутні сільськогосподарські культури, більша частина сільськогосподарських культур значно не ушкоджується. Таким чином, спосіб передбачає 50 виборчий контроль бур'янів, коли щонайменше 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% або більш бур'янів значно ушкоджуються або гинуть, у той час як якщо на поле також присутні сільськогосподарські культури, менш ніж 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% або 1% сільськогосподарських культур значно ушкоджуються або гинуть.

У деяких варіантах здійснення рослина Brassica DP-073496-4 за винаходом значно не ушкоджується при обробці конкретним гербіцидом, наношуванням на рослину в дозі, еквівалентної відношенню, рівному щонайменше 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 150, 170, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 800, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 або більш грамів або унцій (1 унція = 29,57 55 мл) активного інгредієнта або комерційного продукту або препарату гербіциду на акр або на гектар, в той час як відповідний контрольна рослина значна ушкоджується такою ж обробкою. 60

У конкретних варіантах здійснення ефективна кількість гербіциду-інгібітору ALS включає щонайменше приблизно 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 або більш грамів або унцій (1 унція = 29,57 мл) активного інгредієнта на гектар. В інших варіантах здійснення ефективна кількість гербіциду-інгібітору ALS включає щонайменше приблизно 0,1-50, приблизно 25-75, приблизно 50-100, приблизно 100-110, приблизно 110-120, приблизно 120-130, приблизно 130-140, приблизно 140-150, приблизно 150-200, приблизно 200-500, приблизно 500-600, приблизно 600-800, приблизно 800-1000 або більш грамів або унцій (1 унція = 29,57 мл) активного інгредієнта на гектар. Будь-який інгібітор ALS, наприклад, з тих, що перераховано в таблиці 1, може наноситися в цих кількостях.

В інших варіантах здійснення ефективна кількість сульфонілсечовини включає щонайменше 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000 або більш грамів або унцій (1 унція = 29,57 мл) активного інгредієнта на гектар. В інших варіантах здійснення ефективна кількість сульфонілсечовини включає щонайменше приблизно 0,1-50, приблизно 25-75, приблизно 50-100, приблизно 100-110, приблизно 110-120, приблизно 120-130, приблизно 130-140, приблизно 140-150, приблизно 150-160, приблизно 160-170, приблизно 170-180, приблизно 190-200, приблизно 200-250, приблизно 250-300, приблизно 300-350, приблизно 350-400, приблизно 400-450, приблизно 450-500, приблизно 500-550, приблизно 550-600, приблизно 600-650, приблизно 650-700, приблизно 700-800, приблизно 800-900, приблизно 900-1000, приблизно 1000-2000 або більш грамів або унцій (1 унція = 29,57 мл) активного інгредієнта на гектар. Репрезентативні сульфонілсечовини, які можуть наноситися в цій кількості, наведено в таблиці 1.

В інших варіантах здійснення ефективна кількість сульфоніламінокарбонілтріазолінонів, тріазолопіримідинів, піримідинілокси(тіо)бензоатів і імідазолінонів може включати щонайменше приблизно 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2500, 3500, 4000, 4500, 5000 або більш грамів або унцій (1 унція = 29,57 мл) активного інгредієнта на гектар. В інших варіантах здійснення ефективна кількість сульфоніламінокарбонілтріазолінонів, тріазолопіримідинів, піримідинілокси(тіо)бензоатів і імідазолінонів включає щонайменше приблизно 0,1-50, приблизно 25-75, приблизно 50-100, приблизно 100-110, приблизно 110-120, приблизно 120-130, приблизно 130-140, приблизно 140-150, приблизно 150-160, приблизно 160-170, приблизно 170-180, приблизно 190-200, приблизно 200-250, приблизно 250-300, приблизно 300-350, приблизно 350-400, приблизно 400-450, приблизно 450-500, приблизно 500-550, приблизно 550-600, приблизно 600-650, приблизно 650-700, приблизно 700-800, приблизно 800-900, приблизно 900-1000, приблизно 1000-2000 або більш грамів або унцій (1 унція = 29,57 мл) активного інгредієнта на гектар.

Додаткові інтервали ефективних кількостей гербіцидів можна знайти, наприклад, у різних публікаціях від University Extension services. Див., наприклад, Bernards, et al., (2006) Guide for Weed Management in Nebraska (www.ianrpubs.url.edu/sendt/ec130); Regher, et al., (2005) Chemical Weed Control for Fields Crops, Pastures, Rangeland, and Noncropland, Kansas State University Agricultural Extension Station and Corporate Extension Service; Zollinger, et al., (2006) North Dakota Weed Control Guide, North Dakota Extension Service and the Iowa State University Extension at www.weeds.iastate.edu, кожний з яких включений у даний документ як посилання.

У деяких варіантах здійснення винаходу гліфосат наносять на оброблювані землі й/або щонайменше на одну рослину на оброблюваних землях у концентраціях від 8 до 32 унцій кислотного еквівалента на акр, або в концентраціях між значеннями 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 і 30 унцій кислотного еквівалента на акр у нижній межі інтервалу нанесення й між значеннями 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 і 32 унцій кислотного еквівалента на акр у верхній межі інтервалу нанесення (1 унція = 29,57 мл). В інших варіантах здійснення гліфосат наносять, щонайменше, у кількості 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або більш унцій активного інгредієнта на гектар (1 унція = 29,57 мл). У деяких варіантах здійснення винаходу сульфонілсечовинний гербіцид наносять на поле й/або на щонайменше одну рослину в поле в концентраціях від 0,04 до 1,0 унцій активного інгредієнта на акр, або в концентраціях між значеннями 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 і 0,8 унцій кислотного еквівалента на акр у нижній межі інтервалу нанесення й між значеннями 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 і 1,0 унцій кислотного еквівалента на акр у верхній межі інтервалу нанесення (1 унція = 29,57 мл).

Як відомо в даній галузі, гербіциди на основі гліфосату, як клас, містять той самий активний інгредієнт, але активний інгредієнт присутній у вигляді однієї з декількох різних солей і/або у вигляді одного із препаратів. Однак гербіциди, відомі як інгібітори ALS, мають різні активні

інгредієнти, а також хімічні формули. Фахівцevi в даній галузі відоме визначення кількості активного інгредієнта й/або кислотного еквівалента, що присутні в конкретному обсязі й/або в масі препарату гербіциду.

У деяких варіантах здійснення використовується гербіцид-інгібітор ALS. Концентрації, у яких гербіцид-інгібітор ALS наноситься на культуру, насіння або оброблювані землі, може бути кожний з концентрацій, описуваних у даному документі. У конкретних варіантах здійснення концентрація гербіциду-інгібітору ALS становить від приблизно 0,1 до приблизно 5000 г на гектар, від приблизно 0,5 до приблизно 300 г на гектар або від приблизно 1 до приблизно 150 г на гектар.

В основному, конкретний гербіцид наносять на конкретне поле (і на будь-які рослини, що ростуть на ньому) не більш ніж 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 раз у році, або не більш ніж 1, 2, 3, 4 або 5 раз за сезон вегетації.

Під «обробкою поєднанням» або «нанесенням поєднання гербіцидів на культуру, оброблювані землі або поле» слід розуміти, що конкретне поле, культуру або бур'ян обробляють гербіцидами й/або хімікатами, зазначеними як частина поєднання, так що досягнута бажана дія, тобто, так що бур'яни вибірково контрольовані, тоді як культура значно не ушкоджена. У деяких варіантах здійснення бур'яни, чутливі до кожного з гербіцидів, ушкоджуються від обробки кожним гербіцидом, яка є аддитивною або синергічною. Нанесення кожного гербіциду й/або хімікату може відбуватися одномоментно, або нанесення можуть здійснюватися в різний час, за умови досягнення бажаного дії. Крім того, нанесення може відбуватися до посадок культури.

Співвідношення гербіцидів, застосовуваних у способах по винаходу, з іншими гербіцидними активними інгредієнтами в гербіцидних композиціях, в основному, становлять від 5000:1 до 1:5000, від 1000:1 до 1:1000, від 100:1 до 1:100, від 10:1 до 1:10 або від 5:1 до 1:5 по масі. Оптимальні відносини можуть легко визначити фахівці в даній галузі, ґрунтуючись на необхідних спектрах контролю бур'янів. Крім того, будь-які поєднання інтервалів різних гербіцидів, описаних у таблиці 1, також можуть використовуватися в способах по винаходу.

Таким чином, у деяких варіантах здійснення винахіда відноситься до поліпшених способів виборчого контролю бур'янів у полі, де загальне нанесення гербіциду може становити менш 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% або 1% від того, яке використовується в інших способах. Подібним образом, у деяких варіантах здійснення кількість конкретного гербіциду, використовуваного для виборчого контролю бур'янів у полі, може становити менш 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% або 1% від кількості конкретного гербіциду, які може використовуватися в інших способах, тобто, способах, у яких не застосовується рослина по винаходу.

У деяких варіантах здійснення рослина Brassica DP-073496-4 за винаходом має перевага від синергічної дії, де стійкість до гербіциду, забезпечувана поліпептидом GLYAT, і стійкість, забезпечувана поліпептидом стійкості до іншого гербіциду, перевищує очікувану стійкість від простого додавання стійкостей, забезпечуваних кожним геном окремо. Див., наприклад, Mccutchen, et al., (1997) J. Econ. Entomol. 90:1170-1180; Priesler, et al., (1999) J. Econ. Entomol. 92:598-603. Застосовувані в даному документі терміни «синергія», «синергічний», «синергічне» і їх похідні, наприклад, у вираженнях «синергічна дія» або «синергічна поєднання гербіцидів» або «синергічна композиція гербіцидів» відносяться до обставин, при яких біологічна активність поєднанням гербіцидів, такого як щонайменше перший гербіцид і другий гербіцид, перевищує суму типів біологічної активності окремих гербіцидів. Синергія, виражена в контексті «Індексу синергії» (SI), загалом, може визначатися способом, описаним Kull, et al., (1961) Applied Microbiology 9:538. Див. також, Colby, (1967) Weeds 15:20-22.

В інших випадках, стійкість до гербіциду, забезпечувана рослині DP-073496-4 по винаходу, є аддитивною; тобто, профіль стійкості до гербіциду, забезпечуваний генами стійкості до гербіциду, є таким, який очікується від простого поєднання стійкості гербіцидів, забезпечуваної кожним геном окремо трансгенної рослині, що містить їх окремо. Аддитивна й/або синергічна активність двох або більш гербіцидів проти ключових видів бур'янів збільшує загальну ефективність і/або знижує дійсну кількість активного(-их) інгредієнта(-ів), необхідну для контролю зазначених бур'янів. Коли спостерігають таку синергію, рослину за винаходом може характеризуватися стійкістю до більш високої дози або концентрації гербіциду, і/або рослина може характеризуватися стійкістю до додаткових гербіцидів або іншим хімікатів, крім тих, до яких воно, як очікується, проявляє таку стійкість. Наприклад, рослина Brassica DP-073496-4 може характеризуватися стійкістю до фосфорорганічних сполук, таким як інсектициди й/або інгібітори 4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази.

Таким чином, наприклад, рослини Brassica DP-073496-4 по винаходу, якщо вони, крім того, містять гени, забезпечуючі стійкість до інших гербіцидів, можуть характеризуватися більшою, ніж очікувана, стійкістю до різних гербіцидів, включаючи в якості необмежуваних прикладів гліфосат, хімічні сполуки-інгібітори ALS і сульфонілсечовинні гербіциди. Рослина Brassica DP-073496-4 за винаходом може характеризуватися стійкістю до конкретного гербіциду або до поєднанням гербіцидів, яка на щонайменше 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 22%, 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400% або 500% або більш перевищує стійкість відповідної контрольної рослини, яка містить лише єдиний ген стійкості до гербіциду, який забезпечує стійкість до того ж гербіциду або до поєднанням гербіцидів. Таким чином, рослини Brassica DP-073496-4 можуть характеризуватися зниженим рівнем ушкодження від однієї й тієї ж дози гербіциду в порівнянні з підходящою контрольною рослиною, або вони можуть характеризуватися тою ж ступенем ушкодження у відповідь на набагато більшу дозу гербіциду, ніж в контрольній рослині. Таким чином, у конкретних варіантах здійснення конкретний гербіцид, використовуваний для виборчого контролю бур'янів на полі, застосовується в кількості, більшій на 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% або більш, ніж кількість цього конкретного гербіциду, який використовується в інших способах, тобто, способах, у яких не використовується рослина по винаходу.

У такий же спосіб, у деяких варіантах здійснення рослина Brassica DP-073496-4 за винаходом характеризується посиленою стійкістю до конкретного препарату активного інгредієнта гербіциду в порівнянні з підходящою контрольною рослиною. Гербіциди продаються комерційно в якості препаратів, які, як правило, включають інші інгредієнти на додаток до гербіцидному активному інгредієнту; ці інгредієнти часто призначають для посилення ефективності активного інгредієнта. Такі інші інгредієнти можуть включати, наприклад, антидоти й ад'юванти {див., наприклад, Green and Foy, (2003) "Adjuvants: Tools for Enhancing Гербіцид Performance", in Weed Biology i Management, ed. Inderjit (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands)). Таким чином, рослина Brassica DP-073496-4 за винаходом може характеризуватися стійкістю до конкретного препарату гербіциду (наприклад, до конкретного комерційно доступного гербіцидного продукту), яка на щонайменше 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 22%, 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%, 1600%, 1700%, 1800%, 1900% або 2000% або більш перевищує стійкість підходящої контрольної рослини, яка містить тільки один ген стійкості до гербіциду, який забезпечує стійкість до того ж препарату гербіциду.

У деяких варіантах здійснення рослина Brassica DP-073496-4 plant за винаходом характеризується посиленою стійкістю до гербіциду або класу гербіцидів, до якого забезпечує стійкість щонайменше один інший ген стійкості до гербіциду, а також посиленою стійкістю до щонайменше одному гербіциду або хімікату, який характеризується іншим механізмом або основою дії, ніж гліфосат або гербіцид, що відповідає зазначеному щонайменше одному іншому гену стійкості до гербіциду. Це несподівана перевага винаходу знаходить застосування в способах вирощування культурних рослин, які включають їхню обробку різними поєднаннями хімікатів, включаючи, наприклад, інші хімікати, використовувані для вирощування рослин. Таким чином, наприклад, рослина Brassica DP-073496-4 може також характеризуватися посиленою стійкістю до хлорпірофосу, системному фосфорорганічному інсектициду. Таким чином, винахід також відноситься до рослини Brassica DP-073496-4, володіючим стійкістю до гліфосату (тобто, за рахунок гена GLYAT), яке характеризується посиленою стійкістю до хімікатів, які впливають на ген цитохрому P450, і до способів його застосування. У деяких варіантах здійснення рослини Brassica DP-073496-4 також характеризуються посиленою стійкістю до дікамби. У цих варіантах здійснення посилена стійкість до дікамби може бути доведена в присутності гліфосату й сульфонілсечовинного гербіциду.

В інших способах поєднання гербіцидів наносять на рослину Brassica DP-073496-4, де поєднання гербіцидів здійснює аддитивну або синергічне дію для контролю бур'янів. Такі поєднанням гербіцидів можуть забезпечувати зниження кількості нанесеної речовини, більш широкий спектр контрольованої небажаної рослинності, поліпшений контроль небажаної рослинності меншими нанесеними кількостями, більш ранній початок гербіцидної активності або більш тривалу гербіцидну активність.

«Аддитивна гербіцидна композиція» характеризується гербіцидною активністю, яка приблизно рівна спостережуваним активностям окремих компонентів. «Синергічне поєднання гербіцидів» має гербіцидну активність, більш високу, тем та, яка може очікуватися на основі спостережуваних активностей індивідуальних компонентів при окремому використанні. Таким

чином, представлений у даному описі об'єкт винаходу відноситься до синергічному поєднанню гербіцидів, де ступінь контролю бур'янів сумішшю перевершує суму контролю індивідуальними гербіцидами. У деяких варіантах здійснення ступінь контролю бур'янів сумішшю перевершує суму контролю індивідуальними гербіцидами на будь-яке статистично значиме значення, що

5 включає, наприклад, від приблизно 1% до 5%, від приблизно 5% до приблизно 10%, від приблизно 10% до приблизно 20%, від приблизно 20% до приблизно 30%, від приблизно 30% до 40%, від приблизно 40% до приблизно 50%, від приблизно 50% до приблизно 60%, від приблизно 60% до приблизно 70%, від приблизно 70% до приблизно 80%, від приблизно 80% до приблизно 90%, від приблизно 90% до приблизно 100%, від приблизно 100% до 120% або

10 вище. Крім того, «синергічне ефективна кількість» гербіциду відноситься до кількості одного гербіциду, необхідному для надання синергічної дії на інший гербіцид, що присутній у гербіцидній композиції. Таким чином, термін «синергіст» і його похідні відносяться до речовини, яка підсилює дію активного інгредієнта (ai), тобто, речовини в препараті, від якого відбувається біологічна дія, наприклад, гербіциду.

15 Таким чином, у деяких варіантах здійснення представлений у даному описі об'єкт винаходу надає спосіб контролю бур'янів на оброблюваних землях. У деяких варіантах здійснення спосіб включає: (a) засівання земель насіннями культури DP-073496-4 або сільськогосподарських культур, які також включають полінуклеотиди, що забезпечують стійкість до інгібітору ALS; і (b) нанесення на бур'яни, сільськогосподарські культури, частини культур, оброблювані землі або

20 на комбінацію цих об'єктів ефективної кількості гербіцидної композиції, що містить щонайменше одну із синергічне ефективної кількості гліфосату й синергічне ефективної кількості інгібітору ALS (у якості необмежуваних прикладів, включаючого сульфонілсечовинний гербіцид) або їх прийнятні для сільського господарства солі, де дотримується щонайменше одна з умов: (i) синергічна ефективна кількість гліфосату становить менше кількості гліфосату, необхідного для контролю бур'янів під час відсутності сульфонілсечовинного гербіциду; (ii) синергічне ефективна

25 кількість гербіциду-інгібітору ALS становить менше кількості інгібітору ALS, необхідного для контролю бур'янів під час відсутності гліфосату й (iii) їх поєднання, і де ефективна кількість гербіцидної композиції переноситься насіннями культури або сільськогосподарськими культурами й контролює бур'яни на оброблюваних землях.

30 У деяких варіантах здійснення гербіцидна композиція, використовувана в представленому в даному документі способі контролю бур'янів, містить синергічну ефективну кількість гліфосату й сульфонілсечовинного гербіциду. У додаткових варіантах здійснення описана в даному документі синергічна гербіцидна композиція містить гліфосат і сульфонілсечовинний гербіцид, обраний із групи, що полягає з метсульфурон-метилу, хлорсульфурону й тріасульфурону.

35 У конкретних варіантах здійснення синергічне поєднання гербіцидів додатково містить добавку, таку як, наприклад, добавка, заснована на сульфаті амонію, наприклад, ADD-UP® (Wenkem., Halfway House, Midrand, South Africa). У додаткових варіантах здійснення описані в даному документі синергічні гербіцидні композиції містять додатковий гербіцид, наприклад, ефективну кількість гербіциду на основі піримідинілокси(tio)бензоату. У деяких варіантах здійснення гербіцид на основі піримідинілокси(tio)бензоату включає біспірибак, наприклад,

40 (VELOCITY®, Valent U.S.A. Corp., Walnut Creek, California, United States of America) або його прийнятну для сільського господарства сіль.

У деяких варіантах здійснення описаного в даному документі способу контролю небажаних рослин гліфосат наносять на небажані рослини або рослинні культури до сходів, після сходів

45 або до й послуг сходів, і/або гербіцид-інгібітор ALS (тобто, сульфонілсечовинний гербіцид) наносять на небажані рослини або рослинні культури до сходів, після сходів або до й послуг сходів. В інших варіантах здійснення гліфосат і/або гербіцид-інгібітор ALS (тобто, сульфонілсечовинний гербіцид) наносять разом або наносять роздільно. В інших варіантах здійснення синергічну гербіцидну композицію наносять, наприклад, на зазначеній вище стадії

50 (b), щонайменше, у деякий момент перед посадкою інтересуючого(-їх) культури(-р), наприклад, на зазначеній вище стадії (a).

Бур'яни, які важко контролюватися одним гліфосатом у полях, де вирощують культуру (таку як, наприклад, культура Brassica), у якості необмежуваних прикладів включають наступні: мелколестник канадський (наприклад, *Conyza canadensis*); райграс твердий (наприклад,

55 *Lolium rigidum*); подмаренник чіпкий (наприклад, *Eleusine indica*); райграс італійський (наприклад, *Lolium multiflorum*), мелколестник волохатий (наприклад, *Conyza bonariensis*), подорожник ланцетолистний (наприклад, *Plantago lanceolata*), амброзію полінолистну (наприклад, *Ambrosia artemisiifolia*); в'юнок пурпурний (наприклад, *Ipomoea* spp.), щирицу (наприклад, *Amaranthus* spp.); в'юнок польової (наприклад, *Convolvulus arvensis*), сить їстівну

60 (наприклад, *Chenopodium album*), марь білу (наприклад, *Chenopodium album*); горець кучерявий

(наприклад, *Polygonum convolvulus*); канатник Теофраста (наприклад, *Abutilon theophrasti*), кохію (наприклад, *Kochia scolaria*) і коммеліну (наприклад, *Commelina* spp.). На територіях, де перебувають такі бур'яни, особливо придатні рослини *Brassica*, що містять подію DP-073496-4 і стійкість до іншого гербіциду, оскільки вони дозволяють обробляти поле (і, таким чином, будь-якій культурі, що росте в полі) поєднаннями гербіцидів, які завдають неприйнятної шкоди сільськогосподарським культурам, які не містять обоє ці полінуклеотиди. Рослини по винаходу, стійкі до гліфосату й іншим гербіцидам, таким як, наприклад, гербіциди на основі сульфонілсечовини, імідазолінону, тріазолопіримідину, піримідиніл(тіо)бензоату й/або сульфоніламінокарбонілтріазолінону, на додаток до устійчовсти до щонайменше одному іншому гербіциду з іншим способом дії або місцем дії, особливо придатні в ситуаціях, у яких бур'яни стійкі до щонайменше двом з тих же гербіцидів, до яких стійкі рослини. Таким чином, рослини за винаходом дають можливість для поліпшеного контролю бур'янів, які стійкі більш ніж до одному гербіциду.

Наприклад, деякі широко використовувані способи обробки для контролю бур'янів у полях, де вирощують сучасні комерційні культури (включаючи, наприклад, культури *Brassica*), включають гліфосат і, необов'язково, 2,4-D; дане поєднання, однак, має деякі недоліки. Зокрема, є види бур'янів, які воно добре не контролює, і також воно як впливає не працює для контролю бур'янів у холодну погоду. Інша широко використовувана обробка для контролю бур'янів у полях *Brassica* включає сульфонілсечовинний гербіцид хлоримурон-етил, який має значну залишкову активність у ґрунті й, таким чином, підтримує тиск селекції на позднезходні види бур'янів, створюючи сприятливе середовище для росту й поширення стійких до сульфонілсечовини бур'янів. Поля можуть бути оброблені сульфонілсечовиною, імідазоліноном, тріазолопіримідином, піримідиніл(тіо)бензоатами й/або сульфоніламінокарбонілтріазоліноном, наприклад, сульфонілсечовію хлоримурон-етилом, окремо або в поєднаннях з іншими гербіцидами, такому як поєднання гліфосату й трибенурон-метилу (комерційно доступного як Express®). Дане поєднання має деякі переваги для контролю бур'янів у деяких обставинах гербіцидів, що включають застосування, з різними типами дії й застосування гербіцидів, що мають відносно короткий період залишкової активності в ґрунті. Гербіцид з відносно коротким періодом залишкової активності в ґрунті є бажаним, наприклад, у ситуаціях, у яких важливо знизити тиск селекції, який буде сприяти росту стійких до гербіцидів бур'янів. Звичайно, у кожній конкретній ситуації, де потрібен контроль бур'янів, інші міркування можуть бути важливіше, наприклад, необхідність запобігати розвитку й/або появі бур'янів у полі перед посадкою культури шляхом використання гербіциду з відносно довгим періодом залишкової активності. Можуть бути особливо придатні способи обробки, які включають використання трибенурон-метилу й тифенсульфурон-метилу.

Іншими широко використовувані способи обробки для контролю бур'янів у полях, де вирощують сучасні комерційні сорти культур (включаючи, наприклад, види *Brassica*), включають використання сульфонілсечовиноного гербіциду тифенсульфурон-метилу (комерційно доступного як Harmony GT®). Однак, одним з недоліків тифенсульфурон-метилу є те, що високі концентрації нанесення, необхідні для відповідного контролю бур'янів, часто завдають шкоди культурі, що росте на тому ж полі. Рослини *Brassica* DP-073496-4, що містять додатковий вид стійкості, можуть оброблятися поєднанням гліфосату й тифенсульфурон-метилу, яке має перевагу використання гербіцидів з різними способами дії. Таким чином, бур'яни, стійкі до одного гербіциду, контролюються поєднанням двох гербіцидів, і поліпшені рослини *Brassica* DP-073496-4 не будуть значно ушкоджуватися обробкою.

Інші гербіциди, використовувані для контролю бур'янів у полях, де вирощують сучасні комерційні сорти культур (включаючи, наприклад, види *Brassica*), являють собою гербіцид на основі тріазолопіримідину клорансулам-метил (комерційно доступний як Firstrate®) і гербіцид на основі імідазолінона імазаквін (комерційно доступний як Sceptor®). Коли ці гербіциди використовують індивідуально, вони можуть надавати тільки один обмежений вид контролю бур'янів. Однак, може відбуватися обробка, наприклад, поєднанням гліфосату (наприклад, Roundup® (ізопропіламінова сіль гліфосату)), імазапіру (у цей час комерційно доступний як Arsenal®), хлоримурон-етилом (у цей час комерційно доступний як Classic®), квизалофоп-Р-етилом (у цей час комерційно доступний як Assure II®) і фомесафеном (у цей час комерційно доступний як Flexstar®). Дане поєднання має перевага використання гербіцидів з різними способами дії. Таким чином, бур'яни, стійкі всього до одного або декільком із цих гербіцидів, контролюються поєднанням п'ятьох гербіцидів. Дане поєднання надає винятково широкий спектр захисту проти типу стійких до гербіцидів бур'янів, який, як очікується, виникає й поширюється при сучасній практиці контролю бур'янів.

Поля, що містять рослини Brassica DP-073496-4 з додатковим видом стійкості до гербіциду, можуть також оброблятися, наприклад, поєднанням гербіцидів, що включають гліфосат, римсульфурон і дикамбу або мезотріон. Це поєднання може бути особливо придатне при контролі бур'янів, що розбудовують деяку стійкість до гербіцидів, які інгібують ALS. Інша поєднання гербіцидів, які може бути особливо придатним для контролю бур'янів, включає гліфосат і щонайменше один засіб з наступних: метсульфурон-метил (комерційно доступний як Ally®), імазапір (комерційно доступний як Arsenal®), імазетапір, імазаквін і сульфентразон. Слід розуміти, що кожна з комбінацій, обговорюваних вище або в іншій частині даного документа, також можна використовувати для обробки земель у поєднанням з будь-якими іншими гербіцидами або сільськогосподарськими хімікатами.

Деякі загальноприйняті способи обробки для контролю бур'янів на полях, де вирощують сучасні комерційні культури (включаючи, наприклад, Brassica), включають застосування гліфосату (у цей час комерційно доступний як Roundup®), римсульфурону (у цей час комерційно доступний як Resolve® або Matrix®), дікамби (комерційно доступна як Clarity®), атразина й мезотріона (комерційно доступний як Callisto®). Ці гербіциди іноді використовують окремо внаслідок слабкої стійкості культур до множинних гербіцидів. На жаль, при окремому використанні кожний із цих гербіцидів має значні недоліки. Зокрема, поширення бур'янів, стійких до індивідуальних гербіцидів, продовжує рости, приводячи в деяких ситуаціях до зменшення ефективності гліфосату в порівнянні з необхідної. Римсульфурон забезпечує кращий контроль бур'янів у високих дозах, які можуть викликати ушкодження культури, а альтернативи, такі як дікамба, часто більш дороги, ніж загальноприйняті гербіциди.

Деякі загальноприйняті способи обробки для контролю бур'янів на полях, де вирощують сучасні комерційні культури (включаючи, наприклад, Brassica), включають застосування гліфосату (у цей час комерційно доступний як Roundup®), хлоримурон-етилу, трибенурон-метилу, римсульфурону (у цей час комерційно доступний як Resolve® або Matrix®), імазетапіру, імазапіру й імазаквіну. На жаль, при індивідуальному застосуванні кожний із цих гербіцидів має значні недоліки. Зокрема, поширення бур'янів, стійких до індивідуальних гербіцидів, продовжує рости, приводячи в деяких ситуаціях до зменшення ефективності гліфосату в порівнянні з необхідної. Однак, Brassica DP-073496-4 з ознакою додаткової стійкості до гербіциду може оброблятися поєднанням гербіцидів, яке завдає небажаної шкоди стандартним сортам рослин, у тому числі, поєднаннями гербіцидів, що включають щонайменше один із зазначених вище.

У способах за винаходом гербіцид можна становити в препарат і наносити на інтересуючу територію, таку як, наприклад, поле або оброблювані землі, будь-яким підходящим образом. Гербіцид можна наносити на поле в будь-якому виді, наприклад, у вигляді рідкого спрею або твердого порошку або гранул. У конкретних варіантах здійснення гербіцид або поєднання гербіцидів, використовуваних у способах, включають бакову суміш або попередню суміш. Гербіцид можна також становити в препарат, наприклад, з одержанням «гомогенної гранулярної суміші», продукуюмої з використанням технології змішування (див., наприклад, патент США № 6022552, озаглавлений "Однорідні суміші гранул пестициду"). Технологія змішування з патенту США № 6022552 продукуюється нерозшаровна суміш (тобто, «гомогенну гранулярну суміш») препарату хімікатів для захисту культури в сухій гранулярній формі, яка забезпечує доставку спеціалізованих сумішей, розроблених для вирішення конкретних проблем. Гомогенну гранулярну суміш можна транспортувати, нею можна маніпулювати, розділяти її на зразки й наносити тим же образом, яким діють із традиційними попередньо змішаними продуктами, у яких множинні активні інгредієнти становлять у препарат тієї ж самої гранули.

У короткому викладі, «гомогенну гранулярну суміш» одержують змішуванням щонайменше двох утворені шляхом екструзії гранулярних продуктів. У деяких варіантах здійснення кожний гранулярний продукт включає зареєстрований склад, що містить один активний інгредієнт, який являє собою, наприклад, гербіцид, фунгіцид і/або інсектицид. Однорідність (гомогенність) «гомогенної гранулярної суміші» може оптимізуватися шляхом контролю розмірів і розподілу розмірів гранул, застосовуваних у суміші. Діаметр екструдованих гранул контролюють розміром отворів екструзійної матриці, і процес просівання за допомогою центрифуги можна використовувати для одержання популяції екструдованих гранул з необхідним розподілом довжин (див., наприклад, патент США № 6270025).

Суміш гомогенних гранул вважається «гомогенною», коли вона може підрозділятися на аліквоти відповідного розміру, і композиція кожної аліквоти відповідає необхідній специфікації аналізу. Для демонстрації гомогенності одержують великий зразок гомогенної гранулярної суміші, і його потім підрозділяють на аліквоти, що перевищують мінімальний статистичний розмір зразка. До сумішей також можливо додавати інші агрохімікати в нормальних, дозволених до застосування кількостях, наприклад, додаткові гербіциди (з 3-м/ 4-м механізмом дії),

фунгіциди, інсектициди, регулятори росту рослин і т.п., за рахунок чого скорочуються витрати, пов'язані з додатковими нанесеннями.

Будь-який препарат гербіциду для нанесення на рослину Brassica DP-073496-4 можна одержувати у вигляді композиції «бакової суміші». У таких варіантах здійснення кожний інгредієнт або поєднання інгредієнтів можна зберігати окремо друг від друга. Потім інгредієнти можна змішувати один з одним перед нанесенням. Як правило, таке змішування відбувається незадовго до нанесення. У процесі бакового змішування кожний інгредієнт перед змішуванням, як правило, є присутнім у воді або в підходящому органічному розчиннику. Для додаткових вказівок в ділянки одержання препаратів див., Woods, "The Formulator's Toolbox-Product Forms for Modern Agriculture" Pesticide Chemistry і Bioscience, The Food-Environment Challenge, Brooks і Roberts, Eds., Proceedings of the 9th International Congress on Pesticide Chemistry, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, pp. 120-133. Див. також патент США № 3235361, зі сторінки 6, рядок 16, до сторінки 7, рядок 19, і приклади 10-41; патент США № 3309192, зі сторінки 5, рядок 43, до сторінки 7, рядок 62, і приклади 8, 12, 15, 39, 41, 52, 53, 58, 132, 138-140, 162-164, 166, 167 і 169-182; патент США № 2891855, зі сторінки 3, рядок 66, до сторінки 5, рядок 17, і приклади 1-4; Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley і Sons, Inc., New York, 1961, pp 81-96 і Hance, et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989, причому кожний з даних джерел повністю включений у даний документ як посилання.

Способи за винаходом далі забезпечують розробку комбінацій гербіцидів для застосування на рослинах Brassica DP-073496-4. У таких способах оцінюють умови навколишнього середовища на оброблюваних землях. Умови навколишнього середовища, які можна оцінювати, у якості необмежуваних прикладів включають міркування забруднення ґрунту й поверхневих вод, призначення використання культури, стійкість культури, ґрунтові залишки, бур'яни, що присутні на оброблюваних землях, структуру ґрунту, pH ґрунту, кількість органічної речовини в ґрунті, устаткування для нанесення й способи оранки. Після оцінки умов навколишнього середовища ефективна кількість поєднання гербіцидів можна наносити на культуру, частину культури, насіння культури або на оброблювані землі.

У деяких варіантах здійснення гербіцид, нанесений на рослини Brassica DP-073496-4 по винаходу, служить для профілактики початку росту чутливих бур'янів і/або служить для ушкодження бур'янів, які ростуть на інтересуючій території. У деяких варіантах здійснення гербіцид або суміш гербіцидів проявляють ці ефекти на бур'яни, що впливають на культуру, причому культуру після цього саджають на інтересуючу територію (тобто, на поле або оброблювані землі). У способах за винаходом нанесення поєднання гербіцидів не обов'язково відбувається в те саме час. За умови, що поле, на якому посаджена культура, містить кількості, що детектуються, першого гербіциду, а другий гербіцид наносять у деякий момент часу протягом періоду, коли культура росте на оброблюваних землях, культура, як вважається, оброблена сумішню гербіцидів по винаходу. Таким чином, способи за винаходом охоплюють варіанти нанесення гербіцидів, які є «предвсходовими», «післявсходовими», «передпосівним уведенням» і/або в яких використовується обробка насіння перед посадкою.

В одному з варіантів здійснення надаються способи покриття насіння. Способи включають покриття насіння ефективною кількістю гербіциду або поєднанням гербіцидів (описаного в іншій частині даного документа). Насіння потім можуть висаджуватися на оброблювані землі. Далі надані насіння, що мають покриття, що включає ефективна кількість гербіциду або поєднання гербіцидів (описаного в іншій частині даного документа).

«Предвсходовий» відноситься до гербіциду, який наносять на інтересуючу територію (наприклад, на поле або оброблювані землі) перед видимими сходами рослини із ґрунту. «Післявсходовий» відноситься до гербіциду, який наносять на територію після того, як рослина видима зійде із ґрунту. У деяких випадках, терміни «предвсходовий» і «післявсходовий» використовують із посиланням на бур'ян на інтересуючій території, і в деяких випадках ці терміни використовують із посиланням на сільськогосподарську культуру на інтересуючій території. При використанні з посиланням на бур'ян, ці терміни можуть ставитися тільки до конкретного типу або виду бур'яну, який є присутнім або, як вважається, є присутнім на інтересуючій території. Тоді як будь-який гербіцид може наноситися шляхом предвсходової і/або післявсходової обробки, деякі гербіциди, як відомо, більш ефективні при контролі бур'яну або бур'янів, які наносяться перед або після сходів. Наприклад, римсульфурон володіє й предвсходовою, і післявсходовою активністю, тоді як інші гербіциди мають переважно предвсходову (метолахлор) або післявсходову (гліфосат) активність. Ці властивості конкретних гербіцидів відомі в даній галузі й легко визначаються фахівцем у даній галузі. Далі, фахівець в даній галузі легко може вибрати підходящі гербіциди й час нанесення для застосування із

трансгенними рослинами за винаходом й/або на територіях, де слід висівати трансгенні рослини по винаходу. «Передпосівне введення» включає введення сполучень у ґрунт перед посадкою.

Таким чином, винахід відноситься до поліпшених способів вирощування культури й/або контролю бур'янів, таким як, наприклад, «передпосівне випалювання», при якому територію обробляють гербіцидами перед посадкою інтересуючої культури, для кращого контролю бур'янів. Винахід також відноситься до способів вирощування культури й/або контролю бур'янів, які характеризуються «нульовою обробкою ґрунту» або «неглибокою оранкою» (також позначуваної як «зниження оранки»). У таких способах ґрунт не культивують або рідше культивують під час циклу вирощування в порівнянні із традиційними способами; ці способи можуть скоротити витрати, які будуть в протележном випадку здійснені на додаткове культивування, включаючи вартість роботи й палива.

Способи за винаходом охоплюють застосування одночасних і/або послідовних нанесень множинних класів гербіцидів. У деяких варіантах здійснення способи за винаходом включають обробку рослини за винаходом й/або інтересуючий території (наприклад, поля або оброблюваних земель), і/або бур'яну всього одним гербіцидом або іншим хімікатом, таким як, наприклад, сульфонілсечовинний гербіцид.

Час, у який гербіцид наносять на інтересуючу територію (і будь-які рослини на ній), може бути значимим для оптимізації контролю бур'янів. Час, у який наносять гербіцид, можна визначати з урахуванням розміру рослин і/або стадії росту й/або розвитку рослин на інтересуючій території, наприклад, сільськогосподарської культури або бур'янів, що ростуть на території. Стадії росту й/або розвитку рослин відомі в даній галузі. Таким чином, наприклад, час, у який гербіцид або інший хімікат наносять на інтересуючу територію, на якій ростуть рослини, може бути часом, у який деякі або всі рослини на конкретній території досяглися, щонайменше, конкретного розміру й/або стадії росту й/або розвитку, або часом, у який деякі або всі рослини на конкретній території ще не досяглися конкретного розміру й/або стадії росту й/або розвитку.

У деяких варіантах здійснення рослини Brassica DP-073496-4 за винаходом характеризуються поліпшеною стійкістю до післяпосівними обробками гербіцидом. Наприклад, рослини за винаходом можуть бути стійкими до більш високих доз гербіциду, стійкими до більш широкого інтервалу гербіцидів і/або можуть бути стійкими до доз гербіциду, нанесеним у ранні або пізні моменти розвитку, у порівнянні з підходящою контрольною рослиною. Наприклад, у деяких варіантах здійснення рослини Brassica DP-073496-4 за винаходом характеризуються підвищеною стійкістю до морфологічних дефектів, які відомі як результат обробки на конкретних стадіях розвитку. Таким чином, стійкі до гліфосату рослини за винаходом знаходять застосування в способах, що використовують, обробки гербіциду на більш пізніх стадіях розвитку, ніж це було припустимо раніше. Таким чином, рослини за винаходом можуть оброблятися конкретним гербіцидом, який викликає морфологічні дефекти в контрольних рослинах, оброблених на тих же стадіях розвитку, але стійкі до гліфосату рослини за винаходом не будуть значно ушкоджуватися тою же обробкою.

Різні хімікати, такі як гербіциди, характеризуються різними «залишковими» ефектами, тобто, різними періодами часу, протягом яких обробка хімікатом або гербіцидом продовжує виявляти дію на рослини, що ростуть на обробленій території. Такі ефекти можуть бути бажаними або небажаними, залежно від необхідної подальшої мети обробленої території (наприклад, поля або оброблюваних земель). Таким чином, схема обороту культур може бути обрана на основі залишкових ефектів від обробки, які будуть використовуватися для кожної культури і їх дії на культуру, яка буде потім вирощуватися на тій же території. Фахівцям в даній галузі відомі способи, які можна використовувати для оцінки залишкового ефекту гербіциду; наприклад, загалом, гліфосат має дуже маленьку залишкову активність у ґрунті або не має її, тоді як гербіциди, які діють на ALS, варіюють по своєму рівню залишкової активності. Залишкові активності різних гербіцидів відомі в даній галузі, і вони також, як відомо, змінюються з різними факторами навколишнього середовища, такими як, наприклад, рівні вологості ґрунту, температура, рН і композиція ґрунту (текстура й органічна речовина).

Крім того, трансгенні рослини за винаходом надають посилену стійкість до обробки додатковими хімікатами, широко використовуваними на культурах у поєднанні з обробкою гербіцидом, такими як антидоти, добавки, такі як сульфонат амонію й маслянистий концентрат для збереження рослин при обробці, і т.п. Термін «антидот» відноситься до речовини, яка при додаванні до препарату гербіциду скасовує або знижує фітотоксичні ефекти гербіциду у відношенні деяких культур. Фахівцям в даній галузі зрозуміло, що вибір антидоту частково залежить від інтересуючий сільськогосподарської культури, і конкретного гербіциду або поєднання гербіцидів, включених у синергічну гербіцидну композицію. Типові антидоти, придатні

для використання з описаними в даному документі гербіцидними композиціями, у якості необмежуваних прикладів включають ті, що описані в патентах США №№ 4808208; 5502025; 6124240 і в публікаціях патентних заявок США №№ 2006/0148647; 2006/0030485; 2005/0233904; 2005/0049145; 2004/0224849; 2004/0224848; 2004/0224844; 2004/0157737; 2004/0018940; 2003/0171220; 2003/0130120; 2003/0078167, описання яких включені в даний документ повністю в якості посилання. Способи за винаходом можуть використовувати гербіциди в поєднанні з гербіцидними антидотами, такими як беноксакор, ВКС (1-бром-4-[(хлорметил)сульфоніл]бензол), клоквінтосет-мексил, ціометриніл, дихлормід, 2-(дихлорметил)-2- метил-1,3-діоксолан (MG 191), фенхлоразол-етил, фенклорим, флуразол, флуксофенил, фурилазол, ізоксадифен-етил, мефенпір-діетил, метоксифенон ((4-метокси-3-метилфеніл)(3-метилфеніл)метанон), нафтойний ангідрид (1, 8-нафтойний ангідрид) і оксабетринил для підвищення схоронності культури. Ефективні в якості антидоту кількості гербіцидних антидотів можуть наноситися в той самий час із сполученнями по даному винаходу або можуть наноситися при обробці насіння. Таким чином, аспект даного винаходу відноситься до застосування суміші, що містить гліфосат, щонайменше один інший гербіцид і ефективне в якості антидоту кількість гербіцидного антидоту.

Обробка насіння особливо придатна для селективного контролю бур'янів, оскільки вона фізично обмежує обробку антидотами сільськогосподарської культури. Таким чином, особливо придатним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб селективного контролю росту бур'янів у полі, що включає обробку насіння, з яких вирощують культуру, ефективним у якості антидоту кількістю антидоту й обробку поля ефективною кількістю гербіциду для контролю бур'янів. Ефективні в якості антидотів кількості антидоти можуть легко встановлюватися фахівцем у даній галузі за допомогою простого експериментування. Ефективна в якості антидоту кількість антидоту присутня, коли необхідну рослину обробляють антидотом, так що дія гербіциду на рослину знижується в порівнянні з дією гербіциду на рослину, яку не обробляли антидотом; загалом, ефективне в якості антидоту кількість антидоту запобігає ушкодженню або важкому ушкодженню рослини, обробленої антидотом. Фахівець у даній галузі здатний установити, чи є застосування антидоту підходящим, і може встановити дозу, у якій антидот слід вводити рослинам

У конкретних варіантах здійснення гербіцид або поєднання гербіцидів, наносимі на рослину по винаходу, діють у якості антидоту. У цьому варіанті здійснення перший гербіцид або суміш гербіцидів наносять на рослину в ефективній в якості антидоту кількості. Таким чином, надається спосіб контролю бур'янів на оброблюваних землях. Спосіб включає засів території насіннями культури або засадження рослинами, які містять перший полінуклеотид кодуєчий поліпептид, який може забезпечувати стійкість до гліфосату, функціонально пов'язаний із промотором, активним у рослині; і другий полінуклеотид кодуєчий поліпептид, стійкий до інгібітору ALS, функціонально пов'язаний із промотором, активним у рослині. Поєднання гербіцидів, що містить, щонайменше, ефективну кількість першого й другого гербіциду, наносять на культуру, частину культури, бур'ян або оброблювані землі з культурою. Ефективна кількість поєднанням гербіцидів контролює бур'яни; і ефективна кількість першого гербіциду не переноситься культурою, коли воно наноситься окремо, у порівнянні з контрольною культурою, яка не зазнала впливу першого гербіциду; і ефективної кількості другого гербіциду досить для надання дії антидоту, де дія антидоту надає підвищення стійкості культури після нанесення першого й другого гербіциду в порівнянні зі стійкістю культури при нанесенні тільки першого гербіциду.

У конкретних варіантах здійснення поєднання гербіцидів-антидотів включає перший інгібітор ALS і другий інгібітор ALS. В інших варіантах здійснення ефект антидоту досягається нанесенням ефективною кількістю поєднання гліфосату й щонайменше одного хімікату-інгібітору ALS. Такі суміші надають підвищену стійкість культури (тобто, зниження ушкодження гербіцидом). Даний спосіб забезпечує зниження кількості наночастин хімікатів до або після обробки. Такі способи знаходять застосування для підвищеного контролю небажаної або непотрібної рослинності. В інших варіантах здійснення вплив антидоту досягається, коли культуру Brassica DP-073496-4, частини рослин культури, насіння культури, бур'яни або оброблювані землі обробляють щонайменше одним гербіцидом із сімейства хімікатів сульфонілсечовини в поєднанні з щонайменше одним гербіцидом із сімейства імідазоліонів. Цей спосіб надає підвищену стійкість культури (тобто, зниження ушкодження гербіцидом). У конкретних варіантах здійснення сульфонілсечовина включає римсульфурон, а імідазоліон включає імазетапір. В інших варіантах здійснення на культуру, частини рослин культури або оброблювані землі також наносять гліфосат.

Застосовуваний у даному документі термін «добавка» відноситься до будь-якої речовини, доданої до розчину для розпилення або до препарату для модулювання дії

сільськогосподарського хімікату або фізичних властивостей розчину для розпилення. Див., наприклад, Green and Foy, (2003) "Adjuvants: Tools for Enhancing Herbicide Performance", in Weed Biology i Management, ed. Inderjit (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands). Адьюванти можуть розділятися на категорії й підкласи, такі як активатори, підкислювачи, буфери, добавки, 5 клейкі речовини, дефлокулянти, противспінювачи, піногасники, антифризи, аттрактанти, основні суміші, хелатуючі засоби, очисники, барвники або пігменти, засоби сумісності, співрозчинники, зв'язуючі засоби, маслянисті концентрати для захисту культури від гербіцидів, засоби змиву, детергенти, дисперсанти, засобу контролю змиву, емульгатори, засобу зниження випару, наповнювачі, добрива, пінні маркери, наповнювачі препаратів, інертні добавки, зволожувачи, 10 метильовані олії насіння, СОС з високим завантаженням, полімери, модифіковані рослинні олії, пенетратори, репеленти, концентрати мінерального олії, консерванти, засоби захисту від дощу, утримувальні добавки, солюбілізатори, поверхнево-активні речовини, розпилювачі, клеючі склади, адгезивні агенти, синергісти, загусники, засоби, що забезпечують перенос, засоби захисту від ультрафіолету, рослинні олії, водопопільшуючі засоби й засоби для змочування.

15 Крім того, способи за винаходом можуть включати застосування гербіцидів або суміші гербіцидів, а також один або декілька інших інсектицидів, фунгіцидів, нематодіцидів, бактерицидів, акарицидів, регуляторів росту, хімічних стерилізаторів, семохімікати, репелентів, аттрактантів, феромонів, стимуляторів підгодовування або інших біологічно активних сполучень або ентомопатогенних бактерій, вірусів або грибів для утвору мультикомпонентної суміші, що 20 забезпечує більш широкий спектр сільськогосподарського захисту. Приклади таких сільськогосподарських засобів захисту, які можна використовувати в способах по винаходу, включають: інсектициди, такі як абаментин, ацефат, ацетаміпрід, амідфлумет (S-1955), авермектин, азадирахтин, азинфос-метил, біфентрин, біфеназат, бупрофезин, карбофуран, картап, хлорфенапір, хлорфлуазурон, хлорпірифос, хлорпірифос-метил, хромафенозид, 25 клотіанідин, цифлуметофен, цифлутрин, бета-цифлутрин, цигалотрин, лямбда-цигалотрин, циперметрин, циромазин, дельтаметрин, діафентіурон, діазинон, діелдрин, дифлубензурон, димефлутрин, диметоат, динотефуран, діофенолан, емаментин, ендосульфат, есфенвалерат, етипрол, фенотіокарб, феноксикарб, фенпропатрин, фенвалерат, фипроніл, флонікамід, флубендіамід, флуцитринат, тау-флувалинат, флуфенирим (UR-50701), флуфеноксурон, 30 фонофос, галофенозид, гексафлумурон, гидраметилон, імідаклопрід, індоксакарб, ізофенфос, луфенурон, малатіон, метафлумізон, металдегид, метамідофос, метидатіон, метоміл, метопрен, метоксиклор, метофлутрин, монокротофос, метоксифенозид, нітенпірам, нітіазин, новалурон, новифлумурон (XDE-007), оксаміл, паратіон, паратіон-метил, перметрин, форат, фосалон, фосмет, фосфамідон, піримикарб, профенофос, профлутрин, піметрозин, 35 пірафлупрол, піретрин, піридазил, пірипрол, пірипроксифен, ротенон, ріанодин, спіносад, спіродиклофен, спіромезифен (BSN 2060), спіротетрамат, сульпрофос, тебуфенозид, тефлубензурон, тефлутрин, тербуфос, тетраклорвінфос, тіаклопрід, тіаметоксам, тіодикарб, трисульфат-натрій, тралометрин, тріазамат, трихлорфон і трифлумурон; фунгіциди, такі як ацибензолар, альдиморф, амисульбром, азаконазол, азоксистробін, беналаксил, беноміл, 40 бентіавалікарб, бентіавалікарб-ізопропіл, біноміал, біфеніл, бітертанол, бластицидин-S, суміш Бордо (трехосновний сульфат міді), борсалід/нікобіфен, бромуконазол, бупіримат, бутіобат, карбоксин, карпропамід, каптафол, каптан, карбедазим, хлороніб, хлорталоніл, хлосолінат, клотримазол, оксихлорид міді, солі міді, такі як сульфат міді й гідроксид міді, ціазофамід, цифлунамід, цимоксаніл, ципроконазол, ципродиніл, дихлорфлуанід, диклоцимет, дикломезин, 45 диклоран, діетофенкарб, дифеноконазол, диметоморф, димоксистробін, диниконазол, диниконазол-М, динокап, дискостробін, дитіанон, додеморф, додин, еконазол, етаконазол, едифенфос, епоксиконазол, етакосам, етиримол, етридіазол, фамоксадон, фенамідон, фенаримол, фенбуконазол, фенкарамід, фенфурам, фенгексамід, феноксаніл, фенпиклоніл, фенпропідин, фенпропіморф, ацетат фентина, гідроксид фентина, фербам, ферфуразоат, 50 феримзон, флуазинам, флудіоксоніл, флуметовер, флуопіколід, флуоксастробін, флуквінконазол, флузилазол, флусульфамід, флутоланіл, флутріафол, фолпет, фосетил-алюміній, фуберідазол, фуралаксил, фураметаніл, гексаконазол, гимексазол, гуазатин, ентомопатогенних бактерій, імібенконазол, іміноктадин, іодикарб, іпконазол, іпробенфос, іпродіон, іпровалікарб, ізоконазол, ізопротиолан, касугаміцин, крезоксим-метил, манкозіб, 55 мандипропамід, манеб, мапаніпірін, мефеноксам, мепроніл, металаксил, метконазол, метасульфокарб, метирам, метоміностробін/феноміностробін, мепаніпірим, метрафенон, миконазол, миклобутаніл, непро-азоцин (метанарсонат заліза-III), нуаримол, октилінон, офурас, оризастробін, оксакисил, оксолінова кислота, окспоконазол, оксикарбоксин, паклобутразол, пенконазол, пенцикурон, пентіопірад, перфуразоат, фосфонова кислота, 60 фталид, пікобензамід, піоксистробін, поліоксин, пробеназол, прохлораз, процімідон,

пропамокарб, пропамокарб-гідрохлорид, пропіконазол, пропінеб, проквіназид, протіконазол, піраклостробін, пріазофос, пірифенокс, піриметаніл, пірифенокс, піролнітрин, піроквилон, квінконазол, квінксофен, хінтозин, силтіофам, симеконазол, спіроксамін, стрептоміцин, сірка, тебуконазол, техразин, теклофталам, техназин, тетраконазол, тіабендазол, тифлузамід, тіофанат, тіофанат-метил, тирам, тіадиніл, толклофос-метил, толифлуанід, тріадимефон, тріадименол, тріаримол, тріазоксид, тридеморф, тримопрямід трициклазол, трифлуксистробін, трифорин, тритиконазол, уніконазол, валідаміцин, вінклозолин, зинеб, зирам і зоксамід; нематоциди, такі як альдикарб, оксаміл і фенаміфос; бактеріциди, такі як стрептоміцин; акарициди, такі як амітраз, хінометіонат, хлорбензилат, цигексатин, дикофол, діенохлор, етоксазол, феназаквін, оксид фенбутатина, фенопропатрин, фенпіроксимат, гекситіазокс, пропаргит, піридабен і тебуфенпірад, і біологічні засоби, що включають ентомопатогенні бактерії, такі як *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, і інкапсульованні дельта-ендотоксини *Bacillus thuringiensis* (наприклад, Cellcap, MPV, MPVII); ентомопатогенні гриби, такі як гриб зелена мускардина; і ентомопатогенні віруси, що включають бакуловіруси, нуклеополієдровіруси (NPV), тому що HzNPV, AfNPV; і віруси гранулеза (GV), такі як CrGV. Масові відносини цих різноманітних компонентів суміші з іншими композиціями (наприклад, гербіциди), використовуваними в способах по винаходу, як правило, становлять від 100:1 до 1:100 або від 30:1 до 1:30, від 10:1 до 1:10 або від 4:1 до 1:4.

Даний винахід також відноситься до композиції, що містить біологічно ефективну кількість інтересуючого гербіциду, або суміші гербіцидів і ефективна кількість щонайменше одного додаткового біологічно активного сполучення або засобу, і вона може додатково містити щонайменше один засіб з поверхнево-активної речовини, твердого наповнювача або рідкого наповнювача. Прикладами таких біологічно активних сполучень або агентів є: інсектициди, такі як абаментин, ацефат, ацетаміпрід, амідфлумет (S-1955), авермектин, азадирахтин, азинфос-метил, біфентрин, біфеназат, бупрофезин, карбофуран, хлорфенапір, хлорфлуазурон, хлорпірифос, хлорпірифос-метил, хромафенозид, клотіанідин, цифлутрин, бета-цифлутрин, цигалотрин, лямбда-цигалотрин, циперметрин, циромазин, дельтаметрин, діафентіурон, діазинон, дифлубензурон, диметоат, діофенолан, емаментин, ендосульфат, есфенвалерат, етипрол, фенотіокарб, феноксикарб, фенпропатрин, фенвалерат, фіпроніл, флониамід, флуцитринат, тау-флувалинат, флуфенирим (UR-50701), флуфеноксурон, фонофос, галофенозид, гексафлумурон, імідаклопрід, індоксакарб, ізофенфос, луфенурон, малатіон, металдегід, метамідофос, метидатіон, метоміл, метопрен, метоксихлор, монокротофос, метоксифенозид, нитіазин, новалурон, новифлумурон (XDE-007), оксаміл, паратіон, паратіон-метил, перметрин, форат, фосалон, фосмет, фосфамідон, піримікарб, профенофос, піметрозин, піридазил, пірипроксифен, ротенон, спіносад, спіромезифен (BSN 2060), сульпрофос, тебуфенозид, тефлубензурон, тефлутрин, тербуфос, тетрахлорвінфос, тіаклопрід, тіаметоксам, тіодикарб, трисульфат-натрій, тралометрин, трихлорфос і трифлумурон; фунгіциди, такі як ацибензолар, азоциклоптробін, беноміл, бластіцидін-S, суміш Бордо (тріохосновний сульфат міді), бромуконазол, карпропамід, каптафол, каптан, карбедазим, хлоронеб, хлорталоніл, оксихлорид міді, солі міді, цифлуфенамід, цимоксаніл, ципроконазол, ципродініл, (S)-3,5-дихлор-N-(3-хлор-1-етил-1-метил-2-оксопропіл)-4-метилбензамід (RH 7281), диклоцимет (S-2900), дикломезин, диклоран, дифеноконазол, S)-3,5-дихлор-5-метил-2-(метилтіо)-5-феніл-3-(феніламіно)-4Н-імідазол-4-он (RP 407213), диметоморф, димоксистробін, дініконазол, дініконазол-М, додін, едифенфос, епоксиконазол, фамоксадон, фенамідон, фенаримол, фенбуконазол, фенкарамід (SZX0722), фенпиклоніл, фенпропідін, фенпропіморф, ацетат фентіну, гідроксид фентіну, флуазінам, флудіоксоніл, флуметовер (RPA 403397), флуморф/флуморлін (SYP-L190), флуоксастробін (HEC 5725), флуквіконазол, флузилазол, флутоланіл, флутріафол, фолпет, фосетил-алюміній, фуралаксил, фураметапір (S-82658), гексаконазол, іпконазол, іпробенфос, іпродіон, ізопротіолан, касугаміцин, крезоксим-метил, манкозєб, манєб, мефеноксам, мепроніл, металаксил, метконазол, метоміностробін/феноміностробін (SSF-126), метрафенон (AC375839), миклобутаніл, нео-азоцін (метанарсонат заліза-III), нікобіфен (BAS 510), оризастробін, оксациксил, пенконазол, пенцикурон, пробеназол, прохлораз, пропамокарб, пропіконазол, проквіназид (DPX-KQ926), протіконазол (JAU 6476), пірифенокс, піраклостробін, піриметаніл, піроквилон, квінксофен, спіроксамін, сірка, тебуконазол, тетраконазол, тіабендазол, тифлузамід, тіофанат-метил, тирам, тіадиніл, тріадимефон, тріадименол, трициклазол, трифлуксистробін, тритиконазол, валідаміцин і вінклозолін; нематоциди, такі як альдикарб, оксаміл і фенаміфос; бактеріциди, такі як стрептоміцин; акарициди, такі як амітраз, хінометіонат, хлорбензилат, цигексатин, дикофол, діенохлор, етоксазол, феназаквін, оксид фенбутатина, фенопропатрин, фенпіроксимат, гекситіазокс, пропаргит, піридабен і тебуфенпірад, і біологічні засоби, що включають

ентомопатогенні бактерії, такі як *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, і інкапсульованні дельта-ендотоксини *Bacillus thuringiensis* (наприклад, Cellcap, MPV, MPVII); ентомопатогенні гриби, такі як гриб зелена мускардіна; і ентомопатогенні віруси, що включають бакуловируси, нуклеополієдровіруси (NPV), тому що Hznprv, Afnpv; і віруси гранулеза (GV), такі як Crgv. Способи за вінаходом можуть також включати застосування рослин, генетично трансформованих для того, щоб експресувати білки, токсичні для безхребетних-шкідників (такі як дельта-ендотоксини *Bacillus thuringiensis*). У таких варіантах здійснення ефект наношувних ззовні сполучень для контролю шкідників може бути синергічним з експресованими білками-токсинами.

Основні посилання на ці сільськогосподарські захисні засоби включають *The Pesticide Manual*, 13th Edition, Tomlin, Ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, U.K., 2003 і *The Biopesticide Manual*, 2nd Edition, Copping, Ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, U.K., 2001.

У деяких випадках поєднанням з іншими сполученнями або засобами для контролю безхребетних-шкідників, що мають подібний спектр контролю, але інший спосіб дії, будуть, зокрема, кращими для керування стійкістю. Таким чином, композиції по даному вінаходу можуть додатково містити біологічно ефективну кількість щонайменше одного додаткового сполучення або засобу для контролю шкідників-безхребетних, що має, подібний спектр контролю, але інший спосіб дії. Контакт рослини, генетично модифікованого так, що воно експресує сполучення захисту рослини (наприклад, білок), або місця перебування рослини з біологічно ефективною кількістю сполучення по даному вінаходу може також надавати більш широкий спектр захисту рослини й бути кращою для керування стійкістю.

Таким чином, у способах за вінаходом може використовуватися гербіцид або поєднання гербіцидів, вони можуть додатково включати застосування інсектицидів і/або фунгіцидів, і/або інших сільськогосподарських хімічних сполук, таких як добрива. Застосування таких комбінованих способів обробки за вінаходом може розширити спектр активності проти додаткових видів бур'янів і пригнічує розмноження будь-яких стійких біотипів.

Способи за вінаходом можуть додатково використовувати застосування регуляторів росту рослин, таких як авигліцин, N-(фенілметил)-1H-пурін-6-амін, етефон, епохалеон, гібберелінова кислота, гібберелін A₄ і A₇, білок харпін, хлорид мепиквату, прогексадіон кальцію, прогідрожасмон, нітрофенолят натрію й трінексапак-метил, і організми, що модулюють ріст рослини, такі як *Bacillus cereus* штаму BP01.

Варіанти здійснення даного вінаходу далі визначені в наступних прикладах. Слід розуміти, що ці приклади наведені тільки в якості ілюстрації. З наведеної вище дискусії й цих прикладів фахівець у даній галузі може встановити характеристики, властиві даному вінаходу, без відхилення від його сутності й обсягу, може осунестити різні зміни й модифікації варіантів здійснення вінаходу, для адаптації його до різних варіантів застосування й умов. Таким чином, різні модифікації варіантів здійснення вінаходу на додаток до тем, які показані й описані в даному документі, зрозумілі фахівцям у даній ділянці з наведеного вище опису. Такі модифікації також, як мається на увазі, попадають в обсяг прикладеної формули вінаходу.

Експериментальна частина

Наступні скорочення використовують при описі даного вінаходу.

ALS	білок ацетолактатсинтаза
п.о.	пари основ
glyat4621	ген гліфосатуцетилтрансферази
GLYAT4621	білок гліфосатуцетилтрансфераза
zm-als	ген ацетолактатсинтази Brassica дикого типу
zm-hra	модифікована версія гена ацетолактатсинтази Brassica
т.п.о.	тисяч пар основ
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
UTR	нетрансльована ділянка

Приклад 1. Характеристика послідовності вставки й прикордонної фланкуючої послідовності події Brassica DP0-73496-4

Ранс (*Brassica napus* L.) модифікували шляхом вставки гена гліфосатуцетилтрансферази (glyat4621), що відбувається з *Bacillus licheniformis* і оптимізованого шляхом генного тасування. Плазмида PHP28181 містить експресуючу касету, описану тут і далі.

Конструкцію ДНК PHP28181 одержували клонуванням фрагмента GAT4621:PINII TERM, вирізаного з конструкції ДНК pZSL149 подвійним розщепленням BamHI і MfeI, нижче промотору AT-UBQ10 конструкції ДНК QC272 у ті ж ділянки BamHI і MfeI з використанням ДНК-лигази T4

(New England Lab). Отримана в результаті ДНК RHP28181 містить експресуючі касети: AT-UBQ10 (DUPONT) PRO:GAT4621:PINII TERM. Див. фігуру 1 і фігуру 2.

Фрагмент ДНК RHP28181A довжиною 2112 п.о. одержували із плазмиди RHP28181 подвійним розщепленням рестрикційними ферментами HindIII і NotI. Розщеплену ДНК -плазмиду розділяли в 1% агарозном гелі шляхом електрофореза. Смугу ДНК правильного розміру вирізали, і екстрагували фрагмент ДНК із використанням набору для екстракції фрагментів ДНК Qiagen (Qiagen). Чистоту фрагментів ДНК перевіряли шляхом ПЛР серією розведень із позитивним контролем ДНК *amp^r*, оскільки плазида RHP28181 містить у своєму каркасі ген *amp^r*. Концентрацію фрагментів ДНК вимірювали спектрофотометричне й підтверджували порівнянням з низькомолекулярними маркерами ДНК (I InVitrogen) в агарозном гелі.

Трансформацію проводили, по суті, як описано Chen and Tulsieram у публікації патентної заявки США № 2007/0107077. Бруньки збирали від донорської лінії NS1822BC і стерилізували. Потім бруньки гомогенізували, фільтрували й промивали для збору мікроспор. Отриману в результаті суспензію мікроспор доводили до встановленої щільності й культивували протягом 2 доби. Потім виділяли ембріогенні мікроспори шляхом градієнтного центрифугування й культивували.

Золоті частки, покриті фрагментом ДНК RHP28181A використовували для трансформації. Біолістичну трансформацію проводили з використанням системи доставки часток PDS-1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA), як описано Klein, et al., (1987) Nature 327:70-73. Трансформовані ембріогенні мікроспори культивували у свіжому середовищі в темряві протягом 10-12 доби, а потім у неяскарому світлі протягом 1-3 тижнів. Зелені ембріони переносили у свіже середовище й культивували протягом двох тижнів для селекції на стійкість до гліфосату. Гермінативні пагони й/або рослини переносили в середовище для вирощування, доповнену гліфосатом.

Ген *glyat4621* одержували із ґрунтової бактерії *Bacillus licheniformis* і синтезували за допомогою процесу тасування генів для оптимізації активності ацетилтрансферази ферменту GLYAT4621 (Castle, et al., (2004) Science 304:1151-1154).

Вбудований фрагмент (фігура 3) з даної плазмиди містить генну касету *glyat4621*. Експресія гена *glyat4621* контролюється регуляторною ділянкою UBQ10 з *Arabidopsis* і термінатором рінії (див. таблицю 4). Зміст фрагмента трансформації плазмиди RHP28181 показано в таблиці 4. Генетичні елементи плазмиди RHP28181, використані для одержання DP-073496-4, показано в таблиці 3.

Таблиця 3

Опис генетичних елементів плазмиди RHP28181

Ділянка	Локалізація на плазмиді (положення пар основ)	Відомий генетичний елемент	Розмір (пара основ)	Опис
Фрагмент трансформації RHP28181A	від 1 до 2112		2112	Див. таблицю 4 для інформації з елементів цієї ділянки
Конструкція плазмиди	від 2113 до 4770	Включає наведені нижче елементи	2658	ДНК із різних джерел для конструкції плазмиди й реплікації плазмиди
	від 2736 до 3596	<i>bla</i> (Apr)	861	Ген β-лактамази, кодуєчий стійкість до ампициліну, з <i>E. coli</i> (Sutcliffe, 1978) (Yanisch-Perron, et al., 1984)
	від 4170 до 4539	<i>ori</i> <i>col</i> 1	370	Фрагмент <i>Hae</i> II, що містить, бактеріальну ділянку початку реплікації (, що відбувається з <i>col</i> 1) (Tomizawa et al., 1977)

Таблиця 4

Опис генетичних елементів фрагмента трансформції PHP28181A

Локалізація на фрагменті (положення пар основ)	Генетичний елемент	Розмір (пара основ)	Опис
Від 1 до 7	Полілінкерная ділянку	7	Ділянка, необхідна для клонування генетичних елементів
Від 8 до 1312	Промотор UBQ10	1305	Версія промоторной ділянки з гена поліубіквітін Arabidopsis thaliana UBQ10 (Norris et al, 1993), розроблена E. I. dupont de Nemours and Company
Від 1313 до 1335	Полілінкерная ділянка	23	Ділянка, необхідна для клонування генетичних елементів
Від 1336 до 1779	Ген gat4621	444	Синтетичний ген гліфосат-п-ацетилтрансферази (Castle et al., 2004; Siehl et al, 2007)
Від 1780 до 1796	Полілінкерная ділянка	17	Ділянка, необхідна для клонування генетичних елементів
Від 1797 до 2106	Термінатор pinii	310	Термінаторная ділянку із гена інгібітору протеїнази II Solanum tuberosum (Keil et al. 1986; An et al., 1989)
Від 2107 до 2112	Полілінкерная ділянка	6	Ділянку, необхідна для клонування генетичних елементів

Визначали нуклеотидну послідовність вбудованої ДНК події DP-073496-4. За допомогою ПЛР-ампліфікації унікальних ділянок сполучення, що перекриваються з уведеними генетичними елементами, можна відрізнити рослини DP-073496-4 від них не модифікованих генетично варіантів, і її можна використовувати для скрінінга присутності вбудованої ДНК навіть при дуже низьких концентраціях. Нижче описаний аналіз геномної ДНК із Brassica DP-073496-4 шляхом специфічної відносно конструкції полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Конкретно, геномну ДНК із тестуємого матеріалу (рослинний матеріал події DP-073496-4) і контрольного матеріалу (рослинний матеріал не модифікованої генетично Brassica з генетичним фоном, що представляють фон цієї події) виділяли й піддавали кількісній ПЛР-ампліфікації з використанням специфічної відносно конструкції пари праймерів. Продукти ПЛР розділяли в 1,5% або 2% агарозних гелях для підтвердження присутності вбудованої конструкції в геномній ДНК, отриманої з тестуємого матеріалу, і її відсутності в геномній ДНК, отриманої з контрольного матеріалу. Контрольний стандарт (сходовий маркер ДНК із різницею в 100 пару основ; Invitrogen Corporation, каталожний № 10380-012) використовують для визначення розміру продукту ПЛР.

Тестируємий і контрольний зразки одержували з рослин. Екстракцію геномної ДНК із тестируємих і контрольних тканин проводять із використанням стандартного протоколу екстракції за допомогою сечовини у випадку тканини листів. Геномну ДНК із тестируємих і контрольних зразків виділяють із використанням системи для рослинної ДНК Wizard® Magnetic 96 (Promega Corporation, каталожний № FF3760) у випадку тканини насіння. Геномну ДНК кількісно визначають на спектрофлуориметре з використанням реагенту Picogreen® (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) і/або візуалізують на агарозному гелі для підтвердження концентрації, певним шляхом кількісного аналізу, і для визначення якості ДНК.

Геномну ДНК, виділену з рослинного матеріалу події DP-073496-4 і контрольних зразків, піддають ампліфікації ПЛР (PCR Master Mix, каталожний № 7505 від Promega Corporation), з використанням специфічної відносно конструкції пари праймерів, яка перекриває, щонайменше, частину кодуючої ділянки gylat4621 і забезпечує унікальну ідентифікацію події в кукурудзі DP-073496-4. Другий набір праймерів використовують для ампліфікації ендегенного гена у якості позитивного контролю ампліфікації ПЛР. Ділянка-мішень ПЛР і розмір очікуваного продукту ПЛР для кожного набору праймерів порівнюють зі спостережуваними результатами.

Приклад 2. Характеристика події DP-073496-4 шляхом блота по Саузерну

Аналізи за допомогою блота по Саузерну (Southern, 1975) проводять для дослідження числа ділянок вставки трансформуючої ДНК, числа копій і функціональної цілісності генетичних елементів і відсутності послідовностей плазмідного кістяка.

Використовуваний спосіб, загалом, описаний у такий спосіб. Геномну ДНК екстрагують із ліофілізованої тканини, отриманої з Brassica DP-073496-4 і не модифікованих генетично контрольних рослин. Геномну ДНК розщеплюють ферментами - рестрикційними ендонуклеазами й розділяють по розміру на агарозном гелі. Маркер молекулярної маси розділяють разом зі зразками для цілей оцінки розміру. Фрагменти ДНК, розділені на агарозном гелі, депуринізують, денатуриують і нейтралізують *in situ*, і переносять на нейлону мембрану. Після переносу на мембрану ДНК зв'язують із мембраною шляхом перехресного зв'язування шляхом УФ. Фрагменти, гомологічні гена *glyat4621*, одержують шляхом ПЛР із плазміді РНР28181, розділяють на агарозном гелі по розміру, вирізують і очищають із використанням набору екстракції з гелю. Мічений зонд гібридизують з більшою цільовий ДНК на нейлонових мембранах для детекції специфічних фрагментів. Промивання після гібридизації проводять при високій твердості. Блоти експонують на рентгенівську плівку одного разу або в кілька моментів часу для детектування гібридизованих фрагментів і візуалізації маркерів молекулярної маси.

Приклад 3. Експресія вставок

Експресію білка GLYAT4621 оцінюють із використанням тканини листів, отриманої із трансгенних рослин. Наприклад, чотири свіжі пучки листів можуть бути зібрані й розмелені в буфері для екстракції зразка з використанням Genogrinder (Spex Certiprep). Загальний екстрагуємий білок (ТЕР) можна визначати з використанням аналізу білка Bio-Rad, який заснований на процедурі зв'язування барвника по Бредфорду. Екстракти зразка можуть розбавлятися в буфері для екстракції зразка для аналізу ELISA.

Рівні експресії білка GAT4621 в Brassica DP-073496-4 можна визначати кількісним твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA) зразків, отриманих з різних місць поля для випробувань. Реплики зразків насіння (три репліката) можна одержувати з рослин DP-073496-4, оброблених максимально рекомендованою на етикетці концентрацією гербіциду гліфосату Touchdown® Total (500 г/л гліфосату у вигляді калієвої солі; 0,60-1,35 л/га), нанесеної на сім'ядолю на стадії 6 листів, оскільки це відтворює найбільш імовірний сценарій комерційного культивування.

Іншим шляхом верифікації експресії вставки в рослині Brassica DP-073496-4 є оцінка стійкості трансформованих рослин до гліфосату. Стабільність у багатьох поколіннях і розщеплення в поколінні ознаки стійкості до гербіциду, забезпечуваного експресією ферменту GAT4621, підтверджують функціональним аналізом стійкості до гербіцидів. Тести проводять на щонайменше трьох поколіннях рослинного матеріалу. Ушкодження гербіцидом може оцінюватися, як описано в таблиці 5.

Таблиця 5

Система оцінки ушкодження культури гербіцидом від 0 до 100

Рейтинг	Основні категорії	Докладний опис
0	Немає ефекту	Ні гноблення або ушкодження культури
10 20 30	Слабкий ефект	Слабке знебарвлення або уповільнення росту культури Деяке знебарвлення, уповільнення або гноблення росту Більш виражене ушкодження культури, але нетривале
40 50 60	Помірний ефект	Помірне ушкодження культури, як правило, видужує Більш тривале ушкодження культури, видужання сумнівне Тривале ушкодження культури, немає видужання
70 80 90	Виражений ефект	Важке ушкодження культури й стійкі втрати Культура майже зруйнована - рослин мало, що вижили Залишилися живими тільки окремі рослини культури
100	Повноцінний ефект	Повне руйнування рослин

+++

40 Приклад 4. Специфічний відносно конструкції аналіз ПЛР події Brassica DP-073496-4

Геномну ДНК, виділену з листів каноли DP-073496-4 (покоління T2F2) і контрольної каноли (не модифікованої генетично), піддавали ампліфікації шляхом ПЛР (Roche High Fidelity PCR Master Kit, Roche, каталожний № 12140314001) з використанням специфічної відносно конструкції пари праймерів (09-0-3290/09-0-3288), яка перекриває промотор убіквітину й касету

гена *gat4621* (фігура 4). Другий набір праймерів (09-0-2812/09-0-2813) використовували для ампліфікації ендегенного гена *FatA* у якості позитивного контролю ампліфікації ПЛР. Ділянка-Мішень ПЛР і розмір очікуваного ПЛР-продукту для кожного набору праймерів показано в таблиці 8. Реагенти для ПЛР і умови реакції показано в таблиці 9. Послідовності праймерів, використані в даному дослідженні, перераховано в таблиці 10. У даному дослідженні 100 нг

Продукт ПЛР розміром приблизно 600 п.о., ампліфікований за допомогою специфічного відносно конструкції набору праймерів 09-0-3290/09-0-3288, спостерігали в реакціях ПЛР із використанням плазмиди РНР28181 {10 нг} у якості матриці й трьох рослин каноли DP-073496-4, але він був відсутній у трьох контрольних рослинах каноли, і в контролі без матриці (фігура 5). Зразки завантажували, як показано в таблиці 6.

Таблиця 6

Доріжка	Зразок
1	Низькомолекулярні маркери молекулярної маси
2	Порожня доріжка
3	Не модифікована генетично канола С1
4	Не модифікована генетично канола С2
5	Не модифікована генетично канола С3
6	Канола DP-073496-4 Т1
7	Канола DP-073496-4 Т2
8	Канола DP-073496-4 Т3
9	Контроль без матриці
10	Плазида РНР28181
11	Порожня доріжка
12	Низькомолекулярні маркери молекулярної маси

Ці результати відповідають очікуваному розміру продукту ПЛР (675 п.о.) для зразків, що містять геномну ДНК каноли DP-073496-4. Продукт ПЛР розміром приблизно 450 п.о. спостерігали для каноли DP-073496-4 і контрольних рослин каноли після реакції ПЛР із набором праймерів 09-0-2812/09-0-2813 для детекції ендегенного гена *FatA* (фігура 6). Зразки завантажували, як показано в таблиці 7.

Таблиця 7

Доріжка	Зразок
1	Низькомолекулярні маркери молекулярної маси
2	Порожня доріжка
3	Не модифікована генетично канола С1
4	Не модифікована генетично канола С2
5	Не модифікована генетично канола С3
6	Канола DP-073496-4 Т1
7	Канола DP-073496-4 Т2
8	Канола DP-073496-4 Т3
9	Контроль без матриці
10	Плазида РНР28181
11	Порожня доріжка
12	Низькомолекулярні маркери молекулярної маси

Ці результати відповідають очікуваному розміру продукту ПЛР (506 п.о.) для зразків геномної ДНК, що містять ендегенний ген каноли *FatA*. Смуку ендегенної мішені не спостерігали в контролі, що не містить матрицю.

Таблиця 8

Ділянка геномної ДНК - мішень для ПЛР і очікуваний розмір продуктів ПЛР

Набір праймерів	Ділянка-мішень	Очікуваний розмір продукту ПЛР (п.о.)
09-0-3290/09-0-3288	Специфічний для конструкції промотор убіквітіну й gat4621	675
09-0-2812/09-0-2813	Ендогенний ген каноли FatA ¹	506

ПЛР: ПОЛІМЕРАЗНАЯ ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

п.о. ПАРА ОСНОВ

¹ Номер доступу Genbank для гена FatA X87842.1. Цю послідовність використовували для конструювання праймерів ПЛР.

+++

Таблиця 9

Реагенти для ПЛР і умови реакції

Реагенти для ПЛР		Умови реакції ПЛР			
Реагент	Об'єм (мкл)	Елемент циклу	Темп. (°C)	Час (сек)	Число циклів
Матриця ДНК (100 нг/мкл)	1	Вихідна денатурація	94	120	1
Праймер 1 (10 мкМ)	0,75	Денатурація	94	10	35
Праймер 2 (10 мкМ)	0,75	Відпал	65	20	
PCR Master Mix*	12,5	Елонгація	72	45	
ddH ₂ O	10	Кінцева елонгація	72	180	1
		Цикл витримання	4	До аналізу	

ПЛР: ПОЛІМЕРАЗНАЯ ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

ddH₂O: бідистильована вода

* Roche High Fidelity Master Mix

Таблиця 10

Список праймерних послідовностей, використовуваних у реакціях ПЛР

Назва праймера	Послідовність 5'-3'	Послідовність-Мішень
09-0-3290	SEQ ID NO 4: AGCTATTGCTTCACCGCCTTAGC	Промотор убіквітіну
09-0-3288	SEQ ID NO: 5 GCTCAGCTTGGTGAATGAAGCCAC	gat4621
09-0-2812	SEQ ID NO: 6 GACACAAGGCGGCTTCAAAGAGTTACAGATG	Ендогенний FatA каноли
09-0-2813	SEQ ID NO 7: ACAATGTCATCTTGCTGGCATTCTCTCTG	Ендогенний FatA каноли

5

Приклад 5. Подальша характеристика вставки й фланкуючої крайової послідовності події Brassica DP-073496-4

Для характеристики цілісності вбудованої ДНК і ділянки вставки в геном визначали фланкуючі прикордонні ділянки геномної ДНК події DP-073496-4. Фланкуюча геномна послідовність DP-073496-4 включена в SEQ ID NO: 2. Ампліфікація ПЛР вбудованої й прикордонних послідовностей підтверджує, що прикордонні ділянки походять із Brassica, і що ділянки сполучення можна використовувати для ідентифікації Brassica DP-073496-4. Разом, характеристика вбудованих і геномних прикордонних послідовностей разом з даними блота по Саузерну вказують на одіничну вставку фрагмента ДНК, присутній в геномі Brassica. Потім застосовують різні молекулярні способи для специфічної характеристики ділянки вставки.

10

15

- Для початкової характеристики фланкуючі прикордонні ділянки в геномі клонують і секвенують з використанням способів GenomeWalker і зворотної ПЛР. З використанням інформації про фланкуючу прикордонну послідовність проводять ПЛР на геномній ДНК DP-073496-4 і немодифікованої контрольної геномної ДНК. Фахівці в даній галузі також включають в експеримент контрольну ПЛР із використанням ендегенного гена для верифікації того, що виділена геномна ДНК підходить для ампліфікації ПЛР.

Таблица 11

Основанные на ПЦР специфичные в отношении события способы детектирования	Тип анализа ПЦР	Праймер 1		Праймер 2		Зонд			
		Название	Последовательность	Название	Последовательность	Название	Последовательность	5'метка	Гаситель
DP-073496-4	Основание на разделении в геле	10-O-3514 SEQ ID NO: 20	GGTCCGTGGGC CTTCCTAAACGT GCCG	10-O-3515 SEQ ID NO: 23	TTATCCGGTCCTAG ATCATCAGTTCATA CAAACCTCC	-	-	-	-
DP-073496-4	В реальном времени	09-O-2824 SEQ ID NO: 21	GTTCTTCTCTC ATAGCTCATTAC AGTTT	09-O-2825 SEQ ID NO: 24	CAACCTCCATAG AGTCAACATCTTA A	09-QP83 SEQ ID NO: 26	TTAGTTAGATC AGGATATTCTT G	FAM	MGB
Специфичный в отношении FatA	В реальном времени	09-O-3249 SEQ ID NO: 22	ACAGATGAAGT TCGGGACGAGT AC	09-O-3251 SEQ ID NO: 25	CAGGTTGAGATCC ACATGCTTAAATAT	09-QP87 SEQ ID NO: 27	AAGAAGAATCA TCATGCTTC	FAM	MGB

Таблица 12

Зведена таблиця SEQ ID NO

SEQ ID NO	Опис
1	Блок GAT4621
2	Послідовність вставки DP-073496-4 і її фланкуюча послідовність
3	RNR28181A
4	Праймер 09-0-3290 (SEQ ID NO: 4 AGCTATTGCTTCACCGCCTTAGC) Мішень - промотор убіквітину
5	Праймер 09-0-3288 (SEQ ID NO: 5 GCTCAGCTTGGTGGAATGAAGCCAC) Мішень - gat4621
6	Праймер 09-0-2812 (SEQ ID NO: 6 GACACAAGGCGGCTTCAAAGAGTTACAGATG) Мішень - ендегенний FatA канони
7	Праймер 09-0-2813 (SEQ ID NO: ACAATGTCATCTTGCTGGCATTCTCTTCTG) Ендегенний FatA канони
8	Права прикордонна геномна послідовність
9	Ліва прикордонна геномна послідовність
10	Повний внутрішній трансген
11	Повна фланкуюча послідовність і внутрішній трансген
12	Права фланкуюча геномна послідовність/права прикордонна послідовність трансгена (10 п.о./10 п.о.)
13	Ліва фланкуюча геномна послідовність/ліва прикордонна послідовність трансгена (10 п.о./10 п.о.)
14	Права фланкуюча геномна послідовність/права прикордонна послідовність трансгена (20 п.о./20 п.о.)
15	Ліва фланкуюча геномна послідовність/ліва прикордонна послідовність трансгена (20 п.о./20 п.о.)
16	Права фланкуюча геномна послідовність/права прикордонна послідовність трансгена (30 п.о./30 п.о.)
17	Ліва фланкуюча геномна послідовність/ліва прикордонна послідовність трансгена (30 п.о./30 п.о.)
18	Права фланкуюча геномна послідовність/повний трансген
19	Ліва фланкуюча геномна послідовність/повний трансген
20	Праймер 10-0-3514
21	Праймер 09-0-2824

Продовження таблиці 12

22	Праймер 09-0-3249
23	Праймер 10-0-3515
24	Праймер 09-0-2825
25	Праймер 09-0-3251
26	Праймер 09-QP83
27	Праймер 09-QP87

Одніну застосовують у даному документі для позначення одного або більшого числа (тобто, щонайменше одного) граматичних об'єктів, про яких мова йде. Наприклад, "елемент" означає одін або кілька елементів.

Усі публікації й патентні заявки, зазначені в специфікації, є показником рівня фахівців в галузі, до якої відноситься даний вінахід. Усі публікації й патентні заявки включені в даний документ як посилання тією самою мірою, як якби окрема публікація або патентна заявка була б специфічно й окремо зазначена як включена в якості посилання.

Хоча зазначене вище вінахід описаний у деяких подробицях у якості ілюстрації й прикладу для цілей ясності розуміння, мабуть, що деякі зміни й модифікації можуть бути застосовані на практиці в обсязі прикладеної формули вінаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНІСТЕЙ

<110> Charne, David George
 Chen , Wenpin
 Koscielny, Chadwick Bruce
 Patel , Jayantilal Devabhai
 Thoonen , Ferdinand Gerard
 Tulsieram, Lomas
 Zhang, Yongping

<120> ПОДІЯ GAT DP-073496-4 *BRASSICA* И КОМПОЗИЦІЇ И СПОСОБИ ДЛЯ ЇЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ И/АБО ДЕТЕКТУВАННЯ

<130> 035718/399080

<160> 27

<170> FastSEQ Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 147

<212> БЕЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Белок GAT4621, кодуемый піддований тасованню геном gat4621

<400> 1

Met	Ala	Ile	Glu	Val	Lys	Pro	Ile	Asn	Ala	Glu	Asp	Thr	Tyr	Asp	Leu
1				5					10					15	
Arg	His	Arg	Val	Leu	Arg	Pro	Asn	Gln	Pro	Ile	Glu	Ala	Cys	Met	Phe
			20					25					30		
Glu	Ser	Asp	Leu	Thr	Arg	Ser	Ala	Phe	His	Leu	Gly	Gly	Phe	Tyr	Gly
		35					40					45			
Gly	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Ala	Ser	Phe	His	Gln	Ala	Glu	His	Ser	Glu
	50					55				60					
Leu	Gln	Gly	Lys	Lys	Gln	Tyr	Gln	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Thr	Leu	Glu
65					70					75				80	
Gly	Tyr	Arg	Glu	Gln	Lys	Ala	Gly	Ser	Ser	Leu	Val	Lys	His	Ala	Glu
			85					90					95		
Glu	Ile	Leu	Arg	Lys	Arg	Gly	Ala	Asp	Met	Ile	Trp	Cys	Asn	Ala	Arg
			100				105						110		
Thr	Ser	Ala	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Leu	Gly	Phe	Ser	Glu	Gln	Gly
		115					120					125			
Glu	Val	Phe	Asp	Thr	Pro	Pro	Val	Gly	Pro	His	Ile	Leu	Met	Tyr	Lys
	130					135						140			
Arg	Ile	Thr													
145															

<210> 2

<211> 3104

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність вставці DP-073496-4 и її фланкуюча послідовність

<400> 2

aaaaaaaaaa aaatcatctg taaataattg taaagggttaa ttcattatat ttaaaagatt 60
 cggtttaaatg tttatatatg atcgagaata atatatgtttt ggtccaattt agagtcgaat 120
 cttaataatg ttgtggtatc aagagaatcc attgtgcttg tccaattcag atatgggtttt 180

```

ctgtttttttt atttaaatatt atttttttaa atgttgtata atttcgtttc agacgcaaac 240
aaattacact ttttcctttc aattgaatat agcattacat aaaaatcaag agaattccatt 300
tgttcctaaa cataaattaa tttttgttct gttttcagtt ttgtttcggc tgttcacttg 360
ttcgttggag ttgtctactg cttgctgagc tgggtccgtgg gccttcctaa acgtgccgta 420
agttctttctc ttcatagctc attacagttt tcattagtta gatcaggata ttcttgttta 480
agatgttgaa ctctatggag gtttgtatga actgatgatc taggaccgga taagtccct 540
tcttcatagc gaacttattc aaagaatgtt ttgtgtatca ttcttgttac attgttatta 600
atgaaaaaat attattgggtc attggactga acacgagtgt taaatatgga ccaggcccca 660
aataagatcc attgatatat gaattaaata acaagaataa atcgagtcac caaaccactt 720
gcctttttta acggaacttg ttcaccaact tgatacaaaa gtcattatcc tatgcaaatc 780
aataatcata caaaaatata caataacact aaaaaattaa aagaaatgga taatttcaca 840
atatgttata cgataaagaa gttacttttc caagaaatc actgatttta taagcccact 900
tgcattagat aaatggcaaa aaaaaacaaa aaggaaaaga aataaagcac gaagaattct 960
agaaaatacg aaatacgctt caatgcagtg ggaccacag ttcaattatt gccaattttc 1020
agctccaccg tatattttaa aaataaaacg ataatgctaa aaaaatataa atcgtaacga 1080
tcgttaaate tcaacggctg gatcttatga cgaccgttag aaattgtggt tgtcgacgag 1140
tcagtaataa acggcgctca agtggttgca gccggcacac acgagtcgtg tttatcaact 1200
caaagcacaa atactttttc tcaacctaaa aataaggcaa ttagccaaaa acaactttgc 1260
gtgtaaacaa cgctcaatac acgtgtcatt ttattattag ctattgcttc accgccttag 1320
ctttctcgtg acctagtcgt cctcgtcttt tcttctctt cttctataaa acaataccca 1380
aagagctctt cttcttcaca attcagattt caatttctca aaatcttaaa aactttctct 1440
caattctctc taccgtgatc aaggtaaatt tctgtgttcc ttattctctc aaaatcttcg 1500
attttgtttt cgttcgatcc caatttcgta tatgttcttt ggtttagatt ctgttaactc 1560
tagatcgaag acgattttct gggtttgatc gttagatata atcttaattc tcgattaggg 1620
tttcatagat atcatccgat ttgttcaa attttgagtt ttgtcgaata attactcttc 1680
gatttgatgat ttctatctag atctggtgtt agtttctagt ttgtgcgac gaatttgctg 1740
attaatctga gtttttctga ttaacagcgg ccgggatcca cagcacacca tggctattga 1800
ggttaagcct atcaacgcag aggatacctc tgaccttagg catagagtgc tcagaccaa 1860
ccagcctatc gaagcctgca tgtttgagtc tgaccttact aggagtgcac ttcaccttgg 1920
tggattctac ggaggtaaac tgatttcgtt ggcttcattc caccaagctg agcactctga 1980
acttcaaggt aagaagcagt accagcttag aggtgtggct accttggagg gttatagaga 2040
gcagaaggct ggttccagtc tctgtaaaac cgctgaagag attctcagaa agagagggtgc 2100
tgacatgatc tgggtgtaatg ccaggacatc tgcttcagga tactacagga agttgggatt 2160
cagtgcgcaa ggagagggtg tgcatactcc tccagttgga cctcacatcc tgatgtataa 2220
gaggatcaca taactagcta gtcagttaac ctagacttgt ccatcttctg gattggccaa 2280
cttaattaat gtatgaaata aaaggatgca cacatagtga catgctaate actataatgt 2340
gggcatcaaa gttgtgtgtt atgtgtaatt actagttatc tgaataaaag agaaagagat 2400
catccatatt tcttatccta aatgaatgtc acgtgtcttt ataattcttt gatgaaccag 2460
atgcatttca ttaaccaaat ccataacat ataaatatta atcatatata attaatatca 2520
attgggttag caaaacaaat ctagtctagg tgtgttttgc gaatgcgaca gtccgttaact 2580
tggactaaac aaattgacct aaaaacatga gcataactaa aactcccatg taatgggttaa 2640
actataacca acaaatctca aactatgaga tataacacaa gacatctttg agaaattcta 2700
aaccgtagaa taatctctta caaaaaatac tccaaactat ggaaaaacaa cactgagata 2760
ttctaaacta tagaataaat ctcaggaaaa gaattagccc atgtgaaagg cacaaaccgt 2820
taacattact aaaaccctcg aattctttkg cactgatcac ccgacgaaaa cccaagaaaa 2880
taaattagat aaataaaaaa aaccaaacc ctaataaaaa aacaaaacct aacttcrctg 2940
gaatcaacgt cgtcatccgg atcatcttca ccgtcttcat cgtcaacacc accgatgaac 3000
gccatcaaag ctctaaaatt ataatgogga agttttaatt tcgatcccaa agaatcgtct 3060
gctctgatac catgtaaagt ataatagaat ataatatatt attg 3104

```

<210> 3

<211> 2112

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> PNP28181A

<400> 3

```

agcttagatc aggatattct tgtttaagat gttgaactct atggagggtt gtatgaactg 60
atgatctagg accggataag ttcccttctt catagcgaa tttattcaa aatgttttgt 120
gtatcattct tgttacattg ttattaatga aaaaatatta ttgggtcatt gactgaacac 180
gagtgttaaa tatggaccag gcccacaa atagatccatt atatatgaat taaataacaa 240
gaataaatcg agtcaccaa ccacttgcc tttttaacga gacttggtca ccaacttgat 300

```



```

acaaaagtca ttatcctatg caaatcaata atcatacaaa aatatccaat aacactaaaa 360
aattaaaaga aatggataat ttcacaatat gttatacgat aaagaagtta cttttccaag 420
aaattcactg attttataag cccacttgca ttagataaat ggcaaaaaaa aacaaaaagg 480
aaaagaaata aagcacgaag aattctagaa aatacgaaat acgcttcaat gcagtgggac 540
ccacgggttca attattgcca attttcagct ccaccggtata tttaaaaaat aaaacgataa 600
tgctaaaaaa atataaatcg taacgatcgt taaatctcaa cggctggatc ttatgacgac 660
cgtagaaaat tgtggttgtc gacgagtcag taataaacgg cgtcaaagtg gttgcagccg 720
gcacacacga gtcgtgttta tcaactcaaa gcacaaatac ttttcctcaa cctaaaaata 780
aggcaattag ccaaaaacaa ctttgcgtgt aaacaacgct caatacacgt gtcattttat 840
tattagctat tgcttcaccg ccttagcttt ctcgtgacct agtcgtcttc gtcttttctt 900
cttcttcttc tataaaacaa tacccaaaga gctcttcttc ttcacaattc agatttcaat 960
ttctcaaaat cttaaaaact ttctctcaat tctctctacc gtgatcaagg taaattttctg 1020
tgttccttat tctctcaaaa tcttcgattt tgttttctgt cgatcccaat ttcgtatatg 1080
ttctttgggt tagattctgt taatcttaga tgaagacga ttttctgggt ttgatcggtt 1140
gatatcatct taattctcga ttagggtttc atagatatca tccgatttgt tcaaataatt 1200
tgagttttgt cgaataatta ctcttcgatt tgtgatttct atctagatct ggtgttagtt 1260
tctagtttgt gcgatcgaat ttgtcgatta atctgagttt ttctgattaa cagcggcgcg 1320
gatccacacg acaccatggc tattgagggt aagcctatca acgcagagga tacctatgac 1380
cttaggcata gagtgtcag accaaaccag cctatcgaag cctgcatgtt tgagtctgac 1440
cttactagga gtgcatttca ccttggtgga ttctacggag gtaaaactgat ttccgtggct 1500
tcattccacc aagctgagca ctctgaactt caaggtaaga agcagtacca gcttagaggt 1560
gtggctacct tggaagggtt tagagagcag aaggctgggt ccagtctcgt gaaacacgct 1620
gaagagattc tcagaaagag aggtgctgac atgatctggt gtaatgccag gacatctgct 1680
tcaggatact acaggaaggt gggattcagt gagcaaggag aggtgttcga tactctcca 1740
gttgacctc acatcctgat gtataagagg atcacataac tagctagtca gttaacctag 1800
acttgcccat cttctggatt ggccaactta attaattgat gaaataaaaag gatgcacaca 1860
tagtgacatg ctaatcacta taatgtgggc atcaaagttg tgtgttatgt gtaattacta 1920
gttatctgaa taaaagagaa agagatcatc catatttctt atcctaaatg aatgtcacgt 1980
gtctttataa ttctttgatg aaccagatgc atttcattaa ccaaattccat atacatataa 2040
atattaatca tatataatta atatcaattg ggtagcaaa acaaattctag tctaggtgtg 2100
ttttgcgaat gc 2112

```

<210> 4
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер промотора убіквітину

<400> 4
 agctattgct tcaccgcctt agc 23

<210> 5
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер gat4621

<400> 5
 gctcagcttg gtggaatgaa gccac 25

<210> 6
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер ендогенного FatA канони

<400> 6
 gacacaaggc ggcttcaaag agttacagat g 31

<210> 7
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер ендогенного FatA каноли

<400> 7
 acaatgtcat cttgctggca ttctcttctg

30

<210> 8
 <211> 2065
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Права промезова геномна послідовність

<400> 8
 gacagtcctg aacttggact aaacaaattg acctaaaaac atgagcataa ctaaaactcc 60
 catgtaattg ttaaaactata acaacaaat ctcaaaactat gagatataac acaagacatc 120
 tttgagaaat tctaaaccgt agaataatct cttacaaaaa atactccaaa ctatggaaaa 180
 acaacactga gatattctaa actatagaat aaatctcagg aaaagaatta gcccatgtga 240
 aaggcacaaa ccgttaacat tactaaaaac ctogaattct tttgactga tccccgacg 300
 aaaacccaag aaaataaatt agataaataa aaaaaacca aaccctaata aaaaaacaaa 360
 acctaacttc acgtgaatca acgtcgcat ccggatcatc ttcaccgtct tcacgtcaa 420
 caccaccgat gaacgccatc aaagctctaa aattataatg cggaagtttt aatttcgatc 480
 ccaaagaatc gtctgctctg ataccatgta agtataata gaataataa tattattgtg 540
 ttgtatttga taagagaata caatatgcat atatatagt gtaacattaa cataatgtta 600
 aactagata atgctaactt tctaaacac ttaatgtaa tatgctaaga atatcttgtg 660
 attaacttgc tcttcaagtc tttcctttta gtcttgaggg tcttcatggg tttcacgggc 720
 ttcacaatct aggtctgtaa gatacatatc ttccagtcca acatatttct aatatgctga 780
 ttctgaaac acccgatga gtaattttta gatgatacat tgaaaattct aagtaaggat 840
 ogaacattga gcaattttta aaattaagtc aaaaactctta cagtgtttt atagtcata 900
 actgttttacg aacagttttg gtgtttttta attagttttg ccgaagtttg tttctgcttt 960
 gagtgtgac tcaacaccgt tttggtgttc tttgctatta ttaactctaa gatttaagat 1020
 tgtttatgtt tttttgttga tacctctttt atcttaaaat attttttggg gtgtattcca 1080
 ttgaaagttt aaagtaattt gtataaaaat acaaaattct ttcaaactg aatttttaaa 1140
 ttttatttaa aattatatta tcgaatttta aagtactatt aaatttaatg ttactaaaaa 1200
 tatttttaagt tgtgagtttt ataagttttt tagtgctacg tggagttttt tagttaaaaa 1260
 taaaaatctt ttatgatttt aggtgagact ctaagtggta taacaaaatt catattaaat 1320
 tctttagttc atctaaaact cattaagttt tatcccttat ataaaagaat gagatatatg 1380
 taatatataa aatgattagt ctttttgcaa aaaaagagta aatagtattt caagaaacga 1440
 aaattaatgt tttatggagt cggatgaaca aaatgtaaca ttataaaact tggttccatg 1500
 tcaaaaaaaa tgtaaaaacg tataaaaatt caattgatac tttagccatt cagcttagtg 1560
 actactagct agcatgccaa aaagtggcaa tacaacttg aagtattgat taagagatcg 1620
 agcggggact ggaacagaag gaaagactgg agacaaattg aacaaacgac aaataaaacg 1680
 agcaagaat taattcatca tgcgcctga acaaatggca attcctctca agaagcagag 1740
 aaagccact aaatctgtgt tgggacactt gtctgaaacc aaaatctggg ctccgacata 1800
 aaaacaatgc attactaaac ttgtcctcta agccggctag atgaaaggaa caacatcac 1860
 actctgaaac cttactacat cctcccgaag gaaagtgaac cgtgaagcac aacaaacgaa 1920
 taaattcctc tacatgtaat tgctaaacgt gcaaatcaaa ttcaggacaa taagcaacac 1980
 caaatataaa aatcagggga gatgagatag caagaattga ggtcgaagag agttgaattt 2040
 acagggagca gagctcacac ctcca 2065

<210> 9
 <211> 2003
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Ліва промезова геномна послідовність

<400> 9

```

ctttcctgtg actctgtcac gttcatagat ttgaagacca ctcaacacaa tgataataag 60
aggaaaaata tctacagaag tttatatcaa caattacaat tattatagag aaaaagataa 120
aaatagcact aaatcaagtt tttgttccca aactagcatt caaagtcaaa aatcacaaaa 180
ataacactaa atgtttttatc aaaaatcaca aacttagggg ttagagttaa aggggtgggg 240
ttaggattta ggggttaggg ttttaggggt agagtttagg gtttaggggt tagatttttag 300
ggtttagggg ttaggggtta ggggttagag ttttaggggt aggggtttatg gtttaggggt 360
taggggttag agttgagaaa tgagggtttg gggataagat ttcaaatttt gaaaaataaa 420
aaaattaaaa ttttcaaagg ataaacttag aaagggtgcta ttttggtcac tttagttttt 480
gagtgtctatt tttgtgatat aaacttagaa atgtgtctatt ttggagattt gtcatttatt 540
atattcaaaa gaacaaaaca ttatacaaaa cagataaata gacgacgatg atgatgtgga 600
aattcagacg gccaatactc actctgtctt tccagccata cactttaaga taagatgggc 660
cctacagtca tccaacctaa gccataatc tcacgattct tatctaactc catctttcct 720
cacggttaga tcatattaca ctatcgatcc ccatgtcata tggtagaccg cgatacactt 780
gataacgaag tatccactct tgaaatacgc gaaaaccaca tactcgcgtt ccttccctct 840
cactgtcaca actcatcggt ccaaaaaacc cactgtatca acctcgacga tggagtccag 900
cgtgtgtgta cgcgccacag tcaccggagt accgcaattg agacgaccga tcggtgcgat 960
ccaccgtcag gtcagcactg cgtcgtcgtt ctggcgtttt aggttttcag ctccgatcgg 1020
atcagtcgga gagggaggga acctgatctc cggtcgtcag ctccgtccga ttctcctcct 1080
cgatagctcg cgggagaaga gagagattct caagccgggt agagccgcgc ctggagattc 1140
agctgggtta gcaatgaggt ccgtttctgg ctcaattggg gttgactcgt ttgactcgag 1200
tgatctgact cgtttatttg cagggaggcg aagggtggat tctcgggaa gtatccgtgg 1260
ctcgtcacgc gattcttctt ctcatgtgg tacgtgtgtc cctcacgcgc ttttgcggct 1320
ttaccgcaa agtttgatag cgtggattta cggttttgac cccttgttga tttttattac 1380
aggtaactct tgaatgtgat tttcaacatc cttaataaga agatctataa ttacttcccc 1440
tatccctagt aagtaaaata catttaaatt gtttttgaca tatgaaaaaa tttacattta 1500
catacattga tatctagtct ttttgtatct ctatttgatc atctgtaaaa aaaaaaaat 1560
catctgtaaa taattgtaaa ggttaattca ttatatttaa aagattcggg ttaatgttta 1620
tatatgatcg agaataatat agttttggtc caatttagag tcgaatctta ataattgtgt 1680
ggtatcaaga gaatccattg tgctgggtcca attcagatat gggtttctgt ttttttattt 1740
aatattattt tttaaaatgt tgtataattt cgtttcagac gcaaacaaat tacacttttt 1800
cctttcaatt gaatatagca ttacataaaa atcaagagaa tccatttggt ctaaacata 1860
aattaatttt tgttctgttt tcagttttgt ttcggctgtt cacttgctcg ttggagttgt 1920
ctactgcttg ctgagctggg ccgtgggcct tcctaaacgt gccgtaagtt cttctcttca 1980
tagctcatta cagttttcat tag 2003

```

<210> 10

<211> 2109

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Повний внутрішній транскрип

<400> 10

```

ttagatcagg atattcttgt ttaagatgtt gaactctatg gaggtttgta tgaactgatg 60
atctaggacc ggataagttc ccttcttcat agcgaactta ttcaaagaat gttttgtgta 120
tcattcttgt tacattgtta ttaatgaaaa aatattattg gtcattggac tgaacacgag 180
tgtaaatat ggaccaggcc ccaaataaga tccattgata tatgaattaa ataacaagaa 240
taaatcgagt caccaaacca cttgcctttt ttaacgagac ttgttcacca acttgataca 300
aaagtcatla tccatgcaa atcaataatc atacaaaaat atccaataac actaaaaaat 360
taaaagaaat ggataatttc acaatatgtt atacgataaa gaagtacttt ttccaagaaa 420
ttcactgatt ttataagccc acttgcatta gataaatggc aaaaaaaaac aaaaaggaaa 480
agaaataaag cacgaagaat tctagaaaat acgaaatacg cttcaatgca gtgggaccca 540
cggttcaatt attgccaatt ttcagctcca ccgtatatatt aaaaaataaa acgataatgc 600
taaaaaata taaatcgtaa cgatcgtaa atctcaacgg ctggatctta tgacgaccgt 660
tagaaattgt ggttgtcgac gagtcagtaa taaacggcgt caaagtgggt gcagccggca 720
cacacgagtc gtgtttatca actcaaagca caaatacttt tctcaacct aaaaataagg 780
caattagcca aaacaactt tgcgtgtaaa caacgctcaa tacacgtgtc attttattat 840
tagctattgc ttcaccgcct tagctttctc gtgacctagt cgtcctcgtc ttttcttctt 900
cttcttctat aaaacaatac ccaaagagct cttcttcttc acaattcaga tttcaatttc 960
tcaaaatctt aaaaactttc tctcaattct ctctaccgtg atcaaggtaa atttctgtgt 1020
tccttattct ctcaaaatct togatattgt tttcgttcga tcccaatttc gtatatgttc 1080

```



```

tttgggttag attctgttaa tcttagatcg aagacgattt tctgggtttg atcgtttagat 1140
atcatcttaa ttctcgatta gggtttcata gatatcatcc gatttgttca aataatttga 1200
gttttgtcga ataattactc ttcgatttgt gatttctatc tagatctggg gtttagtttct 1260
agtttgtgcg atcgaatttg tcgattaatc tgagtttttc tgattaacag cggccgggat 1320
ccacacgaca ccatggctat tgaggttaag cctatcaacg cagaggatac ctatgacctt 1380
aggcatagag tgctcagacc aaaccagcct atcgaagcct gcatgtttga gtctgacctt 1440
actaggagtg catttcacct tgggtggattc tacggaggta aactgatttc cgtggcttca 1500
ttccaccaag ctgagcactc tgaacttcaa ggtaagaagc agtaccagct tagaggtgtg 1560
gctaccttgg aaggttatag agagcagaag gctgggtcca gtctcgtgaa acacgctgaa 1620
gagattctca gaaagagagg tgctgacatg atctgggtga atgccaggac atctgcttca 1680
ggatactaca ggaagttggg attcagtgag caaggagagg tgttcgatac tcttccagtt 1740
ggacctcaca tctgatgta taagaggatc acataactag ctagttagtt aacctagact 1800
tgtccatctt ctggattggc caacttaatt aatgtatgaa ataaaaggat gcacacatag 1860
tgacatgcta atcactataa tgtgggcatc aaagtttgtg gttatgtgta attactagtt 1920
atctgaataa aagagaaaga gatcatccat atttcttctc ctaaatgaat gtcacgtgtc 1980
tttataatc tttgatgaac cagatgcatt tcattaacca aatccatata catataaata 2040
ttaatcatat ataattaata tcaattgggt tagcaaaaaca aatctagtct aggtgtgttt 2100
tgcaatgc 2109

```

<210> 11

<211> 6177

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Повна фланкуюча послідовність и внутрішній транскрипційний

<400> 11

```

ctttctgtg actctgtcac gttcatagat ttgaagacca ctcaacacaa tgataaataag 60
aggaataata tctacagaag tttatatcaa caattacaat tattatagag aaaaagataa 120
aaatagcact aaatcaagtt tttgttccca aactagcatt caaagtcaaa aatcacaaaa 180
ataacactaa atgttttctc aaaaatcaca aacttagggg ttagagttaa aggggtgggg 240
ttaggattta gggtttaggg ttttagggtt agagtttagg gtttaggggt tagatttttag 300
ggtttagggg ttagggttta gggtttagag ttttagggtt aggggttatg gtttaggggt 360
tagggtttag agttgagaaa tgaggttttg gggataagat ttcaaatttt gaaaaataaa 420
aaaattaaaa ttttcaaagg ataaacttag aaaggtgcta ttttggctat ttttagtttt 480
gagtgtctat ttgttgatat aaacttagaa atgtgtctat ttggagattt gtcattttat 540
atattcaaaa gaacaaaaca ttatacaaaa cagataaata gacgacgatg atgatgtgga 600
aattcagacg gccataactc actctgtctt tccagccata cactttaaga taagatgggc 660
cctacagtca tccaacctaa gccataatc tcaagattct tatctaact catcttttct 720
cacggttaga tcatattaca ctatcgatcc ccatgtcata tggtagaccg cgatacactt 780
gataacgaag tatccactct tgaaatacgc gaaaaccaca tactccgctt ccttccctct 840
cactgtcaca actcatcggt ccaaaaaacc cactgtatca acctcgacga tggagtcacg 900
cgtgtgtcta cgcgccacag tcaaccgagt accgcaattg agacgaccga tgggtgcgat 960
ccaccgtcag gtcagcactg cgtcgtcgtt ctccgctttt aggttttcag ctccgacggg 1020
atcagtcgga gagggaggga acctgatctc cgtcgtcag ctccgaccga ttctctctct 1080
cgatagctcg ccggagaaga gagagattct caagccgggt agagccgccc cgtggagattc 1140
agctgggtta gcaatgaggt ccgtttctgg ctacactggg gttgactcgt ttgactcgag 1200
tgatctgact cgtttatttg cagggaggcg aaggttggat tctcgggaa gtatccgtgg 1260
ctcgtcaccg gattcttctt ctctatgttg tacgtgtgtc cctcacgcgc ttttgcgggt 1320
ttaccgcaa agtttgatag cgtggattta cggttttgac ccctgtgtga tttttattac 1380
agggtactct tgaatgtgat tttcaacatc cttaataaga agatctataa ttacttcccc 1440
tatccctagt aagtaaaata catttaaat gtttttgaca tatgaaaaaa tttacattta 1500
catacattga tatctagtct ttttgtatct ctatttgatc atctgtaaaa aaaaaaaat 1560
catctgtaaa taattgtaaa ggttaattca ttatatttaa aagattcggg ttaattgttt 1620
tatatgatcg agaataatat agttttggtc caatttagag tcgaatctta ataattgtt 1680
ggatcaaga gaatccattg tgctgggtcca attcagatat gggtttctgt tttttattt 1740
aatattattt tttaaaatgt tgtataattt cgtttcagac gcaaacaaat tacactttt 1800
cctttcaatt gaatatagca ttacataaaa atcaagagaa tccatttgtt cctaaacata 1860
aatataattt tgttctgttt tcagttttgt ttcggctgtt cactgttctg ttggagttgt 1920
ctactgcttg ctgagctggg ccgtgggcct tctaaacgt gccgtaagtt cttctcttca 1980
tagctcatta cagttttcat tagtttagtc aggatattct tgtttaagat gttgaactct 2040
atggagggtt gtatgaactg atgatctagg accggataag ttcccttctt catagegaac 2100
ttattcaaa aatgttttgt gtatcattct tgttacattg ttattaatga aaaaatatta 2160

```


ttgggtcattg	gactgaacac	gagtgttaaa	tatggaccag	gccccaaata	agatccattg	2220
atatatgaat	taataaacia	gaataaatcg	agtcaccaaa	ccacttgcc	tttttaacga	2280
gacttggttca	ccaacttgat	acaaaagtc	ttatcctatg	caaatcaata	atcatatacaa	2340
aatatccaat	aacactaaaa	aattaaaaaga	aatggataat	ttcacatata	gttatatcgat	2400
aaagaagtta	cttttccaag	aaattcactg	attttataag	cccacttgca	ttagataaat	2460
ggcaaaaaaa	aacaaaaagg	aaaagaaata	aagcacgaag	aattctagaa	aatacgaaat	2520
acgcttcaat	gcagtgggac	ccacgggttca	attattgcca	attttcagct	ccaccgtata	2580
tttaaaaaat	aaaacgataa	tgctaaaaaa	atataaatcg	taacgatcgt	taaaatctcaa	2640
cggctggatc	ttatgacgac	cgttagaaat	tgtggttgte	gacgagtcag	taataaacgg	2700
cgtcaaagg	gttgacgccc	gcacacacga	gtcgtgttta	tcaactcaaa	gcacaaatac	2760
ttttcctcaa	cctaaaaata	aggcaattag	ccaaaaacaa	ctttgctgtg	aaacaacgct	2820
caatacacgt	gtcattttat	tattagctat	tgcttcaccg	ccttagcttt	ctcgtgacct	2880
agtcgtcttc	gtcttttctt	cttcttcttc	tataaaacaa	tacccaaaga	gctcttcttc	2940
ttcacaattc	agatttcaat	ttctcaaaat	cttaaaaact	ttctctcaat	ttctctctacc	3000
gtgatcaagg	taaatctctg	tgctccttat	ttctcctaaa	ttctcgattt	tgttttctgt	3060
cgatcccaat	ttcgtatatg	ttctttgggt	tagattctgt	taattctaga	tcgaagacga	3120
ttttctgggt	ttgatcggtt	gatatactct	ttaattctga	ttagggtttc	atagatatca	3180
tcgattttgt	tcaataaatt	tgagttttgt	cgaataatta	ctcttcgatt	tggtatttct	3240
atctagatct	ggtgttagtt	tctagtttgt	gcgatcgaat	ttgtcgatta	atctgagttt	3300
ttctgattaa	cagcggccgg	gatccacacg	acaccatggc	tattgagggt	aagcctatca	3360
acgcagagga	tacctatgac	cttaggcata	gagtgtctcag	accaaaccag	cctatcgagg	3420
cctgcatggt	tgagtctgac	cttactagga	gtgcatttca	ccttggtgga	ttctacggag	3480
gtaaactgat	ttcctgtggc	tcattccacc	aagctgagca	ctctgaactt	caaggtaaga	3540
agcagtacca	gcttagaggt	gtggtacct	tggagggtta	tagagagcag	aaggctggtt	3600
ccagtcctct	gaaacacgct	gaagagattc	tcagaaagag	aggtgtctgac	atgatctggt	3660
gtaatgccag	gacatctgct	tcaggatact	acaggaagtt	gggattcagt	gagcaaggag	3720
aggtgttcga	tactcctcca	gttggaacct	acatcctgat	gtataagagg	atcacataac	3780
tagctagtca	gttaacctag	acttgtccat	cttctggatt	ggccaactta	attaatgtat	3840
gaaataaaaag	gatgcacaca	tagtgacatg	ctaataccta	taatgtgggc	atcaaagttg	3900
tgtgttatgt	gtaattacta	gttatctgaa	taaaagagaa	agagatcctc	catatttctt	3960
atcctaaatg	aatgtcacgt	gtctttataa	ttctttgatg	aaccagatgc	atttcattaa	4020
ccaaatccat	atacatataa	atattaatca	tatataatta	atatcaattg	ggttagcaaa	4080
acaaatctag	tctaggtgtg	ttttgcgaat	gcgacagtcc	gtaacttgga	ctaaacaaat	4140
tgacctaaaa	acatgagcat	aactaaaact	cccatgtaat	ggttaaacta	taaccaacaa	4200
atctcaaaact	atgagatata	acacaagaca	ttcttgagaa	attctaaacc	gtagaataat	4260
ctcttacaaa	aaatactcca	aactatggaa	aaacaacact	gagatattct	aaactataga	4320
ataaatctca	ggaaaagaat	tagcccatgt	gaaaggcaca	aaccggtaac	attactaaaa	4380
ccctcgaatt	cttttgcact	gatcacccga	cgaaaaccca	agaaaataaa	ttagataaat	4440
aaaaaaaacc	ataaccctaa	taaaaaaaca	aaacctaa	tcagtgaat	caacgtcgtc	4500
atccggatca	ttttcaccgt	cttcacgtc	aacaccaccg	atgaacgcca	tcaaagctct	4560
aaaattataa	tgccgaagtt	ttaatttcga	tcccaaagaa	tcgtctgctc	tgataccatg	4620
taaagtataa	tagaatataa	tattattattg	tgttgatttt	gataagagaa	tacaatatgc	4680
atataatatag	tggttaacatt	aacataatgt	taacactaga	taatgttaac	tttcttaaac	4740
acttaattgta	aatatgctaa	gaatatcttg	tgattaaact	gctcttcaag	tttttctctt	4800
tagtcttgag	ggtcttcatg	ggtttcacgg	gcttcacaa	ctaggtctgt	aagatacata	4860
tttccagtc	caacatattt	ctaataatgt	gattcctgaa	acaccggat	gagtaatttt	4920
tagatgatac	attgaaaatt	ctaagtaagg	atcgaaact	gagcaatttt	aaaaaattag	4980
tcaaaactct	tacagtagtt	ttatagtc	atactgttta	cgaacagttt	tggtgttttt	5040
taattagttt	tgccgaagtt	tgttctctgt	ttgagtgctg	actcaacacc	gttttggtgt	5100
tttttgctat	tattactct	aagattttaag	attgtttatg	tttttttggt	gatacctctt	5160
ttatcttaaa	atattttttg	gtgtgtatct	cattgaaagt	ttaaagtaat	ttgtataaaa	5220
ataacaaatt	ctttcaaaaca	tgaattttta	aattttattt	aaaattatat	tatcgaattt	5280
taaagtacta	ttaaatttta	tgttactaaa	aattttttta	gttgtaggtt	ttataagttt	5340
tttagtgcta	cgtggagttt	tttagttaaa	attaaaaatc	tttatgatt	ttaggtgaga	5400
ctctaagtg	tataacaaaa	ttcatattaa	attctttagt	tcattctaaa	ctcatttaagt	5460
tttatccctt	atataaaaaga	atgagatata	tgtaatatat	aaaatgatta	gtctttttgc	5520
aaaaaaagag	taaatagtat	ttcaagaac	gaaaattaat	gttttatgga	gtgcgatgaa	5580
caaatgttaa	catttataaa	cttggttcca	tgtcaaaaaa	aatgtaaaaa	cgtataaaaa	5640
ttcaattgat	actttagcca	ttcagcttag	tgactactag	ctagcatgcc	aaaaagtggc	5700
aatacaaaact	tgaagtattg	attaagagat	cgagcgggga	ctggaacaga	aggaaagact	5760
ggagacaaat	tgaacaaacg	acaaataaaa	cgagcaagaa	attaattcat	catgtcgcct	5820
gaacaaatgg	caattcctct	caagaagcag	agaaagccca	ctaaatctgt	gttgggacac	5880
ttgtctgaaa	ccaaaatctg	gtcttcgaca	taaaaacaat	gcattactaa	actgtctctc	5940
taagccggct	agatgaaagg	aacaacatca	ccactctgaa	accttactac	atctctccga	6000

aggaaagtga accgtgaagc acaacaaacg aataaattcc tctacatgta attgctaaac 6060
gtgcaaata aattcaggac aataagcaac accaaatata aaaatcaggg gagatgagat 6120
agcaagaatt gaggtcgaag agagttgaat ttacagggag cagagctcac acctcca 6177

<210> 12
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Права фланкуюча геномна послідовність/права промезова послідовність
транспена(10 п.н./10 п.н.)

<400> 12
ttgcgaatgc gacagtcsgt 20

<210> 13
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ліва фланкуюча геномна послідовність/ліва промезова послідовність
транспена(10 п.н./10 п.н.)

<400> 13
ttttcattag ttagatcagg 20

<210> 14
<211> 40
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Права фланкуюча геномна послідовність/права промезова послідовність
транспена(20 п.н./20 п.н.)

<400> 14
taggtgtgtt ttgcgaatgc gacagtcsgt aacttgact 40

<210> 15
<211> 40
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ліва фланкуюча геномна послідовність/ліва промезова послідовність
транспена(20 п.н./20 п.н.)

<400> 15
ctcattacag ttttcattag ttagatcagg atattcttgt 40

<210> 16
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ліва фланкуюча геномна послідовність/ліва промезова послідовність
транспена(30 п.н./30 п.н.)

<400> 16

aaatctagtc taggtgtgtt ttgcgaatgc gacagtcctgt aacttggact aaacaaattg 60

<210> 17

<211> 60

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ліва фланкуюча геномна послідовність/ліва промезова послідовність
транспена(30 п.н./30 п.н.)

<400> 17

ctcttcacag ctcattacag ttttcattag ttagatcagg atattcttgt ttaagatggt 60

<210> 18

<211> 4174

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Повний трансген/права фланкуюча геномна послідовність

<400> 18

ttagatcagg	atattcttgt	ttaagatggt	gaactctatg	gagggttgtg	tgaactgatg	60
atctaggacc	ggataagttc	ccttcttcat	agcgaactta	ttcaaagaat	gttttgtgta	120
tcattcttgt	tacattgtta	ttaatgaaaa	aatattattg	gtcattggac	tgaacacgag	180
tggttaaata	ggaccaggcc	ccaaataaga	tccattgata	tatgaattaa	ataacaagaa	240
taaatcgagt	caccaaacca	cttgcctttt	ttaacgagac	ttgttcacca	acttgataca	300
aaagtcatta	tcctatgcaa	atcaataatc	atacaaaaat	atccaataac	actaaaaaat	360
taaaagaaat	ggataatttc	acaatatggt	atacgataaa	gaagttactt	ttccaagaaa	420
ttcactgatt	ttataagccc	acttgcatta	gataaatggc	aaaaaaaaac	aaaaaggaaa	480
agaaataaag	cacgaagaat	tctagaaaat	acgaaatacg	cttcaatgca	gtgggaccca	540
cggttcaatt	attgccaat	ttcagctcca	ccgtatat	aaaaaataaa	acgataatgc	600
taaaaaata	taaatcgtaa	cgatcgtaa	atctcaacgg	ctggatctta	tgacgaccgt	660
tagaaattgt	ggttgtcgac	gagtcagtaa	taaacggcgt	caaagtgggt	gcagccggca	720
cacacgagtc	gtgtttatca	actcaaagca	caaatacttt	tcctcaacct	aaaaataagg	780
caattagcca	aaaacaactt	tgctgtgtaa	caacgctcaa	tacacgtgtc	attttattat	840
tagctattgc	ttcacgcct	tagctttctc	gtgacctagt	cgctctcgtc	ttttcttctt	900
cttcttctat	aaaacaatac	ccaaagaget	cttcttcttc	acaattcaga	tttcaatttc	960
tcaaaatctt	aaaaactttc	tctcaattct	ctctaccgtg	atcaaggtaa	atttctgtgt	1020
tccttattct	ctcaaaatct	tcgattttgt	tttcgttcga	tcceaatttc	gtatatgttc	1080
tttggtttag	attctgttaa	tcttagatcg	aagacgat	tctgggtttg	atcggttagat	1140
atcatcttaa	ttctcgatta	gggtttcata	gatcatctcc	gatttgttca	aataatttga	1200
gttttgtcga	ataattactc	ttcgatttgt	gatttctatc	tagatctggg	gttagtttct	1260
agtttgtgcg	atcgaaattg	tcgattaatc	tgagtttttc	tgattaacag	cggccgggat	1320
ccacacgaca	ccatggctat	tgaggttaag	cctatcaacg	cagaggatac	ctatgacctt	1380
aggcatagag	tgctcagacc	aaaccagcct	atcgaaacgt	gcatgtttga	gtctgacctt	1440
actaggagtg	catttcacct	tggtggatcc	tacggaggta	aactgatttc	cgtggcttca	1500
ttccaccaag	ctgagcactc	tgaacttcaa	ggtaagaagc	agtaccagct	tagagggtgtg	1560
gctaccttgg	aagggttatag	agagcagaag	gctgggtcca	gtctcgtaga	acacgctgaa	1620
gagattctca	gaaagagagg	tgctgacatg	atctgggtga	atgccaggac	atctgcttca	1680
ggatactaca	ggaagttggg	attcagtgag	caaggagagg	tggttcgatac	tcctccagtt	1740
ggacctcaca	tcctgatgta	taagaggatc	acataactag	ctagtcagtt	aacctagact	1800
tgtccatctt	ctggattggc	caacttaatt	aatgtatgaa	ataaaaaggat	gcacacatag	1860
tgacatgcta	atcactataa	tggtggcatc	aaagttgtgt	gttatgtgta	attactagtt	1920
atctgaataa	aagagaaaga	gatcatccat	atttcttctc	ctaaatgaat	gtcacgtgtc	1980
tttataattc	tttgatgaac	cagatgcatt	tcattaacca	aatecatata	catataaata	2040
ttaattcatat	ataattaata	tcaattgggt	tagcaaaaca	aatctagtct	aggtgtgttt	2100
tgcaaatgcg	acagtcgcta	acttgacta	aacaaattga	cctaaaaaca	tgagcataac	2160
taaaactccc	atgtaatggg	taaaactata	ccaacaaatc	tcaaaactatg	agatataaca	2220
caagacatct	ttgagaaatt	ctaaaccgta	gaataatctc	ttacaaaaaa	tactccaaac	2280
tatggaaaaa	caacactgag	atattctaaa	ctatagaata	aatctcagga	aaagaattag	2340

```

cccatgtgaa aggacacaaac cggttaacatt actaaaaccc tcgaattctt ttgcactgat 2400
caccgcgacga aaacccaaga aaataaaatta gataaataaaa aaaaaccaa accctaataa 2460
aaaaacaaaa cctaacttca cgtgaatcaa cgtcgtcatc cggatcatct tcaccgtctt 2520
catcgtcaac accacogatg aacgccatca aagctctaaa attataatgc ggaagtttta 2580
atttcgatcc caaagaatcg tctgctctga taccatgtaa agtataatag aatataatat 2640
attatttgtgt tgtatttgat aagagaatac aatatgcata tatatagtggt taacattaac 2700
ataatgttaa cactagataa tgctaacttt cctaaacact taatgtaaat atgctaagaa 2760
tatcttgtga ttaacttgct cttcaagtct ttccttttag tcttgagggt cttcatgggt 2820
ttcacgggct tcacaatcta ggtctgtaag atacatatct tccagtccaa catatttcta 2880
atatgctgat tcctgaaaca cccggatgag taatttttag atgatacatt gaaaattcta 2940
agtaaggatc gaacattgag caattttaaa aattaagtca aaactcttac agtagtttta 3000
tagtcatata ctgtttacga acagttttgg tgttttttaa ttagttttgc cgaagtttgt 3060
ttctgctttg agtgctgact caacaccgtt ttgggtgtct ttgctattat taactctaag 3120
atttaagatt gtttatgttt ttttggtgat acctctttta tcttaaaata ttttttggtg 3180
tgtattccat tgaaagttta aagtaatttg tataaaaaata acaaattctt tcaaacatga 3240
attttaaaaat tttattttaa attatattat cgaattttta agtactatta aatttaatgt 3300
tactaaaaat attttaagtt gtgagtttta taagtttttt agtgctacgt ggagtttttt 3360
agttaaaatt aaaaatcttt tatgatttta ggtgagactc taagtgggtat aacaaaattc 3420
atattaaatt ctttagttca tctaaaactc attaaagtttt atcccttata taaaagaatg 3480
agatatatgt aatatataaa atgattagtc tttttgcaaa aaaagagtaa atagtatttc 3540
aagaaacgaa aattaatggt ttatggagtgt cgatgaacaa aatgtaacat ttataaactt 3600
ggttccatgt caaaaaaaat gtaaaaacgt ataaaaattc aattgatact ttagccattc 3660
agcttagtga ctactagcta gcatgccaaa aagtggcaat acaaacttga agtattgatt 3720
aagagatcga gcggggactg gaacagaagg aaagactgga gacaaattga acaaacgaca 3780
aataaaacga gcaagaaatt aattcatcat gtgcctgaa caaatggcaa ttcctctcaa 3840
gaagcagaga aagccacta aatctgtgtt gggacacttg tctgaaacca aaatctggtc 3900
ttcgacataa aaacaatgca ttactaaact tgtcctctaa gccggctaga tgaaaggaac 3960
aacatcacca ctctgaaacc ttactacatc ctcccgaagg aaagtgaacc gtgaagcaca 4020
acaaacgaaat aaattcctct acatgttaatt gctaaacgtg caaatcaaat tcaggacaat 4080
aagcaacacc aaatataaaa atcaggggag atgagatagc aagaattgag gtcgaagaga 4140
gttgaattta cagggagcag agctcacacc tcca 4174

```

<210> 19

<211> 4112

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ліва фланкуюча геномна послідовність/повний трансген

<400> 19

```

ctttcctgtg actctgtcac gtccatagat ttgaagacca ctcaacacaa tgataataag 60
aggaaaaata tctacagaag tttatatcaa caattacaat tattatagag aaaaagataa 120
aaatagcact aaatcaagtt tttgttccca aactagcatt caaagtcaaa aatcacaaaa 180
ataacactaa atgttttatc aaaaatcaca aacttaggggt ttagagttaa aggggtgggg 240
ttaggattta ggggttaggg tttaggggtt agagtttagg gtttaggggt tagatttttag 300
ggtttaggggt ttaggggtta ggggttaggg tttaggggtt aggggttatg gtttaggggt 360
taggggttag agttgagaaa tgagggtttg ggggataagat ttcaaatttt gaaaaataaa 420
aaaattaaaa ttttcaaagg ataaacttag aaagggtgcta ttttggtcat ttttagtttt 480
gagtgtattt tttgtgatat aaacttagaa atgtgtattt ttggagattt gtcattttatt 540
atattcaaaa gaacaaaaca ttatacaaaa cagataaata gacgacgatg atgatgtgga 600
aattcagacg gccaaactc actctgtctt tccagccata cactttaaga taagatgggc 660
cctacagtc accaacctaa gccaaataat tcaogattct tatctaact catctttcct 720
caccgttaga tcatattaca ctatcgatcc ccatgtcata tggtaacacg cgatacactt 780
gataacgaag tatccactct tgaaatacgc gaaaccaca tactccgctt ccttccctct 840
cactgtcaca actcatcggt ccaaaaaacc cactgtatca acctcgacga tggagtcacg 900
cgtgctgcta cgcgccacag tcaccggagt accgcaattg agacgaccga tcgggtcgat 960
ccaccgtcag gtcagcactg cgtcgtcgtt ctccgctttt aggttttcag ctccgatcgg 1020
atcagtcgga gagggaggga acctgatctc cggtcgtcag ctccgtccga ttctcctcct 1080
cgatagctcg ccggagaaga gagagattct caagccgggt agagccgccg ctggagattc 1140
agctgggtta gcaatgaggt ccgtttctgg ctacttgggt gttgactcgt ttgactcgag 1200
tgatctgact cgtttatttg cagggaggcg aagggtggat tctcgggaa gtatccgtgg 1260
ctcgtcaccg gattcttctt cttcatgtgg tacgtgtgtc cctcacgcgc ttttgcggt 1320
ttaccgcaa agtttgatag cgtggattta cggttttgac cccttgttga tttttattac 1380

```

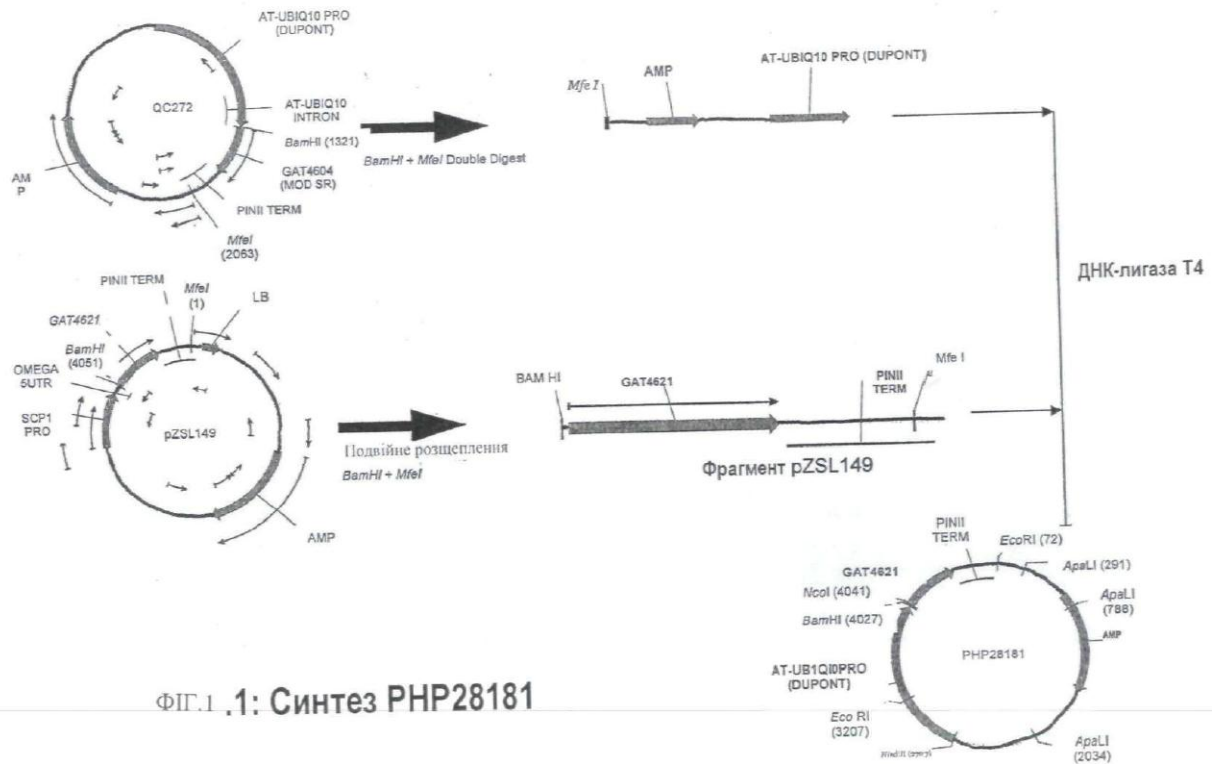

<220>
 <223> Праймер 09-QP87
 <400> 27
 aagaagaatc atcatgcttc

20

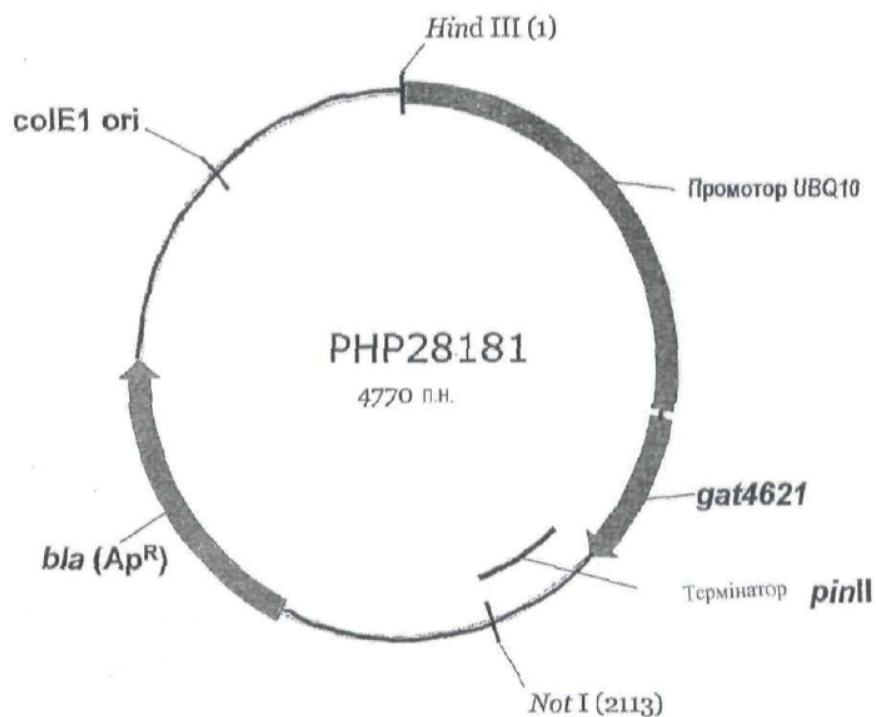
5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рослина *Brassica*, стійка до гліфосату, що має у своєму геномі у наступному порядку: полінуклеотид, що містить SEQ ID NO: 12, полінуклеотид, що кодує гліфосат-N-ацетилтрансферазу, і полінуклеотид, що містить SEQ ID NO: 13.
- 10 2. Рослина за п. 1, геном якої містить SEQ ID NO: 10.
3. Рослина за п. 2, геном якої містить SEQ ID NO: 2.
4. Трансгенне насіння, що має у своєму геномі у наступному порядку: полінуклеотид, що містить SEQ ID NO: 12, полінуклеотид, що кодує гліфосат-N-ацетилтрансферазу, і полінуклеотид, що містить SEQ ID NO: 13.
- 15 5. Насіння за п. 4, геном якого містить SEQ ID NO: 10.
6. Насіння за п. 5, геном якого містить SEQ ID NO: 2.
7. Рослинний матеріал, одержаний із рослини *Brassica* за будь-яким із пп. 1-3 або одержаний із насіння за будь-яким із пп. 4-6.
8. Виділений полінуклеотид, що містить SEQ ID NO: 12 та 13.
- 20 9. Виділений полінуклеотид за п. 8, де зазначений полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 2, 14, 15, 16, 17 або 19.
10. Набір для детектування ДНК, що містить щонайменше один полінуклеотид, який може специфічно детектувати специфічну для DP-073496-4 ділянку, де специфічна для DP-073496-4 ділянка містить SEQ ID NO: 12, 10 і 13, де:
- 25 а) зазначений полінуклеотид містить полінуклеотид, що містить SEQ ID NO: 12 або 13; або
 б) зазначений полінуклеотид містить послідовність, що гібридизується в жорстких умовах з послідовностями, що містять:
 i) послідовності SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 10; або
 ii) послідовності SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 10.
- 30 11. Спосіб ідентифікації події DP-073496-4 у біологічному зразку, де подія DP-073496-4 містить SEQ ID NO: 12, 10 і 13, що включає:
 (а) приведення зазначеного зразка в контакт із першим і другим праймерами; і
 (б) ампліфікацію полінуклеотиду, що містить специфічну для DP-073496-4 ділянку, де специфічна для DP-073496-4 ділянка містить SEQ ID NO: 12 або 13; і
 35 (с) детектування зазначеної ділянки, специфічної для DP-073496-4.
12. Спосіб за п. 11, де:
 i) зазначений полінуклеотид містить SEQ ID NO: 14 або 16; або
 ii) зазначений полінуклеотид містить SEQ ID NO: 15 або 17.
13. Спосіб детектування присутності ДНК, що відповідає події DP-073496-4, у зразку, де подія DP-073496-4 містить SEQ ID NO: 12, 10 і 13, який включає:
 40 (а) приведення зразка в контакт із полінуклеотидним зондом, який гібридизується в жорстких умовах гібридизації з ДНК із зазначеної події *Brassica* і специфічно детектує зазначену подію;
 (б) піддавання зразка і зонда впливу жорстких умов гібридизації; і
 (с) детектування гібридизації зонда із ДНК, де детектування гібридизації вказує на присутність
 45 зазначеної події.
14. Спосіб за п. 13, де зазначений зразок містить тканину *Brassica*.



ФІГ.1: Синтез PHP28181



ФІГ.2 Схематична діаграма плазміді PHP28181



RHP28181A

2112 п.н.

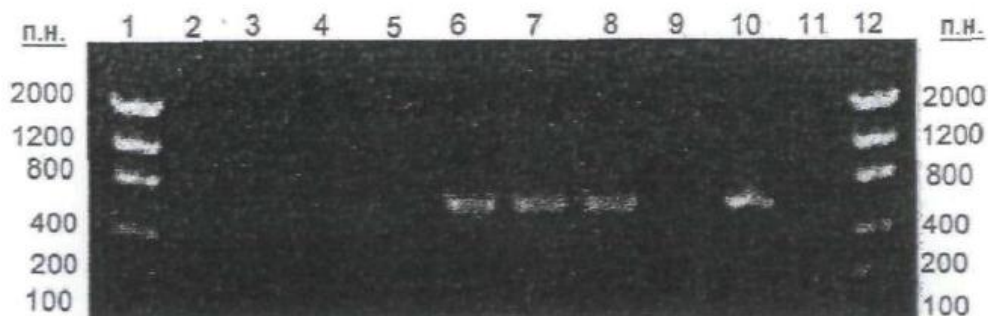
ФІГ.3: Схематична діаграма
фрагменту плазмід **RHP28181A**



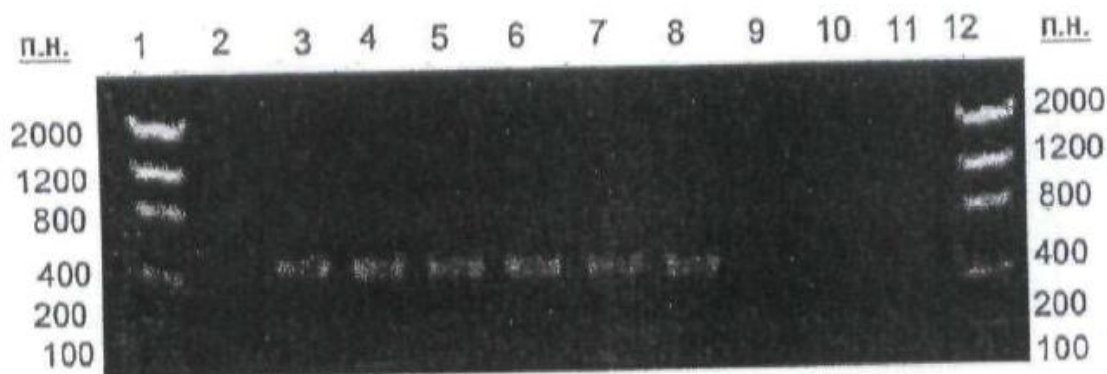
RHP28181A-Erin

2112 п.н.

ФІГ.4: Схематичне уявлення фрагменту А
з плазмід **RHP28181 (RHP28181A)**



ФІГ.5: Аналіз ПЛР ДНК листів від Brassica DP-073486-4
Та не модифікованої генетично контрольної Brassica



ФІГ.6: Аналіз ПЛР гену FatA в ДНК листів від
Brassica DP-073486-4
та не модифікованої генетично контрольної Brassica