



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122197** (13) **C2**  
(51) МПК  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 6/54** (2018.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2015 00556</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Бард Натан (US),</b> <b>Бредфіш Грегори А. (US),</b> <b>Цуй Юньсін Корі (US),</b> <b>Дріппс Джеймс Е. (US),</b> <b>Хоффман Томас (US),</b> <b>Паредді Даякар (US),</b> <b>Паркхерст Дон М. (US),</b> <b>Тоledo Сандра Г. (US),</b> <b>Уїгінз Баррі (US),</b> <b>Чжоу Нін (US),</b> <b>Вуслі Аарон Т. (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>25.06.2013</b>	<b>(73)</b> Володілець (володільці): <b>ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕлЕлСі,</b> 9330 Zionsville Rd., Indianapolis, Indiana 46268, United States of America (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>13.10.2020</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.</b> <b>№367</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/663,700</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012/075426 A1, 07.06.2012 WO 2012/075429 A1, 07.06.2012 WO 2011/063413 A1, 26.05.2011 US 2011/191900 A1, 04.08.2011 WO 2013/016527 A1, 31.01.2013 Crespo et al., "Cross-resistance and mechanism of resistance to CryIAb toxin from Bacillus thuringiensis in a field-derived strain of European corn borer, Ostrinia nubilalis", Journal of Invertebrate Pathology, 29.04.2011, vol. 107, P. 185 - 192
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>25.06.2012</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>27.04.2015, Бюл.№ 8</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>12.10.2020, Бюл.№ 19</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2013/047539,</b> <b>25.06.2013</b>	

**(54) ТРАНСГЕННА РОСЛИНА СОЇ, ЯКА МАЄ СТИЙКІСТЬ ДО ГЛЮФОСИНАТУ І ПІДВИЩЕНУ СТИЙКІСТЬ ДО КОМАХ****(57) Реферат:**

Винахід стосується трансгенної рослини сої, яка має стійкість до глюфосинату і підвищену стійкість до комах *Pseudoplusia includens* (соєвий п'ядак), *Anticarsia gemmatilis* (листовійка квасолі), *Spodoptera frugiperda* (капустяна совка) або *Heliothis virescens* (тютюнова совка). Винахід також стосується насіння трансгенної рослини сої; виділеної послідовності ДНК; полінуклеотиду, що містить послідовність стику події трансформації сої 9582.816.15.1; товарного продукту, отриманого з трансгенної рослини сої; способу боротьби з комахами та способу отримання трансгенної рослини сої.

**UA 122197 C2**



Домагання на пріоритет

У даній заявці вимагається пріоритет попередньої заявки на патент США 61/663700, поданої 25 червня, 2012. Зміст цієї заявки у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

5 Попередній рівень техніки

Гени, що кодують Cry1F і Cry1Ac synpro (Cry1Ac), здатні надавати трансгенним рослинам резистентність до комах, наприклад резистентність до лускокрилих комах, а ген, що кодує РАТ (фосфінотрицинацетилтрансферазу), здатний надавати трансгенним рослинам стійкість до гербіциду фосфінотрицину (глюфозинату). Ген РАТ був успішно експресований в сої і використаний як селективний маркер для промислового продукування резистентних до комах трансгенних культур і для надання цим трансгенним рослинам стійкості до гербіциду глюфозинату.

Відомо, що експресія трансгенів в рослинах залежить від локалізації трансгенів в геномі рослини, що, ймовірно, зумовлено хроматиною структурою (наприклад, гетерохроматином) або близькістю елементів регуляції транскрипції (наприклад, енхансерів) до сайту інтеграції (Weising et al., Ann. Rev. Genet, 22:421-477, 1988). У той же час, присутність трансгена в різних ділянках геному так чи інакше залежить від загального фенотипу рослини. З цієї причини часто буває необхідним вдаватися до скринінгу великого числа трансгенвмісних трансформантів для ідентифікації трансген-специфічного трансформанта, який характеризується оптимальною експресією вбудованого гена, що представляє інтерес. Так, наприклад, в цих рослинах і в інших організмах може спостерігатися широка варіабельність в рівнях експресії гена, вбудованого в ці трансформанти. Можуть також спостерігатися відмінності в просторових або часових профілях експресії, наприклад відмінності у відносних рівнях експресії трансгена в різних тканинах рослин, де вказані відмінності можуть не відповідати передбачуваним профілям елементів регуляції транскрипції, присутніх у вбудованій генній конструкції. З цієї причини, звичайно продукують від ста до тисячі різних трансформантів і скринують їх в пошуку одного трансформанта, який має потрібні рівні і профілі експресії трансгена і який може бути використаний в промислових цілях. Трансформант, який має потрібні рівні або профілі експресії трансгена, може бути використаний для інтрогресії цього трансгена в генетичне оточення іншого виду шляхом статевого ауткросингу із застосуванням стандартних методів схрещування. Потомство таких кросів зберігає рівні експресії трансгена, характерні для вихідного трансформанта. Ця стратегія застосовується для забезпечення надійної експресії гена в різних сортах, добре адаптованих до умов культивування в певній місцевості.

Для того, щоб визначити, чи містить потомство статевого кросу трансген, що представляє інтерес, або групу таких трансгенів, бажано мати можливість детектувати наявність конкретної генетичної трансформації. Крім того, спосіб детектування конкретного трансформанта повинен відповідати нормам, встановленим Регуляторними органами для його апробації до виходу на ринок, а харчові продукти, одержані з рекомбінантних сільськогосподарських культур, повинні, наприклад, мати відповідне маркування, або такий спосіб може бути застосований для моніторингу якості навколишнього середовища, моніторингу якості сільськогосподарських культур, вирощених в польових умовах, або для моніторингу продуктів, одержаних після збирання врожаю, а також його проведення повинно відповідати нормам, затвердженим Регуляторними органами або сторонами договору.

При цьому, присутність трансформанта може бути детектована будь-яким методом детектування нуклеїнових кислот, відомим фахівцям, включаючи, але не обмежуючись ними, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) або гібридизацію ДНК з використанням нуклеїновокислотних зондів. Такі методи детектування звичайно направлені на часто використовувані генетичні елементи, такі як промотори, термінатори, маркерні гени і т. п., оскільки для багатьох ДНК-конструкцій, кодуючі області є однаковими. Тому, такі методи не можуть бути використані для диференціації різних трансформантів, особливо тих трансформантів, які продукуються з використанням одних і тих же ДНК-конструкцій або майже аналогічних конструкцій, за винятком лише тих випадків, коли відома послідовність фланкуючої ДНК, суміжної з вбудованою гетерологічною ДНК. Так, наприклад, в заявці на патент США № 2006/0070139, що стосується трансформанта кукурудзи DAS-59122-7, описаний трансформант-специфічний ПЛР-аналіз. Виходячи з вищесказаного, очевидно, що необхідно розробити простий і диференціальний метод ідентифікації трансформанта сої рDAB9582.816.15.1.

Короткий опис суті винаходу

У деяких своїх варіантах, даний винахід стосується нових трансгенних рослин трансформованої сої, резистентних до комах і стійких до гербіцидів, зокрема, даний винахід стосується трансформанта сої, який позначений рDAB9582.816.15.1 і містить описані тут гени

cry1F v3 (cry1F), cry1Ac synpro (cry1Ac) і pat v6 (pat), вбудовані в специфічний сайт в геномі клітин сої. Репрезентативне насіння сої було депоноване в Американській колекції типових культур (ATCC) під реєстраційним номером, вказаним в параграфі [0033]. ДНК рослин сої, що містять такий трансформант, включає послідовності стику/фланкуючі послідовності, описані в даній заявці, які вказують на локалізацію вбудованої ДНК в геномі сої. SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:2 є діагностичною ознакою присутності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Більш конкретно, послідовності, що оточують область стику в положеннях п.о. 1273/1274 SEQ ID NO:1 і в положеннях п.о. 175/176 і п.о. 316/317 SEQ ID NO:2, є діагностичною ознакою присутності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Нижче, в параграфі [0012] описані приклади послідовностей, що містять такі стики, які є характерними для ДНК сої, що містить трансформант сої pDAB9582.816.15.1.

У одному зі своїх варіантів, даний винахід стосується рослини сої або її частини, яка є резистентною до *Pseudoplusia includens* (соевого п'ядака) і яка має геном, що містить одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів. У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується насіння таких рослин.

У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується способу боротьби з комахами, який включає зараження комахами рослин сої, резистентних до комах, де вказані рослини сої мають геном, що містить одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів, де вказані послідовності є характерними ознаками присутності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, резистентного до комах. Присутність генів cry1F v3 (cry1F) і cry1Ac synpro (cry1Ac) в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1 надає такий рослині резистентність, наприклад, до *Pseudoplusia includens* (соевого п'ядака), *Anticarsia gemmatilis* (листовійки квасолі), *Epinotia aporema*, *Omoides indicatus*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmoides*, *Spodoptera eridania*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spilosoma virginica* і *Elasmopalpus lignosellus*.

У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується способу боротьби з бур'янами сої, який включає обробку сільськогосподарської культури сої гербіцидом глюфозинатом, де вказана сільськогосподарська культура сої включає рослини сої, що мають геном, який містить одну або більше послідовностей, вибраних з групи, що складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів, де вказані послідовності є діагностичними ознаками присутності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Присутність гена pat в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1 надає стійкість до гербіциду глюфозинату.

У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується способу детектування трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 в зразку, що містить соєву ДНК, де вказаний спосіб включає:

(а) контактування вказаного зразка з першим праймером довжиною щонайменше в 10 п.о., який селективно зв'язується з фланкуючою послідовністю в положеннях п.о. 1-1273 SEQ ID NO:1 або з її комплементом, і з другим праймером довжиною щонайменше в 10 п.о., який селективно зв'язується з послідовністю вставки в положеннях п.о. 1274-1577 SEQ ID NO:1 або з її комплементом; і проведення аналізу на амплікон, що утворюється між вказаними праймерами; або

(б) контактування вказаного зразка з першим праймером довжиною щонайменше в 10 п.о., який селективно зв'язується з послідовністю вставки в положеннях п.о. 1-175 SEQ ID NO:2 або з її комплементом, і з другим праймером довжиною щонайменше в 10 п.о., який селективно зв'язується з фланкуючою послідовністю в положеннях п.о. 176-1687 SEQ ID NO:2 або з її комплементом; і

(с) проведення аналізу на амплікон, що утворюється між вказаними праймерами.

У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується способу детектування трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, де вказаний спосіб включає:

(а) контактування вказаного зразка з першим праймером, який селективно зв'язується з фланкуючою послідовністю, вибраною з групи, що складається з п.о. в положеннях 1-1273 SEQ

ID NO:1 і п.о. в положеннях 176-1687 SEQ ID NO:2, або з її комплементами, і з другим праймером, який селективно зв'язується з SEQ ID NO: 3 або з її комплементом;

б) здійснення полімеразної ланцюгової реакції вказаного зразка; і

с) проведення аналізу на амплікон, що утворюється між вказаними праймерами.

5 У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується способу схрещування рослини сої, де вказаний спосіб включає схрещування першої рослини сої з другою рослиною сої з одержанням третьої рослини сої, де вказана перша рослина містить ДНК, що включає одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів; і проведення аналізу вказаної третьої рослини сої на присутність ДНК, що включає одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів.

20 У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується виділеної молекули ДНК, яка є діагностичною ознакою присутності трансформанта сої рDAB9582.816.15.1. Такими молекулами, крім SEQ ID NO:1 і 2, є молекули довжиною щонайменше 25 п.о., що містять п.о. в положеннях 1273-1274 SEQ ID NO:1 і щонайменше 10 п.о. SEQ ID NO:1 в кожному напрямі від п.о. 1273/1274 в області стику; амплікони довжиною щонайменше 25 п.о., що містять п.о. в положеннях 175-176 SEQ ID NO:2 і щонайменше 10 п.о. SEQ ID NO:2 в кожному напрямі від п.о. 175/176 в області стику. Прикладами є п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементи.

25 У іншому своєму варіанті, даний винахід стосується способу боротьби з комахами-шкідниками соєвих бобів, насіння або борошна з насіння, в якому міститься трансформант сої рDAB9582.816.15.1, де вказані боби, насіння або борошно з насіння містять ДНК, що включає одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів.

30 Варіанти здійснення винаходу також стосуються клітин рослин сої і частин рослин сої, включаючи, але не обмежуючись ними, пилок, овули, квітки, паростки, коріння і листя, ядра вегетативних клітин, клітини пилка, насіння і борошно з насіння, а також яйцеклітину, що містять трансформант сої рDAB 9582.816.15.1.

40 У деяких варіантах здійснення винаходу, трансформанту сої рDAB 9582.816.15.1 можуть бути надані і інші ознаки, включаючи, наприклад, інший(і) ген(и) стійкості до гербіцидів і/або білки-інгібітори комах і послідовності регуляції транскрипції (тобто РНК-інтерферуючий агент, дЛРНК, фактори транскрипції і т. п.). Додаткові ознаки можуть бути внесені в геном рослини шляхом схрещування рослин, ретрансформації трансгенної рослини, що містить трансформант сої рDAB 9582.816.15.1, або шляхом надання нових ознак завдяки націленій інтеграції за допомогою гомологічної рекомбінації.

45 Інші варіанти здійснення винаходу включають вирізання полінуклеотидних послідовностей, які містять трансформант сої рDAB9582.816.15.1, включаючи, наприклад, кластер для експресії гена *pat*. Після вирізання полінуклеотидної послідовності, модифікований трансформант може бути перенацілений в специфічний сайт хромосоми, де додаткові полінуклеотидні послідовності присутні разом з трансформантом сої рDAB9582.816.15.1.

50 У одному зі своїх варіантів, даний винахід охоплює сайт-мішень хромосоми сої, локалізований на хромосомі 03 між фланкуючими послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 1 і 2.

55 У одному зі своїх варіантів, даний винахід стосується способу одержання трансгенної рослини сої, де вказаний спосіб включає інсерцію гетерологічної нуклеїнової кислоти в положенні на хромосомі 03 між геномними послідовностями, представленими в SEQ ID NO: 1 і 2, тобто між п.о. в положеннях 1-1273 SEQ ID NO:1 і п.о. в положеннях 176-1687 SEQ ID NO:2.

Крім того, варіанти здійснення винаходу також стосуються аналізів, які включають детектування присутності трансформанта, що розглядається, в зразку (наприклад, сої). Ці аналізи можуть бути здійснені на основі послідовності ДНК рекомбінантної конструкції,

вбудованої в геном сої, і на основі геномних послідовностей, фланкуючих сайт інсерції. Даний винахід також стосується наборів для проведення аналізів у відповідних умовах.

Зокрема, варіанти здійснення винаходу також стосуються клонування і аналізу послідовностей ДНК граничних областей, одержаних після інсерції Т-ДНК від pDAB9582 в лініїх трансгенної сої. Ці послідовності є унікальними. Виходячи з послідовностей вставки і стику можуть бути ідентифіковані і сконструйовані трансформант-специфічні праймери. ПЛР-аналіз продемонстрував, що ці трансформанти можуть бути ідентифіковані за допомогою аналізу ПЛР-ампліконів, одержаних з використанням наборів трансформант-специфічних праймерів. Таким чином, ці і інші споріднені методи можуть бути застосовані для унікальної ідентифікації ліній сої, що містять трансформант згідно з винаходом.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується способу боротьби з комахами, який включає зараження комахами рослин сої, резистентних до комах, де вказані рослини сої включають ДНК, що містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, де вказані послідовності є діагностичними ознаками присутності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, резистентного до комах.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується способу боротьби з комахами *Pseudoplusia includens*, *Anticarsia gemmatilis* або *Spodoptera frugiperda*, де вказаний спосіб включає зараження резистентних до комах рослин сої комахами *Pseudoplusia includens*, *Anticarsia gemmatilis*, *Heliothis virescens* або *Spodoptera frugiperda*, де вказані рослини сої включають ДНК, що містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, де вказана послідовність є діагностичною ознакою присутності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, резистентного до комах.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується способу боротьби з бур'янами сої, який включає обробку сільськогосподарської культури сої гербіцидом глюфозинатом, де вказана сільськогосподарська культура сої включає рослини сої, які містять ДНК, що включає послідовність, вибрану з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, де вказана послідовність є діагностичною ознакою присутності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується виділеної послідовності ДНК, що містить одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується способу схрещування рослини сої, де вказаний спосіб включає схрещування першої рослини сої з другою рослиною сої з одержанням третьої рослини сої, де вказана перша рослина містить ДНК, що включає одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів; і проведення аналізу вказаної третьої рослини сої на присутність ДНК, що включає одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується виділеної молекули ДНК, що містить послідовність стику, яка включає щонайменше одну послідовність, вибрану з групи, що складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів. Один з варіантів здійснення винаходу стосується рослини сої або її частини, яка є резистентною до *Pseudoplusia includens* (соевого п'ядака) і

містить ДНК, що має щонайменше одну нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується композиції, одержаної з рослини сої або її частин, де вказаною композицією є харчовою продукт, вибраний з групи, що складається з кормового соєвого борошна, харчового борошна, білкового концентрату і олії.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується способу боротьби з комахами-шкідниками соєвих бобів, насіння, кормового борошна або харчового борошна, в яких міститься трансформант сої rDAB9582.816.15.1, де вказані боби, насіння, кормове борошно або харчове борошно містять ДНК, що включає одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і їх комплементів.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується насіння сої, що містить в своєму геномі послідовність ДНК, вибрану з групи, що складається з п.о. в положеннях 1258-1288 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1223-1323 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1173-1373 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 1073-1473 SEQ ID NO:1; п.о. в положеннях 160-190 SEQ ID NO:2; п.о. в положеннях 125-225 SEQ ID NO:2 і п.о. в положеннях 75-275 SEQ ID NO:2, і її комплементи. Інший варіант здійснення винаходу стосується насіння сої, що містить в своєму геномі гени *cru1F*, *cru1Ac* і *pat* трансформанта сої rDAB9582.816.15.1, і репрезентативного насіння сої, депонованого в Американській колекції типових культур під реєстраційним номером PTA-12588. Інший варіант здійснення винаходу стосується рослини сої, вирощеної шляхом культивування насіння сої згідно з будь-яким з цих двох варіантів. Інший варіант здійснення винаходу стосується насіння сої, продукovanого цією рослиною сої, де вказане насіння містить в своєму геномі гени *cru1F*, *cru1Ac* і *pat* трансформанта сої rDAB9582.816.15.1, які присутні в насінні сої, депонованому в Американській колекції типових культур під реєстраційним номером PTA-12588. Інший варіант здійснення винаходу стосується частини цієї рослини сої, де вказана частина вибрана з групи, що складається з пилка, овул, квіток, паростків, коріння і листя, і де вказана частина містить вказаний трансформант. Інший варіант здійснення винаходу стосується композиції, одержаної з рослини сої або її частини, де вказаною композицією є харчовий продукт, вибраний з групи, що складається з кормового соєвого борошна, харчового борошна і олії.

У іншому варіанті здійснення винаходу, рослина сої містить послідовність ДНК, яка щонайменше на 95% ідентична послідовності SEQ ID NO:14. Один з варіантів здійснення винаходу стосується потомства рослини сої згідно з вищезгаданим варіантом, де вказана рослина має стійкість до гербіциду глюфозинату, де вказана стійкість зумовлена експресією білка, кодованого у вказаному трансформанті або у вказаному геномі.

Інший варіант здійснення винаходу стосується насіння сої, що містить геном, який включає послідовність ДНК, що щонайменше на 95% ідентична послідовності SEQ ID NO:14. Інший варіант здійснення винаходу стосується рослини, вирощеної шляхом культивування цього насіння сої.

Один з варіантів здійснення винаходу стосується трансгенної рослини сої або її частини, що включає трансформант сої rDAB9582.816.15.1, де репрезентативне насіння сої, що містить трансформант сої rDAB9582.816.15.1, було депоноване в Американській колекції типових культур під реєстраційним номером PTA-12588.

#### Депонування насіння

За час розробки даного винаходу, щонайменше 2500 насінин лінії сої, що містить трансформант rDAB9582.816.15.1, були депоновані в Американській колекції типових культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, і є загальнодоступними без яких-небудь обмежень (але відповідно до патентного права). Цей депозит був зареєстрований в ATCC під депозитарним номером № PTA-12588 23 лютого 2012 р. компанією Dow AgroSciences LLC. Вказаний депозит був встановлений на зберігання згідно з Будапештським договором про депонування насіння з метою проведення патентної процедури.

#### Короткий опис послідовностей

SEQ ID NO:1 являє собою 5'-фланкуючу граничну послідовність ДНК трансформанта сої rDAB9582.816.15.1. Нуклеотиди 1-1273 складають геномну послідовність. Нуклеотиди 1274-1577 складають послідовність вставки.

SEQ ID NO:2 являє собою 3'-фланкуючу граничну послідовність ДНК трансформанта сої рDAB9582.816.15.1. Нуклеотиди 1-175 складають послідовність вставки. Нуклеотиди 176-316 складають реаранжовану послідовність рDAB9582. Нуклеотиди 317-1687 складають геномну послідовність.

5 SEQ ID NO:3 являє собою послідовність Т-ланцюга ДНК рDAB9582, яка вказано нижче в таблиці 1.

SEQ ID NO:4 являє собою олігонуклеотидний праймер 81615\_FW2 для підтвердження 5'-граничної геномної ДНК.

10 SEQ ID NO:5 являє собою олігонуклеотидний праймер 81516\_RV1 для підтвердження 3'-граничної геномної ДНК.

SEQ ID NO:6 являє собою олігонуклеотидний праймер 81516\_RV2 для підтвердження 3'-граничної геномної ДНК.

SEQ ID NO:7 являє собою олігонуклеотид 81516\_RV3 для підтвердження 3'-граничної геномної ДНК.

15 SEQ ID NO:8 являє собою олігонуклеотидний праймер 5'IREnd-01 для підтвердження 5'-граничної геномної ДНК.

SEQ ID NO:9 являє собою олігонуклеотидний праймер 5'IREnd-02 для підтвердження 5'-граничної геномної ДНК.

20 SEQ ID NO:10 являє собою олігонуклеотидний праймер AtUbi10RV1 для підтвердження 5'-граничної геномної ДНК.

SEQ ID NO:11 являє собою олігонуклеотидний праймер AtUbi10RV2 для підтвердження 5'-граничної геномної ДНК.

SEQ ID NO:12 являє собою олігонуклеотидний праймер 3'ATEnd05 для підтвердження 3'-граничної геномної ДНК.

25 SEQ ID NO:13 являє собою олігонуклеотидний праймер 3'TATEnd06 для підтвердження 3'-граничної геномної ДНК.

SEQ ID NO:14 являє собою передбачувану послідовність трансформанта сої рDAB9582.816.15.1. Ця послідовність включає геномну 5'-фланкуючу послідовність, послідовність-вставку Т-ланцюга рDAB9582 і 3'-фланкуючу геномну послідовність.

30 Короткий опис графічного матеріалу

На фігурі 1 представлена карта плазмиди рDAB9582, що містить кластери експресії генів cry1F v3, cry1Ac synpro і pat v6.

На фігурі 2 вказана локалізація праймерів для підтвердження 5'- і 3'-граничної послідовності трансформанта сої рDAB9582.816.15.1.

35 На фігурі 3 представлена геномна послідовність, розташована в певному порядку в трансформанті сої рDAB9582.816.15.1.

Докладний опис даного винаходу

40 Обидва кінці послідовності-вставки трансформанта сої рDAB9582.816.15.1 були секвеновані і охарактеризовані. Були розроблені трансформант-специфічні аналізи. Цей трансформант був також картований по геному сої (хромосомі сої 03). Даний трансформант може бути підданий інтрогресії з одержанням більш елітних ліній.

45 Як згадувалося вище в розділі "Попередній рівень техніки", вбудовування і інтеграція трансгена в геном рослини включає деякі випадкові події (і, отже, слово "подія" включає таке вбудовування). Тобто, багато які методи трансформації, такі як трансформація агробактерією, біобалістична трансформація (тобто за допомогою "вистрілювання" генів) і трансформація, опосередковувана карбідом кремнію (тобто WHISKERS™), не дозволяють передбачити, в яку ділянку геному вбудовується даний трансген. Таким чином, ідентифікація фланкуючої геномної ДНК рослини на обох сторонах вставки може мати важливе значення для ідентифікації рослини, що має дану вставку. Так, наприклад, можуть бути сконструйовані ПЛР-праймери, які генерують

50 ПЛР-амплікон по всій області стику вставки і геному хазяїна. Цей ПЛР-амплікон може бути використаний для ідентифікації унікальної вставки або вставки іншого типу.

Для кращого розуміння варіантів винаходу і для полегшення практичного здійснення цих варіантів фахівцем в даній галузі, в описі даного винаходу наводяться визначення термінів і приклади. Якщо це не обумовлено особливо, то такі терміни мають загальноприйняті значення, відомі фахівцю в галузі, до якої належить даний винахід. Номенклатура основ ДНК наводиться згідно зі ст. 37 Кодексу законів США (CFR) в § 1.822.

Використовуваний тут термін "потомство" означає потомство будь-якого покоління батьківської рослини, що містить трансформант сої рDAB9582.816.15.1.

60 "Трансгенна рослина з генною модифікацією" [або "трансформант"] ("event") одержують шляхом трансформації клітин рослин гетерологічною ДНК, тобто конструкцією нуклеїнової



кислоти, яка включає трансгени, що представляють інтерес; регенерації популяції рослин, одержаних після вбудовування трансгена в геном рослини; і відбору конкретної рослини, відмінної тим, що вона має інсерцію в конкретному положенні геному. Термін "трансгенна рослина з генною модифікацією" ("event") означає вихідний трансформант і потомство трансформанта, які включають гетерологічну ДНК. Термін "трансгенна рослина з генною модифікацією" ("event") також означає потомство рослини, продукуючої за допомогою статевого аутокросингу трансформанта і рослини іншого сорту, що включає геномну/трансгенну ДНК. Навіть після повторного поворотного схрещування з рекурентним батьком, вбудована трансгенна ДНК і фланкуюча геномна ДНК (геномна/трансгенна ДНК), що походить від трансформованого батька, присутні в потомстві цього кросу в тій же самій хромосомній ділянці. Термін "трансформант" ("event") також означає ДНК вихідного трансформанта і його потомства, що містять вбудовану ДНК і фланкуючу геномну послідовність, розташовану в безпосередній близькості від вбудованої ДНК, яка, як передбачається, повинна передаватися потомству, що одержує цю вбудовану ДНК, включаючи трансген, що представляє інтерес, внаслідок статевого схрещування однієї батьківської лінії, яка містить вбудовану ДНК (наприклад, вихідного трансформанта і його потомства, продукуючого після самозапилення), і батьківської лінії, яка не містить вбудовану ДНК.

"Послідовність стику" або "гранична послідовність" охоплює положення, в якому ДНК, вбудована в геном, приєднана до ДНК геному нативної рослини сої, фланкуючого положення вставки, причому ідентифікація або детектування однієї або іншої послідовності стику в рослинному генетичному матеріалі будуть достатніми для виявлення такого трансформанта. Даний винахід включає послідовності ДНК, які охоплюють інсерції в описаних тут трансформантах сої і фланкуючу ДНК аналогічної довжини. Конкретні приклади таких діагностичних послідовностей описані в даній заявці, однак, в даному винаході можуть бути використані і інші діагностичні послідовності, які перекриваються з послідовностями стику вказаних вставок або з послідовностями стику вказаних вставок і геномної послідовності, і такі послідовності можуть бути використані відповідно до варіантів здійснення винаходу.

Варіанти здійснення винаходу, зокрема, стосуються ідентифікації подій трансформації з використанням таких фланкуючих послідовностей, послідовностей стику і послідовностей вставки. Варіанти здійснення винаходу включають використання споріднених ПЛР-праймерів і ампліконів. Відповідно до варіантів здійснення винаходу, для детектування або ідентифікації комерційно доступних сортів або ліній трансгенної сої, виведених із запатентованих ліній трансгенної сої, можуть бути застосовані методи ПЛР-аналізу з використанням ампліконів, які охоплюють вбудовану ДНК і її граничні області.

Фланкуючі послідовності/послідовності стику використовуються як діагностичні ознаки присутності трансформантів сої rDAB9582.816.15.1. На основі цих послідовностей були одержані трансформант-специфічні праймери. ПЛР-аналіз показав, що ці лінії рослини сої можуть бути ідентифіковані по різних генотипах сої шляхом аналізу ПЛР-ампліконів, одержаних з використанням наборів цих трансформант-специфічних праймерів. Таким чином, ці і інші аналогічні процедури можуть бути застосовані для ідентифікації унікальності цих ліній рослини сої. Ідентифіковані тут послідовності є унікальними.

Способи детектування згідно з варіантами винаходу є особливо цінними, якщо їх застосовувати в комбінації зі схрещуванням рослин, де, після визначення, яке саме потомство рослини містить даний трансформант, батьківська рослина, яка містить трансформант, що представляє інтерес, може бути схрещена з лінією іншої рослини для надання потомству однієї або більше додаткових ознак, що представляють інтерес. Ці методи із застосуванням ПЛР-аналізів є переважними для реалізації програм по схрещуванню рослин сої, а також по контролю якості, зокрема, товарного насіннєвого матеріалу трансгенної сої. На даний час існують і використовуються набори для ПЛР-детектування цих ліній трансгенної сої. Це дозволяє також прискорити реєстрацію продукту і його надходження на реалізацію.

Крім того, для ідентифікації конкретної геномної локалізації кожної вставки можуть бути використані фланкуючі/геномні послідовності сої. Ця інформація може бути використана для одержання молекулярних маркерних систем, специфічних для кожного трансформанта. Такі системи можуть бути використані для розробки прискореної стратегії схрещування і одержання даних по зчепленню.

Крім того, інформація про фланкуючу послідовність може бути використана для дослідження і характеристики процесів інтеграції трансгенів, властивостей сайту геномної інтеграції, відбору трансформантів, стабільності трансгенів і їх фланкуючих послідовностей і експресії генів (зокрема, процесів, що стосуються сайленсингу генів, профілю метилування

трансгенів, ефектів положень і потенційних елементів, асоційованих з експресією, таких як MARS [області приєднання до матриці] і т. п.).

Виходячи зі всього вищесказаного, абсолютно очевидно, що варіанти здійснення винаходу включають насіння, депоноване в ATCC під депозитарним номером, вказаним в параграфі [0033]. Варіанти здійснення винаходу також включають стійку до гербіцидів рослину сої, вирощену з насіння, депонованого в ATCC під депозитарним номером, вказаним в параграфі [0033]. Варіанти здійснення винаходу також включають частини вказаної рослини, такі як листя, зразки тканини, насіння, одержане від вказаної рослини, пилок і т. п. (де вказані частини рослини містять *cru1F*, *cru1Ac*, *pat* і *SEQ ID NO:1* і *2*).

Крім того, варіанти здійснення винаходу також включають потомство рослин і/або потомство рослин, вирощених з депонованого насіння, переважно насіння рослини сої, резистентної до гербіцидів, де вказана рослина має геном, що містить описану тут детектовану послідовність "стику"/фланкуючу послідовність дикого типу. Використовуваний тут термін "соя" означає рослину *Glycine max* і включає всі її сорти, які можуть бути виведені шляхом схрещування однієї рослини сої з іншою рослиною сої.

Даний винахід також включає способи одержання кросів з використанням рослини згідно з винаходом як щонайменше одного батька. Так, наприклад, даний винахід включає  $F_1$ -гібрид рослини, що має, як одного або двох батьків, будь-які описані тут рослини. Даний винахід також стосується насіння, продукованого такими  $F_1$ -гібридами згідно з винаходом. Даний винахід включає спосіб продукування насіння  $F_1$ -гібриду шляхом схрещування описаної тут рослини з іншою рослиною (наприклад, інбредним батьком) і збирання одержаного гібридного насіння. Даний винахід включає описану тут рослину, яка є або жіночою батьківською рослиною, або чоловічою батьківською рослиною. Характеризація одержаних рослин може бути проведена більш ефективно після ретельного дослідження рослин-батьків.

Рослина сої згідно з винаходом, резистентна до комах/стійка до глюфозинату, може бути виведена шляхом першого статевого схрещування першої батьківської рослини сої, вирощеної з насіння будь-якої з вказаних тут ліній, з другою батьківською рослиною сої, з одержанням множини рослин-потомків першого покоління, після чого проводять відбір потомства першого покоління, яке є резистентним до глюфозинату; самозапилення потомства першого покоління з продукуванням множини рослин-потомків другого покоління, а потім відбір з потомства другого покоління рослини, яка є резистентною до глюфозинату. Ці стадії можуть також включати поворотне схрещування рослини-потомка першого покоління або рослини-потомка другого покоління з другою батьківською рослиною сої або з третьою батьківською рослиною сої. Потім може бути засіяна культура сої, що дає насіння сої або її потомства згідно з винаходом.

Потрібно також зазначити, що дві різних трансгенних рослини можуть бути також схрещені з одержанням потомства, яке містить два доданих екзогенних гени що незалежно сегрегуються. Після самозапилення відповідного потомства можуть бути одержані рослини, які є гомозиготними по обох доданих екзогенних генах. Поворотне схрещування з батьківською рослиною і ауткросинг з нетрансгенною рослиною також розглядається як вегетативне розмноження. Фахівцям відомі і інші методи схрещування, звичайно застосовувані для надання різних ознак і вирощування різних культур. Поворотне схрещування було використане для простої передачі добре успадкованої ознаки шляхом перенесення генів в потрібні гомозиготні сорти або в інбредну лінію, яка є рекурентним батьком. Джерело ознаки, що передається, називають батьком-донором. Як і очіувалося, одержана рослина має ознаки рекурентного батька (наприклад, сорту), і ця бажана ознака передається від батька-донора. Після першого схрещування відбирають рослини, що мають фенотип батька-донора, і ці рослини повторно схрещують (піддають поворотному схрещуванню) з рекурентним батьком. Як і очіувалося, одержана рослина має ознаки рекурентного батька (наприклад, сорту), і ця бажана ознака передається від батька-донора.

Аналогічним чином, резистентна до комах/стійка до глюфозинату рослина сої згідно з варіантом здійснення винаходу може бути трансформована додатковими трансгенами із застосуванням відомих методів. Методи трансформації, такі як трансформація агробактерією, біобалістична трансформація (тобто за допомогою "вистрілювання" генів) і трансформація, опосередковувана карбідом кремнію (тобто WHISKERS™), можуть бути застосовані для введення додаткового(их) трансгена(ів) в геном трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Відбір і характеризація трансгенних рослин, що містять нові вбудовані трансгени, можуть бути здійснені для ідентифікації рослин, які містять, крім генів *cru1F*, *cru1Ac*, *pat* згідно з варіантами здійснення винаходу, стабільний інтегрант нового трансгена.

Молекули ДНК згідно з варіантами здійснення винаходу можуть бути використані як молекулярні маркери в методі схрещування із застосуванням маркерів (MAB). Молекули ДНК

згідно з варіантами здійснення винаходу можуть бути використані в методах із застосуванням маркерів (таких як AFLP-, RFLP-, RAPD-, SNP- і SSR-маркери), які дозволяють ідентифікувати агрономічно цінні і генетично зчеплені ознаки, відомі фахівцям. Ознаки резистентності до комах і стійкості до гербіцидів можуть бути простежені у потомства кросу, одержаного шляхом

5 схрещування з рослиною сої згідно з варіантами здійснення винаходу (або з її потомством і будь-яким іншим сортом або іншим різновидом рослини сої), із застосуванням МАВ-методів. Маркерами для вказаних ознак є молекули ДНК, і МАВ-методи, добре відомі фахівцям, можуть бути застосовані для простеження ознаки (ознак) стійкості до гербіцидів у рослин сої, де щонайменше одна лінія рослини сої згідно з варіантами здійснення винаходу або її потомства є

10 батьком або предком. Способи згідно з варіантами здійснення винаходу можуть бути застосовані для ідентифікації рослини сої будь-якого сорту, яка має трансформант, що розглядається.

Варіанти здійснення винаходу включають спосіб одержання рослини сої, резистентної до комах і стійкої до гербіцидів, де вказаний спосіб включає схрещування з рослиною згідно з

15 винаходом. Більш конкретно, вказані способи можуть включати схрещування двох рослин згідно з винаходом або однієї рослини згідно з винаходом з будь-якою іншою рослиною. Переважні способи також включають відбір потомства вказаного кросу шляхом аналізу вказаного потомства на трангенну модифікацію, детектовану відповідно до варіанта здійснення винаходу, і на бажану продуктивність даного сорту (наприклад, врожайність). Так, наприклад, варіанти

20 здійснення винаходу можуть бути застосовані для простеження події трансформації, що розглядається, у всіх циклах схрещування з рослинами, що мають інші бажані ознаки, такі як агрономічні показники, стійкість або резистентність до хвороб, стійкість або резистентність до нематод і час дозрівання насіння. Рослини, які містять трансформант, що розглядається, і які мають потрібну ознаку, можуть бути детектовані, ідентифіковані, відібрані і відразу використані,

25 наприклад, в подальших раундах схрещування. Трансформант/ознака, що розглядається, може бути також зчеплений(а) з іншою(ими) ознакою(ами) резистентності до комах і/або з іншими ознаками стійкості до гербіцидів за допомогою схрещування, а потім може бути проведений моніторинг такого(ї) трансформанта/ознаки відповідно до варіантів здійснення винаходу. Одним з варіантів останнього аспекту є рослини, які містять трансген, що розглядається, об'єднаний з

30 генами *cry1F* і *cry1Ac*, що надають резистентність до лускокрилих, якими є *Pseudoplusia includens* (соевий п'ядак), *Anticarsia gemmatilis* (листовійка квасолі), *Epinotia aporema*, *Omoides indicatus*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmoides*, *Spodoptera eridania*, *Heliothis virescens*, *Heliothis virescens*, *Heliothis virescens*, *Spilosoma virginica* і *Elasmopalpus lignosellus*.

Таким чином, варіанти здійснення винаходу можуть бути об'єднані, наприклад, з

35 додатковими ознаками, що кодують резистентність до гліфосату (наприклад, резистентність до рослинних або бактеріальних EPSPS, GOX, GAT), резистентність до глютофозинату (наприклад, резистентність до *dsr-2*, *bar*), резистентність до гербіциду, інгібуючого ацетолактатсинтазу (ALS) (наприклад, до імідазолінонів [таких як імазетапір], до сульфонілсечовин, до сульфоаніліду триазолпіримідину, до піримідинілітобензоатів і до інших хімічних речовин [*Csrl*, *SurA* і т.п.]); резистентність до бромоксінілу (наприклад, *Vxn*); резистентність до інгібіторів

40 ферменту HPPD (4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази); резистентність до інгібіторів фітоєндезатурази (PDS); резистентність до гербіцидів, інгібуючих фотосистему II (наприклад, *psbA*); резистентність до гербіцидів, інгібуючих фотосистему I; резистентність до гербіцидів, інгібуючих протопорфіриногеноксидазу IX (PPO) (наприклад, PPO-1), резистентність до гербіцидів на основі фенілсечовини (наприклад, CYP76B1), резистентність до ферментів, розкладаючих дикамбу (див., наприклад, US 20030135879), і з іншими ознаками, які можуть бути зчеплені з однією ознакою або у множині їх комбінацій, з метою ефективного знищення або попередження поширення заносних бур'янів і/або надання резистентності до будь-яких гербіцидів вищезазначених класів.

Крім того, трансформант сої pDAB9582.816.15.1 може бути зчеплений з однією або більше

50 додатковими ознаками (наприклад, з резистентністю до комах, резистентністю до зараження патогенами або стійкістю до стресів і т. п.) або з продуктивними ознаками (наприклад, з підвищеною врожайністю, з підвищеною олійністю, поліпшеною якістю волокна і т. п.). Таким чином, варіанти здійснення винаходу можуть бути застосовані для вирощування

55 сільськогосподарських культур з повним набором поліпшених агрономічних ознак, таких як якість культури, її пристосованість і економічний показник "витрати - ефективність боротьби з будь-якими шкідниками сільськогосподарських культур".

Методи інтеграції полінуклеотидної послідовності в специфічний сайт хромосоми рослинної клітини за допомогою гомологічної рекомбінації описані в літературі. Так, наприклад, сайт-специфічна інтеграція, описана в публікації патентної заявки на патент США № 2009/0111188

60

A1, яка вводиться в даний опис за допомогою посилання, включає використання рекомбіназ або інтеграз, опосередковуючих введення донорної полінуклеотидної послідовності в хромосому мішені. Крім того, в міжнародній патентній заявці № WO 2008/021207, яка вводиться в даний опис за допомогою посилання, описана гомологічна рекомбінація, опосередковувана білками "цинкові пальці" і здійснювана для інтеграції однієї або більше донорних полінуклеотидних послідовностей в специфічні положення геному. Рекомбінази, такі як FLP/FRT, описані в патенті США № 6720475, який вводиться в даний опис за допомогою посилання, або CRE/LOX, описані в патенті США № 5658772, який вводиться в даний опис за допомогою посилання, можуть бути використані для інтеграції полінуклеотидної послідовності в специфічний сайт хромосоми. І, нарешті, використання мегануклеаз для вбудовування донорних полінуклеотидів в специфічний сайт хромосоми було описане в публікації Puchta et al., PNAS USA 93 (1996) pp. 5055-5060).

Також існують і, в основному, застосовуються інші, по суті, відомі методи сайт-специфічної інтеграції в клітини рослин (Kumar et al., Trends in Plant Set 6(4) (2001), pp. 155-159). Крім того, системи сайт-специфічної рекомбінації, які були ідентифіковані у деяких прокариотичних і нижчих еукаріотичних організмів, можуть бути використані і в рослинах. Прикладами таких систем є, але не обмежуються ними, система рекомбіназ R/RS плазмиди pSR1 дріжджів *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki et al. (1985), J. Mol. Biol. 182:191-203) і система Gin/Gix фага Mu (Maeser and Kahlmann (1991), Mol. Gen. Genet. 230:170-176).

У деяких варіантах здійснення винаходу можуть виявитися бажаними інтеграція або зчеплення з новим(и) трансгеном(ами) в безпосередній близькості від існуючої трансгенної вставки. Трансгенна вставка може розглядатися як переважний геномний локус, який був вибраний, виходячи з унікальних ознак, таких як єдиний інсерційний сайт, нормальна менделєвська сегрегація і стабільна експресія, і переважна комбінація властивостей, включаючи стійкість до гербіцидів і агрономічна продуктивність в окремо взятому і в різних інших географічних регіонах. Потомство рослин, що містить інтегровані трансгени, повинно зберігати експресійні властивості трансгена у вже існуючих трансформантах. Крім того, оскільки вже були ідентифіковані геномні фланкуючі послідовності і їх локалізація в хромосомі потомства рослин, що містять такий трансген, то можуть бути проведені розроблені аналізи для детектування і підтвердження цього трансгена в потомстві рослин, що містять інтегрований трансген. І нарешті, інтеграція нового трансгена в специфічне положення хромосоми, яке тісно зчеплене з існуючим трансгеном, буде полегшувати інтрогресію трансгенів в інший генетичний фон за допомогою статевого ауткросингу із застосуванням стандартних методів схрещування.

У деяких варіантах здійснення винаходу, може виявитися бажаним вирізання полінуклеотидних послідовностей з трансгенної вставки. Так, наприклад, вирізання трансгена, описане в публікації заявки на патент США № 2011/191877, яка вводиться в даний опис за допомогою посилання, здійснюють з використанням нуклеаз "цинкові пальці" для видалення полінуклеотидної послідовності, що складається з генного експресійного кластера, з інтегрованої в хромосому трансгенної вставки. Полінуклеотидною послідовністю, що видаляється, може бути селективний маркер. Після вирізання і видалення полінуклеотидної послідовності, модифікована трансгенна вставка може бути знов вбудована шляхом інсерції полінуклеотидної послідовності. Вирізання полінуклеотидної послідовності і подальше повторне вбудовування модифікованої трансгенної вставки дає певні переваги, такі як можливість повторного використання селективного маркера або попередження спонтанних замін в транскриптомі рослини, які можуть відбуватися внаслідок експресії специфічних генів.

У даному винаході описаний специфічний сайт на хромосомі 03 в геномі сої, який може бути використаний для вбудовування в нього гетерологічних нуклеїнових кислот. Таким чином, варіанти здійснення винаходу стосуються способів введення гетерологічних нуклеїнових кислот, що представляють інтерес, в цей попередньо визначений сайт-мішень або в область, розташовану поблизу від цього сайту-мішені. Варіанти здійснення даного винаходу також охоплюють насіння сої і/або рослину сої, що містить будь-яку гетерологічну нуклеотидну послідовність, вбудовану в описаний тут сайт-мішень або в звичайне оточення цього сайту. Одним з засобів досягнення такої націленої інтеграції є вирізання і/або введення іншої вставки замість описаного тут rat-експресуючого кластера. Взагалі кажучи, у варіантах здійснення винаходу може бути застосований будь-який метод, яким є, наприклад, але не обмежується цим, направлена гомологічна рекомбінація.

Використовуваний тут термін "зчеплення" гена, трансгена або ознаки означає об'єднання бажаних ознак в одній трансгенній лінії. Зчеплення трансгенних ознак здійснюються селекціонерами за допомогою схрещування батьків, кожний з яких має одну з потрібних ознак, і подальшої ідентифікації потомства, яке має обидві ці потрібні ознаки. Іншим способом зчеплення генів є перенесення двох або більше генів в ядро клітини рослини під час

трансформації. Іншим способом зчеплення генів є повторна трансформація трансгенної рослини іншим геном, що представляє інтерес. Так, наприклад, зчеплення генів може бути застосоване для об'єднання двох або більше різних ознак, включаючи, наприклад, дві або більше різних ознак, таких як ознака(и) резистентності до комах і ознака(и) резистентності до хвороб, а також дві або більше ознак резистентності до гербіцидів, і/або ознака(и) резистентності до комах і ознака(и) резистентності до гербіцидів. При "зчепленні генів", крім використання гена, що представляє інтерес, можна також використовувати селективний маркер.

Термін "гомологічна рекомбінація" означає реакцію між будь-якою парою нуклеотидних послідовностей, які мають відповідні сайти, що містять аналогічні нуклеотидні послідовності, за допомогою яких дві нуклеотидні послідовності можуть взаємодіяти (піддаватися рекомбінації) з утворенням нової послідовності рекомбінантної ДНК. Сайти кожної з аналогічних нуклеотидних послідовностей називаються тут "гомологічними послідовностями". Взагалі кажучи, частота гомологічної рекомбінації зростає у міру збільшення довжини гомологічної послідовності. Таким чином, якщо гомологічна рекомбінація відбувається між двома нуклеотидними послідовностями, що мають меншу міру ідентичності, то частота (або ефективність) рекомбінації знижується у міру збільшення дивергентності цих двох послідовностей. Рекомбінація може бути здійснена з використанням однієї гомологічної послідовності на кожного донора і молекулу-мішень, в результаті чого може бути одержаний продукт рекомбінації "простого кросинговеру". Альтернативно, дві гомологічні послідовності можуть знаходитися на кожній з нуклеотидних послідовностей мішені і донора. Рекомбінація між двома гомологічними послідовностями на донорі і двома гомологічними послідовностями на мішені приводить до одержання продукту рекомбінації "подвійного кросинговеру". Якщо гомологічні послідовності на донорній молекулі фланкують послідовність, що піддається модифікації (наприклад, послідовність, що представляє інтерес), то рекомбінація за допомогою подвійного кросинговеру з молекулою-мішенню буде приводити до утворення продукту рекомбінації, в якому послідовність, що представляє інтерес, буде замінювати послідовність ДНК, яка спочатку знаходилася між гомологічними послідовностями на молекулі-мішені. Обмін послідовностями ДНК між мішенню і донором, який відбувається внаслідок події рекомбінації з подвійним кросинговером, називається "заміною послідовностей".

Переважні рослини або насіння згідно з варіантами здійснення винаходу містять в своєму геномі ідентифіковані тут операторні нуклеотидні послідовності *scu1F*, *scu1Ac* *synpro* і *pat* разом щонайменше з 20-500 або більше суміжними фланкуючими нуклеотидами, що знаходяться на обох сторонах вставки, як описано в даній заявці. Якщо це не обумовлено особливо, то термін "фланкуючі послідовності" означає послідовності, ідентифіковані в SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:2. Як і очікувалося, всі ці фланкуючі послідовності або їх частини можуть передаватися потомству, яке буде мати вбудовану ДНК завдяки статевому схрещуванню з батьківською лінією, що включає вказаний трансген.

Варіанти здійснення винаходу включають тканинні культури регенерованих клітин рослини згідно з варіантами здійснення винаходу. Варіанти здійснення винаходу також включають рослину, регенеровану з вказаної тканинної культури, зокрема рослину, яка має здатність експресувати всі морфологічні і фізіологічні ознаки репрезентативного сорту. Переважні рослини згідно з варіантами здійснення винаходу мають всі фізіологічні і морфологічні ознаки рослини, вирощеної з депонованого насіння. Варіанти здійснення винаходу також включають потомство такого насіння і насіння, яке має якісні ознаки, що представляють інтерес.

Використовуваний тут термін "лінія" означає групу рослин, які мають незначні відмінності між собою щонайменше по одній ознаці або взагалі не мають родових відмінностей. Такі лінії можуть бути створені в результаті самозапилення і відбору або вегетативного розмноження декількох поколінь з одного батька із застосуванням методів культивування тканин або клітин.

Використовувані тут терміни "сорт" і "різновид" є синонімами і означають лінію, використовувану в промисловому виробництві.

Терміни "стабільність" або "стабільний", якщо вони стосуються даного компонента, означають, що даний компонент зберігається від покоління до покоління, а переважно щонайменше по трьох поколіннях.

Термін "комерційна цінність" рослини означає, що дана рослина має хорошу схожість і високу фертильність, що дозволяє фермерам вирощувати цю культуру на фермах зі стандартним сільськогосподарським обладнанням, а олія з описаними тут компонентами може бути екстрагована з насіння на стандартному обладнанні для помелу і екстракції.

Термін "агрономічно елітний" стосується лінії, яка має бажані агрономічні властивості, такі як висока врожайність, зрілість, резистентність до хвороб і т. п., а також резистентність до комах і стійкість до гербіцидів, що надаються трансформанту(ам), що розглядається(ються). Будь-які і

всі описані агрономічні ознаки і контрольні точки можуть бути використані для ідентифікації таких рослин у вигляді або оцінного бала, або будь-якої граничної точки або обох граничних точок інтервалу значень, використовуваних для визначення властивостей таких рослин.

Як буде очевидно з даного опису, переважні варіанти наборів для детектування можуть, наприклад, включати зонди і/або праймери, які зв'язані з "послідовностями стику" або "послідовностями транзиції" і/або містять "послідовності стику" або "послідовності транзиції" (де геномна фланкуюча послідовність сої приєднана до послідовності вставки). Так, наприклад, ці набори включають полінуклеотидні зонди, праймери і/або амплікони, сконструйовані для ідентифікації однієї або обох послідовностей стику (де вставка приєднана до фланкуючої послідовності). Однією зі стандартних конструкцій є конструкція, що має один праймер, який гібридизується у фланкуючій області, і один праймер, який гібридизується у вставці. Такі праймери звичайно мають довжину щонайменше приблизно 15 залишків. При такому розташуванні, праймери можуть бути використані для генерування/ампліфікації детектованого амплікону, який вказує на присутність трансгена згідно з варіантом здійснення винаходу. Ці праймери можуть бути використані для генерування амплікону, який охоплює (і включає) послідовність стику, вказану вище.

Праймер(и), "що приєднується(ються)" до фланкуючої послідовності, звичайно не гібридизується(ються) в області, що знаходиться за межами приблизно 1200 основ або за межами області стику. Таким чином, типові фланкуючі праймери повинні бути сконструйовані так, щоб вони містили щонайменше 15 залишків будь-якого ланцюга в межах 1200 основ у фланкуючих послідовностях від початку вставки. Тобто, праймери, які містять послідовність відповідного розміру, що складається із залишків (або гібридизується з ними) в області, що складає в межах від пар основ 1 до 1273 SEQ ID NO:1 і/або пар основ 176-1687 SEQ ID NO:2, входять в обсяг варіантів здійснення винаходу. Аналогічним чином, праймери вставки можуть бути сконструйовані в будь-якій ділянці вставки, однак, пари основ 1273-1873 і 13058-13658 SEQ ID NO:14 можуть бути використані, наприклад, для конструювання кожного праймера без виключення.

Для фахівця в даній галузі також очевидно, що праймери і зонди можуть бути сконструйовані для гібридизації в стандартних умовах гібридизації і/або ПЛР-умовах, де вказаний праймер або зонд не є повністю комплементарним репрезентативній послідовності. Тобто, в цьому випадку може бути допустима певна міра невідповідності або виродженості. Що стосується праймера, що складається приблизно з 20 нуклеотидів, то, звичайно, наприклад, один, два або т. п. нуклеотидів необов'язково будуть зв'язуватися з протилежним ланцюгом, якщо невідповідна основа знаходиться всередині або на кінці праймера, протилежного амплікону. Різні придатні умови гібридизації описані нижче. У зондах можуть бути також використані синтетичні нуклеотидні аналоги, такі як інозин. Можуть бути також використані зонди на основі пептидовмісної нуклеїнової кислоти (PNA), а також ДНК- і РНК-зонди. Важливо зазначити, що такі зонди і праймери є діагностичними показниками (тобто здатні ідентифікувати і диференціювати унікальні ознаки) присутності трансформанта згідно з варіантом здійснення винаходу.

Потрібно зазначити, що при ПЛР-ампліфікації можуть виникати помилки, які можуть приводити, наприклад, до незначних помилок при секвенуванні. Тобто, якщо це не обумовлено особливо, то описані тут послідовності були визначені шляхом конструювання довгих ампліконів, що походять від геномних ДНК сої, з подальшим клонуванням і секвенуванням цих ампліконів. Тому не дивно, що в послідовностях, одержаних і визначених таким способом, можуть бути виявлені незначні відмінності і деякі невідповідності, якщо брати до уваги необхідність проведення множини раундів ампліфікації для одержання амплікону, достатнього для секвенування геномних ДНК. Потрібно зазначити і брати до уваги, що будь-які уточнення, необхідні для виправлення помилок або невідповідностей такого типу, які звичайно виникають при секвенуванні, входять в обсяг варіантів здійснення винаходу.

Потрібно також зазначити, що деякі геномні послідовності нерідко є делетованими, наприклад, при вбудовуванні послідовності в процесі створення трансформанта. Таким чином, між фланкуючими послідовностями, що розглядаються, і геномними послідовностями, що є, наприклад, в базі даних GENBANK, можуть спостерігатися деякі відмінності.

Компоненти послідовності ДНК-"вставки" представлені на кресленнях і більш детально обговорюються нижче в прикладах. Полінуклеотидні послідовності ДНК цих компонентів або їх фрагменти можуть бути використані як ДНК-праймери або зонди в способах згідно з варіантами здійснення винаходу.

У деяких варіантах здійснення винаходу, композиції і способи застосовуються для детектування присутності трансгенної/геномної області вставки в рослині сої і в її насінні і т. п.

Були одержані послідовності ДНК, що містять описану тут 5'-трансгенну/геномну послідовність стику в області вставки (між парами основ 1-1273 SEQ ID NO:1 і 1-1273 SEQ ID NO:14); їх сегменти і комплементи будь-яких репрезентативних послідовностей і будь-яких їх сегментів. Були одержані послідовності ДНК, що містять описану тут 3'-трансгенну/геномну послідовність стику в області вставки (між парами основ 176-1687 SEQ ID NO:2 і 13659-15170 SEQ ID NO:14); їх сегменти і комплементи будь-яких репрезентативних послідовностей і будь-яких їх сегментів. Послідовність стику області вставки охоплює послідовність стику, розташовану між гетерологічною ДНК, вбудованою в геном, і ДНК, яка присутня в клітинах рослини сої і фланкує інсерційний сайт. Такі послідовності дозволяють діагностувати даний трансформант.

На основі цих послідовностей вставки і граничних послідовностей можуть бути сконструйовані праймери, специфічні для даного трансформанта. ПЛР-аналіз показав, що лінії рослини сої згідно з варіантами здійснення винаходу можуть бути ідентифіковані на різні генотипи сої шляхом проведення аналізу ПЛР-ампліконів, одержаних з використанням наборів цих праймерів, специфічних для даного трансформанта. Ці і інші споріднені методи можуть бути застосовані для ідентифікації унікальних властивостей цих ліній рослин сої, що містять трансформант сої rDAB9582.816.15.1. Таким чином, ПЛР-амплікони, що походять від таких пар праймерів, є унікальними і можуть бути використані для ідентифікації цих ліній рослини сої.

У деяких варіантах здійснення винаходу, послідовності ДНК, які містять суміжний фрагмент нової трансгенної/геномної області вставки, також є аспектом даного винаходу. Даний винахід включає послідовності ДНК, які містять полінуклеотиди трансгенної послідовності вставки достатньої довжини і полінуклеотиди геномної послідовності сої достатньої довжини, що походять від однієї або більше з вищезазначених рослин сої, і/або послідовності, які можуть служити як праймери для продукування продукту-амплікону, використовуваного для ідентифікації однієї або більше з цих рослин сої.

Споріднені варіанти здійснення винаходу стосуються послідовностей ДНК, які містять щонайменше 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 або більше суміжних нуклеотидів трансгенної частини ідентифікованої тут послідовності ДНК (такої як SEQ ID NO:1 і її сегмент) або її комплементів і фланкуючу послідовність ДНК сої аналогічної довжини, що походить від вказаних послідовностей або їх комплементів. Такі послідовності можуть бути використані як ДНК-праймери в методах ампліфікації ДНК. Амплікони, продуковані з використанням цих праймерів, дозволяють ідентифікувати будь-які описані тут трансгенні рослини сої. Тому, варіанти здійснення винаходу також включають амплікони, продуковані з використанням таких ДНК-праймерів.

Варіанти здійснення винаходу також включають способи детектування присутності ДНК в зразку, який відповідає описаному тут трансформанту сої. Такі способи можуть включати: (а) контактування зразка, що містить ДНК, з набором праймерів, які, при їх використанні в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з ДНК, що походить щонайменше від одного з цих трансформантів сої, продукують амплікон, що дозволяє ідентифікувати вказаний(и) трансформант(и); (b) здійснення реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з одержанням амплікону, і (c) детектування амплікону.

Інші способи детектування згідно з варіантами здійснення винаходу включають спосіб детектування присутності ДНК в зразку, відповідному вказаному трансформанту, де вказаний спосіб включає: (а) контактування зразка, що містить ДНК, із зондом, який гібридується в жорстких умовах гібридизації з ДНК, що походить щонайменше від одного з вказаних трансформантів сої, і який не гібридується в жорстких умовах гібридизації з ДНК контрольної рослини сої (яка не містить ДНК-вставку, що представляє інтерес); (b) гібридизацію зразка і зонда в жорстких умовах; і (c) детектування гібридизації зонда з ДНК.

У інших своїх варіантах, даний винахід включає способи одержання рослини сої, що містить трансформант rDAB9582.816.15.1 згідно з варіантом здійснення винаходу, де вказаний спосіб включає стадії: (а) статевого схрещування першої батьківської лінії сої (яка містить експресійний кластер згідно з варіантом здійснення винаходу, що надає рослинам вказаної лінії ознаку стійкості до глюфозинату) з другою батьківською лінією сої (яка не має такої ознаки стійкості до гербіцидів) з одержанням множини потомства рослини; і (b) відбору потомства рослини з використанням молекулярних маркерів. Такі способи можуть включати, але необов'язково, додаткову стадію поворотного схрещування потомства рослини з другою батьківською лінією сої з одержанням чистосортної рослини сої, яка має вказану ознаку резистентності до комах і стійкості до глюфозинату.

Відповідно до іншого свого аспекту, даний винахід стосується способів визначення зиготності потомства кросів з вказаним трансформантом. Такі способи можуть включати контактування зразка, що містить ДНК сої, з набором праймерів згідно з варіантом здійснення

винаходу. Вказані праймери, при їх використанні в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з геномною ДНК, яка походить від вказаних трансформантів сої, продукують перший амплікон, що дозволяє ідентифікувати вказані трансформанти сої. Такі способи також включають здійснення реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з продукуванням першого амплікону; детектування першого амплікону і контактування зразка, що містить ДНК сої, з другим набором праймерів (вказаний другий набір праймерів, якщо він використовується в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з геномною ДНК рослин сої, продукує другий амплікон, що включає ендегенну послідовність геномної ДНК природної сої, яка не містить полінуклеотидної послідовності вказаного трансформанта); і здійснення реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з продукуванням другого амплікону. Вказані способи також включають детектування другого амплікону і порівняння першого і другого ампліконів в зразку, де присутність обох ампліконів вказує на зиготність трансгенної вставки.

Набори для детектування ДНК можуть бути розроблені із застосуванням описаних тут композицій і методів, добре відомих фахівцям в галузі детектування ДНК. Такі набори є придатними для ідентифікації ДНК, що розглядається, трансгенної сої в зразку і можуть бути застосовані в методах схрещування рослин сої, що містять цю ДНК. Вказані набори містять послідовності ДНК, комплементарні ампліконам, наприклад описаним тут ампліконам, або послідовностям ДНК, які є комплементарними ДНК, що містяться в трансгенних генетичних елементах трансформантів, що розглядаються. Ці послідовності ДНК можуть бути використані в реакціях ампліфікації ДНК або як зонди в методі гібридизації ДНК. Вказані набори можуть також містити реагенти і матеріали, необхідні для здійснення методу детектування.

"Зонд" являє собою виділену молекулу нуклеїнової кислоти, до якої приєднана стандартна детектована мітка або репортерна молекула (така як радіоактивний ізотоп, ліганд, хемілюмінесцентний агент або фермент). Такий зонд може гібридизуватися з ланцюгом нуклеїнової кислоти-мішені, а у випадку варіантів здійснення винаходу - з ланцюгом геномної ДНК одного з вказаних трансформантів сої, незалежно від того, чи походять вони від самої рослини сої або зразка, що включає ДНК трансформанта. Зондами згідно з варіантами здійснення винаходу є не тільки дезоксирибонуклеїнові або рибонуклеїнові кислоти, але також і поліаміди і інші матеріали, які специфічно зв'язуються з послідовністю ДНК-мішені і можуть бути використані для детектування присутності цієї послідовності ДНК-мішені.

"Праймери" являють собою виділені/синтезовані нуклеїнові кислоти, які були піддані відпалу з ланцюгом ДНК-мішені за допомогою гібридизації нуклеїнових кислот з утворенням гібриду "праймер - ланцюг ДНК-мішені" і з подальшим подовженням ланцюга ДНК-мішені під дією полімерази, наприклад ДНК-полімерази. Пари праймерів згідно з варіантами здійснення винаходу можуть бути використані для ампліфікації послідовності нуклеїнової кислоти-мішені, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або із застосуванням інших стандартних методів ампліфікації нуклеїнових кислот.

Зонди і праймери звичайно мають довжину в 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479,



480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 або 1000, або 2000, або 5000, або більше полінуклеотидів. Такі зонди і праймери специфічно гібридизуються з послідовністю-мішенню за допомогою гібридизації в умовах високої жорсткості. Переважно, зонди і праймери згідно з варіантами здійснення винаходу мають послідовності, повністю ідентичні послідовності-мішені, хоч можуть бути сконструйовані зонди, які відрізняються від послідовності-мішені і зберігають здатність гібридизуватися з послідовностями-мішенями, і такі зонди можуть бути сконструйовані стандартними методами.

Методи одержання і використання зондів і праймерів описані, наприклад, в керівництві Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Пари ПЛР-праймерів можуть бути одержані з відомої послідовності, наприклад, з використанням комп'ютерних програм, розроблених для цієї мети.

Праймери і зонди, одержані на основі описаних тут фланкуючих послідовностей ДНК і послідовностей вставок, можуть бути використані для підтвердження (і, якщо це необхідно, для корекції) описаних послідовностей стандартними методами, наприклад шляхом повторного клонування і секвенування таких послідовностей.

Нуклеїновокислотні зонди і праймери згідно з варіантами здійснення винаходу гібридизуються з послідовністю ДНК-мішені в жорстких умовах. Для детектування присутності ДНК трансгенної вставки в зразку може бути застосований стандартний метод гібридизації нуклеїнових кислот або метод ампліфікації нуклеїнових кислот. Молекули нуклеїнової кислоти або їх фрагменти здатні специфічно гібридизуватися з іншими молекулами нуклеїнової кислоти в певних умовах. Вважається, що дві молекули нуклеїнової кислоти здатні специфічно гібридизуватися одна з одною, якщо ці дві молекули здатні утворювати антипаралельну структуру дволанцюжкової нуклеїнової кислоти. Вважається, що молекула нуклеїнової кислоти "комплементарна" іншій молекулі нуклеїнової кислоти, якщо ці молекули мають повну комплементарність. Вважається, що молекули є "повністю комплементарними", якщо кожний нуклеотид однієї з цих молекул комплементарний нуклеотиду іншої молекули. Молекули, які є "повністю комплементарними", по суті гібридизуються одна з одною, але, при цьому, зберігають стабільність, достатню для їх гібридизації однієї з одною щонайменше в стандартних умовах "високої жорсткості". Стандартні умови високої жорсткості описані в керівництві Sambrook et al., 1989.

Дві молекули вважаються "мінімально комплементарними", якщо вони можуть гібридизуватися одна з одною, але, при цьому, зберігати стабільність, достатню для їх гібридизації однієї з одною щонайменше в стандартних умовах "низької жорсткості". Стандартні умови низької жорсткості описані в керівництві Sambrook et al., 1989. Для того, щоб молекула нуклеїнової кислоти могла служити як праймер або зонд, необхідно, щоб вона була лише мінімально комплементарна послідовності, здатній утворювати стабільну дволанцюжкову структуру в присутності конкретного розчинника і в присутності солі в певній концентрації.

Термін "жорсткі умови" або "умови жорсткості" функціонально визначений з точки зору гібридизації нуклеїновокислотного зонда з нуклеїновою кислотою-мішенню (тобто з конкретною послідовністю нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес), що проводиться відповідно до процедури специфічної гібридизації, обговорюваної в керівництві Sambrook et al., 1989, 9.52-9.55. Див., також, Sambrook et al., 1989, 9.47-9.52 і 9.56-9.58.

Залежно від мети застосування, умови гібридизації можуть варіюватися для досягнення різних мір селективності зонда або праймера з виродженою полінуклеотидною послідовністю відносно послідовності-мішені. У тих випадках, коли потрібна висока селективність, звичайно використовуються відносно жорсткі умови утворення гібридів однієї полінуклеотидної послідовності з іншою полінуклеотидною послідовністю, наприклад, в цьому випадку потрібно використовувати відносно низькі концентрації солі і/або високу температуру, наприклад концентрація NaCl може складати приблизно від 0,02M до 0,15M, а температура може складати приблизно від 50°C до 70°C. Жорсткі умови, наприклад, можуть включати щонайменше 2-кратне промивання гібридизаційного фільтра промивальним буфером високої жорсткості (0,2×SSC, 0,1% ДСН, 65°C). Відповідні умови жорсткості, стимулюючи гібридизацію ДНК, наприклад обробка 6,0× хлоридом натрію/цитратом натрію (SSC) приблизно при 45°C, з подальшим промиванням 2,0×SSC при 50°C, відомі фахівцям в даній галузі. Так, наприклад, концентрація солі в стадії промивання може бути вибрана з концентрацій солі, звичайно використовуваних в умовах низької жорсткості, а саме, приблизно 2,0×SSC при 50°C, і концентрацій солі, звичайно використовуваних в умовах високої жорсткості, а саме, приблизно 0,2×SSC при 50°C. Крім того, температура в стадії промивання, яка в умовах низької жорсткості становить приблизно 22°C, тобто кімнатну температуру, може бути підвищена до температури гібридизації в умовах

високої жорсткості, тобто приблизно до 65°C. Температура і концентрація солі можуть варіюватися або один з цих параметрів може залишатися постійним, а інший може змінюватися. При таких селективних умовах можуть спостерігатися, якщо вони взагалі є, незначні невідповідності між зондом і матрицею або ланцюгом-мішенню. Детектування послідовностей ДНК за допомогою гібридизації добре відоме фахівцям, і репрезентативні методи аналізів за допомогою гібридизації описані в патентах США №№ 4965188 і 5176995.

У особливо переважному варіанті винаходу, нуклеїнова кислота згідно з варіантом здійснення винаходу може специфічно гібридизуватися з одним або більше проілюстрованими або описаними тут праймерами (або ампліконами або іншими послідовностями), включаючи комплементи і їх фрагменти, в умовах високої жорсткості. У одному з аспектів даного винаходу, маркерна молекула нуклеїнової кислоти згідно з варіантом здійснення винаходу має послідовність нуклеїнової кислоти, представлену тут в одній з репрезентативних послідовностей, або комплементи і/або фрагменти цієї послідовності.

У іншому аспекті даного винаходу, маркерна молекула нуклеїнової кислоти згідно з варіантом здійснення винаходу має послідовність, яка на 80-100% або 90-100% ідентична вказаним послідовностям нуклеїнової кислоти. У іншому аспекті даного винаходу, маркерна молекула нуклеїнової кислоти згідно з варіантом здійснення винаходу має послідовність, яка на 95-100% ідентична такій послідовності нуклеїнової кислоти. Ці послідовності можуть бути використані як маркери в методах схрещування рослин для ідентифікації потомства генетичних кросів. Гібридизація зонда з молекулою ДНК-мішені може бути детектована будь-якими методами, відомими фахівцям, і такими методами можуть бути, але не обмежуються ними, методи, здійснювані з використанням флуоресцентних міток, радіоактивних міток, міток на основі антитіл і хемілюмінесцентних міток.

Що стосується ампліфікації послідовності нуклеїнової кислоти-мішені (наприклад, за допомогою ПЛР), що проводиться з використанням конкретної пари праймерів для ампліфікації, то термін "жорсткі умови" означає умови, які дозволяють парі праймерів гібридизуватися тільки з послідовністю нуклеїнової кислоти-мішені, з якою може зв'язуватися праймер, що має відповідну послідовність дикого типу (або її комплемент), і переважно продукувати унікальний продукт ампліфікації, тобто амплікон.

Термін "специфічний до (послідовності-мішені)" означає, що зонд або праймер гібридизується в жорстких умовах гібридизації тільки з послідовністю-мішенню в зразку, що містить таку послідовність-мішень.

Використовувані тут терміни "ампліфікована ДНК" або "амплікон" означають продукт ампліфікації послідовності нуклеїнової кислоти-мішені, яка є частиною нуклеїновокислотної матриці. Так, наприклад, для того, щоб визначити, чи може рослина сої, одержана в результаті статевого схрещування, містити трансгенну геномну ДНК рослини-трансформанта сої згідно з варіантом здійснення винаходу, ДНК, екстрагована із зразка тканини рослини сої, може бути піддана ампліфікації нуклеїнової кислоти з використанням пари праймерів, яка включає праймер, що походить від фланкуючої послідовності, яка присутня в геномі рослини і знаходиться поблизу від інсерційного сайту вбудованої гетерологічної ДНК, і другий праймер, що походить від вбудованої гетерологічної ДНК, внаслідок чого може бути одержаний амплікон, який може бути використаний для детектування присутності трансгенної ДНК. Амплікон має довжину і послідовність, які також є придатними для детектування такого трансгена. Довжина амплікону може варіюватися в межах від загальної довжини пар праймерів плюс одна пара нуклеотидних основ і/або загальної довжини пар праймерів плюс приблизно 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, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332,

333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 або 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 або більше пар нуклеотидних основ ( $\pm$  будь-які з перерахованих вище приростів). Альтернативно, пара праймерів може походити від фланкуючої послідовності, розташованої на обох сторонах вбудованої ДНК, внаслідок чого може продукуватися амплікон, який включає повнорозмірну нуклеотидну послідовність вставки. Один з членів пари праймерів, що походить від геномної послідовності рослини, може знаходитися на певній відстані від вбудованої послідовності ДНК. Така відстань може включати інтервал від однієї пари нуклеотидних основ і приблизно до двадцяти тисяч пар нуклеотидних основ. У використуване тут поняття "амплікон", зокрема, не входять димери праймерів, які можуть утворюватися в реакції термоампліфікації ДНК.

Ампліфікація нуклеїнової кислоти може бути здійснена будь-яким з різних методів ампліфікації нуклеїнової кислоти, відомих фахівцям, включаючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Фахівцям відомі різні методи ампліфікації, і ці методи описані, *inter alia*, в патенті США № 4683195 і в патенті США № 4683202. Методи ПЛР-ампліфікації були розроблені для ампліфікації геномної ДНК довжиною до 22 т.п. о. Ці методи, а також інші методи ампліфікації ДНК, відомі фахівцям, можуть бути застосовані для практичного здійснення даного винаходу. Послідовність гетерологічної трансгенної ДНК-вставки або фланкуюча геномна послідовність трансформанта сої, що розглядається, можуть бути підтверджені (і скоректовані, якщо це необхідно) шляхом ампліфікації таких послідовностей, що походять від вказаного трансформанта, з використанням праймерів, що походять від описаних тут послідовностей, з подальшим проведенням стандартного секвенування ПЛР-амплікону або клонованої ДНК.

Амплікон, одержаний такими методами, може бути детектований різними способами. Найбільш добре відомими методами детектування ДНК-ампліконів є електрофорез в агарозному гелі і забарвлення етидйбромідом. Іншим таким методом є генетичний елементний аналіз, де сконструйований ДНК-олігонуклеотид перекривається з суміжною фланкуючою послідовністю геномної ДНК і з вбудованою послідовністю ДНК. Цей олігонуклеотид іммобілізують на ямках мікротитраційного ямкового планшета. Після ПЛР області, що представляє інтерес (що проводиться з використанням одного праймера у вбудованій послідовності і одного праймера в суміжній фланкуючій геномній послідовності), одноланцюжковий ПЛР-продукт може бути гібридизований з іммобілізованим олігонуклеотидом і може служити як матриця для проведення реакції подовження на одну основу з використанням ДНК-полімераз і мічених ddNTP, специфічних до передбачуваної наступної основи. Аналіз зв'язаного продукту може бути здійснений шляхом кількісної оцінки флуоресцентного сигналу. Флуоресцентний сигнал вказує на присутність вставки/фланкуючої послідовності, що свідчить про успішне здійснення ампліфікації, гібридизації і подовження на одну основу.

Іншим методом є метод піросеквенування, описаний Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). У цьому методі, сконструйований олігонуклеотид перекривається з суміжною геномною ДНК і з послідовністю стику ДНК-вставки. Олігонуклеотид піддають гібридизації з одноланцюжковим ПЛР-продуктом області, що представляє інтерес (що проводиться з використанням одного праймера у вбудованій послідовності і одного праймера у фланкуючій геномній послідовності), і інкубують в присутності ДНК-полімерази, АТР, сульфурілази, люциферази, апірази, аденозин-5'-фосфосульфату і люциферину. Потім окремо додають DNTP, і таке додавання приводить до продукування детектованого світлового сигналу. Світловий сигнал вказує на присутність трансгенної вставки/фланкуючої послідовності, що свідчить про успішне здійснення ампліфікації, гібридизації і подовження на одну або декілька основ.

Іншим методом, який може бути застосований для детектування амплікону згідно з варіантом здійснення винаходу, є поляризація флуоресценції. У цьому методі конструюють олігонуклеотид, який перекривається з геномною фланкуючою послідовністю і з послідовністю стику ДНК-вставки. Олігонуклеотид піддають гібридизації з одноланцюжковим ПЛР-продуктом області, що представляє інтерес (що проводиться з використанням одного праймера у вбудованій ДНК і одного праймера у фланкуючій геномній послідовності ДНК), і інкубують в присутності ДНК-полімерази і флуоресцентно міченого ddNTP. Подовження на одну основу приводить до включення ddNTP. Таке включення флуоресцентно міченого ddNTP може бути

визначене по зміні поляризації на флуориметрі. Зміна поляризації вказує на присутність трансгенної вставки/фланкуючої послідовності, що свідчить про успішне здійснення ампліфікації, гібридизації і подовження на одну основу.

TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) являє собою метод детектування присутності ДНК і кількісної оцінки послідовності ДНК. Коротко, був сконструйований олігонуклеотидний зонд FRET, який перекривається з геномною фланкуючою послідовністю і з послідовністю стику ДНК-вставки. Зонд FRET і ПЛР-праймери (один праймер у вбудованій послідовності ДНК і один у фланкуючій геномній послідовності) піддають реакції циклізації в присутності термостабільної полімерази і dNTP. У процесі специфічної ампліфікації, ДНК-полімераза Taq гідролізується по механізму "корекції", внаслідок чого, з гасильної молекули на зонді FRET вивільняється флуоресцентна молекула. Флуоресцентний сигнал вказує на присутність фланкуючої послідовності/трансгенної послідовності-вставки, що свідчить про успішне здійснення ампліфікації і гібридизації.

Для детектування полінуклеотидної послідовності можуть бути застосовані описані методи "молекулярних маяків" (Beacons). Коротко, був сконструйований олігонуклеотидний зонд FRET, який перекривається з фланкуючою геномною послідовністю і з послідовністю стику ДНК-вставки. Унікальність структури зонда FRET полягає в тому, що цей зонд має вторинну структуру, що підтримує флуоресцентну і гасильну молекули в безпосередній близькості одна від одної. Зонд FRET і ПЛР-праймери (один праймер у вбудованій послідовності ДНК і один у фланкуючій геномній послідовності) піддають реакції циклізації в присутності термостабільної полімерази і dNTP. Після успішної ПЛР-ампліфікації, гібридизація зонда FRET з послідовністю-мішенню приводить до видалення вторинної структури зонда і до просторового розділення флуоресцентної і гасильної молекул. У результаті виникає флуоресцентний сигнал. Флуоресцентний сигнал вказує на присутність фланкуючої геномної послідовності/трансгенної послідовності-вставки, що свідчить про успішне здійснення ампліфікації і гібридизації.

Беручи до уваги той факт, що певна локалізація в геномі сої є особливо придатною для інсерції, можна сказати, що варіанти здійснення винаходу також включають насіння сої і/або рослину сої, що містять щонайменше одну несоеву rDAB9582.816.15.1-вставку-трансформант, що знаходиться, в основному, поблизу від цього положення геному. Одним з варіантів є заміна одного з описаних тут трансформантів сої rDAB9582.816.15.1 на іншу вставку. Взагалі кажучи, в конкретних варіантах здійснення винаходу, може бути, наприклад, здійснена направлена гомологічна рекомбінація. Технологія такого типу розглядається, наприклад, в WO 03/080809 A2 і у відповідній опублікованій заявці на патент США (US 20030232410). Таким чином, варіанти здійснення винаходу включають рослини і клітини рослин, що містять гетерологічну вставку (введену замість множини копій генів cry1F, cry1Ac або pat або разом з множиною копій цих генів), фланковану повнорозмірними ідентифікованими тут фланкуючими послідовностями (п.о. в положеннях 1-1273 SEQ ID NO:1 і п.о. в положеннях 176-1687 SEQ ID NO:2) або розпізнаваною частиною цих послідовностей. З застосуванням такого(их) способу(ів) може (можуть) бути також вбудована(і) додаткова копія (або додаткові копії) cry1F, cry1Ac або pat.

Всі цитовані тут патенти, патентні заявки, попередні заявки і публікації у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання в тій області, яка конкретно відповідає опису даного винаходу. Нижченаведені приклади наводяться для ілюстрації методів практичного здійснення варіантів винаходу і опису деяких переважних варіантів винаходу. Ці приклади не повинні розглядатися як обмеження даного винаходу. При цьому, для фахівця в даній галузі очевидно, що методи, описані в нижченаведених прикладах, являють собою конкретно застосовувані підходи, представлені для ілюстрації переважних варіантів практичного здійснення винаходу. Однак, фахівцю в даній галузі, виходячи з опису винаходу, буде очевидно, що в ці конкретні варіанти здійснення винаходу може бути внесена множина змін, які дозволяють одержати такий же або аналогічний результат і не виходять за рамки суті і обсягу винаходу. Якщо це не обумовлено особливо, то всі проценти дані по масі, а всі співвідношення розчинників в суміші дані по об'єму, якщо це не вказано конкретно.

Якщо це не обумовлено особливо, то нижченаведені скорочення означають:

п.о. - пара основ,

°C - градуси Цельсія,

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота,

EDTA - етилендіамінтетраоцтова кислота,

т.п.о. - тисяча пар основ,

мкг - мікрограми,

мкл - мікролітри,

мл - мілілітри,

М - молярна маса,

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція,

PTU - рослинна транскрипційна одиниця або експресійний кластер,

ДСН - додецилсульфат натрію,

5 SSC - буферний розчин, що містить суміш хлориду натрію і цитрату натрію, рН 7,0,

TBE - буферний розчин, що містить суміш основи Тріс, борної кислоти і EDTA, рН 8,3.

Приклади

Приклад 1. Трансформація і відбір рослин-трансформантів сої рDAB9582.816.15.1, що містять гени Cry1F, Cry1Ac і PAT

10 Трансгенну сою (*Glycine max*), що містить генну модифікацію рDAB9582.816.15.1, одержували за допомогою *Agrobacterium*-опосередковуваної трансформації експлантатів в потовщеннях в сім'ядолі сої. Для ініціації трансформації використовували інактивованій штам EHA101 *Agrobacterium* (Hood et al., 1993), який несе бінарний вектор рDAB9582 (фігура 1), що містить селективний маркер, *pat v6* і гени *cry1F v3* і *cry1Ac synpro*, що представляють інтерес, в області Т-ланцюга ДНК. Послідовність Т-ланцюга ДНК для рDAB9582 представлена в SEQ ID NO:3 і описана нижче в таблиці 1.

Таблиця 1

Генні елементи, локалізовані на рDAB9582

п.о. (SEQ ID NO:3)	Елемент конструкції	Посилання
272-1593	Промотор AtUbi10	Callis, et al. (1990), J. Biol. Chem., 265:12486-12493
1602-5048	Cry1F	Див. вище
5151-5607	ORF23 3'UTR	патент США № 5428147
5671-6187	Промотор CsVMV	Verdaguer et al. (1996), Plant Mol. Biol., 31:1129-1139
6197-9667	Cry1Ac	Див. вище
9701-10157	ORF23 3'UTR	патент США № 5428147
10272-10788	Промотор CsVMV	Verdaguer et al. (1996), Plant Mol. Biol., 31:1129-1139
10796-11347	PAT	Wohlleben et al. (1988), Gene 70:25-37
11450-12153	ORF1 3'UTR	Huang et al. (1990), J. Bacteriol. 172:1814-1822

20 *Agrobacterium*-опосередковувану трансформацію здійснювали модифікованим методом, описаним Zeng et al. (2004). Коротко, насіння сої (сорті Maverick) пророщували на базальному середовищі, а потім виділяли потовщення сім'ядолі, і ці потовщення інфікували агробактерією. У середовища для стимуляції утворення, подовження і укорінення паростків додавали цефотаксим, тиментин і ванкомицин з метою видалення агробактерій. Для інгібування росту нетрансформованих паростків проводили відбір з використанням глюфозинату. Відібрані паростки переносили в середовище для укорінення з метою ініціації утворення коріння, а потім переносили в ґрунтову суміш для акліматизації паростків.

25 Верхівкові листя відібраних паростків забарвлювали глюфозинатом для скринінгу на передбачувані трансформанти. Скриновані паростки переносили в теплицю, залишали для акліматизації, а потім листя забарвлювали глюфозинатом для повторного підтвердження стійкості до гербіцидів і детектування присутності передбачуваних трансформантів. Після цього брали зразки скринованих рослин і проводили їх молекулярний аналіз для підтвердження присутності селективного маркерного гена і/або гена, що представляє інтерес. Рослини T<sub>0</sub> залишали в теплиці для самозапилення і одержували насіння T<sub>1</sub>.

35 Цей трансформант, тобто трансформант сої рDAB9582.816.15.1, одержували з незалежно трансформованого ізоляту. Рослини T<sub>1</sub> піддавали поворотному схрещуванню і інтрогресії даного трансформанта в елітні сорти подальших поколінь. Даний трансформант відбирали, виходячи з його унікальних властивостей, таких як єдиний інсерційний сайт, нормальна менделєвська сегрегація, стабільна експресія і чудова комбінація властивостей, включаючи резистентність до комах, стійкість до гербіцидів і агрономічні показники. У нижченаведених прикладах представлені дані, які були використані для характеристики трансформанта сої рDAB9582.816.15.1.

Приклад 2. Характеризація експресії білка в трансформанті сої рDAB9582.816.15.1

45 Були охарактеризовані біохімічні властивості рекомбінантних білків Cry1F, Cry1Ac і PAT в трансформанті сої рDAB9582.816.15.1. Кількісний твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA) являє собою відомий біохімічний аналіз, який може бути здійснений з метою

характеризації біохімічних властивостей білків і підтвердження експресії цих білків в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1.

Приклад 2.1. Експресія білка PAT, Cry1F і Cry1Ac в тканинах рослини

Зразки тканини сої виділяли з тестованих рослин і готували для аналізу на експресію. Білок PAT екстрагували з тканин рослин сої з використанням забуференого фосфатом фізіологічного розчину, який містить детергент твін-20 (PBST), що включає 0,5% альбумін бичачої сироватки (BSA). Тканину рослини центрифугували, потім водний супернатант збирали, розводили відповідним буфером, якщо це необхідно, і аналізували з використанням набору для "сендвіч"-ELISA PAT. Цей набір використовували відповідно до протоколу, рекомендованого виробниками (Envirologix, Portland, ME). За допомогою цього аналізу вимірювали концентрації експресованого білка PAT.

Білок Cry1F екстрагували з тканин рослин сої з використанням забуференого фосфатом фізіологічного розчину, що містить детергент твін-20 (PBST). Тканину рослини центрифугували, потім водний супернатант збирали, розводили відповідним буфером, якщо це необхідно, і аналізували з використанням набору для "сендвіч"-ELISA Cry1F. Цей набір використовували відповідно до протоколу, рекомендованого виробниками (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE). За допомогою цього аналізу вимірювали концентрації експресованого білка Cry1F.

Білок Cry1Ac екстрагували з тканин рослин сої з використанням забуференого фосфатом фізіологічного розчину, який містить детергент твін-20 (PBST), що включає 0,5% альбумін бичачої сироватки (BSA). Тканину рослини центрифугували, потім водний супернатант збирали, розводили відповідним буфером, якщо це необхідно, і аналізували з використанням набору для "сендвіч"-ELISA Cry1Ac. Цей набір використовували відповідно до протоколу, рекомендованого виробниками (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE). За допомогою цього аналізу вимірювали концентрації експресованого білка Cry1Ac.

Аналіз по детектуванню здійснювали для оцінки стабільності експресії, а також вертикального успадкування (між поколіннями) і горизонтального успадкування (між лініями всередині покоління) трансформанта pDAB9582.816.15.1 в рослинах сої.

Приклад 2.2. Експресія білків Cry1F, Cry1Ac і PAT в тканинах рослини

Рівні білків Cry1F, Cry1Ac і PAT визначали в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1 відповідно до протоколів, описаних вище. Розчинні білки, екстраговані з тканини листа сої, аналізували за допомогою кількісного твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA). Покоління трансформантів сої з генною модифікацією pDAB9582.816.15.1 від T<sub>2</sub> до T<sub>6</sub> мали стабільну експресію (не сегрегувалися), і така експресія спостерігалася у всіх лініях. У таблиці 2 представлений середній рівень експресії трансгенних білків в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1.

Таблиця 2

Середній рівень експресії різних трансгенних білків в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1

Рівень експресії різних білків (нг/см <sup>2</sup> )			
Трансформант	Cry1F	Cry1Ac	PAT
Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	89	18,6	9,9

Приклад 3. Клонування і характеристика послідовності ДНК у вставці і у фланкуючих граничних областях трансформанта сої pDAB9582.816.15.1

Для характеристики і опису геномного інсерційного сайту визначали послідовність граничних областей фланкуючої геномної Т-ДНК трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Була підтверджена геномна послідовність трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, що включає 1273 п.о. 5'-фланкуючої граничної послідовності (SEQ ID NO:1) і 1371 п.о. 3'-фланкуючої граничної послідовності (SEQ ID NO:2). ПЛР-ампліфікація граничних послідовностей трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 підтвердила, що граничні області походять від вихідної рослини сої, а області стику являють собою унікальні послідовності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Області стику можуть бути використані для трансген-специфічної ідентифікації трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Крім того, інсерційний сайт Т-ланцюга був охарактеризований шляхом ампліфікації геномного фрагмента, відповідного області ідентифікованих фланкуючих граничних послідовностей, що походять від геному нетрансформованої сої. Порівняння трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 з рослиною, що має нетрансформовану геномну послідовність, виявило делецію оригінального локусу приблизно в 21 п.о., утворену в процесі інтеграції Т-ланцюга.

Загалом, характеристика вставки і граничної послідовності трансформанта сої рDAB9582.816.15.1 показала, що в геномі сої присутня інтактна копія Т-ланцюга рDAB9582.

Таблиця 3

Список праймерів і їх послідовностей, використовуваних для підтвердження геномної ДНК трансформанта сої рDAB9582.816.15.1

SEQ ID NO:	Назва праймера	Розмір (п.о.)	Послідовність (5'→3')	Ціль
SEQ ID NO:4	81615_FW2	30	TTACACCCTTAGGATCGAGACACTTAGAGC	Підтвердження 5'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з AtUbi10RV1 або RV2, і разом з 5'IREnd-01 або 5'IREnd-02
SEQ ID NO:5	81516_RV1	27	GATTCATGTCCTTCCTAATGCGAATTG	Підтвердження 3'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 3'PATEnd05 або 3'PATEnd06
SEQ ID NO:6	81516_RV2	25	AATTTACATTTACCCCACTTGCGA	Підтвердження 3'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 3'PATEnd05 або 3'PATEnd06
SEQ ID NO:7	81516_RV3	28	GGAGGTGCAGTGAGGAAGGTAATAATGA	Підтвердження 3'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 3'PATEnd05 або 3'PATEnd06DNA
SEQ ID NO:8	5'IREnd-01	29	CGAGCTTTCTAATTTCAAACCTATTCGGGC	Підтвердження 5'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 81615_FW2
SEQ ID NO:9	5'IREnd-02	30	TCCTAGATCATCAGTTCATACAAACCTCCA	Підтвердження 5'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 81615_FW2
SEQ ID NO:10	AtUbi10RV1	29	CGGTCCTAGATCATCAGTTCATACAAACC	Підтвердження 5'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 81615_FW2
SEQ ID NO:11	AtUbi10RV2	28	CACTCGTGTTCAAGTCCAATGACCAATAA	Підтвердження 5'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 81615_FW1, FW2 або FW3
SEQ ID NO:12	3'PATEnd05	20	GCTCCTCCAAGGCCAGTTAG	Підтвердження 3'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 81615_RV1, RV2 або RV3
SEQ ID NO:13	3'PATEnd06	20	CCAGTTAGGCCAGTTACCCA	Підтвердження 3'-граничної геномної ДНК, використовуваної разом з 81615_RV1, RV2 або RV3

Таблиця 4

Умови проведення стандартної ПЛР-ампліфікації граничних областей і трансген-специфічних послідовностей в трансформанті сої рDAB9582.816.15.1

Послідовність-мішень	Набір праймерів	ПЛР-суміш	Попередня денатурація (°C/хв.)	Денатурація (°C/сек.)	Подовження (°C/хв.:сек.)	Кінцеве подовження (°C/хв.)
5'-гранична область	81615_FW2/AtUbi10RV1	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
5'-гранична область	81615_FW2/5'IREnd-01	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
5'-гранична область	81615_FW3/5'IREnd-01	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
3'-гранична область	3'PATEnd05/81615_RV1	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
3'-гранична область	3'PATEnd05/81615_RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
3'-гранична область	3'PATEnd06/81615_RV1	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
3'-гранична область	3'PATEnd06/81615_RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
По всьому локусу вставки	81615_FW2/81615_RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		

Таблиця 5

ПЛР-суміш для стандартної ПЛР-ампліфікації граничних областей і трансген-специфічних послідовностей в трансформанті сої рDAB9582.816.15.1

ПЛР-суміш А		ПЛР-суміш В	
Реагент	1×реакційна суміш (мкл)	Реагент	1×реакційна суміш (мкл)
H <sub>2</sub> O	0,8	H <sub>2</sub> O	14,6
AccPrime pfx SuperMix	20	10×буфер LA Taq	2
--	--	MgCl <sub>2</sub> (25 мМ)	0,6
--	--	dNTP (2,5 мкМ)	1,6
Праймер, 10 мкМ	0,2	Праймер, 10 мкМ	0,1
Гідроліз гДНК	1	Гідроліз гДНК	1
--	--	LA Taq (5 од./мкл)	0,1
Об'єм дози, що вводиться	22	Об'єм дози, що вводиться	20
ПЛР-суміш С		ПЛР-суміш D	
Реагент	1×реакційна суміш (мкл)	Реагент	1×реакційна суміш (мкл)
H <sub>2</sub> O	28	H <sub>2</sub> O	11,6
10×ПЛР-буфер II (Mg <sup>+</sup> )	5	10×ПЛР-буфер II (Mg <sup>+</sup> )	2
MgCl <sub>2</sub> [25 мМ]	1,5	MgCl <sub>2</sub> [25 мМ]	0,6
dNTP [25 мМ]	8	dNTP [25 мМ]	3,2
ПЛР-праймер адаптора (10 мкМ)	1	Праймер 1 (10 мкМ)	0,4
Гніздовий праймер GOI (10 мкМ)	1	Праймер 2 (10 мкМ)	0,4
Сфери, зв'язані з ДНК	5	ДНК-матриця	0,2
LA Taq (5 од./мкл)	0,5	LA Taq (5 од./мкл)	1,6
Об'єм дози, що вводиться	50	Об'єм дози, що вводиться	20



## Приклад 3.1. Підтвердження геномних послідовностей сої

Вирівнювання 5'- і 3'-фланкуючих граничних областей з повнорозмірною геномною "шотган"-послідовністю хромосоми 03 *Glycine max* показало, що трансген трансформанта сої rDAB9582.816.15.1 був вбудований в хромосому 03 геному сої. Для підтвердження інсерційного сайту в геномі трансформанта сої rDAB9582.816.15.1 здійснювали ПЛР з використанням різних пар праймерів (фігура 2, таблиця 3, таблиця 4 і таблиця 5). Геномну ДНК трансформанта сої rDAB9582.816.15.1 і інші трансгенні або нетрансгенні лінії сої використовували як матрицю. Для підтвердження того, що 5'-граничні послідовності є скоректованими, був вибраний праймер, сконструйований так, щоб він зв'язувався з елементом промотору гена *AtUbi10*, наприклад *AtUbi10RV1*, і праймер, сконструйований так, щоб він зв'язувався з клонованою 5'-кінцевою граничною послідовністю на хромосомі 03 геному сої, де вказаний праймер був позначений 81615\_FW2, і ці праймери були використані в цілях ампліфікації ДНК-сегмента, який охоплює елемент промотору гена *AtUbi10* до 5'-кінцевої граничної послідовності. Аналогічним чином, для підтвердження клонованої 3'-кінцевої граничної послідовності, rat-специфічний праймер, наприклад 3'PATEnd05, і праймери, сконструйовані для клонованої 3'-кінцевої граничної послідовності і позначені 81615\_RV1 і 81615\_RV2, були використані з метою ампліфікації ДНК-сегментів, які охоплюють ген *rat* до 3'-кінцевої граничної послідовності. ДНК-фрагменти передбаченого розміру були ампліфіковані тільки з геномної ДНК трансформанта сої rDAB9582.816.15.1. з використанням кожної пари праймерів, але не із зразків ДНК, що походять від інших трансгенних ліній сої або нетрансгенного контролю. Одержані результати показали, що клоновані 5'- і 3'-граничні послідовності являють собою фланкуючі граничні послідовності вставки Т-ланцюга для трансформанта сої rDAB9582.816.15.1.

Для додаткового підтвердження присутності в геномі сої ДНК-вставки, геномну ДНК, що не містить вставки Т-ланцюга в трансформанті сої rDAB9582.816.15.1, піддавали ПЛР-ампліфікації по всіх граничних послідовностях рослини сої. Праймер 81615\_FW2, сконструйований для 5'-кінцевої граничної послідовності, і один праймер 81615\_RV3, сконструйований для 3'-кінцевої граничної послідовності, використовували з метою ампліфікації ДНК-сегментів, що містять локус, в який був інтегрований Т-ланцюг rDAB9582. Як і очікувалося, ПЛР-реакції, що проводяться з використанням пари праймерів 81615\_FW2 і 81615\_RV3, дозволяли одержати приблизно 1,8 т.п.о. ДНК-фрагмента, що походить від всіх контрольних ліній сої, але не з rDAB9582.816.15.1. Вирівнювання ідентифікованих 5'- і 3'-граничних послідовностей трансформанта сої rDAB9582.816.15.1 з повнорозмірною геномною "шотган"-послідовністю хромосоми 03 *Glycine max* показало, що в локусі вихідного геному була присутня делеція приблизно в 21 п.о. (фігура 3). Одержані результати показали, що трансген трансформанта сої rDAB9582.816.15.1 був вбудований в сайт хромосоми 03 геному сої.

Приклад 4. Характеризація трансформанта сої rDAB9582.816.15.1 за допомогою саузерн-блот-аналізу

Саузерн-блот-аналіз проводили з метою визначення профілю інтеграції в трансформанті сої rDAB9582.816.15.1. В результаті цих експериментів були одержані дані, які продемонстрували інтеграцію і цілісність трансгенів *cru1Ac* і *cru1F* в геномі сої. Трансформант сої rDAB9582.816.15.1 був охарактеризований як повнорозмірний трансформант, який утворений за допомогою простої інтеграції і містить одну копію PTU *cru1Ac* і *cru1F*, що походить від плазмиди rDAB9582.

Дані саузерн-блот-аналізу дозволяють передбачити, що фрагмент Т-ланцюга був вбудований в геном трансформанта сої rDAB9582.816.15.1. Більш ретельний саузерн-блот-аналіз був проведений з використанням зондів, специфічних до генів *cru1Ac* і *cru1F*, що містяться в області інтеграції Т-ланцюга rDAB9582.816.15.1, і з використанням описаних тут рестрикуючих ферментів, які мають сайти розщеплення, локалізовані в плазміді, і продукують фрагменти, що гібридизуються, які знаходяться всередині плазмиди, або фрагменти, які охоплюють область стику плазмиди і геномної ДНК сої (граничні фрагменти). Молекулярна маса, одержана виходячи з саузерн-гібридизації для комбінації рестрикуючого ферменту і зонда, була унікальною для даного трансформанта, що забезпечувало його точну ідентифікацію. Ці аналізи також показали, що даний плазмідний фрагмент був вбудований в геномну ДНК сої без реаранжування PTU *cru1Ac* і *cru1F*.

## Приклад 4.1. Збирання зразків листя сої і виділення геномної ДНК (гДНК)

Геномну ДНК екстрагували з тканини листя, зібраного від окремих рослин сої, що містять трансформант сої rDAB9582.816.15.1. Крім того, гДНК виділяли із звичайних рослин сої сорту *Maverick*, що мають генетичний фон, який є репрезентативним для лінії даної рослини, де відсутні гени *cru1Ac* і *cru1F*. Окрему геномну ДНК екстрагували з ліофілізованої тканини листя

згідно зі стандартним методом СТАВ. Після екстракції, ДНК кількісно оцінювали на спектрофлуориметрі з використанням реагенту PICO GREEN (Invitrogen, Carlsbad, CA).

#### Приклад 4.2. Гідроліз і розділення ДНК

Для молекулярної характеристики трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 за допомогою саузерн-блот-аналізу, десять мікрограмів (10 мкг) геномної ДНК піддавали гідролізу. Геномну ДНК, що походить від трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і від нетрансгенної лінії сої сорту Maverick, гідролізували шляхом додавання приблизно п'яти одиниць вибраного рестриктуючого ферменту на мкг ДНК і відповідного реакційного буфера до кожного зразка ДНК. Кожний зразок інкубували приблизно при 37°C протягом ночі. Рестриктуючі ферменти Asel, HindIII, NsiI і NdeI використовували окремо для кожного гідролізату (New England Biolabs, Ipswich, MA). Рестриктуючі ферменти NotI і ApaI використовували разом для подвійного гідролізу (New England Biolabs, Ipswich, MA). Крім того, позитивний по гібридизації контрольний зразок одержували шляхом об'єднання плазмідної ДНК, pDAB9582, з геномною ДНК нетрансгенної сої сорту Maverick. "Коктейль" з плазмідної ДНК/геномної ДНК гідролізували із застосуванням тих же самих методів і з використанням того ж самого рестриктуючого ферменту, які були вибрані для тест-зразків.

Після інкубування гідролізатів протягом ночі додавали 25 мкл розчину Quick-Precip Plus (EdgeBiosystems, Gaithersburg, MD), і гідролізовані зразки ДНК осаджували ізопропанолом. Осаджену ДНК ресуспендували в 15 мкл 1× буфера для завантаження (0,01% бромфенолового синього, 10,0 mM EDTA, 10,0% гліцерину, 1,0 mM Tris, pH 7,5). Зразки ДНК і маркери молекулярної маси піддавали електрофорезу в 0,85% агарозних гелях з 0,4× буфера TAE (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) при 35 вольтах приблизно протягом 18-22 годин для розділення фрагментів. Гелі забарвлювали етидйбромідом (Invitrogen, Carlsbad, CA), і ДНК візуалізували шляхом опромінення ультрафіолетом (УФ).

#### Приклад 4.3. Перенесення за допомогою саузерн-блот-аналізу і обробка мембрани

Саузерн-блот-аналіз проводили, в основному, як описано в публікації Memelink, et al. (1994). Коротко, після електрофоретичного розділення і візуалізації ДНК-фрагментів, гелі піддавали депуринізації шляхом додавання 0,25M HCl приблизно протягом 20 хвилин, а потім обробляли денатуруючим розчином (0,4M NaOH, 1,5M NaCl) приблизно протягом 30 хвилин і нейтралізуючим розчином (1,5M NaCl, 0,5M Tris, pH 7,5) протягом щонайменше 30 хвилин. Перенесення за допомогою саузерн-блот-аналізу проводили протягом ночі на найлонових мембранах з використанням капілярної системи, що містить 10×SSC. Після перенесення, ДНК зв'язували з мембраною з використанням реагентів для перехресного зшивання при УФ-випромінюванні, а потім мембрану швидко промивали 2×SSC-розчином. З застосуванням такого способу одержували саузерн-блот-мембрани, готові для гібридизації.

#### Приклад 4.4. Мічення ДНК-зонда і гібридизації

ДНК-фрагменти, зв'язані з найлоновою мембраною, детектували з використанням міченого зонда (таблиця 6). Зонди одержували шляхом ПЛР-включення нуклеотиду, міченого дигоксигеніном (DIG), [DIG-11]-dUTP, в ДНК-фрагмент, ампліфікований з плазміди pDAB9582 з використанням праймерів, специфічних до генних елементів. Генерування ДНК-зондів шляхом ПЛР-синтезу здійснювали з використанням набору для синтезу ПЛР-зонда, міченого DIG (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), відповідно до процедур, рекомендованих виробниками.

Мічені зонди аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі для визначення їх якості і кількості. Потім потрібну кількість міченого зонда використовували для гібридизації з ДНК-мішенню на найлонових мембранах з метою детектування специфічних фрагментів методами, в основному, описаними для одержання розчину DIG EASY HYB (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Коротко, блоти на найлоновій мембрані, що містять іммобілізовану ДНК, швидко промивали 2×SSC і попередньо гібридизували з 20-25 мл попередньо нагрітого розчину DIG EASY HYB в посудинах для гібридизації приблизно при 45-55°C протягом приблизно 2 годин в печі для гібридизації. Потім розчин для попередньої гібридизації декантували і замінювали на ~15 мл попередньо нагрітого розчину DIG EASY HYB, що містить потрібну кількість специфічних зондів, денатурованих шляхом нагрівання в термокомірці протягом приблизно п'яти хвилин. Потім проводили стадію гібридизації приблизно при 45-55°C протягом ночі в печі для гібридизації.

Після закінчення гібридизації зонда розчини DIG EASY HYB, що містять зонди, декантували в очищені пробірки і зберігали приблизно при -20°C. Ці зонди можуть бути повторно використані два рази у відповідній процедурі, рекомендованій виробниками. Блоти на мембранах швидко обполіскували і два рази промивали в очищених пластикових контейнерах промивальним буфером в умовах низької жорсткості (2×SSC, 0,1% ДСН) приблизно протягом п'яти хвилин при кімнатній температурі, а потім два рази промивали промивальним буфером в умовах високої

жорсткості (0,1×SSC, 0,1% ДСН), кожного разу протягом 15 хвилин приблизно при 65°C. Блоти на мембранах швидко промивали 1× малеїновокислотним буфером, взятим з набору промивальних і блокувальних буферів DIG (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), приблизно протягом 5 хвилин. Потім проводили блокування в 1× блокувальному буфері протягом 2 годин і інкубування з антитілом проти DIG-AP (лужної фосфатази) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) в 1× блокувальному буфері протягом мінімум 30 хвилин. Після 2-3 промивань 1× промивальним буфером, специфічні ДНК-зонди залишалися зв'язаними з блотами на мембрані, і DIG-мічені ДНК-стандарті візуалізували з використанням хемілюмінесцентної системи детектування нуклеїнових кислот (CDP-STAR) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) відповідно до рекомендацій виробників. Блоти експонували з хемілюмінесцентною плівкою один або декілька разів для детектування фрагментів, що гібридизуються, і для візуалізації стандартів молекулярної маси. Плівки проявляли в проявнику плівок ALL-PRO 100 PLUS (Konica Minolta, Osaka, Japan), і зображення сканували. Число і розмір детектованих смуг були задокументовані для кожного зонда. DIG-мічений маркер молекулярної маси ДНК II (DIG MWM II) і DIG-мічений маркер молекулярної маси ДНК VII (DIG MWM VII) візуально спостерігалися після детектування DIG, як описано в даній заявці, а тому вони були використані для визначення розміру фрагмента, що гібридизується, на саузерн-блотах.

Таблиця 6

Локалізація і довжина зондів, використовуваних в саузерн-блот-аналізі

Назва зонда	Генетичний елемент	Довжина (п.о.)
Cry1Ac	Cry1Ac	1720
Cry1F	Cry1F	1746
specR	Ген резистентності до спектиноміцину	750
OriRep	Ori Rep	852
trfA	Блок ініціації реплікації trfA	1119

#### Приклад 4.5. Результати саузерн-блот-аналізу

Розміри передбачуваних і спостережуваних фрагментів, а також конкретні гідролізати і зонд, де вказані гідролізати і зонд були одержані на основі відомих рестрикційних сайтів ферментів для PTU cry1Ac і cry1F, представлені в таблиці 7. Виходячи з цих гідролігатів і гібридизації були ідентифіковані два типи фрагментів: внутрішні фрагменти, в яких відомі сайти ферментів фланкують область зонда і повністю входять до складу інсерційної області PTU cry1Ac і cry1F; і граничні фрагменти, в яких один відомий сайт ферменту локалізований на одному кінці області зонда, а інший сайт, як і очікувалося, локалізований в геномі сої. Розміри граничних фрагментів варіюються залежно від типу трансформанта, оскільки, в більшості випадків, сайти інтеграції ДНК-фрагментів є унікальними для кожного трансформанта. Граничні фрагменти являють собою засіб для визначення локалізації рестрикційних сайтів ферментів відносно інтегрованої ДНК і для оцінки числа ДНК-вставок. Саузерн-блот-аналізи, які проводяться на багатьох поколіннях сої, що містять трансформант pDAB9582.816.15.1, давали результати, які дозволяють передбачити, що низькокопійні інтактні PTU cry1Ac і cry1F, що походять від плазмиди pDAB9582, були вбудовані в геном трансформанта сої pDAB9582.816.15.1.

Таблиця 7

Передбачувані і спостережувані фрагменти, що гібридизуються, в саузерн-блот-аналізі

ДНК-зонд	Рестрикуючі ферменти	Зразки	Передбачувані розміри фрагмента (п.о.) <sup>1</sup>	Спостережуваний розмір фрагмента (п.о.) <sup>2</sup>
Cry1Ac	AseI	pDAB9582	13476	>14000
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	>7286	~8500
	NsiI	pDAB9582	15326	>15000
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	>9479	>10000
	NotI+ApaI	pDAB9582	4550	~4500
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	4550	~4500
Cry1F	NdeI	pDAB9582	8071	~8000
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	>5569	~7500
	NsiI	pDAB9582	11044	11000
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	>9479	>10000
	HindIII	pDAB9582	7732	~7700
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	7732	~7700
SpecR	NsiI	pDAB9582	15320	~15000
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	немає	немає
trfA	NsiI	pDAB9582	15320	~15000
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	немає	немає
oriREP	NdeI	pDAB9582	5239	~5000
		Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	немає	немає

1. Розміри передбачуваних фрагментів одержані на основі карти плазміди pDAB9582.

2. Розміри спостережуваних фрагментів були обчислені приблизно по даних, одержаних в цих аналізах, і по вказаних розмірах фрагментів маркера II і маркера VII молекулярної маси DIG-міченої ДНК.

Рестрикуючі ферменти AseI і NsiI зв'язуються з унікальними рестрикційними сайтами в плазміді pDAB9582 і розщеплюють їх. Потім, ці ферменти відбирали для характеристики вставки гена cry1Ac в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1. Було передбачено, що граничні фрагменти розміром >7286 п.о. або >9479 п.о. гібридизуються із зондом після гідролізу ферментами AseI і NsiI, відповідно (таблиця 7). Одиночні смуги гібридизації cry1Ac розміром приблизно 8500 п.о. і >10000 п.о. спостерігалися у випадку використання ферментів AseI і NsiI, відповідно. Гібридизація зонда зі смугами такого розміру, передбачувано, вказує на присутність одного сайту інсерції гена cry1Ac в геномі трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Рестрикуючі

ферменти NotI і ApaI були вибрані для подвійного гідролізу і виділення фрагмента, що містить транскрипційну одиницю *сгу1Ac* рослини (PTU; промотор/ген/термінатор) (таблиця 7). Передбачені 4550 п.о.-фрагменти спостерігалися у випадку використання зонда після подвійного гідролізу ферментами NotI і ApaI. Результати, одержані при ферментативному гідролізі зразків pDAB9582.816.15.1 з подальшою гібридизацією зонда, показали, що інтактна PTU *сгу1Ac*, що походить від плазмиди pDAB9582, була вбудована в геном трансформанта сої pDAB9582.816.15.1.

Рестрикуючі ферменти NdeI і NsiI зв'язуються з рестрикційними сайтами в плазміді pDAB9582 і розщеплюють їх. Потім, ці ферменти відбирали для характеристики вставки гена *сгу1F* в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1. Було передбачено, що граничні фрагменти розміром >5569 п.о. і >9479 п.о. гібридизуються із зондом після гідролізу ферментами NdeI і NsiI, відповідно (таблиця 7). Одиночні смуги гібридизації *сгу1F* розміром ~7500 п.о. і >10000 п.о. спостерігалися у випадку використання ферментів NdeI і NsiI, відповідно. Гібридизація зонда зі смугами такого розміру, передбачувано, вказує на присутність одного сайту інсерції гена *сгу1F* в геномі трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Рестрикуючий фермент HindIII був вибраний для виділення фрагмента, що містить транскрипційну одиницю *сгу1F* рослини (PTU; промотор/ген/термінатор) (таблиця 7). Передбачений 7732 п.о.-фрагмент спостерігався у випадку використання зонда після гідролізу ферментом HindIII. Результати, одержані при ферментативному гідролізі зразків pDAB9582.816.15.1 з подальшою гібридизацією зонда, показали, що інтактна PTU *сгу1F*, що походить від плазмиди pDAB9582, була вбудована в геном трансформанта сої pDAB9582.816.15.1.

#### Приклад 4.6. Відсутність послідовностей кістяка

Саузерн-блот-аналіз також проводили з метою підтвердження відсутності гена резистентності до спектиноміцину (*specK*), елемента OriRep і білка ініціації реплікації *trfA* (елемента *trfA*) в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1. Як і очікувалося, в зразках трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, якої-небудь специфічної гібридизації з геном резистентності до спектиноміцину, з елементом Ori Rep або з елементом *trfA* не спостерігалось в тому випадку, якщо в саузерн-блот-аналіз були включені відповідні позитивний контроль (з pDAB9582, доданою до геномної ДНК Maverick) і негативний контроль (геномна ДНК Maverick). Після гідролізу ферментом NsiI і гібридизації з *specR*-специфічним зондом, в зразку позитивного контролю (з pDAB9582, доданою до геномної ДНК Maverick) спостерігалася одна очікувана смуга розміром 15320 п.о. *SpecR*-зонд не гібридизувався із зразками негативного контролю і з трансформантом сої pDAB9582.816.15.1. Аналогічним чином, в зразку позитивного контролю (з pDAB9582 плюс Maverick) детектувалася одна очікувана смуга розміром 15320 п.о., але ця смуга була відсутня в зразках негативного контролю і в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1 після NsiI-гідролізу і гібридизації з *trfA*-зондом. Інша очікувана смуга розміром 5329 п.о. детектувалася в зразку позитивного контролю (з pDAB9582, доданою до геномної ДНК Maverick), але була відсутня в зразках негативного контролю і в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1 після NdeI-гідролізу і гібридизації з OriRep-специфічним зондом. Ці дані вказують на відсутність гена резистентності до спектиноміцину, елемента OriRep і білка ініціації реплікації *trfA* в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1.

Приклад 5. Випробування для оцінки агрономічних показників і випробування в польових умовах на врожайність і стійкість до гербіцидів

Було проведено декілька агрономічних випробувань для порівняння агрономічних показників трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і нульової ізоляції - Maverick. Більшість випробувань в польових умовах проводили в різних географічних регіонах в Сполучених Штатах, де культивували сорт сої, що містить трансген pDAB9582.816.15.1. Були проведені додаткові випробування в польових умовах за межами цих регіонів, і відібрані сорти сої, що містять трансформант pDAB9582.816.15.1, поміщали в потенційно стресові умови, які спостерігаються при вирощуванні культур в регіонах, менш сприятливих для вирощування сої. Через зміну навколишнього середовища при проведенні невеликого числа випробувань в польових умовах, на деяких ділянках випробування були перервані.

Експеримент проводили по схемі повних рандомізованих блоків з двома повторностями для кожного розташування ділянки. Було використано вісім ділянок, що включають трансформант сої pDAB9582.816.15.1. Кожна ділянка складалася з двох рядів довжиною 12,5 фути, а усього було засіяно 30 дюймів. Протягом всього сезону, польові ділянки обробляли відповідно до звичайної агрономічної практики і із знищенням бур'янів.

Насіння для випробувань одержували в зимовому розсаднику в Пуерто-Ріко. Насіння трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і Maverick вирощували в тому ж самому розсаднику і обробляли аналогічним чином для мінімізації якої-небудь відмінності в джерелі походження

насіння. Потім насіння повертали в Північну Америку, де його упаковували і розподіляли по різних регіонах для посіву. Протягом всього сезону оцінювали різні агрономічні властивості. Властивості і стадії росту, якщо для них були одержані дані, вказані в таблиці 8.

Таблиця 8

Список агрономічних показників, визначених у випробуваннях в польових умовах, що проводяться для порівняння трансформантів сої pDAB9582.816.15.1 з рослинами Maverick

Оцінені властивості	Стадія росту під час оцінки
1. Поява появи сходів: величина густини стояння рослин, ділена на число насіння, висадженого на ділянку в один метр, і помножена на 100	Обчислено, виходячи з густини стояння рослин на ранній стадії
2. Потужність проростання: потужність проростання становить 0%, якщо на ділянці всі рослини гинули, і 100%, якщо на ділянці всі рослини мали нормальний вигляд	V1-V3
3. Дні до цвітіння: дні після посіву і до початку цвітіння 50% рослин на ділянці	R1
4. Величина густини стояння рослин на фазі росту R2: число рослин на репрезентативній 1-метровій ділянці ряду на фазі росту R2	R2
5. Випадки розвитку хвороби: тяжкість хвороби на ділянці з бальною оцінкою 0-100%	R6
6. Ураження комахами: процент тканини рослини на ділянці, ураженій комахами	R6
7. Висота рослини: середня висота рослин в сантиметрах на кожному ділянці, виміряна від поверхні ґрунту до верхівки після обпадання листя	R8
8. Вилягання рослин: процент вилягання на час збирання урожаю, де 0% = без вилягання, а 100% = всі рослини на ділянці вилягали на землю	R8
9. Дні до дозрівання: дні від посіву і до появи на ділянці 95% рослин, у яких стручки були сухими на вигляд	R8
10. Обпадання плодів: процент стручків, обпалих на землю	R8
11. Врожайність: бушелі на акр плодів з вологістю, доведеною до 13%	R8
12. Маса 100 насінин: для кожної ділянки оцінювали 100 насінин і реєстрували їх масу в грамах	R8

5

Після закінчення вегетаційного періоду, дані, одержані зі всіх ділянок, об'єднували і проводили аналіз по всіх ділянках. Аналіз даних проводили з використанням JMP® Pro 9.0.3 (SAS, Cary, NC). Для аналізу використовували змішану модель, де елемент (ділянка) розглядався як фіксований ефект, а розташування, тобто розташування блока, і повторність розглядалися як випадкові ефекти. Виходячи з цього аналізу, обчислювали величини для різних показників культур із застосуванням методу найменших квадратів, як показано в таблиці 9. У випадку змінних, для яких вимірювали значущий ефект елемента, здійснювали розділення середніх із застосуванням t-критерію Стьюдента з метою проведення порівняння між рослинами Maverick і трансформантами сої pDAB9582.816.15.1. Величина імовірності для визначення значущості складала  $p=0,05$ .

10

15

Таблиця 9

Величини, визначені із застосуванням методу найменших квадратів за результатами аналізу для всіх ділянок з метою порівняння трансформантів сої pDAB9582.816.15.1 і рослин Maverick. Для кожної ознаки, величини, за якими не стоїть та ж сама буква, значущо відрізняються по t-критерію Стюдента ( $p=0,05$ )

Агрономічний показник або ознака	Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	Maverick
Поява сходів (%)	84(A)	89(A)
Потужність проростання (V1-V3)	85(A)	90(A)
Дні до цвітіння (дні після посіву)	44,9(A)	43,0(B)
Величина густини стояння рослин на стадії росту R2 (рослини/м)	24(A)	25(A)
Випадки розвитку хвороби на стадії росту R6 (%)	2(A)	2(A)
Ураження комахами на стадії росту R6 (%)	6(A)	7(A)
Висота рослини (см)	110(A)	114(A)
Дозрівання (дні після посіву)	123(A)	122(У)
Вилягання рослин (%)	24(A)	21(A)
Обпадання плодів (%)	0(A)	0(A)
Врожайність (бушелі/акр)	47,6(A)	50,5(A)
Маса 100 насінин (г)	12,3(B)	13,2(A)

Всі оцінені ознаки, за винятком таких параметрів, як дні до цвітіння, дозрівання і маса 100 насінин, були однаковими для трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і для рослини сорту Maverick. Трансформант сої pDAB.816.15.1 зацвітав приблизно на 2 дні пізніше, ніж рослина сорту Maverick. Така відмінність в 2 дні не є дуже суттєвою для фермерів і не впливає на продуктивність даної культури. Ділянки розглядалися як квітучі, якщо приблизно 50% рослин на ділянці мало квітки, що розпустилися. Трансформант сої pDAB9582.816.15.1 також дозрівав на один день пізніше, ніж рослина сорту Maverick в кінці сезону, але, з агрономічної точки зору, таке уповільнення дозрівання не дає значущого ефекту, який міг би впливати на продуктивність даної культури. Аналогічним чином, маса 100 насінин трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 статистично відрізнялася від маси 100 насінин рослини сорту Maverick, але така відмінність не приводила до значного зниження врожайності. Одержані результати показали, що трансформант сої pDAB9582.816.15.1 може розвиватися не так, як рослина сорту Maverick, з точки зору деяких агрономічних показників, однак, такі відмінності є мінімальними і не виходять за межі звичайних показників соєвих культур при їх обробці на стандартних фермах.

Для проведення тесту на стійкість трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 до гербіциду, цей трансформант висівали на дослідні поля штату Санта-Ісабель, Пуерто-Ріко. Рослину сорту Maverick, яка була вперше трансформована для продукування трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, висівали в кожний розсадник і використовували в експериментах як контроль. Насіння для Т<sub>3</sub>-розсадника одержували після відбору насіння рослини покоління Т<sub>2</sub> з однієї клітини, а насіння для Т<sub>4</sub>-розсадника одержували після відбору насіння покоління Т<sub>3</sub> з однієї клітини. Чотири лінії трансформанта тестували для кожного покоління. Кожну лінію висівали на ділянку шириною в 4 ряди і довжиною 7,5 фута. Відстань між рядами становила 30 дюймів. Рослини на ділянках вирощували при освітленні приблизно протягом 2,5 тижнів для компенсації короткого світлового дня в Пуерто-Ріко. Кожний розсадник обприскували глюфозинатом в нормі 411 г е.к./га. Одну ділянку з контрольними рослинами Maverick обприскували глюфозинатом в тій же нормі, а іншу ділянку не обприскували і використовували як контроль для порівняння з трансформантом. Трансформант сої pDAB9582.816.15.1 виявляв стійкість до гербіциду глюфозинату. На протилежність цьому, жодна з рослин Maverick не була стійкою до обробки гербіцидами.

Приклад 6. Характеризація інсектицидної активності трансформанта pDAB9582.816.15.1

Випробування в польових умовах і в теплиці проводили для характеризації рівня захисту рослини, що забезпечується білками Cry1Ac і Cry1F в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1, від шкідників сої, включаючи лускокрилих комах (Lepidopteran), включаючи *Anticarsia gemmatilis* (листовійку квасолі), *Pseudoplusia includens* (соевого п'ядака), *Spodoptera frugiperda* (капустяну совку) і *Heliothis virescens* (тютюнову совку).

Випробування в теплиці проводили приблизно на 4-тижневих рослинах. П'ятнадцять рослин використовували для оцінки трансформантів сої pDAB9582.816.15.1 і контрольних рослин Maverick. Для випробування на ураження комахами кожного тестованого виду (новонародженими личинками *A. gemmatalis*, *P. includes* і *S. frugiperda*), з кожної рослини

5 вирізали три листових диски, і усього було використано 45 листових дисків на рослину і на вид комах. Вирізаний перфоратором 1,4-см лист, заражений однією новонародженою личинкою, поміщали на тест-площадка на поверхні 2% водного агару і закривали перфорованою

пластиковою кришкою.

Смертність комах і міру пошкодження листя оцінювали після зараження личинками.

10 Личинки, які не реагували на легкий дотик, вважалися загиблими. Смертність комах, які знаходилися на рослинному матеріалі, що містить трансформант сої pDAB9582.816.15.1, була значно вищою (смертність для *Spodopterafrugiperda* становила 86%, смертність для *Anticarsia gemmatalis* становила 100% і смертність для *Pseudoplusia includens* становила 100%), ніж смертність комах, присутніх на контрольних рослинах Maverick (таблиця 10). Пошкодження

15 листя визначали візуально шляхом оцінки процента поїдання листового диска комахами. Результати, одержані шляхом проведення експериментів в теплиці, показали, що на трансформанті сої pDAB9582.816.15.1 спостерігалось значно менше пошкодження листя і значно більша смертність комах, ніж на контрольних рослинах Maverick, заражених личинками *Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia includens* і *Spodoptera frugiperda*.

20 Оцінку ефективності рослин-трансформантів сої pDAB9582.816.15.1, вирощених в польових умовах, проводили шляхом збирання зразків листя з ділянок розсадника рослин зі зрілим насінням в Санта-Ісабель, Пуерто-Ріко, з подальшим відсиленням цього листя в Індіанополіс, ІН, для біоаналізу. Ділянка розсадника для рослин-трансформантів сої pDAB9582.816.15.1 покоління T<sub>3</sub> була засіяна приблизно 180 рослинами в чотири ряди. Кожний ряд мав довжину

25 2,3 м, а відстань між рядами становила 76,2 см, причому, в кожному ряду, відстань між окремими рослинами становила 5,1 см. Біоаналізи проводили на одному трійчастому листі, який повністю сформувався, головного стебла, що має приблизно чотири вузли, розташовані нижче меристеми. Тканину трійчастого листа вирізали у 10 окремих рослин сої, що несуть pDAB9582.816.15.1, і у 10 окремих рослин Maverick. Потім листя упаковували і віддавали в

30 лабораторію. У цій лабораторії, з кожного трійчастого листа перфоратором вирізали один або два диски діаметром 3,33 см, і усього було одержано 16 листових дисків. Кожний листовий диск поміщали на тест-площадка на поверхні 2% агару, заражали однією новонародженою личинкою *S. frugiperda* і закривали перфорованою пластиковою кришкою. Листові диски зберігали в камері з регульованими умовами навколишнього середовища протягом 7 днів, а потім оцінювали

35 кількість загиблих комах і міру пошкодження листя. Личинки, які не реагували на легкий дотик, вважалися загиблими. Пошкодження листя визначали візуально шляхом оцінки процента поїдання листового диска комахами.

Смертність комах і міру пошкодження листя оцінювали після зараження личинками.

40 Личинки, які не реагували на легкий дотик, вважалися загиблими. Смертність комах, які знаходилися на рослинному матеріалі, що містить трансформант сої pDAB9582.816.15.1, була значно вищою (смертність для *Spodopterafrugiperda* становила 68%), ніж смертність комах, присутніх на контрольних рослинах Maverick (смертність для *Spodopterafrugiperda* становила 0%) (таблиця 10). Пошкодження листя визначали візуально шляхом оцінки процента поїдання

45 листового диска комахами. Результати, одержані шляхом проведення біоаналізу листя, показали, що личинки *Spodoptera frugiperda*, що знаходяться на трансформанті сої pDAB9582.816.15.1, значно меншою мірою пошкоджували листя і мали більш низьку виживаність (що також визначається як більш висока смертність комах), ніж личинки *Spodoptera frugiperda*, що знаходяться на контрольних рослинах Maverick.

Ефективність трансформантів сої pDAB9582.816.15.1 оцінювали в першому випробуванні в

50 польових умовах (перше випробування в польових умовах описане в таблиці 10). Насіння сої покоління T<sub>4</sub>, що містить трансформант сої pDAB9582.816.15.1, і насіння нетрансформованої сої сорту Maverick висівали на довільно розташованих ділянках з 2 повторностями. Кожна ділянка-дублікат мала 2 ряди довжиною 2,3 м, а відстань між рядами становила 0,76 м. Було висаджено 40 насінин на ряд з відстанню між рослинами цього ряду 5,7 см. Відповідно до плану

55 випробувань, одну ділянку з двох ділянок-дублікатів обприскували гербіцидом глюфозинатом в нормі 411 г е.к./га, а іншу ділянку з двох дублікатів не обприскували, в результаті чого, тільки необприскані рослини Maverick залишалися живими і піддавалися біоаналізу.

Листя для біоаналізу збирали з рослин сої на стадії росту R2. За декілька днів до збирання листя для біоаналізу, з одного нижнього листового вузла (найбільш старого листа) на одних і

60 тих же рослинах вирізали перфоратором листові диски, і ці диски аналізували на експресію



білків Cry1Ac і Cry1F ELISA-методом, аналогічним методу, описаному в прикладі 2 (таблиця 12). Трійчасті листи, які повністю сформувалися, основного стебла, що не виявляють яких-небудь ознак ураження або знебарвлення і знаходяться в чотирьох вузлах нижче меристеми, відрізали і використовували для біоаналізу. Від кожної з 15 рослин відрізали один трійчастий лист як дублікат. Ці листи зберігали при 15°C і піддавали біоаналізу. Листочки кожного трійчастого листа відрізали, після чого з центра кожного листочка трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 вирізали один диск діаметром 3,33 см, а з кожного листочка рослини Maverick вирізали два диски діаметром 3,33 см. Ці листові диски поміщали в окремі марковані ямки 32-ямкових пластикових планшетів для біоаналізу, де кожна ямка містила тонкий шар агару. На кожний листовий диск саджали одну новонароджену личинку *P. includens*, новонароджену личинку *A. gemmatilis* або новонароджену личинку *S. frugiperda*. Планшети для біоаналізу закривали клейкими пластиковими листами, які були перфоровані для забезпечення вентиляції. Тканини листя трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 заражали 30 личинками кожного виду, і такими ж 30 личинками заражали тканини листя рослини Maverick. Пластикові планшети, що містять заражені листові диски, витримували при 25°C і при відносній вологості 40% (RH). Через 7 днів, личинки були ідентифіковані як загиблі личинки (тобто вони не рухалися при їх стимуляції гострим зондом), як личинки, які не розвивалися (вони мали менший розмір, ніж личинки, присутні на листі рослини Maverick), або як живі личинки (тобто вони мали нормальний розмір і були чутливі до подразника).

Смертність комах оцінювали після зараження личинками. Смертність комах, які знаходилися на рослинному матеріалі, що містить трансформант сої pDAB9582.816.15.1, була значно вищою (смертність для *Spodoptera frugiperda* становила 97%, смертність для *Anticarsia gemmatilis* становила 100% і смертність для *Pseudoplusia includens* становила 100%), ніж смертність комах, присутніх на контрольних рослинах Maverick (таблиця 10). Результати, одержані шляхом проведення біоаналізу листя, показали, що личинки *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis* і *Pseudoplusia includens*, що знаходяться на трансформанті сої pDAB9582.816.15.1, значно менше пошкоджували листя і мали більш низьку виживаність (що також визначається як більш висока смертність комах), ніж личинки *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis* і *Pseudoplusia includens*, що знаходяться на контрольних рослинах Maverick.

Ефективність трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 оцінювали у другому окремому випробуванні в польових умовах (друге випробування в польових умовах описане в таблиці 10). Насіння сої покоління T<sub>4</sub>, що містить трансформант сої pDAB9582.816.15.1, і насіння нетрансформованої сої сорту Maverick висівали на довільно розташованих ділянках з 4 повторностями. Кожна дубльована ділянка мала 4 ряди довжиною 6,1 м, а відстань між рядами становила 1,02 м. Було висаджено 160 насінин на ряд з відстанню між рослинами цього ряду 3,8 см. Між випробуваними ділянками і навколо них висаджували додаткові ряди рослин Maverick для приманювання природних популяцій комах-шкідників.

Листя для біоаналізу збирали з рослин сої на стадії росту R2. Листя для додаткового біоаналізу збирали з тих же рослин сої на стадії росту R5. За декілька днів до збирання листя для біоаналізу, з одного нижнього листового вузла на одних і тих же рослинах вирізали перфратором листові диски, і ці диски аналізували на експресію білків Cry1Ac і Cry1F ELISA-методом, аналогічним методу, описаному в прикладі 2 (таблиця 12). Трійчасті листи, що повністю сформувалися, основного стебла, які не виявляють яких-небудь ознак ураження або знебарвлення і знаходяться в чотирьох вузлах нижче меристеми, відрізали і використовували для біоаналізу. Від кожної з 15 рослин відрізали один трійчастий лист як дублікат, де 4 трійчасті листи кожного дублікату використовували для біоаналізу на *P. includens*, 4 трійчасті листи кожного дублікату використовували для біоаналізу на *S. frugiperda*, 4 трійчасті листи на дублікат використовували для біоаналізу на *H. virescens* і 3 трійчасті листи кожного дублікату використовували для біоаналізу на *A. gemmatilis*. Потім, від кожного трійчастого листа відрізали два бічних листочки, і ці листочки поміщали в окремі марковані чашки Петрі, що містять тонкий шар агару. На кожний листочок саджали личинок в двох інших вікових стадіях, а саме *P. includens*, *A. gemmatilis*, *S. frugiperda* або *H. virescens*. Тканини листя трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і тканини листя рослини Maverick заражали 64 личинками *P. includens*, *S. frugiperda* і *H. virescens*. Тканини листя трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і контрольних рослин Maverick заражали 48 личинками *A. gemmatilis*. Чашки Петрі, що містять заражені листочки, закривали кришками і витримували при 25°C і при відносній вологості 40% (RH). Через 4 дні, личинки були ідентифіковані як загиблі личинки (тобто вони не рухалися при їх стимуляції гострим зондом), як нежиттєздатні личинки (вони реагували на подразник, але були нездатні самостійно приймати колишнє положення, якщо їх перевертали), як личинки, які не

розвивалися (вони мали менший розмір, ніж личинки, присутні на листі рослини Maverick), або як живі личинки (тобто вони мали нормальний розмір і були чутливі до подразника).

Процедура біоаналізу рослин на стадії росту R5 була аналогічна процедурі біоаналізу рослин на стадії росту R2, за винятком того, що для біоаналізу *S. frugiperda* і *H. virescens* всі три листочки відрізали від кожного трійчастого листа, і на кожний листочок саджали одну личинку у другій віковій стадії. Внаслідок цього, на листочках трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і рослини Maverick знаходилося 48 личинок *S. frugiperda* і *H. virescens*.

Смертність комах оцінювали після зараження личинками для біоаналізів листя рослини на стадіях росту R2 і R5. Смертність комах, які знаходилися на рослинному матеріалі, що містить трансформант сої pDAB9582.816.15.1, була значно вищою (смертність для *Spodoptera frugiperda* в біоаналізі листя на стадії R2 становила 69%, а в біоаналізі на стадії R5 становила 54%; смертність для *Anticarsia gemmatilis* в біоаналізі листя на стадіях R2 і R5 становила 100%; смертність для *Heliothis virescens* в біоаналізі листя на стадії R2 становила 95%, а на стадії R5 - 70%; а смертність для *Pseudoplusia includens* в біоаналізі листя на стадії R2 становила 100%, а на стадії R5 - 98%), ніж смертність комах, присутніх на контрольних рослинах Maverick (таблиця 10). Результати, одержані в біоаналізі листя, показали, що личинки *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis*, *Pseudoplusia includens* і *Heliothis virescens*, що знаходяться на трансформанті сої pDAB9582.816.15.1, значно менше пошкоджували листя і мали більш низьку виживаність (що також визначається як більш висока смертність комах), ніж личинки *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis*, *Pseudoplusia includens* і *Heliothis virescens*, що знаходяться на контрольних рослинах Maverick.

Боби сої збирали з рослин трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і з рослин Maverick, вирощених у другому випробуванні в польових умовах, і піддавали біоаналізу на виживаність личинок *H. virescens*. Два найбільш верхніх боби на головному стеблі відрізали у шести рослин, вибраних довільно в кожній дубльованій ділянці. Кожну партію бобів поміщали в пластикові чашки Петрі і заражали однією личинкою *H. virescens* у другій віковій стадії. Цей експеримент проводили так, щоб на партії бобів, зібраних з трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і з контрольних рослин Maverick, знаходилося 24 личинки. Чашки Петрі витримували в тих же умовах, які були описані раніше для біоаналізу, що проводиться на відрізаному листі. Через 2 дні оцінювали виживаність личинок *H. virescens* відповідно до процедури, описаної для біоаналізів листя.

Смертність комах оцінювали після зараження соєвих бобів личинками. Смертність комах, які знаходилися на соєвих бобах, що містять трансформант сої pDAB9582.816.15.1, була значно вищою (смертність для *Heliothis virescens* в біоаналізі соєвих бобів становила 50%), ніж смертність комах, присутніх на соєвих бобах контрольних рослин Maverick (таблиця 10). Результати, одержані в цьому аналізі на соєвих бобах, вирощених в польових умовах, показали, що личинки *Heliothis virescens*, що знаходяться на трансформанті сої pDAB9582.816.15.1, мали значно більш низьку виживаність (що також визначається як більш висока смертність комах), ніж личинки *Heliothis virescens*, що знаходяться на контрольних рослинах Maverick.

Верхівки (найбільш верхню частину головного стебла, що несе два або три трійчасті листи, що сформувалися, і гроно незрілих бобів) трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 і контрольних рослин сої Maverick заражали в польових умовах яйцями *H. virescens*. Частини сирної серветки, що несе приблизно двадцять яєць *H. virescens*, поміщали на верхівки п'яти довільно вибраних рослин в кожній дубльованій ділянці (усього було протестовано 20 рослин), і закріплювали в певному місці пластиковим затискачем для паперів. На верхівки рослин надівали мішки з ситової тканини, а вільні кінці сітчастого мішка зав'язували вузлом навколо основного стебла. Моніторинг вилуплення з яєць проводили щодня в репрезентативній партії сітчастих мішків. Після вилуплення личинок зі всіх яєць, в кожному сітчастому мішку, надітому на кожну з п'яти рослин, підраховували число живих личинок *H. virescens*.

Середнє число живих личинок комах, поміщених на верхівки рослин-трансформантів сої pDAB9582.816.15.1, було значно нижчим (0,00 комах *Heliothis virescens* в біоаналізі верхівок рослини сої), ніж число личинок комах, поміщених на верхівки контрольних рослин Maverick (таблиця 11). Результати, одержані в цьому аналізі, показали, що личинки *Heliothis virescens*, що знаходяться на трансформанті сої pDAB9582.816.15.1, мали значно більш низьку виживаність, ніж личинки *Heliothis virescens*, що знаходяться на контрольних рослинах Maverick.

Число природних личинок *P. includens* у випробуваннях на ділянках підраховували один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів. Зразки брали з двох центральних рядів кожної ділянки. У довільно вибраних ділянках між центральними двома рядами поміщали білий клапоть тканини розміром 91×91 см. Рослини, що знаходяться на ділянці ряду, розташованого поблизу від одного краю клаптя, перегинали через цей клапоть, а потім 15 разів трусили для струшування

всіх комах, що там є. Цю процедуру повторювали для ряду з протилежного краю клаптя. Личинки оцінювали на вигляд і розмір: личинки довжиною <6 мм були визначені як невеликі личинки, а личинки довжиною ≥6 мм були визначені як великі личинки. Всі комахи були видалені з клаптя для подальшого аналізу. Потім клапоть переносили у друге, довільно вибране положення між двома центральними рядами, і процес взяття зразків повторювали, в результаті чого одержували два субзразки на ділянку в кожний момент взяття зразка.

Середнє число комах, підрахованих в ряду довжиною 1,82 м, засіяному трансформантом сої рDAB9582.816.15.1, було значно нижчим (0,00 комах *Pseudoplusia includens*), ніж число комах, підрахованих в ряду довжиною 1,82 м, засіяному контрольними рослинами Maverick (таблиця 11). Результати, одержані в цьому аналізі, показали, що зараження трансформанта сої рDAB9582.816.15.1 личинками *Pseudoplusia includens* було значно нижчим, ніж зараження личинками *Pseudoplusia includens*, що знаходяться на контрольних рослинах Maverick.

Результати, одержані в цих експериментах з повторностями, показали, що личинки лускокрилих (Lepidoptera), що знаходяться на трансформанті сої рDAB9582.816.15.1, мали значно більш низьку виживаність, ніж личинки комах всіх тестованих видів, присутні на контрольних рослинах Maverick. Таким чином, трансформант сої рDAB9582.816.15.1 мав інсектицидну активність відносно комах-шкідників даного широкого ряду.

Таблиця 10

Оцінка числа загиблих лускокрилих комах, яка проводиться шляхом біоаналізу листя і бобів сої, одержаних від трансформанта сої рDAB9582.816.15.1, у порівнянні з контрольними рослинами Maverick

Випробування	Вид і вікова стадія тестованого шкідника	Тест	Трансформант сої рDAB9582.816.15.1		Maverick	
			Число загиблих личинок	Загальне число тестованих личинок	Число загиблих личинок	Загальне число тестованих личинок
Теплиця	Новонароджена личинка <i>A. gemmatalis</i>	Біоаналіз листя	45	45	3	45
Теплиця	Новонароджена личинка <i>P. includens</i>	Біоаналіз листя	45	45	3	45
Теплиця	Новонароджена личинка <i>S. frugiperda</i>	Біоаналіз листя	39	45	0	45
Санта-Ісабель, Пуерто-Ріко	Новонароджена личинка <i>S. frugiperda</i>	Біоаналіз листя	11	16	0	16
Перше випробування в польових умовах	Новонароджена личинка <i>A. gemmatalis</i>	Біоаналіз листя	30	30	3	30
	Новонароджена личинка <i>P. includens</i>	Біоаналіз листя	30	30	6	30
	Новонароджена личинка <i>S. frugiperda</i>	Біоаналіз листя	29	30	2	30
Друге випробування в польових умовах	Личинка <i>A. gemmatalis</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз листя на стадії R2	48	48	0	48
	Личинка <i>P. includens</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз листя на стадії R2	64	64	0	64
	Личинка <i>S. frugiperda</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз листя на стадії R2	44	64	0	64

Таблиця 10

Оцінка числа загиблих лускокрилих комах, яка проводиться шляхом біоаналізу листя і бобів сої, одержаних від трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, у порівнянні з контрольними рослинами Maverick

Випробування	Вид і вікова стадія тестованого шкідника	Тест	Трансформант сої pDAB9582.816.15.1		Maverick	
			Число загиблих личинок	Загальне число тестованих личинок	Число загиблих личинок	Загальне число тестованих личинок
	Личинка <i>H. virescens</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз листя на стадії R2	61	64	0	64
	Личинка <i>A. gemmatalis</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз листя на стадії R2	48	48	4	48
	Личинка <i>P. includens</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз листя на стадії R2	63	64	0	64
	Личинка <i>S. frugiperda</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз листя на стадії R2	26	48	1	48
	Личинка <i>H. virescens</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз листя на стадії R2	34	48	3	48
	Личинка <i>H. virescens</i> на 2-ій віковій стадії	Біоаналіз бобів	12	24	4	24

Таблиця 11

Середнє число живих лускокрилих комах, присутніх на трансформанті сої pDAB9582.816.15.1, у порівнянні з контрольними рослинами Maverick

Місце випробувань	Вид і вікова стадія тестованого шкідника	Тест	Середнє число живих личинок	
			Трансформант сої pDAB9582.816.15.1	Maverick
Друге випробування в польових умовах	Личинка <i>H. virescens</i>	Кінцевий біоаналіз	0,00 на кінцевій стадії	3,75 на кінцевій стадії
	Невелика + велика личинка <i>P. includens</i>	Оцінка в польових умовах на перший тиждень	0,00 на 1,82 м ряду	2,25 на 1,82 м ряду
	Невелика + велика личинка <i>P. includens</i>	Оцінка в польових умовах на другий тиждень	0,50 на 1,82 м ряду	6,25 на 1,82 м ряду
	Невелика + велика личинка <i>P. includens</i>	Оцінка в польових умовах на третій тиждень	0,00 на 1,82 м ряду	22,75 на 1,82 м ряду
	Невелика + велика личинка <i>P. includens</i>	Оцінка в польових умовах на четвертий тиждень	0,00 на 1,82 м ряду	4,00 на 1,82 м ряду

Середній рівень експресії різних трансгенних білків, виділених з рослинних матеріалів трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, використовуваних для біоаналізу на інсектицидність

Випробування в польових умовах	Вікова стадія тестованої рослини	Тестована тканина	нг/см <sup>2</sup> білка, виділеного з тканини листа			
			Трансформант сої pDAB9582.816.15.1		Maverick	
			Cry1Ac	Cry1F	Cry1Ac	Cry1F
Перше випробування в польових умовах	R2	листя	6,8	52,9	0,0	0,0
Друге випробування в польових умовах	R2	листя	0,79	2,73	0,0	0,0
Друге випробування в польових умовах	R5	листя	0,39	2,28	0,0	0,0

Приклад 7. Передбачувана послідовність трансформанта сої pDAB9582.816.15.1

SEQ ID NO:14 являє собою передбачувану послідовність трансформанта сої pDAB9582.816.15.1. Ця послідовність містить геномну 5'-фланкуючу послідовність, передбачувану вставку Т-ланцюга pDAB9582 і геномну 3'-фланкуючу послідовність. Що стосується SEQ ID NO:14, то залишки 1-1273 складають геномну 5'-фланкуючу послідовність, залишки 1274-13658 являють собою залишки вставки Т-ланцюга pDAB9582, залишки 13659-13821 являють собою залишки, що утворюються після реаранжування плазміді pDAB9582, а залишки 13822-15170 складають 3'-фланкуючу послідовність. Таким чином, послідовність стику або транзиція біля 5'-кінця вставки знаходиться в положеннях залишків 1273-1274 SEQ ID NO:14. Послідовність стику або транзиція біля 3'-кінця вставки знаходиться в положеннях залишків 13658-13659 SEQ ID NO:14.

Потрібно зазначити, що SEQ ID NO:14 являє собою передбачувану послідовність трансформанта сої pDAB9582.816.15.1, і така послідовність була зібрана після вирівнювання послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 і Т-ланцюга pDAB9582. Фактична послідовність вставки Т-ланцюга трансформанта сої pDAB9582.816.15.1 може дещо відрізнятись від SEQ ID NO:14. У процесі трансформації, а саме введення вставку Т-ланцюга в геном клітини рослини, нерідко утворюються деякі делеції або інші альтерації вставки. Крім того, при ПЛР-ампліфікації можуть виникати помилки, які можуть приводити до незначних помилок секвенування. Так, наприклад, перераховані тут фланкуючі послідовності були визначені шляхом генерування ампліконів з геномних ДНК сої, з подальшим клонуванням і секвенуванням цих ампліконів. При цьому, нерідко, для виявлення незначних відмінностей і невеликих розходжень в послідовностях, одержаних і визначених таким способом, може бути потрібне проведення множини раундів ампліфікації, необхідних для продукування амплікону, довжина якого є достатньою для його секвенування з геномних ДНК. Фахівцю в даній галузі очевидно і потрібно звернути увагу, що будь-які корекції, які необхідно проводити через помилки або розходження, що часто зустрічаються при секвенуванні такого типу, входять в обсяг даного винаходу. Таким чином, релевантний сегмент плазмідної послідовності, що тут розглядається, може містити деякі незначні зміни. Так, наприклад, рослина, яка містить полінуклеотид, що має послідовність, яка деякою мірою ідентична послідовності вставки, що тут розглядається, входить в обсяг даного винаходу. Що стосується ідентичності послідовності SEQ ID NO:14, то така полінуклеотидна послідовність повинна бути щонайменше на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ідентична послідовності, що розглядається або описана тут. Фланкуючі послідовності плюс послідовність вставки можуть бути підтверджені, як описано в розділі "Депоноване насіння". Таким чином, можуть бути ідентифіковані деякі відмінності між послідовністю SEQ ID NO:14 і фактичною вставкою Т-ланцюга трансформанта сої pDAB9582.816.15.1.

При ознайомленні з проілюстрованими і описаними тут ідеями винаходу, фахівцю в даній галузі повинно бути очевидно, що в структуру і деталі опису даного винаходу можуть бути внесені зміни, що не виходять за рамки основної концепції винаходу. Авторами заявлені всі модифікації, що не виходять за рамки суті і обсягу, визначених в прикладеній формулі винаходу.

Всі публікації і опубліковані патентні документи, цитовані в даній заявці, вводяться в даний опис за допомогою посилання так, як якби кожна конкретна публікація або патентна заявка була конкретно і окремо введена за допомогою посилання.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow Agrosiences LLC  
 <120> Резистентний до комах і стійкий до гербіцидів трансформант сої  
 9582.816.15.1  
 <130> 70971  
 <160> 14  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1577  
 <212> ДНК  
 <213> Glycine max  
 <400> 1  
 atatcgatcc cggagggagt gagtagagag gaaatacact aacactggga tcgcacttct 60  
 actccagggt cggataaaca ataagtaaataaaaatactac tactttatca tagtttaatt 120  
 aacaaaatta tatatactgg tataaaattt aatactttaa ataatcatgt gattttttat 180  
 tatctaatta gtattttaat agtttcatta tatattgggtg aaaaattaaa atatcaaata 240  
 tttcatttat acgttattat aataatataa tatttttaaatacactata ttaaaaaataa 300  
 atttatacaa cttgataatt attacattta tgtatcttaa ttaaaataat tagtaaaaga 360  
 ataaatttaa attaaatatt ttaataaat agaaagttgt gtgataactt tttttatagt 420  
 gtaagaaaaa aggcaaatca aacaaagaag ttacaccctt aggatcgaga cacttagagc 480  
 atcagtaaca agcaagtcca acgagagacg atcaacccta gaaattatca tgccataatt 540  
 tagcccaaac ttaacaagat aattagtact cctattgcct tctctcgatg aatgcacaaa 600  
 ttgaacactc aaatcttcct tcacaaagtc acgaatgctt ttcacaattg tgcataaaca 660  
 tgatacactt gtggcggtatg aattccagac acagaatatt aacatactcc aactcccaag 720  
 caattcttaa gccatgcaac agtgtcaata actcagcctt aacaatattt gtgaaacaa 780  
 tatcaccata gaaaccatat atctaagacc cattaatggt acgaagcagc ccaccaaatc 840  
 ttgcatgccc aagattcctt tagcaacttc catccacaag ttatgaaaca ctgacatgta 900  
 tacggacatt ggacatgaca cggacacgta gatattctgta atgttcaaaa tatagaacgt 960  
 agtatagggtg ttgtgtcagt gtcagacact aacatggatg cgtatcagac accgaacacg 1020  
 gtaagggatt ggagtatccg tgcttcatag tccacaagca aggatgattc aagaacttaa 1080  
 gaaacttaaa gtaaaattat tttttgacat atattagtat taaaattttt tattgaggta 1140  
 tattagtact aattttttttt tattaaaatt tatttttaaa cataatttta taataaattt 1200  
 ttttggagat atattagtac ttaaaagaaa ttagatcttt ttttttggg gtttaaagtc 1260  
 cttgctgctt ggaccagtca gcatcatcac accaaaagtt aggccgaat agtttgaaat 1320  
 tagaaagctc gcaattgagg tctacaggcc aaattcgctc ttagccgtac aatattactc 1380

accggatcct aaccggtgtg atcatggggc gcgattaaaa atctcaatta tatttggtct 1440  
aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cggcgccatg cccgggcaag cggccgcaca 1500  
agtttgtaca aaaaagcagg ctccgcggtg actgactgaa aagcttgctg acctgcagg 1560  
caacggatca ggatatt 1577

<210> 2  
<211> 1687  
<212> ДНК  
<213> Glycine max

<400> 2  
gcacatagac acacacatca tctcattgat gcttggtaat aattgtcatt agattgtttt 60  
tatgcataga tgcactcgaa atcagccaat tttagacaag tatcaaaccg atgtgacttc 120  
agtacattaa aaacgtccgc aatgtgttat taagttgtct aagcgtcaat ttgatttgcg 180  
gtgggcaagg ctctctttca gaaagacagg cggccaaagg aaccaagggt gaggtgggct 240  
atggctctca gttccttggtg gaagcgcttg gtctaagggtg cagaggtggt agcgggatga 300  
agcaaaagtg tccgattgca atctgggtgc cagtagcttg aatacactag acccatgttg 360  
gtggcttgca agtcgtatta tcagtgttcc tgcttccttc aaaagtttga acgatattat 420  
tataaagaga aagagtgttg tggataatct aatgaggctg gaccacgtta ttctcaagat 480  
ctaagcattc catatacccc attgaaagat atgaagaatt atgtcaccat gctccaagtg 540  
cttattaagc tactccagct aactagtatt tgaatcaggc ctcaaacat gtactttcaa 600  
ggtgtcccaa acgcgccaaa cattaccaca gtgccaaaaa gatgtgaaag agttcctcat 660  
cggcaacccc acaacgatta caattcgcat taggaaggac atgaatcatt ttcatgaaac 720  
tcttggtggg aagaacattg tgatctatct gccataagaa aaattcacgt tctcaagaag 780  
atgaataaat atataacaaa taaaaatata ataatatcaa gttataaata aaatttctat 840  
ccctcatggt tactcgcaag tggggtaaat gtgaaatttt tgtttttttt ttttacaata 900  
ttttttggtt ctttttttaa tcgtcttaaa aagtcagccg gttttcctat atgtaaaaat 960  
gaactgatcc aacggctagt ataactctcc cacggttgga catgtgatgg tctctcacc 1020  
tagccaccgt cccgttacat agcccacaat agctgaagtc cgtcagaaaa cttacaaaag 1080  
cggtgcggtt caagggatac aagacatgca gcagccgttg ctctaaacc taaactaaac 1140  
taaaacccta gccagttgtc ggtgatcacc atttgtgtaa aaccgtcatg gcgatgaaaa 1200  
ctgcagaaga acacgaagtg ggtatctcct gttcatttcc cgaccttcc ggttccgcg 1260  
gaatttttaa gcaaaggctc cttcattttc tacattaaaa atcattatta cttcctcac 1320  
tgcacctcct ttgtttaatg atgaagtgca ttattcaaca gtgtcttggt agtgctgatt 1380  
caattgaata tgattcaggt attctgattt tatcgtgaat gaagtggaca gagatggaac 1440



```

agttgttcaa ttgtcctcgc ttgatgcccc tcaagaggag ccagaggtct aattatccgt      1500
gatcattgat aaattgattt gtgctgtttt tgttttttag tatctaactt tttttgggct      1560
tatttcagag ttttcaggaa aatggaacca acacatccga caatggtgta agttatgcct      1620
ctcagattga atctttcaag tctcttgctg gggactctga tgctgttctt ttggaagaat      1680
ttattaa                                         1687

```

```

<210> 3
<211> 12381
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність плазміди pDAB9582

```

```

<400> 3
agtcagcatc atcacacca aagttaggcc cgaatagttt gaaattagaa agctcgcaat      60
tgagggtctac aggccaaatt cgctcttagc cgtacaatat tactcaccgg atcctaaccg      120
gtgtgatcat gggccgcgat taaaaatctc aattatattt ggtctaattt agtttggtat      180
tgagtaaaac aaattcggcg ccatgcccgg gcaagcggcc gcacaagttt gtacaaaaaa      240
gcagggtccg cggtgactga ctgaaaagct tgtcgacctg cagggtcaacg gatcaggata      300
ttcttgttta agatgttgaa ctctatggag gtttgatga actgatgatc taggaccgga      360
taagttccct tcttcatagc gaacttattc aaagaatggt ttgtgtatca ttcttgttac      420
attgttatta atgaaaaaat attattgggc attggactga acacgagtgt taaatatgga      480
ccaggcccca aataagatcc attgatatat gaattaaata acaagaataa atcgagtcac      540
caaaccactt gcctttttta acgagacttg ttcaccaact tgatacaaaa gtcattatcc      600
tatgcaaatc aataatcata caaaaatata caataacact aaaaaattaa aagaaatgga      660
taatttcaca atatgttata cgataaagaa gttacttttc caagaaattc actgatttta      720
taagcccact tgcattagat aaatggcaaa aaaaaacaaa aaggaaaaga aataaagcac      780
gaagaattct agaaaatacg aaatacgctt caatgcagtg ggaccacagg ttcaattatt      840
gccaattttc agctccaccg tatattttaa aaataaaacg ataatgctaa aaaaatataa      900
atcgtaacga tcgttaaata tcaacggctg gatcttatga cgaccgtag aaattgtggg      960
tgtcgacgag tcagtaataa acggcgctca agtggttgca gccggcacac acgagtcgtg      1020
tttatcaact caaagcacia atacttttcc tcaacctaaa aataaggcaa ttagccaaaa      1080
acaactttgc gtgtaaacaa cgctcaatac acgtgtcatt ttattattag ctattgcttc      1140
accgccttag ctttctcgtg acctagtcgt cctcgtcttt tcttcttctt cttctataaa      1200
acaataccca aagcttcttc ttcacaattc agatttcaat ttctcaaaat cttaaaaact      1260
ttctctcaat tctctctacc gtgatcaagg taaatttctg tgttccttat tctctcaaaa      1320

```

tcttcgattt tgttttcggt cgatcccaat ttcgtatatg ttcttttggt tagattctgt	1380
taatcttaga tcgaagacga ttttctgggt ttgatcgta gatcatct taattctcga	1440
ttagggtttc ataaatatca tccgatttgt tcaaataatt tgagttttgt cgaataatta	1500
ctcttcgatt tgtgatttct atctagatct ggtgttagtt tctagtttgt gcgatcgaat	1560
ttgtcgatta atctgagttt ttctgattaa cagagatctc catggagaac aatatccaga	1620
accagtgtgt cccatacaat tgctcaaca atcctgaagt tgagatcctc aacgaagaga	1680
ggagcactgg acgccttccc cttgacatct cctctccct cacaaggttc cttttgtctg	1740
agtttgttcc tgggtgtgggt gtggcctttg gcctctttga cctcatctgg ggcttcatca	1800
ccccatctga ttggagcctc ttcttctcc agattgaaca attgattgag cagaggattg	1860
agacccttga aaggaacaga gccatcacca cacttcgtgg ccttgctgac agctatgaaa	1920
tctacattga agcactccgt gagtgggaag ccaatcccaa caatgctcaa ctccgtgaag	1980
atgtgaggat tcgctttgcc aacacagatg acgctttgat cacagccatc aacaatttca	2040
ccctcaccag ctttgagatc ctttgctctc cagtctatgt tcaagctgca aacctccact	2100
tgagcttgct tagggatgct gtgtccttcg gacaaggttg gggacttgac atagccactg	2160
tcaacaatca ctacaacaga ctcatcaact tgattcatcg ctacaccaa cattgcttgg	2220
acacctaaa tcaaggattg gagaacctca gaggcaccaa cactcgcaa tgggcaagggt	2280
tcaaccagtt tagaagggtat ctacactca ctgtgcttga catagttgct ctcttccca	2340
actatgatgt tcgcacctac ccaattcaaa ccagctccca acttacaagg gaaatctaca	2400
cctcctcagt cattgaggac agcccagttt ctgccaacat acccaatggt ttcaaccgtg	2460
ctgagtttggt tgtcagacca ccccatctca tggacttcat gaactccttg tttgtgactg	2520
ccgagactgt taggtcccaa actgtgtggg gaggccacct tgttagctcc cgcaacaccg	2580
ctggcaaccg catcaacttc ccatectatg gggttttcaa tcttggtgga gccatctgga	2640
ttgcagatga ggaccaagg ctttcttaca gaaccttgct agatcctgtc tttgtcagag	2700
gaggctttgg caatccacac tatgttcttg gtttgagggg agtggtttt cagcagactg	2760
gcaccaatca caccgcaca ttcagaaaca gcggcaccat tgacagcctt gatgagatcc	2820
cacctcaaga caacagcgga gcaccctgga acgactactc ccatgtgctc aatcatgtca	2880
cctttgtgct ctggcctggt gagatcagcg gttcagattc ttggagagca ccaatgttct	2940
catggacca tcgctctgcc acaccacaa acaccattga tccagagaga atcaccaga	3000
ttcccttggt gaaggcacac acacttcagt ctggaaccac agttgtcaga gggcctgggt	3060
tactgggtg agacattctc agacgcacct ctggaggggc atttgcttac accattgtca	3120
acatcaatgg gcaacttccc cagcgttacc gtgccagaat ccgctatgct tccaccacta	3180
acttgagaat ctatgtcaca gttgctggtg aaaggatctt tgctggtcag ttcaacaaga	3240

caatggacac tggatgatcca ttgacattcc agtcattctc ctatgccacc atcaacactg	3300
cattcacctt tccaatgagc cagtccagct tcacagtggg tgcagatacc ttcagctccg	3360
gcaatgaggt gtacattgac cgctttgagt tgattccagt gactgccaca cttgaggctg	3420
agttctgactt ggagcgtgct cagaaggccg tgaatgctct cttcacctct tcaaactcaga	3480
ttgggctcaa gacagatgtg actgactacc atatagaccg tgtttccaat cttgttgagt	3540
gcctctctga tgagttctgc ttggatgaga agaaagagtt gtcagagaag gtcaagcacg	3600
ccaagaggct ctctgatgag aggaacttgc ttcaagatcc caacttcaga gggatcaacc	3660
gtcaattgga tcgtggatgg aggggatcaa ctgacataac cattcaagga ggtgacgatg	3720
tgttcaagga gaactatgtc acactcttgg ggaccttga tgagtgtac ccaacatacc	3780
tttaccagaa gatagacgaa agcaagctca aggcctacac aagataccag ttgagagggt	3840
acattgagga ctctcaagac cttgaaatct acctcatcag atacaacgcc aaacatgaga	3900
cagtcaatgt gcctgggact gggttactct ggccacttcc agccccaagc cccattggca	3960
agtgtgcca tcactcacat cacttctcct tggacataga tgttggtgc actgacttga	4020
atgaggacct tgggtgtgtg gtgatcttca agatcaagac ccaagatggc catgcaagggt	4080
tgggcaatct tgagtttctt gaagagaaac cacttgttgg agaagccctt gccagagtga	4140
agagggtga gaagaaatgg agggacaaga gagagaagtt ggagtgggaa acaaacttg	4200
tgtacaaaga agccaaagaa tcagttgatg ctttgtttgt gaactcccaa tatgataggc	4260
tccaagctga caccaacata gcaatgattc atgctgcaga caaaagggtt cacagcattc	4320
gtgaagcata ccttcctgaa ctctcagtga ttcttgggggt caatgctgca atctttgaag	4380
agcttgaagg acgcatcttc actgccttct ccttgtatga tgcaaggaat gtcacatgaa	4440
atggtgactt caacaatggc ctttcctgct ggaatgtgaa agggcacgtg gatgttgaag	4500
agcagaacaa tcaccgctct gtcttgttg tccctgagtg ggaagctgaa gtttcacaag	4560
aagttcgtgt ctgccctggc cgtggctaca ttcttcgtgt gactgcttac aaagaaggct	4620
atggagaagg ttgtgtcacc atccacgaga tagagaacaa tactgatgaa ttgaagttca	4680
gcaactgtgt tgaggaagag gtctacccaa acaatactgt cacttgcaat gactacactg	4740
caactcaaga agagtatgag ggcacttaca cttctcgcaa ccgtggctat gatggagcct	4800
atgagagcaa ctcatctgtg cctgctgact atgcttcagc ctatgaagag aaggcataca	4860
ctgatggaag gcgtgacaat ccttgtgaaa gcaacagagg ctatggggac tacacacccc	4920
tcccagctgg ctatgtgacc aaagagttgg agtactttcc tgaaactgac aaggtttga	4980
ttgagatagg agaaactgaa ggcacattca tagttgactc tgtggagctt ttgctcatgg	5040
aagagtgagt agttagctta atcacctaga gctcggtcac cagcataatt tttattaatg	5100
tactaaatta ctgttttgtt aaatgcaatt ttgctttctc gggattttta tatcaaaatc	5160



tatttagaaa tacacaatat tttgttgcag gcttgctgga gaatcgatct gctatcataa	5220
aaattacaaa aaaattttat ttgcctcaat tatttttagga ttggtattaa ggacgcttaa	5280
attatttgtc gggtcactac gcatcattgt gattgagaag atcagcgata cgaaatattc	5340
gtagtactat cgataattta tttgaaaatt cataagaaaa gcaaacgta catgaattga	5400
tgaacaata caaagacaga taaagccacg cacatttagg atattggccg agattactga	5460
atattgagta agatcacgga atttctgaca ggagcatgtc ttcaattcag cccaaatggc	5520
agttgaaata ctcaaaccgc cccatatgca ggagcggatc attcattgtt tgtttggttg	5580
cctttgccaa catgggagtc caagggttgcg gccgcgcgcc gaaaacaact ttgtatacaa	5640
aagttgccgc ggtgactgac tgaactaaac ccagaaggta attatccaag atgtagcatc	5700
aagaatccaa tgtttacggg aaaaactatg gaagtattat gtaagctcag caagaagcag	5760
atcaatatgc ggcacatatg caacctatgt tcaaaaatga agaattgaca gatacaagat	5820
cctatactgc cagaatacga agaagaatac gtagaaattg aaaaagaaga accaggcgaa	5880
gaaaagaatc ttgaagacgt aagcactgac gacaacaatg aaaagaagaa gataaggctc	5940
gtgattgtga aagagacata gaggacacat gtaagggtgga aaatgtaagg gcggaaagta	6000
accttatcac aaaggaatct tatccccac tacttatcct tttatatattt tccgtgtcat	6060
ttttgccctt gagttttcct atataaggaa ccaagttcgg catttggtga aacaagaaaa	6120
aatttggtgt aagctatttt ctttgaagta ctgaggatag aacttcagag aaatttgtaa	6180
gtttgtagat ccaacaatgg acaacaatcc caacatcaac gagtgcattc cttacaactg	6240
cctgagcaac cctgaggttg aggtgctggg tggagaacgg attgagactg gttacacacc	6300
tatcgacatc tcgttgtcac ttaccaatt ccttttgta gagttcgtgc ccggtgctgg	6360
attcgtgctt ggacttgctg atatcatttg gggaaatctt ggtccctctc aatgggacgc	6420
ctttcttgta cagatagagc agttaattaa ccaaagaata gaagaattcg ctaggaacca	6480
agccatctca aggttagaag gcctcagcaa cctttaccag atttacgcag aatcttttcg	6540
agagtgggaa gcagaccgga ccaatcctgc ctaagagag gagatgcgca ttcaattcaa	6600
tgacatgaac agcgcgctga cgaccgcaat tccgtctctc gccgttcaga attaccaagt	6660
tcctctttta tccgtgtacg tgcaggctgc caacctgcac ttgtcggtgc tccgcgatgt	6720
ctccgtgttc ggacaacggt ggggctttga tgccgcaact atcaatagtc gttataatga	6780
tctgactagg cttattggca actataccga ttatgctgtt cgctggtaca acacgggtct	6840
cgaacgtgtc tggggaccgg attctagaga ttgggtcagg tacaaccagt tcaggcgaga	6900
gttgacacta actgtcctag acattgtcgc tctctttccc aactacgact ctaggcgcta	6960
cccaatccgt actgtgtcac aattgaccgc ggaatctac acaaaccag tcctcgagaa	7020
cttcgacggt agctttcgag gctcggctca gggcatagag agaagcatca ggtctccaca	7080

cctgatggac atattgaaca gtatcacgat ctacaccgat ggcacccgcg gttattacta	7140
ctggtcaggg catcagatca tggcatcacc cgttgggttc tctggaccag aattcacttt	7200
cccactttac gggactatgg gcaatgcagc tccacaacaa cgtattgttg ctcaactcgg	7260
tcagggcggtg tatagaacct tgtccagcac tctatatagg agacctttca acatcggcat	7320
caacaatcaa caattgtctg tgcttgacgg gacagaattt gcctatggaa cctcctcaaa	7380
tctgccatcc gctgtctaca gaaagagcgg aacagttgat agcttggatg agatccctcc	7440
acagaacaac aacgttccac ctaggcaagg gtttagccat cgccttagcc atgtgtccat	7500
gttccgttca ggcttttagta atagcagcgt tagtatcatc agagctccga tgttctcttg	7560
gatacatcgt agtgctgagt ttaacaacat aattgcatcc gatagcatta ctcatatccc	7620
agctgtcaag gggaactttc tctttaatgg ttctgtcatt tcaggaccag gattcactgg	7680
aggcgacttg gttaggctga attcttccgg caacaacatc cagaatagag ggtatattga	7740
agtgccatt cacttcccat cgacatctac cagatatcgt gttcgtgtaa ggtatgcctc	7800
tgttaccctt attcacctca acgtcaattg gggtaattcc tccatctttt ccaatacagt	7860
accagcgaca gctacatcct tggataatct ccaatctagc gatttcgggtt acttcgaaag	7920
tgccaatgcc ttcacctctt ccctaggtaa catagtaggt gttagaaatt tctccggaac	7980
cgccggagtg ataatcgacc gcttcgaatt cattcccgtt actgcaacgc tcgaggcaga	8040
gtctgacttg gaaagagcac agaaggcggg gaatgctctg ttcacttcgt ccaatcagat	8100
tgggctcaag acagatgtga ctgactatca catcgatcgc gtttccaacc ttgttgagtg	8160
cctctctgat gagttctgtt tggatgagaa gaaggagttg tccgagaagg tcaaacaatgc	8220
taagcgactt agtgatgagc ggaacttgct tcaagatccc aactttcgcg ggatcaacag	8280
gcaactagat cgtggatgga ggggaagtac ggacatcacc attcaaggag gtgatgatgt	8340
gttcaaggag aactatgtta cgctcttggg tacctttgat gagtgcctatc caacatacct	8400
gtaccagaag atagatgaat cgaaactcaa agcctacaca agataccagt tgagagggtta	8460
catcgaggac agtcaagacc ttgagatcta cctcatcaga tacaacgcca aacatgagac	8520
agtcaatgtg cctgggacgg gtctactctg gccactttca gcccgaagtc ccatcggcaa	8580
gtgtgcccac cactcacacc acttctcctt ggacatagac gttggctgta ccgacctgaa	8640
cgaagacctc ggtgtgtggg tgatcttcaa gatcaagact caagatggcc atgccaggct	8700
aggcaatctg gagtttctag aagagaaacc acttgttgga gaagccctcg cttagagtga	8760
gagggctgag aagaagtgga gggacaagag agagaagttg gaatgggaaa caaacattgt	8820
gtacaaagaa gccaaagaaa gcgttgacgc tctgtttgtg aactctcagt atgataggct	8880
ccaagctgat accaacatag ctatgattca tgctgcagac aaacgcgttc atagcattcg	8940
ggaagcttac cttcctgaac ttagcgtgat tccgggtgtc aatgctgcta tctttgaaga	9000



gttagaaggg	cgcattctca	ctgcattctc	cttgtatgat	gcgaggaatg	tcatacaaga	9060
tggtgacttc	aacaatggcc	tatcctgctg	gaatgtgaaa	gggcacgtag	atgtagaaga	9120
acagaacaat	caccgctctg	tccttggtgt	tcctgagtg	gaagcagaag	tttcacaaga	9180
agttcgtgtc	tgtcctggtc	gtggctacat	tcttcgtgtt	accgctaca	aagaaggata	9240
cggagaaggt	tgcgtcacca	tacacgagat	tgagaacaac	accgacgagc	tgaagttcag	9300
caactgcgtc	gaggaggaag	tctacccaaa	caacaccgta	acttgcaatg	actacactgc	9360
gactcaagag	gagtatgagg	gtacttacac	ttctcgaat	cgaggatacg	atggagccta	9420
tgagagcaac	tcttctgtac	ccgctgacta	tgcatcagcc	tatgaggaga	aggcttacac	9480
cgatggacgt	agggacaatc	cttgccaatc	taacagaggc	tatggggact	acacaccgtt	9540
accagccggc	tatgtcacca	aagagttaga	gtactttcca	gaaaccgaca	aggtttggat	9600
tgagattgga	gaaacggaag	gaacattcat	tgttgatagc	gtggagttac	ttctgatgga	9660
ggaatgagta	gttagcttaa	tcacctagag	ctcggttacc	tatcaaaatc	tatttagaaa	9720
tacacaatat	tttgttgag	gcttgctgga	gaatcgatct	gctatcataa	aaattacaaa	9780
aaaattttat	ttgcctcaat	tatttttagga	ttggtattaa	ggacgcttaa	attatattgtc	9840
gggtcactac	gcatcattgt	gattgagaag	atcagcgata	cgaaatattc	gtagtactat	9900
cgataattta	tttgaaaatt	cataagaaaa	gcaaacgtta	catgaattga	tgaaacaata	9960
caaagacaga	taaagccacg	cacatttagg	atattggccg	agattactga	atattgagta	10020
agatcacgga	atttctgaca	ggagcatgtc	ttcaattcag	cccaaattggc	agttgaaata	10080
ctcaaaccgc	cccatatgca	ggagcggatc	attcattggt	tgtttgggtg	cctttgcca	10140
catgggagtc	caaggttgcg	gccgcgcgcc	gaccagctt	tcttgtaaaa	agtgggtgcg	10200
gccgcttaat	taaatttaaa	tgcccggggc	tttaaaccgc	gccgcttaat	taaggccggc	10260
ctgcagcaaa	cccagaaggt	aattatccaa	gatgtagcat	caagaatcca	atgtttacgg	10320
gaaaaactat	ggaagtatta	tgtaagctca	gcaagaagca	gatcaatatg	cggcacatat	10380
gcaacctatg	ttcaaaaatg	aagaatgtac	agatacaaga	tcctatactg	ccagaatacg	10440
aagaagaata	cgtagaaatt	gaaaaagaag	aaccaggcga	agaaaagaat	cttgaagacg	10500
taagcactga	cgacaacaat	gaaaagaaga	agataaggtc	ggtgattgtg	aaagagacat	10560
agaggacaca	tgtaagggtg	aaaatgtaag	ggcggaaagt	aaccttatca	caaaggaatc	10620
ttatccccca	ctacttatcc	ttttatattt	ttccgtgtca	tttttgccct	tgagttttcc	10680
tatataagga	accaagttcg	gcatttgtga	aaacaagaaa	aaatttggtg	taagctattt	10740
tctttgaagt	actgaggata	caacttcaga	gaaatttgta	agtttgtaga	tctccatgtc	10800
tccggagagg	agaccagttg	agattaggcc	agctacagca	gctgatatgg	ccgcggtttg	10860
tgatatcggt	aaccattaca	ttgagacgtc	tacagtgaac	tttaggacag	agccacaaac	10920

```

accacaagag tggattgatg atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc 10980
tgagggttgag ggtgttgtgg ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaacgc 11040
ttacgattgg acagttgaga gtactgttta cgtgtcacat aggcacaaa ggttgggcct 11100
aggatccaca ttgtacacac atttgcttaa gtctatggag gcgcaagggt ttaagtctgt 11160
ggttgctgtt ataggccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttgggata 11220
cacagcccgg ggtacattgc gcgcagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttgg 11280
tttttgcaa agggattttg agttgccagc tcctccaagg ccagttaggc cagttacca 11340
gatctgaggt accctgagct tgagcttatg agcttatgag cttagagctc ggatccacta 11400
gtaacggccg ccagtgtgct ggaattcgcc cttgactaga taggcgcca gatcggcggc 11460
aatagcttct tagcgccatc ccgggttgat cctatctgtg ttgaaatagt tgcgggtggc 11520
aaggctctct ttcagaaaga caggcgcca aaggaacca aggtgaggtg ggctatggct 11580
ctcagttcct tgtggaagcg cttggtctaa ggtgcagagg tgttagcggg atgaagcaaa 11640
agtgtccgat tgtaacaaga tatgttgatc ctacgtaagg atattaaagt atgtattcat 11700
cactaatata atcagtgtat tccaatatgt actacgattt ccaatgtctt tattgtcgcc 11760
gtatgtaatc ggcgtcaca aataatcccc ggtgactttc ttttaatcca ggatgaaata 11820
atatgttatt ataatttttg cgatttggtc cgttatagga attgaagtgt gcttgcggtc 11880
gccaccactc ccatttcata attttacatg tatttgaaaa ataaaaattt atggatttca 11940
atttaaacac gtatacttgt aaagaatgat atcttgaaag aaatatagtt taaatattta 12000
ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa acataaattt attgatgcaa 12060
gtttaaattc agaaatattt caataactga ttatatcagc tggtagattg ccgtagatga 12120
aagactgagt gcgatattat ggtgtaatac atagcggccg ggtttctagt caccgggttag 12180
gatccgttta aactcgaggc tagcgcatgc acatagacac acacatcatc tcattgatgc 12240
ttggtaataa ttgtcattag attgttttta tgcatagatg cactcgaaat cagccaattt 12300
tagacaagta tcaaacggat gtgacttcag tacattaaaa acgtccgcaa tgtgttatta 12360
agttgtctaa gcgtcaattt g 12381

```

```

<210> 4
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Праймер 81615_FW2

```

```

<400> 4
ttacaccctt aggatcgaga cacttagagc

```

30

```

<210> 5

```

<211>	27	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер 81516_RV1	
<400>	5	
	gattcatgtc cttcctaattg cgaattg	27
<210>	6	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер 81516_RV2	
<400>	6	
	aatttcacat ttaccccaact tgcga	25
<210>	7	
<211>	28	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер 81516_RV3	
<400>	7	
	ggaggtgcag tgaggaaggt aataatga	28
<210>	8	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер 5'IREnd-01	
<400>	8	
	cgaactttct aatttcaaac tattcgggc	29
<210>	9	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Праймер 5'IREnd-01	
<400>	9	
	tcctagatca tcagttcata caaacctcca	30
<210>	10	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	



<220>  
 <223> Праймер AtUbi10RV1

<400> 10  
 cggtcctaga tcatcagttc atacaaacc 29

<210> 11  
 <211> 28  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Праймер AtUbi10RV2

<400> 11  
 cactcgtggt cagtccaatg accaataa 28

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

<220>  
 <223> Праймер 3'PATEnd05

<400> 12  
 gctcctccaa ggccagttag 20

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

<220>  
 <223> Праймер 3'PATEnd06

<400> 13  
 ccagttaggc cagttaccsa 20

<210> 14  
 <211> 15170  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Передбачувана послідовність трансформанта сої 9582.814.19.1

<400> 14  
 atatcgatcc cggagggagt gagtagagag gaaatacact aacactggga tcgcacttct 60  
 actccagggt cggataaaca ataagtaaataaaaatactac tactttatca tagtttaatt 120  
 aacaaaatta tatatactgg tataaaattt aatactttaa ataatcatgt gattttttat 180  
 tatctaatta gtatttttaat agtttcatta tatattggtg aaaaattaaa atatcaaata 240  
 tttcatttat acgttattat aataatataa tatttttaaatacactata ttaaaaataa 300  
 atttatacaa cttgataatt attacattta tgtatcttaa ttaaaataat tagtaaaaga 360

ataaatttaa attaaatatt ttttaataaat agaaagttgt gtgataactt tttttatagt	420
gtaagaaaaa aggcaaatca aacaaagaag ttacaccctt aggatcgaga cacttagagc	480
atcagtaaca agcaagtcca acgagagacg atcaacccta gaaattatca tgccataatt	540
tagcccaaac ttaacaagat aattagtact cctattgcct tctctcgatg aatgcacaaa	600
ttgaacactc aaatcttcct tcacaaagtc acgaatgctt ttcacaattg tgcataacaa	660
tgatacactt gtggcggatg aattccagac acagaatatt aacatactcc aactcccaag	720
caattcttaa gccatgcaac agtgtcaata actcagcctt aacaatattt gttgaaccaa	780
tatcaccata gaaaccatat atctaagacc cattaatggt acgaagcagc ccaccaaadc	840
ttgcatgccc aagattcctt tagcaacttc catccacaag ttatgaaaca ctgacatgta	900
tacggacatt ggacatgaca cggacacgta gatattctgta atgttcaaaa tatagaacgt	960
agtataggtg ttgtgtcagt gtcagacact aacatggatg cgtatcagac accgaacacg	1020
gtaagggatt ggagtatccg tgcttcatag tccacaagca aggatgattc aagaacttaa	1080
gaaacttaaa gtaaaattat tttttgacat atattagtat taaaattttt tattgaggta	1140
tattagtact aatttttttt tattaaaatt tattttttaa cataatttta taataaattt	1200
ttttggagat atattagtac ttaaaagaaa ttagatcttt tttttttggg gtttaaagtc	1260
cttgctgctt ggaccagtca gcatcatcac accaaaagtt agggccgaat agtttgaaat	1320
tagaaagctc gcaattgagg tctacaggcc aaattcgctc ttagccgtac aatattactc	1380
accggatcct aaccggtgtg atcatgggcc gcgattaaaa atctcaatta tatttggtct	1440
aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cggcgccatg cccgggcaag cggccgcaca	1500
agtttgtaaa aaaaagcagg ctccgcggtg actgactgaa aagcttgctg acctgcaggt	1560
caacggatca ggatattcctt gtttaagatg ttgaactcta tggagggttg tatgaactga	1620
tgatctagga ccgataaagt tcccttcttc atagcgaact tattcaaaga atgttttggtg	1680
tatcattcctt gttacattgt tattaatgaa aaaatattat tggtcattgg actgaacacg	1740
agtgttaaat atggaccagg ccccaaataa gatccattga tatatgaatt aaataacaag	1800
aataaatcga gtcaccaaac cacttgctt ttttaacgag acttggtcac caacttgata	1860
caaaagtcac tatcctatgc aaatcaataa tcatacaaaa atatccaata aactaaaaa	1920
attaaaagaa atggataatt tcacaatatg ttatacgata aagaagttac tttccaaga	1980
aattcactga ttttataagc ccacttgcat tagataaatg gcaaaaaaaa acaaaaagga	2040
aaagaaataa agcacgaaga attctagaaa atacgaaata cgcttcaatg cagtgggacc	2100
cacgggtcaa ttattgcaa ttttcagctc caccgtatat ttaaaaaata aaacgataat	2160
gctaaaaaaa tataaatcgt aacgatcgtt aaatctcaac ggctggatct tatgacgacc	2220
gttagaaatt gtggttgctg acgagtcagt aataaacggc gtcaaagtgg ttgcagccgg	2280

cacacacgag tcgtgtttat caactcaaag cacaaatact tttcctcaac ctaaaaataa	2340
ggcaattagc caaaaacaac tttgcggtga aacaacgctc aatacacgtg tcatttttatt	2400
attagctatt gcttcaccgc cttagctttc tcgtgacctg gtcgtcctcg tctttttctc	2460
ttctttctct ataaaaacaat acccaaagct tcttcttcac aattcagatt tcaatttctc	2520
aaaatcttaa aaactttctc tcaatttctc ctaccgtgat caaggtaaatt ttctgtgttc	2580
cttattctct caaaatcttc gattttgttt tcgttcgatc ccaatttcgt atatgttctt	2640
tgggttagat tctgttaatc ttagatcgaa gacgattttc tgggtttgat cgtagatat	2700
catcttaatt ctgattagc gtttcataaa tatcatccga tttgttcaaa taatttgagt	2760
tttgtcgaat aattactctt cgatttgatg tttctatcta gatctggtgt tagtttctag	2820
tttgtcgat cgaatttgct gattaatctg agttttctg attaacagag atctccatgg	2880
agaacaatat ccagaaccag tgtgtcccat acaattgcct caacaatcct gaagttgaga	2940
tcctcaacga agagaggagc actggacgcc tccccctga catctccctc tccctcacia	3000
ggttcctttt gtctgagttt gttcctggtg tgggtgtggc ctttggcctc tttgacctca	3060
tctggggctt catcacccca tctgattgga gcctcttctt tctccagatt gaacaattga	3120
ttgagcagag gattgagacc cttgaaagga acagagccat caccacactt cgtggccttg	3180
ctgacagcta tgaaatctac attgaagcac tccgtgagtg ggaagccaat cccaacaatg	3240
ctcaactccg tgaagatgtg aggattcgct ttgccaacac agatgacgct ttgatcacag	3300
ccatcaacaa tttcacctc accagctttg agatccctt gctctcagtc tatgttcaag	3360
ctgcaaacct ccacttgagc ttgcttaggg atgctgtgtc cttcggacaa ggttggggac	3420
ttgacatagc cactgtcaac aatcactaca acagactcat caacttgatt catcgctaca	3480
ccaaacattg cttggacacc tacaatcaag gattggagaa cctcagaggc accaactctc	3540
gccaatgggc aaggttcaac cagtttagaa gggatctcac actcactgtg cttgacatag	3600
ttgtctctct cccaactat gatgttcgca cctaccaat tcaaaccagc tcccaactta	3660
caagggaaat ctacacctc tcagtcattg aggacagccc agtttctgcc aacataacca	3720
atggtttcaa ccgtgctgag tttggtgtca gaccaccca tctcatggac ttcatgaact	3780
ccttgtttgt gactgccgag actgttaggt cccaaactgt gtggggaggc caccttgta	3840
gctcccga caccgctggc aaccgcatca acttcccatc ctatgggggtt ttcaatcctg	3900
gtggagccat ctggattgca gatgaggacc caaggccttt ctacagaacc ttgtcagatc	3960
ctgtctttgt cagaggaggc tttggcaatc cacactatgt tcttggtttg aggggagtgg	4020
cttttcagca gactggcacc aatcacaccc gcacattcag aaacagcggc accattgaca	4080
gccttgatga gatccacct caagacaaca gcggagcacc ctggaacgac tactcccatg	4140
tgctcaatca tgtcaccttt gtgcgctggc ctggtgagat cagcggttca gattcttggg	4200



gagcaccaat gttctcatgg acccatcgct ctgccacacc cacaaacacc attgatccag	4260
agagaatcac ccagattccc ttggtgaagg cacacacact tcagtctgga accacagttg	4320
tcagagggcc tgggttcact ggtggagaca ttctcagacg cacctctgga gggccatttg	4380
cttacaccat tgtcaacatc aatgggcaac ttccccagcg ttaccgtgcc agaatccgct	4440
atgcttccac cactaacttg agaatctatg tcacagttgc tggtgaaagg atctttgctg	4500
gtcagttcaa caagacaatg gacactgggtg atccattgac attccagtca ttctcctatg	4560
ccaccatcaa cactgcattc acctttccaa tgagccagtc cagcttcaca gtgggtgcag	4620
ataccttcag ctccggcaat gaggtgtaca ttgaccgctt tgagttgatt ccagtgactg	4680
ccacacttga ggctgagttc gacttggagc gtgctcagaa ggccgtgaat gctctcttca	4740
cctcttcaaa tcagattggg ctcaagacag atgtgactga ctaccatata gaccgtgttt	4800
ccaatcttgt tgagtgcctc tctgatgagt tctgcttggga tgagaagaaa gagttgtcag	4860
agaagggtcaa gcacgccaa aggtctctctg atgagaggaa cttgcttcaa gatcccaact	4920
tcagagggat caaccgtcaa ttggatcggtg gatggagggg atcaactgac ataaccattc	4980
aaggaggtga cgatgtgttc aaggagaact atgtcacact cttggggacc tttgatgagt	5040
gctaccaaac atacctttac cagaagatag acgaaagcaa gctcaaggcc tacacaagat	5100
accagttgag aggttacatt gaggactctc aagaccttga aatctacctc atcagataca	5160
acgccaaaca tgagacagtc aatgtgcctg ggactgggtc actctggcca ctttcagccc	5220
caagccccat tggcaagtgt gcccatcact cacatcactt ctccctggac atagatgttg	5280
gctgcactga cttgaatgag gaccttgggtg tgtgggtgat cttcaagatc aagacccaag	5340
atggccatgc aagggttggc aatcttgagt ttcttgaaga gaaaccactt gttggagaag	5400
cccttgccag agtgaagagg gctgagaaga aatggaggga caagagagag aagttggagt	5460
gggaaacaaa catttgtgtac aaagaagcca aagaatcagt tgatgctttg tttgtgaact	5520
cccaatatga taggctccaa gctgacacca acatagcaat gattcatgct gcagacaaaa	5580
gggttcacag cattcgtgaa gcataccttc ctgaactctc agtgattcct ggggtcaatg	5640
ctgcaatctt tgaagagctt gaaggacgca tcttcactgc cttctccttg tatgatgcaa	5700
ggaatgtcat caagaatggt gacttcaaca atggcctttc ctgctggaat gtgaaagggc	5760
acgtggatgt tgaagagcag aacaatcacc gctctgtcct tgttgtcctt gagtgggaag	5820
ctgaagtttc acaagaagtt cgtgtctgcc ctggtcgtgg ctacattctt cgtgtgactg	5880
cttacaaga aggctatgga gaaggttgtg tcaccatcca cgagatagag aacaatactg	5940
atgaattgaa gttcagcaac tgtgttgagg aagaggtcta cccaaacaat actgtcactt	6000
gcaatgacta cactgcaact caagaagagt atgagggcac ttacacttct cgcaaccgtg	6060
gctatgatgg agcctatgag agcaactcat ctgtgcctgc tgactatgct tcagcctatg	6120

aagagaaggc atacactgat ggaaggcgtg acaatccttg tgaaagcaac agaggctatg	6180
gggactacac acccctccca gctggctatg tgaccaaaga gttggagtag tttcctgaaa	6240
ctgacaaggt ttggattgag ataggagaaa ctgaaggcac attcatagtt gactctgtgg	6300
agcttttgct catggaagag tgagtagtta gcttaatcac ctagagctcg gtcaccagca	6360
taatttttat taatgtacta aattactggt ttgttaaag caattttgct ttctcgggat	6420
tttaatatca aaatctatct agaaatacac aatattttgt tgcaggcttg ctggagaatc	6480
gatctgctat cataaaaaatt acaaaaaaat tttattttgcc tcaattatct taggattggg	6540
attaaggacg cttaaattat ttgtcgggtc actacgcac attgtgattg agaagatcag	6600
cgatacgaaa tattcgtagt actatcgata atttatttga aaattcataa gaaaagcaaa	6660
cgttacatga attgatgaaa caatacaaag acagataaag ccacgcacat ttaggatatt	6720
ggccgagatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc tgacaggagc atgtcttcaa	6780
ttcagcccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat atgcaggagc ggatcattca	6840
ttgtttgttt ggttgccctt gccaacatgg gagtccaagg ttgcggccgc gcgccgaaaa	6900
caactttgta taaaaaggt gccgcggtga ctgactgaac taaaccaga aggtattat	6960
ccaagatgta gcatcaagaa tccaatgttt acgggaaaaa ctatggaagt attatgtaag	7020
ctcagcaaga agcagatcaa tatgcggcac atatgcaacc tatgttcaaa aatgaagaat	7080
gtacagatac aagatcctat actgccagaa tacgaagaag aatacgtaga aattgaaaaa	7140
gaagaaccag gcgaagaaaa gaatcttgaa gacgtaagca ctgacgacaa caatgaaaag	7200
aagaagataa ggtcgggtgat tgtgaaagag acatagagga cacatgtaag gtggaaaatg	7260
taagggcgga aagtaacctt atcacaaggg aatcttatcc cccactactt atccttttat	7320
atttttccgt gtcatttttg cccttgagtt ttcctatata aggaaccaag ttcggcattt	7380
gtgaaaacaa gaaaaaattt ggtgtaagct attttctttg aagtactgag gatcaactt	7440
cagagaaatt tgtaagtttg tagatccaac aatggacaac aatcccaaca tcaacgagtg	7500
cattccttac aactgcctga gcaacctga ggttgagggt ctgggtggag aacggattga	7560
gactggttac acacctatcg acatctcggt gtcacttacc caattccttt tgcagagtt	7620
cgtgcccggt gctggattcg tgcttgaggt tgcgatatc atttggggaa tctttgggtc	7680
ctctcaatgg gacgcctttc ttgtacagat agagcagtta attaaccaa gaatagaaga	7740
attcgctagg aaccaagcca tctcaagggt agaaggctc agcaaccttt accagattta	7800
cgcagaatct tttcgagagt ggaagcaga cccgaccaat cctgccttaa gagaggagat	7860
gcgcattcaa ttcaatgaca tgaacagcgc gctgacgacc gcaattccgc tcttcgccgt	7920
tcagaattac caagttcctc ttttatccgt gtacgtgcag gctgccacc tgcactgtc	7980
ggtgctccgc gatgtctccg tgttcggaca acggtggggc tttgatgccg caactatcaa	8040



tagtcgttat aatgatctga ctaggcttat tggcaactat accgattatg ctgttcgctg	8100
gtacaacacg ggtctcgaac gtgtctgggg accggattct agagattggg tcagggtacaa	8160
ccagttcagg cgagagtga cactaactgt cctagacatt gtcgctctct tcccaacta	8220
cgactctagg cgctaccaa tccgtactgt gtcacaattg acccgggaaa tctacacaaa	8280
cccagtcctc gagaacttcg acggtagctt tcgaggctcg gctcagggca tagagagaag	8340
catcaggtct ccacacctga tggacatatt gaacagtatc acgatctaca ccgatgcgca	8400
ccgcggttat tactactggt cagggcatca gatcatggca tcaccggttg ggttctctgg	8460
accagaattc actttccac tttacgggac tatgggcaat gcagctccac aacaacgtat	8520
tgttgctcaa ctcggtcagg gcgtgtatag aacctgtcc agcactctat ataggagacc	8580
tttcaacatc ggcatcaaca atcaacaatt gtctgtgctt gacgggacag aatttgcta	8640
tggaaacctc tcaaactcgc catccgctgt ctacagaaag agcggaacag ttgatagctt	8700
ggatgagatc cctccacaga acaacaacgt tccacctagg caagggttta gccatgcct	8760
tagccatgtg tccatgttcc gttcaggctt tagtaatagc agcgtagta tcatcagagc	8820
tccgatgttc tcttggtac atcgtagtgc tgagttaaac aacataattg catccgatag	8880
cattactcag atcccagctg tcaaggggaa ctttctcttt aatgggtctg tcatttcagg	8940
accaggattc actggaggcg acttggttag gctgaattct tccggcaaca acatccagaa	9000
tagagggtat attgaagtgc ccattcactt cccatcgaca tctaccagat atcgtgttcg	9060
tgtaagggtat gcctctgtta cccctattca cctcaacgtc aattggggta attcctccat	9120
cttttccaat acagtaccag cgacagctac atccttgat aatctccaat ctacgattt	9180
cggttacttc gaaagtgcc atgccttcac ctcttccta ggtaacatag taggtgttag	9240
aaatttctcc ggaaccgcc gagtgataat cgaccgcttc gaattcattc ccgttactgc	9300
aacgctcgag gcagagtctg acttggaag agcacagaag gcggtgaatg ctctgttcac	9360
ttcgtccaat cagattgggc tcaagacaga tgtgactgac tatcacatcg atcgcgtttc	9420
caaccttgtt gagtgcctct ctgatgagtt ctgtttggat gagaagaagg agttgtccga	9480
gaagggtcaa catgctaagc gacttagtga tgagcggaaac ttgcttcaag atcccaactt	9540
tcgcgggatc aacaggcaac tagatcgtgg atggagggga agtacggaca tcaccattca	9600
aggaggtgat gatgtgttca aggagaacta tgttacgctc ttgggtacct ttgatgagt	9660
ctatccaaca tacctgtacc agaagataga tgaatcgaaa ctcaaagcct acacaagata	9720
ccagttgaga gggtacatcg aggacagtca agacctgag atctacctca tcagatacaa	9780
cgccaaacat gagacagtca atgtgcctgg gacgggttca ctctggccac tttcagcccc	9840
aagtcccatc ggcaagtgtg cccatcactc acaccacttc tccttggaac tagacgttgg	9900
ctgtaccgac ctgaacgaag acctcggtgt gtgggtgatc ttcaagatca agactcaaga	9960

tggccatgcc aggctaggca atctggagtt tctagaagag aaaccacttg ttggagaagc	10020
cctcgctaga gtgaagaggg ctgagaagaa gtggagggac aagagagaga agttggaatg	10080
ggaaacaaac attgtgtaca aagaagccaa agaaagcggt gacgctctgt ttgtgaactc	10140
tcagtatgat aggctccaag ctgataccaa catagctatg attcatgctg cagacaaacg	10200
cgttcatagc attcggaag cttaccttcc tgaacttagc gtgattccgg gtgtcaatgc	10260
tgctatcttt gaagagttag aagggcgcat cttcactgca ttctccttgt atgatgcgag	10320
gaatgtcatc aagaatgggtg acttcaacaa tggcctatcc tgctggaatg tgaaagggca	10380
cgtagatgta gaagaacaga acaatcaccg ctctgtcctt gttgttcctg agtgggaagc	10440
agaagtttca caagaagttc gtgtctgtcc tggctgtggc tacattcttc gtgttaccgc	10500
gtacaaagaa ggatacggag aaggttgctg caccatacac gagattgaga acaacaccga	10560
cgagctgaag ttcagcaact gcgtcgagga ggaagtctac ccaaacaaca ccgtaacttg	10620
caatgactac actgcgactc aagaggagta tgagggtact tacacttctc gcaatcgagg	10680
atacgatgga gcctatgaga gcaactcttc tgtaccgct gactatgcat cagcctatga	10740
ggagaaggct tacaccgatg gacgtagga caatccttgc gaatctaaca gaggctatgg	10800
ggactacaca ccgttaccag ccggctatgt caccaaagag ttagagtact ttccagaaac	10860
cgacaagggt tggattgaga ttggagaaac ggaaggaaca ttcattgttg atagcgtgga	10920
gttacttctg atggaggaat gagtagttag cttaatcacc tagagctcgg ttacctatca	10980
aaatctattt agaaatacac aatattttgt tgcaggcttg ctggagaatc gatctgctat	11040
cataaaaatt acaaaaaaat tttatttgcc tcaattattt taggattggg attaaggacg	11100
cttaaattat ttgtcgggtc actacgcac atgtgtgattg agaagatcag cgatacgaaa	11160
tattcgtagt actatcgata atttatttga aaattcataa gaaaagcaaa cgttacatga	11220
attgatgaaa caatacaaag acagataaag ccacgcacat ttaggatatt ggccgagatt	11280
actgaatatt gagtaagatc acggaatttc tgacaggagc atgtcttcaa ttcagcccaa	11340
atggcagttg aaatactcaa accgccccat atgcaggagc ggatcattca ttgtttgttt	11400
ggttgccttt gccaacatgg gagtccaagg ttgcggccgc gcgccgaccc agctttcttg	11460
tacaaagtgg ttgcggccgc ttaattaaat ttaaattgcc gggcgtttaa acgcggccgc	11520
ttaattaagg ccggcctgca gcaaaccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga	11580
atccaatgtt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca	11640
atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aatgaagaa tgtacagata caagatccta	11700
tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcaagaaa	11760
agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga	11820
ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct	11880



tatcacaaag gaatcttata cccactact tatcctttta tttttttccg tgtcattttt	11940
gcccttgagt tttcctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt	12000
tggtgtaagc ttttttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt	12060
gtagatctcc atgtctccgg agaggagacc agttgagatt aggccagcta cagcagctga	12120
tatggccgcg gtttgtgata tcgttaacca ttacattgag acgtctacag tgaactttag	12180
gacagagcca caaacaccac aagagtggat tgatgatcta gagagggtgc aagatagata	12240
cccttggttg gttgctgagg ttgaggggtg tgtggctggg attgcttacg ctgggccctg	12300
gaaggctagg aacgcttacg attggacagt tgagagtact gtttacgtgt cacataggca	12360
tcaaaggttg ggcctaggat ccacattgta cacacatttg cttagtcta tggaggcgca	12420
aggttttaag tctgtggttg ctgttatagg ccttccaaac gatccatctg ttaggttgca	12480
tgaggctttg ggatacacag cccggggtag attgcgcgca gctggataca agcatggtgg	12540
atggcatgat gttgggtttt ggcaaagga ttttgagttg ccagctctc caaggccagt	12600
taggccagtt acccagatct gaggtaccct gagcttgagc ttatgagctt atgagcttag	12660
agctcggatc cactagtaac ggccgccagt gtgctggaat tcgcccttga ctagataggc	12720
gccagatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggtg ttgatcctat ctgtgttgaa	12780
atagttgcgg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagtg	12840
aggtgggcta tggctctcag ttccttgtag aagcgcttg tctaagggtgc agaggtgta	12900
gcgggatgaa gcaaaagtg ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt	12960
aaagtatgta ttcatacta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat	13020
gtctttattg tcgccgatg taatcggcgt cacaaaataa tccccggtga ctttctttta	13080
atccaggatg aaataatat ttattataat ttttgcgatt tgggtccgta taggaattga	13140
agtgtgcttg cggtcgccac cactcccatt tcataatttt acatgtattt gaaaaataa	13200
aatttatggt attcaattta aacacgtata cttgtaaaga atgatattt gaaagaaata	13260
tagtttaaatt atttattgat aaaataacaa gtcaggtatt atagtccaag caaaaacata	13320
aatttatgta tgcaagttta aattcagaaa tttttcaata actgattata tcagctggta	13380
cattgccgta gatgaaagac tgagtgcgat attatggtgt aatacatagc ggccgggttt	13440
ctagtcaccg gttaggatcc gtttaaactc gaggctagcg catgcacata gacacacaca	13500
tcattctcatt gatgcttggt aataattgtc attagattgt ttttatgcat agatgcactc	13560
gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa cggatgtgac ttcagtacat taaaaacgtc	13620
cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgattt gcggtgggca aggctctctt	13680
tcagaaagac aggcggccaa aggaacccaa ggtgaggtgg gctatggctc tcagttcctt	13740
gtggaagcgc ttggtctaag gtgcagaggt gttagcggga tgaagcaaaa gtgtccgatt	13800



```

gcaatctggt tgccagtagc ttgaatacac tagacccatg ttggtggctt gcaagtcgta 13860
ttatcagtggt tcttgcttcc ttcaaaagtt tgaacgatat tattataaag agaaagagtg 13920
ttgtggataa tctaatagag ctggaccacg ttattctcaa gatctaagca ttccatatac 13980
cccattgaaa gatatgaaga attatgtcac catgctccaa gtgcttatta agctactcca 14040
gctaactagt atttgaatca ggccctcaca catgtacttt caaggtgtcc caaacgcgcc 14100
aaacattacc acagtgccaa aaagatgtga aagagttcct catcggcaac cccacaacga 14160
ttacaattcg cattaggaag gacatgaatc attttcatga aactcttggt gggaagaaca 14220
ttgtgatcta tctgccataa gaaaaattca cgttctcaag aagatgaata aatatataac 14280
aaataaaaat ataataatat caagttataa ataaaatttc tatccctcat gtttactcgc 14340
aagtggggta aatgtgaaat ttttggtttt tttttttaca atattttttg tttccttttt 14400
taatcgtctt aaaaagtcag cgggttttcc tatatgtaaa aatgaactga tccaacggct 14460
agtataactc tcccacgggt ggacatgtga tgggtctctca ccctagccac cgtcccggtta 14520
catagcccac aatagctgaa gtccgctcaga aaacttaca aagcgggtgcg tttcaagggga 14580
tacaagacat gcagcagccg ttgctctaaa ccctaaacta aactaaaacc ctagccagtt 14640
gtcggtgatc accatttggtg taaaaccgtc atggcgatga aaactgcaga agaacacgaa 14700
gtgggtatct cctgcttcat ttccgacctt cctggcttcc gcggaatttt aaagcaaagg 14760
tctcttcatt ttctacatta aaaatcatta ttaccttctt cactgcacct cctttgttta 14820
atgatgaagt gcattattca acagtgtctt gttagtgtcg attcaattga atatgattca 14880
ggatattctga ttttatctgt aatgaagtgg acagagatgg aacagttggt caattgtcct 14940
cgcttgatgc ccctcaagag gagccagagg tctaattatc cgtgatcatt gataaattga 15000
tttgtgctgt ttttggtttt tagtatctaa ctttttttgg gcttatttca gagttttcag 15060
gaaaatggaa ccaacacatc cgacaatggt gtaagttagt cctctcagat tgaatctttc 15120
aagtctcttg ctggggactc tgatgctggt cttttggaag aatttattaa 15170

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Трансгенна рослина сої, яка має стійкість до гербіциду і підвищену стійкість до комах, де вказана трансгенна рослина сої містить послідовність ДНК, що містить в собі SEQ ID NO: 14, де вказаним гербіцидом є глюфосинат, і де вказаною комахою є *Pseudoplusia includens* (соевий п'ядак), *Anticarsia gemmatilis* (листовійка квасолі), *Spodoptera frugiperda* (капустяна совка) або *Heliothis virescens* (тютюнова совка).
- 10 2. Насіння трансгенної рослини сої за пунктом 1, де вказане насіння містить послідовність ДНК, що містить SEQ ID NO: 14.
3. Трансгенна рослина сої за п. 1, де трансгенна рослина сої стійка до *Pseudoplusia includens* (соевий п'ядак) і стійка до глюфосинату.
- 15 4. Трансгенна рослина сої, отримана шляхом вирощування насіння за п. 2, де вказана рослина сої містить послідовність ДНК, що має щонайменше 95 % ідентичності послідовності SEQ ID NO: 14, де вказана рослина сої має стійкість до гербіциду і застосовується для підвищення стійкості рослини до комах, де вказаним гербіцидом є глюфосинат, і де комахою є *Pseudoplusia*

*includens* (соевий п'ядак), *Anticarsia gemmatalis* (листовійка квасолі), *Spodoptera frugiperda* (капустяна совка) або *Heliothis virescens* (тютюнова совка).

5. Трансгенна рослина сої за п. 1, де вказана ДНК містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з пар основ 1258-1288 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1223-1323 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1173-1373 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1073-1473 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 160-190 послідовності SEQ ID NO: 2; пар основ 125-225 послідовності SEQ ID NO: 2 і пар основ 75-275 послідовності SEQ ID NO: 2, і їхніх комплементів.

6. Виділена послідовність ДНК, що містить одну або більше послідовностей, вибраних з групи, яка складається з пар основ 1258-1288 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1223-1323 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1173-1373 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1073-1473 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 160-190 послідовності SEQ ID NO: 2; пар основ 125-225 послідовності SEQ ID NO: 2 і пар основ 75-275 послідовності SEQ ID NO: 2, де вказана послідовність є діагностичною відносно присутності SEQ ID NO: 14.

7. Полінуклеотид, що містить послідовність стику події трансформації сої 9582.816.15.1, де вказана послідовність стику містить принаймні одну послідовність, вибрану з групи, яка складається з пар основ 1258-1288 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1223-1323 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1173-1373 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1073-1473 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 160-190 послідовності SEQ ID NO: 2; пар основ 125-225 послідовності SEQ ID NO: 2 і пар основ 75-275 послідовності SEQ ID NO: 2, і їхніх комплементів.

8. Товарний продукт, отриманий з трансгенної рослини сої за п. 1, де вказаний товарний продукт вибраний з групи, що складається з кормового соєвого борошна, харчового борошна, соєвого білкового концентрату і соєвої олії, і де вказаний продукт містить ДНК, що містить SEQ ID NO: 14.

9. Частина трансгенної рослини сої за п. 1, де вказана частина вибрана з групи, що складається з пилку, зародків, квіток, пагонів, коренів і листя, і де вказана частина містить ДНК, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовності SEQ ID NO: 14.

10. Спосіб боротьби з комахами, де вказаний спосіб включає включення в раціон комах трансгенної рослини сої, де вказана трансгенна рослина сої містить ДНК, яка містить SEQ ID NO: 14, таким чином здійснюючи боротьбу з комахами, де вказаною комахою є *Pseudoplusia includens* (соевий п'ядак), *Anticarsia gemmatalis* (листовійка квасолі), *Spodoptera frugiperda* (капустяна совка) або *Heliothis virescens* (тютюнова совка).

11. Спосіб захисту сільськогосподарської культури сої від пошкодження гербіцидом глюфосинатом, де вказаний спосіб включає садіння сільськогосподарської культури сої, яка включає трансгенну рослину сої за п. 1, нанесення гербіциду глюфосинату на сільськогосподарську культуру сої, де вказана сільськогосподарська культура сої включає рослини сої, що містять ДНК, яка містить послідовність, вибрану з групи, що складається з пар основ 1258-1288 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1223-1323 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1173-1373 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 1073-1473 послідовності SEQ ID NO: 1; пар основ 160-190 послідовності SEQ ID NO: 2, пар основ 125-225 послідовності SEQ ID NO: 2 і пар основ 75-275 послідовності SEQ ID NO: 2.

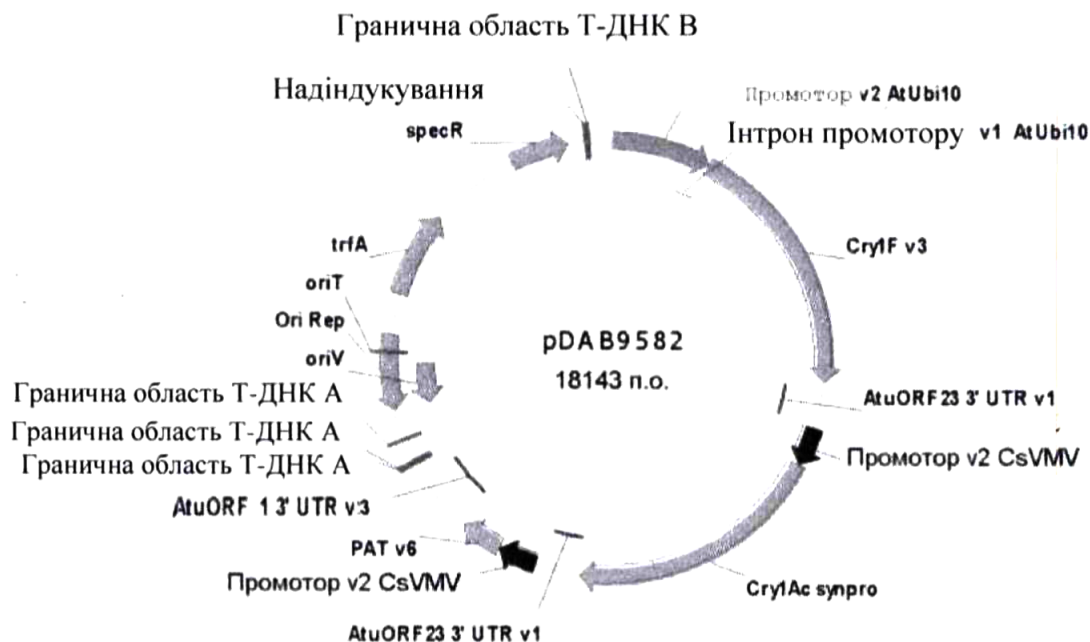
12. Трансгенна рослина сої за будь-яким з пп. 1, 3, 4 або 5, де вказана трансгенна рослина сої містить вставку ДНК, що експресує гени Cry1F, Cry1Ac і PAT, де вказана вставка ДНК фланкована послідовністю SEQ ID NO: 1 на 5'-кінці і послідовністю SEQ ID NO: 2 на 3'-кінці.

13. Спосіб боротьби зі шкідниками соєвих бобів, насіння, кормового борошна або харчового борошна, де спосіб включає надання можливості для вказаних шкідників поглинати вказані соєві боби, насіння, кормове борошно або харчове борошно, які отримані з рослин сої, які містять послідовність ДНК, що містить SEQ ID NO: 14, таким чином здійснюючи боротьбу зі шкідниками, де вказаним шкідником є *Pseudoplusia includens* (соевий п'ядак), *Anticarsia gemmatalis* (листовійка квасолі), *Spodoptera frugiperda* (капустяна совка) або *Heliothis virescens* (тютюнова совка).

14. Спосіб отримання трансгенної рослини сої за будь-яким з пп. 1, 3, 4 або 5, де вказаний спосіб включає трансформацію рослини сої послідовністю ДНК, що містить кодуючі послідовності генів Cry1F, Cry1Ac і PAT в межах послідовності SEQ ID NO: 14.

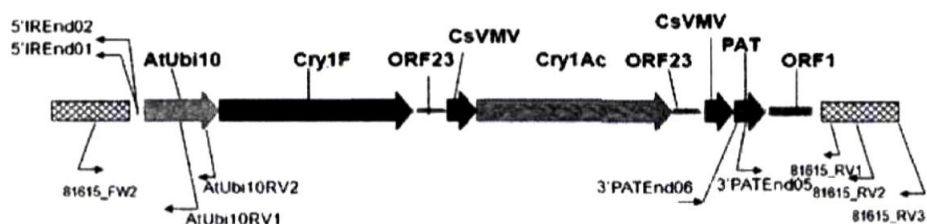
15. Застосування трансгенної рослини сої за будь-яким з пп. 1, 3, 4 або 5, або насіння за п. 2 для отримання трансгенної сільськогосподарської культури сої, що має стійкість до гербіциду і підвищену стійкість до комах, де зазначеним гербіцидом є глюфосинат, і де вказаною комахою є *Pseudoplusia includens* (соевий п'ядак), *Anticarsia gemmatalis* (листовійка квасолі), *Spodoptera frugiperda* (капустяна совка) або *Heliothis virescens* (тютюнова совка).

На фігурі 1 представлена карта плазміді pDAB9582, що містить кластери експресії генів *cry1F v3*, *cry1Ac* і *pat v6*



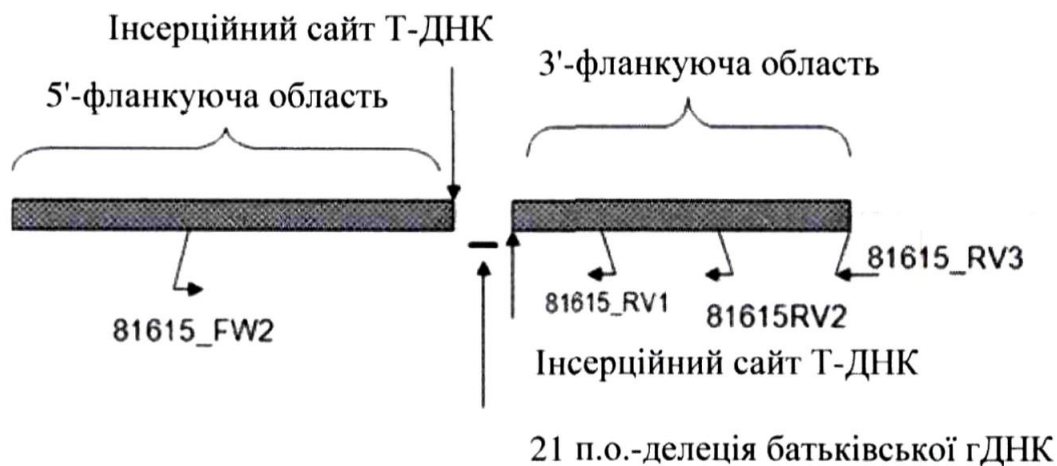
Фіг.1

Діаграма, що ілюструє локалізацію праймерів для підтвердження 5'-і 3'-граничної послідовності трансформанта сої pDAB9582.816.15.1.



Фіг.2

Діаграма, на якій представлена геномна послідовність, розташована в певному порядку в трансформанті сої pDAB9582.816.15.1



Фіг.3

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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