



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124487** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 6/46 (2018.01)

A01H 5/10 (2018.01)

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

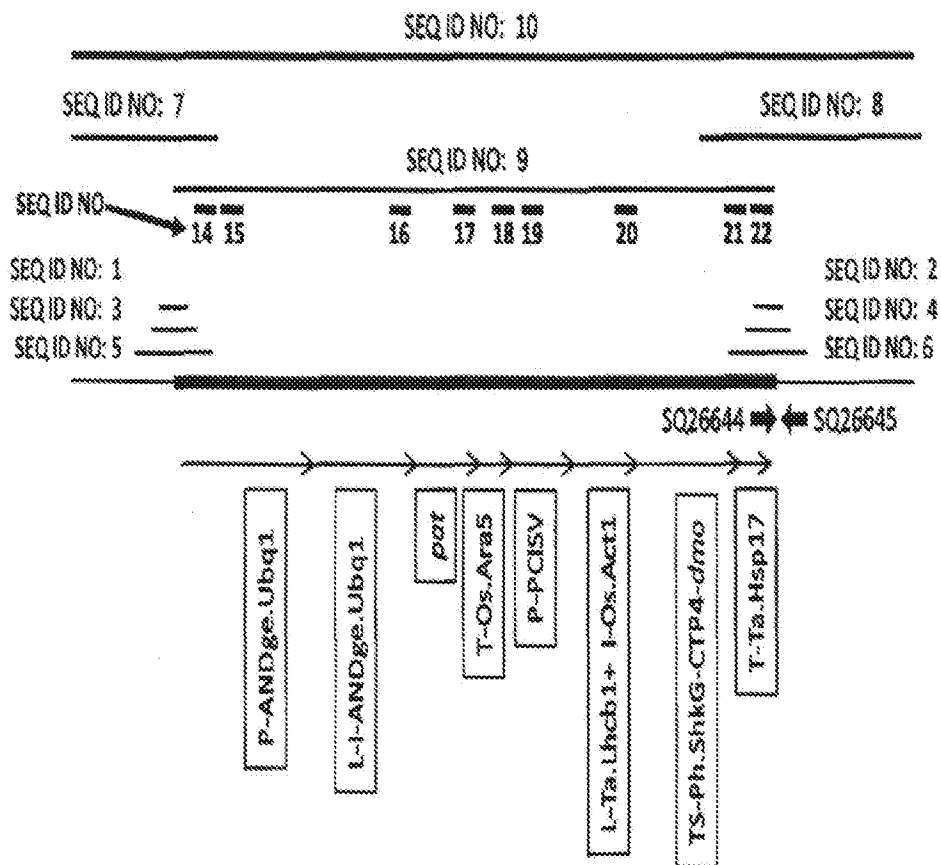
(21) Номер заявки: а 2016 10556 (22) Дата подання заявки: 10.03.2015 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 30.09.2021 (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/968,342 (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 20.03.2014 (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US (41) Публікація відомостей про заявку: 12.12.2016, Бюл.№ 23 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 29.09.2021, Бюл.№ 39 (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2015/019663, 10.03.2015	(72) Винахідник(и): Бернс Вен К. (US), Гоулі Майкл І (US), Хуан Цзінтай (US), МакКен Мелінда К. (US), Шао Айхуа (US), Спаркс Оскар С. (US), Стекер Мартин А. (US), Вей Ліпін (US) (73) Володілець (володільці): МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖІ еЛелСі, 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America (US) (74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367 (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2011/066382 A1, 03.06.2011 WO 2008/051633 A2, 02.05.2008 US 2012/255050 A1 04.10.2012 Qiudeng Que et al, "Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities", GM Crops, Landes Bioscience, United States, 01.07.2010, vol. 1, no. 4, P. 220 - 229
--	---

(54) РЕКОМБІНАНТНА МОЛЕКУЛА ДНК, ЯКА НАДАЄ РОСЛИНІ КУКУРУДЗИ СТІЙКОСТІ ДО ГЛЮФОСИНАТУ І ДИКАМБА, ТА СПОСІБ ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується рекомбінантної молекули ДНК, яка надає рослині кукурудзи стійкість до глюфосинату та дикамба; способу детекції наявності такої молекули; трансгенної рослини, одержаної з використанням такої молекули; та способу вирощування такої рослини.

UA 124487 C2



©irypa 1

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[001] Дана заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США № 61/968342, поданою 20 березня 2014 року.

ВКЛЮЧЕННЯ ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5 [002] Перелік послідовностей міститься у файлі під назвою "MONS362WO.txt", розміром 29,4 кб (виміряно у MS-Windows) та створеному 9 березня 2015 року, подається у цьому документі в електронній формі та включений у цей документ за допомогою посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

10 [003] Цей винахід відноситься до рекомбінантних молекул ДНК, унікальних для трансгенного трансформанту кукурудзи MON 87419. Цей винахід також відноситься до трансгенних рослин, частин, насіння, клітин кукурудзи та сільськогосподарських продуктів, що містять трансформант кукурудзи MON 87419, а також до способів їх застосування. Трансгенні рослини кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419, проявляють стійкість до гербіцидів дікамба та глюфосинату.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

15 [004] Кукурудза (*Zea mays*) є важливою сільськогосподарською культурою у багатьох регіонах світу. Для цієї культури застосовувались способи біотехнології з метою отримання кукурудзи з бажаними ознаками. Одною з таких бажаних ознак є стійкість до гербіцидів. Експресія гетерологічного гену, також відомого як трансген, для стійкості до гербіциду у рослині може надати стійкості до гербіцидів всій рослині. Однак, на експресію трансгену, а отже на його ефективність можуть впливати багато різних факторів, включаючи орієнтацію та композицію касети, яка відповідає за експресію окремого трансгену, переміщеного в хромосому рослини, та хромосомну локалізацію, та геномний результат трансгенної інсерції. Це додатково ускладнюється в трансгенних рослинах з безліччю молекулярно-зв'язаних трансгенів, які визначають окремі ознаки. У такому випадку, коректна експресія кожного з молекулярно-зв'язаних трансгенів у рослині повинна бути результатом такої ж трансгенної інсерції (що також називається мультигенним трансформантом). У таких випадках, необхідно розробити та протестувати багато касет експресії, кожна з яких має іншу конфігурацію трансгенів та елементів експресії, а потім отримати та проаналізувати велику кількість окремих об'єктів трансформації рослин за допомогою багатьох поколінь рослин для того, щоб відібрати трансгенний трансформант з переважними властивостями по відношенню до кожної з бажаних ознак та оптимальними фенотипічними та сільськогосподарськими характеристиками, необхідними для того, щоб зробити його придатним для комерційних цілей. Такий відбір потребує обширних молекулярних досліджень, а також багаторічних тепличних та польових випробувань в різних місцях та при різних умовах, щоб таким чином можна було зібрати значну кількість агрономічних, фенотипічних та молекулярних даних. Отримані в результаті дані та спостереження мають бути потім проаналізовані групами вчених та агрономів з метою відбору трансформанту, придатного для комерційного використання у сільському господарстві в широкому діапазоні генетичних ознак та в різних польових умовах. Будучи відібраним, комерційний трансформант, що визначає бажані ознаки, може бути інтрогресованим в інші фонові генотипи з використанням методів розведення рослин, тим самим отримуючи ряд різних сортів сільськогосподарських культур, які містять бажану ознаку та, відповідним чином, адаптовані до конкретних місцевих умов зростання.

20 [005] Для того, щоб створити трансгенну рослину, що містить один об'єкт трансформації, частину конструкції рекомбінантної ДНК переносять у геном клітини кукурудзи з використанням методів трансформації рослин. Ця клітина кукурудзи згодом використовується для отримання унікальної рослини R₀, яку потім можна буде використати для отримання трансгенних рослин-потомків. Геном рослин-потомків містить унікальний трансформант, ці рослини можуть бути протестовані на бажану ознаку (ознаки), а також на агрономічну продуктивність. На ефективність трансформанту можуть впливати cis та/або trans фактори відносно сайту інтеграції в об'єкті трансформації. На фенотип, що визначається трансформантом, також може впливати розмір та структура ДНК-конструкції, яка може варіювати в залежності від комбінації генетичних елементів у касеті експресії, кількості трансгенів, кількості касет експресії, а також конфігурації таких елементів та таких касет. Продуктивність цього трансформанту може додатково ускладнюватись такими факторами, які пов'язані з розвитком рослини, добовими, сезонними та просторовими патернами експресії трансгенів; або зовнішніми факторами, наприклад, умовами оточуючого середовища для росту рослин, наявністю води, наявністю азоту, теплом або стресом. Таким чином, можливість створити трансформант, що визначає бажаний набір фенотипічних ознак, не є легко передбачуваною.

КОРОТКИЙ ОПИС СУТНОСТІ ВІНАХОДУ

[006] Цей винахід відноситься до рекомбінантної молекули ДНК, що містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:1-10. Цей винахід також відноситься до рекомбінантної ДНК, отриманої із трансгенної рослини кукурудзи або насінини, що містять трансформант кукурудзи MON 87419, характерний зразок насінини, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, був депонований у ATCC під номером доступу РТА-120860. Цей винахід також відноситься до рекомбінантної молекули ДНК, яка є ампліконом для діагностики наявності ДНК, отриманої із трансформанту кукурудзи MON 87419. Цей винахід також відноситься до молекули ДНК, яка знаходиться у рослині кукурудзи, клітині, насінині, рослині-потомку або частині рослини, отриманих із трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419.

[007] Цей винахід відноситься до молекули ДНК з достатньою довжиною безперервної послідовності ДНК SEQ ID NO:10, щоб функціонувати у якості зонду ДНК, який гібридується при жорстких умовах гібридизації з молекулою ДНК, що містить ДНК-послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:1-10, та не гібридується в жорстких умовах гібридизації з молекулою ДНК, що не містить ДНК-послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:1-10. Винахід також відноситься до пари молекул ДНК, що містить першу молекулу ДНК та другу молекулу ДНК, при чому перша молекула ДНК являє собою фрагмент послідовності SEQ ID NO:9, а друга молекула ДНК являє собою фрагмент геномної ДНК кукурудзи трансформанту кукурудзи MON 87419, та при цьому і перша, і друга молекули ДНК містять послідовність ДНК із суміжних нуклеотидів достатньої довжини, щоб функціонувати у якості праймерів ДНК при їх спільному використанні у реакції ампліфікації з ДНК, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, для отримання амплікону для діагностики трансформанта кукурудзи MON 87419 у зразку.

[008] Винахід відноситься до способу детекції наявності трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК шляхом приведення в контакт зразка з ДНК-зондом, піддаючи зразок та зонд ДНК жорстким умовам гібридизації, та детекції гібридизації ДНК зонда до молекули ДНК у зразку, де гібридизація ДНК зонду з молекулою ДНК вказує на наявність трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК.

[009] Винахід відноситься до способу детекції наявності трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК шляхом приведення в контакт зразка з парою ДНК праймерів, виконуючи реакцію ампліфікації, достатню для отримання ДНК амплікону, що містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:1-8 та SEQ ID NO:10, та детекції наявності амплікону ДНК в реакції, при чому наявність амплікону ДНК в реакції вказує на наявність трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК.

[0010] Винахід також відноситься до набору для детекції ДНК, що містить щонайменше одну молекулу ДНК, що містить послідовність ДНК із суміжних нуклеотидів SEQ ID NO:10 довжиною, достатньою для того, щоб функціонувати у якості специфічного праймера або зонду для детекції наявності трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК.

[0011] Цей винахід відноситься до рекомбінантної рослини кукурудзи, насінини, клітини, частини рослини або товарного продукту, що містить молекулу ДНК з послідовністю ДНК, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO:1-10. Цей винахід також відноситься до трансгенної рослини кукурудзи, насінини або клітини, стійким до гербіцидів глюфосинату, або дікамба, або глюфосинату та дікамба. Цей винахід також відноситься до трансгенної рослини кукурудзи, насінини, клітини, частини рослини або товарного продукту, що містять трансформант кукурудзи MON 87419. Цей винахід також відноситься до рослини кукурудзи або насінини, що являють собою гібрид, який має щонайменше одну батьківську рослину, що містить трансформант кукурудзи MON 87419.

[0012] Цей винахід відноситься до способу боротьби із бур'янами на ділянці, що включає посадку трансгенної кукурудзи, яка містить трансформант кукурудзи MON 87419, на ділянці та застосування ефективної дози гербіцидів дікамба або глюфосинату, або дікамба та глюфосинату для боротьби із бур'янами на ділянці, не ушкоджуючи трансгенної кукурудзи. Винахід також відноситься до способу боротьби із бур'янами шляхом застосування ефективної дози гербіциду глюфосинату від близько 0,1 фунта (0,045 кг) кислотного еквіваленту на акр (0,405 га) до близько 16 фунтів (7,257 кг) кислотного еквіваленту на акр гербіциду глюфосинату впродовж періоду вегетації. Винахід також відноситься до способу боротьби із бур'янами шляхом застосування ефективної дози гербіциду глюфосинату від близько 0,4 фунта (0,181 кг) кислотного еквіваленту на акр (0,405 га) до близько 1,59 фунтів (0,721 кг) кислотного еквіваленту на акр гербіциду глюфосинату впродовж періоду вегетації. Винахід також відноситься до способу боротьби із бур'янами шляхом застосування ефективної дози гербіциду дікамба від близько 0,1 фунта (0,045 кг) кислотного еквіваленту на акр (0,405 га) до близько 16

фунтів (7,257 кг) кислотного еквіваленту на акр гербіциду дікамба впродовж періоду вегетації. Винахід також відноситься до способу боротьби із бур'янами шляхом застосування ефективної дози гербіциду дікамба від близько 0,5 фунтів (0,227 кг) кислотного еквіваленту на акр (0,405 га) до близько 2 фунтів (0,906 кг) кислотного еквіваленту на акр гербіциду дікамба впродовж

5

[0013] Цей винахід також відноситься до способу отримання трансгенної рослини кукурудзи, стійкої до гербіцидів глюфосинату та дікамба, шляхом статевого схрещування трансгенної рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, з іншою рослиною кукурудзи, збору отриманого насіння, вирощування насіння для отримання рослин-потомків, обробки рослин-потомків гербіцидами глюфосинатом або дікамба, або глюфосинатом та дікамба, а також відбору рослини-нащадка, стійкої до гербіцидів глюфосинату та дікамба. Цей винахід також відноситься до способу отримання трансгенної рослини кукурудзи, стійкої до гербіцидів глюфосинату та дікамба, шляхом самозапилення трансгенної рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, збору отриманого насіння, вирощування насіння для отримання рослин-потомків, обробки рослин-потомків гербіцидами глюфосинатом або дікамба, або дікамба та глюфосинатом, а також відбору рослини-нащадка, стійкої до гербіцидів глюфосинату та дікамба.

10

15

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[0014] Фігура 1: ілюструє організацію трансгенної вставки у геном рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Горизонтальні лінії відповідають відносним положенням SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; товсті стрілки, помічені SQ26644 та SQ26645, означають приблизне положення пари праймерів, що використовуються для ідентифікації трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419; товсті короткі лінії під номером від 14 до 22 являють собою відносно положення унікальних послідовностей рекомбінантних конструктів всередині вставки ДНК (SEQ ID NO:9) та число відноситься до відповідного SEQ ID NO кожної, відповідно; тонкі горизонтальні стрілки представляють відносну організацію двох окремих касет експресії вбудованої ДНК гетерологічного трансгена, трансформанту кукурудзи MON 87419, та блоки вказують на окремі елементи двох касет експресії; велика літера 'P' означає промоторний елемент, велика літера 'L' означає лідерний елемент, велика літера 'I' означає інтрон, великі літери 'TS' позначають транзитний пептид хлоропласту, велика літера 'T' означає 3'-елемент термінації транскрипції та поліаденілювання (3' UTR), pat означає кодуючу ділянку білку фосфінотрицинацетилтрансферази (PAT) та dmo означає кодуючу ділянку білку дікамба монооксигенази (DMO).

20

25

30

35

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

[0015] SEQ ID NO:1 являє собою послідовність ДНК довжиною у тридцять нуклеотидів, що відображає 5'-з'єднання геномної ДНК кукурудзи та трансгенної вставки. SEQ ID NO:1 відповідає позиціям нуклеотидів від 1232 до 1261 з SEQ ID NO:10.

40

[0016] SEQ ID NO:2 являє собою послідовність ДНК довжиною у тридцять нуклеотидів, що відображає 3'-з'єднання геномної ДНК кукурудзи та трансгенної вставки. SEQ ID NO:2 відповідає позиціям нуклеотидів від 7994 до 8023 з SEQ ID NO:10.

[0017] SEQ ID NO:3 являє собою послідовність ДНК довжиною у шістьдесят нуклеотидів, що відображає 5'-з'єднання геномної ДНК кукурудзи та трансгенної вставки. SEQ ID NO:3 відповідає позиціям нуклеотидів від 1217 до 1276 з SEQ ID NO:10.

45

[0018] SEQ ID NO:4 являє собою послідовність ДНК довжиною у шістьдесят нуклеотидів, що відображає 3'-з'єднання геномної ДНК кукурудзи та трансгенної вставки. SEQ ID NO:4 відповідає позиціям нуклеотидів від 7979 до 8038 з SEQ ID NO:10.

[0019] SEQ ID NO:5 являє собою послідовність ДНК довжиною у сто нуклеотидів, що відображає 5'-з'єднання геномної ДНК кукурудзи та трансгенної вставки. SEQ ID NO:5 відповідає позиціям нуклеотидів від 1197 до 1296 з SEQ ID NO:10.

50

[0020] SEQ ID NO:6 являє собою послідовність ДНК довжиною у сто нуклеотидів, що відображає 3'-з'єднання геномної ДНК кукурудзи та трансгенної вставки. SEQ ID NO:6 відповідає позиціям нуклеотидів від 7959 до 8058 з SEQ ID NO:10.

55

[0021] SEQ ID NO:7 являє собою послідовність ДНК довжиною у 1771 нуклеотидів, що відображає 1246 нуклеотидів 5'-фланкуючої геномної ДНК кукурудзи та 525 нуклеотидів 5'-кінця трансгенної вставки.

[0022] SEQ ID NO:8 являє собою послідовність ДНК довжиною у 1767 нуклеотидів, що відображає 516 нуклеотидів 3'-кінця трансгенної вставки та 1251 нуклеотидів 3'-фланкуючої геномної ДНК кукурудзи.

60

[0023] SEQ ID NO:9 являє собою послідовність ДНК довжиною у 6762 нуклеотиди, що відповідає трансгенній вставці трансформанта кукурудзи MON 87419.

[0024] SEQ ID NO:10 являє собою послідовність ДНК довжиною у 9259 нуклеотидів, що відображає трансформант кукурудзи MON 87419; послідовність містить 5'-фланкуючу послідовність геномної ДНК від 1 до 1246 позицій, ДНК трансгенної вставки від 1247 до 8008 позицій та 3'-фланкуючу послідовність геномної ДНК від 8009 до 9259 позицій.

[0025] SEQ ID NO:11 являє собою послідовність ДНК довжиною у 33 нуклеотиди, що відповідає праймеру, позначеному як SQ26644, та який використовується для ідентифікації трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку; вона відповідає позиціям від 7966 до 7998 з SEQ ID NO:10.

[0026] SEQ ID NO:12 являє собою послідовність ДНК довжиною у 24 нуклеотиди, що відповідає праймеру, позначеному як SQ26645, та який використовується для ідентифікації трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку; вона відповідає позиціям від 8022 до 8045 з SEQ ID NO:10.

[0027] SEQ ID NO:13 являє собою послідовність ДНК довжиною у 19 нуклеотидів, що відповідає зонду, позначеному як PB11207, та який використовується для ідентифікації трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку; вона відповідає позиціям від 8002 до 8020 з SEQ ID NO:10.

[0028] SEQ ID NO:14-22 являють собою послідовності ДНК, що відповідають унікальним послідовностям у межах трансгенної вставки трансформанта кукурудзи MON 87419.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[0029] Наступні визначення та способи запропоновані для того, щоб краще визначити цей винахід та направити середнього спеціаліста у цій галузі техніки в практичному підході за цим винаходом. Якщо не вказано інше, терміни слід розуміти у відповідності зі звичайним використанням середніми спеціалістами у цій галузі техніки.

[0030] Сучасні методи трансформації рослин використовуються для створення генетично модифікованих рослин. Термін "трансгенний" також може бути використаний для позначення генетично сконструйованих рослин. У процесі створення трансгенної рослини, чужорідну ДНК випадковим чином вбудовують у геном рослинної клітини. Під час трансформації, трансформується багато окремих клітин. Внаслідок випадкової інтеграції буде відбуватись окрема та унікальна подія рекомбінації ДНК у межах геному кожної окремої трансформованої клітини рослини. Потім вирощують цілу трансгенну рослину із однієї окремої трансгенної клітини, що обов'язково приводить в результаті до того, що у кожній клітині трансгенної рослини міститься унікально вбудована ДНК у якості стабільної частини її геному. Стійка до гербіцидів трансгенна кукурудза, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, містить одну вставку трансгенної ДНК у хромосомі/геномі зародкової плазми кукурудзи. Трансформант кукурудзи MON 87419 був отриманий шляхом: (I) трансформації тисяч клітин рослини кукурудзи конструкцією нуклеїнової кислоти, яка включає трансгени інтересу, (II) регенерації популяції рослин кукурудзи, жодна з яких містить унікальний трансгенний трансформант та (III) багаторічного тестування, скринінгу та відбору, щоб відібрати трансформант з необхідними агротехнічними властивостями, трансформант кукурудзи MON 87419. Трансформант кукурудзи MON 87419 характеризується унікальною послідовністю ДНК вставки трансгену у певному місці геному рослини кукурудзи.

[0031] Акт вставки трансгенної ДНК у геном рослини кукурудзи здійснюється шляхом акту трансформації рослин та в результаті приводить до створення нової трансгенної геномної молекулярної послідовності, відомої як "трансформант". Ця послідовність є унікальною та специфічною для трансформанту та може бути легко ідентифікована при порівнянні з оригінальною геномною послідовністю кукурудзи або іншими трансгенними трансформантами кукурудзи. Молекулярний аналіз трансформанта кукурудзи MON 87419 визначив геномний сайт вставки вбудованої ДНК (SEQ ID NO:9) та фланкуючу геномну послідовність ДНК кукурудзи, безпосередньо суміжної до обох сторін від вбудованої ДНК (SEQ ID NO:7 та SEQ ID NO:8). Таке положення вбудованої ДНК по відношенню до оточуючої ДНК геному рослини кукурудзи є, таким чином, специфічним та унікальним для стійкої до гербіцидів трансгенної кукурудзи, що включає трансформант кукурудзи MON 87419. Ця нова геномна молекулярна послідовність (SEQ ID NO:10) також є невід'ємною частиною хромосоми трансгенних стійких до гербіцидів рослин кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419, і, таким чином, є статичною у рослині та може передаватись потомству рослини.

[0032] Цей винахід також відноситься до потомства вихідного трансформанта, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Таке потомство може бути отримано шляхом самозапилення рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, або

статевого схрещування між рослиною кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, та ще однією рослиною, яка містить або не містить трансформант кукурудзи MON 87419. Така інша рослина може бути трансгенною рослиною, що містить той самий або інший трансформант(трансформанти), або нетрансгенною рослиною, такою як рослина іншого сорту. Навіть після багаторазового оберненого схрещування з рекурентною батьківською рослиною, трансформант кукурудзи MON 87419 з трансформованої батьківської рослини присутній у потомстві, отриманому від схрещування, у тому ж місці геному.

[0033] Як використовується у цьому документі термін "кукурудза" означає *Zea mays* (також відомий як кукурудза) та включає всі види рослин, які можна схрещувати з кукурудзою.

[0034] Цей винахід відноситься до стійкої до гербіциду трансгенної рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, який є стійким до гербіцидів дікамба (3,6-дихлор-2-метоксибензойної кислоти) та глюфосинату (2-аміно-4-(гідроксиметилфосфинил)-бутанової кислоти). Дікамба являє собою синтетичний ауксиновий гербіцид, який застосовується для боротьби з широким спектром широколистяних бур'янів. Глюфосинат являє собою органофосфорний гербіцид, який застосовується для боротьби з широким спектром однолітніх та багаторітніх трав та широколистяних бур'янів. Трансформант кукурудзи MON 87419 містить ген деметилази (dmo) із *Stenotrophomonas maltophilia*, який експресує білок дікамба моно-оксигенази (DMO) для надання стійкості до гербіциду дікамба, та ген стійкості до білафосу (pat) із *Streptomyces viridochromogenes*, який експресує білок фосфінотрицин N-ацетилтрансферази (PAT) для надання стійкості до гербіциду глюфосинату.

[0035] Як використовується у цьому документі термін "рекомбінантний" відноситься до ненатуральних ДНК, білку або організму, які зазвичай не зустрічаються у природі та були створені шляхом людського втручання. Як використовується у цьому документі "молекула рекомбінантної ДНК" являє собою молекулу ДНК, що містить комбінацію молекул ДНК, які не зустрічаються разом у природних умовах, та є результатом людського втручання, наприклад, ДНК-молекулу, яка містить комбінацію щонайменше двох молекул ДНК, гетерологічних по відношенню один до одного, наприклад, молекулу ДНК, яка містить трансген та геномну ДНК рослини, сумішню з трансгеном. Приклад молекули рекомбінантної ДНК являє собою молекулу ДНК, що містить щонайменше одну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:1-10. Як використовується у цьому документі "рекомбінантна рослина" являє собою рослину, яка зазвичай не існує у природі, є результатом людського втручання та містить трансгенну молекулу ДНК. У результаті такої зміни геному, рекомбінантна рослина являє собою щось нове та помітно відрізняється від відповідної рослини дикого типу. Прикладом рекомбінантної рослини є рослина кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419.

[0036] Як використовується у цьому документі термін "трансген" відноситься до молекули ДНК, штучно вбудованої у геном організму в результаті людського втручання, наприклад, за допомогою методів трансформації рослин. Трансген може бути гетерологічним по відношенню до організму. Термін "трансгенна вставка", як використовується у цьому документі, відноситься до трансгену, вбудованого за допомогою методів трансформації рослин у геном кукурудзи для отримання трансформанту кукурудзи MON 87419. Послідовність для цієї трансгенної вставки запропонована як послідовність SEQ ID NO:9. Термін "трансгенний" відноситься до чогось, що містить трансген, наприклад, "трансгенна рослина" відноситься до рослини, що містить трансген.

[0037] Як використовується у цьому документі термін "гетерологічний" відноситься до першої молекули, яка у природі, як правило, не пов'язана з другою молекулою або організмом. Наприклад, молекула ДНК може бути отримана з перших видів та вбудована у геном других видів. Молекула ДНК, таким чином, буде гетерологічною по відношенню до геному та організму.

[0038] Як використовується у цьому документі термін "химерний" відноситься до однієї молекули ДНК, отриманої шляхом злиття першої молекули ДНК з другою молекулою ДНК, при цьому ні перша, ні друга молекули ДНК, як правило, не були б у нормі знайдені у такій злитій конфігурації по відношенню до іншої. Молекула химерної ДНК, таким чином, являє собою нову молекулу ДНК, яка, як правило, не зустрічається у природі. Приклад молекули химерної ДНК являє собою молекулу ДНК, що містить щонайменше одну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:1-10.

[0039] Цей винахід відноситься до молекул ДНК та відповідним ДНК послідовностям. Як використовується у цьому документі терміни "ДНК" та "молекула ДНК" відносяться до молекули дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). Молекула ДНК може бути геномного або синтетичного походження, та, як прийнято, представляється від 5' (лівого) кінця до 3' (правого) кінця. Як використовується у цьому документі термін "послідовність ДНК" відноситься до нуклеотидної послідовності молекули ДНК. Використана номенклатура є такою, як вимагається у Розділі 37

Кодексу федеральних нормативних актів Сполучених Штатів § 1.822, та приведена у Таблицях в стандарті BOIB ST.25 (1998), Додаток 2, Таблиці 1 та 3. Як прийнято, послідовності ДНК за даним винаходом та їх фрагменти описані з посиланням тільки по одному ланцюгу з двох комплементарних ланцюгів ДНК послідовності. Описано та навмисно, комплементарні послідовності запропонованих у цьому документі послідовностей (послідовності комплементарного ланцюга), що також називаються у даній галузі техніки зворотніми комплементарними послідовностями, знаходяться у межах об'єму даного винаходу та явно маються на увазі у межах заявленого предмету. Таким чином, як використовується у цьому документі посилання на SEQ ID NO:1-10 і SEQ ID NO:14-22 та їх фрагменти включають та відносяться до послідовності комплементарного ланцюга та її фрагментам.

[0040] Як використовується у цьому документі термін "фрагмент" відноситься до невеликої частини цілого. Наприклад, фрагменти SEQ ID NO:10 будуть включати послідовності, які складають щонайменше близько 20 послідовних нуклеотидів, щонайменше, близько 25 послідовних нуклеотидів, щонайменше, близько 30 послідовних нуклеотидів, щонайменше, близько 35 послідовних нуклеотидів, щонайменше, близько 40 послідовних нуклеотидів, щонайменше близько 45 послідовних нуклеотидів, щонайменше близько 50 послідовних нуклеотидів, щонайменше близько 60 послідовних нуклеотидів, щонайменше близько 70 послідовних нуклеотидів, щонайменше близько 80 послідовних нуклеотидів, щонайменше близько 90 послідовних нуклеотидів або щонайменше близько 100 послідовних нуклеотидів повної послідовності SEQ ID NO:10.

[0041] Послідовність ДНК, що відповідає повній послідовності ДНК вставки трансгену та істотних сегментів ДНК геному кукурудзи, що фланкують будь-який кінець трансгенної вставки, представлена як SEQ ID NO:10. ДНК-послідовності геномної ДНК кукурудзи фізично зв'язані фосфодієфірним зв'язком і, таким чином, фланкуючий 5'-кінець трансгенної вставки представлений як SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 та SEQ ID NO:7. Послідовність ДНК геномної ДНК кукурудзи фізично зв'язана фосфодієфірним зв'язком і, таким чином, фланкуючий 3'-кінець трансгенної вставки представлений як SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 та SEQ ID NO:8.

[0042] Трансгенна кукурудза, що містить трансформант кукурудзи MON 87419 містить дві ділянки, що називаються з'єднаннями. "З'єднання" являє собою місце, в якому один кінець трансгенної вставки поєднаний з геномною ДНК. З'єднання охоплює або тягнеться через частину трансгенної вставки та прилеглої до неї фланкуючої геномної ДНК і, як таке, є точкою з'єднання цих двох молекул у якості однієї суміжної молекули. Одне з'єднання на 5'-кінці трансгенної вставки та одне на 3'-кінці трансгенної вставки, згадується у цьому документі як 5'-та 3'-з'єднання, відповідно. «Послідовність з'єднання» відноситься до послідовності ДНК будь-якої довжини, яка охоплює 5'- або 3'-з'єднання трансформанту. Послідовності з'єднання трансформанту кукурудзи MON 87419 є очевидними для спеціаліста у даній галузі техніки, який використовує SEQ ID NO:10. Приклади послідовностей з'єднань трансформанту кукурудзи MON 87419 представлені як SEQ ID NO:1-8. Фігура 1 ілюструє фізичне положення SEQ ID NO:1-10, розташованих від 5' до 3'. Таким чином, цей винахід відноситься до молекули ДНК, яка містить щонайменше одну з послідовностей ДНК, приведених у SEQ ID NO:1-8.

[0043] Послідовності з'єднання трансформанту кукурудзи MON 87419 можуть бути присутніми як частина геному трансгенної рослини кукурудзи, насінини або клітини, що містять трансформант кукурудзи MON 87419. Ідентифікація будь-якої однієї або декількох з SEQ ID NO:1-8 у зразку, взятому з рослини трансгенної кукурудзи, частини рослини, насінини або клітини, вказує на те, що ДНК була отримана з трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, та є діагностичним параметром наявності трансформанту кукурудзи MON 87419.

[0044] Трансформант кукурудзи MON 87419 містить послідовності, які є унікальними для трансгенної вставки, зокрема, SEQ ID NO:14-22. Ці послідовності є унікальними для конкретної химерної конфігурації різних промоторів, інтронів, хлоропласт-направлених пептидів (СТР), 3'-сигналу термінації, генів *pat* та *dmo* у межах трансгенної вставки трансформанту. Фігура 1 ілюструє відносне положення кожної з цих унікальних послідовностей вставки трансгену по відношенню до послідовності SEQ ID NO:9.

[0045] Запропонованими є приклади молекул ДНК, які можуть бути використані або у якості праймерів, або зондів з метою діагностики наявності у зразку ДНК, отриманої із трансформанту кукурудзи MON 87419. Такі праймери або зонди є специфічними для послідовності-мішені нуклеїнової кислоти та у якості таких можуть бути використані для ідентифікації трансформанту кукурудзи MON 87419 за допомогою методів, описаних у цьому документі.

[0046] "Праймер" являє собою молекулу ДНК, яка призначена для використання при відпалі

або гібридизаційних методах, які включають реакцію ампліфікації. Реакція ампліфікації являє собою реакцію *in vitro*, яка ампліфікує матричну ДНК для отримання амплікону. Як використовується у цьому документі "амплікон" являє собою молекулу ДНК, яка була синтезована з використанням методів ампліфікації. Амплікони, згідно з даним винаходом, мають послідовність ДНК, що містить одну або декілька з SEQ ID NO:1-10, або їх фрагменти. Пара праймерів може бути використана з матричною ДНК, такою як зразок геномної ДНК кукурудзи, в реакції ампліфікації, такий як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), щоб отримати амплікон, при цьому отриманий амплікон буде мати послідовність ДНК, що відповідає послідовності матричної ДНК, розташованої між двома ділянками, де праймери гібридизуються з матрицею. Праймер, як правило, призначений для гібридизації з комплементарним цільовим ланцюгом ДНК з утворенням гібриду між праймером та цільовим ланцюгом ДНК. Наявність праймера є точкою розпізнавання для полімерази, щоб почати подовження праймера з використанням у якості матриці ланцюг ДНК-мішені. Пари праймерів відносяться до використання двох праймерів, зв'язуючих протилежні ланцюги двохланцюгового нуклеотидного сегменту з метою ампліфікації нуклеотидного сегменту між ними. Приклади послідовностей праймерів представлені як SEQ ID NO:11 та SEQ ID NO:12. Пара праймерів, представлена як SEQ ID NO:11 та SEQ ID NO:12, може бути використана у якості першої молекули ДНК та другої молекули ДНК, при тому, що перша молекула ДНК являє собою фрагмент SEQ ID NO:9, а друга молекула ДНК являє собою фрагмент послідовності геномної ДНК кукурудзи SEQ ID NO:10, та кожна має достатню довжину, щоб функціонувати у якості праймерів ДНК при їх спільному використанні у реакції ампліфікації з ДНК, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, для отримання амплікону з метою діагностики трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку. Послідовність геномної ДНК кукурудзи з трансформанту кукурудзи MON 87419 представлена у якості позицій 1-1246 та 8009-9259 з SEQ ID NO:10.

[0047] "Зонд" являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, яка є комплементарною к цільового ланцюга нуклеїнової кислоти та використовується в гібридизаційних методах детекції. Зонди за даним винаходом включають не тільки дезоксирибонуклеїнові або рибонуклеїнові кислоти, але також та поліаміди та інші матеріали зонду, які специфічно зв'язуються з послідовністю ДНК мішені та детекція такого зв'язування може бути використана при детекції наявності або відсутності ДНК послідовності мішені. Зонд може бути приєднаний до звичайної мітки, що детектується, або репортеру, такої як радіоактивний ізотоп, ліганд, хемілюмінісцентний агент або фермент. Приклад послідовності ДНК, що використовується у якості зонду для детекції трансформанту кукурудзи MON 87419, представлений як SEQ ID NO:13.

[0048] Способи конструювання та використання праймерів і зондів добре відомі у даній галузі техніки, а ДНК-молекули, що містять фрагменти SEQ ID NO:1-10 та використовуються у якості праймерів та зондів для детекції трансформанту кукурудзи MON 87419, можуть бути легко розроблені спеціалістом у даній галузі техніки.

[0049] Молекули ДНК та ДНК послідовності, що їм відповідають, представлені у цьому документі, таким чином, використовуються для ідентифікації трансформанту кукурудзи MON 87419 у трансгенних рослинах кукурудзи, клітинах, насінні або частинах рослини; відбору сортів кукурудзи або гібридів, що містять трансформант кукурудзи MON 87419; та детекції наявності або відсутності трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку.

[0050] Як використовується у цьому документі термін "ізольований" відноситься до відокремлення молекули від інших молекул, зазвичай зв'язаних з нею у своєму природньому або натуральному стані. Термін "ізольований", таким чином, може відноситись до молекули ДНК, яка була відокремлена від іншої молекули(молекул) ДНК, які зазвичай зв'язані з нею у своєму природньому або натуральному стані. Така молекула ДНК може бути присутньою у рекомбінантному стані, такому як рекомбінантна молекула ДНК. Таким чином, молекули ДНК, злиті з регуляторними або кодуючими послідовностями, з якими вони зазвичай не зв'язані, наприклад, як результат рекомбінантних технологій, вважаються ізольованими, навіть при вбудовуванні у якості трансгену у хромосому клітини або присутності з іншими молекулами ДНК.

[0051] Цей винахід відноситься до рослин кукурудзи, потомства, насіння, клітин рослини та частин рослини, що містять трансформант кукурудзи MON 87419, та товарним продуктом, отриманим з їх використанням. Характерний зразок трансгенної насінини кукурудзи, стійкої до гербіцидів, що містить трансформант MON 87419, депонований у відповідності з Будапештським договором у Американській колекції типових культур (ATCC®). Для насінини трансгенної стійкої до гербіцидів рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, репозитарій ATCC привласнив позначення патентного депозиту РТА-120860. Рослини, потомство, насіння, клітини рослини, частини рослини та товарні продукти за даним винаходом

містять кількість ДНК, що детектується, з, щонайменше, однією з послідовностей, приведених як SEQ ID NO:1-10 та SEQ ID NO:14-22. Рослини, потомство, насіння, клітини рослини та частини рослин за даним винаходом можуть також містити одну або декілька додаткових трансгенних ознак, зокрема, тих, які вносяться шляхом схрещування рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, з іншою рослиною, що містить додаткову трансгенну ознаку (ознаки). Такі ознаки включають, але без обмежень, підвищену стійкість до комах, підвищену ефективність використання води, підвищену продуктивність врожаю, підвищену стійкість до засухи, підвищену якість насіння, покращення поживної якості, продукцію гібридного насіння та/або підвищену стійкість до гербіцидів, при цьому ознака оцінюється по відношенню до рослини кукурудзи, яка не має такої трансгенної ознаки.

[0052] Рослини за даним винаходом можуть бути використані для отримання потомства, яке містить трансформант кукурудзи MON 87419. Як використовується у цьому документі термін "потомство" включає будь-яку рослину, насінину та клітину рослини, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, успадкований від рослини-предка, вказаної рослиною, що містить молекулу ДНК, з, щонайменше, однією послідовністю, вибраною з SEQ ID NO:1-10. Рослини, потомство та насіння можуть бути гомозиготними або гетерозиготними за трансформантом кукурудзи MON 87419. Рослини-потомки можна вирощувати з насіння, що продукується рослиною кукурудзи, яка містить трансформант кукурудзи MON 87419, або з насіння, отриманого за допомогою рослини кукурудзи, заплідненої пилом, що містить трансформант кукурудзи MON 87419.

[0053] Як використовується у цьому документі термін "частина рослини" за даним винаходом являє собою будь-яку частину, отриману з трансгенної рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Частини рослин включають, але без обмежень, пилок, бруньку, стручок, квітку, коріння, стебла, волокна та листя. Частини рослини можуть бути життєздатними або нежиттєздатними.

[0054] Винахід відноситься до товарного продукту, який отриманий з трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Товарні продукти за даним винаходом містять кількість ДНК, яка детектується, що містить послідовність ДНК, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:1-10. Як використовується у цьому документі термін "товарний продукт" відноситься до будь-якої композиції, або продукту, який складається з матеріалу, отриманого з трансгенної рослини кукурудзи, насінини кукурудзи, клітини рослини кукурудзи або частини рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Товарні продукти включають, але без обмежень, оброблене насіння, зерна, частини рослини та їжу. Трансгенна кукурудза, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, може бути використана для виробництва будь-якого товарного продукту, як правило, отриманого з кукурудзи. Товарний продукт за даним винаходом буде містити кількість ДНК, що детектується, відповідно до трансформанта кукурудзи MON 87419. Детекція однієї або декількох з таких ДНК у зразку може бути використана для визначення вмісту або джерела товарного продукту. Можна використати будь-який стандартний спосіб детекції молекул ДНК, у тому числі способи детекції, описані у цьому документі.

[0055] Цей винахід відноситься до способів боротьби із бур'янами з використанням гербіцидів глюфосинату або дікамба, або глюфосинату та дікамба з трансгенною кукурудзою, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Передбачено, що спосіб боротьби із бур'янами на ділянці, такий як поле, включає посадку трансгенних рослин кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419, на ділянці, та застосування гербіцидно ефективної дози гербіцидів глюфосинату або дікамба, або глюфосинату та дікамба на ділянці з метою боротьби із бур'янами на ділянці, не пошкоджуючи трансгенних рослин кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419. Таке застосування гербіцидів глюфосинату або дікамба, або глюфосинату та дікамба може бути до проростання (у будь-який час після посадки насінини трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, та проростанням трансгенної рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419) або після проростання (у будь-який час після проростання трансгенних рослин кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419). Гербіцидно ефективна доза глюфосинату для використання на ділянці для боротьби із бур'янами повинна складати у межах діапазону від близько 0,1 фунта (0,045 кг) кислотного еквіваленту на акр (0,405 га) (к.е./акр) аж до близько 16 фунтів (7,257 кг) к.е./акр глюфосинату впродовж періоду вегетації. Гербіцидно ефективна доза дікамба для використання на ділянці для боротьби із бур'янами повинна складати у межах діапазону від близько 0,1 фунта (0,045 кг) к.е./акр аж до близько 16 фунтів (7,257 кг) к.е./акр дікамба впродовж періоду вегетації. Багато застосувань гербіцидів глюфосинату або дікамба, або глюфосинату та дікамба можуть бути використані впродовж періоду вегетації, наприклад,

два застосування (такі, як застосування до посадки та застосування після проростання або застосування перед проростанням та застосування після проростання) або три застосування (такі, як застосування до посадки, застосування перед проростанням та застосування після проростання).

5 [0056] Як використовується у цьому документі термін "активний інгредієнт" або "a.i." є компонентом гербіцидного складу, що відповідає за гербіцидну активність, часто вимірюється у фунтах на галон або застосовується у фунтах на акр. Для гербіцидів, які є кислотами (наприклад, молекулами, які мають карбоксильну групу, як частину їх структури), в яких кислотну групу часто перетворюють (може бути замінено бажаними іонами, щоб сформувати) на сіль або (піддають взаємодії зі спиртом, щоб сформувати) складний ефір у процесі формулювання. Це може змінити не тільки хімічні характеристики конкретної молекули гербіциду, але й масу. Тим не менш, відповідна кислота є гербіцидною активною частиною складу, а еквівалентність гербіцидної активності між різними активними інгредієнтами можна розраховувати з використанням кислотного еквіваленту у якості стандартної одиниці вимірювання. 10 Термін "кислотний еквівалент" або "к.е." означає ту частину активного інгредієнта у складі, яка теоретично може бути перетворена назад у відповідну кислоту. Норми витрат гербіциду можуть бути виражені у вигляді "кислотного еквіваленту на акр" (скорочено "к.е./акр") або у вигляді "активного інгредієнта на акр" (скорочено "a.i./акр").

[0057] Запропоновані способи отримання трансгенної рослини кукурудзи, стійкої до гербіцидів, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Потомство, отримане цими способами може бути сортовими або гібридними рослинами; може бути вирощено з насіння, отриманого з трансгенної рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, або з насіння, отриманих з рослини кукурудзи, заплідненої пилком з трансгенної рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419; та може бути гомозиготним або гетерозиготним за трансформантом кукурудзи MON 87419. Рослини можуть самозапилюватися (також відомо як "самозапилювання") або перехресно запилюватися (також відомо як "перехресне запилювання"). Трансгенні рослини кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419 можуть самозапилюватися для створення істинної лінії для розведення рослин, які є гомозиготними за трансформантом кукурудзи MON 87419. Самозапилювання в результаті 20 приводить до отримання потомства, відомого як "інбредне", та використовується для виробництва інбредних ліній, які є генетично однорідними. У якості альтернативи, трансгенні рослини кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419, можуть бути ауткросними (схрещені з іншою рослиною, яка є трансгенною або нетрансгенною) для отримання сортової або гібридної насінини. Насіння та рослини-потомки, отримані способами за даним винаходом, будуть містити трансформант кукурудзи MON 87419, а потім можуть бути відібрані гербіцидами глюфосинатом або дікамба, або глюфосинатом та дікамба. Обробку гербіцидами глюфосинатом або дікамба, або глюфосинатом та дікамба можна використати для відбору стійкого потомства. У якості альтернативи, ці рослини-потомки можуть бути проаналізовані за допомогою діагностичних методів, щоб відібрати рослини або насіння, що містять трансформант кукурудзи MON 87419. 30 40

[0058] Рослини, потомство, насіння, клітини рослини та частини рослин за даним винаходом можуть також містити одну або декілька додаткових трансгенних ознак кукурудзи, зокрема, ті, які вносяться шляхом схрещування рослини кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419 з іншою рослиною кукурудзи, що містить додаткову трансгенну ознаку(ознаки). Такі трансгенні ознаки кукурудзи включають, але без обмежень, підвищену стійкість до комах, підвищену ефективність використання води, підвищену продуктивність врожаю, підвищену стійкість до засухи, підвищену якість насіння, покращення поживних характеристик, продукцію гібридного насіння та стійкість до гербіцидів, при цьому ознака вимірюється по відношенню до рослини кукурудзи, яка не має такої трансгенної ознаки. Такі трансгенні ознаки кукурудзи відомі спеціалісту у даній галузі техніки; наприклад, перелік таких ознак надається у Державному департаменті сільського господарства Сполучених Штатів (USDA) Служби контролю здоров'я тварин та рослин (APHIS) та можуть бути знайдені на їх сайті <http://www.aphis.usda.gov>. Дві трансгенні рослини, таким чином, можуть бути схрещені для отримання потомства, яке містить дві або декілька незалежні одна від одної окремі трансгенні ознаки. Також розглядаються зворотнє скрещування з батьківською рослиною та ауткросинг із нетрансгенною рослиною, як і вегетативне розмноження. Опис способів розведення, які зазвичай використовуються для різних ознак та культур, можна знайти в одному з декількох посилань, наприклад, Fehr, у Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., 45 50 55

[0059] Рослини, насіння, клітини, частини рослин та товарні продукти за даним винаходом можуть бути використані для детекції ДНК та білкових молекул, що свідчать про наявність 60

трансформанту кукурудзи MON 87419. Таку детекцію можна здійснювати з використанням ДНК послідовності, запропонованої у цьому документі, та відповідних послідовностей білків DMO та PAT, що кодується трансгенною вставкою, що приведена як SEQ ID NO:9. Детекцію наявності трансформанту кукурудзи MON 87419 можна здійснити за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки, таких як теплова ампліфікація нуклеїнової кислоти, методи гібридизації нуклеїнових кислот (такі як, нозерн-блотинг та саузерн-аналіз), методи детекції білку (такі як, вестерн блотинг, імунопреципітація та твердофазний імуносорбентний аналіз (ELISA)) або за допомогою методів детекції та/або наборів для детекції, запропонованих у цьому документі. Один зі способів відноситься до контактування зразка ДНК з парою праймерів, яка здатна продукувати амплікон з ДНК трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, виконуючи реакцію ампліфікації та, таким чином, продуциуючи амплікон ДНК, що містить щонайменше одну з послідовностей ДНК, представлених як SEQ ID NO:1-10 та SEQ ID NO:14-22, а потім детекції наявності або відсутності молекули амплікону та можливого підтвердження у межах послідовності амплікон, що містить, щонайменше одну з послідовностей, представлених як SEQ ID NO:1-10 та SEQ ID NO:14-22. Наявність такого амплікону є діагностичною ознакою наявності специфічної ДНК для трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, і, таким чином, біологічного матеріалу у зразку, який отриманий з трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Інший спосіб відноситься до контактування зразка ДНК з ДНК зондом, піддаючи зонд та зразок ДНК жорстким умовам гібридизації, а потім детекції гібридизації між зондом та зразком ДНК мішені. Детекція гібридизації є діагностичною ознакою наявності специфічної ДНК для трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК.

[0060] Пропонуються набори для детекції ДНК трансформанту кукурудзи MON 87419. Варіації таких наборів також можуть бути розроблені з використанням композицій та способів, описаних у цьому документі, та способів детекції ДНК, добре відомих у даній галузі техніки. Набори для детекції ДНК можна застосовувати до способів розведення трансгенних рослин кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419. Такі набори містять ДНК праймери або зонди, що містять фрагменти SEQ ID NO:1-10. Один з прикладів такого набору містить щонайменше одну молекулу ДНК із суміжних нуклеотидів SEQ ID NO:10 достатньої довжини, щоб функціонувати у якості зонду ДНК, що використовується для детекції наявності та/або відсутності у зразку ДНК, отриманої із трансгенних стійких до гербіцидів рослин кукурудзи, що містять трансформант кукурудзи MON 87419. Пропонується молекула ДНК, достатня для використання у якості зонду ДНК, що використовується для визначення, детекції або діагностики наявності та/або відсутності у зразку трансгенної стійкої до гербіцидів кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, ДНК, приведеної як SEQ ID NO:13. Інші зонди можуть бути легко розроблені спеціалістом у даній галузі техніки та повинні містити, щонайменше, близько п'ятнадцяти нуклеотидів SEQ ID NO:10 та бути достатньо унікальними для стійкої до гербіцидів трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, з метою виявлення ДНК, отриманої від трансформанту кукурудзи MON 87419. Інший тип набору містить пару праймерів, що використовуються для отримання амплікону, який використовується для детекції наявності або відсутності у зразку трансформанту кукурудзи MON 87419. Такий набір повинен застосовувати спосіб, що включає приведення у контакт зразка ДНК-мішені з парою праймерів, а потім проведення реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти, достатньої для отримання амплікону, що містить молекулу ДНК з щонайменше однією послідовністю, вибраною з SEQ ID NO:1-10, а потім детекцію наявності або відсутності амплікону. Такий спосіб може також включати секвенування амплікону або його фрагменту. Інші пари праймерів можуть бути легко розроблені спеціалістом у даній галузі техніки та повинні містити щонайменше двадцять нуклеотидів SEQ ID NO:10 та бути достатньо унікальними для стійкої до гербіцидів трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, з метою детекції трансформанту кукурудзи MON 87419. Набори за даним винаходом також можуть необов'язково включати реагенти для виконання детекції або діагностичних реакцій, описаних у цьому документі або інструкціях по застосуванню набору та його вмісту.

[0061] Як використовується у цьому документі термін "що містить" означає "що включає, але не обмежується".

Інформація про депозит

[0062] Депозит характерного зразка насінини трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, був проведений у відповідності з Будапештським договором в Американській колекції типових культур (ATCC), за адресою 10801 University Boulevard, Manassas, Вірджинія, США, поштовий індекс 20110. ATCC позначенням патентного депозиту (номер доступу) для насіння, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, є РТА-

120860 та датою депозиту було 17 січня 2014. Депозит буде зберігатись у депозитарії впродовж 30 років або 5 років після останнього запиту, або впродовж терміну дії патенту, в залежності від того, який період довше.

ПРИКЛАДИ

5 [0063] Наступні приклади включені для більш повного опису даного винаходу. Спеціалістам у даній галузі техніки повинно бути зрозуміло, що різні модифікації можуть бути створені у конкретних прикладах, які описані, але все ще з отриманням аналогічного результату. Деякі засоби, які схожі і хімічно, і фізіологічно, можуть бути використані замість засобів, описаних у цьому документі, досягаючи тих самих або подібних результатів. Всі такі заміни та модифікації, очевидні для спеціалістів у даній галузі техніки, вважаються у межах об'єму даного винаходу.

10 Приклад 1: Отримання та відбір трансформанту MON 87419

[0064] Цей приклад описує отримання, аналіз та відбір трансгенної кукурудзи, що містить трансформант MON 87419, трансформант, який може забезпечити стійкість до обох гербіцидів, дікамба та глюфосинату. Узагальнено кажучи, для остаточного відбору трансформанту кукурудзи MON 87419 необхідні отримання та аналіз десятків тисяч окремих рослин впродовж багатьох років за допомогою строгих молекулярних, фенотипічних та польових випробувань.

20 [0065] Вектори трансформації, що містять різні касети експресії були розроблені та протестовані для підтвердження їх користі для експресії генів *dmo* та *pat*. Використовуючи ці дані, були відібрані комбінації елементів експресії та вісім різних векторів трансформації були сконструйовані та трансформовані у кукурудзу. За допомогою цих векторів були протестовані промотори та термінатори у різних комбінаціях з двома кодуючими ділянками гену *pat* та *dmo* (Таблиця 1). Отримані в результаті рослини аналізували на експресію білку та два вектори (позначені як А та В в Таблиці 1) були відібрані для комерційної трансформації кукурудзи.

Таблиця 1

Конфігурація касети векторів трансформації

Вектор	касета 1 (PAT)			касета 2 (DMO)		
	Промотор	Ген інтересу	Термінатор	Промотор	Ген інтересу	Термінатор
A	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	PCSV/I-Act1	CTP4/DMO	Hsp17.5
B	P-1	PAT	T-1	PCSV/I-Act1	CTP4/DMO	Hsp17.5
C	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-1	CTP4/DMO	Hsp17.5
D	P-1	PAT	T-1	AND.ge.Ubq1	CTP4/DMO	Hsp17.5
E	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-2	CTP4/DMO	Hsp17.5
F	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-3	CTP4/DMO	Hsp17.5
G	P-1	PAT	T-1	P-2	CTP4/DMO	Hsp17.5
H	P-1	PAT	T-1	P-3	CTP4/DMO	Hsp17.5

25 [0066] Більше тринадцяти тисяч унікальних трансформованих рослин кукурудзи були отримані з використанням двох векторів (А та В), які були відібрані. У рослинах часто спостерігаються значні відмінності у рівнях експресії вбудованого гену серед окремих трансформантів та експресія генів може безпосередньо позитивно або негативно корелювати з фенотипом рослини, що містить трансформант. Експресія чужорідних генів у рослинах, як відомо, знаходиться, між іншим, під впливом їх положення у хромосомі. По цій причині необхідно було провести відбір великої кількості окремих рослин, що містять випадкові вставки трансформантів, впродовж багатьох років та локалізацій для того, щоб визначити оптимальний трансформант. Трансгенний трансформант кукурудзи MON 87419 був створений за допомогою Agrobacterium-опосередованої трансформації LH244 незрілих зародків кукурудзи. Способи трансформації кукурудзи відомі у даній галузі техніки. Клітини кукурудзи були трансформовані та регенерували у цілі рослини кукурудзи. Були відібрані укорінені рослини з нормальними фенотипічними характеристиками. Тисячі окремих незалежних трансформантів потім переносили у ґрунт для росту та додаткової оцінки.

Таблиця 2

Процес відбору трансформанту

	Етап	Вектор А Просунуті транс- форманти	Вектор В Просунуті транс- форманти	Всього Унікальні просунуті трансфор- манти
Оцінка R0	Отримані трансгенні трансформанти	5236	8413	13649
	Проходження першого аналізу з однією копією	1300	1698	2998
	Обприскування R0	642	798	1440
	Первинний детальний молекулярний аналіз	85	99	184
	Саузерн R0	54	58	112
Ранні відбори (R1 та R2)	Випробування R1 та молекулярний аналіз	22	22	44
	Випробування R2 та молекулярний аналіз	20	22	42
Просунуті польові випробування та молекулярний аналіз	Рік 1 ПАм	7	10	17
	Рік 1 США	5	6	11
	Рік 2 ПАм	2	3	5
	Детальна оцінка	2	0	2
	Остаточний відбір трансформанту	1	0	1

[0067] Протягом всього процесу відбору трансформантів були проведені, часто одночасно, молекулярний аналіз, а також польові випробування для оцінки фенотипу, агрономії та ефективності трансформантів (Таблиця 2). На початку були проаналізовані 13 000 унікальних трансформованих R0 рослин кукурудзи за допомогою ПЛР, щоб відібрати трансформанти з однією копією трансгенної вставки (Проходження першого аналізу з однією копією). Це привело у результаті до просування 2998 трансформантів. Наступний відбір на стійкість R0 до обприскування гербіцидами проводився у теплиці. Рослини тестувались одночасно на стійкість до глюфосинату (гербіцид Ignite® 280) та дікамба (гербіцид Clarity®) з використанням бакової суміші глюфосинату (0,9 фунтів а.і./акр) та дікамба (2,0 фунти (0,907 кг) к.е./акр), розпиленої на стадії росту V1/V2. Рослини, які продемонстрували >15 % пошкодження, були відкинуті, а 1440 трансформантів були відібрані для додаткового аналізу. Був проведений первинний детальний молекулярний аналіз, який включав ідентифікацію та підтвердження послідовності і другу перевірку кількості копій та відсутності основи. В результаті цього аналізу було отримано 184 трансформанти, що містять тільки одну копію трансгенної вставки, відібраної для просування. Саузерн аналіз на ДНК, виділеної із трансформантів R0, був проведений для додаткового підтвердження числа копій трансгенної вставки та підтвердження відсутності трансформації основи. Виходячи з цього, 112 трансформанти були відібрані для просування до R1 для додаткового аналізу. Рослини R0 самозапильовались та насіння збирали для випробувань з R1.

[0068] Одночасно з усіма польовими випробуваннями додатковий молекулярний аналіз був на стадії розробки. Нозерн аналіз був проведений для детекції та вимірювання транскриптів мРНК pat та dmo генів. N-кінцеве білкове секвенування білків PAT та DMO, очищених із трансгенних рослин, що містять відібрані трансформанти, проводили для того, щоб підтвердити рекомбінантну послідовність білку. Вестерн аналіз для детекції PAT та DMO білків проводили з трансгенними зразками рослин. Було проведено секвенування всього трансгену та обох 5'- і 3'-кінців вставки, та згодом використано для розробки способів детекції окремих трансформантів. Детальний аналіз за Саузерном проводили на R1 рослинах для того, щоб підтвердити число копій та відсутності основи.

[0069] Для польового випробування R1 ранніх відборів, серед 112 трансформантів, відібраних з R0 скринінгу, були відібрані 82 трансформанти, враховуючи проростання насіння та розмір розсадника. Рослини R1 були розділені і, таким чином, були нульовими, гемізиготними або гомозиготними за трансформантом. Оцінювали 82 трансформанта у R1 рослинах при

відборі по ефективності на полі з високими нормами витрат гербіцидів. Пошкодження рослин оцінювали після обробки різними комбінаціями глюфосинату (Ignite 280) та дікамба (Clarity) (до 20-кратного глюфосинату та до 16-кратного дікамба вказаних норм витрат) та з урахуванням часу застосування на різних стадіях росту від V1/V2 до V8/V10. Ступінь пошкодження оцінювали через 10-14 днів після застосування гербіцидів. Стандарти ступеня пошкодження включають оцінку хлорозу у балах, мальформацій та схрещуваності. Загальні середні значення для багатьох рослин, що містять той самий трансформант, були використані для відбору трансформантів для просування. При застосуваннях гербіцидів при 2-кратних значеннях зазвичай отримують менш 10 % пошкоджень, а при застосуванні гербіцидів при 16-кратних та 20-кратних значеннях отримують більш ніж ступінь пошкодження у 10 %. Окрім тестування ефективності проводили агрономічне оцінювання у балах для кожної рослини та корелювали із трансформантом, який у ній міститься. Критерії агрономічного оцінювання у балах, які були оцінені, включали висоту рослини, висоту колосу, процент вологості, тест ваги, дні до 50 % запилення та дні до 50 % появи ниток початків. На основі аналізу даних, зібраних в ході польових випробувань R1 та молекулярного аналізу, були відібрані 44 трансформанта для просування до R2 для додаткового аналізу. Рослини R1 самозапилювались та насіння збирали для випробувань з R2.

[0070] У польовому випробуванні R2 ранніх відборів, R2 та F1 трансформанти (з R1 ауткросів) оцінювались у відборах польової ефективності у трьох місцях (двох штатах та Пуерто-Ріко). Пошкодження рослин оцінювали після обробки різними комбінаціями норм витрат глюфосинату та дікамба та з урахуванням часу застосування. Рослини R2 є гомозиготними за трансформантом та рівень невдалої стійкості до гербіцидів після обробки гербіцидами був низьким, що підтверджує результати R1. Агрономічні дані були зібрані та оцінені у балах як у польових випробуваннях R1. Додатковий молекулярний аналіз, включаючи аналіз експресії генів, також був використаний для відбору рослин, що містять найкращі трансформанти. На основі аналізу даних, зібраних в ході польових випробувань R2 та F1 молекулярного аналізу, були відібрані 42 трансформанти для просування до R3 для додаткового аналізу. Рослини R2 самозапилювались та насіння збирали для випробувань з R3.

[0071] Для просунутих польових випробувань були проведені польові випробування як гібридної, так і інбредної ефективності, а також гібридні та інбредні агрономічні польові випробування. Агрономічні польові випробування проводились впродовж того ж сезону, що й польові випробування ефективності. Всі польові випробування використовували рандомізацію повними групами та були проведені в декількох місцях. Для польових випробувань ефективності та агрономічних польових випробувань, впродовж всього сезону випробувань було проведено агрономічне оцінювання у балах, а в кінці сезону визначали врожайність (ефективність врожаю або агрономічну врожайність). Польові випробування ефективності були проведені для оцінки пошкодження сільськогосподарських культур від 10 до 14 днів після застосування гербіциду, оцінки пошкодження сільськогосподарських культур та врожаю. Оцінка пошкодження цільового врожаю у балах була менше 10 % для просування трансформанту. Для агрономічних польових випробувань, на ділянках підтримувалась відсутність бур'янів та у період вегетації не використовувались гербіциди глюфосинат або дікамба. Гібридні агрономічні польові випробування включали контролі гібриду, якого порівнювали (гібридного контролю), отриманого з використанням тих самих батьківських ліній кукурудзи, які використовувались для того, щоб провести трансгенне гібридне схрещування, але такого що не містить трансгенний трансформант. Інбредні контролі були співставні по інбредності з трансгенними інбредними лініями.

[0072] Мета-аналіз проводили з використанням сукупності мульти-сезонних багатолокаційних даних польових випробувань. У Таблиці 3 представлена кількість повторів, для яких повторювали спостереження для конкретного типу польового випробування для рослин, що містять один з трансформантів. Для кожного з цих двох трансформантів нараховували 135 значень, зареєстрованих для агрономічних реалізацій гібриду, 933 значення для ефективності гібриду, 179 значень для інбредної агрономії, 30 значень для інбредної ефективності та 16 значень для тестування трансформанта випробуванням навантаженням нормами витрат гербіциду для кукурудзи, що містить трансформант.

Таблиця 3

Повтори польових випробувань для двох остаточних трансформантів.

Опис	Повтори для кожного трансформанту
Агрономія гібриду	135 повторів
Ефективність гібриду	933 повторів
Інбредна агрономія	179 повторів
Інбредна ефективність	30 повторів
Випробування трансформанта навантаженням	16 повторів
Загальна кількість повторів для кожного трансформанту	1293

[0073] Гібридні рослини, кожна з яких містить один з 23 відібраних трансформантів (підмножина 42 трансформантів із польового випробування R2), були оцінені у Південній Америці (ПАм) в рік 1 контра-сезону польових випробувань ефективності та агрономічних польових випробувань. Випробування проводились у шести місцях при рандомізації повними групами з 4-ма обробками та 2-ма повторами кожної обробки. У польових випробуваннях ефективності препаратом дікамба був гербіцид Banvel® 4SL, а складом глюфосинату був Liberty® 1.67SL. Обробки гербіцидами включали наступне: (1) необроблений контроль; (2) дікамба у 2 фунти (0,907 кг) к.е./акр (акр) PRE (при тому, що PRE визначається при посадці або до появи врожаю) з наступним дікамба в 1 фунт (0,454 кг) к.е./акр, що застосовувався до кожного з VE-V2, з наступним V4 з наступним V8; (3) глюфосинат, що застосовувався у 0,8 фунтів (0,363 кг) а.і./акр до VE-V2, з наступним V4 з наступним V8; та (4) глюфосинат, що застосовувався у 0,8 фунтів (0,363 кг) а.і./акр, плюс дікамба, що застосовувався в 1 фунт (0,454 кг) к.е./акр до VE-V2, з наступним V4 з наступним V8. Ступінь пошкодження оцінювали через 10-14 днів після застосування гербіцидів. Загальні середні значення для багатьох рослин, що містять той самий трансформант, були використані для відбору трансформантів для просування. Оцінка пошкодження цільового врожаю у балах склала менше 10 % та оцінка спостереженого пошкодження була менше 1 %. На основі оцінювання пошкодження гібриду у балах, агрономічного оцінювання у балах, ефективності врожаю, агрономічної врожайності та додаткового молекулярного аналізу, були відібрані 17 трансформантів для просування.

[0074] Інбредні та гібридні рослини з 17 трансформантів, просунутих від року 1 ПАм польових випробувань контра-сезону, були потім додатково оцінені у польових випробуваннях ефективності року 1 та агрономічних польових випробуваннях у Сполучених Штатах (США). Ці випробування були проведені в 2012 році, який був сезоном сильної засухи у Сполучених Штатах. Польові випробування ефективності гібриду проводились у 12 місцях, 2 штатах при рандомізації повними групами з 6-тьма обробками та 3-ма повторами кожної обробки. Гібридні рослини, що містять трансгенний трансформант стійкості до гліфосату, мали походження від чоловічої батьківської рослини при схрещуванні. У польових випробуваннях ефективності складом гліфосату був Roundup PowerMAX® 4.5SL, складом дікамба був Clarity 4SL та складом глюфосинату був Ignite 280 2.34SL. Обробки гербіцидами включали наступне: (1) необроблений контроль; (2) гліфосат у 3 фунти (1,361 кг) к.е./акр, що застосовувався до V4, з наступним V8; (3) глюфосинат у 0,8 фунтів (0,363 кг) а.і./акр, що застосовувався до V2, з наступним V4 з наступним V8; (4) дікамба у 2 фунти (0,907 кг) а.і./акр, що застосовувався PRE, та потім знову застосовувався до V4, з наступним V8; (5) гліфосат у 3 фунти (1,361 кг) к.е./акр плюс дікамба у 1,5 фунти (0,68 кг) к.е./акр, що застосовувався до V2, з наступним V4 з наступним V8; (6) дікамба у 2 фунти (0,907 кг) к.е./акр, що застосовувався до V2, з наступним глюфосинатом у 0,8 фунтів (0,363 кг) а.і./акр плюс дікамба в 1 фунт (0,454 кг) к.е./акр, що застосовувався на стадії росту V4, з наступним гліфосатом у 3 фунти (1,361 кг) к.е./акр плюс дікамба у 1,5 фунти (0,68 кг) к.е./акр, що застосовувався на стадії росту V8. Ступінь пошкодження оцінювали через 10-14 днів після застосування гербіцидів. Загальні середні значення для багатьох рослин, що містять той самий трансформант, були використані для відбору трансформантів для просування. Оцінка пошкодження цільового врожаю у балах склала менше 10 % та оцінка спостереженого пошкодження була менше 1 %. На основі оцінювання пошкодження гібриду у балах, агрономічного оцінювання у балах, ефективності врожаю, агрономічної врожайності та додаткового молекулярного аналізу, були відібрані 11 трансформантів для просування.

[0075] Польові випробування року 2 контра-сезону у Південній Америці (ПАм) для оцінки ефективності гібриду та інбредної агрономічної врожайності були потім проведені з рослинами,

що містять ці 11 трансформантів. Гібридні рослини, що містять трансгенний трансформант стійкості до гліфосату, мали походження від чоловічої батьківської рослини при схрещуванні. Польові випробування ефективності гібриду були проведені, в основному, як описано для контра-сезону року 1 польових випробувань у Південній Америці (ПАм), але з наступними гербіцидними обробками: (1) необробленим контролем; (2) гліфосатом у 3 фунти (1,361 кг) к.е./акр, що застосовувався до V4, з наступним V8; (3) глюфосинатом у 0,8 фунтів (0,363 кг) а.і./акр, що застосовувався до V4, з наступним V8; (4) дікамба у 2 фунти (0,907 кг) к.е./акр, що застосовувався PRE, та потім знову застосовувався до V4 з наступним V8; (5) гліфосатом у 3 фунти (1,361 кг) к.е./акр плюс дікамба у 1,5 фунти (0,68 кг) к.е./акр, що застосовувався до V4, з наступним V8; (6) глюфосинатом у 0,8 фунтів (0,363 кг) а.і./акр плюс дікамба в 1 фунт (0,454 кг) к.е./акр, що застосовувався до V4, з наступним гліфосатом у 3 фунти (1,361 кг) к.е./акр плюс дікамба у 1,5 фунти (0,68 кг) к.е./акр, що застосовувався до V8. Ступінь пошкодження оцінювали через 10-14 днів після застосування гербіцидів. Загальні середні значення для багатьох рослин, що містять той самий трансформант, були використані для відбору трансформантів для просування. На основі оцінювання пошкодження гібриду у балах, агрономічного оцінювання у балах, ефективності врожаю гібриду, інбредної агрономічної врожайності та додаткового молекулярного аналізу, були відібрані 5 трансформантів для просування.

[0076] Потім був здійснений додатковий молекулярний аналіз для цих 5 трансформантів. Багаторічні польові та молекулярні дані для кожного з 5 трансформантів, включаючи польові випробування ознаки ефективності гібриду, гібридні та інбредні вимірювання врожайності, агрономічне оцінювання у балах та молекулярну інформацію, були згодом розглянуті, та були відібрані два трансформанти для додаткового аналізу. Ці обидва трансформанти були отримані з використанням того ж самого вектору трансформації і, таким чином, мали ту ж саму вставку трансгену, але не іншу локалізацію у геномі або фланкуючу послідовність.

[0077] Польові випробування року 2 у Сполучених Штатах (США) інбредної ефективності, а також гібридні та інбредні агрономічні польові випробування були проведені для оцінки цих двох трансформантів. Польові випробування ефективності гібриду були проведені аналогічним чином, як в рік 1 польових випробувань у США, але включаючи різні режими розпилення. Ефективність була виміряна по ступеню пошкодження та ефективності врожаю гібриду. Потім був здійснений додатковий молекулярний аналіз для цих трансформантів. Гібридні рослини, що містять трансгенний трансформант стійкості до гліфосату, мали походження від чоловічої батьківської рослини при схрещуванні. Польові випробування 1 та 2 ефективності гібриду проводились в 12 місцях серед двох штатів та польові випробування 3 ефективності гібриду проводились в тридцяти трьох місцях серед чотирьох штатів. У цих польових випробуваннях ефективності складом гліфосату був Roundup PowerMAX 4.5SL, складом дікамба був Clarity 4SL та складом глюфосинату був Ignite 280 2.34SL. Гербіцидами для випробувань ефективності 1 та ефективності 2 (зі схрещуванням двох окремих інбредних ліній) були: (1) необроблений контроль; (2) глюфосинат у 0,4 фунти (0,181 кг) а.і./акр, що застосовувався до VE-V2, з наступним V6; (3) глюфосинат у 0,8 фунтів (0,363 кг) а.і./акр, що застосовувався до VE-V2, з наступним V6; (4) дікамба у 0,5 фунтів (0,227 кг) к.е./акр, що застосовувався до V4, з наступним V8; (5) дікамба в 1,0 фунт (0,454 кг) к.е./акр, що застосовувався до V4, з наступним V8; та (6) гліфосат у 2,25 фунтів к.е./акр плюс дікамба в 1,0 фунт (0,454 кг) к.е./акр, що застосовувався до V4, з наступним V8. Гербіцидами для випробувань ефективності 3 (що представляють гібрид, отриманий від схрещування з третьою інбредною лінією) були: (1) необроблений контроль; (2) дікамба у 0,5 фунтів (0,227 кг) к.е./акр, що застосовувався до VE-V2, з наступним глюфосинатом у 0,4 фунта (0,181 кг) а.і./акр, що застосовувався до V6; та (3) дікамба в 1,0 фунт (0,454 кг) к.е./акр, що застосовувався до VE-V2, з наступним глюфосинатом у 0,8 фунтів (0,363 кг) а.і./акр, що застосовувався до V6. Ступінь пошкодження оцінювали через 10-14 днів після застосування гербіцидів та для багатьох рослин, що містять такий же трансформант, використовували для відбору трансформантів для просувань. Збирали дані врожайності та агрономічні дані.

[0078] Для порівняння ступеня пошкодження гібриду для двох трансформантів, був проведений мета-аналіз багатьох польових випробувань ефективності гібриду. (Таблиця 4) Ступінь пошкодження оцінювали на V8 (при тому, що аналіз V8 охоплює кумулятивне пошкодження від V2, V4, V6 та V8 застосувань гербіцидів) зі статистичною найменшою достовірною різницею (LSD при $p < 0,05$). Тестер 1, тестер 2 та тестер 3 являють собою схрещування з 3-ма незалежними інбредними батьківськими лініями кукурудзи, які були використані для створення гібриду для вказаного польового випробування. Для кожного з випробувань не було знайдено статистичної різниці у ступені пошкодження між гібридами, отриманими з використанням батьківської трансгенної кукурудзи, що містить один з двох трансформантів.

Таблиця 4

Мета-аналіз ступеня пошкодження з польових випробувань ефективності гібриду.

Польове випробування	Трансгенна кукурудза	Пошкодження V8	LSD (P<0,05)
Рік 1 комбіновано ПАМ та США	MON 87419	0,43	0,3
Рік 1 комбіновано ПАМ та США	ТРАНСФОРМАНТ 2	0,49	0,3
Ефективність гібриду року 2 ПАМ	MON 87419	2,58	3
Ефективність гібриду року 2 ПАМ	ТРАНСФОРМАНТ 2	1,98	3
Тестер 1 гібриду року 2 ПАМ	MON 87419	0	0
Тестер 1 гібриду року 2 ПАМ	ТРАНСФОРМАНТ 2	0	0
Тестер 2 гібриду року 2 ПАМ	MON 87419	0	0
Тестер 2 гібриду року 2 ПАМ	ТРАНСФОРМАНТ 2	0	0
Тестер 2 гібриду року 3 ПАМ	MON 87419	0,31	0,42
Тестер 2 гібриду року 3 ПАМ	ТРАНСФОРМАНТ 2	0,12	0,42

- 5 [0079] Був проведений мета-аналіз ефективності врожаю гібриду (бушелів/акр) з багатьох польових випробувань ефективності порівняно з врожаєм гібридів, що містять кожний з двох трансформантів. (Таблиця 5) Для кожного з випробувань не було знайдено статистичної різниці в ефективності врожаю гібридів між гібридами, отриманими з використанням батьківської трансгенної кукурудзи, що містить один з двох трансформантів.

Таблиця 5

Мета-аналіз врожайності польових випробувань ефективності гібриду.

Польове випробування	Гібрид кукурудзи	Врожайність (бушелів/акр)	LSD (P<0,05)
Рік 1 комбіновано ПАМ та США	MON 87419	171,07	4
Рік 1 комбіновано ПАМ та США	ТРАНСФОРМАНТ 2	172,90	4
Рік 2 ПАМ	MON 87419	233,66	14
Рік 2 ПАМ	ТРАНСФОРМАНТ 2	231,59	14
Тестер 1 року 2 США	MON 87419	217,43	10
Тестер 1 року 2 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	220,06	10
Тестер 2 року 2 США	MON 87419	219,68	7
Тестер 2 року 2 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	221,21	7
Тестер 3 року 2 США	MON 87419	208,76	5,67
Тестер 3 року 2 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	213,02	5,67

- 10 [0080] Польові випробування тестування випробування навантаженням були проведені також з гібридною трансгенною кукурудзою, що містить один з двох трансформантів. В тестах випробування навантаженням або гербіцид глюфосинат (Ignite 280, 2.34SL), або дікамба (Clarity 4SL) застосовувались при некомерційно високих величинах. Для типічних польових
- 15 випробувань 1-кратна величина глюфосинату складала 0,4 фунта (0,181 кг) а.і./акр та 1-кратна величина для дікамба складала 0,5 фунта (0,227 кг) к.е./акр. Для польових випробувань тестування випробування навантаженням глюфосинату, застосовували глюфосинат на VE-V2 з наступним V4 з наступним V8 з наступними величинами: (1) 1 фунт (0,454 кг) а.і./акр (2,5-кратний); (2) 2 фунти (0,907 кг) а.і./акр (5-кратний); (3) 4 фунти (1,814 кг) а.і./акр (10-кратний); та (4) 8 фунтів (3,629 кг) а.і./акр (20-кратний). Для польових випробувань тестування
- 20 випробування навантаженням дікамба, застосовували дікамба на VE-V2 з наступним V4 з наступним V8 з наступними величинами: (1) 2 фунти (0,907 кг) к.е./акр (4-кратний); (2) 4 фунта (1,814 кг) к.е./акр (8-кратний); (3) 8 фунтів (3,629 кг) к.е./акр (16-кратний); та (4) 16 фунтів (7,257 кг) к.е./акр (32-кратний). В кінці сезону польові випробування тестування випробування навантаженням гібриду збирали та визначали врожайність (бушелів/акр або буш/акр). Аналіз
- 25 даних по врожайності порівнювали з гібридами, що містили будь-який з цих двох трансформантів. Для кожного з випробувань не було знайдено статистичної різниці у врожайності по будь-якій з величин застосування гербіцидів між гібридами, отриманими з

використанням батьківської трансгенної кукурудзи, що містить один з двох трансформантів.

Таблиця 6

Врожайність з польових випробувань ефективності тестування випробовування гібриду навантаженням.

Польове випробування	Трансгенний гібрид кукурудзи	Врожайність (бушелів/акр)	LSD (P<0,05)
Тест випробовування навантаженням 2,5-20-кратного глюфосинату	MON 87419	207,31	40
Тест випробовування навантаженням 2,5-20-кратного глюфосинату	ТРАНСФОРМАНТ 2	201,65	40
Тест випробовування навантаженням 4-32-кратного дікамба	MON 87419	239,93	40
Тест випробовування навантаженням 4-32-кратного дікамба	ТРАНСФОРМАНТ 2	234,60	40

5 [0081] Агрономічні польові випробування гібридів проводились у 3-х комплексах по 15 місць у кожному комплексі у 21 місці серед 3 штатів та були проведені впродовж того ж самого сезону з польовими випробуваннями ефективності гібриду. Агрономічні вимірювання були зібрані впродовж польового сезону випробувань, а в кінці сезону була визначена агрономічна врожайність. Мета-аналіз мульти-сезону багатолокаційних агрономічних польових випробувань гібриду використовували для порівняння з врожайністю гібридного контролю та гібридів, що містять один з двох трансформантів. Жодної статистичної різниці для агрономічної врожайності гібриду не було знайдено ні між трансгенними гібридами, ні порівняно з контрольними гібридами (Таблиця 7).

Таблиця 7

Мета-аналіз врожайності агрономічних польових випробувань гібриду.

Польове випробування	Гібрид кукурудзи	Врожайність (бушелів/акр)	LSD (P<0,05)
Рік 1 комбіновано ПАМ та США	Контроль	180,28	6
Рік 1 комбіновано ПАМ та США	MON 87419	179,01	6
Рік 1 комбіновано ПАМ та США	ТРАНСФОРМАНТ 2	184,88	6
Рік 2 ПАМ	Контроль	231,70	10
Рік 2 ПАМ	MON 87419	232,47	10
Рік 2 ПАМ	ТРАНСФОРМАНТ 2	225,07	10
Тестер 2 року 1 США	Контроль	185,80	17,40
Тестер 2 року 1 США	MON 87419	187,09	17,40
Тестер 1 року 2 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	192,28	17,40
Тестер 2 року 2 США	Контроль	219,12	12,83
Тестер 2 року 2 США	MON 87419	219,56	12,83
Тестер 2 року 2 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	221,22	12,83
Тестер 3 року 2 США	Контроль	197,62	8,66
Тестер 3 року 2 США	MON 87419	191,49	8,66
Тестер 3 року 2 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	195,48	8,66

15 [0082] Польові випробування інбредної ефективності були проведені з використанням рандомізації повними групами в 6 місцях, 1 штаті. У цих польових випробуваннях складом дікамба був Clarity 4SL та складом глюфосинату був Ignite 280 2.34SL. Застосування гербіциду для інбредних польових випробувань ефективності представляли собою глюфосинат у 0,8 фунта (0,363 кг) а.і./акр та дікамба у 2,0 фунта (0,907 кг) к.е./акр, що застосовувались при VE-V2 з наступним глюфосинатом у 0,8 фунта (0,363 кг) а.і./акр та дікамба у 2,0 фунти (0,907 кг) к.е./акр, що застосовувався на V8. У кінці сезону вимірювали врожайність. Для кожного з випробувань була знайдена статистична різниця інбредної ефективності врожайності порівняно з інбредною врожайністю, отриманою в цих випробуваннях від трансгенної кукурудзи, що

містить один з двох трансформантів (Таблиця 8). Ці дані вказують на більш високу продуктивність трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419.

Таблиця 8

Мета-аналіз врожайності польових випробувань інбредної ефективності.

Польове випробування	Інбредна кукурудза	Врожайність (бушелів/акр)	LSD (P<0,05)
Інбредне року 2 США	MON 87419	110,95	7
Інбредне року 2 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	98,89	7

- 5 [0083] Інбредні агрономічні польові випробування проводились впродовж того ж сезону, що й польові випробування ефективності року 1 США, польові випробування ефективності року 1 ПАМ та польові випробування ефективності року 2 США (11 місць, 1 штат). Ділянки були налаштовані при рандомізації повними групами, проведеної у багатьох місцях, а також випробування включали контроль інбредної лінії, що порівнювали з трансгенними інбредними
- 10 лініями. Мета-аналіз мульти-сезону багатолокаційних інбредних агрономічних польових випробувань проводили порівняно з врожайністю парного контролю та трансгенними інбредними рослинами з використанням одного з двох трансформантів. Для інбредної агрономічної врожайності не було знайдено жодної статистичної різниці між контрольною та трансгенною кукурудзою, що містить трансформант MON 87419 (Таблиця 9). На відміну від
- 15 цього, спостерігалось статистично значуще зниження врожайності трансгенної кукурудзи, що містить трансформант 2, порівняно або з контролем, або трансгенною кукурудзою, що містить трансформант MON 87419. Ці дані додатково вказують на більш високу продуктивність трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419.

Таблиця 9

Мета-аналіз врожайності інбредних агрономічних польових випробувань.

Польове випробування	Інбредна кукурудза	В загальному (бушелів/акр)	LSD (P<0,05)
Інбредне року 1 США	Контроль	65,87	31
Інбредне року 1 США	MON 87419	60,33	31
Інбредне року 1 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	43,10	31
Інбредне року 2 ПАМ	Контроль	95,88	7
Інбредне року 2 ПАМ	MON 87419	98,77	7
Інбредне року 2 ПАМ	ТРАНСФОРМАНТ 2	75,85	7
Інбредне року 2 США	Контроль	108,90	6
Інбредне року 2 США	MON 87419	109,22	6
Інбредне року 2 США	ТРАНСФОРМАНТ 2	96,88	6

20

Приклад 2: Характеристика послідовності ДНК трансформанту кукурудзи MON 87419

- [0084] Цей приклад описує широку молекулярну характеристику, яка була проведена для трансформанта кукурудзи MON 87419. Трансгенна вставка трансформанту кукурудзи MON 87419 у напрямку від 5' до 3' містить: (i) промотор (P-ANDge.Ubq1), лідер та інтрон (L-I-ANDge.Ubq1) гену убіквітину (Ubq) з *Andropogon gerardii*; функціонально зв'язаний з pat геном з *Streptomyces viridochromogenes* (CR-STRvi.pat), який кодує фосфінотрицин N-ацетилтрансферазу (PAT), що надає стійкість до гербіциду глюфосинату; функціонально зв'язаний із сигналом поліаденілювання (також відомий як термінатор, який направляє поліаденілювання мРНК) з RA5B попередника гену з *Oryza sativa* (T-Os.Ara5) та (ii) промотор
- 25 повної довжини транскрипту вірусу хлоротичної смугастості арахісу з подвоєною енансерною ділянкою (PCISV); ген з *Triticum aestivum* (L-Ta.Lhcb1), функціонально зв'язаний з лідером світлозбираючого комплексу b1; функціонально зв'язаний з першим інтроном гену актину 1 з *Oryza sativa* (I-Os.Act1); функціонально зв'язаний з N-кінцевим транзитним пептидом хлоропласту із гібриду гену 5-енолпірувілшкімат-3-фосфатсинтази петунії (TS-Ph.ShkG-CTP4);
- 30 функціонально зв'язаний з dmo геном *Stenotrophomonas maltophilia*, оптимізованим для експресії в однодольних (CR-STEm.DMO), який кодує монооксигеназу дікамба (DMO), що надає стійкість до гербіциду дікамба; функціонально зв'язаний з сигналом поліаденілювання
- 35

білку теплового шоку 17 з *Triticum aestivum* (T-Ta.Hsp17). 5'-кінець трансгенної вставки фланкований правою межею *Agrobacterium tumefaciens* та 3'-кінець трансгенної вставки фланкований лівою межею *Agrobacterium tumefaciens*.

[0085] Саузерн-блот-аналіз був проведений, щоб підтвердити, що трансгенна кукурудза, яка містить трансформант кукурудзи MON 87419, містить єдину, непошкоджену копію всієї трансгенної вставки без жодної основи вектора. Фланкуючі послідовності були відокремлені від обох 5'- та 3'-кінців вставки, а відповідні з'єднання були визначені за допомогою зворотної ПЛР та/або методів "прогулянки по геному". Хромосомне положення вставки трансформанту кукурудзи MON 87419 визначали за допомогою зворотної ПЛР для ампліфікації геномної ДНК за межами сайту інтересу. Фланкуючі послідовності трансформанту кукурудзи MON 87419 були картовані за відомою фізичною сукупністю геному кукурудзи та було підтверджено, що у межах будь-якого з відомих генів не було трансформанту кукурудзи MON 87419. Ця інформація про послідовність була використана для розробки TAQMAN® аналізів за кінцевою точкою, специфічних по відношенню до трансформанту, для виявлення присутності трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку. Інформація про послідовність сайту вставки була також використана для біоінформатичного аналізу хромосомної локалізації трансформанту. Цілісність сайту вставки визначалась за допомогою ПЛР через алель дикого типу з використанням праймерів, специфічних до фланкуючих ділянок трансформанту кукурудзи MON 87419. Дикий тип вставки сайту був використаний для картування по еталонному геному кукурудзи унікального сайту вставки трансгену для трансформанту кукурудзи MON 87419. Для того, щоб гарантувати, що жодні зміни або мутації не були введені у будь-яку ділянку трансгену у процесі трансформації, вся трансгенна вставка трансформанту кукурудзи MON 87419 була виділена з рослини та секвенована.

[0086] N-кінцеве білкове секвенування експресованих білків PAT та DMO проводили з використанням імуноочищених білкових екстрактів, отриманих із зерна трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Цю послідовність потім використовували для підтвердження достовірності N-кінцевої амінокислотної послідовності. Вестерн-аналіз проводили на білкових екстрактах отриманих із зерна трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Це підтверджувало, що продукувався один білок очікуваного розміру для PAT та DMO, відповідно. Були проведені аналізи ELISA для визначення рівнів білку в різних типах тканин трансгенної кукурудзи (листя, насіння, коріння та пилку) для білку PAT або DMO, експресованого з трансформанту кукурудзи MON 87419. Нозерн-аналіз був проведений на поліаденільованій РНК, виділеній із зерна трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Це підтверджувало розмір транскрипту та кількість продуктів мРНК pat та dmo. Рівні експресії РНК також були виміряні за допомогою ПЛР у реальному часі з використанням зразків, отриманих з трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419.

Приклад 3: Специфічні по відношенню до трансформанту TAQMAN® аналізи за кінцевою точкою

[0087] У цьому прикладі описаний специфічний по відношенню до трансформанту спосіб термічної ампліфікації TAQMAN® за кінцевою точкою, розроблений для ідентифікації трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419 у зразку. ДНК-праймери, які використовуються в аналізі за кінцевою точкою являють собою праймери SQ26644 (SEQ ID NO:11), SQ26645 (SEQ ID NO:12) та 6-FAM™ мічений зонд PB11207 (SEQ ID NO:13). 6-FAM™ являє собою флуоресцентний барвник, продукт із Applied Biosystems (Фостер Сіті, Каліфорнія), приєднаний до ДНК-зонду. Для зондів TAQMAN® MGB™ 5' екзонуклеаза активність Taq ДНК-полімерази розщеплює зонд з 5'-кінця між флуорофором та гасником. При гібридизації з ланцюгом ДНК-мішені, гасник та флуорофор розділені достатньо, щоб отримати флуоресцентний сигнал, тим самим вивільнюючи флуоресценцію. SQ26644 та SQ26645 при використанні з цими методами реакції та PB11207 дозволяють отримати ДНК амплікон, який є діагностичним для трансформанту кукурудзи MON 87419. Контролі для цього аналізу повинні включати позитивний контроль, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, негативний контроль з нетрансгенною кукурудзою, а також негативний контроль, який не містить матричної ДНК. Крім того, контроль ПЛР-реакції повинен оптимально включати праймери внутрішнього контролю та зонд внутрішнього контролю, специфічні до однієї копії гена у геномі кукурудзи. Ці аналізи оптимізовані для використання або з Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (пробіг на максимальній швидкості) або на MJ Research DNA Engine PTC-225 термоциклері, але можна використати й інше обладнання.

[0088] Прикладом умов, які використовуються зі способом аналізу TAQMAN® за кінцевою точкою, який використовується для детекції трансформанту кукурудзи MON 87419, є наступне.

Стадія 1: 18 мегаомну воду доводили до кінцевого об'єму 10 мкл. Стадія 2: 5,0 мкл 2-кратної суміші Universal Master Mix (dNTP, фермент, буфер) доводили до 1-кратної кінцевої концентрації. Стадія 3: 0,5 мкл праймер-1 для трансформанту (SQ26644) та праймер-2 для трансформанту (SQ26645). Суміш (ресуспендували у 18 мегаомній воді до концентрації 20 мкМ кожного праймера) доводили до 1,0 мкМ кінцевої концентрації (наприклад, у пробірці для мікроцентрифуги, щоб досягти 500 мкл кінцевої концентрації 20 мкМ необхідно додати наступне: 100 мкл праймера SQ26644 у концентрації 100 мкМ; 100 мкл праймера SQ26645 у концентрації 100 мкМ; 300 мкл 18 мегаомної води). Стадія 4: 0,2 мкл зонду для трансформанту 6-FAM™ MGB PB11207 (10мкМ) (ресуспендували у 18 мегаомній воді до концентрації 10 мкМ до 0,2 мкМ кінцевої концентрації. Стадія 5: 0,5 мкл суміші праймера-1 внутрішнього контролю та праймера-2 внутрішнього контролю (ресуспендували у 18 мегаомній воді до концентрації 20 мкМ для кожного праймера) доводили до 1,0 мкМ кінцевої концентрації. Стадія 6: 0,2 мкл зонду внутрішнього контролю VIC™ (10мкМ) доводили до 0,2 мкМ кінцевої концентрації (ресуспендували у 18 мегаомній воді до концентрації 10 μM). Стадія 7: 3,0 мкл виділеної ДНК (матричної) для кожного зразка з одним з наступного, що містить 1. Зразки листків для аналізу; 2. Негативний контроль (не трансгенна ДНК); 3. Негативний контроль води (без матриці); 4. Позитивний контроль трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419. Стадія 8: Умови термоциклера наступні: Один цикл при 50 °C впродовж 2 хвилин; один цикл при 95 °C впродовж 10 хвилин; десять циклів при 95 °C впродовж 15 секунд, потім 64 °C впродовж 1 хвилини при (-1°C/цикл); тридцять циклів при 95 °C впродовж 15 секунд, потім 54 °C 1 хвилину, необов'язкові додаткові від 10 до 20 циклів (95 °C впродовж 15 секунд, потім 64 °C впродовж 1 хвилини (-1°C/цикл) можуть забезпечити більш чітке розділення популяції при аналізі EndPoint TaqMan®); кінцевий цикл при 10 °C.

Приклад 4: Аналіз зиготності

[0089] Аналіз зиготності може бути використаний для визначення того, чи є рослина, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, гетерозиготною або гомозиготною за трансформантом або алелем дикого типу. Аналіз реакції ампліфікації може бути розроблений з використанням інформації про послідовність, вказаній у цьому документі. Праймер-1, праймер-2 та праймер-3, при тому, що праймер-1 є специфічним для геномної ДНК кукурудзи на 3'-фланкуючому кінці трансформанту кукурудзи MON 87419; праймер-2 є специфічним для трансгенної вставки трансформанту кукурудзи MON 87419; та праймер-3 є специфічним для алелю дикого типу. При використанні у якості пари праймерів в реакції ампліфікації праймера-1 з праймером-2 буде отриманий ПЛР амплікон, специфічний для трансформанту кукурудзи MON 87419. При використанні у якості пари праймерів в реакції ампліфікації праймера-1 з праймером-3 буде отриманий ПЛР амплікон, специфічний для алелю дикого типу. При ПЛР-реакції, виконаній на геномній ДНК кукурудзи, відповідні ПЛР амплікони, отримані за допомогою (праймера-1 + праймер-2) та (праймера-1 + праймер-3), будуть відрізнятися за послідовністю та розміром амплікону. Коли три праймери включені у реакцію ПЛР з ДНК, виділеною з рослини, гомозиготної за трансформантом кукурудзи MON 87419, буде синтезуватися тільки амплікон праймер-1 + праймер-2. Коли три праймери включені у реакцію ПЛР з ДНК, виділеною з рослини, гетерозиготної за трансформантом кукурудзи MON 87419, будуть синтезуватися амплікон праймер-1 + праймер-2 та амплікон праймер-1 + праймер-3. Коли три праймери змішуються разом у реакції ПЛР з ДНК, виділеною з рослини, нульової за трансформантом кукурудзи MON 87419 (такої, яка є диким типом), буде синтезуватися тільки амплікон праймер-1 + праймер-3.

[0090] Іншим способом визначення зиготності рослини кукурудзи для трансформанту кукурудзи MON 87419 є TaqMan® реакція термічної ампліфікації за кінцевою точкою. Для даного типу аналізу, на додаток до праймерів, як описано вище, аналіз буде включати два флуоресцентно мічених зонди. Зонд-1 буде специфічним для трансформанту кукурудзи MON 87419 та зонд-2 буде специфічним для рослини кукурудзи, яка є нульовим за трансформантом кукурудзи MON 87419 (диким типом), та при тому, що два зонди містять різні флуоресцентні мітки, наприклад 6-FAM™—мітку або VIC™—мітку. При використанні TAQMAN® реакції термічної ампліфікації за кінцевою точкою, праймер-1 + праймер-2 + зонд-1 буде виробляти перший флуоресцентний сигнал, специфічний для трансформанту кукурудзи MON 87419. При використанні TAQMAN® реакції термічної ампліфікації за кінцевою точкою, праймер-1 + праймер-3 + зонд-2 буде виробляти другий флуоресцентний сигнал, специфічний для кукурудзи дикого типу. Коли три праймери та два зонди включені в TAQMAN® реакцію термічної ампліфікації за кінцевою точкою з ДНК, виділеної з рослини, гомозиготної за трансформантом кукурудзи MON 87419, буде генеруватись тільки перший флуоресцентний сигнал (специфічний праймеру-1 + праймеру-2 + зонду-1). Коли три праймери включені в TAQMAN® реакцію

термічної ампліфікації за кінцевою точкою з ДНК, виділеної з рослини, гетерозиготної за трансформантом кукурудзи MON 87419, буде генеруватись перший флуоресцентний сигнал (специфічний праймеру-1 + праймеру-2 + зонду-1) та другий флуоресцентний сигнал (специфічний праймеру-1 + праймеру-3 + зонду-2). Коли три праймери змішуються разом при

5 ТАQMAN® реакції термічної ампліфікації за кінцевою точкою з ДНК, виділеною з рослини, яка є нульовим за трансформантом кукурудзи MON 87419 (диким типом), буде генеруватись тільки другий флуоресцентний сигнал (специфічний праймеру-1 + праймеру-3 + зонду-2).

[0091] Іншим способом визначення зиготності рослини кукурудзи для трансформанту MON 87419 буде аналіз за Саузерном. Спеціалісту у даній галузі техніки має бути зрозуміло як розробити гібридизаційний(гібридизаційні) зонд(зонди) для аналізу за Саузерном, специфічні для трансформанту кукурудзи MON 87419, та інший гібридизаційний зонд для аналізу за Саузерном, специфічний для рослини кукурудзи, яка є нульовою за трансформантом кукурудзи MON 87419 (диким типом). За допомогою аналізу за Саузерном сигнал, що детектується тільки від першого гібридизаційного зонду для аналізу за Саузерном, буде свідчити про те, що

10 рослина є гомозиготною за трансформантом кукурудзи MON 87419; сигнал, що детектується як від першого гібридизаційного зонду для аналізу за Саузерном, так і від другого гібридизаційного зонду для аналізу за Саузерном, буде свідчити про те, що рослина є гетерозиготною за трансформантом кукурудзи MON 87419; та сигнал, що детектується тільки від другого гібридизаційного зонду для аналізу за Саузерном, буде свідчити про те, що ДНК виділили з

20 рослини, яка є нульовою за трансформантом кукурудзи MON 87419 (диким типом).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> ТРАНСГЕННИЙ ТРАНСФОРМАНТ КУКУРУДЗИ MON 87419 ТА СПОСОБИ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

<130> MONS:362WO

<140> Невідомо

<141> 2015-03-10

<150> 61/968342

<151> 2014-03-20

<160> 22

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Рекомбінантна

<400> 1

cagggtattga tgtgcgccag tcagcatcat 30

<210> 2

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Рекомбінантна

<400> 2

ttctttttct ccatagcatt cgcaatacag 30

<210> 3

<211> 60

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Рекомбінантна

<400> 3

gcaggcggtc gctgccaggt attgatgtgc gccagtcagc atcatcacac caaaagttag 60

<210> 4

<211> 60

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 5 <400> 4
 attggttaatt actctttctt ttctccata gcattcgcaa tacagttaga tgcgagtga 60
 <210> 5
 <211> 100
 <212> ДНК
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 5
 aggggggggt tggcgggggtg gcaggcgggtc gctgccagggt attgatgtgc gccagtcagc 60
 15 atcatcacac caaaagttag gcccgataag ttgaaatta 100
 <210> 6
 <211> 100
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 6
 catttttgaa ttgaaaaaa attggttaatt actctttctt ttctccata gcattcgcaa 60
 tacagttaga tgcgagtga gacagataag tcacaaccat 100
 25 <210> 7
 <211> 1771
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Рекомбінантна
 <400> 7
 gttgatattt tgacccaaag acatgccatt ctcatgttt tcagttttat cctaccaatg 60
 tagtaaccca aacagtttaa ttacaagtga atcaactgga aacaagatct acagactgca 120
 cacagcacat taacaattct gcgccaaatg aatgacagag tgatttatag gactaagct 180
 35 ggttttcac atgaatttg atcagagcat aaaccttgt gacaacagaa tagaatcaaa 240
 caagctgctc agctcagatg gaccaaaata atgaacgcgc gcacagtata ttgaaccaa 300
 atagtgaacg cacagtgaag aacagacgga gaagctagt cactactaaa atagaactca 360
 ctgatgcatt tttaaccgaa tcattaaaa acagaccaac atgattagac cagctatcaa 420
 aagacacact gctgagaatc aacaactgct atatgtgtga tctacctgaa ataaacagat 480
 40 gcagttttt gtccctacag accaaccatgt tttaatcaga atgccaatga taaatcctta 540
 gagatctgga gagcaaaact attaaccact gagaatcaac aactgctata atccttagag 600
 atctggagag cactactaatt aaccactgag cctcttttgt cagcatgcag aaatcccaa 660
 aactatactg taattcgaaa ccataagcg cacatcaaag caactccatt gttgatggt 720
 gggaatgta aaaatatgtg tgtggacacc aattgccgta aacaaaccca cagggagaac 780
 45 atgagtatga acaatcaaaa ctaacatgaa taagtggatg ttcagattaa gtaaggaaaa 840
 tggtcacag attaagaaca gagcaatgta tagcacaagt ggaaattaca aaccttttt 900
 cacaaaatta caatctctag acagcacaca gcaagatctt ggaatggatg agggtgatga 960
 atcggtgaaa aaagacagca cacagcaaga tctctagaac agaacatgaa atgttgaga 1020
 gtggggatgg gttgtagacc taacctctgt ccatcctttt aatagccgtc gctgccagg 1080
 50 atggaatagg gcgccgtgag tgccgtcgag ggcgcgcgca gggcgcggt ttggtgtggg 1140
 cgggataccc ggcgcggtcg ggaacccca cggcggtcat cacggcgagc cgggggaggg 1200
 gggggtggc ggggtggcag gcggtcgctg ccaggtattg atgtgcgcca gtcagcatca 1260
 tcacacaaa agttaggccc gaatagtttg aaattagaaa gctcgcaatt gaggtctgtc 1320
 gaggaggta acctaggtac tgaattacc ttgtatccct aactagatat cgaattctaa 1380
 55 ctataacggt cctaaggtag cgaatcgctc ttctggcg gcgaagacgc aaactcggac 1440
 cggtcacgc cgtaaggca ctctatgca accacagtca acttgaatgc cgcttgatg 1500
 cctctcaag tttttttc ttgcaaaaat catttcttt ttttaaaaa agtataattt 1560
 ggatcgtgca aattctctc taggtgtgtg tgtgactgtg tgagtaacaa ttctctagt 1620
 tgtgcgcgac tgctgcttac ttggagatt acaatatct tctaaatgc ttcgattact 1680
 60 tattataaa ccgtctctaa ggccaattgc tcaagattca ttaacaatt gaaacgtctc 1740

acatgattaa atcatataaa gtttctaagt c 1771
 <210> 8
 <211> 1767
 <212> ДНК
 5 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 8
 gcgagtctga tgagacatct ctgtattgtg ttctttccc cagtgttttc tgtactgtg 60
 10 taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt 120
 ttgagtgcga aaaaaaagga attagatctg tgtgtgttt ttgatcccc gggcgcccg 180
 cacaacaaac gaatacgtcc tgcttgccct actaggccaa cgcaggcgt gcccgtagc 240
 gccacgagcg aactgatac gaattctagg gataacaggg taatccacgt gtagctaaac 300
 gcgccctcat ctaagcccc atttgacgt gaatgtagac acgtcgaaat aaagatttcc 360
 15 gaattagaat aattgttta ttgctttcgc ctataaatc gacggatcgt aattgtcgt 420
 ttatcaaaa tgtacttca tttaataa acgctgcga catctacatt ttgaattga 480
 aaaaaaattg gtaattactt ttcttttc tccatagcat tcgcaatata gttagatgcg 540
 agtgaagcac gataagtcac aaccataata catactatta gaatccggct ctttgccgag 600
 tgctttttt gggcactcgg caaagacttc ttaccggca aagtcctact ctcgtaacg 660
 20 accacgttta ccgagagcag gacgctcgg acagggagac actcgcaaa gacctttg 720
 tcgagtgcga aacgctcggc aaagggcgt cagcagccgt ctatagcaga tgtttattat 780
 ctttgccgag cgccaagcgt tggcactcgg caaaacaagt gttgccgagt gcttaaattg 840
 gacactcggc aaaatatatt ttcttttt cttttgcaa ccaaacttc tgtggttgt 900
 tcctacacta ttagacata catgttccat ttggcaca ttataaaagt gttgctata 960
 25 aatattagat ttgttcgt taattgaatt ttctcgata attcagattt gaactacaag 1020
 tcactcaaaa aatggaaaac catgaatgca aaaatgatat ccatgttatt tagcacaagt 1080
 tacggccgat ttcaggagta gacccgaatt ttgagcacc atgctcacga aacatgactg 1140
 tgaactgtc atccagttgt ttaaaaattg tataaaacac aaacaaaatc aaaaaatcat 1200
 gaaactgtc cacatgtcat gatatcatca tatgtagagg ttgtgataaa aagttgaaaa 1260
 30 tatttcgtga aagttgtcca tagttcactg agcctctttg tcgagtgtca cactcggcaa 1320
 agcctttgtc gagtgcttca gacactcggc aaataagttg ttccagtag tgacattaat 1380
 agaaaaagag tgcatagttc gttcacatag ctaactaatt ggttcattac aaagaaacat 1440
 tagaacaagc ataattgatg ctggacata atgaaataaa atacataggt tgagggaacc 1500
 aaacataatg gaacacagaa caaatagagg acaacatcat agaaaacgac ataactcac 1560
 35 atgggtttta cgcaattgc tccacgcaa gtccataagt gtcgatgag atcatgttga 1620
 agttggtgt atcatttgag actagtgatg ttgtgtggg agcatagcca ctctgtacga 1680
 actcagggga ttgtgatgag agatccacgt gactccaat tgcggcaaac tcaacattac 1740
 ttgcacgtgg gacctgtcc tcgacaa 1767
 <210> 9
 40 <211> 6762
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 45 <400> 9
 gccagtcagc atcatcacac caaaagttag gccgaatag ttgaaatta gaaagctcgc 60
 aattgaggtc tgtcgaggag gttacctag gtactgaatt accctgttat ccctaactag 120
 atatcgaatt ctaactataa cggctctaag gtacggaatc gttctcttg gcgcgccaag 180
 acgcaaacac ggaccggttc aagccgtcaa ggcacttcta tgcaaccaca gtcaactga 240
 50 atgccgcttg agtgccttct caagttttt ttcttgcaa aatcatttc ttttttaa 300
 aaaaagtata atttgatcgc tgcaaattc tctctagggt tgtgtgtgac tgtgtgagta 360
 acaatttctc tagttgtcgc cgactgtcgc ttactttgga gattacaata tctttctaaa 420
 atgcttcgat tacttattta taaaccgtct ctaaggccaa ttgtcaaga ttattcaac 480
 aattgaaacg tctcacatga ttaaatcata taaagtttct aagtcttgt tgacaagatt 540
 55 ttttagatt ttcattctaa ttgatgaaa ctatcaaca ctaattttaa aaaatataag 600
 agaagctccg gagataaaag gtcgtctatg ttattataag agtaaagtcg tctattctct 660
 tcgtcccaac atataatatt ctaagcatga attgcttct ttttgacaa aaggagcatg 720
 ccacaacaca agaattgatg caccgtcatg cttggatcct ttatggtaa agcttcacct 780
 tctataatct aacaatagag aaatcaggga aaaatcatgt ttggttgtt ttatttcta 840
 60 acctccacaa taactttgtt ttaccatttt ttgttgatt ttagtttag agaagcgttt 900

ataacaggac ctaaaatctt ttttcagtac acagtacaac gcagacgctc atacacgcac 960
 gcacactcac ctctatgaac acacgtaaga aaacctaca ccttgagcac ctctgaagga 1020
 ctgagccggt aaatatagag attctgaag tctacttag cgctctgtg tcaacggga 1080
 tgcgcttac cacttaaagc ataacgccga gaaatcccgt aataaatcca gtaaataacg 1140
 5 agcaccctgt ccaagtga taittgaacc cgagtgggta gaitccaccg caaaggacct 1200
 aaccagatca tttcgcaaac aggaactaaa atcggtagag agcccagaca aaagccttc 1260
 ctaagagcca ctccagtga agccctact ttaggataa aatgcaatac tagtggggct 1320
 cctaaataaa ctctatctt tcatggcctt ctaaaatca ctccaaacc cctagctata 1380
 gaagtctctt atccatctc taaataaaaa tgggagtcta tttatttca ccagagttga 1440
 10 tctgaaattt agtctctca atttataag ttgagggtag aggatgactg gattgtctt 1500
 aaacggacct atctcaagt gacctcagt agcccggtta acggcgctga caagttaat 1560
 ctaacggaca ccaaccagag aagagaacca ccgccagcgc cgagccaagc gacgttgaca 1620
 tctggcgcg gcacggcacc tccctggcgt ctggccccc ctgagacctt ccgctccacc 1680
 tcccaccggt ggcggttcc aagtccgtc cgcctcctt cacacggcac gaaaccgtga 1740
 15 cgggcaccgg cagcagggg ggaftcctt cccaccgctc ctcccttc ccttctctc 1800
 ccgcccgtat aaatagccag ccccatcccc agcttcttc cccaacctca tcttctctg 1860
 tgttgttcgg cacaaccgga tcatcccca actccctct cgtctctct cgcgagcctc 1920
 gtcgatcccc cgttcaagg tacggcgatc gattatctt cctctctca ccttctctt 1980
 ctatagggc ctgctagctc tgttctgtt ttccatggc tgcgaggtac aatagatcg 2040
 20 cgatccatgg ttaggcgctg ctagtgtgt tctgtttt ccatggctgc gaggcacaat 2100
 agatctgatg gcgttatgt ggttaactg tcatactctt gcgatctatg gtcccttag 2160
 gagtttaga catctattt atttcgata gttcgagatc tggatccat ggtagtacc 2220
 ctaggcagt gggtagatc cgtgctgta tggctgtag atggattctg attgctcagt 2280
 aactgggaat cctgggatg tttagctgg ttgcagata agatcgattt catgatatg 2340
 25 tatacttgt ttggtgccg tgggtccgtt aaatctgtt gttatgatct tagtcttga 2400
 taaggttcgg tctgtctagc tacgtctgt gcagcacta attgtcagg ctaattttt 2460
 agcatgctt tttttattg gtttggtt gtctgactg gctgtagata gttcaatct 2520
 ttgtctgact gggctgtaga tagttcaat ctacctgtc gttatttta taaatttg 2580
 atctgtatgt gtgtcatata tctcatctt ttgatataat cgatagggtt atatgtgct 2640
 30 gtcggtttt tactgttct ttatgagata tattcatgt tagatacatg aaacaacgtg 2700
 ctgttacagt ttaatagtc ttgttatct aataaacaaa taaggatagg tatatgctgc 2760
 agttagttt actggtactt ttttgacat gaacctacgg cttaataat agtcttcatc 2820
 aaataaaaag catattttt aattatttcg atatactga atgatgtcat atgcagcatc 2880
 tgtgtgaat ttggccctg tcttcatatg ctgtttatt gttgggact gttctttg 2940
 35 ttgataact atcctgtgt ttgtgatcc ttgtcagg gcaacctatg ctccggagag 3000
 gagaccagt gagattaggc cagctacagc agctgatatg gccgcggtt gtgatatcgt 3060
 taaccattac attgagacgt ctacagtga cttaggaca gagccacaaa caccacaaga 3120
 gtggattgat gatctagaga ggtgcaaga tagataacct tgggtggtg ctgagggtga 3180
 ggggtgtgt gctgttatt ctacgctgg gccctggaag gctaggaacg ctacgattg 3240
 40 gacagttgag agtactgtt acgtgtcaca taggcatcaa aggttgggcc taggatccac 3300
 attgtacaca cattgtcta agtctatga ggcgcaagg tttaagtctg tgggtgctgt 3360
 tataggcctt ccaaacgatc catctgttag gttgcatgag gctttgggat acacagcccg 3420
 gggtagattg cgcgcagctg gatacaagca tgggtgatg catgatgtg gttttggca 3480
 aagggtatt gagtgccag ctctccaag gccagttagg ccagttacc agatctgatt 3540
 45 aattaactag gctactgtg ctactgtgc atgtatgtg tgtggttact aaaataatta 3600
 gtgttttct ttttttga agcatatgt tggtaataa atgatgaact ccgatgtcc 3660
 tctctataaa tcttgatgt tctgactga tccgtacgtc gttgtctt gatttgatga 3720
 tgagattgaa aaatggaatg tcatgctaag gaggtgccc cgcccggcc gtagcgcca 3780
 cgagcgaact cctgcaggac aacggagcag cctctcagc aaatcctacc acctattta 3840
 50 aatagagtga ggttgattg ctgaggtagc ggccgcgtta acaagctct gcagaattc 3900
 tcaacgagat ctgagccaa tcaagagga gtgatgtaga ctaaaagcaa taatggagcc 3960
 atgacgtaag ggctacgcc catacgaaat aattaaaggc tgatgtgacc tgcggtctc 4020
 tcagaacctt tacttttat gtttggcgtg tttttttaa ttccacggc aatgacgatg 4080
 tgaccaaacg agatcttgag ccaatcaag aggagtgtg tagacctaaa gcaataatg 4140
 55 agccatgacg taagggtta cggccatag aaataattaa aggtgatgt gacctgtcg 4200
 tctctagaa ccttactt ttatatttg cgtgtattt taaattcca cggcaatgac 4260
 gatgtacct gtgcacccg ttgcctata aataagttt agttgtatt gatcgacacg 4320
 gtcgagaaga cagggccatt ctagaacct ctccacaca ctcaagccac actattggag 4380
 aacacacagg gacaacacac cataagatcc aaggaggcc tccgcccgc cggttaacca 4440
 60 cccgcccct ctctcttc tttccggtt tttttccg tctcggtctc gatcttggc 4500

cttggtagt ttgggtggcg agaggcggct tcgtgcgcgc ccagatcggg ggcggggagg 4560
 ggcgggatct cgcggctggg gctctgcgc gcgtggatcc ggcccggatc tcgcggggaa 4620
 tggggctctc ggatgtagat ctgcgatccg ccgtgttg ggagatgat ggggggttta 4680
 aaatttcgc cgtgtaaac aagatcagga agaggggaaa agggcactat ggttatatt 4740
 5 ttatatatt tctgtgctt cgtcaggctt agatgtgcta gatctttt tctttttt 4800
 gtgggtagaa ttgaatccc tcagcattgt tcacggtag tttttttt catgattgt 4860
 gacaaatgca gccctgtgc gagcttttt gtaggtagaa gtgatcaacc atggcccaga 4920
 tcaacaacat ggcccagggc atccagacc tgaaccctaa ctctaactc cacaagccgc 4980
 aagtgccaa gtctagctcc ttctcgtgt tcggctcaa gaagctcaag aatagcgcca 5040
 10 attcatgct ggtcctgaag aaagactga tctcatgca gaagtctgc tctttcgca 5100
 tcagtcttc ggttcgact gccctcatgc tcacctcgt taggaacgcc tggtagctc 5160
 ccgctctccc tgaggagctg agcgagaagc cttgggtcg caccatccta gacactccgt 5220
 tagccctta cgcagcgtt gacggcgtg tggcgccct gctgacatc tgcccgcata 5280
 ggttcgctcc gctcagcgc ggcacctctg tcaacgggca tctcagtgc ccgtaccag 5340
 15 ggttggaatt tgacggcgtt gggcagtgt tcacaacc gcacggcaac ggcgcacggc 5400
 cagctccct caacgttagg tcttccctg ttgcgagc gcacgcactg atctgact 5460
 ggcctggcga cccagctctg gccgatccg gagccattcc cgactcgtt tggcgctgg 5520
 acccagccta tcggacggtc ggcggttagg ggcacgtcga ttgtaactat aagctcctg 5580
 tggacaacct tatgatttg gccacgctc agtactgtga ccgggctaac gctcagactg 5640
 20 acgctttga ccgtctgaa agggaggta tcgtggcga cggagagatt caggcgctga 5700
 tgaagatccc tggaggcag ccctctgtc tcattggcga gtttctaga ggcgcgaaca 5760
 cgcccgtaga ccctggaac gacatccgt ggaataaggt ctccgcatg ctgaactca 5820
 tcgccgttc gcccgaggc acaccaaag agcagtaat ccacagcaga gggaccata 5880
 ttctacacc ggaaccgag gctagtggc actactctt cggctcgtc cgaatttcg 5940
 25 ggatagacga tcggagatg gacggtgtt ttcgatctt gcaagcgca gctctcgtc 6000
 aggaagataa ggtggtcgt gaggctatc agcgtaggc cgcctacgtt gaggcgaacg 6060
 gtattaggcc cgcgatgct tctgcgacg aggcgcagc tagagtgtc cgcgagatg 6120
 aaaagctgga gcagctagag gccgcctgag gtaccgagc cgtcaatcac tagtgaattc 6180
 tgcattgctt tggacgatg ctattcagg ttggagcaa ttggtgat gttgtgca 6240
 30 gttctgca gtcgatgag acatctctt attgtttt tttcccagc gttttctga 6300
 cttgtgtaat cggctaact ccaacagat cggcgatga taaatgaga ataaattgt 6360
 ctgatttga gtgcaaaaa aaaggaatta gatctgtgtg tgtttttg atccccggg 6420
 cggccgcaca acaacgaat acgtctgtt tggcctacta ggccaacgca ggcgtggcc 6480
 gtgacggcca cgagcgaact gatatgaat tctaggata acagggtaac ccacgttag 6540
 35 ctaaacgcgc cctcatcga gccccattt ggacgtgaat gtacacagc cgaataaag 6600
 atttccgaat tagaataatt ttttatgtc ttgcctat aaatacagc gatcgtaat 6660
 tgcgtttta taaaatgta ctttattt ataataacgc tgcggacatc tacattttg 6720
 aattgaaaaa aaattggtta ttactcttc ttttctca ta 6762
 <210> 10
 40 <211> 9259
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 45 <400> 10
 gttgatatt tgacccaaag acatgccatt ctattgtt tcagtttat cctaccaatg 60
 tagtaaccca aacagttaa ttacaagtga atcaactgga aacaagatct acagactgca 120
 cacagcacat taacaattct gcgcaaatg aatgacagag tgatttatg gactaagct 180
 ggttttcatc atgaatttg atcagagcat aaaccttgt gacaacagaa tagaatcaa 240
 50 caagctgctc agtcagatg gaccaaaata atgaacgcgc gcacagtata tgaacaaaa 300
 atagtgaacg cacagtagaa aacagacgga gaagctagt cactactaaa atagaactca 360
 ctgatgcatt ttaaccgaa tcattaaaa acagaccaac atgattagac cagctatcaa 420
 aagacacact gctgagaatc aacaactgct atatgtgtga tctacctgaa ataaacagat 480
 gcagttttt gtcctacag accaactgt ttaatcaga atgccaatga taaatcctta 540
 55 gagatcgtga gagcaacta attaacact gagaatcaac aactgctata atccttagag 600
 atctggagag cactactaatt aaccactgag cctctttgt cagcatgcag aaatcccaa 660
 aactatactg taattcgaaa ccataagcg cacatcaaag caactccatt gttgatggt 720
 gggaatgta aaaaatggt tgggacacc aattgccgta aacaaaccca cagggagaac 780
 atgagtatga acaatcaaaa ctaacatgaa taagtggatg ttcagattaa gtaaggaaaa 840
 60 tggtcacag attaagaaca gagcaatgta tagcacaagt ggaaattaca aacctttt 900

cacaaaaatta caatctctag acagcacaca gcaagatctt ggaatggatg aggggtgatga 960
 atcgggtgaaa aaagacagca cacagcaaga tctctagaac agaacatgaa atgttgaga 1020
 gtggggatgg gtgttagacc taacctctgt ccatcctttt aatagccgtc gctgccaggt 1080
 atggaatagg ggcgctgag tgccgtcgag ggcgcgcgca ggggcgcggt ttggtgtggg 1140
 5 cgggataccc ggcgcggtcg ggaacccca cggcgggtcat cacggcgagc cgggggaggg 1200
 gggggtggc ggggtggcag gcggtcgctg ccaggattg atgtgcgcca gtcagcatca 1260
 tcacacaaa agttagggcc gaatagttt aaattagaaa gtcgcaatt gaggtctgtc 1320
 gaggaggta acctaggtag tgaattacc ttgtatccct aactagatat cgaattctaa 1380
 ctataacgtt cctaaggtag cgaatcgctt ttctggcg gcgaagacgc aaactcgac 1440
 10 cggltcaagc cgtaaggca ctctatgca accacagtca acttgaatgc cgcttgagt 1500
 ccttcaag ttttttct tgcaaaaat catttcttt ttttaaaaa agtataattt 1560
 ggatcgtgca aatttctct taggtgtgtg tgtgactgtg tgagtaaca tttctctagt 1620
 tgtgcgcgac tgcgtcttac ttggagatt acaatatctt tctaaatgc ttcgattact 1680
 tatttataaa ccgtctctaa ggccaattgc tcaagattca tcaacaatt gaaacgtctc 1740
 15 acatgattaa atcatataaa gtttctaagt ctgtttgac aagattttt tagattttca 1800
 tctaaattgg atgaaactat caaacactaa ttttaaaaa tataagagaa gctccggaga 1860
 taaaaggctg tctatgttat tataagagta aagtcgtcta ttcttctgt cccaacatat 1920
 ataattctaa gcatgaattg ctttctttt ggacaaaagg agcatgccac aacacaagaa 1980
 tgatgtcacc gtcagcttg gatccttta tggtaaagct tcaccttcta taatctaaca 2040
 20 atagagaaat cagggaataa tcatgtttt gttgtttta ttttaacct ccacaataac 2100
 ttgtgtttac catttttgt ttgatttag tttagagaa gcggttata caggacctaa 2160
 aatcttttt cagtacacag tacaacgcag acgtctatac acgcacgcac actcacctct 2220
 atgaacacac gtaagaaaac cctacacctt gacaccttc gaaggactga gccggtaaat 2280
 atagagattc tgaagtcac tattagcgc tcgtgtcaa cggaatgtc gcttaccact 2340
 25 taaagcataa cgccgagaaa tcccgaata aatccagtaa aatacgagca cccgtgccaa 2400
 gttgaatatt tgaacccgag tgggtagatt ccaccgcaa ggacctaacc agatcatttc 2460
 gcaaacagga actaaaatcg gttagagagc cagacaaaag ctttcttaa gagccactcc 2520
 agtggaagcc cctacttag gtataaaatg caatactagt ggggctcta aataaacttc 2580
 tatttttcat ggcttctaa aattcactcc caaaccccta gctatagaag tctctatcc 2640
 30 atcctctaaa taaaatggg agtctatatt atttaccag agttgatcgt aaatttagtc 2700
 tctcaattt tataagtga gggtagagga tgactggagt tgcctaaac ggacctatct 2760
 tcaagtgaac tcagttagcc cggttaacgg cgtcgacaag ttaatactaa cggacaccaa 2820
 ccagagaaga gaaccaccgc cagcgcgag ccaagcgacg ttgacatctt ggcgcggcac 2880
 ggcactctcc tggcgtctg cccctctcg agacttccgc tccactccc accggtggcg 2940
 35 gtttcaagt ccgttccgc tctctcaca cggcacgaaa ccgtgacggg caccggcagc 3000
 acggggggat tctttccca ccgtctctc ctttccctt cctctccgc cgctataaat 3060
 agccagcccc atcccagct tcttccca acctcatctt ctctcgtgtt gttcggcaca 3120
 accgtagca tcccacaact cctcgtcgtc tctctcgcg agcctcgtc atccccgct 3180
 tcaaggtagc gcatagatt atctccctc tctctacct ctctcttta tagggcctgc 3240
 40 tagctctgtt cctgttttc catggctgcg aggtacaata gatcggcgat ccatggttag 3300
 ggctctctag ttgtttctt gttttccat ggctgcgag cacaatagat ctgatggcgt 3360
 tatgatggtt aactgtcat actcttgcga tctatggctt ctttaggagt ttaggacatc 3420
 tatttaattt cggatagttc gagatctgtg atccatggtt agtaccctag gcagtggggt 3480
 tagatccgtg ctgttatgtt tcttagatgg attctgattg ctacagtaact gggaatcctg 3540
 45 ggtatggtct agctggttcg cagataagat cgatttcag atatgctata tctgttttg 3600
 ttgccgtggt tccgttaaat ctgtctgta tgatcttagt cttgataag gttcggctgt 3660
 gctagctacg tctgtgcag cacttaattg tcaggtcata atttttagca tgccttttt 3720
 ttattggtt ggtttgtct gactgggctg tagatagttt caatcttgt ctgactgggc 3780
 ttagatagat tcaatctac ctgtcggtt attttattaa atttgaatc gtatgtgtgt 3840
 50 catatctt catcttttag atatatgat aggtttatat gttgctgctg gtttttact 3900
 gtctcttat gagatatatt catgcttaga tacatgaaac aacgtgctgt tacagtttaa 3960
 tagttctgtt ttatctaata acaataaag gataggata tgctgcagtt agttttactg 4020
 gtacttttt tgacatgaac ctacggctta ataattagtc ttcatcaat aaaaagcata 4080
 ttttttaatt atttcatat acttgaatga tgcataatgc agcatctgtg tgaattttg 4140
 55 gccctgtctt catatgctgt ttattgttt gggactgtt ctttggtga taactcatcc 4200
 tgtgttttg tgatcctttt gcagggtcaa ccatgtctcc ggagaggaga ccagttgaga 4260
 ttaggccagc tacagcagct gatatggcg cggtttgtga tatcgttaac cattacattg 4320
 agacgtctac agtgaacttt aggacagagc cacaaacacc acaagagtgg attgatgatc 4380
 tagagaggtt gcaagataga tacccttggg tgggtgtga gttgagggg gttgtggctg 4440
 60 gtattgctta cgctggggcc tgaaggcta ggaacgcta cgattggaca gttgagagta 4500

ctgtttacgt gtcacatagg catcaaaggt tgggcctagg atccacattg tacacacatt 4560
 tgcttaagtc tatggaggcg caaggtttta agtctgtggt tgctgttata ggccttccaa 4620
 acgatccatc tgttaggttg catgaggctt tgggatacac agcccggggt acattgcgcg 4680
 cagctggata caagcatggt ggatggcatg atgttggttt ttggcaaagg gattttgagt 4740
 5 tgccagctcc tccaaggcca gtagggccag ttaccagat ctgattaatt aactaggcta 4800
 ctgtagctag ctgtgcatgt atgtggtgtg gttactaaaa taattagtgt ttctctttg 4860
 tttggaagca tatgtgtggt gaataaatga tgaactccga tgttctctc tataaatctt 4920
 gatgattcgc tagctatccg tacgtcgttg ttcttgatt tgatgatgag attgaaaaat 4980
 ggaatgtcat gctaaggagg gtgccgcggc cggcccgta cggccacgag cgaactcctg 5040
 10 caggacaacg gagcagctc ctacgcaa cctaccacct catttaata gattgaggtt 5100
 gatttgctga ggtagcggcc gcgttaacaa gcttctgcag aattcgtcaa cgagatcttg 5160
 agccaatcaa agaggagtga ttagaccta aagcaataat ggagccatga cgttaagggt 5220
 tacgcccata cgaaataatt aaaggctgat gtgacctgtc ggtctctcag aacctttact 5280
 tttatgttt ggcgtgtatt tttaaatttc caggcaatg acgatgtgac ccaacgagat 5340
 15 ctgagccaa tcaaaggagg gtgatgtaga ctaaagcaa taatggagcc atgacgtaag 5400
 ggcttacgcc catacgaaat aattaaaggc tgaatgtacc tgcggtctc tcagaacctt 5460
 tacttttat atttggcgtg tattttttaa ttccacggc aatgacgatg tgacctgtgc 5520
 atccgcttg cctataaata agttttagt tttatgtac gacacggctg agaagacacg 5580
 gccattctag aaccatctc cacacactca agccacacta ttggagaaca cacagggaca 5640
 20 acacaccata agatccaagg gaggcctccg ccgcccggc taaccacccc gccctctcc 5700
 tctttcttc tccgttttt ttccgtctc ggtctcgatc ttggccttg gtagtttggg 5760
 tgggcgagag gcggtctct gcgcgccag atcggtgcgc gggaggggag gtagctcgcg 5820
 gctggggctc tcgcccggc gtagccggc cggatctgc ggggaatggg gctctcgat 5880
 gtagatctgc gatcccggt ttttgggga gatgatggg ggtttaaata ttccgcccgt 5940
 25 ctaaacaaga tcaggaagag gggaaaagg cactatggt tatatttta tatattctg 6000
 ctgctctgc aggttagat gtgctagatc ttcttctt cttttgttg gtagaattg 6060
 aatccctcag cattgtcat cggtagttt tctttcatg atttgtaga aatgcagcct 6120
 cgtgcggagc tttttgtg gtagaagtg tcaacctgg cccagatcaa caacatggcc 6180
 cagggcaccc agacctgaa ccctaactc aactccaca agccgcaagt gcccaagtct 6240
 30 agctcctcc tcgtgttcg ctccaagaag ctcaagaata gcgccaattc catgctggtc 6300
 ctgaagaaag actgactct catgcagaag ttctgtctc ttgcatcag tgcttcggtt 6360
 gcgactgcct gcatgctac ctctgttag aacgcctgt acgtcgccg tctccctgag 6420
 gagctgagcg agaagccctt ggtctgcacc atcttagaca ctccgttagc cttttaccgc 6480
 cagcctgacg gcgtagtgg gcctctgct gacatctgcc cgcataaggt cgtctcgctc 6540
 35 agcgacggca tctctgtcaa cgggcatct cagtgcctg accacgggct ggaattgac 6600
 ggcggtggc agtgtgtcca caaccgcac ggcaacggc cacggccagc ttccctcaac 6660
 gttaggctgt tccctgtgt cgagcgcgac gactgatct gtagctggc tggcgacca 6720
 gctctggccg atccaggag cattccgac ttggttgcc gcgtggacc agcctatcg 6780
 acggtgcggc gttacgggca cgtcgattgt aactataagc tctgttga caacctatg 6840
 40 gatttggcc acgtcagta cgtgcaccg gtaacgctc agactgacgc cttgaccgt 6900
 ctgaaaggg aggtcatct cggcgacgga gagattcagg cgtgatgaa gatccctgga 6960
 ggcacgccc ctgtgtcat ggcaagttt ctacaggcg cgaacacgcc cgtggacgcc 7020
 tggaacgaca tccgttgaa taaggctcc gcgatctga acttcacgc cgttcgccc 7080
 gagggcacac ccaaagagca gtcaatccac agcagaggga cccatattct tacaccgaa 7140
 45 accgaggcta gttgccacta ctctctggc tcgtcacgga attcgggat agacgatccg 7200
 gagatggacg gtttcttcg atcttgcaa gcgcaagctc tcgtcaagga agataaggtg 7260
 gtcgtggagg ctatcgagcg taggcgcgc tacgttgagg cgaacggtat taggcccgcg 7320
 atgctgtct gcgacgagg cgcagttaga gtgcgcgcg agatagaaaa gctggagcag 7380
 ctgagggcgg cctgaggtag cgagctgct aatcactagt gaattctgca tgcgttga 7440
 50 cgtatgctca ttacggttg agccaattg gtgatgtgt gtgcgagtc ttgcgagtct 7500
 gatgagacat ctctgtattg ttttcttc cccagtgtt tctgtactg tgtaatcggc 7560
 taatcgccaa cagattcggc gatgaataaa tgagaaataa attgttctga tttgagtgc 7620
 aaaaaaaaag gaattagatc tgtgtgtgt ttttgatcc ccggggcggc cgcacaacaa 7680
 acgaatacgt cctgcttggc ctactaggcc aacgcaggcg ctggccgtga cggccacgag 7740
 55 cgaactgata tgaattcta gggataacag ggtaatccac gtgtagctaa acgcgccctc 7800
 atctaagccc ccatttggac gtgaatgag acagctcga ataaagatt ccgaattaga 7860
 ataattgtt tattgttct gcctataat acgacggatc gtaattgtc gtttatcaa 7920
 aatgtactt cattttataa taacgtcgc gacatctaca ttttgaatt gaaaaaaat 7980
 tggaattac tctttctt tctccatagc attcgcaata cagttagatg cgagtgaagc 8040
 60 acgataagtc acaaccataa tacatactat tagaatccg cttttgccc agtgctttt 8100

ttgggcactc ggcaaagact tctttaccgg caaagtccta ctctcggtaa cgaccacgtt 8160
 taccgagagc aggacgctcg gtacaggag acactcggca aagacctctt tgcgagtg 8220
 caaacgctcg gcaaagggcc gtcagcagcc gtctatagca gatgtttatt atctttgccg 8280
 agcgccaagc gttggcactc ggcaaaacaa gtgttgccga gtgcttaaat tggacactcg 8340
 5 gcaaaatata ttttcttt tcttttgc aaccaaactt tctgtggtt gttctacac 8400
 tatgtagaca tacatgttcc attttggcac aattataaaa gtgttgcta taaatattag 8460
 atttgttcg ttaattgaa ttttctcgga taattcagat tgaactaca agtcactcaa 8520
 aaaatgaaa accatgaatg caaaaatgat atccatgta ttagcaciaa gttacggccg 8580
 atttcaggag tagaccgaa ttttgagca ccatgctcac gaaacatgac tgtgaacttg 8640
 10 tcatccagtt gtttataaa tgtataaaac acaaacaaaa tcaaaaaatc atgaaacttg 8700
 tccacatgic atgatatcat catatgtaga ggtgtgata aaaagttgaa aatattcgt 8760
 gaaagttgc catagttcac tgagcctctt tgcgagtggt cactcggc aaagccttg 8820
 tgcagtgct cagacactcg gcaataagt tgttccagt agtgacatta atagaaaaag 8880
 agtgcatagt tcttcacat agctaactaa ttggttcatt acaagaaac attagaacaa 8940
 15 gcataatgat gacttgaca taatgaaata aaatacatag gttgaggaa ccaaacataa 9000
 tggaacacag aacaaataga ggacaacatc atagaaaacg acataacttc acatgggtt 9060
 tacgccaatt gctccagcc aagtcataa gtgctcgatg agatcatgtt gaagtgtt 9120
 gtatcattg agactagta tgtgtgtg ggagcatagc cactctgtac gaacttcagg 9180
 gattgtgatg agagatccac gtgcactcca attgcggcaa actcaacatt actgcacgt 9240
 20 gggacctgt cctcgacaa 9259
 <210> 11
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 11
 gaattgaaa aaaattgga attactctt ctt 33
 <210> 12
 30 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 35 <400> 12
 atcgtgctc actcgcactc aact 24
 <210> 13
 <211> 19
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 13
 ctccatagca ttcgcaata 19
 45 <210> 14
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Рекомбінантна
 <400> 14
 attagaaagc tcgcaattga ggtctgtcga ggaggtaac ctaggactg aattaccctg 60
 ttatccctaa ctagatatcg a 81
 <210> 15
 55 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 60 <400> 15

tggcgcgccca agacgcaaac tcggaccggt tcaagccgtc aaggcacttc tatgcaacca 60
 с 61
 <210> 16
 <211> 59
 5 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 16
 10 atcctgttgt ttggtgatcc tttgcaggt gcaaccatgt ctccggagag gagaccagt 59
 <210> 17
 <211> 56
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 15 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 17
 ccagttaggc sagttaccca gatctgatta attaactagg ctactgtagc tagctg 56
 <210> 18
 20 <211> 99
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 25 <400> 18
 aaaaatggaa tgtcatgcta aggaggggtgc cgcggcccg cctgacggc cacgagcgaa 60
 ctctgcagg acaacggagc agcctctca gcaaatcct 99
 <210> 19
 <211> 56
 30 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 19
 35 tgaggttgat ttgctgaggt agcggccgcy ttaacaagct tctgcagaat tcgtca 56
 <210> 20
 <211> 55
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 20
 aggtagaagt gatcaaccat ggcccagatc aacaacatgg cccagggcat ccaga 55
 <210> 21
 45 <211> 91
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 50 <400> 21
 cgcgagatag aaaagctgga gcagctagag gccgcctgag gtaccgagct cgtcaatcac 60
 tagtgaattc tgcattcggt tggacgtatg c 91
 <210> 22
 <211> 67
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Рекомбінантна
 <400> 22
 60 ctagggataa cagggtaatc cacgtgtagc taaacgcgcc ctcatctaag cccccatttg 60

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Рекомбінантна молекула ДНК, яка містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 10, або її компоненти, що вказує на наявність трансформанту кукурудзи MON 87419, де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.
- 10 2. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, де молекула ДНК отримана від трансгенної рослини кукурудзи або насінини, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.
3. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, де молекула ДНК являє собою амплікон для діагностики наявності ДНК, отриманої із трансформанту кукурудзи MON 87419, де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.
- 15 4. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, де молекула ДНК отримана з рослини кукурудзи, клітини, насінини, рослини-нащадка або частини рослини з трансгенної кукурудзи, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.
- 20 5. Молекула ДНК, яка містить суміжну послідовність ДНК SEQ ID NO: 10 достатньої довжини, щоб функціонувати як зонд ДНК, який гібридується у жорстких умовах гібридизації з послідовністю ДНК, вибраною з групи, яка складається із SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 10, де молекула ДНК не гібридується у жорстких умовах гібридизації з
- 25 послідовністю ДНК, яка не містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 10, і де вказана молекула ДНК містить SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2.
6. Пара молекул ДНК, яка містить першу молекулу ДНК і другу молекулу ДНК, де перша молекула ДНК є фрагментом послідовності SEQ ID NO: 9, а друга молекула ДНК є фрагментом
- 30 геномної ДНК кукурудзи трансформанту кукурудзи MON 87419, і де і перша, і друга молекули ДНК містять послідовність ДНК із суміжних нуклеотидів достатньої довжини, щоб функціонувати як праймери ДНК при їхньому спільному використанні у реакції ампліфікації з ДНК, що містить трансформант кукурудзи MON 87419, для отримання амплікону для діагностики трансформанту
- 35 кукурудзи MON 87419 у зразку, де вказаний амплікон містить SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, і де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.
7. Спосіб детекції наявності трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК, де спосіб включає:
 - а) контактування зразка з молекулою ДНК за п. 5;
 - 40 б) застосування до зразка і молекули ДНК жорстких умов гібридизації; і
 - в) детекцію гібридизації молекули ДНК з молекулою ДНК-мішені у зразку, де гібридизація молекули ДНК з молекулою ДНК-мішені свідчить про наявність трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК, і де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.
- 45 8. Спосіб детекції наявності трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК, де спосіб включає:
 - а) контактування зразка з парою молекул ДНК за п. 6;
 - б) здійснення реакції ампліфікації, достатньої для отримання ДНК амплікону, що містить послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3,
 - 50 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8; і
 - в) детекцію наявності ДНК амплікону в реакції, де наявність ДНК амплікону в реакції свідчить про наявність трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку ДНК, і де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.
9. Набір для детекції ДНК, який містить:
 - а) молекулу ДНК, яка містить SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2; або
 - б) пару молекул ДНК, яка містить першу молекулу ДНК і другу молекулу ДНК, де перша молекула ДНК є фрагментом послідовності SEQ ID NO: 9, а друга молекула ДНК є фрагментом
 - 55 геномної ДНК кукурудзи трансформанту кукурудзи MON 87419, і де і перша, і друга молекули ДНК містять послідовність ДНК із суміжних нуклеотидів достатньої довжини, щоб функціонувати як праймери ДНК при їхньому спільному використанні у реакції ампліфікації з ДНК, що містить
 - 60

трансформант кукурудзи MON 87419 для отримання амплікону для діагностики трансформанту кукурудзи MON 87419 у зразку, де вказаний амплікон містить SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, і де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.

5 10. Трансгенна рослина кукурудзи, насінина, клітина або частина рослини, яка містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, а також молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує білок дикамба монооксигенази (DMO) і білок фосфінотрицинацетилтрансферази (PAT).

10 11. Трансгенна рослина кукурудзи, насінина або клітина за п. 10, де рослина, насінина або клітина стійка до глюфосинату або дикамба, або гербіцидів глюфосинату і дикамба, і де рослина, насінина або клітина містить SEQ ID NO: 10.

12. Трансгенна рослина кукурудзи, насінина, клітина або частина рослини, яка містить трансформант кукурудзи MON 87419, де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.

15 13. Трансгенна рослина кукурудзи або насінина за п. 12, де рослина кукурудзи або насінина є гібридом, який має щонайменше одну батьківську рослину, яка містить трансформант кукурудзи MON 87419, де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.

20 14. Спосіб вирощування трансгенної кукурудзи, який включає висівання трансгенної кукурудзи, яка містить трансформант кукурудзи MON 87419, на ділянці і застосування ефективної дози дикамба або глюфосинату, або гербіцидів дикамба і глюфосинату для контролювання росту бур'янів на ділянці, не ушкоджуючи трансгенну кукурудзу, де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.

15. Спосіб за п. 14, де ефективна доза гербіциду глюфосинату в цілому складає від 0,1 фунта (0,045 кг) кислотного еквівалента на акр (0,405 га) до 16 фунтів (7,257 кг) кислотного еквівалента на акр (0,405 га) гербіциду глюфосинату впродовж періоду вегетації.

25 16. Спосіб за п. 14, де ефективна доза гербіциду глюфосинату в цілому складає від 0,4 фунта (0,181 кг) кислотного еквівалента на акр (0,405 га) до 1,59 фунта (0,721 кг) кислотного еквівалента на акр (0,405 га) гербіциду глюфосинату впродовж періоду вегетації.

30 17. Спосіб за п. 14, де ефективна доза гербіциду дикамба в цілому складає від 0,1 фунта (0,045 кг) кислотного еквівалента на акр (0,405 га) до 16 фунтів (7,257 кг) кислотного еквівалента на акр (0,405 га) гербіциду дикамба впродовж періоду вегетації.

18. Спосіб за п. 14, де ефективна доза гербіциду дикамба в цілому складає від 0,5 фунта (0,227 кг) кислотного еквівалента на акр (0,405 га) до 2 фунтів (0,907 кг) кислотного еквівалента на акр (0,405 га) гербіциду дикамба впродовж періоду вегетації.

35 19. Спосіб вирощування трансгенної рослини кукурудзи, стійкої до гербіцидів глюфосинату і дикамба, де спосіб включає:

а) посадку насінини кукурудзи, що містить трансформант MON 87419;

б) забезпечення росту рослини із вказаної насінини; і

с) обробку рослини глюфосинатом або дикамба, або гербіцидами глюфосинату і дикамба, де вказаний трансформант кукурудзи MON 87419 містить SEQ ID NO: 10.

40 20. Спосіб отримання рослини, стійкої до застосування гербіцидів глюфосинату і дикамба, де спосіб включає:

а) забезпечення ДНК-конструкта, який містить вставку трансгена, що включає SEQ ID NO: 9;

б) введення ДНК-конструкта у клітину рослини кукурудзи; і

45 с) регенерацію клітини рослини кукурудзи для отримання рослини кукурудзи, такої як рослина, стійка до застосування гербіцидів глюфосинату і дикамба.

21. Спосіб за п. 20, де введення ДНК-конструкта у клітину рослини кукурудзи приводить у результаті до отримання SEQ ID NO: 10 як частини геному клітини кукурудзи.

22. Рослина кукурудзи, отримана способом за п. 20.

50 23. Рослина-нащадок, насінина або частина рослини кукурудзи за п. 22, яка містить SEQ ID NO: 10.

