

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 032683

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.07.31

(21) Номер заявки
201600085

(22) Дата подачи заявки
2011.12.09

(51) Int. Cl. *A01H 5/00* (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/05 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A01C 1/00 (2006.01)
A01N 41/10 (2006.01)
A01N 57/20 (2006.01)
A01P 13/00 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)
A23J 1/14 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(54) НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОБЫТИЯ SYHT0H2 В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБРАЗЦЕ (ВАРИАНТЫ)

(31) 61/423,131; 61/467,621

(32) 2010.12.15; 2011.03.25

(33) US

(43) 2016.05.31

(62) 201300707; 2011.12.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗИНГЕНТА ПАРТИСИПЕЙШНС АГ
(СН)

(72) Изобретатель:
Хипскинд Джон, Бёрджин Кристина,
Джейн Ракеш, Терпстра Каролин,
Сигарева Марина, Дефрамон Анник,
Брейтингер Бекки, Крамер Ванс, Гу
Вэйнин (US)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(56) US-A1-20030176284
US-A1-20100099859
WO-A2-2008150473

(57) Изобретение относится к наборам для идентификации объекта SYHT0H2 в биологическом образце, которые содержат праймеры для амплификации указанного объекта или зонды для его обнаружения.

032683 B1

032683 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к идентификации события SYHT0H2, т.е. к предназначенным для этих целей наборам, где событие SYHT0H2 является трансгенным растением сои.

Предпосылки изобретения

Экспрессия гетерологичных генов в растениях, как известно, зависит от их расположения в геноме растения, возможно из-за структуры хроматина или близости транскрипционных регуляторных элементов, близких к сайту интеграции. В то же время наличие трансгена в различных местах в геноме по-разному влияет на общий фенотип растения. По этой причине часто необходим скрининг большого количества событий для идентификации события, характеризуемого оптимальной экспрессией введенного целевого гена. Например, было замечено, что у растений и у других организмов могут быть значительные различия в уровнях экспрессии введенного гена между событиями. Могут иметь место различия в пространственных или временных паттернах экспрессии, например различия в относительной экспрессии трансгена в различных тканях растения, которые могут не соответствовать паттернам, ожидаемым от транскрипционных регуляторных элементов, присутствующих во введенной генной конструкции. Кроме того, было обнаружено, что трансгенная вставка может повлиять на эндогенную экспрессию генов. По этим причинам обычно получают от сотен до тысяч различных событий и подвергают скринингу данные события для обнаружения единичного события, которое обладает требуемыми для коммерческих целей уровнями и паттернами экспрессии трансгенов. Событие, которое обладает требуемыми уровнями или паттернами экспрессии трансгенов, используется для интрогрессирования трансгена в другие генетические окружения путем генеративного ауткроссинга с использованием традиционных способов селекции. Потомство от таких скрещиваний сохраняет характеристики экспрессии трансгена оригинального трансформанта. Эта стратегия используется для обеспечения надежной экспрессии генов в ряду сортов, которые хорошо приспособлены к местным условиям выращивания.

Было бы полезно иметь возможность обнаруживать присутствие специфического события для того, чтобы определить, содержит ли потомство, полученное в результате генеративного скрещивания, целевой трансген. Кроме того, обнаружение специфического события будет полезно для соблюдения правил процедуры предрыночного одобрения и маркировки пищевых продуктов, полученных из рекомбинантных сельскохозяйственных растений, для использования в экологическом мониторинге, контролирующем признаки культурных растений в поле, для контроля продукции, полученной из собранного урожая, и/или для обеспечения соблюдения сторонами нормативных или договорных условий. Наборы, которые обеспечивают быструю идентификацию событий в растениях, проявляющих толерантность к гербициду, могут быть использованы для защиты растений и борьбы с сорняками, например, с целью уменьшения количества применений гербицида, необходимых для борьбы с сорняками в поле, с целью уменьшения количества гербицида, необходимого для борьбы с сорняками в поле, с целью уменьшения объема обработки почвы, необходимого для получения урожая, и/или для разработки программ, которые отсрочат или предотвратят появление устойчивых к гербицидам сорняков. Существует постоянная потребность в защите растений и борьбы с сорняками, которые дают возможность целевого использования конкретных комбинаций гербицида и эффективного обнаружения такого события.

Чтобы удовлетворить эту потребность, настоящее изобретение предоставляет соевые растения, которые включают трансформационное событие SYHT0H2, которое придает устойчивость к гербициду-ингибитору HPPD и к глюофосинату. Также предложены композиции и способы обнаружения трансформационного события SYHT0H2.

Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к наборам для идентификации события SYHT0H2 в биологическом образце. В одном аспекте настоящего изобретения набор включает в себя первый и второй праймеры, в котором первый и второй праймеры амплифицируют полинуклеотид, содержащий специфический участок SYHT0H2. В другом аспекте настоящего изобретения указанный набор содержит по меньшей мере один зонд нуклеиновой кислоты, который гибридизуется в жестких условиях со специфическим участком SYHT0H2.

Краткое описание графических материалов

Чертеж представляет собой изображение бинарного вектора 15954, содержащего соевый кодон-оптимизированный Avena HPPD ген.

Краткое описание последовательностей в перечне последовательностей

Таблица 1

SEQ ID NO.	Описание
1	20 п. о. LB2 соединение (10 п. о. фланкирующая /10 п. о. вставка)
2	20 п. о. LB1 соединение (3 п. о. вставка /17 п. о. фланкирующая)
3	40 п. о. LB2 соединение (20 п. о. фланкирующая /20 п. о. вставка)
4	40 п. о. LB1 соединение (13 п. о. вставка /27 п. о. фланкирующая)
5	60 п. о. LB2 соединение (30 п. о. фланкирующая /30 п. о. вставка)
6	60 п. о. LB1 соединение (23 п. о. вставка /37 п. о. фланкирующая)
7	LB2 фланкирующая геномная последовательность (99 п. о.)
8	LB1 фланкирующая геномная последовательность (462 п. о.)
9	Полная вставка
10	Вставка плюс фланкирующая геномная последовательность
13, 16	Зонды, используемые для TAQMAN® теста
11-12, 14-15, 17-21	Последовательности праймера, используемые в амплификационных тестах
22-23	TAQMAN® тестовые продукты амплификации
24	Gm08: 9905210-9905426
25-28	Последовательности праймера, используемые для секвенирования

Подробное описание настоящего изобретения

Соевое растение, содержащее событие SYHT0H2, включающее полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1-6, 9, 11 или 12, создали путем вставки мутантного гена HPPD, полученного из *Avena*, и гена фосфинотрицин ацетилтрансферазы из *S. Viridochromogenes*, как описано в примере 1.

В контексте данного документа аббревиатура "HPPD" означает гидроксифенил-пируват-диоксигеназу. HPPD полинуклеотиды кодируют полипептиды, обладающие ферментативной активностью фермента гидроксифенил-пируват-диоксигеназы.

Полинуклеотиды, наделяющие толерантностью к ингибитору HPPD, встраивают в определенное положение в геноме сои и тем самым получают соевое событие SYHT0H2. См. пример 3. Соевое растение, содержащее событие SYHT0H2, включает геномные/трансгенные соединения, имеющие, по меньшей мере, полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2. Идентификация геномного сайта встраивания события SYHT0H2 обеспечивает повышенную оплодотворяемость и дает возможность использования молекулярных маркеров для отслеживания трансгенной вставки в выведенных популяциях и их потомстве. См. пример 4. Различные способы и композиции для идентификации, обнаружения и использования соевого события SYHT0H2 приведены в данном документе. См., например, пример 2. В контексте данного документа описание "определенное SYHT0H2", используемое для описания нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности, относится к особенности дифференциально идентифицированного события SYHT0H2 в растениях, растительных материалах или в продуктах, таких как, но, не ограничиваясь ими, пищевые или кормовые продукты (сырые и переработанные), содержащие растительный материал или полученные из растительного материала.

В контексте данного документа термин "соя" означает *Glycine max* и включает в себя все сорта растений, которые могут быть выведены из сои. В контексте данного документа термин "растение" включает растительные клетки, органы растений, растительные протопласты, клеточные тканевые культуры растения, из которых растения могут быть восстановлены, каллус и пр., а также растительные клетки, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как зародыши, пыльца, семяпочки, семена, листья, цветы, ветви, плоды, стебли, корни, корневые кончики, пыльники и тому подобное. Зерно означает зрелые семена, полученные фермерами-коммерсантами для отличных от выращивания или воспроизведения видов целей. Трансгенное "событие" получают путем трансформации растительных клеток конструкцией(ями) гетерологичной ДНК, включая экспрессионную кассету нуклеиновой кислоты, которая содержит целевой трансген, регенерацию популяции растений, полученную в результате введения трансгена в геном растения, а также выбор определенного растения, характеризующееся вставкой в определенное место генома. Событие характеризуется фенотипически экспрессией трансгена(ов). На генетическом уровне событие является частью генетического строения растения. Термин "событие" относится к потомству, полученному путем генеративного ауткроссинга между трансформантом и другим сортом, который включает гетерологичную ДНК. Даже после повторного обратного скрещивания с

рекуррентным родителем вставленная ДНК и фланкирующая ДНК из трансформированного родителя присутствует в потомстве, полученном в результате скрещивания в том же хромосомном месторасположении. Термин "событие" относится к ДНК из первичного трансформанта, содержащего вставленную последовательность ДНК и фланкирующую последовательность ДНК, непосредственно примыкающие к встроенной ДНК, которая, как ожидается, будет передана потомству, которое получает встроенную ДНК, в том числе целевой трансген в результате генеративного скрещивания одной родительской клеточной линии, которая включает встроенную ДНК (например, первичный трансформант и потомство, полученное в результате самоопыления), и родительской клеточной линии, не содержащей вставленную ДНК.

Среднюю величину и распределение толерантности к гербициду или уровни устойчивости ряда основных трансформационных событий растения оценивают стандартным способом, основанным на повреждении растений, меристематических симптомах обесцвечивания и т.д. в диапазоне различных концентраций того или иного гербицида. Эти данные могут быть выражены в терминах, например, GR50 значений, полученных из кривых дозовой зависимости, имеющих "дозу", нанесенную на ось x , и "процент уничтожения", "гербицидное действие", "количество новых зеленых растений" и т.д., нанесенные на ось Y , где повышенные GR50 значения соответствуют повышенным уровням наследственной толерантности к ингибитору (например, повышенное K_i/K_{mHPP} значение) и/или уровню экспрессии экспрессируемого HPPD полипептида.

В контексте данного документа "ДНК-вставка" относится к гетерологичной ДНК в экспрессионных кассетах, используемой для трансформации растительного материала, в то время как "фланкирующая ДНК" может включать либо геномную ДНК, естественным образом присутствующую в организме, таком как растение, либо чужеродную (гетерологичную) ДНК, введенную способом трансформации, которая является чужеродной для исходной молекулы ДНК-вставки, например фрагменты, связанные с трансформационным событием. "Фланкирующая область" или "фланкирующая последовательность" в контексте данного документа относится к последовательности по меньшей мере с 20, 50, 100, 200, 300, 400, 1000, 1500, 2000, 2500 или 5000 или более парами оснований, которая расположена либо непосредственно перед исходной чужеродной молекулой ДНК-вставки и является смежной с ней, либо непосредственно ниже и является смежной с ней. Неограничивающие примеры фланкирующих областей события SYHT0H2 представлены в SEQ ID NO: 7 и 8, а также в их вариантах и фрагментах.

Методики трансформации, приводящие к случайной интеграции чужеродной ДНК, дадут в результате трансформанты, содержащие различные уникальные для каждого трансформанта характеристики фланкирующих областей. При введении рекомбинантной ДНК в растение путем традиционного скрещивания ее фланкирующие области в целом не будут изменены. Трансформанты будут содержать уникальные соединения между частью гетерологичной ДНК-вставки и геномной ДНК, или двумя частями геномной ДНК, или двумя частями гетерологичной ДНК. "Соединение" - это точка, где соединяются два специфических фрагмента ДНК. Например, соединение существует там, где ДНК-вставка соединяется с фланкирующей ДНК. Точка соединения существует в трансформированном организме, где два фрагмента ДНК объединяются способом, который является модификацией обнаруженного в природном организме фрагмента. В контексте данного документа "соединение ДНК" относится к ДНК, которая содержит точку соединения. Неограничивающие примеры соединения ДНК из набора событий SYHT0H2 представлены далее как SEQ ID NO: 1-6, а также их варианты и фрагменты.

Растение, содержащее событие SYHT0H2, может быть выведено с помощью первого генеративного скрещивания первого родительского соевого растения, выращенного из трансгенного соевого растения SYHT0H2, и второго родительского соевого растения, которому не хватает фенотипа толерантности к гербициду, получая вследствие этого некоторое количество первого потомства растений; а затем отбора первого потомства растения, которое проявляет требуемую толерантность к гербициду и самоопыления первого потомства растений, получая вследствие этого некоторое количество второго потомства растений, а затем отбора из второго потомства растения, которые проявляют требуемую толерантность к гербициду. Эти этапы могут дополнительно включать обратное скрещивание устойчивого к гербицидам потомства растения со вторым родительским соевым растением или третьим родительским соевым растением, тем самым получая соевое растение, которое проявляет требуемую толерантность к гербициду. Также признают, что анализ потомства на фенотип не требуется. Известно, что два различных трансгенных растения могут быть генеративно скрещенными с получением потомства, которое содержит два независимо сегрегирующих добавленных экзогенных гена. Путем самоопыления соответствующего потомства можно получить растения, которые являются гомозиготными для обоих добавленных экзогенных генов. Обратное скрещивание с родительским растением и ауткроссинг с нетрансгенным растением рассматриваются, как вегетативное размножение. Описание других способов селекции, которые обычно используются для различных признаков и культур, могут быть найдены в одной из нескольких ссылок, например Fehr, в *Breeding Methods for Cultivar Development* 1987, Wilcos, J. (ed.), Американское агрономическое общество, Мадисон, Висконсин.

Термин "идиоплазма" относится к индивидууму, группе индивидуумов или клону, представляющему генотип, сорт, вид или культуру, или к их генетическому материалу.

"Линия" или "штамм" является группой индивидуумов одинакового происхождения, которые

обычно являются инбредными до некоторой степени и которые обычно являются изогенными или близкими к изогенным.

Инбредные линии сои, как правило, разрабатывают для использования в производстве соевых гибридов и для использования в качестве идиоплазмы в выведенных популяциях для создания новых и отличающихся инбредных линий сои. Инбредные линии сои часто используют в качестве целей для интрогрессии новых признаков посредством традиционных методик скрещивания и/или молекулярных методик интрогрессии. Для использования в качестве родителей коммерческих гибридов инбредные линии сои должны быть высокооднородными, гомозиготными и воспроизводимыми. Для определения гомозиготности и фенотипической стабильности инбредных линий доступно множество аналитических способов.

Выражение "гибридные растения" относится к растениям, полученным в результате скрещивания генетически разнородных индивидуумов.

Термин "скрещенные" или "скрещивание" в контексте настоящего изобретения в случае растений означает слияние гамет, например, посредством опыления с получением потомства (т.е. клеток, семян или растений). Термин охватывает как генеративное скрещивание (опыление одного растения другим), так и в случае растений самоопыление (гомоклиное опыление, т.е. если пыльца и семязачаток из одного растения).

Термин "интрогрессия" относится к передаче требуемого аллеля генетического локуса от одного генетического окружения другому. В одном из способов требуемые аллели могут быть интрогрессированы посредством генеративного скрещивания двух родителей, где по меньшей мере один из родителей имеет нужную аллель в своем геноме.

Событие SYHT0H2 может содержать один или несколько дополнительных целевых признаков с любой комбинацией целевых полинуклеотидных последовательностей для создания растений с требуемой комбинацией признаков. Признак в контексте данного документа относится к фенотипу, полученному из конкретной последовательности или группы последовательностей. Например, толерантные к гербициду полинуклеотиды могут быть состыкованы с любыми другими полинуклеотидами, кодирующими полипептиды, обладающие пестицидной и/или инсектицидной активностью, как, например, токсичные белки *Bacillus thuringiensis* (описанные в патентах США №№ 5366892; 5747450; 5737514; 5723756 и 5593881; Geiser et al., *Gene*, 1986 48:109; Lee et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69:4648-4657 (Vip3A); Galitzky et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallog.*, 2001, 57:1101-1109 (Cry3Bb1) и Herman et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52:2726-2734 (Cry1F)), лектины (Van Damme et al., *Plant Mol. Biol.*, 1994, 24:825), пектины (описанные в патенте США № 5981722) и т.п. Полученные сочетания могут включать несколько копий любого из целевых полинуклеотидов. Данные комбинации можно также получить путем скрещивания наборов с существующими или новыми событиями, содержащими данные гены. Примеры событий, которые могут быть использованы в наборах для скрещивания, включают, но не ограничиваются ими, MON87701-устойчивость к чешуекрылым.

Событие SYHT0H2 можно состыковать с другими признаками толерантности к гербициду для создания трансгенного растения с дополнительно улучшенными свойствами. Например, полинуклеотиды, кодирующие мутантный полипептид HPPD или его вариант, который сохраняет HPPD ферментативную активность, можно состыковать с любыми другими полинуклеотидами, кодирующими полипептиды, которые придают требуемые признаки, в том числе, но не ограничиваясь ими, устойчивость к болезням, насекомым и гербицидам, устойчивость к теплу и засухе, сокращенное время вызревания сельскохозяйственной культуры, улучшенная промышленная обработка, как, например, осахаривание крахмала или биомассы до сбраживаемых сахаров, а также улучшенные агрономические качества, такие как высокое содержание масла и высокое содержание белка.

Примеры полинуклеотидов, которые можно состыковать с полинуклеотидами настоящего изобретения, кодирующими мутантный HPPD полипептид или его вариант, который сохраняет HPPD ферментативную активность, включают полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, сообщающие устойчивость к вредителям/патогенам, таким как вирусы, нематоды, насекомые или грибки и т.п. Примеры полинуклеотидов, которые можно состыковать с полинуклеотидами настоящего изобретения, включают полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, обладающие пестицидной и/или инсектицидной активностью, такие как токсичные белки *Bacillus thuringiensis* (описанные в патентах США №№ 5366892; 5747450; 5737514; 5723756 и 5593881 и Geiser et al., *Gene*, 1986, 48:109), лектины (Van Damme et al., *Plant Mol. Biol.*, 1994, 24:825), пентин (описанные в патенте США № 5981722) и т.п.; признаки, желательные для устойчивости к болезням или к гербицидам (например, гены нейтрализации фумонизина (патент США № 5792931); гены невирулентности и устойчивости к болезням (Jones et al., *Science*, 1994, 266:789; Martin et al., *Science*, 1993, 262:1432; Mindrinos et al., *Cell*, 1993, 78:1089); мутанты ацетолактатсинтазы (ALS), которые приводят к устойчивости к гербицидам, такие как S4 и/или Hra мутации ((устойчивость к гербицидам, включая сульфонилмочевины, имидазолиноны, триазолопиримидины, пиримидинил тиобензоаты); ген устойчивости к глифосату (например, ген 5-энол-пировил-шикимат-3-фосфат-синтазы (EPSPS), включая, но не ограничиваясь описанными в патентах США №№ 4940935, 5188642, 5633435, 6566587, 7674598, а также во всех связанных заявках, или ген глифосат N-ацетилтрансферазы (GAT), описанный в

Castle et al., Science, 2004, 304:1151-1154, а также в опубликованных патентных заявках США №№ 20070004912, 20050246798 и 20050060767)); устойчивость к глюфосинату (например, BAR, см., например, патент США № 5561236); устойчивость к 2,4-D (например, арилоксиалканоат диоксигеназа или AAD-1, AAD-12 или AAD-13), устойчивость к HPPD (например, Pseudomonas HPPD) и устойчивость к PPO (например, фомезафен, ацифлуорфен-натрий, оксифлуорфен, лактофен, флутиацетметил, сафлуфенацил, флумиоксазин, флумиклорак-пентил, карфентразон-этил, сульфентразон); цитохром P450 или его вариант, который придает устойчивость к гербицидам или устойчивость, в частности, к HPPD-ингибирующим гербицидам, PPO-ингибирующим гербицидам и ALS-ингибирующим гербицидам (опубликованная патентная заявка США № 20090011936; патенты США №№ 6380465; 6121512; 5349127; 6649814 и 6300544; а также международная публикация согласно PCT № WO 2007/000077); устойчивость к дикамбе (например, дикамба монооксигеназой) и признаки, желательные для обработки или переработки продуктов, таких как продукты с высоким содержанием масла (например, патент США № 6232529); модифицированные масла (например, гены десатуразы жирной кислоты (патент США № 5952544, международная публикация согласно PCT № WO 94/11516)), модифицированные крахмалы (например, ADPG-пиروفосфорилазы (AGPase), крахмал-синтазы (SS), ветвящий фермент крахмала (SBE) и девятвящие ферменты крахмала (SDBE)), а также полимеры или биопластик (например, патент США № 5602321; β -кетотиолаза, полигидроксibuтират синтазы и ацетоацетил-CoA-редуктаза (Schubert et al., J. Bacteriol, 1988, 170:5837-5847) облегчают экспрессию полиоксиалканоатов (PHAs)), раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки.

Другие толерантные к гербициду полинуклеотиды, которые могут быть использованы, включают полинуклеотиды, сообщающие толерантность к ингибиторам HPPD с помощью других генов или способов действия. Другие признаки, которые могут быть объединены с соевыми событиями SYHT0H2, включают признаки, полученные от полинуклеотидов, которые наделяют растение возможностью продуцировать более высокий уровень 5-энолпирувилшкимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS), например, как более детально описанные в патентах США №№ 6248876, 5627061, 5804425, 5633435, 5145783, 4971908, 5312910, 5188642, 4940835, 5866775, 6225114, 6130366, 5310667, 4535060, 4769061, 5633448, 5510471; RE 36449; RE 37287 и 5491288, в международной публикации согласно PCT № WO 97/04103, WO 00/66746, WO 01/66704 и WO 00/66747. Другие признаки, которые могут быть объединены с событием SYHT0H2, включают признаки, придающие устойчивость сульфонилмочевине, имидазолинон триазолпиримидинам и/или пиримидинил тиобензоатам, например, как более детально описанные в патентах США №№ 5605011, 5013659, 5141870, 5767361, 5731180, 5304732, 4761373, 5331107, 5928937 и 5378824, а также в международной публикации согласно PCT № WO 96/33270.

Событие SYHT0H2 можно состыковывать, например, с гидроксифенилпируватдиоксигеназами, которые являются ферментами, катализирующими реакцию, в которой парагидроксифенилпируват (HPP) преобразуется в гомогентизат. Молекулы, которые ингибируют этот фермент и которые связываются с ферментом для того, чтобы ингибировать трансформацию HPP в гомогентизат, используют в патентах США №№ 6245968; 6268549 и 6069115 и в международной публикации согласно PCT № WO 99/23886. Другие примеры подходящих признаков толерантности к гербициду, которые можно состыковать с событием SYHT0H2, включают полинуклеотиды арилоксиалканоат диоксигеназы (которые могут придавать толерантность к 2,4-Д и к другим феноксиауксин гербицидам, а также к арилоксифеноксипропионатным гербицидам, как описано, например, в международных публикациях PCT №№ WO 2005/107437, WO 2007/053482 и WO 2008/141154 и патенте США № 7820883, а также соответствующих заявках и патентах), а также полинуклеотиды, толерантные к гомогентизату соланесилтрансферазе (HST) (например, как описано в международной публикации согласно PCT № WO 10/029311, и дикамбе (монооксигеназе), как описано, например, в Herman et al., J. Biol. Chem., 2005, 280: 24759-24767 и в патенте США № 7812224, а также связанных с ними заявках и патентах.

Другие примеры признаков устойчивости к гербициду, которые могут быть объединены с событием SYHT0H2, включают признаки, сообщаемые полинуклеотидами, кодирующими экзогенную фосфинотрицинацетилтрансферазу, как описано в патентах США №№ 5969213; 5489520, 5550318, 5874265, 5919675, 5561236, 5648477, 5646024, 6177616 и 5879903. Растения, содержащие экзогенную фосфинотрицинацетилтрансферазу, могут демонстрировать повышенную толерантность к гербицидам с глюфосинатом, которые ингибируют фермент глутаминсинтетазу. Другие примеры признаков устойчивости к гербициду, которые могут быть объединены с событием SYHT0H2, включают признаки, придаваемые полинуклеотидами, сообщающими измененную активность протопорфириногенаоксидазы (протоке), как описано в патентах США №№ 6288306; 6282837 и 5767373 и в международной публикации согласно PCT № WO 01/12825. Растения, содержащие такие полинуклеотиды, могут обладать повышенной толерантностью к любому из ряда гербицидов, которые направлены на фермент протокса (именуемые "ингибиторами протокса").

Другие примеры признаков толерантности к гербициду, которые могут быть объединены с событием SYHT0H2, включают признаки, придающие толерантность по меньшей мере к одному гербициду в растении, таком как, например, соевое растение или мелколепестник канадский. Толерантные к гербици-

дам сорняки известны в данной области техники как растения, которые различаются в своей толерантности к определенным гербицидам. См., например, Green & Williams, "Correlation of Corn (*Zea mays*) Inbred Response to Nicosulfuron and Mesotrione", представленный на ежегодном собрании WSSA в Канзас-Сити, Миссури, 9-12 февраля 2004 г.; Green (1998) *Weed Technology* 12: 474-477; Green & Ulrich, *Weed Science* 2003, 41:508-516. Признак(и), ответственные за эти толерантности, могут быть объединены с помощью скрещивания или с помощью других способов с событием SYHT0H2.

Описанные выше гены могут быть генетически сконструированы в событии SYHT0H2 или объединены с событием SYHT0H2 с помощью набора для скрещивания с новым или существующим событием, придавая толерантность одному из вышеупомянутых генов. Возможные события для использования в наборе для скрещивания включают, но не ограничиваются ими, MON89788 - толерантность к глифосату (патент США № 7632985 и связанные заявки и патенты), MON87708 - толерантность к дикамбе (опубликованная патентная заявка США № 2011/0067134 и связанные заявки и патенты), DP-356043-5 - толерантность к глифосату и ALS (опубликованная патентная заявка США № 2010/0184079 и связанные заявки и патенты), A2704-12 - толерантность к глюфосинату (опубликованная патентная заявка США № 2008/0320616 и связанные заявки и патенты), толерантность к DP-305423-1 - толерантность к ALS (опубликованная патентная заявка США № 2008/0312082 и связанные заявки и патенты), толерантность к A5547-127-глюфосинату (опубликованная патентная заявка США № 2008/0196127 и связанные заявки и патенты), толерантность к DAS-40278-9 - 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте и арилоксифеноксипропионату (международная публикация согласно PCT № WO 2011/022469, WO 2011/022470, WO 2011/022471 и связанные заявки и патенты), толерантность к 127-ALS (международная публикация согласно PCT № WO 2010/080829 и связанные заявки и патенты), толерантность к GTS 40-3-2-глифосату, толерантность к DAS-68416-4 - 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте и глюфосинату, толерантность к PO72-глифосату и изоксафлутолу, толерантность к BPS-CV127-9 - ALS и толерантность к GU262-глюфосинату, толерантность к SYHT04R-HPPD.

Событие SYHT0H2 может быть объединено по меньшей мере с одним дополнительным признаком, таким как признаки, требуемые для кормления животных, такие как высокое содержание масла (например, патент США № 6232529); сбалансированное содержание аминокислот (например, гордотианинов (патенты США №№ 5990389; 5885801, 5885802 и 5703409, патент США № 5850016), высоколизиновый ячмень (Williamson и др., *Eur. J. Biochem.*, 1987, 165:99-106 и международная публикация согласно PCT № WO 98/20122) и белки с высоким содержанием метионина (Pedersen et al., *J. Biol. Chem.* 1986, 261:6279; Kirihara et al., *Gene*, 1988, 71:359; и Musumura et al., *Plant Mol. Biol.*, 1989, 12:123)), повышенная усвояемость (например, модифицированные запасные белки (патент США № 6858778), а также тиоредоксины (патент США № 7009087)), раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки. Требуемые комбинации признаков включают LLNC (низкое содержание линоленовой кислоты; см., например, Dyer et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 59:224-230) и OLCN (высокое содержание олеиновой кислоты; см., например, Fernandez-Moya et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53: 5326-5330).

Событие SYHT0H2 можно объединять с другими желательными признаками, такими как, например, гены дезактивации фумонизина (патент США № 5792931), гены устойчивости к невирулентности и болезни (Jones et al., *Science*, 1994, 266:789; Martin et al., *Science*, 1993, 262:1432; Mindrinos et al., *Cell*, 1994, 78:1089), а также признаками, желательными для обработки или переработки продуктов, таких как модифицированные масла (например, жирные кислоты десатуразы (патент США № 5952544; международная публикация согласно PCT № WO 94/11516)), модифицированные крахмалы (например, ADPG пирофосфорилаза (AGPase), синтазы крахмала (SS), ветвящийся фермент крахмала (SBE) и деветвящийся фермент крахмала (SDBE)), а также полимеры или биопластик (например, патент США № 5602321; β -кетотиолаза, полигидроксибутират синтазы и ацетоацетил-CoA-редуктазы (Schubert et al., *J. Bacteriol.*, 1988, 170:5837-5847) облегчают экспрессию полиоксиполканоатов (PHAs)), раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки. Можно также объединять толерантные к гербицидам полинуклеотиды с полинуклеотидами, придающими агрономические признаки, такие как мужская стерильность (см., например, патент США № 5583210), прочность стебля, время цветения или признаки технологии трансформации, такие как регуляция клеточного цикла или направленное воздействие на гены (например, международные публикации согласно PCT №№ WO 99/61619, WO 00/17364 и WO 99/25821), раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

Событие SYHT0H2 может быть объединено с Rcg1 последовательностью или биологически активным вариантом или его фрагментом. Rcg1 последовательность является геном устойчивости к антракнозной гнили стебля в кукурузе. См., например, опубликованные патентные заявки США №№ 20060225151, 20060223102 и 20060225152, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

Описанные выше состыкованные комбинации можно создавать любым способом, включая, но не ограничиваясь ими, разведение растений с помощью любой традиционной или TopCross методологии или генетической трансформации. В случае, если последовательности состыковываются посредством генетического трансформирования растений, целевые полинуклеотидные последовательности могут быть объединены в любое время и в любом порядке. Признаки могут быть введены одновременно в протокол котрансформации с целевыми полинуклеотидами, полученными посредством любого сочетания

кассет для трансформации. Например, в случае введения двух кассет, две последовательности можно содержать в отдельных трансформационных кассетах (транс) или содержать в одной трансформационной кассете (цис). Экспрессия последовательностей может приводиться в действие одним и тем же промотором или различными промоторами. В некоторых случаях может быть желательным введение трансформационной кассеты, которая будет подавлять экспрессию целевого полинуклеотида. Возможно объединение с любой комбинацией других супрессионных кассет или сверхэкспрессионных кассет для создания требуемой комбинации признаков в растении. Также признают, что полинуклеотидные последовательности можно состыковывать в нужной геномной локализации с использованием системы сайт-специфической рекомбинации. См., например, международные публикации согласно РСТ №№ WO 99/25821, WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855 и WO 99/25853, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В контексте данного документа применение термина "полинуклеотид" охватывает полинуклеотиды, содержащие рибонуклеотиды и/или дезоксирибонуклеотиды, включая как молекулы природного происхождения, так и синтетические аналоги. Полинуклеотиды охватывают все виды последовательностей, включая, но не ограничиваясь ими, одноцепочечные формы, двухцепочечные формы, шпильки, структуры "петля на стебле" и тому подобные.

SYNT0H2 растение содержит экспрессионную кассету, имеющую мутантный ген HPPD и 5' и 3' регуляторные последовательности, функционально связанные с мутантным геном HPPD. "Функционально связанный" означает функциональную связь между двумя или более элементами. Например, функциональная связь между целевым полинуклеотидом и регуляторной последовательностью (т.е. промотором) является функциональной связью, которая создает возможность для экспрессии целевого полинуклеотида. Функционально связанные элементы могут быть смежными или несмежными. Обычно, когда ссылаются на соединение двух белок-кодирующих областей, под функционально связанным предполагают, что кодирующие участки находятся в одной рамке считывания. Кассета может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный ген, который будет котрансформирован в организм. Кроме того, дополнительный ген(ы) может быть предусмотрен на нескольких экспрессионных кассетах. Такая экспрессионная кассета снабжена множеством сайтов рестрикции и/или сайтов рекомбинации для того, чтобы вставка полинуклеотида находилась под транскрипционным контролем регулирующих областей. Экспрессионная кассета может дополнительно содержать селективные маркерные гены.

Экспрессионная кассета будет включать в 5'-3' направлении транскрипции область инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), кодирующую область и функциональную область терминации транскрипции и трансляции в растениях. "Промотор" относится к нуклеотидной последовательности, способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. Обычно кодирующая последовательность расположена 3 к промоторной последовательности. Промоторная последовательность может включать в себя проксимальный и дистальный вышерасположенные элементы, последние элементы часто называют энхансерами. Соответственно, "энхансер" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая может стимулировать активность промотора и может быть природным элементом промотора или гетерологичным элементом, вставленным для повышения уровня или тканеспецифичности промотора. Промоторы могут быть получены полностью из природного гена или состоять из различных элементов, полученных из различных промоторов, существующих в природе, или даже содержать синтетические нуклеотидные сегменты. Специалистам в данной области техники ясно, что различные промоторы могут направлять экспрессию генов в различных тканях или типах клеток или на различных стадиях развития, или в ответ на различные условия окружающей среды. Промоторы, которые порождают фрагмент нуклеиновой кислоты, который будет экспрессироваться в большинстве типов клеток, в большинстве случаев традиционно именуется "конститутивными промоторами". Постоянно раскрывают новые промоторы различных типов, используемые в растительных клетках, многочисленные примеры могут быть найдены в компиляции Okamura & Goldberg, *Biochemistry of Plants*, 1989, 15:1-82. Кроме того, признано, что поскольку в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей полностью не определены, фрагменты нуклеиновых кислот различной длины могут обладать идентичной промоторной активностью.

Экспрессионные кассеты могут содержать 5' лидерные последовательности. Такие лидерные последовательности могут служить для усиления трансляции. Регулирующие области (например, промоторы, регулирующие области транскрипции, области процессинга РНК или области устойчивости, интроны, сигналы полиаденилирования и области терминации трансляции) и/или кодирующая область могут быть нативными/аналогичными или гетерологичными по отношению к клетке-хозяину или друг к другу.

"Трансляционная лидерная последовательность" относится к нуклеотидной последовательности, расположенной между промоторной последовательностью гена и кодирующей последовательностью. Трансляционная лидерная последовательность присутствует в полностью обработанной мРНК выше последовательности инициации трансляции. Трансляционная лидерная последовательность может влиять на многочисленные параметры, включая процессинг первичных транскриптов в мРНК, стабильность мРНК и/или эффективность трансляции. Примеры трансляционных лидерных последовательностей были описаны (Turner & Foster, *Mol. Biotechnol.*, 1995, 3:225-236). "3' некодирующие последовательности" от-

носятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным ниже кодирующей последовательности, и включают последовательности распознавания полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные воздействовать на процессинг мРНК или экспрессию генов. Сигнал полиаденилирования обычно характеризуется влиянием на добавление участков полиадениловой кислоты к 3'-концу предшественника мРНК. Использование различных некодирующих 3'-последовательностей иллюстрируется Ingelbrecht et al., Plant Cell, 1989, 1:671-680.

В контексте данного документа "гетерологичный" со ссылкой на последовательность означает последовательность, которая берет свое начало из чужеродного вида, или, если из того же вида, то в композиции и/или геномном локусе является существенно модифицированной по сравнению со своей природной формой в результате преднамеренного вмешательства человека. Например, промотор, функционально связанный с гетерологичным полинуклеотидом происходит от вида, отличного от вида, из которого полинуклеотид был получен, или, если из того же/аналогичного вида, то один из них или оба являются существенно модифицированными по сравнению с их первоначальной формой и/или геномным локусом, либо промотор не является природным промотором для функционально связанного полинуклеотида.

При получении экспрессионной кассеты можно манипулировать различными фрагментами ДНК так, чтобы обеспечить подходящие последовательности ДНК и при необходимости подходящую рамку считывания. С этой целью могут быть задействованы адаптеры или линкеры для присоединения фрагментов ДНК или другие манипуляции могут быть вовлечены для получения удобных сайтов рестрикции, удаления избыточной ДНК, удаления сайтов рестрикции или тому подобного. С этой целью *in vitro* мутагенез, репарация праймера, рестрикция, отжиг, подстановки, например переходы и транс-версии, могут быть вовлечены. Экспрессионная кассета может содержать селективный маркерный ген для отбора трансформированных клеток.

Селективные маркерные гены используются для отбора трансформированных клеток или тканей.

Предлагаются изолированные полинуклеотиды, которые могут быть использованы в различных способах обнаружения и/или определения события SYHT0H2. "Изолированный" или "очищенный" полинуклеотид или его биологически активная часть является в значительной степени или практически свободной от компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с полинуклеотидом в его природной среде. Таким образом, изолированный или очищенный полинуклеотид практически свободен от другого клеточного материала или среды для культивирования при продуцировании рекомбинантными способами или практически свободен от химических предшественников или других химических веществ, в случае, если он химически синтезирован. Оптимально "изолированный" полинуклеотид является свободным от последовательностей (оптимально кодирующих белок последовательностей), которые естественным образом фланкируют полинуклеотид (например, последовательностей, расположенных на 5'- и 3'-концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которой полинуклеотид происходит. Например, в различных аспектах изобретения выделенный полинуклеотид может содержать менее чем приблизительно 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, или 0.1 kb нуклеотидной последовательности, которая естественным образом фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой происходит этот полинуклеотид. Во избежание неясности "изолированная" последовательность все еще может быть в окружении другой ДНК либо *in vitro*, либо *in vivo* и может, например, встречаться в трансгенной клетке или организме.

В определенных аспектах настоящего изобретения полинуклеотиды содержат соединение ДНК последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-6. Фрагменты и варианты соединения ДНК последовательностей являются подходящими для дифференциальной идентификации события SYHT0H2. Как обсуждалось в других местах данного документа, такие последовательности находят применение в качестве праймеров и/или зондов.

В других аспектах настоящего изобретения предлагаются полинуклеотиды, которые могут обнаружить событие SYHT0H2 или специфический участок SYHT0H2. Такие последовательности включают любой полинуклеотид, представленный в SEQ ID NO: 1-20, а также его варианты и фрагменты. В определенных аспектах настоящего изобретения полинуклеотид, используемый для обнаружения события SYHT0H2, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 или фрагмент SEQ ID NO: 10, имеющий по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 нуклеотидов. Фрагменты и варианты полинуклеотидов, которые обнаруживают событие SYHT0H2 или специфический участок SYHT0H2 подходят для дифференциально идентифицированного события SYHT0H2. Как обсуждалось в других местах данного документа, такие последовательности находят применение в качестве праймеров и/или зондов. Кроме того, дополнительно предлагаются праймеры с изолированной нуклеотидной ДНК последовательностью, содержащие последовательность или состоящие из (а) последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21, и (б) варианты и фрагменты SEQ ID NO: 10 или ее комплемент.

"Варианты" означает по сути аналогичные последовательности. В случае полинуклеотидов вариант содержит полинуклеотид, имеющий делеции (т.е. усечения) на 5'- и/или 3'-конце; делецию и/или добавление одного или нескольких нуклеотидов к одному или нескольким внутренним сайтам в природном полинуклеотиде; и/или замену одного или нескольких нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в

природном полинуклеотиде.

В контексте данного документа "зонд" представляет собой изолированный полинуклеотид, к которому прикреплена обычная детектируемая метка или репортерная группа, например радиоактивный изотоп, лиганда, хемилюминесцентный агент, фермент и т.д. Такой зонд является комплементарным к нити целевого полинуклеотида, в данном случае к нити изолированной ДНК из соевого события SYHT0H2 либо из соевого растения или из образца, который включает ДНК из события. Зонды включают не только дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые кислоты, но также полиамиды и другие материалы зонда, которые могут специфично обнаруживать присутствие целевой ДНК последовательности.

В контексте данного документа "праймерами" являются изолированные полинуклеотиды, которые соединяются с комплементарной нитью ДНК-мишени посредством гибридизации нуклеиновых кислот с образованием гибрида между праймером и нитью ДНК-мишени, затем распространяются вдоль нити ДНК-мишени с помощью полимеразы, например ДНК-полимеразы. Пары праймеров относятся к их применению для амплификации целевого полинуклеотида, например, с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) или других обычных способов амплификации нуклеиновых кислот. "PCR" или "полимеразная цепная реакция" представляет собой способ, используемый для амплификации специфических участков ДНК (см. патенты США №№ 4683195 и 4800159, включенные в данный документ посредством ссылки). Любая комбинация праймеров, раскрытых в данном документе, может быть использована, вследствие чего пара позволяет обнаружить событие SYHT0H2 (например, праймеры, содержащие SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21, а также их варианты или фрагменты SEQ ID NO: 10 или ее комплемент). Неограничивающие примеры пар праймеров, используемых в раскрытых способах, включают в себя: (a) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, которая может быть использована для амплификации последовательности, охватывающей LB1 (левый край 1) соединения геномной ДНК сои и вставленную гетерологичную последовательность, содержащую Avena HPPD последовательность, (b) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, который может быть использован для амплификации последовательности, охватывающей LB2 (левый край 2) соединения геномной ДНК сои и вставленной гетерологичной последовательности, содержащей Avena HPPD последовательность, (c) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, которая может быть использована для амплификации последовательности, охватывающей LB1 соединения геномной ДНК сои и вставленной гетерологичной последовательности, содержащей Avena HPPD последовательность, и (d) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, которая может быть использована для амплификации LB1 соединения геномной ДНК сои и вставленной гетерологичной последовательности, содержащей Avena HPPD последовательности, "LB1", применяемое для описания вставки соединения или фланкирующей последовательности, относится к 3'-концу вставки и соседней фланкирующей последовательности. "LB2", применяемое для описания вставки соединения или фланкирующей последовательности, относится к 5'-концу вставки и прилегающей фланкирующей последовательности.

Зонды и праймеры имеют достаточную для связывания с целевой ДНК последовательностью длину нуклеотидной цепи и главным образом обнаруживают и/или идентифицируют полинуклеотид, имеющий событие SYHT0H2. Следует признать, что условия гибридизации или условия реакции для достижения данного результата могут быть определены оператором. Данная длина может быть любой длиной, достаточной для использования в предпочтительном способе обнаружения. Как правило, используется 8, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 нуклеотидов или более или примерно 11-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800 или более нуклеотидов в длину. Такие зонды и праймеры могут гибридизоваться главным образом с целевой последовательностью при условиях гибридизации высокой жесткости. Зонды и праймеры по настоящему изобретению могут иметь полное соответствие ДНК-последовательности смежных нуклеотидов с целевой последовательностью, хотя зонды отличаются от ДНК-мишени, а те, что сохраняют способность специфически обнаруживать и/или идентифицировать целевую ДНК-последовательность могут быть сконструированы традиционными способами. Соответственно, зонды и праймеры могут иметь около 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности в последовательности или комплементарности к целевому полинуклеотиду (например, SEQ ID NO: 1-12) либо могут отличаться от целевой последовательности (например, SEQ ID NO: 1-12) на 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более нуклеотидов. Зонды могут быть использованы в качестве праймеров, но, как правило, предназначены для связывания с ДНК-или РНК-мишенью и не используются в процессе амплификации.

Специфические праймеры могут быть использованы для амплификации фрагмента интеграции с получением ампликона, который можно использовать в качестве "специфического зонда", или могут самообнаруживаться для идентификации события SYHT0H2 в биологических пробах. В качестве альтернативы зонд может быть использован в ходе реакции PCR с целью создания возможности для обнаружения

амплификационного события (т.е. TAQMAN® зонд или MGB™ зонд) (так называемая PCR в режиме реального времени). Когда зонд гибридизуют с полинуклеотидами биологического образца при условиях, которые создают возможность для связывания зонда с образцом, это связывание может быть обнаружено, и таким образом обеспечивают указание на наличие события SYHT0H2 в биологическом образце. Такая идентификация связанного зонда была описана в данной области. В одном аспекте настоящего изобретения специфический зонд представляет собой последовательность, которая при оптимальных условиях специфично гибридизируется с участком в 5'- или 3'-фланкирующей области события и содержит часть чужеродной ДНК смежной с ним. Специфический зонд может содержать последовательность по меньшей мере с 80, от 80 до 85, от 85 до 90, от 90 до 95 и от 95 до 100% идентичностью (или комплементарностью) со специфическим участком события SYHT0H2.

В контексте данного документа "амплифицированная ДНК" или "ампликон" относится к продукту амплификации целевого полинуклеотида, который является частью матрицы нуклеиновой кислоты. Например, чтобы определить, содержит ли соевое растение, полученное в результате генеративного скрещивания, событие SYHT0H2, ДНК, выделенная из образца ткани соевого растения, может быть подвергнута способу амплификации полинуклеотида с использованием пары ДНК-праймеров, которая включает первый праймер, полученный из фланкирующей последовательности, смежной с сайтом встраивания вставленной гетерологичной ДНК, и второго праймера, полученного из вставленной гетерологичной ДНК для получения ампликона, который является диагностическим в отношении присутствия события SYHT0H2 ДНК. Под "диагностическим" в отношении события SYHT0H2 подразумевают использование любого способа или анализа, который распознает наличие или отсутствие события SYHT0H2 в биологическом образце. В качестве альтернативы второй праймер может быть получен из фланкирующей последовательности. В других аспектах изобретения пары праймеров могут быть получены из фланкирующей последовательности по обе стороны вставленной ДНК для получения ампликона, который включает в себя полинуклеотидную вставку экспрессирующей конструкции целиком, а также последовательность, фланкирующую трансгенную вставку. Ампликон имеет длину и имеет последовательность, которая является диагностической для события (т.е. содержит соединение ДНК из события SYHT0H2). Ампликон может варьировать по длине от суммарной длины пары праймеров плюс одной пары оснований нуклеотида до любой длины ампликона, предъясняемой протоколом амплификации ДНК. Член пары праймера, полученный из фланкирующей последовательности, может быть расположен на расстоянии от вставленной ДНК-последовательности, данное расстояние может варьировать от одной пары оснований нуклеотида до предельного значения реакции амплификации, или до около двадцати тысяч нуклеотидных пар оснований. Применение термина "ампликон", как правило, исключает димеры праймера, которые могут быть сформированы в реакции термической амплификации ДНК.

Способы получения и использования зондов и праймеров, описаны, например, в Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed, vol. 1-3, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, 1992, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, NY; и в Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, San Diego, CA. Пары PCR-праймера могут быть получены из известной последовательности, например, с помощью компьютерной программы, предназначенной для этой цели, такой как способ анализа праймера для PCR в Vector NTI версия 6 (Informax Inc., Бетесда, Мэриленд); PrimerSelect (DNASTAR Inc., Мадисон, Висконсин.) и в Primer (версия 0.5.COPYRGT., 1991, институт медико-биологических исследований Уайтхед, Кембридж, Массачусетс). Кроме того, последовательность можно визуально сканировать и определять праймеры вручную с использованием инструкций, известных специалисту в данной области техники.

Следует понимать, что в контексте данного документа термин "трансгенный" включает любую клетку, клеточную линию, каллус, ткань, часть растения или растение, генотип которых был изменен благодаря наличию гетерологичной нуклеиновой кислоты, в том числе изначально трансгенные и таким образом измененные, а также те, которые созданы путем генеративного скрещивания или бесполого размножения из изначально трансгенных. Термин "трансгенный" в контексте данного документа не охватывает изменение генома (хромосомного или внехромосомного) с помощью обычных способов селекции растений или с помощью событий природного происхождения, таких как случайное перекрестное опыление, нерекомбинантная вирусная инфекция, нерекомбинантная бактериальная трансформация, нерекомбинантная транспозиция или спонтанная мутация.

"Трансформация" относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном организма-хозяина, приводящему в результате к генетически стабильной наследственности. Организмы-хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновой кислоты, называют "трансгенными" организмами. Примеры способов трансформации растений включают трансформацию, опосредованную агробактериями (De Blaere et al., *Meth. Enzymol.*, 1987, 143:277), а также технологии ускоренной частицами трансформации или "генной пушки" (Klein et al., *Nature*, 1987, 327:70-73; патент США № 4945050, включенный в данный документ посредством ссылки). Дополнительные способы преобразования представлены ниже.

Таким образом, изолированные полинуклеотиды могут быть включены в рекомбинантные конст-

рукции, обычно ДНК-конструкции, которые способны к интродукции и репликации в клетке-хозяине. Такая конструкция может быть вектором, который включает в себя систему репликации и последовательности, которые способны к транскрипции и трансляции последовательности, кодирующей полипептид в данной клетке-хозяине. Количество векторов, подходящих для стабильной трансфекции клеток растений или создания трансгенных растений, было описано в, например, Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985; Supp. 1987; Weissbach & Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, 1989, Academic Press, New York, NY; и Flevin et al., *Plant Molecular Biology Manual*, 1990, Kluwer Academic Publishers. Обычно растительные экспрессионные векторы включают, например, один или несколько клонированных растительных генов под транскрипционным контролем 5'- и 3'-регуляторных последовательностей и доминантный селективный маркер. Такие растительные экспрессионные векторы могут содержать промоторный регулирующий участок (например, регулирующий участок, контролирующей индуцируемую или конститутивную, экологически регулируемую или регулируемую развитием либо клеточно- или ткане-специфическую экспрессию), начальный участок инициации транскрипции, сайт связывания рибосомы, сигнал обработки РНК, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

Известны различные способы и композиции для идентификации события SYHT0H2. Такие способы находят применение в идентификации и/или обнаружении события SYHT0H2 в любом биологическом материале. Такие способы включают, например, способы подтверждения чистоты семян и способы скрининга семян в партии семян для события SYHT0H2. Биологический образец может включать любой образец, в котором требуется определить наличие ДНК, имеющей событие SYHT0H2. Например, биологический образец может содержать любой растительный материал или материал, содержащийся в растительном материале или полученный из растительного материала, такого как, но не ограничиваясь ими, пищевые или кормовые продукты. В контексте данного документа "растительный материал" означает материал, который добыт или получен из растения или части растения. В конкретных аспектах изобретения биологический образец содержит соевую ткань.

Праймеры и зонды, основанные на фланкирующей ДНК и вставленных последовательностях, раскрытых в данном документе, могут быть использованы для подтверждения (и, если необходимо, для корректировки) раскрытых последовательностей с помощью обычных способов, например, с помощью повторного клонирования и секвенирования таких последовательностей. Полинуклеотидные зонды и праймеры специфично определяют ДНК-мишень. Для идентификации наличия ДНК из трансгенного события в образце может быть использован любой обычный способ гибридизации или амплификации нуклеиновых кислот. Под "специфично определять" подразумевают, что полинуклеотид может быть использован либо в качестве праймера для амплификации специфического участка SYHT0H2, либо в качестве зонда, который гибридизуется в жестких условиях с полинуклеотидом, имеющим событие SYHT0H2 или специфический участок SYHT0H2. Уровень или степень гибридизации, которая создает возможность для конкретного обнаружения события SYHT0H2 или специфического участка события SYHT0H2, является достаточной для того, чтобы отличить полинуклеотид со специфическим участком SYHT0H2 от полинуклеотида, лишённого данного участка и тем самым создают возможность избирательной идентификации события SYHT0H2. Под "иметь идентичность или комплементарность последовательности, достаточную для обеспечения амплификации специфического события SYHT0H2" подразумевают, что последовательность имеет по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности или комплементарности к фрагменту полинуклеотида или ко всей длине полинуклеотида, имеющего специфический участок SYHT0H2.

Относительно амплификации целевого полинуклеотида (например, посредством PCR) с использованием конкретной пары праймеров амплификации "жесткие условия" представляют собой условия, которые позволяют паре праймеров гибридизоваться с целевым полинуклеотидом, к которому праймер, имеющий соответствующую последовательность дикого типа (или ее комплемент), будет создавать идентифицируемый продукт амплификации (ампликон), имеющий специфический участок SYHT0H2 в реакции термической амплификации ДНК. В случае PCR подхода олигонуклеотидные праймеры могут предназначаться для использования в реакциях PCR для амплификации специфического участка SYHT0H2. Способы конструирования праймера для PCR и PCR-клонирования, как правило, известны в данной области и описаны в Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York; Innis et al. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, New York; Innis & Gelfand (eds.), *PCR Strategies*, 1995, Academic Press, New York; и Innis & Gelfand (eds.), *PCR Methods Manual*, 1999, Academic Press, New York. Способы амплификации также описаны в патентах США №№ 4683195 и 4683202 и в Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91:5695-5699. Данные способы амплификации ДНК, а также другие способы амплификации ДНК, известные в данной области, могут быть использованы в практической реализации других аспектов изобретения. Понятно, что ряд параметров в специфическом протоколе PCR может требовать адаптации к конкретным условиям лаборатории и может быть незначительно модифицирован, при этом все же обеспечить получение аналогичных результатов. Данные корректировки будут очевидны для специалистов в данной области.

Амплифицированный полинуклеотид (ампликон) может быть любой длины, которая создает воз-

возможности для обнаружения события SYHT0H2 или специфического участка SYHT0H2. Например, ампликон может быть приблизительно 10, 50, 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 нуклеотидов в длину или длиннее.

В конкретных аспектах настоящего изобретения первый праймер содержит фрагмент полинуклеотида SEQ ID NO: 10, где первый или второй праймер имеет идентичность или комплементарность последовательности к полинуклеотиду достаточную для амплификации специфического участка SYHT0H2. Пара праймеров может содержать фрагмент SEQ ID NO: 11 и фрагмент SEQ ID NO: 12. В других аспектах изобретения первый и второй праймер могут содержать (а) любую из последовательностей или любую комбинацию последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21, или (б) последовательность фрагмента SEQ ID NO: 10 или ее комплемент. Праймеры могут иметь любую длину, достаточную для амплификации участка SYHT0H2, включая, например, по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 или 30 или приблизительно 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 нуклеотидов или длиннее. В некоторых аспектах настоящего изобретения первый и второй праймеры являются SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно; SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно; SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно; SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19 соответственно; SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20 соответственно или SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 21 соответственно. Например, используемые пары праймеров включают: (а) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, которые могут быть использованы для амплификации последовательности, охватывающей LB1 (левая граница 1) соединение геномной ДНК сои и вставленную гетерологичную последовательность, содержащую последовательность *Avena HPPD*, (б) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, которые могут быть использованы для амплификации последовательности, охватывающей LB2 (левый край 2) соединение геномной ДНК сои и вставленную гетерологичную последовательность, содержащую последовательность *Avena HPPD*, (с) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, которые могут быть использованы для амплификации последовательности, охватывающей LB1 соединение геномной ДНК сои и вставленную гетерологичную последовательность, содержащую последовательность *Avena HPPD*, а также (д) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, которые могут быть использованы для амплификации LB1 соединения геномной ДНК сои и вставленную гетерологичную последовательность, содержащую последовательность *Avena HPPD*.

Как обсуждалось в другом месте данного документа, может быть использован любой способ PCR-амплификации события SYHT0H2 или специфического участка, включая, например, PCR в режиме реального времени. См., например, Livak et al., PCR Methods and Applications, 1995, 4:357-362; патенты США №№ 5538848 и 5723591; пользовательский бюллетень прикладных биосистем (Applied Biosystems User Bulletin) № 2, "Relative Quantitation of Gene Expression", P/N 4303859; а также пользовательский бюллетень прикладных биосистем (Applied Biosystems User Bulletin) № 5, "Multiplex PCR with TAQMAN® VIC probes", P/N 4306236, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

В методике гибридизации используется целый полинуклеотид или часть полинуклеотида, которые селективно гибридизуются с целевым полинуклеотидом, имеющим специфическое событие SYHT0H2. Под "жесткими условиями" или "жесткими условиями гибридизации", когда речь идет об условиях полинуклеотидного зонда, подразумевают такие условия, при которых зонд гибридизуется со своей целевой последовательностью в заметно большей степени, чем другие последовательности (например, по меньшей мере в 2 раза больше окружения). Относительно амплификации целевого полинуклеотида (например, посредством PCR) с использованием определенной пары амплификационных праймеров, "жесткие условия" являются условиями, которые позволяют паре праймеров гибридизоваться с целевым полинуклеотидом, с которым праймер имеет аналогичный дикий тип. Строгие условия зависят от последовательности и будут различными в разных случаях. Путем регулирования жесткости гибридизации и/или условий отмывки могут быть идентифицированы (гомологичное зондирование) целевые последовательности, которые на 100% комплементарны зонду. Кроме того, жесткость условий можно регулировать для обеспечения некоторого несовпадения в последовательностях с тем, чтобы обнаружить более низкие степени идентичности (гетерологичное зондирование). Обычно зонд составляет меньше чем приблизительно 1000 нуклеотидов в длину или меньше чем 500 нуклеотидов в длину.

В контексте данного документа в значительной степени идентичная или комплементарная последовательность представляет собой полинуклеотид, который будет специфически гибридизоваться с комплементом молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она сравнивается в условиях высокой жесткости. Подходящие жесткие условия, которые способствуют ДНК-гибридизации, например 6X хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующей отмывкой в 2XSSC при 50°C, известны специалистам в данной области техники или могут быть найдены в Ausebel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology. 1989, John Wiley & Sons, NY, 6.3.1-6.3.6. Как правило, жесткими условия-

ми гибридизации и обнаружения будут те, в которых концентрация солей составляет менее чем приблизительно $1,5M Na^+$ ион, обычно приблизительно от $0,01$ до $1,0M Na^+$ концентрация ионов (или других солей) при pH от $7,0$ до $8,3$, а температура составляет по меньшей мере приблизительно $30^{\circ}C$ для коротких зондов (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно $60^{\circ}C$ для длинных зондов (например, более чем 50 нуклеотидов). Жесткие условия могут быть достигнуты при добавлении дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Типичные условия низкой жесткости включают гибридизацию с буферным раствором в $30-35\%$ формамиде, $1M NaCl$, 1% SDS (додецилсульфат натрия) при $37^{\circ}C$ и отмывку в IX-2X SSC ($20X SSC = 3,0M NaCl/0,3M$ тринатрийцитрат) при $50-55^{\circ}C$. Типичные условия средней жесткости включают гибридизацию в $40-45\%$ формамиде, $1,0M NaCl$, 1% SDS при $37^{\circ}C$ и отмывку в $0,5 X-IX SSC$ при $55-60^{\circ}C$. Типичные условия высокой жесткости включают гибридизацию в 50% формамиде, $1M NaCl$, 1% SDS при $37^{\circ}C$ и отмывку в $0,1 X SSC$ при $60-65^{\circ}C$. Дополнительно отмывочные буферы могут содержать от приблизительно $0,1$ до приблизительно 1% SDS. Продолжительность гибридизации обычно составляет менее приблизительно 24 ч, обычно от приблизительно 4 до приблизительно 12 ч.

Продолжительность отмывки будет равна, по меньшей мере, периоду времени, достаточному для достижения равновесия.

В реакциях гибридизации специфичность является, как правило, функцией последовательности гибридизационных отмывок, причем критическими факторами являются ионная сила и температура конечного отмывочного раствора. Для ДНК-ДНК гибридов, T_m может быть приближена из уравнения Meinkoth & Wahl, Anal. Biochem., 1984, 138:267-284: $T_m = 81,5^{\circ}C + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% GC) - 0,61 (\% \text{ форм.}) - 500/L$, где M представляет собой молярность одновалентных катионов, $\% GC$ представляет собой процент нуклеотидов гуанозина и цитозина в ДНК, $\% \text{ форм.}$ представляет собой процент формамида в растворе для гибридизации и L представляет собой длину гибрида в парах оснований. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной целевой последовательности гибридизируется с идеально подходящим зондом. T_m уменьшается приблизительно на $1^{\circ}C$ на каждый 1% несоответствия, таким образом, T_m , гибридизацию и/или условия отмывки можно регулировать для гибридизации до последовательностей нужной идентичности. Например, если добавляются последовательности с $>90\%$ идентичностью, T_m может быть уменьшена на $10^{\circ}C$. Обычно выбирают жесткие условия, которые примерно на $5^{\circ}C$ ниже, чем температура точки плавления (T_m) для конкретной последовательности и ее комплемента при определенной ионной силе и pH. Тем не менее, в очень жестких условиях возможно использование гибридизации и/или отмывки при температуре на $1, 2, 3$ или $4^{\circ}C$ ниже, чем температура точки плавления (T_m), в умеренно жестких условиях возможно использование гибридизации и/или отмывки при температуре на $6, 7, 8, 9$ или $10^{\circ}C$ ниже, чем температура точки плавления (T_m); в условиях низкой жесткости возможно использование гибридизации и/или отмывки при температуре на $11, 12, 13, 14, 15$ или $20^{\circ}C$ ниже, чем температура точки плавления (T_m). Используя уравнение, композиции для гибридизации и отмывки и нужную T_m , специалисты поймут, что вариации жесткости растворов для гибридизации и/или для отмывки, по сути, описаны выше. Если требуемая степень несоответствия дает в результате T_m менее чем $45^{\circ}C$ (водный раствор) или $32^{\circ}C$ (раствор формамида), оптимальным является увеличение концентрации SSC с тем, чтобы более высокая температура могла быть применена. Подробное руководство к гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 1993, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY; Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Chapter 2, Greene Publishing и Wiley-Interscience, NY; Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY), а также Haymes et al., In: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, 1985, IRL Press, Washington, DC.

Говорят, что полинуклеотид является "комплементом" другого полинуклеотида, если они проявляют взаимодополняемость. В контексте данного документа говорят, что молекулы обладают "полной комплементарностью" в случае, когда каждый нуклеотид одной из полинуклеотидных молекул является комплементарным к нуклеотиду другой. Говорят, что две молекулы являются "минимально комплементарными", если они могут гибридизироваться друг с другом со стабильностью, достаточной для того, чтобы позволить им оставаться соединенными друг с другом при стандартных условиях "низкой жесткости". Аналогично говорят, что молекулы являются "комплементарными", если они могут гибридизироваться друг с другом со стабильностью, достаточной для того, чтобы позволить им оставаться соединенными друг с другом при стандартных условиях "низкой жесткости".

Для обнаружения специфического участка SYHTOH2 или его ампликона могут быть использованы различные способы, включая, но не ограничиваясь ими, генетический анализ бита (Nikiforov et al., Nucleic Acid Res., 1994, 22: 4167-4175).

Другим способом обнаружения является методика пиросеквенирования, описанная в Winge, Innov. Pharma. Tech., 2000, 00:18-24. В этом способе используют олигонуклеотид, предназначенный перекрывать смежную ДНК и вставленное ДНК соединение или пару олигонуклеотидов, которые могут амплифицировать специфический участок SYHTOH2. Олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечным продуктом PCR целевого участка (один праймер во вставленной последовательности и один во фланкирую-

шей последовательности) и инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы, АТФ, сульфурилазы, люциферазы, апиразы, аденозина 5' фосфосульфата и люциферина. Отдельно добавляют dNTPs и инкорпорация дает в результате световой сигнал, который измеряют. Световой сигнал указывает на присутствие трансгена вставленной/фланкирующей последовательности, возникшей в результате успешной амплификации, гибридизации и удлинения цепи на одно или несколько оснований.

Поляризация флуоресценции, описанная Chen и др., *Genome Res*, 1999, 9: 492-498 представляет собой способ, который может быть использован для обнаружения ампликона настоящего изобретения. В случае этого способа используют олигонуклеотид, предназначенный перекрывать фланкирующее и вставленное ДНК-соединение или пару олигонуклеотидов, которые могут амплифицировать специфический участок SYHT0H2. Олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечным продуктом PCR из целевой области (один праймер во вставленной ДНК и один во фланкирующей ДНК последовательности) и инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы и флуоресцентно-меченого ddNTP. Удлинение цепи на одно основание приводит к инкорпорации ddNTP. Инкорпорация может быть измерена с использованием флуориметра как изменение поляризации. Изменение поляризации указывает на присутствие трансгена вставленной/фланкирующей последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и удлинения цепи на одно основание.

TAQMAN® (PE прикладные биосистемы, Фостер Сити, Калифорния) описан как способ обнаружения и количественного определения присутствия последовательности ДНК и полностью ясен из инструкции изготовителя. Коротко, создают FRET олигонуклеотидный зонд, который перекрывает фланкирующее и вставленное соединение ДНК или задействуют пару олигонуклеотидов, которые могут амплифицировать специфический участок SYHT0H2. FRET зонд и праймеры для PCR (один праймер во вставленной ДНК последовательности и один во фланкирующей геномной последовательности) циркулируют в присутствии термостабильной полимеразы и dNTPs. Гибридизация FRET зондов приводит к расщеплению и высвобождению флуоресцентной части из гасящей части на FRET зонде. Флуоресцентный сигнал указывает на наличие фланкирующей/трансгенной вставленной последовательности, возникшей в результате успешной амплификации и гибридизации.

Молекулярные маяки были описаны для использования в определении последовательности, как описано в Tuang et al., *Nature Biotech.*, 1996, 14: 303-308. Коротко, создают FRET олигонуклеотидный зонд, который перекрывает фланкирующее и вставленное ДНК соединение, или задействуют пару олигонуклеотидов, которые могут амплифицировать специфический участок SYHT0H2. Уникальная структура FRET зонда приводит в результате к тому, что он содержит вторичную структуру, которая удерживает флуоресцентную и гасящую части в непосредственной близости. FRET зонд и праймеры для PCR (один праймер в вставленной ДНК последовательности и один во фланкирующей последовательности) циркулируют в присутствии термостабильной полимеразы и dNTPs. Последующая успешная амплификация PCR, гибридизация зонда FRET с целевой последовательностью приводит к удалению вторичной структуры зонда и пространственному разделению флуоресцентной и гасящей части. В результате имеет место флуоресцентный сигнал. Флуоресцентный сигнал указывает на наличие фланкирующей/трансгенной вставленной последовательности, возникшей в результате успешной амплификации и гибридизации.

Реакция гибридизации с использованием зонда, специфичного для последовательности, обнаруженной внутри ампликона, представляет собой еще один способ, применяемый для обнаружения ампликона, полученного в результате реакции PCR.

В контексте данного документа "набор" относится к набору реактивов для идентификации и/или определения события SYHT0H2 в биологических пробах. Набор может быть использован, а его компоненты могут быть специально адаптированы для целей контроля качества (например, чистоты партии семян), определения события SYHT0H2 в растительном материале или материале, содержащем растительный материал или полученном из растительного материала, таком как, но, не ограничиваясь ими, пищевые или кормовые продукты.

В определенных аспектах настоящего изобретения предлагается набор для идентификации события SYHT0H2 в биологическом образце. Набор включает в себя первый и второй праймер, где первый и второй праймеры амплифицируют полинуклеотид, содержащий специфический участок SYHT0H2. В других аспектах изобретения набор включает полинуклеотид для обнаружения специфического участка SYHT0H2. Набор может содержать, например, первый праймер, содержащий фрагмент полинуклеотида SEQ ID NO: 10 или его комплемент, причем первый или второй праймер имеют достаточную гомологию или комплементарность последовательности к полинуклеотиду для амплификации специфического участка SYHT0H2. Например, пара праймеров может содержать фрагмент SEQ ID NO: 11 и фрагмент SEQ ID NO: 12 или их комплемент. В других аспектах настоящего изобретения первый и второй праймеры может включать любую из последовательностей или любую комбинацию последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21. Праймеры могут иметь любую достаточную для амплификации участка SYHT0H2 длину, включая, например, по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 или 30 или приблизительно 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 нуклеотидов или длиннее. В некоторых аспектах настоящего изобретения первый и второй праймеры представляют собой SEQ ID NO:

11 и SEQ ID NO: 12 соответственно, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19 соответственно, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20 соответственно или SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 21 соответственно. Например, указанные выше пары праймеров могут быть использованы для амплификации (а) последовательности, охватывающей LB1 соединение геномной ДНК сои и гетерологичную вставку, содержащую последовательность *Avena* HPPD (SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 17 и 18; SEQ ID NO: 17 и 19), или (б) последовательности, охватывающей LB2 соединение геномной ДНК сои и гетерологичную вставку, содержащую последовательность *Avena* HPPD (SEQ ID NO: 14 и 15, SEQ ID NO: 17 и 20, SEQ ID NO: 17 и 21).

Также предлагаются наборы для обнаружения ДНК, содержащие по меньшей мере один полинуклеотид, который может специфически обнаруживать специфический участок SYHT0H2, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну молекулу ДНК с достаточной длиной смежных нуклеотидов, гомологичных или комплементарных SEQ ID NO: 10. В конкретных аспектах настоящего изобретения набор для обнаружения ДНК содержит любой полинуклеотид из SEQ ID NO: 11-12 или его фрагмент или последовательность, которая гибридизуется с любой из SEQ ID NO: 11-12 или ее фрагмент.

Любой из полинуклеотидов и его фрагменты и варианты, используемые в способах и композициях, могут иметь идентичность последовательности с участком трансгенной вставки события SYHT0H2, соединением последовательности события SYHT0H2 или фланкирующей последовательностью события SYHT0H2. Известны способы определения взаимосвязи различных последовательностей. В контексте данного документа "эталонная последовательность" является определенной последовательностью, используемой в качестве основы для сравнения последовательностей. Эталонная последовательность может быть разновидностью указанной последовательности или всей указанной последовательностью, например, в качестве сегмента полноразмерной кДНК или геномной последовательности, или целой кДНК или геномной последовательности. В контексте данного документа "окно сравнения" ссылается на смежный и определенный сегмент полинуклеотидной последовательности, причем полинуклеотидная последовательность в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух полинуклеотидов. Как правило, окно сравнения составляет по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов в длину и, необязательно, может составлять 30, 40, 50, 100 или больше. Специалистам в данной области понятно, что во избежание высокого сходства с эталонной последовательностью за счет включения пробелов в полинуклеотидную последовательность обычно вводят штраф за пропуск в последовательности и вычитают из количества совпадений.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Таким образом, определение процента идентичности последовательностей между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Неограничивающими примерами таких математических алгоритмов являются алгоритм Myers и Miller, CABIOS, 1988, 4:11-17; алгоритм локального выравнивания Smith et al., Adv. Appl. Math., 1981, 2:482; алгоритм глобального выравнивания Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol., 1970, 48:443-453; способ поиска локального выравнивания Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85:2444-2448; алгоритм Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1990, 87:2264, модифицированный как в Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993, 90:5873-5877.

Компьютерная реализация данных математических алгоритмов может применяться для сравнения последовательностей с целью определения идентичности последовательностей. Такие реализации включают, но не ограничиваются ими, CLUSTAL в PC/генная программа (доступна у Intelligentics, Маунтин Вью, Калифорния); ALIGN программа (версия 2.0) и GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA в GCG Wisconsin Genetics Software Package, версия 10 (доступны у Accelrys Inc., 9685 Скрэнтон-Роуд, Сан-Диего, Калифорния). Выравнивание с использованием этих программ могут быть выполнены с применением параметров по умолчанию. CLUSTAL программа хорошо описана Higgins et al., Gene, 1988, 73:237-244; Higgins et al., C45/OS, 1989, 5:151-153; Corpet et al., Nucleic Acids Res., 1988, 16:10881-90; Huang et al., CABIOS, 1992, 8:155-65; и Pearson et al., Meth. Mol. Biol., 1994, 24:307-331. Программа ALIGN основана на алгоритме Myers & Miller, CABIOS, 1988, 4:11-17. Таблица веса остатков PAM120, штраф за длину пропуска, равную 12, и штраф за пропуск, равный 4, можно использовать с программой ALIGN при сравнении аминокислотных последовательностей. Программа BLAST Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215:403 основана на алгоритме Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993, 90:5873-5877. Поиски нуклеотидов BLAST могут быть выполнены с программой BLASTN, показатель = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеотидной последовательности, кодирующей белок. Поиски белка BLAST могут быть выполнены с помощью программы BLASTX, показатель = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белку или полипептиду. Для получения содержащих разрывы выравниваний в целях сравнения может быть использован содержащий разрывы BLAST (в BLAST 2.0), описанный в Altschul et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389. В качестве альтернативы PSI-BLAST (в BLAST 2.0) может быть использован для выполнения повторного поиска, который обнаруживает отдаленные взаимосвязи между молекулами. См. Altschul et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389. При использовании BLAST, содержащих разрывы

BLAST, PSI-BLAST, могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTN для нуклеотидных последовательностей, BLASTX для белков). Выравнивание можно осуществлять вручную посредством контроля.

Если не указано иное, значения идентичности/сходства последовательности, приведенных в данном документе, относятся к значению, полученному с использованием GAP версии 10 с применением следующих параметров: % идентичности и % сходства для нуклеотидной последовательности, использующей вес GAP, равный 50, и меру длины, равную 3, а также матрицу замены `nwsgapdna.cmp`; % идентичности и % сходства для последовательности аминокислот, использующих вес GAP, равный 8, и меру длины, равную 2, а также оценочную матрицу BLOSUM62 или любой эквивалентной ей программы. Под "эквивалентной программой" подразумевают любую программу сравнения последовательностей, которая для любой из двух исследуемых последовательностей создает выравнивания, имеющие сходные совпадения нуклеотидных или аминокислотных остатков и сходные проценты идентичности последовательности по сравнению с соответствующим выравниванием, созданным с помощью GAP версии 10.

GAP использует алгоритм Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 1970, 48:443-453 для нахождения выравнивания двух полных последовательностей, которые максимизируют количество совпадений и минимизируют число пробелов. GAP учитывает все возможные выравнивания и позиции пробела и создает выравнивание с наибольшим количеством совпадающих оснований и наименьшим количеством пробелов. Это создает возможность для введения в действие штрафа за возникновение пробелов и штрафа за увеличение пробела в частях совпадающих оснований. GAP должен извлечь выгоду от штрафа за возникновение пробелов в ряду совпадений для каждого пробела, который он вставляет. Если выбирают штраф за расширение больше нуля, GAP должен, вдобавок, извлечь выгоду для каждого вставленного пробела в размере длины пробела, умноженной на штраф за увеличение пробела. Значения штрафа за создание пробелов по умолчанию и значения штрафа за увеличение пробела по умолчанию в версии 10 GCG Wisconsin Genetics Software Package для белковых последовательностей равны 8 и 2 соответственно. Для нуклеотидных последовательностей штраф за создание пробелов по умолчанию равен 50, в то время как штраф за увеличение пробела по умолчанию равен 3. Штрафы за создание пробелов и увеличение пробелов могут быть выражены как целое число, выбранное из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 200. Так, например, штрафы за создание пробелов и увеличение пробелов могут быть 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или больше.

GAP представляет одного из членов семейства лучших выравниваний. Членов данной семьи может быть много, но ни один другой из членов не имеет лучшего качества. GAP демонстрирует четыре показателя качества для выравниваний: качество, соотношение, идентичность и сходство. Качество является показателем, максимизированным для выравнивания последовательностей. Соотношение является качеством, разделенным на количество оснований в более коротком сегменте. Процент идентичности является процентом символов, которые фактически совпадают. Процент сходства является процентом символов, которые являются аналогичными. Символы, которые находятся в стороне от пробелов игнорируются. Сходство отмечают, когда значение матрицы замен для пары символов больше или равно 0,50, порога сходства. Матрица замен, используемая в версии 10 GCG Wisconsin Genetics Software Package, является, BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, 89:10915).

В контексте данного документа "идентичность последовательности" или "идентичность" применительно к двум полинуклеотидным или полипептидным последовательностям, ссылается на остатки в двух последовательностях, которые являются аналогичными при выравнивании для максимального соответствия в заданном окне сравнения. Признают, что в случае, когда процент идентичности последовательностей применяют со ссылкой на белки, положения остатков, которые не являются идентичными, часто отличаются консервативными аминокислотными заменами, где аминокислотные остатки заменены на другие аминокислотные остатки со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью) и, следовательно, не изменяют функциональные свойства молекулы. В случае, когда последовательности отличаются консервативными заменами, процент идентичности последовательности может быть отрегулирован в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Говорят, что последовательности, которые отличаются такими консервативными заменами, обладают "сходством последовательностей" или "сходством". Средства для осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. Как правило, они включают в себя количественную оценку консервативной замены скорее как частичного, а не полного неправильного спаривания, тем самым увеличивая процент идентичности последовательностей. Так, например, если идентичным аминокислотам дается оценка 1 и неконсервативное замещение имеет коэффициент, равный нулю, а консервативное замещение имеет коэффициент между нулем и 1. Количественную оценку консервативных замен рассчитывают, например, как реализовано в программе PC/GENE (Intelligenetics, Маунтин Вью, Калифорния).

В контексте данного документа "процент идентичности последовательности" означает значение, определенное путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавле-

ний или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывается путем определения числа позиций, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или идентичный аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях для получения числа совпадающих позиций, деля некоторое количество совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножая результат на 100 для получения процента идентичности последовательностей.

Термин "борьба" и его производные, например "борьба с сорняками", относится к одному или нескольким из ингибирующих рост, прорастание, воспроизведение и/или пролиферацию и/или уничтожение, удаление, инактивацию или иным образом уменьшение появления и/или активности сорняков.

В контексте данного документа "обрабатываемые земли" или "месторасположение" включает любой регион, в котором хотят вырастить растение. Такие обрабатываемые земли включают, но не ограничиваются ими, область, в которой растение выращивают (например, нива, перелог, лес, управляемый лес, поле для культивирования фруктов и овощей и т.д.), теплицу, камеру роста и т.д.

Соевые растения, содержащие событие SYNH0H2 могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных участков полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, которые придают устойчивость к одному или нескольким дополнительным гербицидам, насекомым, грибковым, бактериальным и/или вирусным инфекциям. Примеры полипептида(ов), который придает устойчивость к гербицидам, включают, например, толерантную к глифосату 5-енол-пирувилшкимат-3-фосфат-синтазу (EPSPS) (например, раскрытую в патентах США №№ 5804425 и 6566587), глифосат N-ацетилтрансферазу (GAT) (например, раскрытую в WO 02/036782), толерантную к гербицидам 4-гидроксипирувилдиоксигеназу (HPPD) (например, раскрытую в WO 02/46387), фосфинотрицин-ацетилтрансферазу (PAT) (например, раскрытую в патенте США 5273894), цитохром P450 (например, раскрытую в международной публикации согласно PCT № WO 07/103567), глутатион S-трансферазу (GST) (например, раскрытую в международной публикации согласно PCT № WO 01/21770), толерантную к гербицидам ацетил-КоА-карбоксылазу (ACCase), устойчивую к гербицидам ацетолактатсинтазу (ALS) (например, раскрытую в патенте США № 5013659), толерантную к гербицидам протопорфириногеназ (PPGO) (например, раскрытую в международной публикации согласно PCT № WO 95/34659) бромоксилинитрилазу (например, раскрытую в международной публикации согласно PCT № WO 89/00193), толерантную к гербицидам фитоендесатуразу (например, раскрытую в опубликованной европейской заявке № 0393690), арилоксиалканол диоксигеназу (например, раскрытую в международных публикациях согласно PCT № WO 2005/107437 и WO 2007/053482) и дикамба-разрушающие ферменты (например, раскрытые в международной публикации согласно PCT № WO 98/45424), в том числе известные мутировавшие или иначе модифицированные варианты этих полипептидов.

Соответственно, гербицидные композиции, применяемые к месторасположению, могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных пестицидов, к которым соевое растение, содержащее событие SYNH0H2, является толерантным, например нематоцид, инсектицид, фунгицид и/или гербицид. Примеры подходящих пестицидов приведены в Tomlin, C.D.S. (ed.), *The Pesticide Manual*, 14th ed., 2006. Например, пестицид может быть одним или несколькими пестицидами, выбранными из следующих классов инсектицидно, акарицидно, нематоцидно или моллюскицидно активных ингредиентов: аланикарб, алдикарб, бендиокарб, бенфуракарб, бутоксикарб, бутоксикарб, карбарил, карбофуран, карбосульфат, этиофенкарб, фенобукарб, форметанат, фуратиокарб, изопрокарб, метиокарб, метомил, метолкарб, оксамил, пиримикарб, пропоксур, тиодикарб, тиофанокс, триазамат, триметакарб, ХМС, ксилкарб; ацефат, азаметифос, азинфос-этил, азинфос-метил, кадусафос, хлорэтоксифос, хлорфенвинфос, хлормефос, хлорпирифос, хлорпирифос-метил, кумафос, цианофос, деметон-S-метил, диазинон, дихлорвос/DDVP, дикротофос, диметоат, диметилвинфос, дисульфотон, EPN, этион, этопрофос, фамфур, фенамифос, фенитротрион, фентион, фостиазат, гепетнофос, имисуафос, изофенфос, изопропил-О-(митоксинаминотиофосфорил)салицилат, изоксатион, малатион, мекарбам, метамидофос, метидатион, мевинфос, монокротофос, налед, ометоат, оксидеметон-метил, паратион, паратион-метил, фентоат, фозалон, фосмет, фосфамидон, фоксим, пиримифос-метил, профенофос, пропетамфос, протиофос, пираклофос, пиридафентион, квиналфос, сульфотеп, тебупиримфос, темефос, тербуфос, тетрахлолвинфос, тиометон, триазофос, триклофон, вимидотион, циклодиен хлорорганических соединений, хлордан, эндосульфат; этипрол, фипронил, акринатрин, аллетрин, D-цис-транс-аллетрин, D-транс-аллетрин, бифентрин, биоаллетрин, биоаллетрин S-изомер циклопентенил, биоресметрин, циклопротрин, цифлутрин, бета-цифлутрин, цигалотрин, лямбда-цигалотрин, гамма-цигалотрин, циперметрин, альфа-циперметрин, бета-циперметрин, тета-циперметрин, зета-циперметрин, цифенотрин [(1R)-транс-изомеры], дельтаметрин, эмпертрин [(EZ)-(1R)-изомеры], эсфенвалерат, этофенпрокс, фенпропатрин, фенвалерат, флуцитринат, флуметрин, тауфлувалинат, халфенпрокс, имипротрин, кадетрин, перметрин, фенотрин [(1R)-транс-изомер], праллетрин, пиретрин (пиретрум), ресметрин, силафлуофен, тефлутрин, тетраметрин, тетраметрин [(1R)-изомеры], тралометрин, трансфлутрин; ДДТ; метоксихлор, ацетамиприд, клоотианидин, динотефуран, имидаклоприд, нитенпирам, тиаклоприд, тиаметоксам; никотин, спинеторам, спиносат, абамектин, эмабектин бензоат, лепимектин, милбектин, гидропрен, кинопрен, метопрен; феноксикарб; пирипроксифен, хлорпикрин; сульфурилфторид, бура; антимонил-тарtrat калия, пиметрозин; флониамид, клофентезин, гекситиазокс, дифлотидазин, этоксазол. Бактерии *Bacillus thuringiensis* подвида *israelensis*,

бактерии *Bacillus sphaericus*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *aizawai*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *kurstaki*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *tenebrionis*, ВТ-белки сельскохозяйственных культур Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry2Ab, mCry3A, Cry3Ab, Cry3Bb, Cry34/35Ab1, диафентиурон, азоксиклотин, цигексатин, фенбутатин оксид, пропаргит, тетрадифон, хлорфенапир, ДНОК, сульфуранид, бенсультап, картап гидрохлорид, тиоциклам, тиосульфат-натрий, бистрифлурон, хлорфлуазурон, дифлубензурон, флуциклоксурон, флуфеноксурон, гексафлумурон, луфенурон, новалурон, новифлумурон, тефлубензурон, трифлумурон, бупрофезин, цирوماзин, хромафенозид, галофенозид, метоксифенозид, тебуфенозид, амитраз, гидраметилнон, ацеквиноцил, флакрипирим, феназаквин, фенпироксимат, пиримидифен, пиридабен, тебуфенпирад, толфенпирад, ротенон (Denis), индоксакарб; метафлумизон, спиродиклофен, спиромезифен, спиротетрамат, фосфида алюминий, кальция фосфид, фосфин, фосфид цинка, циенопирафен, хлорантранилипрол, флубендиамид, амидофлумет, азадирахтин, бенклотиаз, бензоксимат, бифеназат, бромпропилат, хинометионат, криолит, циантранилипрол (циазипир), цифлуметофен, дикофол, дифловидазин, флуенсульфон, флуфенерим, флуфипрол, флуопирам, фуфенозид, имидаклотиз, ипродион, меперфлутрин, пиридалил, пирифлувинозин, тетраметилфлутрин, иодметан; продукты на основе *Bacillus firmus* (включая, но не ограничиваясь им, штамм CNCM 1-1582, такой как, например, VOTiVO™, BioNem); 3-бром-N-{2-бром-4-хлор-6-[(1-циклопропилэтил)карбамоил]фенил}-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-карбоксамид (известный из WO 2005/077934), 4-{{(6-бромпиридин-3-ил)метил}(2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известное из WO 2007/115644), 4-{{(6-фтор-3-ил)метил}(2,2-дифторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), 4-{{(2-хлор-1,3-тиазол-5-ил)метил}(2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}(2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), флупирадифурон, 4-{{(6-хлор-5-фтор-3-ил)метил}(метил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115643), 4-{{(5,6-дихлорпиридин-3-ил)метил}(2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известного из WO 2007/115646), 4-{{(6-хлор-5-фтор-3-ил)метил}(циклопропил)амино}фуран-2(5H)-он (известного из WO 2007/115643), 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}(циклопропил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из EP-A-0539588), 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}(метил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из EP-A-0539588), {{[1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (известный из WO 2007/149134) и его диастереомеры {{[(1R)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (A) и {{[(1S)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (B) (также известный из WO 2007/149134), а также сульфоксафлор и его диастереомеры [(R)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (A1) и [(S)-метил-(оксидо){(1S)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (A2), называют группой диастереомеров А (известный из WO 2010/074747, WO 2010/074751), [(R)-метил-(оксидо){(1S)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (B1) и [(S)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (B2), именуемый группой диастереомеров В (также известный из WO 2010/074747, WO 2010/074751) и 11-(4-хлор-2,6-диметилфенил)-12-гидрокси-1,4-диокса-9-азаспиро[4.2.4]тетрадец-11-ен-10-он (известный из WO 2006/089633), 3-(4-фтор-2,4-диметилбифенил-3-ил)-4-гидрокси-8-оксо-1-азаспиро[4.5]дец-3-ен-2-он (известный из WO 2008/067911), 1-{2-фтор-4-метил-5-[(2,2,2-трифлуорэтил)сульфинил]фенил}-3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-амин (известный из WO 2006/043635), [(3S,4aR,12R,12aS,12bS)-3-[(циклопропилкарбонил)окси]-6,12-дигидрокси-4,12b-диметил-11-оксо-9-(пиридин-3-ил)-1,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-декагидро-2H,11H-бензо-[f]-пирано[4,3-b]хромен-4-ил]метилциклопропан-карбоксилат (известный из WO 2008/066153), 2-циано-3-(дифторметокси)-N,N-диметилбензол-сульфонамид (известный из WO 2006/056433), 2-циано-3-(дифторметокси)-N-метилбензол-сульфонамид (известный из WO 2006/100288), 2-циано-3-(дифторметокси)-N-этилбензол-сульфонамид (известный из WO 2005/035486), 4-(дифторметокси)-N-этил-N-метил-1,2-бензотиазол-3-амин-1,1-диоксид (известный из WO 2007/057407), N-[1-(2,3-диметилфенил)-2-(3,5-диметилфенил)этил]-4,5-дигидро-1,3-тиазол-2-амин (известный из WO 2008/104503), {1'-[(2E)-3-(4-хлорфенил)проп-2-ен-1-ил]-5-фторспиро[индол-3,4'-пиперидин]-1(2H)-ил]}(2-хлорпиридин-4-ил)метанон (известный из WO 2003/106457), 3-(2,5-диметилфенил)-4-гидрокси-8-метокси-1,8-диазаспиро[4.5]дец-3-ен-2-он (известный из WO 2009/049851), 3-(2,5-диметилфенил)-8-метокси-2-оксо-1,8-диаза-спиро[4.5]дец-3-ен-4-ил этилкарбонат (известный из WO 2009/049851), 4-(бут-2-ин-1-илокси)-6-(3,5-диметилпиперидин-1-ил)-5-фторпиримидин (известный из WO 2004/099160), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентил)(3,3,3-трифторпропил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентил)(3,3,4,4,4-пентафторбутил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), 8-[2-(циклопропилметокси)-4-(трифторметил)феноксил]-3-[6-(трифторметил)пиридазин-3-ил]-3-азабицикло[3.2.1]октан (известный из WO 2007/040280), флометоквин, PF1364 (CAS-reg. № 1204776-60-2) (известный из JP 2010/018586), 5-[5-(3,5-дихлорфенил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 5-[5-(2-хлорпиридин-4-ил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 4-[5-(3,5-дихлорпропенил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-метил-N-{2-оксо-2-[(2,2,2-трифторэтил)амино]этил}бензамид (известный из WO

2005/085216), 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}(циклопропил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}(этил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}(метил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он (все известны из WO 2010/005692), NNI-0711 (известный из WO 2002/096882), 1-ацетил-N-[4-(1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-метоксипропан-2-ил)-3-изобутилфенил]-N-изобутирил-3,5-диметил-1H-пиразол-4-карбоксамид (известный из WO 2002/096882), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-хлор-3-метилбензоил]-2-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-этилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-метилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)бензоил]-1,2-диэтилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)бензоил]-2-этилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), (5RS,7RS;5RS,7RS)-1-(6-хлор-3-пириметил)-1,2,3,5,6,7-гексагидро-7-метил-8-нитро-5-пропоксиимидазо[1,2-а]пиридин (известный из WO 2007/101369), N-[2-(5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-хлор-6-метилфенил]-3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-карбоксамид (известный из CN 102057925) и метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)бензоил]-2-этил-1-метилгидразин карбоксилат (известный из WO 2011/049233).

В качестве дополнительного примера фунгицид включает, но не ограничивается ими, один или несколько фунгицидов, выбранных из следующих: алдиморф, азаконазол, битертанол, бромконазол, ципроконазол, диклобутразол, дифеноконазол, диниконазол, диниконазол-М, додеморф, додеморф ацетат, эпоксиконазол, этаконазол, фенаримол, фенбуконазол, фенгексамид, фенпропидин, фенпропиморф, флу-квинконазол, флурпримидол, флусилазол, флутриафол, фурконазол, фурконазол-цис, гексаконазол, има-залил, имазалил сульфат, имибенконазол, ипконазол, метконазол, миклобутанил, нафтифин, нуаримол, окспокконазол, паклобутразол, пефуразоат, пенконазол, пипералин, прохлораз, пропиконазол, протиоко-назол, пирибутикарб, пирифенокс, квинконазол, симеконазола, спирокамин, тебуконазол, тербинафин, тетраконазол триадимефон, триадименол, тридеморф, трифлумизол, трифорин, тритиконазол, уникано-зол, униканозол-р, виниконазол, вориконазол, 1-(4-хлорфенил)-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)циклогептанол, метил-1-(2,2-диметил-2,3-дигидро-1H-инден-1-ил)-1H-имидазол-5-карбоксилат, N'-{5-(дифторметил)-2-метил-4-[3-(триметилсилил)пропокси]фенил}-N-этил-N-метилимидоформамид, N-этил-N-метил-N'-{2-метил-5-(трифторметил)-4-[3-(триметилсилил)пропокси]фенил}имидоформамид, O-[1-(4-метоксифенокс)-3,3-диметилбутан-2-ил]-1H-имидазол-1-карботиоат, бикафен, боскалид, карбоксин, дифлуметорим, фенфурам, флуопирам, флутоланил, флуксапироксад, фураметпир, фурмециклокс, изо-пиразам (смесь син-эпимерного рацемата 1RS,4SR,9RS и антиэпимерного рацемата 1RS,4SR,9SR), изо-пиразам (антиэпимерный рацемат 1RS,4SR,9SR), изопиразам (антиэпимерный энантиомер 1S,4R,9R), изопиразам (син-эпимерный рацемат 1RS,4SR,9RS), изопиразам (антиэпимерный энантиомер 1R,4S,9R), изопиразам (син-эпимерный энантиомер 1S,4R,9S), мепронил, оксикарбоксин, пенфлуфен, пентиопирад, седаксан, тифлузамид, 1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафтортокси)фенил]-3-(трифторметил)-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафтортокси)фенил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-[4-фтор-2-(1,1,2,3,3,3-гексафторпропокси)фенил]-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[1-(2,4-дихлорфенил)-1-метокси-пропан-2-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, 5,8-дифтор-N-[2-(2-фтор-4-[4-(три-фторметил)пиридин-2-ил]окси)фенил]этил]квинозолин-4-амин, N-[9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтален-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[(1S,4R)-9-(дифторметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтален-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[(1R,4S)-9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтален-5-ил]-3-(дифтор-метил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, аметоктрадин, амисульбром, азоксистробин, циазофамид, куметоксистробин, кумоксистробин, димоксистробин, энестроурин, фамоксадон, фенамидон, фенокси-стробин, флюксастробин, крезоксим-метил, метоминостробин, орисастробин, пикоксистробин, пиракло-стробин, пираметостробин, пираоксистробин, пирибенкарб, триклопирикарб, трифлуксистробин, (2E)-2-(2-{{[6-(3-хлор-2-метилфенокс)-5-фторпиримидин-4-ил]окси}фенил}-2-(метоксиимино)-N-метилэтан-амид, (2E)-2-(метоксиимино)-N-метил-2-(2-{{[(1E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден}амино]окси}метил}фенил)этанамид, (2E)-2-(метоксиимино)-N-метил-2-{{2-[(E)-{{1-[3-(трифторметил)фенил]этокси}имино]метил}фенил}этанамид, (2E)-2-{{2-{{[(1E)-1-(3-{{(E)-1-фтор-2-фенилэтилен]окси}фенил]этили-ден]амино}окси]метил}фенил}-2-(метоксиимино)-N-метилэтанамид, (2E)-2-{{2-{{[(2E,3E)-4-(2,6-дихлорфенил)бут-3-ен-2-илиден]амино}окси]метил}фенил}-2-(метоксиимино)-N-метилэтанамид, 2-хлор-N-(1,1,3-триметил-2,3-дигидро-1H-инден-4-ил)пиридин-3-карбоксамид, 5-метокси-2-метил-4-(2-{{[(1E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден}амино]окси]метил}фенил)-2,4-дигидро-3H-1,2,4-триазол-3-он, метил-(2E)-2-{{2-{{[циклопропил(4-метоксифенил)имино]метил}сульфанил]метил}фенил}-3-метоксипроп-2-еноат, N-(3-этил-3,5-триметилциклогексил)-3-(формиламино)-2-гидроксibenзамид, 2-{{2-[(2,5-диметилфенокс)метил]фенил}-2-метокси-N-метилацетамид, (2R)-2-{{2-[(2,5-диметилфенокс)метил]

фенил}-2-метокси-N-метилацетамид, беномил, карбендазим, хлорфеназол, диэтофенкарб, этабоксам, флуопиколид, фуберидазол, пенцикурон, тиабендазол, тиофанат-метил, тиофанат, зоксамид, 5-хлор-7-(4-метилпиперидин-1-ил)-6-(2,4,6-трифторфенил)[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин, 3-хлор-5-(6-хлорпиридин-3-ил)-6-метил-4-(2,4,6-трифторфенил)пиридазин, бордосская жидкость, каптафол, каптан, хлороталонил, гидроксид меди, нафтенат меди, оксид меди, оксихлорид меди, сульфат меди (2+), дихлофлуанид, дитианон, додин, свободное основание додина, фербам, фторфолпет, фолпет, гуазатин, гуазатин ацетат, иминоктадин, иминоктадин албесилат, иминоктадин триацетат, манкоппер, манкозеп, манеб, метирам, метирам цинк, оксин меди, пропамидин, пропинесб, сера, соединения серы, включая полисульфид кальция, тирам, толилфлуанид, цинеб, зирам, ацибензолар-S-метил, изотианил, пробеназол, тиадинил, андоприм, бластицидин-S, ципродинил, касугамицин, касугамицин гидрохлорид гидрат, мепанипирим, пириметанил, 3-(5-фтор-3,3,4,4-тетраметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)хинолин, фентин ацетат, хлорид фентин, фентин гидроксид, силтиофам, бентиаваликарб, диметоморф, флуморф, ипроваликарб, мандипропамид, полиоксины, полиоксорим, валидамицин А, валифеналат, бифенил, хлоронеб, диклоран, эдифенфос, этридазол, иодокарб, ипробенфос, изопропиолан, пропамокарб, пропамокарб гидрохлорид, протиокарб, пиразофос, квинтозен, текназен толклофос-метил, карпропамид, диклоцимет, феноксанил, фталид, пироквилон, трициклазол, 2,2,2-трифторэтил{3-метил-1-[(4-метилбензоил)амино]бутан-2-ил}карбамат, беналаксил, беналаксил-M (киралаксил), бупиримат, клозилакон, диметиримол, этиримол, фуралаксил, гимексазол, металаксил, металаксил-M (мефеноксам), офурас, оксациксил, оксолиновая кислота, хлозолинат, фенпиклонил, флудиоксонил, ипродион, процимидон, квиноксифен, винклозолил, бинапакрил, динокап, феримзон, флуазинам, мептилдинокап, бентиазол, бетоксазин, капсимицин, карвон, хинометионат, пириофенон (хлазафенон), куфранесб, цифлуфенамид, цимоксанил, ципросульфамид, дазомет, дебакарб, дихлорофен, дикломезин, дифензокват, дифензокват метилсульфат, дифениламин, экомат, фенпиразамин, флуметовер, фторимид, флусульфамид, флутанил, фосетил-алюминий, фосетил-кальций, фосетил-натрий, гексахлорбензол, иримамицин, метасульфокарб, метил изотиоцианата, метрафенон, милдиомицин, натамицин, никель диметилдитиокарбамат, нитротал -изопропил, октилинон, оксамокарб, оксифентин, пентахлорфенол и соли, фенотрин, фосфористая кислота и ее соли, пропамокарб-фосетилат, пропанозин-натрий, проквиазид, пириморф, (2E)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, (2Z)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, пирролнитрин, тебуфлоквин, теклофталам, толнифанид, триазоксид, трихламид, зариламид, (3S,6S,7R,8R)-8-бензил-3-[(3-[(изобутирилокси)метокси]-4-метокси-пиридин-2-ил)карбонил)амино]-6-метил-4,9-диоксо-1,5-диоксонан-7-ил-2-метилпропаноат, 1-(4-{4-[(5R)-5-(2,6-дифторфенил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-{4-[(5S)-5-(2,6-дифторфенил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-{4-[(5R)-5-(2,6-дифторфенил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-метоксифенокси)-3,3-диметилбутан-2-ил-1H-имидазол-1-карбоксилат, 2,3,5,6-тетрахлор-4-(метилсульфонил)пиридин, 2,3-дибутил-6-хлортиено[2,3-d]пиримидин-4(3H)-он, 2,6-диметил-1H,5H-[1,4]дитиино[2,3-с:5,6-с']дипиррол-1,3,5,7(2H,6H)-тетрон, 2-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]-1-(4-{4-[(5R)-5-фенил-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)этанон, 2-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]-1-(4-{4-[(5S)-5-фенил-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)этанон, 2-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]-1-{4-[4-(5-фенил-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил)-1,3-тиазол-2-ил]пиперидин-1-ил}этанон, 2-бутоксид-6-иод-3-пропил-4H-хромен-4-он, 2-хлор-5-[2-хлор-1-(2,6-дифтор-4-метоксифенил)-4-метил-1H-имидазол-5-ил]пиридин, 2-фенилфенол и соли, 3-(4,4,5-трифтор-3,3-диметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)хинолин, 3,4,5-трихлорпиридин-2,6-дикарбонитрил, 3-[5-(4-хлорфенил)-2,3-диметил-1,2-оксазол-идин-3-ил]пиридин, 3-хлор-5-(4-хлорфенил)-4-(2,6-дифторфенил)-6-метилпиридазин, 4-(4-хлорфенил)-5-(2,6-дифторфенил)-3,6-диметилпиридазин, 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-тиол, 5-хлор-N'-фенил-N'-(проп-2-ин-1-ил)тиофен-2-сульфоногидразид, 5-фтор-2-[(4-фторбензил)окси]пиримидин-4-амин, 5-фтор-2-[(4-метилбензил)окси]пиримидин-4-амин, 5-метил-6-октил[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-амин, этил(2Z)-3-амино-2-циано-3-фенилпроп-2-еноат, N'-(4-{[3-(4-хлорбензил)-1,2,4-тиадиазол-5-ил]окси}-2,5-диметилфенил)-N-этил-N-метилимидоформаид, N-(4-хлорбензил)-3-[3-метокси-4-(проп-2-ин-1-илокси)фенил]пропанамид, N-[(4-хлорфенил)(циано)метил]-3-[3-метокси-4-(проп-2-ин-1-илокси)фенил]пропанамид, N-[(5-бром-3-хлорпиридин-2-ил)метил]-2,4-дихлорпиридин-3-карбоксамид, N-[1-(5-бром-3-хлорпиридин-2-ил)этил]-2,4-дихлорпиридин-3-карбоксамид, N-[1-(5-бром-3-хлорпиридин-2-ил)этил]-2-фтор-4-иодопиридин-3-карбоксамид, N-{(E)-[(циклопропилметокси)имино][6-(дифторметокси)-2,3-дифторфенил]метил}-2-фенилацетамид, N-{(Z)-[(циклопропилметокси)имино][6-(дифторметокси)-2,3-дифторфенил]метил}-2-фенилацетамид, N'-4-[(3-трет-бутил-4-циано-1,2-тиазол-5-ил)окси]-2-хлор-5-метилфенил}-N-этил-N-метилимидоформаид, N-метил-2-(1-{[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-(1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-ил)-1,3-тиазол-4-карбоксамид, N-метил-2-(1-{[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-[(1R)-1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-ил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид, N-метил-2-(1-{[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-[(1S)-1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-ил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид, пен-

тил{6-([{(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)(фенил)метилиден]амино}окси)метил]пиридин-2-ил}карбамат, фенозин-1-карбоновая кислота, хинолин-8-ол, хинолин-8-ол сульфат (2:1), трет-бутил{6-([{(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)(фенил)метил]амино}окси)метил]пиридин-2-ил}карбамат, 1-метил-3-(трифторметил)-N-[2'-(трифторметил)бифенил-2-ил]-1Н-пиразол-4-карбоксамид, N-(4'-хлорбифенил-2-ил)-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, N-(2',4'-дихлорбифенил-2-ил)-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[4'-(трифторметил)бифенил-2-ил]-1Н-пиразол-4-карбоксамид, N-(2',5'-дифторбифенил-2-ил)-1-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[4'-(проп-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 5-фтор-1,3-диметил-N-[4'-(проп-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 2-хлор-N-[4'-(проп-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]пиридин-3-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-[4'-(3,3-диметилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, N-[4'-(3,3-диметилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-5-фтор-1,3-диметил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-(4'-этинилбифенил-2-ил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, N-(4'-этинилбифенил-2-ил)-5-фтор-1,3-диметил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 2-хлор-N-(4'-этинилбифенил-2-ил)пиридин-3-карбоксамид, 2-хлор-N-[4'-(3,3-диметилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]пиридин-3-карбоксамид, 4-(дифторметил)-2-метил-N-[4'-(трифторметил)бифенил-2-ил]-1,3-тиазол-5-карбоксамид, 5-фтор-N-[4'-(3-гидрокси-3-метилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1,3-диметил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 2-хлор-N-[4'-(3-гидрокси-3-метилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]пиридин-3-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-[4'-(3-метокси-3-метилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 5-фтор-N-[4'-(3-метокси-3-метилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1,3-диметил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 2-хлор-N-[4'-(3-метокси-3-метилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]пиридин-3-карбоксамид, (5-бром-2-метокси-4-метилпиридин-3-ил)(2,3,4-триметокси-6-метилфенил)метанон, N-[2-(4-{[3-(4-хлорфенил)проп-2-ин-1-ил]окси}-3-метоксифенил)этил]-N2-(метилсульфонил)валинамид, 4-оксо-4-[(2-фенилэтил)амино]бутановая кислота, бут-3-ин-1-ил{6-([{(Z)-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)(фенил) метил]амино}окси)метил]пиридин-2-ил}карбамат.

Также примером добавочного пестицида может быть один или несколько гербицидов, выбранных из группы, состоящей из ацетохлора, ацифлуорфена, ацифлуорфен-натрия, аклонифена, алахлора, аллидохлора, аллоксидима, аллоксидим натрия, аметрина, амикарбазона, амидохлора, амидосульфурона, аминоциклопирахлора, аминоциклопирахлор-калия, аминоциклопирахлор-метила, аминопиралида, амитрола, аммонийсульфата, анилофоса, азулама, атразина, азафенидина, азимсульфурина, бифлурата, беназолина, беназолин-этила, бенфлуралина, бенфуресата, бенсульфурина, бенсульфурон-метила, бензулида, бентазона, бензобициклона, бензофенапа, бициклопирона, бифенокса, биланафоса, биланафос-натрия, биспирибака, биспирибак-натрия, бромацила, бромобутида, бромфеноксима, бромоксинила, бромоксинил-бутирата, -калия-, -гептаноата и -октаноата, бузоксина, бутлахлора, бутафенацила, бутамифоса, бутенахлора, бутралина, бутроксида, бутилата, кафенстрола, карбетамиды, карфентразона, карфентразон-этила, хлорамбена, хлорбромурона, хлорфенака, хлорфенак-натрия, хлорфенпропа, хлорфлуренола, хлорфлуренол-метила, хлоридазона, хлоримурона, хлоримурон-этила, хлорфталима, хлоротолурина, хлортал-диметила, хлорсульфурина, цинидона, цинидон-этила, цинметилина, циносульфурина, клетодима, клодинафопа, клодинафоп-пропаргила, кломазона, кломепропа, клопиралида, клорансулама, клорансулам-метила, кумилурина, цианамиды, цианазина, циклоата, циклосульфамурона, циклоксидима, цигалофопа, цигалофоп-бутила, ципразина, 2,4-D, 2,4-D-бутотила, -бутила, -диметил-аммония, -диоламина, -этила, 2-этилгексила, дазомета, -изобутила, -изооктила, -изопропиламмония, калий-, -трисопропаноламмония и -троламина, 2,4-DB, 2,4-DB-бутил-, диметиламмония, изооктила, -калий и натрий-, даимурона (димрона), далапона, N-деканола, десмедифама, детосил-пиразолат (ДТР), дикамбы, дихлобенила, дихлорпропа, дихлорпроп-Р, диклофопа, диклофоп-метила, диклофоп-Р-метила, диклосулама, дифензоквата, дифлуфеникана, дифлуфензопира, дифлуфензопир-натрия, димефурина, димепиперата, диметахлора, диметаметрина, диметенамида, диметенамида-Р, диметрасульфурона, динитрамина, динотерба, дифенамида, диквата, дикват-дибромида, дитиопира, диурона, DНОС, эндотала, ЕРТС, эпрокарба, эталфлуралина, этаметсульфурина, этаметсульфурон-метила, этиозина, этофумесата, этоксифена, этоксифен-этила, этоксисульфурона, этобензанида, F-5231, т.е. N-{2-хлор-4-фтор-5-[4-(3-фторпропил)-5-оксо-4,5-дигидро-1Н-тетразол-1-ил]фенил}этансульфонамида, F-7967, т.е. 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)пиримидин-2,4(1Н,3Н)-диона, феноксапропа, феноксапропа-Р, феноксапроп-этила, феноксапроп-Р-этила, феноксасульфона, фентразамиды, фламппропа, фламппроп-М-изопропила, фламппроп-М-метила, флазасульфурона, флорансулама, флауазифопа, флауазифопа-Р, флауазифоп-бутила, флауазифоп-Р-бутила, флукарбазона, флукарбазон-натрия, флуцетосульфурона, флухлоралина, флуфенацета (тиафлуамида), флуфенпура, флуфенпур-этила, флуметсулама, флумиклорака, флумиклорак-пентила, флумиоксазина, флуометурона, флуренола, флуренол-бутила, -диметиламмоний и -метила, флуорогликофена, флуорогликофен-этила, флупропаната, флупирсульфурина, флупирсульфурон-метил-натрия, флуридола, флуорохлоридона, флуороксипира, флуорокси-пир-метила, флуртамон флутиацета, флутиацет-метила, флутиамида, фомезафена, фомезафен-натрия, форамсульфурина, фозамина, глюфосината, глюфосинат аммония, глюфосинат-Р-натрия, глюфосинат-Р-аммония, глюфосинат-Р-натрия, глифосата, глифосата аммония, -изопропиламмония, -диаммония-, -диметиламмония, -калия, -натрий- и -тримеснума, Н-9201, т.е. О-(2,4-диметил-6-нитрофенил)-О-этил

изопропилфосфорамидотиоата, галозафена, галосульфурона, галосульфурон-метила, галоксифопа, галоксифопа-Р, галоксифоп-этоксизтила, галоксифоп-Р-этоксизтила, галоксифоп-метила, галоксифоп-Р-метила, гексазинона, НВ-02, т.е. 1-(диметоксифосфорил)этил-(2,4-дихлорфенокси)ацетата, имазаметабенза, имазаметабенз-метила, имазамокса, имазамокс-аммония, имазапика, имазапик-аммония, имазапира, имазапир-изопропиламмония, имазахина, имазахина-аммоний, имазетапира, имазетапир-иммония, имазосульфурона, инданофана, индазифлама, иодосульфурона, иодосульфурон-метил-натрия, иоксинила, иоксинил-октаноата, -калия и -натрия, ипфенкарбазона, изопротурона, изоуруна, изоксабена, изоксафлутола, карбутилата, КУН-043, т.е. 3-({[5-(дифторметил)-1-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-4-ил]метил}сульфонил)-5,5-диметил-4,5-дигидро-1,2-оксазола, кетоспирадокса, лактофена, кенацила, кинурона, МСРА, МСРА-бутотила, -диметиламмония, -2-этилгексила, -изопропиламмония, -калия и -натрия, МСРВ, МСРВ-метила, -этила и -натрия, мекопропа, мекопроп-натрия и -бутотила, мекопроп-Р, мекопроп-Р-бутотила, диметиламмония, -2-этилгексила и -калия, мефенацета, мефлуидида, мезосульфурона, мезосульфурон-метила, мезотриона, метабензтиазуруна, метама, метамифопа, метамитрона, метазахлора, метазосульфурона, метабензтиазуруна, метиопирсульфурона, метиозолина, метил этиотицианата, метобромуруна, метолахлора, метосулама, метоксуруна, метрибузина, метсульфурона, метсульфурон -метила, молината, монолинуруна, моноссульфурона, моноссульфурон-эфира, МТ-128, т.е. 6-хлор-N-[(2E)-3-хлорпроп-2-ен-1-ил]-5-метил-N-фенилпиридазин-3-амин, МТ-5950, т.е. N-(3-хлор-4-изопропилфенил)-2-метилпентан амида, NGGC-011, напропамида, NC-310, т.е. [5-(бензилокси)-1-метил-1Н-пиразол-4-ил](2,4-дихлорфенил)метанола, небуруна, никосульфурона, нонановой кислоты (пеларгоновой кислоты), норфлуразона, олеиновой кислоты (жирной кислоты), орбенкарба, ортосульфамурон, оризалина, оксадиаргила, оксадиазона, оксафульфурона, оксацикломефона, оксифлуорфена, паракувата, дихлорида паракувата, пебулата, пендиметалина, пеносулама, пентахлорфенола, пентоксазона, петоксамида, нефтяных масел, фенмедифама, пиклорама, пиколинафена, пиноксадена, пиперофоса, претилахлора, примисульфурона, примисульфурон-метила, продиамин, прифлуралина, профоксидима, прометон прометрина, пропахлора, пропанила, пропаквизафопа, пропазина, профама, прописохлора, пропоксикарбазона, пропоксикарбазон-натрия, пропирисульфурона, пропирамида, просульфокарба, просульфурона, пираклонила, пирафлуфена, пирафлуфен-этила, пирасульфотол, пиразолината (пиразолат), пиразосульфурона, пиразосульфурон-этила, пиразоксифена, пирибамбенза, пирибамбенз изопропила, пропила-пирибамбенза, пирибензоксима, пирибутикарба, пиридафола, пиридата, пирифталида, пириминобака, пириминобак-метила, пиримисульфана, пиритиобака, пиритиобак-натрия, пироксасульфона, пироксулама, квинклорака, квинмерака, квинокламина, хизалофопа, квизалофоп-этила, квизалофопа-Р, квизалофоп-Р-этила, квизалофоп-Р-тефурила, римсульфурона, сафлуфенацила, сетоксидима, сидуруна, симазина, симетрина, сулькотриона, сульфентразона, сульфометурона, сульфометурон-метила, сульфосульфурона, SW-065, SYN-523, SYP-249, т.е. 1-этокси-3-метил-1-оксобут-3-ин-2-ил-5-[2-хлор-4-(трифторметил)фенокси]-2-нитробензоата, SYP-300, т.е. 1-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-ин-1-ил)-3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-6-ил]-3-пропил-2-тиоксоимидазолидин-4,5-диона, 2,3,6-ТВА, ТСА (трихлоруксусной кислоты), ТСА-натрия, тебутиуруна, тефурилтриона, темботриона, тепралоксидима, тербацила, тербукарба, тербуметона, тербутилазина, тербутрина, тенийлхлора, тиазопира, тиенкарбазона, тиенкарбазон-метила, тифенсульфурона, тифенсульфурон-метила, тиобенкарба, топрамезона, траклоксидима, триафамона, триаллата, триасульфурона, триазифлама, трибенуруна, трибенурун-метила, триклопира, триетазина, трифлорисульфурона, трифлорисульфурон-натрия, трифлуралина, трифлусульфурона, трифлусульфурон-метил тритосульфурона, сульфат мочевины, вернолата, ZJ-0862, т.е. 3,4-дихлор-N-{2-[(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)окси]бензил}анилина или регуляторов роста растений, выбранных из группы, содержащей ацибензолар, ацибензолар-S-метил, 5-аминолевулиновую кислоту, анцимидол, 6-бензиламинопуридин, брассинолид, катехин, хлормекват хлорид, клопроп, цикланилид, 3-(циклопроп-1-енил)пропионовую кислоту, даминозид, дазомет, п-деканол, дикегулак, дикегулак-натрий, эндотал, эндотал-дикалий, -динатрий-и моно-(N,N-диметилалкиламмоний), этефон, флуметралин, флуренол, флуренол-бутил, флурпримидол, форхлорфенурон, гибберелловую кислоту, инабенфид, индол-3-уксусную кислоту (IAA), 4-индол-3-ил-масляную кислоту, изопропиолан, пробеназол, жасминовую кислоту, гидразид малеиновой кислоты, мепикватхлорид, 1-метилциклопропен, метилжасмонат, 2-(1-нафтил)ацетамид, 1-нафтилуксусную кислоту, 2-нафтилуксусную кислоту, смесь нитрофенолата, паклобутразол, N-(2-фенилэтил)-бета-аланин, N-полуамид фенилфталеиновой кислоты, прогексадион, прогексадион-кальций, прогидрожасмон, салициловую кислоту, стриголактон, текназен, тидиазурон, триаконтанол, тринексапак, тринексапак-этил, цитодеф, униконазол, униконазол-Р, или предпочтительных в области агрохимии солей или других форм.

В зависимости от характера гербицидов в гербицидной композиции она может быть применена к месторасположению до посадки, до всходов и/или после всходов. Под "до посадки" подразумевают, что гербицидную композицию применяют до посадки сельскохозяйственной культуры в месторасположении, под "до всходов" подразумевают, что гербицидную композицию наносят до того, как прорастающие семена сельскохозяйственной культуры выступят над поверхностью месторасположения, и "после всходов" означает, что гербицидную композицию применяют, как только сельскохозяйственная культура покажется над поверхностью месторасположения. Эти индивидуальные схемы применения могут быть

применены к месторасположению отдельно или в любой комбинации. Например, схема применения может содержать применение до посадки с последующим применением после всходов.

Со многими видами сорняков можно бороться (т.е. уничтожать или повреждать) с помощью гербицидной композиции(ий). Соответственно, ее применяют в борьбе с данными видами растений, где они нежелательны (т.е. если они являются сорняками). Эти виды растений включают культурные растения, а также виды, обычно причисляемые к сорнякам, в том числе, но не ограничиваясь, такими видами, как лисохвост полевой (*Alopecurus myosuroides*), лисохвост (*Setaria faberi*), ползучий сорняк (*Digitaria sanguinalis*), суринам трава (*Brachiaria decumbens*), овсюг (*Avenafatua*), дурнишник обыкновенный (*Xanthium pensylvanicum*), марь белая (*Chenopodium album*), вьюнок пурпурный (*Ipomoea* spp. и многие другие виды ипомеи, включая *hederacea*, *grandifolia*), амарант (*Amaranthus* spp), канатник Теофраста (*Abutilion theophrasti*), ежовник обыкновенный (*Echinochloa crus-galli*), бермудская трава (*Cynodon dactylon*), костер кровельный (*Bromus tectorum*), элевзина индийская (*Eleusine indica*), щетинник зеленый (*Setaria Viridis*), итальянский райграсс (*Lolium multiflorum*), джонсонова трава (*Sorghum halepense*), малый канареечник канарский (*Phalaris minor*), метлица (*Apera spica-venti*), шерстняк мохнатый (*Eriochloa villosa*), чуфа (*Cyperus esculentus*), звездчатка полевая (*Stellaria media*), амброзия трехраздельная, амброзия высокая (*Ambrosia trifida*) (*Ambrosia artemisiifolia*), *Kochia scoriata*, мелколепестник канадский (*Coryza canadensis*), плевел жесткий (*Lolium rigidum*), элевзина индийская (*Eleusine indica*), мелколепестник волосистый (*Coryza bonariensis*), подорожник (*Plantago lanceolata*), тропический паучник (*Commelina benghalensis*), полевой вьюнок (*Convolvulus arvensis*), циперус пурпурный (*Cyperus rotundus*), бруннихия (*Brunnichia ovata*), сесбания конопляная (*Sesbania exaltata*), резуха канадская (*Senna obtusifolia*), тexasский сыняк обыкновенный (*Helianthus ciliaris*), просо раздвоенноцветковое (*Panicum dichotomiflorum*), тexasское просо (*Panicum texanum*), широколистная брахиария (*Brachiaria*) и лютик полевой (*Proboscidea louisianica*). В других аспектах настоящего изобретения сорняки содержат устойчивый к гербицидам райграсс, например устойчивый к глифосату райграсс, устойчивый к параквату райграсс, устойчивый к АССазы-ингибитору райграсс и устойчивый к неселективному гербициду райграсс.

Различные химикаты, такие как гербициды, имеют разное "последствие", т.е. разное количество времени, в течение которого обработка химикатами или гербицидами продолжает оказывать влияние на растения, произрастающие в обработанной области. Такой эффект может быть желательным или нежелательным в зависимости от желаемой будущей цели обработанной области (например, поля или обрабатываемых земель). Таким образом, схема чередования культур может быть выбрана на основе последствий от обработок, которые будут использоваться для каждой культуры и их влияния на культуру, которая будет впоследствии выращиваться в том же районе. Специалист в данной области техники знаком со способами, которые могут быть использованы для оценки последствия гербицидов, например, как правило, глифосат обладает очень незначительным последствием или совсем его не имеет на почве, в то время как гербициды, которые выполняют функцию ингибирования HPPD, различаются в своих уровнях последствия. Как известно, последствия для различных гербицидов, которые известны в данной области техники, зависят от различных факторов внешней среды, таких как, например, уровень влажности почвы, температура, pH и состав почвы (текстура и органическая примесь). Соевые растения СYHT0H2 находят особое применение в способах выращивания сельскохозяйственных культур, где повышенная устойчивость к последствию гербицидов является выгодной.

Термин "антидот" относится к веществу, которое при добавлении к гербицидным составам, примененным к семенам посева или внесенным в почву, устраняет или снижает фитотоксическое действие гербицида у определенных культур. Специалисту в данной области должно быть понятно, что выбор антидота зависит, в частности, от целевой сельскохозяйственной культуры, а также от конкретного гербицида или сочетания гербицидов, включенных в синергическую гербицидную композицию. Примеры антидотов, подходящих для использования с раскрытыми в настоящий момент композициями гербицидов включают, но не ограничиваются ими, описанные в патентах США №№ 4808208; 5502025; 6124240 и опубликованных патентных заявках США №№ 2006/0148647; 2006/0030485; 2005/0233904; 2005/0049145; 2004/0224849; 2004/0224848; 2004/0224844; 2004/0157737; 2004/0018940; 2003/0171220; 2003/0130120; 2003/0078167, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Эти способы могут включать использование гербицидов в сочетании с антидотами гербицидов, такими как беноксакор, ВCS (1-бром-4-[(хлорметил)сульфонилбензин], клоквиносет-мексил, циометринил, дихлормид, 2-(дихлорметил)-2-метил,3-диоксолана (MG 191), фенхлоразол-этил, фенклорим, флуразол, флукофеним, фурилазол, изоксадифенэтил, мефенпир-диэтил, метоксифенон ((4-метокси-3-метилфенил)-(3-метилфенил)метанон), нафтойный ангидрид (1,8-нафтойный ангидрид), ципросульфамид, N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензолсульфонамид и оксабетринил для повышения безопасности посева. Эффективные в качестве противоядия количества антидотов гербицида можно применять при этом в виде соединений или применять для обработки семян или почвы. Таким образом, один из аспектов настоящего изобретения относится к применению смеси, содержащей гербицид-ингибитор HPPD, по меньшей мере еще один гербицид и эффективное в качестве противоядия количество антидота гербицида.

Обработка семян антидотами гербицида, в частности, применяют для селективной борьбы с сорня-

ками, так как она физически ограничивает действие антидота на культурные растения. Избирательная борьба с сорняками в поле включает обработку семян, из которых выращивают сельскохозяйственные культуры эффективным в качестве противоядия количеством антидота и обработку поля эффективным количеством гербицида с целью борьбы с сорняками. Эффективные в качестве противоядия количества антидота могут быть легко определены специалистом в данной области с помощью простых экспериментов. Эффективное в качестве противоядия количество антидота присутствует там, где желаемое растение обрабатывают антидотом с тем, чтобы уменьшить действие гербицида на растение по сравнению с действием гербицида на растение, которое не обрабатывали антидотом; как правило, эффективное в качестве противоядия количество антидота предупреждает повреждение или значительное повреждение растения, обработанного антидотом. Специалист в данной области техники способен определить, является ли применение антидота целесообразным и способен определить дозу, в которой антидот следует вводить сельскохозяйственным культурам.

Гербицид или смесь гербицидов, примененные к SYHT0H2 растению, иногда действуют как антидот. Например, первый гербицид или смесь гербицидов применяют в эффективном в качестве противоядия количестве к растению. Например, способ может содержать засадку посевной площади семенами сельскохозяйственных культур или растениями, которые содержат первый полинуклеотид, кодирующий полипептид, который может придать толерантность к ингибитору гербицида HPPD, функционально связанный с промотором, активным в растении, и второй полинуклеотид, кодирующий полипептид, который придает толерантность к гербициду, функционально связанный с промотором, активным в растении. Соединение гербицидов, содержащее по меньшей мере эффективное количество первого и второго гербицидов, применяют к сельскохозяйственной культуре, частям сельскохозяйственной культуры, сорнякам или области их возделывания. Эффективное количество соединения гербицидов борется с сорняками, причем эффективное количество первого гербицида не переносится сельскохозяйственной культурой при применении отдельно по сравнению с контрольной сельскохозяйственной культурой, которую не подвергли воздействию первого гербицида, при этом эффективное количество второго гербицида является достаточным для получения эффекта противоядия, где эффект противоядия обеспечивает повышение толерантности сельскохозяйственной культуры при применении первого и второго гербицида по сравнению с толерантностью культуры, когда первый гербицид применяется отдельно.

Соя является ведущим в мире источником растительного масла и шрота. Масло, полученное из соевых бобов, используют в качестве кулинарного жира, маргарина и заправки для салатов. Соевое масло состоит из насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот. Оно имеет в составе типичную смесь 11% пальмитиновой, 4% стеариновой, 25% олеиновой, 50% линолевой и 9% линоленовой жирных кислот ("Economic Implications of Modified Soybean Traits Summary Report", Iowa Soybean Promotion Board and American Soybean Association Special Report 92S, May 1990). Изменения в составе жирных кислот для повышения устойчивости к окислению и питательной ценности пользуются постоянным спросом. Промышленное использование соевого масла, которое подвергают дальнейшей переработке, включает ингредиенты для красок, пластмасс, волокон, моющих средств, косметических средств, смазочных материалов и биодизельного топлива. Соевое масло может быть расщепленным, интерэтерифицированным, сульфированным, эпоксицированным, полимеризованным, этоксицированным или расщепляемым. Разработка и получение производных соевого масла с улучшенной функциональностью и улучшенным химическим составом является быстро развивающейся областью. Типичная смесь триглицеридов, как правило, является расщепленной и разделенной на чистые жирные кислоты, которые затем смешивают со спиртами, полученными из нефти или кислотами, азотом, сульфонатами, хлорином или с жирными спиртами, полученными из жиров и масел.

Соя также используется в качестве источника пищи для людей и животных. Соя широко используется в качестве источника белка для животных кормов для домашней птицы, свиней и крупного рогатого скота. Во время обработки цельных соевых бобов удаляют волокнистый корпус и извлекают масло. Оставшийся соевый шрот представляет собой соединение углеводов и приблизительно 50% белка.

Для употребления в пищу соевый шрот превращают в соевую муку, которую перерабатывают в белковые концентраты, используемые для наполнителей мяса или специализированных кормов для домашних животных. Производство пищевых белковых ингредиентов из сои предлагает более полезную для здоровья, менее дорогую замену животного белка в мясных продуктах, а также в продуктах молочного типа.

Процесс производства данной продукции может протекать, например, следующим образом:

- (i) нагревание бобов до 82°C до содержания в них всего лишь 9% влаги;
- (ii) размещение в бочках в течение от 24 до 72 ч;
- (iii) дробление бобов с целью удаления оболочки так, что остатки составляют от 1/4 до 1/8 исходных бобов;
- (iv) удаление оболочки посредством всасывания воздуха;
- (v) нагревание остатков при 71°C в течение от 20 до 30 мин;
- (vi) прессование остатков в мелкие хлопья толщиной от 1,2 до 1,6 мм;
- (vii), обработка с созданием "сухариков" с помощью механического давления и пара;

- (viii), отмывание гексаном с целью разбавления жиров;
- (ix) нагревание при 100°C в течение 20 мин для испарения жиров (восстановленные жиры создают соевое масло);
- (x) дополнительный нагрев для удаления гексана;
- (xi) прессование сухариков частями от 2 до 4 мм с получением соевой муки или прессование в соевый кормовой жмых.

Аспекты настоящего изобретения дополнительно описаны в следующих примерах. Следует понимать, что данные примеры даны только с целью иллюстрации. Из приведенного выше обсуждения и данных примеров специалист в данной области может установить существенные признаки и без отхода от сущности и объема изобретения может внести различные изменения и модификации аспектов настоящего изобретения с целью его адаптации к различным практическим применениям и условиям. Таким образом, различные модификации аспектов настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе будут очевидными специалистам в данной области техники из предшествующего описания. Такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение и определение соевого события SYHT0H2.

Двоичные векторы преобразования сои создавали (сконструировали) с промотором, таким как промотор, содержащий синтетический CaMV 35S и FMV транскрипционный энхансер и синтетический TATA-бокс, запускающий экспрессию кодирующей последовательности HPPD, за которой следует 3'-терминатор гена NOS. Мутантный ген HPPD, полученный из *Avena HPPD*, кодировали для экспрессии сои на основе прогнозированной аминокислотной последовательности кодирующей участок гена HPPD. Мутантный фермент HPPD включает делецию изолированного остатка аланина в позициях 109-111 природного фермента *Avena sativa HPPD*. См. опубликованную патентную заявку США № 20100197503. Бинарный вектор 15954 конструировали для включения экспрессионных кассет для экспрессии мутантного гена HPPD вместе с селективным маркерным геном (см. чертеж). Данный вектор конструировали с использованием комбинации способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, таких как перекрестная PCR, синтез ДНК, субклонирование рестрикционного фрагмента и лигирование.

Аббревиатуры, используемые на чертеже (вектор 15954), определяют следующим образом:

cAvHPPD-03.

Начало: 1036, конец: 2355.

Соевый кодон-оптимизированный HPPD ген овса, кодирующий SEQ ID NO: 14.

cPAT-03-01.

Начало: 3178, конец: 3729.

PAT Hoescht AO2774 синтетические S. виридохромогены, кодоны растения, идентичные Q57146 фосфотрицину.

Белок ацетилтрансферазы.

cPAT-03-02.

Начало: 4761, конец: 5312.

PAT Q57146 S. белок фосфинотрицинацетилтрансферазы виридохромогенов, cPAT-03-01 ДНК, но мутирует BamH1, Bgl2 сайты.

cSpec-03.

Начало: 6045, конец: 6833.

Стрептомицин аденилилтрансфераза; из Tn7 (aadA).

cVirG-01.

Начало: 7133, конец: 7858.

G ген вирулентности из *Agrobacterium tumefaciens* (virGN54D, содержащей TTG кодон начала) virGN54D, полученный из pAD1289, описанного в Hansen et al., 1994, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 91:7603-7607.

cRepA-01.

Начало: 788, конец: 8961.

RepA, pVS1 белок репликации от A до G при nt735.

eTMV-02.

Начало: 965, конец: 1032 (комплементарный).

Вирус табачной мозаики (TMV_Omega 5'UTR лидер последовательности, предназначенный для усиления экспрессии).

EMBL: TOTMV6.

e35S-05.

Начало: 608, конец: 900 (комплементарный).

Вирус мозаики цветной капусты 35S участок энхансера с от C до T&C в т.н.п. изменениями.

eFMV-03.

Начало: 408, конец: 601 (комплементарный).

Энхансер вируса мозаики норичника.

bNRB-05.

Начало: 4, конец: 259 (комплементарный).

Правая граничная область Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* нопалин ти-плазмиды.

bNRB-01-01.

Начало: 101, конец: 125 (комплементарный).

Повтор правой границы Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* нопалин ти-плазмиды.

bNLB-03.

Начало: 5636, конец: 5765 (комплементарный).

Левая граничная область Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* нопалин ти-плазмиды. (Zambryski et al., 1980, Science, 209:1385-1391) EMBL no: J01825.

bNLB-01-01.

Начало: 5671, конец: 5695 (комплементарный).

25 т.п.н. левой граничной области Т-ДНК нопалин ти-плазмиды опухолеобразующей агробактерии.

pg35S-04-01.

Начало: 2633, конец: 3153.

35S промотор; изначально определенный на карте длиной 64 т.п.н., точного соответствия в литературе не найдено (LF июль 2004 г.).

pgCMP-06.

Начало: 4024, конец: 4677.

Промотор вируса скручивания желтого листа *Cestrum* с лидерной последовательностью. Промотор транскрипта не полной длины. 528 пар оснований изменили с G на C для удаления внутреннего сайта RsrII.

oVS1-02.

Начало: 9004, конец: 9408.

Исходная точка репликации и разбегания участка из плазмиды pVS1 *Pseudomonas* (Itoh et al., 1984, Plasmid 11: 206-220); аналогичной номеру доступа GenBank U10487; служит в качестве источника репликации в хозяине опухолеобразующей агробактерии.

oCOLE-06.

Начало: 10086, конец: 10892 (комплементарный).

ColE1 исходная точка функциональной репликации в *E. coli*.

tNOS-05-01.

Начало: 2372, конец: 2624 (комплементарный).

NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы.

tNOS-05-01.

Начало: 3763, конец: 4015.

NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы.

tNOS-05-01.

Начало: 5341, конец: 5593.

NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы.

Материал соевого растения можно соответствующим образом трансформировать, а плодоносящие растения регенерировать множеством способов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, плодоносящие морфологически нормальные трансгенные соевые растения могут быть получены путем 1) производства соматической эмбриогенетической ткани, например, из незрелой семядоли, гипокотыля или другой подходящей ткани; 2) трансформации путем бомбардировки частицами или инфицирования агробактериями и 3) регенерации растений. В одном примере, описанном в патенте США № 5024944, ткань семядоли вырезали из незрелых зародышей сои, необязательно с удаленной зародышевой осью и культивировали на гормонсодержащей среде с образованием соматического эмбрионного растительного материала. Данный материал трансформируют в плодоносящие трансгенные соевые растения с использованием, например, прямых способов ДНК, баллистической трансфекции покрытой ДНК или инфицирования агробактериями, культивированными на подходящей селективной среде и регенерированные, необязательно, также в постоянном присутствии селективного агента. Селективными агентами могут быть антибиотики, такие как канамицин, гигромицин или гербициды, такие как ингибитор HPPD, фосфинотрицин или глифосат, или в качестве альтернативы селекция может быть основана на экспрессии визуализируемого маркерного гена, такого как GUS. Целевые ткани для преобразования включают меристему, соматическую эмбриогенетическую ткань и цветочную или создающую цветок ткань. Другие примеры трансформации сои включают физические способы доставки ДНК, такие как бомбардировка частицами (см., например, Finer & McMullen, In Vitro Cell Dev. Biol., 1991, 27P:175-182; McCabe et al., Bio/technology, 1998, 6:923-926), усов (Khalafalla et al., African J. of Biotechnology, 2006, 5:1594-1599), аэрозольное введение бобам (патент США № 7001754) или опосредованные агробактериями способы доставки (Hinchee et al., BioTechnology, 1988, 6:915-922, патент США № 7002058; опубликованные патентные заявки США №№ 20040034889 и 20080229447, Paz et al., Plant Cell Report, 2006,

25:206-213).

Соевые трансгенные растения могут быть получены с использованием описанного выше бинарного вектора 15954, содержащего мутантный ген HPPD, используя любой доступный способ трансформации. Необязательно, HPPD ген может обеспечить средство отбора и идентификации трансгенной ткани. Например, вектор использовали для трансформации незрелых целевых семян, согласно описанию, для создания трансгенных HPPD соевых растений, ограничиваясь использованием ингибиторов HPPD, таких как мезотрион, в качестве селективного агента (см. опубликованную патентную заявку США № 20080229447). Необязательно, HPPD ген может присутствовать в полинуклеотиде наряду с другими последовательностями, которые обеспечивают дополнительными средствами селекции/идентификации трансформированных тканей, включая, например, известные гены, которые придают устойчивость к каминацину, гиромоцину, фосфинотрицину, бутафенацилу или глифосату. Например, в данной области техники известны различные бинарные векторы, содержащие PAT или EPSPS селективные маркерные гены (см., например, опубликованную патентную заявку США № 20080229447). В качестве альтернативы селективные маркерные последовательности могут присутствовать в отдельных полинуклеотидах, при этом используют, например, способ котрансформации и вспомогательной селекции. Подлежащие оценке маркерные гены, такие как G.U.S. также могут быть использованы для идентификации трансформированной ткани.

Растения T₀, взятые из культуры тканей, помещали в теплицу, где их пересаживали в водонасыщенную почву (REDI-EARTH® Plug and Seedling Mix, Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA, or Fafard Germinating Mix), смешанную с 1% гранулированного MARATHON® (Olympic Horticultural Products, Co., Mainland, PA) в дозировке 5-10 г/галлон почвы в 2"-квадратные горшки. Растения покрывали влажным колпаком и помещали в камеру Conviron (Пембина, Северная Дакота) при следующих условиях: 24°C днем; 20°C ночью, 16-23-часовой световой период - 1-8-часовой темный период, 80% относительной влажности.

После того как растения укоренились в почве и появился подрост (~1-2 недели), отбирали образцы растений и проверяли на наличие требуемого трансгена с помощью TAQMAN® анализа с использованием соответствующих зондов для HPPD генов или промоторов (например, prCMT). Позитивные растения пересаживали в 4"-квадратные горшки, содержащие почву Fafard #3. Удобрение с медленным высвобождением Sierra 17-6-12 вводили в почву в рекомендованной дозе. Затем растения перемещали в стандартную теплицу для акклиматизации (~1 неделя). Условиями окружающей среды были 27°C днем; 21°C ночью; 14-часовой световой период (с дополнительным светом); влажность окружающей среды. После акклиматизации (~1 неделя) отбирали образцы растений и проверяли на наличие и количество копий вставленных трансгенов. Трансгенные соевые растения выращивали до зрелости с получением семян T₁. Растения T₁ выращивали, а после TAQMAN® анализа гомозиготные растения выращивали для получения семян. Трансгенные семена и потомство растений использовали для дальнейшей оценки показателей их устойчивости к гербициду и молекулярных свойств. Из популяции в приблизительно 90 трансформантов событие SYHT0H2 показало высокий уровень толерантности к мезотриону.

Вставку события SYHT0H2 и фланкирующие последовательности получали сочетанием двух способов; создания библиотеки лямбда и GENOMEWALKER™ (Clontech). Секвенирование события SYHT0H2 проводили, используя способ Сэнгера секвенирования ДНК. Анализ последовательности проводили с использованием программы анализа последовательности SEQUENCHER® (Gene Codes Corporation). Геномную ДНК из соевого события SYHT0H2 изолировали для получения библиотеки лямбда путем изолирования геномной ДНК и ограничения расщепления рестрикционными ферментами BamHI и EcoRI и KpnI до завершения, описанного поставщиком рестриктазы (NEB). Неполное расщепление геномной ДНК завершали, применяя BfuCI при 0.15 U/мкг ДНК при 37°C. Образцы отбирали через 2, 4, 6, 8 и 10 мин после добавления фермента. Образцы объединяли для загрузки в гель. Расщепленные образцы загружали в 1% агарозный гель TAE и запускали в течение ночи при 20 V. Фракции изолировали для каждого расщепления BfuCI; 2-4 т.п.н., BamHI; 0,7-3,5 т.п.н. и EcoRI-KpnI, 3-6 т.п.н. ДНК выделяли из геля, используя QIAQUICK® Gel Extraction Kit согласно описанию поставщика (Qiagen). Изолированные фракции сшивали с лямбда Zap экспресс вектором (Lambda Zap Express vector) (Stratagene), разрезанным либо BamHI, либо EcoRI-KpnI. Организовали лигирования, применяя соотношение 1000 нг вектора на 100 нг вставки в 10 мкл объема с 200 U лигазы в течение ночи при 6°C.

Библиотеки компоновали с использованием Maxplaq согласно описанию поставщика (Epicentre). Библиотеки титровали с использованием XL-1MRA (Stratagene) клеток. Клетки выращивали в течение 6 ч при 37°C в бульоне NZY с добавлением 0,2% мальтозы. Клетки центрифугировали при 4 K и ресуспендировали в SM буфере (Stratagene). Фаг разводили 1/100 в буфере SM и 10 мкл смешивали с 100 мкл клеток, инкубированных при 37°C в течение 15 мин, добавляли 3,5 мл NZY линейной агарозы (50°C), смешанной путем инверсии и распределенной по всем планшетам с L-агаром, которые затем инкубировали в течение ночи при 37°C.

Библиотеку подвергали проверке на отдельные клоны, которые содержали вставленные гетерологичные последовательности. Бактериальные клетки, используемые для посева библиотеки XL-1MRA,

приобретали у Stratagene. XL-1MRA клетки выращивали в бульоне NZY с добавлением 0,2% мальтозы в течение 6 ч перед использованием. Зараженные бактериальные клетки сеяли на планшетах с L-агаром, подготовленных путем заливки L-агара на 25×150 мм планшеты, нагретые при 37°C перед использованием. Бактериальные клетки собирали с помощью центрифугирования при 4 К и ресуспендирования клеток в SM буфере (Stratagene). 300 мкл бактериальных клеток и 50000 фага смешивали в 15 мл пробирке (Fisher Scientific) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. 9 мл NZY линейной агарозы добавляли и смешивали посредством инверсии, а полученную смесь распределяли по всей поверхности больших планшетов для сохранения гладкой поверхности. Изготавливали 10 планшетов на библиотеку для в общей сложности проверенных 500000 фагов на библиотеку. Инокулированные планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день растения удаляли и оставляли при 4°C по меньшей мере на 1 ч.

Бляшки, образованные в инокулированных планшетах, перемещали на Hybond NX (GE Amersham) мембраны путем размещения мембраны на поверхности планшета. После того как мембрана стала равномерно влажной, ей дали возможность инкубироваться в течение 2 мин. Ориентацию планшета помечали иглой и индийскими чернилами путем проделывания отверстий иглой с чернилами на ней в мембране и агаре в трех разных местах. Меченую мембрану снимали с планшета и помещали мембрану фага сверху на ватман, пропитанный 0,5M NaOH на 5 мин (Bio-Rad способ) с последующим перемещением на ватман, пропитанный 2X SSC, затем сушили на воздухе, при этом ДНК и мембрану перекрестно сшивали с использованием ДНК-кросслинкера фирмы Stratalinker (Stratagene) при 160 мДж.

С целью определения клонов фага лямбда, которые содержали гетерологичную вставленную ДНК, вышеуказанные фильтры исследовали следующим образом: фильтры предварительно гибридизировали в 7% SDS, 250 мМ фосфата натрия, pH 7,0, 1% BSA при 62°C в течение 4 ч. Прегибридизационный раствор заменяли свежим гибридизационным раствором перед добавлением радиоактивного зонда.

Зонды получали посредством PCR с праймерами MT_SOY_F2 и MT_SOY_R3, используя pSYN15764 в качестве матрицы

P_MTSOY_F2

TTTTGTGGTCGTCACCTGCGTT

(SEQ ID NO: 25)

P_MTSOY_R3

CAGGATATATTGTGGTGTAACAAATTGACGCTTAGACAA

(SEQ ID NO: 26)

Условия реакции были следующими: 1X буфера Expand, 200 мкМ dNTP, 50 нг матрицы, 10 пм праймеров, 1,5 U ДНК-полимеразы Expand (Roche) в 50 мкл реакционного объема.

Условия циклования представляли собой 35 циклов при [94°C, 30 с, 55°C, 30 с, 72°C, 2 мин].

Аmplифицированный фрагмент изолировали в 1% агарозном TAE геле. ДНК очищали от агарозы, используя набор для удаления геля QIAQUICK (Qiagen). Зонд помечали случайными штрихами, используя REDIPRIME™ II набор (GE Amersham) с радиоактивным dCT³²P. Зонд отделяли от единичной метки с помощью спин-колонки GE Amersham G-50. Зонд нагревали в течение 5 мин при 95°C перед добавлением к буферу для гибридизации. Гибридизация происходила в течение ночи при 62°C. Фильтры отмывали сначала 2X SSC, 0,5% SDS в течение 30 мин при 62°C, а затем с 0,2X SSC, 0,2% SDS в течение 30 мин при 62°C. Фильтры оборачивали в полимерную пленку и подвергали воздействию пленки Kodak Biomax XAR в течение 16-24 ч при -80°C. Позитивные капли закупоривали пробкой диаметром 8 мм и помещали в 500 мкл буфера SM с 25 мкл хлороформа и позволяли элюировать в течение ночи при 6°C. Фаги разбавляли 1/7500 SM в буфере для 2-го этапа скрининга. В общей сложности 1000 pfu (бляшкообразующих единиц) проверили во 2-м этапе. В тестах 2-го этапа повторяют процесс, используемый для тестов 1-го этапа. Это делали для каждого положительного клона, выявленного в тестах 1-го этапа. Данный процесс можно повторять до изолирования отдельной бляшки.

Фаг преобразовывали в плазмиду, используя протокол, описанный в ручном наборе Zap вектора экспрессии (Stratagene). Изолированные плазмиды секвенировали, при этом последовательность собирали с помощью программы SEQUENCHER® (Gene Codes Corporation).

В дополнение к описанному выше способу секвенирования сайт встраивания гетерологичной вставленной полинуклеотидной последовательности соевого события SYHT0H2 также секвенировали, используя универсальный комплект BD GENOMEWALKER™. Границу 1 (LB1), фланкирующую последовательности для события SYHT0H2, восстанавливали, используя комплект BD GENOMEWALKER™. Как указано в инструкции к набору, геномную ДНК из соевого события SYHT0H2 изолировали и полностью расщепляли путем соединения 8 мкл ДНК (~10 нг/мкл), 1 мкл 10X буфера EcoRV и 1 мкл EcoRV в стерильной микроцентрифужной пробирке и инкубирования при 37°C в EcoRV расщепленную ДНК лигировали к адаптеру BD GENOMEWALKER™ согласно описанию в инструкции производителя. Для амплификации ДНК, которая содержит гетерологичную вставленную полинуклеотидную последовательность соевого события SYHT0H2, два ген-специфичных праймера (GSP1 и GSP2) создавали на основе

последовательности левой граничной области 15954 трансформационной векторной последовательности. GSP2 вкладывают в продукт PCR, созданный с помощью амплификации GSP1 и праймера, созданного на основе последовательности адаптера BD GENOMEWALKER™.

Таблица 4

Наименование праймера	Последовательность праймера
GSP1/FlkSeq 0027	GAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAA SEQ ID NO: 27
GSP2/FlkSeq 0005	GGCCAGCATGGCCGTATCCGCAATGTGTT SEQ ID NO: 28

PCR ампликоны получали в две стадии, состоящие из первичной PCR и вторичной (вложенной) PCR, в соответствии с инструкциями производителя. PCR продукты вторичной PCR секвенировали.

Параметры последовательности, созданной с помощью и последовательности библиотеки лямбда, и секвенирования GENOMEWALKER, объединяли для создания последовательности сайта встраивания соевого события SYTH0H2. Нуклеотидную последовательность завершённой вставки определяют как SEQ ID NO: 9, а нуклеотидную последовательность вставки, окружённой геномной ДНК, определяют как SEQ ID NO: 10. Дополнительные нуклеотидные последовательности, которые описывают LB2 и LB1 соединения вставленной и фланкирующей геномной ДНК, определяют как SEQ ID NO: 1-6 (см. табл. 1).

Пример 2. PCR анализ трансформационного события.

Геномную ДНК из трансформантов *Glucine max* использовали в качестве матрицы для PCR анализа в TAQMAN® анализе с использованием пары праймеров, показанных в табл. 5, и условий циклования, показанных в табл. 6. Стандартная реакционная смесь включала 1X JUMPSTART™ READYMIX™, 300 нм праймера 1, 300 нм праймера 2, 100 нм зонда и приблизительно 30 нг ДНК-матрицы в общем объеме 10 мкл. В случае анализа A1720 праймер P10325 находится во вставке и используется для амплификации LB1 T-ДНК-вставки, в то время как праймер P12721 находится в геноме на сайте встраивания. Анализ A1720 генерирует PCR продукт, длина которого составляет 66 пар оснований

CGGGCGGCCAGCATGGCCGTATCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCT

AAACCCTAAACCAATGGCAC (SEQ ID NO: 24).

В случае анализа A1721 праймер P10043 находится во вставке и используется для обнаружения LB2 T-ДНК-вставки, в то время как праймер P12723 находится в геноме на сайте встраивания. Анализ A1721 генерирует PCR продукт, длина которого составляет 70 пар оснований

GGATGAAGAGATGAGAGAACCATCACAGAATTGACGCTTAGACAA

CTTAATAACACATTTGCGGATACGGC (SEQ ID NO: 25)

Таблица 5

ID анализа	ID праймера/зонда	Последовательность (с 5'- по- 3')
A1720	P10325 (праймер)	CGGGCGGCCAGCAT (SEQ ID NO: 11)
	P12721 (праймер)	GTGCCATTGGTTTAGGGTTAGAC (SEQ ID NO: 12)
	P12722 (зонд)	FAM-ATCCGCAATGTGTTATTA-MGB* (SEQ ID NO: 13)
ID анализа	ID праймера/зонда	Последовательность (с 5'- по- 3')
A1721	P10043 (праймер)	GCCGTATCCGCAATGTGTTA (SEQ ID NO: 14)
	P12723 (праймер)	GGATGAAGAGATGAGAGAACCATCA (SEQ ID NO: 15)
	P12724 (зонд)	FAM-TAAGTTGTCTAAGCGTCAATT-MGB* (SEQ ID NO: 16)

FAM - 6 карбоксифлуоресцин,

*MGB - дигидроциклопиролоиндола трипептид, связывающийся с малой бороздой,

*BGB-меченый зонд также может быть использован.

Таблица 6

Цикл	Этап	Температура (°C)	Время	Повторяющиеся циклы
A	1	95	10 минут	--
B	1	95	15 секунд	40
B	2	60	1 минута	40

В качестве альтернативы геномную ДНК из трансформантов *Glycine max* использовали в качестве матрицы для анализов на основе геля с использованием пары праймеров, показанных в табл. 7, и условиях циклования, приведенных в табл. 8. Стандартная реакционная смесь включала 1X JUMPSTART™ READYMIX™, 10 мкм праймера 1, 10 мкм праймера 2, 1 мкл 10 нг/мкл геномной ДНК в общем объеме 20 мкл.

Таблица 7

Цель	Праймер 1 (Т-ДНК)	Праймер 2 (геном)
SYHT0H2 LBFS 1	FE0845 (SEQ ID NO: 17)	FE3427 (SEQ ID NO: 18)
SYHT0H2 LBFS 1	FE0845 (SEQ ID NO: 17)	FE3443 (SEQ ID NO: 19)
SYHT0H2 LBFS 2	FE0845 (SEQ ID NO: 17)	FE3429 (SEQ ID NO: 20)
SYHT0H2 LBFS 2	FE0845 (SEQ ID NO: 17)	FE3442 (SEQ ID NO: 21)

Таблица 8

Цикл	Этап	Температура (°C)	Время	Повторяющиеся циклы
A	1	94	3 минуты	--
B	1	94	30 секунд	35
B	2	58	30 секунд	35
B	3	68	1 минут	35
C	1	68	7 минут	--
D	1	4	10 минут	--

Пример 3. Эффективность события SYHT0H2 в полевых условиях.

Событие SYHT0H2 соевых растений протестировали на эффективность действия в отношении мезотриона в 5 местах на территории Соединенных Штатов. Нетрансгенную линию сои Jack использовали в качестве контроля. Соевые растения как SYHT0H2, так и Jack, обрабатывали 210 г а.и./га мезотриона на V2/V3 этапе, а затем оценивали на процентную долю листьев с повреждениями на 4-7 дней после обработки (DAT), 13-17 DAT и 25-33 DAT. Результаты в табл. 9 показывают эффективность 0H2 в отношении мезотриона по сравнению с контрольной линией.

Таблица 9

Генотип	% Повреждение		
	4-7 DAT	13-17 DAT	25-33 DAT
Jack	46,5	81	62,4
SYHT0H2	13,2	4,7	0

SYHT0H2 соевых растений протестировали на эффективность действия в отношении глюфосината в 8 местах на территории Соединенных Штатов. Нетрансгенную линию сои Jack использовали в качестве контроля. Соевые растения как SYHT0H2, так и Jack, обрабатывали 900 г а.и./га глюфосинатом на V2/V3 этапе, а затем повторно обрабатывали на V5-V6 этапе. Затем их оценивали на процентную долю листьев с повреждениями на 4-8 день после обработки (DAT), 13-20 DAT, 26-35 DAT. Результаты в табл. 10 демонстрируют эффективность SYHT0H2 в отношении глюфосината по сравнению с контрольной линией.

Таблица 10

Генотип	% Повреждения		
	4-8 DAT	13-20 DAT	26-35 DAT
Jack	100	100	100
SYHT0H2	9	5	0

Пример 4. Маркеры для картирования и селекции скрещиванием.

Фланкирующую последовательность из LB2 (SEQ ID NO: 7) или фланкирующую последовательность LB1 (SEQ ID NO: 8) вставки SYHT0H2 привели в соответствие с 8X базой данных генома сои (т.е. базой данных "Phytozome" в ведении объединенного института генома (Joint Genome Institute) и центра интегративной геномики (Center for Integrative Genomics), доступной во всемирной сети Интернет, см. также Schmutz et al. (2010) Nature 463:178-183) с помощью средства поиска основного локального выравнивания (BLAST; Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215:403-410; Altschul et al., Nucleic Acids Res., 1997,

25:3389-3402), также доступного в сети Интернет. LB2 привели в соответствие с хромосомой номер 8 (группа сцепления A2) из нуклеотида 9905212-9905310. LB1 привели в соответствие с хромосомой 8 (группа сцепления A2) из нуклеотида 9905326-9905788. Физические позиции затем сравнивали с физическими позициями маркеров, перечисленных в консенсусной карте сои 4.0 (Huyten et al., Crop Sci., 2010, 50:960-968). Идентифицировали позицию сантиморганиды ближайшего маркера, все маркеры в пределах 10 сантиморганид приведены в табл. 9. Эти данные показывают, что вставка гетерологичной полинуклеотидной последовательности в событии SYT0H2 происходила на соевой хромосоме 8 в месте между парами оснований 9905310 и 9905326, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 24 между нуклеотидами 99 и 116. После вставки гетерологичной последовательности, содержащей последовательность HPPD, удаляют 16 пар оснований геномной последовательности, которые соответствуют нуклеотидам 100-115 SEQ ID NO: 24.

Событие SYHT0H2 вводят в соевое растение, используя один или несколько доступных маркеров, указанных в табл. 11, и традиционные способы селекции. Событие SYHT0H2 находится ближе всего к молекулярным маркерам BARC-65571-19573 и находится между молекулярными маркерами BARC-65571-19573 и BARC-43119-08535. Подходы и способы скрещивания хорошо известны в данной области техники. См., например, Fehr, в *Breeding Methods for Cultivar Development* 1987, Wilcos, J. (ed.), American Society of Agronomy, Madison, WI; Welsh J. R., *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*. John Wiley & Sons, NY (1981); Wood D.R. (Ed.), *Crop Breeding*. American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*. Second Edition, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D.P., *Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests*. Springer-Verlag, NY (1986); и Wricke and Weber, *Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding*. Walter de Gruyter and Co., Berlin (1986).

Таблица 11

Общепринятое название маркера	LG	сМ	Тип
Sat 400	A2	43,8	SSR
BARC-032503-08989	A2	44,5	SNP
BARC-045047-08867	A2	45,6	SNP
BARC-028361-05839	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05840	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05841	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05842	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05843	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05844	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05845	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05846	A2	45,7	SNP

032683

BARC-028361-05847	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05848	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05849	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05850	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05851	A2	45,7	SNP
BARC-018419-02910	A2	46,0	SNP
BARC-018419-02911	A2	46,0	SNP
BARC-018419-02912	A2	46,0	SNP
BARC-016861-02355	A2	46,1	SNP
Satt632	A2	46,3	SSR
Sat 157	A2	46,4	SSR
BARC-021329-04038	A2	46,4	SNP
BARC-021329-04039	A2	46,4	SNP
BARC-016685-03321	A2	46,4	SNP
Sat 162	A2	46,6	SSR
BARC-018023-02498	A2	46,7	SNP
BARC-018023-02499	A2	46,7	SNP
BARC-028309-05824	A2	46,8	SNP
BARC-028309-05825	A2	46,8	SNP
BARC-028309-05826	A2	46,8	SNP
BARC-040339-07714	A2	47,0	SNP
BARC-040339-07715	A2	47,0	SNP
BARC-030485-06876	A2	47,2	SNP
BARC-050171-09440	A2	47,3	SNP
BARC-012193-01743	A2	47,6	SNP
BARC-010097-00518	A2	47,6	SNP
Sat 215	A2	47,9	SSR
BARC-059853-16139	A2	48,0	SNP
BARC-015419-01822	A2	48,2	SNP
BARC-027690-06633	A2	49,0	SNP
BARC-021831-04219	A2	49,0	SNP
BARC-021831-04220	A2	49,0	SNP
BARC-027726-06646	A2	49,3	SNP
BARC-057257-14650	A2	49,3	SNP
Satt187	A2	49,9	SSR
BARC-027618-06620	A2	50,0	SNP
BARC-027618-06621	A2	50,0	SNP
BARC-027618-06622	A2	50,0	SNP
BARC-027618-06623	A2	50,0	SNP
BARC-027618-06624	A2	50,0	SNP
BARC-026091-05255	A2	50,4	SNP
Sat 212	A2	50,7	SSR
BARC-065571-19573	A2	51,3	SNP

032683

BARC-040029-07638	A2	52,2	SNP
BARC-040029-07639	A2	52,2	SNP
BARC-040029-07640	A2	52,2	SNP
BARC-043119-08535	A2	52,3	SNP
BARC-038631-07266	A2	52,4	SNP
BARC-053809-12037	A2	52,4	SNP
BARC-018083-02511	A2	52,5	SNP
BARC-018083-02512	A2	52,5	SNP
BARC-013857-01257	A2	52,6	SNP
BARC-013857-01258	A2	52,6	SNP
BARC-017983-02492	A2	53,0	SNP
BARC-039145-07456	A2	53,1	SNP
BARC-039145-07457	A2	53,1	SNP
BARC-029007-06050	A2	53,4	SNP
Satt424	A2	53,6	SSR
BARC-020307-04547	A2	55,1	SNP
BARC-020307-04548	A2	55,1	SNP
BARC-020307-04549	A2	55,1	SNP
BARC-020307-04550	A2	55,1	SNP
BARC-020307-04551	A2	55,1	SNP
BARC-045081-08872	A2	55,1	SNP
BARC-019749-04349	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04350	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04351	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04352	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04353	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04354	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04355	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04356	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04357	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04358	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04359	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04360	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04361	A2	56,4	SNP
BARC-013587-01167	A2	56,6	SNP
BARC-013587-01169	A2	56,6	SNP
BARC-013587-01170	A2	56,6	SNP
BARC-029671-06301	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06302	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06303	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06304	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06305	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06306	A2	56,7	SNP

BARC-029671-06307	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06308	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06309	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06310	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06311	A2	56,7	SNP
BARC-039393-07313	A2	56,7	SNP
BARC-027614-06615	A2	56,9	SNP
BARC-027614-06616	A2	56,9	SNP
BARC-027614-06617	A2	56,9	SNP
BARC-027614-06618	A2	56,9	SNP
BARC-027614-06619	A2	56,9	SNP
BARC-016661-02162	A2	57,2	SNP
BARC-016661-02163	A2	57,2	SNP
BARC-044327-08668	A2	58,2	SNP
BARC-044869-08827	A2	58,9	SNP
BARC-044869-08828	A2	58,9	SNP
BARC-018941-03041	A2	59,3	SNP
BARC-018941-03042	A2	59,3	SNP
BARC-030759-06940	A2	60,1	SNP
BARC-030759-06941	A2	60,1	SNP
BARC-030759-06942	A2	60,1	SNP
BARC-014665-01611	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01612	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01613	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01614	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01615	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01616	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01617	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01618	A2	61,1	SNP
BARC-029865-06449	A2	61,5	SNP
BARC-044217-08646	A2	61,9	SNP
BARC-013567-01162	A2	62,2	SNP
BARC-013567-01163	A2	62,2	SNP

Пример 5. Использование события SYHT0H2 сайт встраивания для направленной интеграции в сое.

Фланкирующие последовательности события SYHT0H2, раскрытые в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, используют для поиска в базах данных генома сои. Идентичные совпадения с обеими фланкирующими последовательностями идентифицируют на ВАС-клоне и идентифицируют молекулярные маркеры по месту нахождения. Дополнительные маркеры разрабатывают и используют для тонкого картирования сайта встраивания.

Однородные агрономические свойства трансгена события SYHT0H2 в нескольких поколениях в полевых условиях, сайт интеграции события SYHT0H2 обеспечивают используемый геномный локус для интеграции целевых трансгенов, кроме мутантного фермента HPPD события SYHT0H2. Такая целевая интеграция преодолевает проблемы с так называемыми "эффектами положения" и риском возникновения мутации в геноме в случае интеграции трансгена в хозяина. Дополнительные преимущества такой направленной интеграции включают, но не ограничиваются ими, сокращение ряда трансформационных событий, которые должны быть проверены и испытаны до получения трансгенного растения, которое проявляет желаемый уровень экспрессии трансгена, не обнаруживая в то же время нарушений в результате случайной вставки трансгена в важный локус в геноме хозяина. Кроме того, такая направленная интеграция делает возможным разведение элитных линий растения с обоими генами более эффективным.

С помощью описанной выше идеи специалист может использовать способы, известные в области техники, для направления трансгенов к тому же сайту встраивания, что и в SYHT0H2 или к сайту в непосредственной близости от сайта встраивания в SYHT0H2. Один такой способ описан в опубликованной патентной заявке США № 20060253918, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Коротко, до 20 т.п.н. геномной последовательности, фланкирующей 5' к сайту встраивания (например, SEQ ID NO: 7, геномные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 7, и геномные последовательности, гомологичные SEQ ID NO: 7), и до 20 т.п.н. геномной последовательности, фланкирующей 3' к сайту встраивания (например, SEQ ID NO: 8, геномные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 8, и геномные последовательности, гомологичные SEQ ID NO: 8), используют для фланкирования целевого гена или генов, которые предназначают для вставки путем гомологичной рекомбинации, сайт интеграции которых находится у сайта события SYHT0H2 или вблизи него. Данные последовательности можно дополнительно фланкировать путем повторов границы Т-ДНК, как, например, повторов последовательностей левой границы (LB) и правой границы (RB) и других усиливающих последовательностей для повышения эффективности доставки Т-ДНК. Целевой ген или гены могут быть размещены именно так, как в сайте встраивания SYHT0H2, или могут быть размещены в любом месте в пределах

20 т.п.н. участков вблизи сайтов встраивания SYHT0H2, чтобы обеспечить постоянный уровень экспрессии трансгенов без вредного воздействия на растения. ДНК-векторы, содержащие целевой ген или гены, и фланкирующие последовательности могут быть доставлены в клетки растений с помощью одного из нескольких способов, известных специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ею, опосредованную агробактериями трансформацию. Вставку ДНК вектора в целевой сайт SYHT0H2 можно дополнительно усилить одним из нескольких способов, включая, но не ограничиваясь ими, ко-экспрессию или повышение экспрессии усиливающих рекомбинацию генов или снижение экспрессии эндогенных генов подавления рекомбинации. Более того, в данной области техники известно, что расщепление специфических последовательностей в геноме можно использовать для увеличения частоты гомологичной рекомбинации, поэтому вставка в сайт встраивания SYHT0H2 и ее фланкирующие участки могут быть усилены путем экспрессии природных или искусственно созданных распознающих последовательностей эндонуклеаз для расщепления этих последовательностей.

Пример 7. Использование сайта встраивания события SYHT0H2 и фланкирующей последовательности для стабилизации экспрессии генов.

Геномные последовательности, фланкирующие сайт встраивания SYHT0H2, также могут быть использованы для стабилизации экспрессии другого целевого гена(ов) в случае вставки в качестве трансгена в геномные локализации в сое, за исключением сайта интеграции в SYHT0H2, а также в другие сельскохозяйственные культуры. В частности, до 20 т.п.н. геномной последовательности, фланкирующей 5' к сайту встраивания (например, SEQ ID NO: 7, геномные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 7, а также геномные последовательности, гомологичные SEQ ID NO: 7), и до 20 т.п.н. геномной последовательности, фланкирующей 3' к сайту встраивания (например, SEQ ID NO: 8, геномные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 8, и геномные последовательности, гомологичные SEQ ID NO: 8), используют для фланкирования целевого гена или генов, что которые предназначают для вставки в геном растений. Данные последовательности можно дополнительно фланкировать путем повторов границы Т-ДНК, как, например, повторов последовательностей левой границы (LB) и правой границы (RB) и других усиливающих последовательностей для повышения эффективности доставки Т-ДНК.

Целевой ген или гены могут быть размещены именно так, как в сайте встраивания SYHT0H2, или могут быть размещены в любом месте в пределах 20 т.п.н. участков вблизи сайтов встраивания SYHT0H2, чтобы обеспечить постоянный уровень экспрессии трансгенов без вредного воздействия на растения. ДНК-векторы, содержащие целевой ген или гены и фланкирующую последовательность сайта встраивания SYHT0H2, могут быть доставлены в клетки растений с помощью одного из нескольких способов, известных специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, трансформацию протопластов, баллистическую бомбардировку и опосредованную агробактериями трансформацию. Доставленная ДНК может быть интегрирована случайно в геном растения или может также присутствовать как часть независимо расщепленных генетических единиц, таких как искусственные хромосомы или мини-хромосомы. ДНК-векторы, содержащие целевой ген(ы) с геномной последовательностью, фланкирующей сайт встраивания SYHT0H2, могут быть доставлены в клетки растений. Таким образом, окружая целевой ген или гены геномной последовательностью, фланкирующей сайт встраивания SYHT0H2, экспрессию таких генов стабилизируют в трансгенном растении-хозяине, включая как однодольные, так и двудольные растения.

Перечень последовательностей

<110> Зингента Партиципейшнс АГ

<120> НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОБЫТИЯ СЫНТОН2 В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБРАЗЦЕ (ВАРИАНТЫ)

<130> 72722WOPST

<150> US61/423131
<150> US61/467621

<160> 28

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 1
accatcacag aattgacgct 20

<210> 2
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 2
taaaccstaa accaatggca 20

<210> 3
<211> 40
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 3
agatgagaga accatcacag aattgacgct tagacaact 40

<210> 4
<211> 40
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 4
ttaagttgtc taaaccstaa accaatggca cacaaaaatt 40

<210> 5
<211> 60
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 5
taggatgaag agatgagaga accatcacag aattgacgct tagacaact aataacacat 60

<210> 6
<211> 60
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 6
caatgtgtta ttaagttgtc taaaccstaa accaatggca cacaaaaatt occatcctag 60

<210> 7
<211> 99
<212> ДНК
<213> Glycine max

<400> 7
 acatatacta cataagaagg aggtggagaa agtgtatgta accgacaaca aaaaactaat 60
 aggaatataat aggatgaaga gatgagagaa coactcacag 99

<210> 8
 <211> 462
 <212> ДНК
 <213> Glycine max

<400> 8
 accaatggca cacaaaaatt cccatcctag tttttggagt aattaatgaa ctagcaalta 60
 tataataagc tctgtatctg ttatattctg cattaatttt gttgaataaa aaacactgta 120
 aattaattgg tcatgtgta tattttgcac actaattttt tttttaaaaa aggtgggaga 180
 gcgatgatt tttagtgtc cagaaaataa agattgaaaa atttgaatgt atttgcaacg 240
 tgggatactt taaaaattag aaggcaacct attgtttact tccatcggag aaaaaataa 300
 aatccttta tatgttaatt tatttcaatt tgtatgctg tagtaggaat attaaagtag 360
 acatttata ttaactcact tattagtctt tccctttgta gaatctcgtt aattttatta 420
 actaactttt aaataactct cttaggaat gaacaaaata at 462

<210> 9
 <211> 7914
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность Avena sativa, оптимизированная для экспрессии в Glycine max

<400> 9
 aattgacgct tagacaactt aatacacat tgcggatag gccatgtgg ccgcccgggc 60
 atggtagcca attcccagtc tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag 120
 tttgcgcgct atattttggt ttctatcgcg tattaatgt ataattgcgg gactctaate 180
 ataaaaacc atctcaaaa taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg 240
 taattcaaca gaaattatat gataatcacc gcaagaccgg caacaggatt caactttaag 300
 aaactttatt gccaaatggt tgaacgatcg gggaaattcg gggatctaga gctcactca 360
 tatctgggta actggcctaa ctggccttgg aggagctggc aactcaaaat ccccttgcca 420
 aaaaccaaca tcatgccatc cccatgctt gtatccagct gcgcgcaatg taccccgggc 480
 tgtgtatccc aaagcctcat gcaacctaac agatggatcg tttggaaagg ctataacagc 540
 aaccacagac ttaaacctt gcgcctccat agacttaagc aaatgtgtgt acaatgtaga 600
 tctaggccc aacctttgat gcctatgtga cactaaaca gtaactcaca ctgtccaate 660
 gtaagcgttc ctagccttc agggcccagc gtaagcaata ccagccacaa caccctcaac 720
 ctacagcaacc aaccaagggt atctatcttg caacctctct agatcatcaa tccactcttg 780
 tgggtttgt ggctctgccc taaagttcac tgtagacgtc tcaatgtaat ggttaacgat 840
 atcacaacc gcggccatat cagctgctgt agctggccta atctcaactg gtctctctc 900
 cgggacatg gtgggacct gtaattgtaa atagtaattg taatgttgtt tgtgtttgt 960
 tgtgtttgtt aattgttga aaaaactcgc agggtttatg tttttacaaa cgactccaac 1020
 aaagtatcaa gttttatca aacagaatga tacagattta aatatcgggt tttatacaaa 1080
 ccatatgata tttatcaatt cagtgatcct atacggacgg tggagacaaa aatcatcaag 1140
 aatcatcttt gagatgagaa agcttagctc ttacctgttt tctcgtctt ggcctttctt 1200
 ctctctggcc acctgctga atactctgcc gecttgacta ctctaggett acttctctc 1260
 tttctctctc taggactate tctctgagat tttctcct taacaatgag ggaggggcta 1320
 agtatttata gactgacggg tgagtggaca ttcccacaa tactctact tatttctgaa 1380
 gccctaacgt cattgtcca ttattggagt ctgaagatgc ctccacatgg tggaccccca 1440
 cctgtcggcc acgaaactta ttgttctgc agaaaaagcc aaaccgactg cacagttttt 1500
 coactcgtgt agggaccact ttggtattga ttaaggcag ccgacctaac ctttgcaga 1560
 cgcattatct cagcgttttt cttttacaga ttccatcttc atttgggga cagtatgct 1620
 gccactttgt ctgcccagtaa ttaaacggcg tccggatcta gtaacataga tgacacggcg 1680

032683

cgcgataatt tatocctagtt tgcgcgctat attttgtttt ctatcgcgta ttaaatgtat 1740
 aattggggga ctctaatacat aaaaacccat ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta 1800
 attattacat gcttaacgta attcaacaga aattatatga taatcatcgc aagacggca 1860
 acaggattca atcttaagaa actttattgc caaatgtttg aacgatctgc aggtcgaccc 1920
 atggcgccga tatcactagt tcagatctgg gtaactggcc taactggcct tggaggagct 1980
 ggcaactcaa aatccctttg ccaaaaacca acatcatgcc atccaccatg cttgtatcca 2040
 gctgcgcgca atgtaccocg ggctgtgtat cccaaagcct catgcaacct aacagatgga 2100
 tegtgttgaa ggccctataac agcaaccaca gacttaaaac cttgcgcctc catagactta 2160
 agcaaatgtg tgtacaatgt ggatcctagg ccaaaccttt gatgcctatg tgacacgtaa 2220
 acagtactct caactgtcca atcgttaagcg ttoctagcct tccaggggccc agcgttaagca 2280
 ataccagcca caaacccctc aacctcagca accaaccaag ggtatctatc ttgcaacctc 2340
 tctagatcat caatccactc ttgtggtgtt tgtggctctg tctaaagt cactgtagac 2400
 gtctcaatgt aatggttaac gatatacaa accgcggcca tatcagctgc tgtagctggc 2460
 ctaatctcaa ctggtctcct ctccggagac atgggtgact agtgatttca gogtgcctc 2520
 tccaaatgaa atgaacttcc ttatatagag gaagggtcct gcgaaggata gtgggattgt 2580
 gogtcatccc ttacgtcagt ggagatatca catcaatcca cttgctttga agaactgggt 2640
 ggaactcctt cttttccac gatgctcctc gtgggtgggg gtccatcttt gggaccactg 2700
 toggcagagc catctcaac gatggccttt ctttatcgc aatgatgcca tttgtaggag 2760
 ccaacttctt ttccaactat ctcacaata aagtgcagca tagctgggca atggaacct 2820
 tctgtctgca catggacttg ctgacagtc tgttggagct taatcccg aaacctcctc 2880
 ggattocatt gccacgctat ctgcaactt attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc 2940
 tectacaat gccatcattg cgataaagga aagctatcg ttgaagatgc ctctgcgac 3000
 agtggccca aagatggacc cccaccacg aggagcatcg tggaaaaaga agactgtcca 3060
 accacgtcct caaagcaagt ggattgatg gatatacca ctgacgtaag ggatgacgaa 3120
 caatcccact atcctctgc aggtcgactc tagaggatcc tataaatagg aagttoattt 3180
 catttgaga ggaacctcg agtatctta caacaattac caacaacaac aaacaacaaa 3240
 caacattaca attactattt acaattacac atatgcctcc aacaccagct actgctactg 3300
 gagctgtgc tgcctgocgtt acaccagaac atgctgcaag gtcattccct agagtgttc 3360
 gcgttaacc taggtctgac agatccctg ttctgtcctt ccatcatgtg gagcttgggt 3420
 gtgctgatgc agctagtgtc gctggtcgtt tcaactttgc aettggagca ccaactgtg 3480
 caagatctga tctgtctaca ggaactcag cacatgcttc tctcctactt cगतctggag 3540
 cattagcctt cctttttacc gctccttatg ctccacctcc acaagaagct gcaactgctg 3600
 caactgttc cattccctcc tttcagcag atgctgcaag aacctttgct gctgcacatg 3660
 gactgtgtg cagatctgtt ggagttagg ttgctgatgc agctgaagca tttcogtta 3720
 gtgttctgg aggagcaaga cctgctttg ctccagcaga tcttggctac ggatttggac 3780
 ttgctgaagt ggaactgtat ggagatggtg ttctgagatt cgtgagctat cctgaogaaa 3840
 ctgacctacc atttctcca ggattcgaga ggtttcaag tccaggtgca gttgactacg 3900
 gtttgactcg ctttgaccac gttgtggaa acyttccaga aatggctcct gtcacogact 3960
 acatgaaggg attccttggg ttccacgagt tgcctgaatt cacagcagag gatgttgaa 4020
 ccacagaatc tggactgaac agtgtggttc tagccaaca cagtgaagct gttctctgc 4080
 cattgaacga gctgttcat ggaaccaaga gacgatctca gatccaaacc tacctogaat 4140
 accatggtg accagaggtt caacacatcg cattggcttc taacgatgtg ctccgaactc 4200
 tcagggaat gagagccaga actccaatgg gaggttcca atttatggt cctccacaag 4260
 ccaagtacta tgaaggagtc cgtagaatcg ctggagatgt cttgtcagag gaacagatca 4320
 aggagtgtca agaactgggt gttctcgttg atcgagacga tcaaggtgtg ctactccaga 4380
 tcttcaccaa accagttggg gatcgtccca ctttttctc cgaatgatt cagcgaatag 4440
 gatcagatgga gaaggatgaa gttgggcaag agtaccagaa aggtggatgt ggtgggtttg 4500

032683

gaaaggggaa cttttccgag ttgttcaagt ccatagagga ctacgagaag tcaactggaag 4560
 tcaagcagtc tgtcgttgct cagaagagct aagagctctt catatgacga tcgttcaaac 4620
 atttgcaat aaagtctctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata 4680
 taattctgt tgaattaogt taagcatgta ataattaaca tgaatgcat gacgtatttt 4740
 atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca ttttaacgc gatagaaaac 4800
 aaaatatagc gcgcaacta ggataaatta tcgcgcgccc tgcctctat gttactagat 4860
 cgcggaccga gtcaaaagatt caaatagagc acctaacaga actcgcctga aagactggcg 4920
 aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc gtcaacatgg 4980
 tggagcacga cacgcttgtc tactccaaaa atatcaaga tacagtctca gaagacccaa 5040
 gggcaattga gacttttcaa caaagatgac ttttcaaca agggtaatat ccggaacct 5100
 cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg 5160
 tggctctac aaatgccatc attgcgataa aggaaggccc atcgttgaag atgcctctgc 5220
 cgacagtggc ocaaaagatg gacccccacc caccgaggagc atcgttgaaa aagaagacgt 5280
 tocaaacocg tottcaaacg aagtgagtg atgtgatatc tccactgaog taagggatga 5340
 cgcacaatcc cactatcctt cgcgaagacc ttctctata taaggagtt catttcattt 5400
 ggagaggaca cgtgaaatc actagtccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat 5460
 taggccagct acagcagctg atatggcccg ggtttgtgat atcgttaacc attacattga 5520
 gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtga ttgatgatct 5580
 agagaggttg caagatagat acccttggtt ggttgcgtgag gttgagggtg ttgtggctgg 5640
 tattgcttac gctgggcoct ggaaggctag gaaogcttac gattggacag ttgagagtac 5700
 tgtttacgtg tcaatagagc atcaaaagtt gggcctagga tccacattgt acacacattt 5760
 gottaaactc atggaggcgc aaggttttaa gtctgtggtt gctgttatag gocttccaaa 5820
 cgtaccatct gttagttgac atgaggcttt gggatacaca gccoggggta cattgocgoc 5880
 agctggatac aagcatggtg gatgcatga tgttggtttt tggcaagggt atttgagtt 5940
 gccagctcct ocaaggocag ttaggcocag taccagatc tgaactagt atatcggcgc 6000
 catgggtcga cctgcagatc gtccaacat ttggcaataa agttcttaa gattgatcc 6060
 tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgta agcatgtaat 6120
 aattaacatg taatgcatga cgttattat gagatgggtt tttatgatta gactccgca 6180
 attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaacctagg ataaattatc 6240
 gcgcgoggtg tcatctatgt tactagatcc ggaccgctt taattactgg cagacaaagt 6300
 ggcagacata ctgtcccaca aatgaagatg gaatctgtaa aagaaaacgc gtgaataat 6360
 gcgtctgaca aaggttaggt cggctgcctt taatcaatac caaagtggc cctaccacga 6420
 tggaaaaact gtgcagtcgg tttggctttt tctgaogaac aaataagatt cgtggcgcac 6480
 aggtgggggt ccaccatgtg aaggcatctt cagactccaa taatggagca atgacgtaag 6540
 ggcttacgaa ataagtaagg gtatgttggg aaatgtccac tcaccogtca gctataaat 6600
 acttagcccc tccctcattg ttaagggagc aaaatctcag agagatagtc ctagagagag 6660
 aaagagagca agtagcctag aagtagtcaa ggcggcgaag tattcaggca ggtggccag 6720
 aagaagaaaa gccaaagcga cgaaaacagc taagagctaa gotttctcat ctcaaaagtg 6780
 attcttgatg atttttgtct ccaccgtccg tataggatca ctgaattgat aaatcata 6840
 tggtttgat aaaaaccgat atttaaatct gtatcattct gtttgaataa aacttgatc 6900
 tttgttgag tcgtttgtaa aaacataaac cctcagatct ttttcaaca attaccaaca 6960
 acaacaaca acaacaaca ttacaattac tatttacaat tacaggatcc caccatgtct 7020
 ccggagagga gaccagttga gattaggcca gctacagcag ctgatatggc ogogttttgt 7080
 gatatacgtta accattacat tgagagctct acagtgaaact ttaggacaga gccacaaca 7140
 ccacaagatg ggattgatga tctagagagg ttgcaagata gatacccttg gttggttgc 7200
 gaggttgagg gtgttgggc tggattgct tacgtgggc cctggaagc taggaacgct 7260
 tacgattgga cagttgagag tactgtttac gtgtcacata ggcatacaag gttgggccta 7320

032683

```

ggatctacat tgtaacacaca ttgcttaag tctatggagg cgcaagggtt taagtctgtg 7380
gttgctgtta taggccttcc aaacgatcca tctgttaggt tgcatgaggc ttggggatac 7440
acagcccggg gtacattgoc cgcagctgga tacaagcatg gtggatggca tgatgttgg 7500
tttggcaaa gggattttga gttgccagct cctccaaggc cagtttagcc agttaccag 7560
atatgagtcg agctctagat cccccaattt ccccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag 7620
tttctaaga ttgaatcctg ttgccgtctc tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa 7680
ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt 7740
tatgattaga gtcccogcaat tatacattta atacgcgata gaaaaaaaaa tatagcgcgc 7800
aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc atctatgta ctagatcggg aattgggtac 7860
catgcccggg cggccagcat gcccgatccc gcaatgtgtt attaagtgtg ctaa 7914

```

```

<210> 10
<211> 9206
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

```

```

<220>
<221> иной_признак
<222> (1)..(821)
<223> геномный участок, называемый LB2

```

```

<220>
<221> иной_признак
<222> (822)..(8735)
<223> гетерологичная вставленная ДНК

```

```

<220>
<221> иной_признак
<222> (8736)..(9206)
<223> геномная фланкирующая последовательность, называемая LB1

```

```

<400> 10
tgatcttaaa aattcaaatg ccacctaatt tgacaaggaa agcaccaggt agcgtttcat 60
ctaatgtttt ctccatatag ttgactattt acccaagttc atgacgatgt caacaatgca 120
agttgtacga ctaaacttct tccttctgca ataaaatgcc atctattact gtcacaaagg 180
aagtgtttta ctgtcttata agttagtgtt attacataag ttttatttag taaacagcgt 240
tattaattta ttgcatatta ttagggtgtc caaaatagaa tagaggatcc agagtattct 300
aataatttct tatatgaatg ggtctagatt taacaaaaat gaatcaaaat catttatgta 360
tgattattct actttatata tataggaaa cttaaaaggt tattttttta ttattatgat 420
attgatatag aatatttato aatttttttg aaaattattt ttgatataa aatcgtattg 480
accattttta ataaaatttt tccttacaat gacgtttttt tatatacaag atgaatttaa 540
aattttaatt atggggatcg aatttaata togattaatg acttaatgat actctaagct 600
aatttagttt tacataattg agaatgagc accaacatc ttgtggtaat attaaatttt 660
ctgttgactt ttttttacct aaatgatact tgattagaag atgactaata aatgaaggct 720
ttacatatac tacataagaa ggaggtggag aaagtgtatg taaccgaca caaaaaacta 780
ataggaatat ataggatgaa gagatgagag aaccatcaca gaattgacgc ttagacaact 840
taataacaca ttgoggatac gcccatgctg gcccccggg catggtacc c aattcccgat 900
ctaagtaacat agatgacacc gcgcgcgata atttacctta gtttgcgcgc tatattttgt 960
ttctatcgcg gtattaaatg tataattgoc ggactctaata cataaaaaacc catctcataa 1020
ataacgtcat gcattacatg ttaattatta catgcttaac gtaattcaac agaaattata 1080
tgataatcat cgcagacccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt 1140
ttgaacgacg ggggaaattc ggggatctag agctcgactc atatctgggt aactggccta 1200
actggccttg gaggagctgg caactcaaaa tccctttgcc aaaaocaaac atcagccat 1260
ccaccatgct tgtatccagc tgcgcgcaat gtaccocggg ctgtgtatcc caaagcctca 1320
tgcaacctaa cagatggatc gtttggaaag cctataacag caaccacaga cttaaaacct 1380
tgcgcctcca tagacttaag caaatgtgtg tacaatgtag atcctaggcc caacctttga 1440

```

tgcctatgtg acacgtaaac agtactctca actgtccaat cgtaagcgtt cctagocctc	1500
cagggcccag cgtaagcaat accagccaca acacctcaa cctcagcaac caaccaaggg	1560
tatctatctt gcaacctctc tagatcatca atccactctt gtgggtgttg ttgctctgtc	1620
ctaaagtca ctgtagacgt ctcaatgtaa tggttaacga tatcacaac cggggccata	1680
tcagctgctg tagctggcct aatctcaact ggtctcctct cgggagacat ggtgggatcc	1740
tgtaattgta aatagtaatt gtaatgttg ttgtgtttg ttgtgtttg taattgtgt	1800
aaaaactc gagggtttat gttttacaa acgactccaa caaagtatca agttttatc	1860
aaacagaatg atacagattt aaatatcggg tttatataca accatgatgat atttatcaat	1920
tcagtgatcc tataccgacg gtggagacaa aaatcatcaa gaatcatctt tgagatgaga	1980
aagcttagct cttacctgtt ttctgctct ttgctttct tcttctctg cactgctg	2040
aatactctgc cgccttgact acttctaggc tacttctct ctttctctct cttagactat	2100
ctctctgaga ttttctccc ttaacaatga gggaggggct aagtatttat agactgacgg	2160
gtgagtggac atttccaaa ctaccttac ttatttctga agcccttacg tcattgtctc	2220
attattggag tctgaagatg ccttcacatg gtggaccccc acctgtctgc caggaatctt	2280
atttgttctg cagaaaaagc caaacccact gcaagctttt tccatctgtg tagggaccac	2340
tttggattg attaaagca gccgacctaa cctttgtcag acgattattt tcacgcttt	2400
tcttttacag attccactt catttgggg acagtatgtc tgccactttg tctgccaata	2460
attaaacgcg gtcogtatct agtaacatag atgacaocgc gcgcgataat ttatcctagt	2520
ttgcgcgcta tattttgtt tctatcgcgt attaaatgta taattggcgg actcctaaca	2580
taaaaacca tctcataaat aacgtcatgc attacatgtt aattattaca tgcttaacgt	2640
aattcaacag aaattatag ataactcog caagaccggc aacaggattc aatcttaaga	2700
aactttattg ccaaatgtt gaacgatctg caggtcgacc catggcgccg atatcactag	2760
ttcagatctg ggttaactgc ctaactggcc ttggaggagc tggcaactca aatcccttt	2820
gccaaaaacc aacatcatgc catccaccat gcttctatcc agctgcgcgc aatgtacccc	2880
ggcgtgtgta tccccaaagc tcatgcaacc taacagatgg atcgtttgga aggcctataa	2940
cagcaaccac agacttaaaa ccttgcgcct ccatagactt aagcaaatgt gtgtacaatg	3000
tggatcctag gcccaacctt tgatgcctat gtgacacgta aacagtactc tcaactgtcc	3060
aatcgttaagc gttcctagcc ttccaggccc cagcgttaagc aataccagcc acaacacct	3120
caacctcage aaccaaccaa gggatctctat cttgcaacct ctctagatca tcaatccact	3180
cttgtgggtg ttgtggctct gtctaaagt tcaactgtaga cgtctcaatg taatgggttaa	3240
cgatcacaca aaccgcggcc atatcagctg ctgtagctgg cetaactca actggtctcc	3300
tctccggaga catgggtgac tagtgatttc agcgtgtcct ctccaaatga aatgaacttc	3360
cttatataga ggaagggtct tgcgaaggat agtgggattg tgcgtcatcc cttacgtcag	3420
tggagatc acatcaatcc acttgccttg aagacgtggt tggaaactct tctttttcca	3480
cgatgctct cgtgggtggg ggtccactt ttggaccact gtcggcagag gcatcttcaa	3540
cgatggcctt tcccttatcg caatgatggc attttagga gccaccttcc ttttccacta	3600
tcttcaaat aaagtgcagc atagctgggc aatggaacct ttgctgctgc acatggactt	3660
gctgtcagat ctgttggagc ttaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcocageta	3720
tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt	3780
gcgataaagg aaaggctatc gttgaagatg cctctgcoga cagtgttccc aaagatggac	3840
ccccaccac gagggcctc gtggaaaaag aagacgttcc aaccactct tcaaagcaag	3900
tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa gggatgacga acaatccacc tatcctctg	3960
caggtcgact ctagaggatc ctataaatag gaagttcatt tcatttggag aggaaacctc	4020
gagtattttt acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattactatt	4080
tacaattaca catatgcctc caacaccagc tactgtact ggagctgctg ctgctgccgt	4140
tacaocagaa catgctgcaa ggtcattccc tagagttgtt cgcgttaacc ctaggctctga	4200
cagatccctt gttctgctct tccatcatgt ggagctttgg tgtgctgatg cagctagtgc	4260

tgtgtgctgt ttcagctttg cacttgagc accacttgct gcaagatctg atctgtctac	4320
agggaactca gcaatgctt ctctctact togatctgga geattagcct tcctttttac	4380
cgctccttat gctocacctc cacaagaagc tgcaactgct gcaactgctt ccattcoctc	4440
cttttcaaga gatgctgcaa gaacctttgc tgctgcacat ggacttgctg tcagatctgt	4500
tggagttagg gttgctgatg cagctgaagc atttcgctt agtggtgctg gaggaagcaag	4560
acctgctttt gctocagcag atcttggtca cggatttga cttgctgaag tggagotgta	4620
tggagatgtg gttctgagat tcgtgagcta tcctgacgaa actgacctac catttctccc	4680
aggattcgag agggtttcaa gtccaggtgc agttgactac ggtttgactc gotttgacca	4740
cgttgttga aacgttccag aatggctcc tgctatogac tacatgaagc gattccttgg	4800
tttccacgag ttogctgaat tcacagcaga ggatggttga accacagaat ctggaactgaa	4860
cagttggtt ctagccaaca acagtgaagc tgttctctg ccattgaacg agcctgttca	4920
tggaaccaag agacgatctc agatccaaac ctacctgaa taccatggtg gaaccaggagt	4980
tcaacacatc gcattggctt ctaacgatgt gcttcgaaact ctcagggaaa tgagagccaag	5040
aactccaatg ggagggttcg aatttatggc tctccacaa gccaaagtact atgaaggagt	5100
ccgtagaatc gctggagatg tcttgcaga ggaacagatc aaggagtgc aagaactggg	5160
tgttctgctt gatcgagacg atcaaggtgt gctactccag atcttcacca aaccaagtgg	5220
tgatcgtccc acttttttcc tcgaaatgat tcagcgaata ggatgcatgg agaaggatga	5280
agttgggcaa gagtaccaga aaggtgatg tggtgggttt ggaaggggga acttttccga	5340
gttgttcaag tccatagagg actacgagaa gtcactggaa gtcaagcagt ctgtcgttgc	5400
tcagaagacg taagagctct tcatatgacg atcgttcaaa catttggcaa taaagttct	5460
taagattgaa toctgttgcc ggtcttgoga tgattatcat ataattctg ttgaattaag	5520
ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gttttatga	5580
ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cगतगगगगग caaaatatag cgcgcacaaact	5640
aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgcgggacc agtcaaaagt	5700
tcaaatagag gaactaacag aactcgcctt aaagactggc gaacagttca tacagagtct	5760
cttacgactc aatgacaaga agaaaacttt cgtcaacatg gtggagcagc acacgctgt	5820
ctactocaaa aatatcaaa atacagctctc agaagacca agggcaattg agacttttca	5880
acaaagatga cttttcaaca aaggtaata tccgaaacc tctcggatt ccattgccc	5940
gctatctgtc actttattgt gaagatagt gaaaaggaag gtggtccta caaatgccat	6000
cattgcgata aaggaaggc catcgttga gatgctctg ccgacagtgg tcccaagat	6060
ggacccccac ccacgaggag catcgtgaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag	6120
caagtggtt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaate ccaatctct	6180
tcgcaagacc ctctctctat ataaggaagt tcaattcatt tggagaggac acgctgaaat	6240
cactagtoca ccattgtctc ggagaggaga ccagttgaga ttaggcacagc tacagcagct	6300
gatatggccg cggtttgtga tatcgttaac cattacattg agacgtctac agtgaacttt	6360
aggacagagc caacaacacc acaagagtgg attgatgac tagagaggtt gcaagataga	6420
taaccttggc tggttgctga gttgagggc gttgtgctg gtattgctta cgotgggccc	6480
tggaaaggct ggaacgctta cgattggaca gttgagagta ctgtttacgt gtcacatagg	6540
catcaaaagt tggccttagg atccacattg tacacacatt tgcttaagtc tatggaggcg	6600
caaggtttta agtctgtggt tgctgttata ggcttccaa acgatccatc tgttaggttg	6660
catgaggctt tgggatacac agccccgggt acattgogcg cagctggata caagcatggt	6720
ggatggcatg atgttggttt ttggcaaaag gattttgagt tgccagctcc tcaaggcca	6780
gttaggcacg ttaccocagat ctgaactagt gatatcggcg ccatgggtcg acctgcagat	6840
cgttcaaaaca tttggaata aagtttctta agattgaatc ctggtgcggy tottgogatg	6900
attatcatat aatttctggt gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg	6960
acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg	7020
atagaaaaca aaatatagcg cgcacaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcactatg	7080

032683

ttactagatc cggaccgct ttaattactg gcagacaaag tggcagacat actgtcccac 7140
aatgaagat ggaatctgta aaagaaaacg cgtgaataa tgcgtctgac aaaggttagg 7200
tcggctgcct ttaatcaata ccaaagtggc coctaccacg atggaaaaac tgtgcagtcg 7260
gtttggcttt ttctgacgaa caaataagat tcgtggccga caggtggggg tccaccatgt 7320
gaaggcatct tcagactcca ataatggagc aatgacgtaa gggcttacga aataagtaag 7380
ggtagtttgg gaaatgtcca ctaccocgtc agtctataaa tacttagccc ctccctcatt 7440
gttaagggag caaaatctca gagagatagt cctagagaga gaaagagagc aagtagccta 7500
gaagtagtca aggcggcgaa gtattcaggc aggtggccag gaagaagaaa agccaagacg 7560
acgaaaacag gtaagagcta agctttctca tctcaaatg gattcttgat gattttttgc 7620
tccaccgtcc gtataggatc actgaattga taaatcatat atggttttga taaaaccgca 7680
tatttaaatc tgtatcattc tgtttgaata aaacttgata ctttggttga gtogtttga 7740
aaaaataaaa coctcgagta tttttacaac aattaccaac aacaacaac acaaaaacac 7800
attacaatta ctatttaca ttacaggatc coaccatgtc tccggagagc agaccagttg 7860
agatttaggc agctacagca gctgatatgg ccgcggtttg tgatcgtt aaccattaca 7920
ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaac accacaagag tggattgatg 7980
atctagagag gttgcaagat agataccott ggttggttgc tgaggttgag ggtgtttgg 8040
ctggtattgc ttacgctggg coctggaagc ctaggaaagc ttacgattgg acagttgaga 8100
gtactgttta cgtgtcacat aggcataaaa ggttgggctt aggatctaca ttgtacacac 8160
atttgcttaa gtctatggag gcgcaaggtt ttaagtctgt ggttctgtt ataggccttc 8220
caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagc ctttgggata cacagcccgg ggtcattgc 8280
gcgcaagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttg tttttggcaa agggattttg 8340
agttgccaagc tctccaagc ccagttaggc cagttacca gatatgagtc gagctctaga 8400
tccccgaatt tccccgatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct 8460
gttgcggctc ttgogatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata 8520
attaacatgt aatgcatgac gttatttatg agatgggttt ttatgattag agtcccgcga 8580
ttatacattt aatagcagat agaaaaaaa atatagcgcg caaactagga taaattatcg 8640
cgcgcggtgt catctatgtt actagatcgg gaattgggta coctgcccgg gcgcccagca 8700
tggccgtatc cgcgatgtgt tattaagttg tctaaacct aaaccaatgg cacacaaaaa 8760
ttcccactct agtttttga gtaattaatg aactagcaat tatataataa gctctgtatc 8820
tgttatatc tgcattaatt ttgttgaata aaaaacactg taaattaatt ggtcatgtgt 8880
tatattttgc acactaattt ttttttaaaa aaaggtggga gagcgtgata tttttagttg 8940
tccagaaaaa aaagattgaa aaatttgaat gtatttggca cgtgggatac tttaaaaatt 9000
agaaggcacc ttattgttta cttcgatcgg agaaaaataa taaaatcctt tatatgtaa 9060
tttattcaa ttgtatgtc tgtagtagga atattaagt agacatttat cattaatctc 9120
attattagtc ttctctttg tagaatctcg ttaatttat taactaactt ttaataact 9180
ctctagagga atggaacaaa ataata 9206

<210> 11
<211> 14
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> PCR-праймер

<400> 11
cgggcggcca gcat 14

<210> 12
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> PCR-праймер

<400> 12
 gtgccattgg tttagggttt agac 24

<210> 13
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Зонд для анализа TAQMAN

<400> 13
 atccgcaatg tgttattaa 19

<210> 14
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PCR-праймер

<400> 14
 gccgtatccg caatgtgta 20

<210> 15
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PCR-праймер

<400> 15
 ggatgaagag atgagagaac catca 25

<210> 16
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Зонд для анализа TAQMAN
 <400> 16
 taagttgtct aaggtcaat t 21

<210> 17
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PCR-праймер

<400> 17
 caaggccagt taggscagtt a 21

<210> 18
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PCR-праймер

<400> 18
 attaacgaga ttctacaaaa ggaag 26

<210> 19
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PCR-праймер

<400> 19
 ggacaactaa aaatatcacg ctctccca 28

<210> 20
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PCR-праймер

<400> 20
actacataаg ааggaggtgg аgаааg 26

<210> 21
<211> 29
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> PCR-праймер

<400> 21
gaggtggаgа ааgtgtatgt аассgасаа 29

<210> 22
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> PCR-продукт, полученный из Glycine max и Avena sativa

<400> 22
сgggсggссa gсatggссgt atссgсаatg tgttattaаg ttgtсtаас сctaaассaa 60
tggсас 66

<210> 23
<211> 70
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> PCR-продукт, полученный из Glycine max и Avena sativa

<400> 23
ggatgааgаg atgаgаgаас саtсаsаgаа ttgасgеtta gасаасtтаа таасасатtg 60
сgаtасggс 70

<210> 24
<211> 217
<212> ДНК
<213> Glycine max

<400> 24
ttacatatac tacataаgаа ggaggtggag ааgtgtatg таассgасаа саааааааста 60
ataggаatаt ataggatgаа gаgatgаgаg аассатсаса gattggасgг tgggggассa 120
atggсасаса аааатtссса tсctagtттt tggagтаatt аatgаасtag саатtатата 180
ataagctctg tatctgttat атtctgcatt аатттtg 217

<210> 25
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> PCR-праймер

<400> 25
ttttgtggtc gtcactgogt t 21

<210> 26
<211> 40
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> PCR-праймер

<400> 26
саggататат tgtggtgтаа асааатtgас gcttagасаа 40

<210> 27
<211> 35
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> PCR-праймер

<400> 27

gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaa

35

<210> 28
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> PCR-праймер

<400> 28
 ggccagcatg googtatccg caatgtgtt

29

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Набор для идентификации области нуклеиновой кислоты, которая указывает на устойчивое к гербицидам трансгенное растение сои, содержащее последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в биологическом образце, включающий первый и второй праймеры, которые при использовании вместе образуют ампликон, содержащий SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 или комплементарные им последовательности.

2. Набор по п.1, который дополнительно включает зонд для обнаружения амплифицированного специфического участка SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 или комплементарных им последовательностей.

3. Набор по п.1 или 2, где

(а) первый праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и второй праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(б) первый праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, и второй праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15;

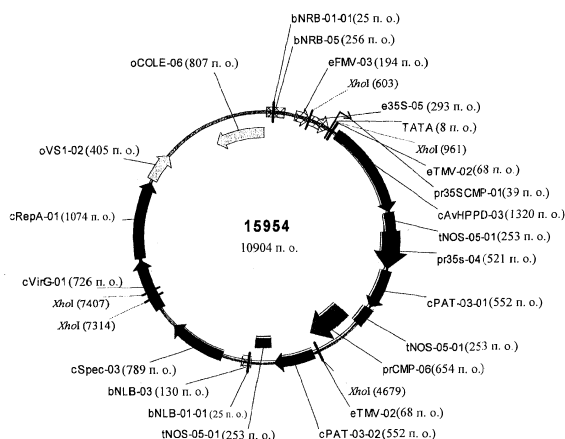
(с) первый праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18;

(d) первый праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19;

(е) первый праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; или

(f) первый праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21.

4. Набор для идентификации области нуклеиновой кислоты, которая указывает на устойчивое к гербицидам трансгенное растение сои, содержащее последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в биологическом образце, включающий по меньшей мере один зонд для нуклеиновой кислоты, который гибридизуется в жестких условиях с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 или комплементарными им последовательностями.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2