



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 113882

(13) C2

(51) МПК

A01N 39/04 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2015 00081</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Хоффман Томас (US), Цуй Юньсін (US), Оборн Малкольм (US), Паркхерст Дон М. (US), Уїгінз Баррі (US), Веркаутерен Майкл (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>07.06.2013</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ДАУ АГРОСАЕНСИЗ ЕлЕлСі, 9330 Zionsville Rd., Indianapolis, Indiana 46268, United States of America (US)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>27.03.2017</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/656,546</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2007/053482 A2, 10.05.2007 STREIBIG J C, "JOINT ACTION OF ROOT- ABSORBED MIXTURES OF AUXIN HERBICIDES IN SINAPIS-ALBA L. AND BARLEY HORDEUM-VULGARE L", WEED RESEARCH, (1987), vol. 27, no. 5, ISSN 0043-1737, pages 337 - 348 CN 100 556 896 C, 04.11.2009</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>07.06.2012</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>27.04.2015, Бюл.№ 8</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>27.03.2017, Бюл.№ 6</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2013/044717, 07.06.2013</b>		

**(54) СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ВРОЖАЙНОСТІ РЕЗИСТЕНТНИХ ДО 2,4-D СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР****(57) Реферат:**

Даний винахід стосується способів підвищення висоти рослин і/або врожайності сільськогосподарських культур, резистентних до гербіциду 2,4-D, за допомогою обробки 2,4-D при нормах внесення, що не є шкідливими для рослин. Зокрема, винахід стосується способу з використанням нанесення 2,4-D для підвищення врожайності сільськогосподарських культур, які експресують ген AAD-12 для резистентності до 2,4-D. Спосіб, що надається, представляє конкретний інтерес для обробки сільськогосподарських рослин, включаючи кукурудзу, сою, ріпак, з якого отримують олію, що використовується у весняний і зимовий сезон (канолу), цукровий буряк, пшеницю, соняшник, ячмінь і рис.

UA 113882 C2



# ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

По даній заявці заявляється пріоритет по попередній заявці США № 61/656546, зареєстрованій 7 червня 2012 року, опис якої, таким чином, явно включений як посилання в повному об'ємі.

## 5 ВКЛЮЧЕННЯ МАТЕРІАЛУ, ПОДАНОГО В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ, ЯК ПОСИЛАННЯ

Включеним в повному об'ємі як посилання є машиночитаний список послідовностей, який поданий одночасно із заявою і визначений таким чином: один файл розміром 11342 байт ASCII (текстовий) під назвою "72747\_ST25.txt", створений 13 травня 2013 року.

## ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

10 Бур'яни можуть швидко виснажувати вміст в ґрунті корисних поживних речовин, необхідних для сільськогосподарських культур і інших бажаних рослин. Існує велика кількість типів гербіцидів, що використовуються в цей час для контролю бур'янів. Одним з дуже популярних гербіцидів є гліфосат.

15 Розроблені сільськогосподарські культури, такі як кукурудза, соя, канولا, бавовна, цукровий буряк, пшениця, газонна трава і рис, резистентні до гліфосату. Таким чином, поля з активно зростаючою кукурудзою, резистентною до гліфосату, наприклад, можна обприскувати для контролю бур'янів без значного пошкодження рослин кукурудзи.

20 З впровадженням генетично сконструйованих, стійких до гліфосату сільськогосподарських культур (GTC) в середині 1990-х років сільгоспвиробники отримали простий, зручний, гнучкий і недорогий інструмент для контролю широкого спектра широколистяних і трав'янистих бур'янів, що не має аналогів в сільському господарстві. Таким чином, виробники швидко прийняли GTC і в багатьох випадках відмовилися від багатьох з кращих загальноприйнятих агрономічних прийомів, таких як сівозмін, сівозмін в комбінації з дією гербіцидів, використання бакової суміші, впровадження механічного контролю разом з хімічним і культуральним контролем бур'янів. У цей час толерантні до гліфосату соя, бавовна, кукурудза і канولا є комерційно доступними в США і в інших областях Західної півкулі. Все більше GTC (наприклад, пшениця, рис, цукровий буряк, газонна трава, і т. д.) готові для впровадження, очікуючи прийняття на глобальному ринку. Багато інших резистентних до гліфосату видів знаходяться в стадії від експерименту до розробки (наприклад, люцерна, цукрова тростина, соняшник, буряк, горох, морква, огірок, латук, цибуля, полуниця, помідор і тютюн; лісгосподарські види, такі як тополя і лівідамбар; і садівничі види, такі як чорнобривці, петунія і бегонія; див. "веб-сайт [isb.vt.edu/cfdocs/fieldtestsl.cfm](http://isb.vt.edu/cfdocs/fieldtestsl.cfm), 2005"). Крім того, вартість гліфосату за останні роки значно знизилася до такої точки, що декілька програм загальноприйнятого контролю бур'янів можуть ефективно конкурувати по ціні і дії з системами гліфосат-GTC.

35 Гліфосат успішно використовують для знищення бур'янів і в інших несільськогосподарських галузях для тотальної боротьби з бур'янами протягом більше 15 років. У багатьох випадках, як і з GTC, гліфосат використовують 1-3 разів на рік протягом 3, 5, 10, до 15 років підряд. Ці обставини привели до надмірного довіря до гліфосату і технології GTC і важкого тиску відбору відносно місцевих видів бур'янів на користь рослин, які є від природи більш стійкими до гліфосату або у яких розвинувся механізм резистентності до гербіцидної активності гліфосату.

40 Широке використання програм контролю бур'янів тільки за допомогою гліфосату приводить до селекції резистентних до гліфосату бур'янів і є селективним для розмноження видів бур'янів, від природи більш стійких до гліфосату, ніж більшість видів-мішеней (тобто зсуви в популяціях бур'янів). (Ng et al., 2003; Simarmata et al, 2003; Lorraine-Colwill et al, 2003; Sfiligoj, 2004; Miller et al, 2003; Heap, 2005; Murphy et al., 2002; Martin et al., 2002). Хоча гліфосат широко використовують по всьому світу протягом більше 15 років, повідомляють, що тільки у невеликої кількості бур'янів розвинулася резистентність до гліфосату (Heap, 2005); однак, більшість з них ідентифікували в останні 3-5 років. Резистентні бур'яни включають трав'янисті і широколистяні види - *Lolium rigidum*, *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis* і *Plantago lanceolata*. Крім того, бур'яни, що раніше не являли собою агрономічну проблему до широкого використання GTC, тепер стають все більш поширеними і важкоконтрольованими у випадку GTC, що займають >80 % акрів бавовни і сої в США і >20 % акрів кукурудзи в США (Gianessi, 2005). Ці зсуви в популяціях бур'янів переважно (але не виключно) відбуваються у важкоконтрольованих широколистяних бур'янів. Деякі приклади включають види *Ipomoea*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Taraxacum* і *Commelina*.

55 У областях, де сільгоспвиробники стикаються з резистентними до гліфосату бур'янами або зсувами в сторону більш важкоконтрольованих видів бур'янів, сільгоспвиробники можуть компенсувати недостатність дії гліфосату використанням його в баковій суміші або заміною іншими гербіцидами, за допомогою яких будуть контролювати упущені бур'яни. Одним з популярних і ефективних засобів для використання в баковій суміші для контролю

широколистяних диких рослин в багатьох випадках є 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-D). 2,4-D використовують в агрономії і в несільськогосподарських умовах широкого спектра для контролю широколистяних бур'янів протягом більше 60 років. Повідомляють про окремі випадки стійких видів, але 2,4-D залишається одним з гербіцидів, що найбільш широко використовується по всьому світу. Обмеженням для подальшого використання 2,4-D є те, що його селективність у випадку дводольних сільськогосподарських культур, таких як соя або бавовна, дуже погана, і, таким чином, 2,4-D, як правило, не використовують на (і, як правило, не поблизу) чутливих дводольних сільськогосподарських культур. Крім того, використання 2,4-D у випадку трав'янистих сільськогосподарських культур в деякій мірі обмежене природою пошкодження сільськогосподарських культур, яке може відбуватися. 2,4-D в комбінації з гліфосатом використовують для забезпечення більш надійної burndown обробки перед посадкою сої і бавовни з нульовою обробкою ґрунту; однак, внаслідок чутливості цих дводольних видів до 2,4-D, цю burndown обробку необхідно провести щонайменше за 14-30 днів до посадки (Agrilience, 2003).

2,4-D належить до феноксикислотного класу гербіцидів, як і MCPA. 2,4-D використовують у випадку багатьох однодольних сільськогосподарських культур (таких як кукурудза, пшениця і рис) для селективного контролю широколистяних бур'янів без істотного пошкодження бажаних сільськогосподарських культур. 2,4-D є синтетичним похідним ауксину, діючим, порушуючи регуляцію нормального клітинно-гормонального гомеостазу і перешкоджаючи збалансованому, контрольованому росту; однак, точний механізм дії все ще невідомий. Триклопір і флуороксипір є гербіцидами на основі піридиліоксіоцтової кислоти, механізм дії яких також є таким, як у синтетичного ауксину.

Ці гербіциди мають різні рівні селективності відносно конкретних рослин (наприклад, дводольні рослини є більш чутливими, ніж трав'янисті рослини). Відмінності метаболізму у різних рослин є одним з пояснень різних рівнів селективності. У основному, рослини повільно метаболізують 2,4-D, таким чином, різну відповідь рослин на 2,4-D, більш ймовірно, можна пояснити різною активністю в сайтах-мішенях (WSSA, 2002). Метаболізм 2,4-D у рослин, як правило, відбувається за допомогою двофазного механізму, як правило, гідроксилювання з подальшою кон'югацією з амінокислотами або глюкозою (WSSA, 2002).

З плином часу в популяціях мікроорганізмів з'явився альтернативний і ефективний шлях деградації цього конкретного ксенобіотику, що приводить до повної мінералізації 2,4-D. Подальше нанесення гербіциду приводить до селекції мікроорганізмів, які можуть використовувати гербіцид як джерело вуглецю для росту, забезпечуючи їм конкурентну перевагу в ґрунті. З цієї причини 2,4-D, який складається в цей час має, відносно короткий час напівжиття в ґрунті, і не виявляє значних перехідних ефектів відносно подальших сільськогосподарських культур. Це підвищує застосовність 2,4-D як гербіциду.

Одним з організмів, що піддається широким дослідженням на предмет його здатності деградувати 2,4-D, є *Ralstonia eutropha* (Streber et al., 1987). Кодуючим геном на першому ферментативному етапі циклу мінералізації, є *tfdA*. Див. патент США № 6153401 і GENBANK реєстр. № M16730. *TfdA* каталізує перетворення кислоти 2,4-D в дихлорфенол (DCP) через реакцію  $\alpha$ -кетоглутарат-залежної діоксигенази (Smejkal et al., 2001). DCP має невисоку гербіцидну активність в порівнянні з 2,4-D. *TfdA* використовують в трансгенних рослинах для надання резистентності до 2,4-D дводольних рослин (наприклад, бавовни і тютюну), в нормі чутливим до 2,4-D (Streber et al. (1989), Lyon et al. (1989), Lyon (1993) і патент США № 5608147).

Велика кількість генів *tfdA*-типу, що кодують білки, здатні деградувати 2,4-D, ідентифіковані в навколишньому середовищі і депоновані в базі даних Genbank. Багато гомологів схожі з *tfdA* (>85 % ідентичності амінокислот) і мають схожі з *tfdA* ферментативні властивості. Однак, існує ряд гомологів, що мають значно меншу ідентичність відносно *tfdA* (25-50 %), але мають характерні залишки, асоційовані з  $\alpha$ -кетоглутарат-залежними  $\text{Fe}^{+2}$ -діоксигеназами. Таким чином, не зрозумілі субстратні специфічності цих дивергентних діоксигеназ.

Одним унікальним прикладом низької гомології відносно *tfdA* (31 % ідентичності амінокислот) є *sdpA* з *Delftia acidovorans* (Kohler et al., 1999, Westendorf et al., 2002, Westendorf et al., 2003). Показано, що цей фермент каталізує перший етап в мінералізації (S)-дихлорпропу (і інших (S)-феноксипропіонових кислот), а також 2,4-D (феноксіоцтової кислоти) (Westendorf et al., 2003). До цього часу не повідомляли про використання цього гена в трансформації рослин.

Розробка нових технологій стійких до гербіцидів сільськогосподарських культур (HTC) має обмежений успіх, головним чином, внаслідок ефективності, низької вартості і зручності GTC. Таким чином, серед виробників має місце дуже високий рівень впровадження GTC. Це приводить до низької мотивації для розробки нових технологій HTC.

Арилоксіалканоатні хімічні субструктури є поширеними речовинами в багатьох комерційних гербіцидах, включаючи феноксіацетатауксини (такі як 2,4-D і дихлорпроп), піридилноксіацетатауксини (такі як флуроксипір і триклопір), арилоксифеноксипропіонатні (АОРР) інгібітори ацетил-кофермент А карбоксилази (АСCase) (такі як галоксифоп, квізалофоп, і диклофоп) і 5-заміщені феноксіацетатні інгібітори протопорфіриногеноксидази IX (такі як пірафлуфен і флуміклорак). Однак ці класи гербіцидів є абсолютно різними, і в сучасній літературі немає доказів загальних шляхів деградації серед цих класів хімічних речовин. Нещодавно описаний мультифункціональний фермент для деградації гербіцидів, які охоплюють множину типів дії (РСТ US/2005/014737; зареєстрованої 2 травня 2005 року).

#### СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується способів підвищення висоти рослин і/або врожайності сільськогосподарських культур, резистентних до гербіциду 2,4-D, за допомогою обробки рослин 2,4-D при нормах внесення, що не є шкідливими для рослин. Зокрема, винахід стосується способу з використанням обробки 2,4-D для підвищення врожайності сільськогосподарських культур, які експресують ген AAD-12 для резистентності до 2,4-D. Цей винахід додатково стосується застосування 2,4-D для поліпшення врожайності сільськогосподарських культур, що є резистентними до 2,4-D. Спосіб, що надається, представляє конкретний інтерес для обробки сільськогосподарських рослин, включаючи кукурудзу, сою, озимий і яровий ріпак, (канолу), цукровий буряк, пшеницю, соняшник, ячмінь і рис.

У деяких варіантах здійснення резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури є трансгенними сільськогосподарськими культурами, трансформованими арилоксіалканоатдіоксигеназою (AAD). У додатковому варіанті здійснення арилоксіалканоатдіоксигеназа (AAD) є AAD-1 або AAD-12. AAD-1 раніше описана в патенті США 2009/0093366, а AAD-12 раніше описана в WO 2007/053482, повний зміст яких включений в даний опис як посилання.

Підвищуючий врожайність ефект обробки 2,4-D можна спостерігати при нормах внесення від 25 г ке/га до 5000 г ке/га, або від 100 г ке/га до 2500 г ке/га, або, зокрема, від 1000 г ке/га до 2000 г ке/га. У одному з варіантів здійснення використовують від 1000 г ке/га до 1500 г ке/га 2,4-D. У іншому варіанті здійснення використовують від 2000 г ке/га до 2500 г ке/га. Крім того, цей підвищуючий врожайність ефект обробки 2,4-D є особливо вираженим при нанесенні 2,4-D в фазу від 2 до 8 листків сільськогосподарських культур до цвітіння. Однак необхідна норма внесення і/або фаза зростання сільськогосподарської культури варіюється залежно від рослин, їх росту і кліматичних умов.

Термін "підвищення" врожайності означає, що врожайність рослини підвищується на 50 % або більше. У одному з варіантів здійснення підвищення врожайності становить щонайменше 10 %. У іншому варіанті здійснення підвищення врожайності становить щонайменше 20 %. У іншому варіанті здійснення підвищення врожайності становить від 10 % до 60 %. У іншому варіанті здійснення підвищення врожайності становить від 20 % до 50 %. У іншому варіанті здійснення підвищення врожайності є статистично значущим. Активність 2,4-D, що посилює зростання, відносно резистентних до 2,4-D сільськогосподарських культур можна вимірювати в польових випробуваннях або вегетаційних дослідях. Про гербіцид, що має різний механізм дії, як правило, відомо, чи надає він несприятливий вплив на врожайність, або чи не впливає на врожайність.

Один з аспектів стосується способу підвищення врожайності резистентних до 2,4-D сільськогосподарських культур, що включає обробку рослин стимулюючою кількістю гербіциду, що містить залишок арилоксіалканоату.

У одному з варіантів здійснення резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури є трансгенними рослинами, трансформованими з використанням арилоксіалканоатдіоксигенази (AAD). У додатковому варіанті здійснення арилоксіалканоатдіоксигеназа (AAD) є AAD-1 або AAD-12. У іншому варіанті здійснення гербіцид, що містить залишок арилоксіалканоату, є фенокси-гербіцидом або феноксіоцтовим гербіцидом. У додатковому варіанті здійснення гербіцид, що містить залишок арилоксіалканоату, є 2,4-D. У додатковому варіанті здійснення 2,4-D містить 2,4-D-холін або 2,4-D-диметиламін (DMA).

У одному з варіантів здійснення трансгенні рослини, трансформовані з використанням арилоксіалканоатдіоксигенази, (AAD) вибрані з бавовни, сої і канолі. У іншому варіанті здійснення обробку здійснюють щонайменше один раз при нормі внесення 2,4-D, що використовується також для контролю бур'янів. У іншому варіанті здійснення обробку здійснюють два рази при нормі внесення 2,4-D, що використовується також для контролю бур'янів. У додатковому варіанті здійснення 2,4-D наносять в фази росту V3 і R2 сої зі стійкістю до 2,4-D. У іншому варіанті здійснення обробку здійснюють щонайменше три рази при нормі

внесення 2,4-D, що використовується також для контролю бур'янів. У іншому варіанті здійснення гербіцид, що містить залишок арилоксіалканоату, досягає резистентних до 2,4-D сільськогосподарських культур за допомогою поглинання корінням.

У іншому варіанті здійснення для контролю бур'янів резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури також обробляють гербіцидом, іншим, ніж 2,4-D. У додатковому варіанті здійснення гербіцид, інший, ніж 2,4-D, є фосфорним гербіцидом або арилоксифеноксипропіоновим гербіцидом. У додатковому варіанті здійснення фосфорний гербіцид включає гліфосат, глүфосинат, їх похідні або їх комбінації. У додатковому варіанті здійснення фосфорний гербіцид знаходиться в формі солі амонію, солі ізопропіламонію, солі ізопропіламіну або солей калію. У іншому варіанті здійснення фосфорний гербіцид досягає резистентних до 2,4-D сільськогосподарських культур за допомогою поглинання корінням. У іншому варіанті здійснення арилоксифеноксипропіоновий гербіцид включає хлоразифоп, феноксапроп, флуазифоп, галоксифоп, квізалофоп, їх похідні або їх комбінації. У додатковому варіанті здійснення арилоксифеноксипропіоновий гербіцид досягає резистентних до 2,4-D сільськогосподарських культур за допомогою поглинання корінням.

У одному з варіантів здійснення резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури обробляють щонайменше один раз при дозі від 25 г ке/га до 5000 г ке/га 2,4-D. У іншому варіанті здійснення резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури обробляють щонайменше один раз при дозі від 100 г ке/га до 2000 г ке/га 2,4-D. У іншому варіанті здійснення резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури обробляють щонайменше один раз при дозі від 100 г ке/га до 2500 г ке/га 2,4-D. У іншому варіанті здійснення резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури обробляють щонайменше один раз при дозі від 1000 г ке/га до 2000 г ке/га 2,4-D. У додатковому варіанті здійснення 2,4-D включає 2,4-D-холін або 2,4-D-диметиламін (DMA).

Один з варіантів здійснення стосується способу підвищення врожайності резистентних до 2,4-D сільськогосподарських культур. Спосіб включає

- (a) трансформацію рослинних клітин з використанням молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує арилоксіалканоатдіоксигеназу (AAD);
- (b) селекцію трансформованих клітин;
- (c) регенерацію рослин з трансформованих клітин; і
- (d) обробку рослин стимулюючою кількістю гербіциду, що містить залишок арилоксіалканоату.

У одному з варіантів здійснення арилоксіалканоатдіоксигеназа (AAD) є AAD-1 або AAD-12. У іншому варіанті здійснення молекула нуклеїнової кислоти містить селективний маркер, що не є арилоксіалканоатдіоксигеназою (AAD). У додатковому варіанті здійснення або альтернативному варіанті здійснення селективний маркер є геном фосфінотрицинацетилтрансферази (pat) або геном резистентності до білафосу (bar). У іншому варіанті здійснення молекула нуклеїнової кислоти оптимізована для рослин.

Інший аспект стосується застосування гербіциду, що містить залишок арилоксіалканоату, у виробництві трансгенних рослин з резистентністю до 2,4-D з підвищеною врожайністю в порівнянні з їх нетрансгенними батьківськими рослинами. У одному з варіантів здійснення гербіцид, що містить залишок арилоксіалканоату, є 2,4-D. У додатковому варіанті здійснення 2,4-D наносять щонайменше один раз при дозі від 25 г ке/га до 5000 г ке/га 2,4-D. У іншому варіанті здійснення 2,4-D наносять щонайменше один раз при дозі від 100 г ке/га до 2000 г ке/га 2,4-D. У іншому варіанті здійснення 2,4-D наносять щонайменше один раз при дозі від 100 г ке/га до 2500 г ке/га 2,4-D. У іншому варіанті здійснення 2,4-D наносять щонайменше один раз при дозі від 1000 г ке/га до 2000 г ке/га 2,4-D. У додатковому варіанті здійснення 2,4-D включає 2,4-D-холін або 2,4-D-диметиламін (DMA). У додатковому варіанті здійснення резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури обробляють 2,4-D щонайменше два рази перед цвітінням. У іншому варіанті здійснення резистентні до 2,4-D сільськогосподарські культури є трансгенними рослинами, трансформованими з використанням арилоксіалканоатдіоксигенази (AAD). У додатковому варіанті здійснення арилоксіалканоатдіоксигеназа (AAD) є AAD-1 або AAD-12.

#### КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ І ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

На фіг. 1 представлена загальна хімічна реакція, яка каталізується ферментами AAD-12 за даним винаходом. На фіг. 2 представлена типова карта плазмиди pDAB4468. На фіг. 3 представлена типова карта плазмиди pDAS1740.

SEQ ID NO: 1 являє собою нуклеотидну послідовність AAD-12 з *Delftia acidovorans*.

SEQ ID NO: 2 являє собою транскльоновану білкову послідовність, що кодується SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 являє собою оптимізовану для рослин нуклеотидну послідовність AAD-12 (v1).

SEQ ID NO: 4 являє собою транскльоновану білкову послідовність, що кодується SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 являє собою оптимізовану для *E. coli* нуклеотидну послідовність AAD-12 (v2).

SEQ ID NO: 6 являє собою послідовність прямого праймера M13.

SEQ ID NO: 7 являє собою послідовність зворотного праймера M13.

SEQ ID NO: 8 являє собою послідовність прямого праймера PTU AAD-12 (v1).

5 SEQ ID NO: 9 являє собою послідовність зворотного праймера PTU AAD-12 (v1).

SEQ ID NO: 10 являє собою послідовність прямого праймера для ПЛР кодууючої області AAD-12 (v1).

SEQ ID NO: 11 являє собою послідовність зворотного праймера для ПЛР кодууючої області AAD-12 (v1).

10 SEQ ID NO: 12 являє собою послідовність "праймера sdpacodF" AAD-12 (v1).

SEQ ID NO: 13 являє собою послідовність "праймера sdpacodR" AAD-12 (v1).

SEQ ID NO: 14 являє собою послідовність "праймера Nco1 °F Brady".

SEQ ID NO: 15 являє собою послідовність "праймера Sac1 °F Brady".

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

15 Як застосовують в даному описі, фраза "трансформований" або "трансформація" стосується вбудовування ДНК в клітину. Фрази "трансформант" або "трансгенний" стосуються рослинних клітин, рослин і т. п., трансформованих або підданих трансформації. Вбудовувана ДНК, як правило, знаходиться в формі вектора, що містить вставку ДНК.

Як застосовують в даному описі, фраза "селективний маркер" або "ген селективного маркера" стосується гена, необов'язково, що використовується в трансформації рослин, наприклад, для захисту рослинних клітин від селективного засобу або забезпечення резистентності/стійкості до селективного засобу. Тільки ті клітини або рослини, які отримували функціональний селективний маркер, здатні ділитися або рости в умовах наявності селективного засобу. Приклади селективних засобів можуть включати, наприклад, антибіотики, включаючи спектиноміцин, неоміцин, канаміцин, паромоміцин, гентаміцин і гігromіцин. Ці селективні маркери включають ген неоміцинофосфотрансферази (npt II), експресуючий фермент, що додає резистентності до антибіотика канаміцину, і гени для споріднених антибіотиків неоміцину, паромоміцину, гентаміцину і G418, або гена гігromіцинофосфотрансферази (hpt), експресуючий фермент, що додає резистентності до гігromіцину. Інші гени селективних маркерів можуть включати гени, що кодують резистентність до гербіциду, включаючи Bar (резистентності до BASTA® (глуфосинат амонію) або фосфінотрицину (PPT)), ацетолактатсинтазу (ALS, резистентності до інгібіторів, таких як сульфонілкарбаміди (SU), імідазоліони (IMI), триазолопіримідини (TP), піримідинілоксибензоати (POB) і сульфоніламінокарбонілтриазоліони, що запобігають першому етапу синтезу амінокислот з розгалуженим ланцюгом, гліфосату, 2,4-D і резистентності або чутливості до металів. Фраза "маркер-позитивний" стосується рослин, трансформованих з включенням гена селективного маркера.

У вибраний експресуючий вектор можна вбудовувати різні селективні або детектовані маркери, роблячи можливою ідентифікацію і селекцію трансформованих рослин, або трансформантів. Доступна множина способів підтвердження експресії селективних маркерів в трансформованих рослинах, включаючи, наприклад, секвенування ДНК і ПЛР (полімеразну ланцюгову реакцію), Саузерн-блотинг, РНК-блотинг, імунологічні способи визначення білка, що експресується з вектора, наприклад, преципітованого білка, білків репортерних генів - до фосфінотрицину, або інших білків, таких як β-глюкуронідаза (GUS), люцифераза, зелений флуоресцентний білок (GFP), DsRed, β-галактозидаза, хлорамфеніколацетилтрансфераза (CAT), лужна фосфатаза і т. п. (див. Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001, зміст якого включений в даний опис як посилання в повному об'ємі).

Гени селективних маркерів використовують для селекції трансформованих клітин або тканин. Гени селективних маркерів включають гени, що кодують резистентність до антибіотиків, такі як гени, що кодують неоміцинофосфотрансферазу II (NEO) і гігromіцинофосфотрансферазу (HPT), а також гени, що додають резистентності до гербіцидних сполук. Гени резистентності до гербіцидів, як правило, кодують модифікований білок-мішень, нечутливий до гербіциду, або деградує фермент, або детоксифікуючий гербіцид в рослині до того, як він може подіяти. Див. DeBlock et al. (1987) EMBO J., 6:2513-2518; DeBlock et al. (1989) Plant Physiol., 91:691-704; Fromm et al. (1990) 8:833-839; Gordon-Kamm et al. (1990) 2:603-618). Наприклад, резистентності до гліфосату або сульфонілкарбамідних гербіцидів досягали з використанням генів, що кодують мутантні ферменти-мішені 5-енолпірувілшкімат-3-фосфатсинтетазу (EPSPS) і ацетолактатсинтазу (ALS). Резистентності до глуфосинату амонію, бромоксинілу і 2,4-дихлорфеноксіацетату (2,4-D) досягали з використанням бактеріальних генів, що кодують

фосфінотрицинацетилтрансферазу, нітрилазу або 2,4-дихлорфеноксіацетатмонооксигеназу, детоксифікуючі відповідні гербіциди. Ферменти/ген резистентності до 2,4-D раніше описані в патенті США № 2009/0093366 і WO 2007/053482, зміст яких, таким чином, включений в даний опис як посилання в повному об'ємі.

5 Інші гербіциди можуть інгібувати конус наростання або меристему, включаючи імідазолінон або сульфонілкарбамід. Приклади генів цієї категорії кодують мутантні ферменти ALS і AHAS, як описано, наприклад, в Lee et al., EMBO J. 7: 1241 (1988); і Miki et al., Theon. Appl. Genet. 80:449 (1990), відповідно.

10 Гени резистентності до гліфосату включають мутантні гени 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтетази (EPSP) (за допомогою вбудовування рекомбінантних нуклеїнових кислот і/або різних форм мутагенезу in vivo нативних генів EPSP), гени *aroA* і гени гліфосатацетилтрансферази (GAT), відповідно. Гени резистентності до інших фосфонових сполук включають гени глуфосинат (гени фосфінотрицинацетилтрансферази (PAT) з видів *Streptomyces*, включаючи *Streptomyces hygroscopicus* і *Streptomyces viridichromogenes*) і піридинокси- або феноксипропіонові кислоти і циклогексони (гени, що кодують інгібітор ACCase). Див., наприклад, патент США № 4940835 Shah, et al. і патент США № 6248876 Barry et al., в яких описують нуклеотидні послідовності форм EPSP, які можуть додавати рослині резистентності до гліфосату. Молекулу ДНК, що кодує мутантний ген *aroA*, можна отримувати в ATCC під реєстраційним номером 39256, і нуклеотидна послідовність мутантного гена описана в патенті США № 4769061 Comai, європейській патентній заявці № 0 333 033 Kumada et al. і патенті США № 4975374 Goodman et al., в яких описують нуклеотидні послідовності генів глутамінсинтетази, що додають резистентності до гербіцидів, таких як L-фосфінотрицин. Нуклеотидна послідовність гена PAT представлена в європейській патентній заявці № 0 242 246 Leemans et al. Крім того, в DeGreef et al., Bio/Technology 7:61 (1989) описують отримання трансгенних рослин, експресуючих химерні гени *bar*, що кодують активність PAT. Прикладами генів, що додають резистентності до феноксипропіонових кислот і циклогексонів, включаючи сетоксидим і галооксифоп, є гени *Acc1-S1*, *Acc1-S2* і *Acc1-S3*, що описуються в Marshall et al., Theon. Appl. Genet. 83:435 (1992). Гени GAT, здатні додавати резистентності до гліфосату, описують в WO 2005012515 Castle et al. Гени, що додають резистентності до гербіцидів 2,4-D, фоп і піридилоксиауксину, описують в WO 2005107437 і патентній заявці США з серійним № 11/587893.

35 Інші гербіциди можуть інгібувати фотосинтез, включаючи триазин (гени *psbA* і *1s+*) або бензонітрил (ген нітрилази). У Przibila et al., Plant Cell 3: 169 (1991) описують трансформацію *Chlamydomonas* з використанням плазмід, що кодують мутантні гени *psbA*. Нуклеотидні послідовності генів нітрилази описують в патенті США № 4810648 Stalker, і молекули ДНК, що містять ці гени, доступні в ATCC під реєстраційними №№ 53435, 67441 і 67442. Клонування і експресію ДНК, що кодує глутатіон-S-трансферазу, описують в Hayes et al., Biochem. J. 285: 173 (1992).

40 У цілях за даним винаходом, гени селективних маркерів включають, як необмежувальні приклади, гени, які кодують: неоміцинфосфотрансферазу II (Fraley et al. (1986) CRC Critical Reviews in Plant Science, 4: 1-25); ціанамідгідратазу (Maier-Greiner et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4250-4264); аспартаткіназу; дигідродіпіколінатсинтетазу (Perl et al. (1993) Bio/Technology, 11:715-718); триптофандекарбоксилазу (Goddijn et al. (1993) Plant Mol. Bio., 22:907-912); дигідродіпіколінатсинтетазу і десенсибілізовану аспартаткіназу (Perl et al. (1993) Bio/Technology, 11:715-718); ген *bar* (Toki et al. (1992) Plant Physiol., 100: 1503-1507 і Meagher et al. (1996) and Crop Sci., 36: 1367); триптофандекарбоксилазу (Goddijn et al. (1993) Plant Mol. Biol., 22:907-912); неоміцинфосфотрансферазу (NEO) (Southern et al. (1982) J. Mol. Appl. Gen., 1:327; гіроміцинфосфотрансферазу (HPT або HYG) (Shimizu et al. (1986) Mol. Cell Biol., 6: 1074); дигідрофолатредуктазу (DHFR) (Kwok et al. (1986) PNAS USA 4552); фосфінотрицинацетилтрансферазу (DeBlock et al. (1987) EMBO J., 6:2513); дегалогеназу 2,2-дихлорпропіонової кислоти (Buchanan-Wollaston et al. (1989) J. Cell. Biochem. 13D:330); синтетазу ацетогідроксикислот (Anderson et al., патент США № 4761373; Haughn et al. (1988) Mol. Gen. Genet. 221:266); 5-енолпірувілшикіматфосфатсинтетазу (*aroA*) (Comai et al. (1985) Nature 317:741); галоарилнітрилазу (Stalker et al., опублікована заявка PCT WO87/04181); ацетил-кофермент А карбоксилазу (Parker et al. (1990) Plant Physiol. 92: 1220); дигідрооптероатсинтетазу (*sul I*) (Guerineau et al. (1990) Plant Mol. Biol. 15: 127); і поліпептид фотосистеми II масою 32 кДа (*psbA*) (Hirschberg et al. (1983) Science, 222: 1346).

60 Також включені гени, що кодують резистентність до: хлорамфеніколу (Herrera-Estrella et al. (1983) EMBO J., 2:987-992); метотрексату (Herrera-Estrella et al. (1983) Nature, 303:209-213; Meijer et al. (1991) Plant Mol Bio., 16:807-820 (1991); гіроміцину (Waldron et al. (1985) Plant Mol.



Biol., 5: 103-108; Zhijian et al. (1995) Plant Science, 108:219-227 i Meijer et al. (1991) Plant Mol. Bio. 16:807-820); стрептомицину (Jones et al. (1987) Mol. Gen. Genet., 210:86-91); спектиномицину (Bretagne-Sagnard et al. (1996) Transgenic Res., 5: 131-137); блеомицину (Hille et al. (1986) Plant Mol. Biol., 7: 171-176); сульфонамїду (Guerineau et al. (1990) Plant Mol. Bio., 15: 127-136); бромоксинїлу (Stalker et al. (1988) Science, 242:419-423); 2,4-D (Streber et al. (1989) Bio/Technology, 7:811-816); гліфосату (Shaw et al. (1986) Science, 233:478-481); і фосфінотрицину (DeBlock et al. (1987) EMBO J., 6:2513-2518). Всі посилання, процитовані в описі, таким чином, включені в даний опис як посилання в повному об'ємі, якщо не указано інакше.

Представлений вище список генів селективних маркерів і репортерних генів не є обмежувальним. Будь-який репортерний або ген селективного маркера знаходяться в об'ємі даного винаходу. При необхідності, такі гени можна секвенувати відомими в цій галузі способами.

Репортерні гени і гени селективних маркерів синтезують для оптимальної експресії в рослинах. Тобто кодуєчу послідовність гена модифікують для підвищення експресії в рослинах. Синтетичний маркерний ген конструюють для експресії в рослинах на високому рівні, трансформації, що приводить до більш високої ефективності. У цій галузі доступні способи синтетичної оптимізації генів. Фактично, декілька генів оптимізують для підвищення експресії продукту гена в рослинах.

Послідовність маркерного гена можна оптимізувати для експресії у конкретному виді рослин або, альтернативно, її можна модифікувати для оптимальної експресії в сімействах рослин. Переважні для рослини кодони можна визначати з кодонів, які зустрічаються з найбільшою частотою в білках, які експресуються в найбільших кількостях у конкретному виді рослин, який цікавить. Див., наприклад, EPA 0359472; EPA 0385962; WO 91/16432; Perlak et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3324-3328; i Murray et al. (1989) Nucleic Acids Research, 17: 477-498; патент США № 5380831; і патент США № 5436391, включені в даний опис як посилання. Таким чином, нуклеотидні послідовності можна оптимізувати для експресії в будь-якій рослині. Встановлено, що можна оптимізувати або синтезувати всю послідовність гена або будь-яку її частину. Тобто, також можна використовувати повністю оптимізовані або частково оптимізовані послідовності.

Крім того, розроблено декілька стратегій трансформації з використанням системи опосередкованої *Agrobacterium* трансформації. Наприклад, бінарна векторна стратегія основана на двоплазмідній системі, де Т-ДНК знаходиться в іншій плазміді, ніж плазмїда Ті. У стратегії коінтеграції невелику частину Т-ДНК вміщують в той же вектор, що і чужорідний ген, який потім рекомбінує з плазмїдою Ті.

Як застосовують в даному описі, фраза "рослина" включає дводольні рослини і однодольні рослини. Приклади дводольних рослин включають тютю, арабїдопсис, сою, помідор, папайю, канолу, соняшник, бавовну, люцерну, картоплю, виноград, голубиний горох, горох, декоративну капусту, нут, цукровий буряк, ріпак, кавун, диню, перець, арахїс, гарбуз, редиску, шпинат, гігантський гарбуз, броколі, капусту, моркву, цвітну капусту, селеру, китайську капусту, огірок, баклажан і латук. Приклади однодольних рослин включають кукурудзу, рис, пшеницю, цукрову тростину, ячмінь, жито, сорго, орхідею, бамбук, банан, рогіз, лілію, овес, цибулю, просо і тритикале.

Предметна розробка гена резистентності до 2,4-D і подальших резистентних сільськогосподарських культур забезпечує виняткові засоби контролю широколистяних, резистентних до гліфосату (або високостійких і підданих зсуву) видів бур'янів для використання в сільськогосподарських культурах. 2,4-D є відносно недорогим і надійним гербіцидом широкого спектра дії проти широколистяних рослин, який буде приносити виняткову користь сільгоспвиробникам, якщо можна забезпечувати більш високу стійкість сільськогосподарських культур в рівній мірі у випадку дводольних і однодольних сільськогосподарських культур. Стійкі до 2,4-D трансгенні дводольні сільськогосподарські культури також будуть мати велику гнучкість по термінах і нормі внесення. Додатковою користю вказаної ознаки стійкості до гербіциду 2,4-D є запобігання пошкодженню в нормі сприйнятливих сільськогосподарських культур при дрейфі 2,4-D, випаровуванні, перетворенні (або іншому явищі переміщення за межі території), неправильному застосуванні, вандалізмі і т. п. Додатковою перевагою гена AAD-12 є те, що, на відміну від всіх гомологів *tfdA*, охарактеризованих до теперішнього часу, AAD-12 здатна деградувати піридиллоксіацетатні ауксини (наприклад, триклопір, флуроксіпір) в доповнення до ахіральних феноксіауксинів (наприклад, 2,4-D, MCPA, 4-хлорфеноксіоцтової кислоти). Див. таблицю 1. Загальна картина хімічних реакцій, каталізованих вказаним ферментом AAD-12, представлена на фіг. 1. (Додавання O.sub.2 є стереоспецифічним; розпад проміжної сполуки на

фенол і гліюксилат є спонтанним.) Потрібно розуміти, що за допомогою хімічних структур на фіг. 1 ілюструють молекулярні кістяки, і що різні R-групи і т. п. (такі як представлені в таблиці 1) включені, але не обов'язково конкретно проілюстровані на фіг. 1. Для впливу на конкретні спектри бур'янів і умови навколишнього середовища в різних областях у всьому світі використовують множини сумішей різних комбінацій феноксіяуксинів. Використання гена AAD-12 в рослинах забезпечує захист проти набагато більш широкого спектра ауксинових гербіцидів, таким чином, збільшуючи гнучкість і спектри бур'янів, які можна контролювати.

До теперішнього часу ідентифікований єдиний ген (AAD-12), який при генетичному конструюванні для експресії в рослинах має властивості, які дозволяють використовувати феноксіяуксинові гербіциди на рослинах, у яких ніколи не було спадкової стійкості, або вона була недостатньо високою, щоб мати можливість використовувати ці гербіциди. Крім того, AAD-12 може забезпечувати захист від піридиллоксіяцетатних гербіцидів в польових умовах, підвищуючи потенційну користь від цих гербіцидів, природної стійкості до яких також недостатньо, щоб зробити можливою селективність. Рослини, що містять AAD-12 нарізно, тепер можна обробляти послідовно або з використанням бакової суміші з одним, двома або комбінацією декількох феноксіяуксинових гербіцидів. Норма внесення кожного феноксіяуксинового гербіциду може знаходитися в діапазоні від 25 до 4000 г ке/га, і частіше - від 100 до 2000 г ке/га для контролю широкого спектра дводольних бур'янів. Аналогічно, одну, дві або суміш декількох піридиллоксіяцетатауксинових сполук можна наносити на рослини, які експресують AAD-12, зі зниженим ризиком пошкодження від вказаних гербіцидів. Норма внесення для піридиллоксіяцетатного гербіциду може знаходитися в діапазоні від 25 до 2000 г ке/га, і частіше - 35-840 г ке/га для додаткового контролю дводольних бур'янів.

Гліфосат широко використовують, оскільки він допомагає контролювати дуже широкий спектр широколистяних і трав'янистих видів бур'янів. Однак повторне використання гліфосату в GTC і при несільськогосподарському застосуванні приводить і буде продовжувати приводити до селекції бур'янів зі зсувами в сторону природно більш стійких видів або резистентних до гліфосату біотипів. Використання бакових сумішей гербіцидів, які використовуються в ефективних нормах внесення, що забезпечують контроль одних і тих же видів, але мають різні механізми дії, призначають в більшості стратегій боротьби з резистентністю до гербіцидів, як спосіб затримки появи резистентних бур'янів. Стекінг AAD-12 з ознакою стійкості до гліфосату (і/або з ознаками стійкості до інших гербіцидів) може представляти механізм, що дозволяє контролювати резистентні до гліфосату види дводольних бур'янів в GTC, роблячи можливим використання гліфосату, феноксіяуксинів (наприклад, 2,4-D) і піридиллоксіяцетатауксинових гербіцидів (наприклад, триклопіру) вибірково в одній сільськогосподарській культурі. Нанесення цих гербіцидів може бути одночасним нанесенням в баковій суміші, що містить два або більше гербіциди з різними механізмами дії; окремим нанесенням однієї композиції гербіцидів з послідовним нанесенням в передпосівному, передсходовому або післясходовому і окремому режимі нанесення в діапазоні від приблизно 2 годин до приблизно 3 місяців; або, альтернативно, будь-яку комбінацію будь-якої кількості гербіцидів, що представляють кожний хімічний клас, можна наносити в будь-якому режимі в межах від приблизно 7 місяців від посадки сільськогосподарської культури до збору урожаю сільськогосподарської культури (або передзбирального інтервалу для окремого гербіциду, залежно від того, який з них є найбільш коротким).

Важливо мати гнучкість в контролі широкого спектра трав'янистих і широколистяних бур'янів відносно режиму нанесення, норми внесення окремих гербіцидів і здатності контролювати резистентні або які представляють ускладнення бур'яни. Норма внесення гліфосату на сільськогосподарську культуру зі стеком гена резистентності до гліфосату/AAD-12 може знаходитися в діапазоні приблизно 250-2500 г ке/га; феноксіяуксинові гербіциди (один або декілька) можна наносити при нормі внесення приблизно 25-4000 г ке/га; і піридиллоксіяцетатауксинові гербіциди (один або декілька) можна наносити при нормі внесення 25-2000 г ке/га. Оптимальні комбінації і режим цього нанесення буде залежати від конкретної ситуації, виду і навколишнього середовища, і найкраще їх буде визначати фахівець в галузі контролю бур'янів, що отримує користь від даного винаходу.

Проростки, як правило, резистентні протягом всьому циклу зростання. Трансформовані рослини, як правило, будуть резистентні до нанесення нового гербіциду в будь-який час експресії гена. У даному описі представлена стійкість до 2,4-D протягом всього життєвого циклу при використанні конститутивних промоторів, протестованих до теперішнього часу (головним чином, CsVMV і AtUbi10). Це, як правило, є очікуваним, але являє собою удосконалення в порівнянні з іншими неметаболізованими активними засобами, де на стійкість може значно впливати, наприклад, знижена експресія місця прикладення дії механізму резистентності.

Одним з прикладів є Roundup Ready cotton, де рослини стійкі при ранньому обприскуванні, але якщо обприскати їх дуже пізно, гліфосат концентрується в меристемі (оскільки він не метаболізується і переміщується); використовувані вірусні промотори Monsanto погано експресуються в квітках. Відносно цього заявлений винахід являє собою удосконалення.

5 Склади гербіцидів (наприклад, склад складних ефірів, кислот або солей; або розчинний концентрат, емульгований концентрат або розчинна рідина) і добавки для бакових сумішей (наприклад, допоміжні засоби, поверхнево-активні речовини, уповільнювачі дрейфу або засоби сумісності) можуть значно впливати на контроль бур'янів за допомогою вказаного гербіциду або комбінації одного або декількох гербіцидів. Будь-яка їх комбінація з будь-якою з вказаних вище

10 гербіцидних хімічних речовин входить в об'єм даного винаходу.

Фахівець в цій галузі також побачить користь комбінування двох або більше механізмів дії для збільшення спектра контрольованих бур'янів і/або для контролю природно більш стійких або резистентних видів бур'янів. Це також може поширюватися на хімічні речовини, у випадку яких стійкість до гербіцидів в сільськогосподарських культурах стала можливою під впливом

15 людини (трансгенно або нетрансгенно), крім GTC. Насправді, ознаки резистентності до гліфосату (наприклад, EPSPS резистентної рослини або бактерії, гліфосатоксидоредуктазу (GOX), GAT), резистентності до гліфосинату (наприклад, Pat, bar), ацетолататсинтаза (ALS)-інгібіторної резистентності до гербіцидів (наприклад, імідазолінону, сульфонілкарбаміду, триазолопіримідин сульфоналіду, піримідинілтїобензоатів і інших хімічних речовин - AHAS, CsrI, SurA і ін.), резистентності до бромоксінілу (наприклад, Bxp), резистентності до інгібіторів ферменту HPPD (4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази), резистентності до інгібіторів фітоендесатурази (PDS), резистентності до гербіцидів, які інгібують фотосистему II (наприклад, psbA), резистентності до гербіцидів, які інгібують фотосистему I, резистентності до гербіцидів, які інгібують протопорфіриногеноксидазу IX (PPO) (наприклад, PPO-1), резистентності до

20 гербіцидів на основі фенолсечовини (наприклад, CYP76B1), диамба-деградуючі ферменти (див., наприклад, US 20030135879) і інші можуть бути відособлені або бути у множині комбінацій для забезпечення здатності ефективно контролювати або запобігати зсувам бур'янів і/або резистентності до будь-якого гербіциду з вказаних вище класів. У деяких переважних варіантах здійснення можна використовувати модифіковану in vivo EPSPS, а також гени резистентності до

25 гліфосату класу I, класу II і класу III.

Що стосується додаткових гербіцидів, деякі додаткові переважні інгібітори ALS включають, як необмежувальні приклади сульфонілкарбаміди (такі як хлорсульфурон, галосульфурон, нікосульфурон, сульфометурон, сульфосульфурон, трифлорисульфурон), імідазолінони (такі як імазамокс, імазетапір, імазахін), триазолопіримідин сульфоналіди (такі як клорансулам-метил, диклосулам, флорасулам, флуметсулам, метосулам і пеноксулам),

35 піримідинілтїобензоати (такі як біспірибак і піритіобак) і флукарбазон. Деякі переважні інгібітори HPPD включають, як необмежувальні приклади, мезотрион, ізоксафлутол і сулкотрион. Деякі переважні інгібітори PPO включають, як необмежувальні приклади, флуміклорак, флуміоксазин, флуфенпір, пірафлуфен флутіацет, бутафенацил, карфентразон, сульфентразон і дифенілові прості ефіри (такі як ацифлуорфен, фомезафен, лактофен і оксифлуорфен).

Крім того, AAD-12 окрему або піддану стекингу з однією або декількома додатковими ознаками HTC можна піддавати стекингу з однією або декількома додатковими вхідними (наприклад, резистентність до комах, резистентність до грибів або стресостійкість і ін.) або вихідними (наприклад, підвищена врожайність урожай, поліпшений профіль олій, поліпшена

45 якість волокон і ін.) ознаками. Таким чином, даний винахід можна використовувати для забезпечення повного агрономічного пакету поліпшеної якості сільськогосподарської культури зі здатністю гнучко і економічно ефективно контролювати будь-яку кількість сільськогосподарських шкідників.

Даний винахід частково стосується ідентифікації ферменту, який не тільки здатний

50 деградувати 2,4-D, але також, несподівано, має нові властивості, що відрізняє фермент за даним винаходом, наприклад, від раніше відомих білків tfdA. Незважаючи на те, що цей фермент має дуже низьку гомологію з tfdA, гени за даним винаходом все одно, як правило, можна класифікувати в те ж загальне сімейство  $\alpha$ -кетоглутарат-залежних діоксигеназ. Це сімейство білків відрізняється трьома консервативними залишками гістидину в мотиві "HX(D/E)X23-26(T/S)X114-183HX10-13R", що містить активний центр. Гістидини координують в активному центрі іон  $Fe^{2+}$ , який важливий для каталітичної активності (Hogan et al., 2000). Попередні експерименти по експресії in vitro, що обговорюються в даному описі, адаптували для полегшення селекції нових властивостей. Ці експерименти також показують, що фермент AAD-12 унікальний відносно іншого, в корені відмінного ферменту того ж класу, що описується в

60 зареєстрованій раніше патентній заявці (PCT US/2005/014737; зареєстрованій 2 травня 2005

року). Фермент AAD-1 по цій заявці має всього лише приблизно 25 % ідентичності послідовності відносно білка AAD-12 за даним винаходом.

Більш конкретно, даний винахід частково стосується застосування ферменту, здатного деградувати не тільки 2,4-D, але також і піридиллоксіацетатні гербіциди. Раніше не повідомляли про  $\alpha$ -кетоглутарат-залежний фермент діоксигенази, який має здатність деградувати гербіциди різних хімічних класів і механізмів дії. Переважні ферменти і гени для застосування за даним винаходом означають в даному описі як гени і білки AAD-12 (ариллоксіалканоатдіоксигенази).

Білки за даним винаходом при аналізі були тест-позитивними на перетворення 2,4-D в 2,4-дихлорфенол ("DCP"; гербіцидно неактивний). Частково очищені білки за даним винаходом можуть швидко перетворювати 2,4-D в DCP *in vitro*. Додатковою перевагою AAD-12-трансформованих рослин, які надаються, є те, що батьківські гербіциди метаболізуються до неактивних форм, таким чином, знижуючи потенціал збору гербіцидних залишків разом із зерном або соломом.

Даний винахід також включає способи контролю бур'янів, де вказані способи включають нанесення піридиллоксіацетатного і/або феноксіауксинового гербіциду на рослини, що містять ген AAD-12.

У світлі цих результатів, тепер надають нові рослини, що містять полінуклеотид, який кодує цей тип ферменту. До цього моменту не існувало мотивації отримувати такі рослини, і не очікували, що такі рослини зможуть ефективно продукувати цей фермент, що робить рослини резистентними не тільки до гербіцидів на основі феноксікислот (таким як 2,4-D), але також і до піридиллоксіацетатних гербіцидів. Таким чином, даний винахід забезпечує велику кількість переваг, які до даного моменту в цій галузі не вважали можливими.

Загальнодоступні штами (депоновані в колекціях культур, таких як ATCC або DSMZ) можна купувати і піддавати скринінгу на нові гени з використанням способів, представлених в даному описі. Послідовності, представлені в даному описі, можна використовувати для ампліфікації і клонування гомологічних генів в систему рекомбінантної експресії для додаткового скринінгу і тестування за даним винаходом.

Як указано вище в розділі "Рівень техніки", одним з організмів, який інтенсивно досліджуються на здатність деградувати 2,4-D, була *Ralstonia eutropha* (Streber et al., 1987). Геном, що кодує перший фермент в шляху деградації, є *tfdA*. Див. патент США № 6153401 і GENBANK реєстр. № M16730. *TfdA* каталізує перетворення кислоти 2,4-D в гербіцидно неактивний DCP за допомогою реакції  $\alpha$ -кетоглутарат-залежної діоксигенази (Smejkal et al., 2001). *TfdA* використовують в трансгенних рослинах для надання резистентності до 2,4-D дводольних рослин (наприклад, бавовни і тютюну), в нормі сприйнятливих до 2,4-D (Streber et al., 1989; Lyon et al., 1989; Lyon et al., 1993). Велика кількість генів *tfdA*-типу, що кодують білки, здатні деградувати 2,4-D, ідентифікували з навколишнього середовища і депонували в базі даних Genbank. Багато гомологів дуже схожі на *tfdA* (>85 % ідентичності амінокислот) і мають аналогічні *tfdA* ферментативні властивості. Однак, до теперішнього часу ідентифікували невелику колекцію гомологів  $\alpha$ -кетоглутарат-залежної діоксигенази, що мають низький рівень гомології з *tfdA*.

Даний винахід частково стосується несподіваних даних про нове використання і функції віддалено спорідненого ферменту *sdpA* з *Delftia acidivorans* (Westendorf et al., 2002, 2003) з низькою гомологією відносно *tfdA* (31 % ідентичності амінокислот). Раніше показано, що цей фермент  $\alpha$ -кетоглутарат-залежна діоксигеназа, очищена в своїй нативній формі, деградує 2,4-D і S-дихлорпроп (Westendorf et al., 2002 і 2003). Однак раніше не повідомляли про фермент  $\alpha$ -кетоглутарат-залежної діоксигенази, що має здатність деградувати гербіциди хімічного класу піридиллоксіацетатів. *SdpA* ніколи не експресували в рослинах, не було і мотивації для цього, частково тому, що розробка нових технологій HTC обмежена, головним чином, ефективністю, низькою вартістю і зручністю GTC (Devine, 2005).

З урахуванням нової активності білки і гени за даним винаходом означають в даному описі як білки і гени AAD-12. До теперішнього часу підтверджено, що AAD-12 деградує різноманітні феноксіацетатауксинові гербіциди *in vitro*. Однак, як уперше повідомлено в даному описі, несподівано виявляли, що цей фермент також здатний деградувати додаткові субстрати класу ариллоксіалканоатних молекул. Субстрати значної агрономічної важливості включають піридиллоксіацетатауксинові гербіциди. Це нове відкриття є основою для значних можливостей для стійких до гербіцидів сільськогосподарських культур (HTC) і ознак селективних маркерів. Цей фермент унікальний по своїй здатності виявляти свою гербіцид-деструктивну активність відносно гербіцидів широколистяних рослин широкого спектра (феноксіацетат- і піридиллоксіацетатауксинів).

Таким чином, даний винахід частково стосується деградації 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти, інших феноксіацетатауксинових гербіцидів і піридилкоксіацетатних гербіцидів за допомогою ферменту арилоксіалканоатдіоксигенази (AAD-12), який рекомбінантно експресується. Даний винахід також частково стосується ідентифікації і застосування генів, що

5 кодують деградуєний фермент арилоксіалканоатдіоксигеназу (AAD-12), здатну деградувати фенокси- і/або піридилкоксіауксинові гербіциди.

Фермент за даним винаходом робить можливою трансгенну експресію, що приводить до стійкості до комбінацій гербіцидів, за допомогою яких будуть контролювати майже всі широколистяні бур'яни. AAD-12 може служити як виняткова ознака стійкої до гербіцидів

10 сільськогосподарської культури (НТС) для стекингу з іншими ознаками НТС [наприклад, резистентністю до гліфосату, резистентністю до глюфосинату, резистентністю до ALS-інгібіторів (наприклад, імідазолінону, сульфонілкарбаміду, триазолопіримідин сульфоналіду), резистентністю до бромоксинілу, резистентністю до HPPD-інгібіторів, резистентністю до PPO-інгібіторів і ін.] і, наприклад, ознаками резистентності до комах (Cry1F, Cry1Ab, Cry 34/45, інші

15 білки Bt. або інсектицидні білки, що не походять з *Bacillus*, і ін.). Додатково, AAD-12 може служити як селективний маркер для полегшення селекції первинних трансформантів рослин, генетично сконструйованих з другим геном або групою генів.

Крім того, ген мікроорганізму за даним винаходом перекоструювали таким чином, що білок кодується кодонами, зміщеними у бік їх використання і однодольними, і дводольними

20 рослинами (гемікот). Арабідопсис, кукурудзу, тютюн, бавовну, сою, канолу і рис трансформували з використанням конструкцій, що містять AAD-12, і вони демонстрували високі рівні резистентності до фенокси- і піридилкоксіауксинових гербіцидів. Таким чином, даний винахід також стосується генів, "оптимізованих для рослин", що кодують білки за даним винаходом.

Оксіалканоатні групи застосовні для включення в гербіциди стабільної кислотної функціональної групи. Кислотна група за допомогою "кислотної пастки" може додавати бажану

25 характерну рису дії гербіциду - рухливість у флоемі, і, таким чином, її можна включати в нові гербіциди з метою підвищення рухливості. Аспекти даного винаходу також стосуються механізму отримання НТС. Існує велика кількість потенційних комерційних і експериментальних

30 гербіцидів, які можуть служити як субстрати для AAD-12. Таким чином, застосування генів за даним винаходом також може приводити до стійкості до гербіциду також відносно інших гербіцидів.

Ознаки НТС за даним винаходом можна використовувати в нових комбінаціях з іншими ознаками НТС (включаючи, як необмежувальні приклади, стійкість до гліфосату). Ці комбінації

35 ознак дають початок новим способам контролю видів бур'янів (і т. п.) внаслідок новонабутої резистентності або спадкової стійкості до гербіцидів (наприклад, гліфосату). Таким чином, в доповнення до ознак НТС в об'єм винаходу входять нові способи контролю бур'янів з використанням гербіцидів, стійкість до яких в трансгенних сільськогосподарських культурах досягали за допомогою вказаного ферменту.

Даний винахід можна застосовувати відносно отримання комерційної вигоди з ознаки

40 резистентності до 2,4-D, підданої стекингу, наприклад, з існуючими в цей час ознаками резистентності до гліфосату у сої. Таким чином, даний винахід стосується інструмента для боротьби зі зсувами в популяціях видів широколистяних бур'янів і/або селекції резистентних до гербіцидів широколистяних бур'янів, що досягли широкого поширення внаслідок надто високого

45 довіря сільгоспвиробників відносно гліфосату для контролю бур'янів в різних сільськогосподарських культурах.

Трансгенна експресія генів AAD-12 за даним винаходом представлена як приклад в арабідопсисі, тютюні, сої, бавовні, рисі, кукурудзі і канолі. Соя є переважною

50 сільськогосподарською культурою для трансформації за даним винаходом. Однак даний винахід можна використовувати у множині інших однодольних (таких як пасовищні злаки або газонна трава) і дводольних сільськогосподарських культур, таких як люцерна, конюшина, види дерев і ін. Аналогічно, 2,4-D (або інші субстрати AAD-12) можна більш успішно використовувати у випадку трав'янистих сільськогосподарських культур, в яких стійкість є помірною, і стійкість, підвищена за допомогою цієї ознаки, буде надавати сільгоспвиробникам можливість

55 використання цих гербіцидів в більш ефективних нормах внесення і з більш широким режимом нанесення без ризику пошкодження сільськогосподарських культур.

Крім того, даний винахід стосується одного гена, який може забезпечувати резистентність до гербіцидів, за допомогою яких можна контролювати широколистяні бур'яни. Цей ген можна

60 використовувати у множині сільськогосподарських культур, щоб зробити можливим використання комбінації гербіцидів широкого спектра. За допомогою даного винаходу також

можна контролювати бур'яни, резистентні до існуючих в цей час хімічних речовин, і він може допомагати контролювати зсуви популяцій бур'янів, які виникають внаслідок існуючих в цей час агрономічних технологій. AAD-12 за даним винаходом також можна використовувати в спробах ефективно детоксифікувати додаткові гербіцидні субстрати в негербіцидні форми. Таким чином, даний винахід стосується розробки додаткових ознак НТС і/або технології селективних маркерів.

Окремо або в доповнення до використання генів за даним винаходом для отримання НТС, гени за даним винаходом також можна використовувати як селективні маркери для успішної селекції трансформантів в культурах клітин, теплицях і в польових умовах. Гени за даним винаходом мають надто важливе значення просто як селективний маркер для біотехнологічних проєктів. Недиференційована дія AAD-12 відносно інших арилоксиалканоксифенових гербіцидів надає множини можливостей для використання цього гена з метою отримання НТС і/або селективного маркера.

Не можна просто описати термін "резистентність" і не використати дієслово "мати стійкість" або прикметник "стійкий". У цій галузі витрачена незліченна кількість годин в дебатах про терміни "стійкі до гербіцидів сільськогосподарські культури" (НТС) і "резистентні до гербіцидів сільськогосподарські культури" (HRC). НТС є переважним терміном в цій галузі. Однак, офіційним визначенням "резистентності" згідно з Weed Science Society of America є "природжена здатність рослини виживати і розмножуватися після впливу дози гербіциду, в нормі летальній для рослини дикого типу. У рослин резистентність може бути природною або яка індукується за допомогою таких технологій, як генна інженерія або селекція варіантів, здійснювана за допомогою культури тканин або мутагенезу". Як застосовують в даному описі, якщо не указано інакше, "резистентність" до гербіциду є спадковою і дозволяє рослині рости і розмножуватися в присутності типової гербіцидно-ефективної обробки за допомогою гербіциду для вказаної рослини, як запропоновано в останньому, на момент подачі даної заявки, виданні Herbicide Handbook. Як вважають фахівці в цій галузі, рослину все одно можна вважати "резистентною", навіть якщо очевидна деяка міра пошкодження рослини внаслідок обробки гербіцидом. Як застосовують в даному описі, термін "стійкість" є більш широким, ніж термін "резистентність", і включає "резистентність", як визначено в даному описі, а також поліпшену здатність конкретної рослини чинити опір різним ступеням пошкодження, що індукується гербіцидами, яке, як правило, відбувається у рослин дикого типу того ж генотипу при тій же дозі гербіциду.

Перенесення функціональної активності в рослинні або бактеріальні системи може включати послідовність нуклеїнової кислоти, кодує амінокислотну послідовність білка за даним винаходом, інтегровану у вектор, експресуючий білок, відповідний для хазяїна, в якому вектор буде знаходитися. Одним зі способів отримання послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує білок з функціональною активністю, є виділення нативного генетичного матеріалу з видів бактерій, які продукують білок, який цікавить, з використанням інформації, що прогнозується з амінокислотної послідовності білка, як представлено в даному описі. Нативні послідовності можна оптимізувати для експресії в рослинах, наприклад, як більш детально описано нижче. Оптимізований полінуклеотид також можна конструювати на основі послідовності білка.

Існує ряд способів отримання білків для застосування за даним винаходом. Наприклад, можна використовувати антитіла проти білків, представлених в даному описі, для ідентифікації і виділення таких білків з суміші білків. Зокрема, можна індукувати антитіла проти частин білків, які є найбільш консервативними або які найбільш розрізняються в порівнянні з іншими спорідненими білками. Потім ці антитіла можна використовувати для конкретної ідентифікації еквівалентних білків з характерною активністю за допомогою імунопреципітації, твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) або імуноблотингу. Антитіла проти білків, представлених в даному описі, або проти еквівалентних білків, або проти фрагментів цих білків можна легко отримувати з використанням стандартних способів. Такі антитіла є аспектом даного винаходу. Антитіла за даним винаходом включають моноклональні і поліклональні антитіла, переважно, продуковані у відповідь на той, який є прикладом або передбачуваний білок.

Фахівцям в цій галузі буде зрозуміло, що білки (і гени) за даним винаходом можна отримувати з різноманітних джерел. Оскільки відомо, що повні оперони деградації гербіцидів кодуються мобільними генетичними елементами, такими як плазміди, а також елементами, що інтегруються в геном, білки за даним винаходом можна отримувати з широкого спектра мікроорганізмів, наприклад, включаючи рекомбінантні бактерії і/або бактерії дикого типу.

Мутантні форми ізолятів бактерій можна отримувати способами, добре відомими в цій галузі. Наприклад, аспорогенні мутанти можна отримувати, піддаючи ізолят мутагенезу з використанням етилметансульфонату (EMS). Мутантні штами також можна отримувати з

використанням ультрафіолетового випромінювання і нітрозогуанідину добре відомими в цій галузі способами.

Білок "з" або що "отримується з" будь-якого з ізолятів за даним винаходом, згаданий або запропонований в даному описі, означає, що білок (або аналогічний білок) можна отримувати з ізоляту або деякого іншого джерела, такого як інший штам бактерій або рослина. "Отриманий з" також має це значення і включає білки, що отримуються з вказаного типу бактерій, наприклад, модифіковані для експресії в рослині. Фахівцям в цій галузі буде зрозуміло, що, беручи до уваги опис бактеріального гена і білка, можна конструювати рослину для отримання білка. Препарати антитіл, зонди нуклеїнових кислот (наприклад, ДНК, РНК або ПНК) і т. п. можна отримувати з використанням полінуклеотидних і/або амінокислотних послідовностей, представлених в даному описі, і використовувати їх для скринінгу і виділення інших споріднених генів з інших (природних) джерел.

Для клонування і секвенування білків і генів, представлених в даному описі, можна використовувати стандартні способи молекулярної біології. Додаткову інформацію можна знайти в Sambrook et al., 1989, включеному в даний опис як посилання.

Полінуклеотиди і зонди: Даний винахід додатково стосується послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодують білки для застосування за даним винаходом. Даний винахід додатково стосується способів ідентифікації і визначення властивостей генів, які кодують білки, що мають бажану гербіцидну активність. У одному з варіантів здійснення даний винахід стосується унікальних нуклеотидних послідовностей, застосованих як зонди для гібридизації і/або праймерів для способів ПЛР. За допомогою праймерів отримують характерні фрагменти генів, які можна використовувати в ідентифікації, визначенні властивостей і/або виділенні конкретних генів, які цікавлять. Нуклеотидні послідовності за даним винаходом кодують білки, відмінні від раніше описаних білків.

Полінуклеотиди за даним винаходом можна використовувати для отримання повних "генів", що кодують білки або пептиди в бажаній клітині-хазяїні. Наприклад, як буде зрозуміло фахівцям в цій галузі, полінуклеотиди за даним винаходом можна відповідним чином вміщувати під контроль промотору в хазяїні, який цікавить, як відомо в цій галузі. Рівень експресії гена і тимчасова/тканиноспецифічна експресія можуть значно впливати на застосовність винаходу. Як правило, більш високі рівні експресії білка деструктивного гена будуть приводити до більш швидкої і більш повної деградації субстрату (в цьому випадку - гербіциду-мішені). Бажано, щоб промотори контролювали експресію гена-мішені на високих рівнях, якщо висока експресія не має подальшого негативного впливу на здоров'я рослини. Як правило, бажано мати ген AAD-12, який конститутивно експресується у всіх тканинах для повного захисту рослини на всіх фазах росту. Однак, альтернативно, можна використовувати ген резистентності, який експресується залежно від фази вегетативного циклу; це дозволить використати гербіцид-мішень в фазу плодоношення для контролю бур'янів і потім контролювати статеве розмноження цільової сільськогосподарської культури за допомогою нанесення протягом фази цвітіння. Крім того, бажані рівні і періоди експресії також можуть залежати від типу рослини і бажаного рівня стійкості. У деяких переважних варіантах здійснення використовують сильні конститутивні промотори в комбінації з енхансерами транскрипції і т. п. для підвищення рівнів експресії і стійкості до бажаних рівнів. Деякі такі варіанти здійснення більш детально описані нижче перед розділом "Приклади".

Як відомо фахівцям в цій галузі, ДНК, як правило, існує в дволанцюжковій формі. У такій структурі один ланцюг комплементарний іншому ланцюгу, і навпаки. Оскільки ДНК реплікується (наприклад) в рослині, продукуються додаткові комплементарні ланцюги ДНК. Термін "кодуючий ланцюг" часто використовують в цій галузі для позначення ланцюга, що зв'язується з антисмисловим ланцюгом. мРНК транскрибується з "антисмислового" ланцюга ДНК. "Смисловий" або "кодуючий" ланцюг має серію кодонів (кодон являє собою три нуклеотиди, які можна читати як одиницю з трьох залишків для позначення конкретної амінокислоти), яка може бути прочитана як відкрита рамка зчитування (ORF) для утворення цікавлячого білка або пептиду. У випадку продукції білка *in vivo* ланцюг ДНК, як правило, транскрибується в комплементарний ланцюг мРНК, що використовується як матриця для білка. Таким чином, даний винахід включає застосування прикладів полінуклеотидів, представлених в прикладеному списку послідовностей, і/або еквівалентів, включаючи комплементарні ланцюги. Даний винахід включає РНК і ПНК (пептид-нуклеїнові кислоти), що є функціонально еквівалентними прикладам молекул ДНК.

Білки і гени для застосування за даним винаходом можна ідентифікувати і отримувати, наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів. Ці зонди є детектованими нуклеотидними послідовностями, які можна визначати за допомогою відповідної мітки, або які

можна отримувати, по суті, флуоресцентними, як описано в міжнародній патентній заявці № WO 93/16094. Зонди (і полінуклеотиди за даним винаходом) можуть являти собою ДНК, РНК або ПНК. У доповнення до аденіну (А), цитозину (С), гуаніну (G), тиміну (Т) і урацилу (U); у випадку молекул РНК), синтетичні зонди (і полінуклеотиди) за даним винаходом також можуть містити інозин (нейтральна основа, здатна спарюватися зі всіма чотирма основами; іноді використовується замість суміші всіх чотирьох основ в синтетичних зондах) і/або інші синтетичні (неприродні) основи. Таким чином, коли в даному описі згадують синтетичний, вироджений олігонуклеотид і, загалом, використовують "N" або "n", "N" або "n" може являти собою G, A, T, C або інозин. Як застосовують в даному описі, невизначені коди відповідають стандартним угодам про номенклатуру IUPAC на момент подачі даної заявки (наприклад, R означає A або G, Y означає C або T і т. д.).

Як добре відомо в цій галузі, якщо молекулу зонда гібридизують із зразком нуклеїнової кислоти, можна розумно передбачити, що зонд і зразок мають істотну гомологію/схожість/ідентичність. Переважно, спочатку здійснюють гібридизацію полінуклеотиду з подальшими промиваннями в умовах зниженої суворості, помірної суворості або в суворих умовах способами, добре відомими в цій галузі, як описано, наприклад, в Keller, G. H., M. M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, N.Y., pp. 169-170. Наприклад, як там указано, умов зниженої суворості можна досягати спочатку промиванням 2-кратним SSC (стандартним цитратно-сольовим буфером)/0,1 % SDS (додецилсульфатом натрію) протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Як правило, здійснюють два промивання. Потім можна досягати більшої суворості, знижуючи концентрацію солі і/або підвищуючи температуру. Наприклад, після вказаного вище промивання можна здійснювати два промивання 0,1-кратним SSC/0,1 % SDS протягом 15 хвилин, кожне при кімнатній температурі, з подальшими промиваннями 0,1-кратним SSC/0,1 % SDS протягом 30 хвилин, кожне при 55 °C. Ці температури можна використовувати з іншими протоколами гібридизації і промивання, приведеними в даному описі і відомими фахівцям в цій галузі (як сіль замість SSC можна використовувати, наприклад, SSPE). 2-кратний SSC/0,1 % SDS можна отримувати, додаючи 50 мл 20-кратного SSC і 5 мл 10 % SDS в 445 мл води. 20-кратний SSC можна отримувати, комбінуючи NaCl (175,3 г/0,150 M), цитрат натрію (88,2 г/0,015 M) і воду, доводячи рН до 7,0 за допомогою 10 N NaOH, а потім доводячи об'єм до 1 літра. 10 % SDS можна отримувати, розчиняючи 10 г SDS в 50 мл автоклавованої води, а потім розбавляючи до 100 мл.

Детекція зонда забезпечує засоби для визначення відомим способом того, чи підтримується гібридизація. Такий аналіз зонда представляє швидкий спосіб ідентифікації генів за даним винаходом. Сегменти нуклеотидів, що використовуються як зонди за винаходом, можна синтезувати з використанням ДНК-синтезатора і стандартних способів. Ці нуклеотидні послідовності також можна використовувати як праймери для ПЛР для ампліфікації генів за даним винаходом.

Гібридизаційні характеристики молекули можна використовувати для визначення полінуклеотидів за даним винаходом. Таким чином, даний винахід включає полінуклеотиди (і/або комплементарні їм полінуклеотиди, переважно, повністю комплементарні їм полінуклеотиди), які гібридизуються з полінуклеотидом, приведеним як приклад в даному описі. Тобто, одним зі способів визначення гена (і білка, що кодується їм), наприклад, є визначення його здатності гібридизуватися (в будь-яких умовах, конкретно представлених в даному описі) з відомим або конкретно приведеним як приклад геном.

Як застосовують в даному описі, термін "суворі" умови гібридизації стосується умов, за допомогою яких досягають того ж або приблизно того ж ступеня специфічності гібридизації, що і в умовах, які використовуються авторами даного винаходу. Зокрема, гібридизацію іммобілізованої ДНК при Саузерн-блотингу з міченими <sup>32</sup>P специфічними для гена зондами можна здійснювати стандартними способами (див., наприклад, Maniatis et al. 1982). У основному, гібридизацію і подальші промивання можна здійснювати в умовах, що дозволяють визначати послідовності-мішені. У випадку дволанцюжкових ДНК-зондів до гена гібридизацію можна здійснювати протягом ночі при температурі на 20-25 °C нижче за температуру плавлення (T<sub>m</sub>) гібрида ДНК в 6-кратному SSPE, 5-кратному розчині Денхардта, 0,1 % SDS, 0,1 мг/мл денатурованої ДНК.

Як правило, промивання можна здійснювати таким чином: (1) двічі при кімнатній температурі протягом 15 хвилин в 1-кратному SSPE, 0,1 % SDS (промивання в умовах зниженої суворості); і (2) один раз при T<sub>m</sub>-20 °C протягом 15 хвилин в 0,2-кратному SSPE, 0,1 % SDS (промивання в умовах помірної суворості).



У випадку олігонуклеотидних зондів гібридизацію можна здійснювати протягом ночі при температурі на 10-20 °C нижче температури плавлення ( $T_m$ ) гібрида в 6-кратному SSPE, 5-кратному розчин Денхардта, 0,1 % SDS, 0,1 мг/мл денатурованої ДНК.

5 Як правило, промивання можна здійснювати таким чином: (1) двічі при кімнатній температурі протягом 15 хвилин в 1-кратному SSPE, 0,1 % SDS (промивання в умовах зниженої суворості); і (2) один раз при температурі гібридизації протягом 15 хвилин в 1-кратному SSPE, 0,1 % SDS (промивання в умовах помірної суворості).

10 У основному, для зміни суворості можна змінювати сіль і/або температуру. У випадку міченого фрагмента ДНК довжиною >70 основ або близько того, можна використовувати наступні умови: (1) зниженої суворості: 1- або 2-кратний SSPE, кімнатна температура; (2) зниженої суворості: 1- або 2-кратний SSPE, 42 °C; (3) помірної суворості: 0,2- або 1-кратний SSPE, 65 °C, або (4) суворі умови: 0,1-кратний SSPE, 65 °C.

15 Утворення і стабільність дуплекса залежать від фактичної комплементарності між двома ланцюгами гібрида і, як показано вище, можна допускати деякий ступінь неспівпадіння. Таким чином, послідовності зондів за даним винаходом включають мутації (одиначні і множинні), делеції, інсерції в послідовностях, що описуються, і їх комбінації, де вказані мутації, інсерції і делеції роблять можливим утворення стабільних гібридів з полінуклеотидом-мішенню, який цікавить. Мутації, інсерції і делеції можна отримувати у вказаній полінуклеотидній послідовності множиною способів, і ці способи, як правило, відомі фахівцям в цій галузі. Інші способи можуть стати відомими в майбутньому.

20 Технологія ПЛР: Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) являє собою повторюваний, ферментативний, примований синтез послідовності нуклеїнової кислоти. Цей спосіб добре відомий і загальновикористовуваний серед фахівців в цій галузі (див. Mullis, патенти США №№ 4683195, 4683202, і 4800159; Saiki et al., 1985). ПЛР основана на ферментативній ампліфікації фрагмента ДНК, який цікавить, фланкованого двома олігонуклеотидними праймерами, які гібридизуються на протилежних ланцюгах послідовності-мішені. Переважно, праймери орієнтовані по 3'-кінцях, направлених один проти одного. Повторювані цикли термічної денатурації матриці, відпалу праймерів на комплементарних їм послідовностях і елонгації відпалених праймерів за допомогою ДНК-полімерази приводять до ампліфікації сегмента, що визначається по 5'-кінцях праймерів для ПЛР. Продукт елонгації кожного праймера може служити як матриця для інших праймерів, таким чином, в кожному циклі подвоюється кількість фрагмента ДНК, що утворилася в попередньому циклі. Це приводить до експонентного накопичення конкретного фрагменту-мішені в декілька мільйонів разів за декілька годин. Використовуючи термостабільну ДНК-полімеразу, таку як Taq-полімеразу, виділена з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*, можна повністю автоматизувати ампліфікацію. Інші ферменти, які можна використовувати, відомі фахівцям в цій галузі.

35 Приклади послідовності ДНК або їх сегменти можна використовувати як праймери для ПЛР-ампліфікації. При здійсненні ПЛР-ампліфікації можна допускати певний ступінь неспівпадіння між праймерами і матрицею. Таким чином, мутації, делеції, і інсерції (особливо додавання нуклеотидів на 5'-кінець) прикладів праймерів входять в об'єм даного винаходу. У вказаному праймері можна здійснювати мутації, інсерції і делеції способами, як правило, відомими фахівцям в цій галузі.

40 Модифікація генів і білків: Гени і білки за даним винаходом можна піддавати злиттю з іншими генами і білками для отримання химерних або злитих білків. Гени і білки, застосовні за даним винаходом, включають не тільки конкретно приведені як приклади повнорозмірні послідовності, але також частини, сегменти і/або фрагменти (включаючи суміжні фрагменти і варіанти з внутрішніми і/або кінцевими делеціями в порівнянні з повнорозмірними молекулами) цих послідовностей, їх варіанти, мутантні, химерні і злиті форми. Білки за даним винаходом можуть містити заміни амінокислот за умови, що вони зберігають бажану функціональну активність. "Варіанти" генів мають нуклеотидні послідовності, які кодують ті ж білки або еквівалентні білки, що мають активність, еквівалентну або схожу з білком, приведеним як приклад.

50 Два кращих результати пошуків за допомогою BLAST з використанням нативної нуклеотидної послідовності aad-12 демонструють достатній рівень гомології (приблизно 85 %) по 120 парах основ в послідовності. Можна очікувати, що гібридизація в конкретних умовах буде включати ці дві послідовності. Див. GENBANK реєстр. №№ DQ406818.1 (89329742; *Rhodospirillum rubrum*) і AJ6288601.1 (44903451; *Sphingomonas*). *Rhodospirillum rubrum* дуже схожа з *Delftia*, але *Sphingomonas* філогенетично представляє абсолютно інший клас.

60 Терміни "варіанти білків" і "еквівалентні білки" стосуються білків, що мають ту ж або, по суті, ту ж біологічну/функціональну активність проти субстратів-мішеней і еквівалентні послідовності

відносно білків, приведених як приклади. Як застосовують в даному описі, посилання на "еквівалентну" послідовність стосується послідовностей, що містять заміни амінокислот, делеції, додатки або інсерції, які поліпшують або не впливають на активність значною мірою несприятливо. Фрагменти, що зберігають активність також включені в це визначення.

5 Фрагменти і інші еквіваленти, що зберігають ту ж або аналогічну функцію або активність, що і відповідний фрагмент білка, приведеного як приклад, входять в об'єм даного винаходу. Зміни, такі як заміни амінокислот або додавання, можна здійснювати в різних цілях, таких як підвищення (або зниження) протеазної стабільності білка (без значного/істотного зниження функціональної активності білка), видалення або додавання ділянки рестрикції і т. п. Варіанти генів можна легко конструювати, наприклад, з використанням стандартних способів отримання точкових мутацій.

Крім того, наприклад, в патенті США № 5605793 описують способи отримання додаткової молекулярної різноманітності з використанням реасемблювання ДНК після випадкової або направленої фрагментації. Це можна позначати як "перетасовування" генів, як правило, що  
15 включає змішування фрагментів (бажаного розміру) двох або більше різних молекул ДНК з подальшими повторюваними раундами ренатурації. Це може поліпшувати активність білка, що кодується вихідним геном. Результатом є химерний білок, що має поліпшену активність, змінену субстратну специфічність, підвищену ферментативну стабільність, змінену стереоспецифічність або інші характеристики.

20 "Перетасовування" можна планувати і направляти після отримання і дослідження атомних 3D (тривимірних) координат і кристалічної структури білка, який цікавить. Таким чином, "направлене перетасовування" можна направляти на конкретні сегменти білка, ідеальні для модифікації, такі як сегменти, що експонуються на поверхні, і, переважно, не внутрішні сегменти, що беруть участь у фолдингу білка і важливі для 3D структурної цілісності.

25 Конкретні зміни в "активному центрі" ферменту можна здійснювати для впливу на властиву йому функціональність відносно активності або стереоспецифічності. Muller et. al. (2006). Відому кристалічну структуру tauD використовували як модель діоксигенази для визначення залишків активного центра, в той час як він був пов'язаний зі своїм характерним субстратом таурином. Elkins et al. (2002) "X-ray crystal structure of Escherichia coli taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase  
30 complexed to ferrous iron and substrates, " Biochemistry 41(16):5185-5192. Що стосується оптимізації послідовності і конструювання активних центрів ферменту, див. Chakrabarti et al., PNAS, (Aug. 23, 2005), 102(34): 12035-12040.

Фрагменти повнорозмірних генів можна отримувати стандартними способами з використанням комерційно доступних екзонуклеаз або ендонуклеаз. Наприклад, для  
35 систематичного відщеплення нуклеотидів з кінців цих генів можна використовувати ферменти, такі як Bal31, або сайт-специфічний мутагенез. Крім того, гени, що кодують активні фрагменти, можна отримувати з використанням різних ферментів рестрикції. Щоб напряду отримувати активні фрагменти цих білків, можна використовувати протеази.

Як представлено в даному описі, в об'єм винаходу входить те, що білки можуть бути  
40 укороченими і все одно зберігати функціональну активність. Термін "укорочений білок" означає, що можна відщеплювати частину білка, в той час як інший укорочений білок після розщеплення зберігає і виявляє бажану активність. Розщеплення можна здійснювати з використанням різних протеаз. Крім того, ефективно розщеплені білки можна отримувати способами молекулярної біології, де основи ДНК, що кодує вказаний білок, видаляють за допомогою обробки  
45 рестрикційними ендонуклеазами, або іншими способами, доступними фахівцям в цій галузі. Після укорочення вказані білки можна експресувати в гетерологічних системах, таких як E. coli, бакуловіруси, системи на основі вірусів рослин, дріжджі і т. п., а потім вміщувати в системи аналізу на основі клітин комах, як представлено в даному описі, для визначення активності. У цій галузі добре відомо, що можна успішно отримувати укорочені білки таким чином, що вони  
50 зберігають функціональну активність, маючи меншу послідовність, ніж повнорозмірна послідовність. Наприклад, білки B.t. можна використовувати в укороченій формі (коровий білок) (див., наприклад, Hofte et al. (1989), і Adang et al. (1985)). Як застосовують в даному описі, термін "білок" може включати функціонально активні укорочені форми.

Як застосовують в даному описі, якщо не указано інакше, процент ідентичності і/або  
55 подібності послідовності двох нуклеїнових кислот визначають з використанням алгоритму Karlin and Altschul, 1990, модифікованого, як указано в Karlin and Altschul, 1993. Такий алгоритм включений в програми NBLAST і XBLAST Altschul et al., 1990. Нуклеотидні пошуки в BLAST здійснюють з використанням програми NBLAST, вага збігів=100, довжина "слова"=12. Можна використовувати Gapped BLAST, як описано в Altschul et al., 1997. При використанні програм  
60 BLAST і Gapped BLAST використовують параметри відповідних програм за умовчанням

(NBLAST і XBLAST). Див. веб-сайт NCBI/NIH. З метою порівняння для отримання вирівнювання з пропусками використовували функцію AlignX Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, Md., U.S.A.) з параметрами за умовчанням. Вони були наступними: штраф за відкриття пропуску - 15, штраф за подовження пропуску - 6,66, і штраф за розділення пропуску - 8.

5

Таблиця 1

Клас амінокислот	Приклади амінокислот
Неполярні	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Незаряджені полярні	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Кислі	Asp, Glu
Основні	Lys, Arg, His

Також можна змінювати різні властивості і тривимірні межі білка без несприятливого впливу на його активність/функціональність. Консервативні амінокислотні заміни можна допускати/включати таким чином, щоб не впливати несприятливо на активність і/або тривимірну конфігурацію молекули. Амінокислоти можна розділяти на наступні класи: неполярні, незаряджені полярні, основні і кислі. Консервативні заміни, при яких амінокислоту одного класу замінюють іншою амінокислотою того ж типу, потрапляють в об'єм даного винаходу за умови, що заміна не впливає несприятливо на біологічну активність сполуки. У таблиці 1 представлений список прикладів амінокислот, що належать до кожного класу. У деяких випадках також можна здійснювати неконсервативні заміни. Однак переважні заміни не змінюють значно функціональну/біологічну активність білка.

Як застосовують в даному описі, посилання на "виділені полінуклеотиди і/або "очищені" білки стосується цих молекул, коли вони не пов'язані з іншими молекулами, з якими їх виявляють в природі. Таким чином, посилання на "виділені" і/або "очищені" означає участь "рук людини", як представлено в даному описі. Наприклад, бактеріальний "ген" за даним винаходом, вміщений в рослину для експресії, є "виділеним полінуклеотидом". Аналогічно, білок, отриманий з бактеріального білка і продукований рослиною, є "виділеним білком".

Внаслідок виродженості/надмірності генетичного коду амінокислотні послідовності, представлені в даному описі, можуть кодуватися множиною різних послідовностей ДНК. Фахівець в цій галузі може отримувати альтернативні послідовності ДНК, що кодують однакові або, по суті, однакові білки. Ці варіанти послідовностей ДНК входять в об'єм даного винаходу. Це більш детально описано нижче в розділі під назвою "Оптимізація послідовності для експресії в рослинах".

Оптимізація послідовності для експресії в рослинах: Для досягнення високого рівня експресії гетерологічних генів в рослинах, як правило, переважно реконструювати гени таким чином, щоб вони більш ефективно експресувались в рослинних клітинах (цитоплазмі). Кукурудза є однією з таких рослин, в яких переважним може бути реконструювання гетерологічних генів перед трансформацією для підвищення рівня їх експресії у вказаній рослині. Таким чином, додатковим етапом в конструюванні генів, що кодують бактеріальний білок, є реконструювання гетерологічного гена для оптимальної експресії з використанням відхилення частоти використання кодонів, більш відповідної послідовності-мішені рослини, що належить до дводольних або однодольних видів. Послідовності також можна оптимізувати для експресії в будь-якому з більш конкретних типів рослин, що обговорюються де-небудь в даному описі.

Трансгенні хазяїни: Гени за даним винаходом, кодуючі білки, можна вбудовувати в широкий спектр мікроорганізмів- або рослин-хазяїв. Даний винахід включає трансгенні рослинні клітини і трансгенні рослини. Переважними рослинами (і рослинними клітинами) є кукурудза, арабідопсис, тютюн, соя, бавовна, канولا, рис, пшениця, газонна трава, бобово-злакові рослини (наприклад, люцерна і конюшина), пасовищні злаки і т. п. За даним винаходом також можна отримувати інші типи трансгенних рослин, такі як плодові рослини, овочеві культури, декоративні рослини і дерева. Загалом, в різних аспектах за даним винаходом можна використовувати дводольні і/або однодольні рослини.

У переважних варіантах здійснення експресія гена, прямо або опосередковано, приводить до внутрішньоклітинної продукції (і збереження) білків, які цікавлять. Таким чином, рослини можна робити резистентними до гербіцидів. Таких хазяїв можна позначати як трансгенні, рекомбінантні, трансформовані і/або трансфіковані хазяїни і/або клітини. У деяких аспектах за даним винаходом (наприклад, при клонуванні і отриманні гена, який цікавить) клітини мікроорганізмів (переважно, бактерій) можна отримувати і використовувати стандартними способами з вигодою розкриття предмета винаходу.

Рослинні клітини, трансфіковані з використанням полінуклеотиду за даним винаходом, можна піддавати регенерації в цілі рослини. Даний винахід включає культури клітин, включаючи культури клітин тканин, рідкі культури і культури на твердому середовищі. Насіння, які продукуються і/або використовуються для отримання рослин за даним винаходом, також

5

входять в об'єм даного винаходу. Інші рослинні тканини і частини також включені в даний винахід. Даний винахід аналогічно включає способи отримання рослин або клітин, що містять полінуклеотид за даним винаходом. Одним з переважних способів отримання таких рослин є посадка насіння за даним винаходом.

Хоча рослини можуть бути переважними, даний винахід також включає продукцію

10

високоактивної рекомбінантної AAD-12, наприклад, в штамі-акцепторі *Pseudomonas fluorescens* (Pf). Даний винахід включає переважні температури зростання для підтримки розчинної активної AAD-12 в цьому хазяїні; умови ферментації, в яких AAD-12 продукується як більше 40 % загального білка клітини або щонайменше 10 г/л; спосіб очищення, що приводить до ефективного виділення активної рекомбінантної AAD-12 з Pf-хазяїна; схему очищення, вихід якої становить щонайменше 10 г активної AAD-12 на кг клітин; схему очищення, вихід якої може становити 20 г активної AAD-12 на кг клітин; спосіб складання, при якому можна зберігати AAD-12 і відновлювати її активність в розчині; і спосіб ліофілізації, при якому можна зберігати активність AAD-12 для тривалого зберігання і терміну придатності.

15

Вбудовування генів для отримання трансгенних хазяїв: Одним з аспектів даного винаходу є трансформація/трансфекція рослин, рослинних клітин і інших клітин-хазяїв з використанням полінуклеотидів за даним винаходом, з яких експресуються білки за даним винаходом. Рослини, трансформовані таким чином, можна робити резистентними до різних гербіцидів з різними механізмами дії.

20

Доступний широкий спектр способів вбудовування гена, що кодує бажаний білок, в хазяїна-мішень в умовах, що роблять можливим стабільне збереження і експресію гена. Ці способи добре відомі фахівцям в цій галузі і описані, наприклад, в патенті США № 5135867.

25

Вектори, що містять полінуклеотид AAD-12, включені в об'єм даного винаходу. Наприклад, для підготовки до вбудовування чужорідних генів у вищі рослини доступна велика кількість клонуючих векторів, що містять систему реплікації в *E. coli* і маркер, що робить можливою селекцію трансформованих клітин. Вектори включають, наприклад, pBR322, серію pUC, серію M13 mp, pACYC184, і т. д. Таким чином, послідовність, яка кодує білок, можна вбудовувати у вектор у відповідну ділянку рестрикції. Отриману плазмиду використовують для трансформації *E. coli*. Клітини *E. coli* культивують у відповідному поживному середовищі, потім збирають і лізують. Плазмиду виділяють за допомогою очищення від геномної ДНК. Як способи аналізу, як правило, здійснюють, аналіз послідовності, рестрикційний аналіз, електрофорез і інші способи біохімії і молекулярної біології. Після кожної маніпуляції використовуювану послідовність ДНК можна рестрикувати і з'єднувати з наступною послідовністю ДНК. Послідовність кожної плазмиди можна клонувати в однакові або різні плазмиди. Залежно від способу вбудовування бажаних генів в рослину, необхідними можуть бути інші послідовності ДНК. Наприклад, якщо для трансформації рослинної клітини використовують плазмиду Ti або Ri, то, щонайменше, правий край, але часто і правий край, і лівий край Т-ДНК плазмиди Ti або Ri необхідно з'єднувати у вигляді фланкуючих областей генів, що підлягають вбудовуванню. Використання Т-ДНК для трансформації рослинних клітин активно досліджують і описують в EP 120 516; Hoeskema (1985); Fraley et al. (1986); і An et al. (1985).

30

35

Для вбудовування ДНК в рослинну клітину хазяїна доступна велика кількість способів. Ці способи включають трансформацію за допомогою Т-ДНК з використанням *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* як об'єктів трансформації, злиття, ін'єкцію, білістику (бомбардування мікрочастинками), використання віскерів карбіду кремнію, обробку аерозольним шляхом, PEG або електропорацію, а також інші можливі способи. При використанні *Agrobacteria* для трансформації, ДНК, що підлягає вбудовуванню, необхідно клонувати в спеціальні плазмиди, а саме в проміжний вектор або бінарний вектор. Проміжні вектори можна вбудовувати в плазмиду Ti або Ri за допомогою гомологічної рекомбінації завдяки послідовностям, гомологічним послідовностям в Т-ДНК. Плазмиди Ti або Ri також містять *vir*-область, необхідну для перенесення Т-ДНК. Проміжні вектори не можуть самостійно реплікуватися в *Agrobacteria*. Проміжний вектор можна перенести в *Agrobacterium tumefaciens* за допомогою плазмиди-помічника (кон'югації). Бінарні вектори можуть самостійно реплікуватися і в *E. coli*, і в *Agrobacteria*. Вони містять ген селективного маркера і лінкер або полілінкер, фланковані правою і лівою крайовими областями Т-ДНК. За допомогою них можна напяму трансформувати *Agrobacteria* (Holsters, 1978). *Agrobacterium*, що використовується як клітина-хазяїн, повинна містити плазмиду, яка несе *vir*-область. *Vir*-область необхідна для перенесення

45

50

55

60

Т-ДНК в рослинну клітину. Можна включати додаткову Т-ДНК. Трансформовану таким чином бактерію використовують для трансформації рослинних клітин. Для перенесення ДНК в рослинну клітину рослинні експлантати можна культивувати переважно з *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes*. Потім у відповідному середовищі, яке може містити

антибіотики або біоциди для селекції, з інфікованого рослинного матеріалу (наприклад, шматочків листя, сегментів стебла, коріння, а також протопластів або клітин, що культивуються в суспензії) можна здійснювати регенерацію цілих рослин. Потім рослини можна тестувати на наявність вбудованої ДНК. У випадку ін'єкції і електропорації для плазмід немає спеціальних вимог. Можна використовувати загальноприйняті плазмідні, такі як, наприклад, похідні pUC.

Трансформовані клітини ростуть всередині рослин звичайним чином. Вони можуть утворювати статеві клітини і передавати трансформовані ознаки потомству рослин. Такі рослини можна вирощувати загальноприйнятим чином і схрещувати з рослинами, що мають ті ж трансформовані спадкові чинники або інші спадкові чинники. Отримані гібридні особні мають відповідні фенотипові властивості. У деяких переважних варіантах здійснення винаходу гени, що кодують бактеріальний білок, експресуються з транскрипційних одиниць, вбудованих в геном рослини. Переважно, вказаними транскрипційними одиницями є рекомбінантні вектори, які здатні до стабільної інтеграції в геном рослини і роблять можливою селекцію ліній трансформованих рослин, які експресують мРНК, що кодує білки.

При вбудовуванні ДНК інтегрується в геном і є в ньому відносно стабільною (і не виходить назад). У нормі вона містить селективний маркер, що додає трансформованим рослинним клітинам резистентності до біоциду або антибіотику, такому як, крім іншого, канаміцин, G418, блеоміцин, гігроміцин або хлорамфеникол. Селективні маркери рослин, як правило, також можуть додавати резистентності до різних гербіцидів, таких як глүфосинат (наприклад, PAT/bar), гліфосат (EPSPS), інгібітори ALS (наприклад, імідазолінон, сульфонілкарбамід, триазолопіримідин сульфонанлід і ін.), бромоксиніл, резистентності до інгібіторів HPPD, інгібіторів PPO, інгібіторів ACC-ase і багатьох інших. Таким чином, використовуваний окремо маркер повинен робити можливою селекцію трансформованих клітин, а не клітин, що не містять вбудовану ДНК. Переважно, гени, які цікавлять, експресуються в рослинній клітині за допомогою конститутивних або індукційних промоторів. При експресії мРНК транскрибується в білки, таким чином, амінокислоти, які цікавлять, вбудовуються в білок. Гени, що кодують білок, який експресується в рослинних клітинах, можуть знаходитися під контролем конститутивного промотору, тканиноспецифічного промотору або індукційного промотору.

Існує декілька способів вбудовування чужорідних рекомбінантних векторів в рослинні клітини і отримання рослин, що стабільно зберігають і експресують вбудований ген. Такі способи включають вбудовування генетичного матеріалу, яким покривають мікрочастинки, безпосередньо в клітини (патенти США №№ 4945050 Cornell і 5141131 DowElanco, в цей час Dow AgroSciences, LLC). Крім того, рослини можна трансформувати за допомогою технології з використанням *Agrobacterium*, див. патенти США №№ 5177010 University of Toledo; 5104310 Texas A&M; європейську патентну заявку № 0131624B1; європейські патентні заявки №№ 120516, 159418B1 і 176112 Schilperoot; патенти США №№ 5149645, 5469976, 5464763, 4940838 і 4693976 Schilperoot; європейські патентні заявки №№ 116718, 290799, 320500 Max Planck; європейські патентні заявки №№ 604662 і 627752 і патент США № 5591616 Japan Tobacco; європейські патентні заявки №№ 0267159 і 0292435 і патент США № 5231019 Ciba Geigy, в цей час Syngenta; патенти США №№ 5463174 і 4762785 Calgene; і патенти США №№ 5004863 і 5159135 Agracetus. Інша технологія трансформації включає технологію з використанням віскерів. Див. патенти США №№ 5302523 і 5464765 Zeneca, в цей час Syngenta. Інша технологія трансформації з прямою доставкою ДНК включає технологію aerosol beam. Див. патент США № 6809232. Для трансформації рослин також використовують технологію електропорації. Див. WO 87/06614 Boyce Thompson Institute; патенти США №№ 5472869 і 5384253 Dekalb; і WO 92/09696 і WO 93/21335 Plant Genetic Systems. Крім того, для отримання трансгенних рослин, які експресують білок, який цікавить, також можна використовувати вірусні вектори. Наприклад, однодольні рослини можна трансформувати за допомогою вірусного вектора з використанням способів, що описуються в патенті США № 5569597 Mycogen Plant Science і Ciba-Geigy (в цей час Syngenta), а також патентах США №№ 5589367 і 5316931 Biosource, в цей час Large Scale Biology.

Як указано вище, спосіб, яким конструкцію ДНК вбудовують в рослину-хазяїна, не є критичним для даного винаходу. Можна використовувати будь-який спосіб, що забезпечує ефективну трансформацію. Наприклад, різні способи трансформації рослинних клітин представлені в даному описі і включають використання плазмід Ti або Ri і т. п. для здійснення опосередкованої *Agrobacterium* трансформації. У багатьох випадках бажано мати конструкцію,

що використовується для трансформації, яка фланкується з однієї або обох сторін крайовими областями Т-ДНК, більш конкретно - правою крайовою областю. Особливо корисно, коли для конструкції як спосіб трансформації використовують трансформацію, опосередковану *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes*, хоча крайові області Т-ДНК можуть знайти застосування в інших способах трансформації. При використанні *Agrobacterium* для трансформації рослинних клітин можна використовувати вектор, який можна вбудовувати в хазяїна для гомологічної рекомбінації з Т-ДНК або плазмідною Ті або Ri, присутніх в хазяїні. Вбудовування вектора можна здійснювати за допомогою електропорації, трибатьківського схрещування і інших способів трансформації грамнегативних бактерій, відомих фахівцям в цій галузі. Спосіб трансформації *Agrobacterium*-хазяїна з використанням вектора не є критичним для даного винаходу. Плазміда Ті або Ri, що містить Т-ДНК для рекомбінації, може бути здатна або нездатна спричиняти утворення галів і не є критичною для вказаного винаходу за умови, що у вказаному хазяїні присутні віг-гени.

У деяких випадках при використанні *Agrobacterium* для трансформації експресуючу конструкцію всередині крайових областей Т-ДНК будуть вбудовувати в широкий спектр векторів, таких як рRK2 або його похідні, як описано в Ditta et al. (1980) і ЕРО 0 120 515. У експресуючу конструкцію і Т-ДНК будуть включати один або декілька маркерів, як представлено в даному описі, що роблять можливою селекцію трансформованих *Agrobacterium* і трансформованих рослинних клітин. Конкретний використовуваний маркер не є суттєвим для даного винаходу, при цьому переважний маркер залежить від використовуваного хазяїна і конструкції.

Для трансформації рослинних клітин з використанням *Agrobacterium* експлантати можна комбінувати і інкубувати з трансформованими *Agrobacterium* протягом періоду часу, достатнього, щоб зробити можливою їх трансформацію. Після трансформації *Agrobacteria* знищують за допомогою селекції з використанням відповідного антибіотика і культивують рослинні клітини з відповідним селективним середовищем. Після утворення калюсів можна стимулювати утворення пагонів, використовуючи відповідні рослинні гормони, способами, добре відомими в галузі культивування рослинних тканин і регенерації рослин. Однак проміжна стадія калюсу не завжди є обов'язковою. Після утворення пагонів вказані рослинні клітини можна перенести в середовище, яке стимулює утворення кореня, таким чином, завершуючи регенерацію рослини. Потім рослини можна вирощувати для отримання насіння і вказане насіння можна використовувати для отримання майбутніх поколінь. Незалежно від способу трансформації, ген, що кодує бактеріальний білок, переважно, вбудовують у вектор для перенесення гена, адаптований для експресії вказаного гена в рослинній клітині за допомогою включення у вектор промоторного регуляторного елемента рослин, а також 3'-нетрансльованих областей термінації транскрипції, такої як Nos і т. п.

У доповнення до численних технологій трансформації рослин також можна варіювати тип тканини, що приводиться в контакт з чужорідними генами. Така тканина буде включати, як необмежувальні приклади, ембріогенну тканину, тканину калюсу типів I, II і III, гіпокотиль, меристему, тканину кореня, тканини для експресії у флоемі і т. п. Майже всі тканини рослин можна трансформувати при дедиференціюванні з використанням відповідних способів, представлених в даному описі.

Як вказано вище, при бажанні можна використовувати множину селективних маркерів. Перевага конкретного маркера залишається на розсуд фахівця в цій галузі, але можна використовувати будь-який з наступних селективних маркерів разом з будь-яким іншим геном, не вказаним в даному описі, який може функціонувати як селективний маркер. Такі селективні маркери включають, як необмежувальні приклади, ген аміноглікозидфосфотрансферази транспозону Tn5 (Aph II), що кодує резистентність до антибіотиків канаміцину, неоміцину і G41; резистентність до гігроміцину; резистентність до метотрексату, а також гени, що кодують резистентність або стійкість до гліфосату; фосфінотрицину (біалафосу або глүфосинату); ALS-інгібуючих гербіцидів (імідазоліонів, сульфонілкарбамідів і триазолопіримідинових гербіцидів), інгібіторів ACC-ase (наприклад, арилоксипропіонатів або циклогександіонів) і ін., таких як бромоксиніл, і інгібіторів HPPD (наприклад, мезотриону) і т. п.

У доповнення до селективного маркера бажаним може бути використання репортерного гена. У деяких випадках репортерний ген можна використовувати з селективним маркером або без нього. Репортерними генами є гени, як правило, не присутні в організмі- або тканині-реципієнті і, як правило, кодуєчі білки, що приводять до деяких фенотипових змін або ферментативної властивості. Приклади таких генів представлені в Weising et al., 1988. Переважні репортерні гени включають ген бета-глюкуронідази (GUS) локусу uidA *E. coli*, ген хлорамфеніколацетилтрансферази з Tn9 *E. coli*, ген зеленого флуоресцентного білка біоломінесцентної медузи *Aequorea victoria* і гени люциферази світляка *Photinus pyralis*. Потім

можна здійснювати аналіз для визначення експресії репортерного гена у відповідний час після вбудовування вказаного гена в реципієнтні клітини. Такий переважний аналіз включає використання гена, що кодує бета-глюкуронідазу (GUS), локусу uidA *E. coli*, як описано в Jefferson et al., (1987), для ідентифікації трансформованих клітин.

У доповнення до промоторних регуляторних елементів рослин в рослинних клітинах для експресії чужорідних генів можна ефективно використовувати промоторні регуляторні елементи з множини джерел. Наприклад, можна використовувати промоторні регуляторні елементи бактеріального походження, такі як промотор октопінсинтази, промотор нопалінсинтази, промотор манопінсинтази; промотори вірусного походження, такі як промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (35S і 19S), 35T (що є реконструйованим промотором 35S, див. патент США № 6166302, особливо приклад 7E) і т. п. Промоторні регуляторні елементи рослин включають, як необмежувальні приклади, промотор малої субодиноці рибулозо-1,6-біфосфат (RUBP)-карбоксилази (ssu), промотор бета-конгліциніну, промотор бета-фазеоліну, промотор ADH, промотори білків теплового шоку і тканиноспецифічні промотори. Можуть бути присутніми інші елементи, такі як послідовності прикріплення до матриксу, послідовності зв'язування з ядерним матриксом, інтрони, енхансери, послідовності поліаденілування і т. п., і, таким чином, можуть поліпшувати ефективність транскрипції або інтеграцію ДНК. Такі елементи можуть бути або не бути необхідними для функціонування ДНК, хоча вони можуть забезпечувати кращу експресію або функціонування ДНК, впливаючи на транскрипцію, стабільність мРНК і т. п. Такі елементи, при бажанні, можна включати в ДНК для досягнення оптимального функціонування трансформованої ДНК в рослині. Типові елементи включають, як необмежувальні приклади, Adh-інтрон 1, Adh-інтрон 6, лідерну послідовність білка оболонки вірусу мозаїки люцерни, послідовності UTR осмотину, лідерну послідовність білка оболонки вірусу смугастості кукурудзи, а також інші, доступні фахівцям в цій галузі. Також можна використовувати конститутивні промоторні регуляторні елементи, таким чином, регулюючи безперервну експресію гена у всіх типах клітин і в будь-який момент часу (наприклад, актин, убіквітин, CaMV 35S і т. п.). Тканиноспецифічні промоторні регуляторні елементи відповідають за експресію гена в конкретних типах клітин або тканин, таких як листя або насіння (наприклад, зеїн, олеозин, напін, ACP, глобулін і т. п.), і їх також можна використовувати.

Промоторні регуляторні елементи також можуть бути активними (або неактивними) протягом конкретної фази росту рослини, а також активними в тканинах і органах рослини. Їх приклади включають, як необмежувальні приклади, специфічні для пилка, ембріоспецифічні, специфічні для кукурудзяних приймочок, специфічні для бавовняного волокна, специфічні для коріння, специфічні для ендосперму насіння і т. п. В конкретних обставинах бажаним може бути використання індукцйбельного промоторного регуляторного елемента, що відповідає за експресію генів у відповідь на конкретний сигнал, такий як: фізичний стимул (гени білків теплового шоку), світло (RUBP-карбоксилаза), гормон (Em), метаболіти, хімічні речовини (чутливі до тетрацикліну) і стрес. Можна використовувати інші бажані транскрипційні і трансляційні елементи, що функціонують в рослинах. У цій галузі відома множина специфічних для рослин векторів для перенесення генів.

Для експресії бактеріального білка також можна використовувати системи на основі РНК-вірусів рослин. При цьому ген, що кодує білок, можна вбудовувати в промоторну область гена білка оболонки відповідного вірусу рослин, яким інфікують рослину-хазяїна, яка цікавить. Потім білок може експресуватися, таким чином, забезпечуючи захист рослини від пошкодження гербіцидів. Системи на основі РНК-вірусів рослин описують в патенті США № 5500360 Mycogen Plant Sciences, Inc. і патентах США №№ 5316931 і 5589367 Biosource, в цей час Large Scale Biology.

Засоби додаткового підвищення рівнів стійкості або резистентності. У даному описі показано, що рослинам за даним винаходом можна додавати нових ознак резистентності до гербіцидів без несприятливих впливів на фенотип, , що спостерігаються, включаючи врожайність. Такі рослини входять в об'єм даного винаходу. Рослини, приведені як приклади і запропоновані в даному описі, можуть витримувати 2-, 3-, 4- і 5-кратні типові норми внесення, наприклад, щонайменше одного гербіциду за даним винаходом. Поліпшення цих рівнів стійкості входять в об'єм даного винаходу. Наприклад, в цій галузі відомі різні способи, і їх передбачувано можна оптимізувати і розробляти далі для підвищення експресії вказаного гена.

Один з таких способів включає підвищення копійності генів AAD-12 за даним винаходом (в експресуючих касетах і т. п.). Трансформовані об'єкти також можна піддавати селекції на користь генів, які мають множину копій.

Можна використовувати сильні промотори і енхансери для "форсування" експресії. Приклади таких промоторів включають переважний промотор 35T, в якому використовують

енхансери 35S. Для таких цілей включені промотори 35S, убіквітину кукурудзи, убіквітину арабідопсису, актину A.t. і CSMV. Також переважними є інші сильні вірусні промотори. Енхансери включають подвійний енхансер 4 OCS і 35S. Для підвищення ефективності трансформації і експресії трансгена також можна використовувати послідовності прикріплення до матриксу (MAR).

Для варіантів здійснення даного винаходу також можна використовувати перетасовування (направлений розвиток) і чинники транскрипції.

Також можна конструювати варіанти білків, відмінні на рівні послідовності, але що зберігають ту ж або схожу з необхідну трипільнувимірну структуру, поверхневий розподіл заряду і т. п. див., наприклад, патент США № 7058515; Larson et al., Protein Sci. 2002 11: 2804-2813, "Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles"; Cramer et al., Nature Biotechnology 15, 436-438 (1997), "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling"; Stemmer, W. P. C. 1994. "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751; Stemmer, W. P. C. 1994. "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" Nature 370: 389-391; Stemmer, W. P. C. 1995. Searching sequence space. Bio/Technology 13: 549-553; Cramer, A., et al. 1996. "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling" Nature Medicine 2: 100-103; and Cramer, A., et al. 1996. "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling" Nature Biotechnology 14: 315-319.

Активність рекомбінантних полінуклеотидів, вбудованих в рослинні клітини, може залежати від впливу ендегенної ДНК рослин, суміжної з вставкою. Таким чином, іншим варіантом є використання переваги об'єктів, про які відомо, що вони є прекрасними ділянками для інсерцій в геномі рослин. Див. наприклад WO 2005/103266 A1, що стосується об'єктів бавовни *scylF* і *scylAc*; геном AAD-12 за даним винаходом можна замінити в локусах генома вставки *scylF* і/або *scylAc*. Таким чином, за даним винаходом можна використовувати, наприклад, направлену гомологічну рекомбінацію. Цей тип технології є об'єктом, наприклад, WO 03/080809 A2 і відповідної опублікованої патентної заявки США № 20030232410, що стосується використання цинкових пальців для направленої рекомбінації. Також відоме використання рекомбінази (наприклад, *cre-10 x i flp-frt*).

Вважають, що детоксифікація AAD-12 відбувається в цитоплазмі. Таким чином, аспекти даного винаходу включають засоби для додаткової стабілізації цього білка і мРНК (включаючи блокування деградації мРНК), і, таким чином, можна використовувати відомі в цій галузі способи. Можна конструювати білки, резистентні до деградації протеазами і т. п. (ділянки розщеплення протеазами можна ефективно видаляти, реконструюючи амінокислотну послідовність білка). Такі варіанти здійснення включають використання 5'- і 3'-структури типу "стебло-петля", таких як UTR з осмотину, і *per5* (AU-багаті 5'-нетрансльовані послідовності). Також можна використовувати 5'-кепи, такі як 7-метил- або 2'-О-метильні групи, наприклад, залишок 7-метилгуанілової кислоти. Див., наприклад: Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 74, No. 7, pp. 2734-2738 (July 1977) Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eucaryotic protein synthesis. Також можна використовувати білкові комплекси або ліганд-блокуючі групи.

У об'ємі даного винаходу також можна здійснювати комп'ютерний дизайн 5'- або 3'-UTR, найбільш прийнятних для AAD-12 (синтетичні шпильки). Комп'ютерне моделювання загалом, а також перетасовування генів і направлений розвиток описують будь-де в даному описі. Більш конкретно, що стосується комп'ютерного моделювання і UTR, способи комп'ютерного моделювання для використання в прогнозуванні/оцінці похідних 5'- і 3'-UTR за даним винаходом включають, як необмежувальні приклади: MFold версії 3.1, доступний в Genetics Corporation Group, Madison, Wis. (див. Zucker et al., Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski & B. F. C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker et al., Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J. Mol. Biol. 288, 911-940 (1999); Zucker et al., RNA Secondary Structure Prediction. In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry S. Beaucage, D. E. Bergstrom, G. D. Glick, and R. A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (аналіз структури РНК з використанням коваріаційних моделей (стохастичних безконтекстних граматичних способів)) v. 2.4.2 (Eddy & Durbin, Nucl. Acids Res. 1994, 22: 2079-2088) вільно поширюваний як початкова програма і який можна завантажувати за допомогою доступу до веб-сайту [genetics.wustl.edu/eddy/software/](http://genetics.wustl.edu/eddy/software/), і FOLDALIGN, також вільно поширюваний і доступний для завантаження на веб-сайті [bioinf.au.dk.FOLDALIGN/](http://bioinf.au.dk/FOLDALIGN/) (див. Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences. J. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. Nucleic Acids Research, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732, 1997; Finding



Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences. J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. ISMB 5; 120-123, 1997).

Варіанти здійснення за даним винаходом можна використовувати в комбінації з природно розвиненими або хімічно індукованими мутантами (мутантів можна піддавати селекції за допомогою способів скринінгу, а потім трансформувати з використанням AAD-12 і, можливо, інших генів). Можна комбінувати рослини за даним винаходом з резистентністю до ALS і/або розвиненою резистентністю до гліфосату. Резистентність до амінопіраліду, наприклад, також можна комбінувати або "піддавати стекингу" з геном AAD-12.

Загальноприйняті способи схрещування також можна комбінувати з даним винаходом для отримання сильної комбінації, інтрогресії і поліпшення бажаних ознак.

Додаткові поліпшення також включають використання разом з відповідними антидотами для додаткового захисту рослин і/або для надання перехресної резистентності до більшої кількості гербіцидів. Антидоти, як правило, діють, посилюючи імунну систему рослин за допомогою активації/експресії cP450. Антидоти є хімічними засобами, що знижують фітотоксичність гербіцидів відносно сільськогосподарських культур за допомогою фізіологічного або молекулярного механізму, не порушуючи ефективність контролю бур'янів.

Антидоти гербіцидів включають беноксакор, клоквінтоцет, ціометриніл, дихлормід, дициклонон, діетолат, фенхлоразол, фенклорим, флуразол, флуксофеним, фурилазол, ізоксадифен, мефенпір, мефенат, нафтойний ангідрид і оксабетриніл. У варіантах здійснення даного винаходу також можна використовувати рослинні активатори (новий клас сполук, що захищають рослини за допомогою активації їх механізмів захисту). Вони включають ацибензолар і пробеназол.

Можна використовувати комерційно доступні антидоти для захисту великонасінних трав'янистих сільськогосподарських культур, таких як кукурудза, сорго звичайне і культура рису, що висівається у воду, при нанесенні передпосівних або передсходових гербіцидів з сімейств тіокарбамату і хлорацетаніліду. Також розробляють антидоти для захисту озимих зернових сільськогосподарських культур, таких як пшениця, при післясходовому нанесенні арилоксифеноксипропіонатних і сульфонілкарбамідних гербіцидів. Також добре відоме використання антидотів для захисту кукурудзи і рису від гербіцидів сульфонілкарбаміду, імідазолінону, циклогександіону, ізоксазолу і трикетону. Індуковане антидотом підвищення детоксифікації гербіциду в захищених рослинах широко визнають як основний механізм дії антидота. Антидоти індують кофактори, такі як глутатіон і гербіцид-детоксифікуючі ферменти, такі як глутатіон-S-трансферази, цитохром-P450-монооксигенази і глюкозилтрансферази. Hatzios KK, "Burgos N (2004) Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners, " Weed Science: Vol. 52, No. 3 pp. 454-467.

Використання гена цитохром-p450-монооксигенази, підданого стекингу з AAD-12, є одним з переважних варіантів здійснення. Існують P450, що беруть участь в метаболізмі гербіцидів; cP450 може мати, наприклад, походження з ссавця або рослинне походження. Відомо, що у вищих рослин цитохром-P450-монооксигеназа (P450) здійснює повторний метаболізм. Вона також відіграє важливу роль в окислювальному метаболізмі ксенобіотиків у взаємодії з NADPH-цитохром-P450-оксидоредуктазою (редуктазою). Повідомляють, що резистентність до деяких гербіцидів є результатом метаболізму за допомогою P450, а також глутатіон-S-трансферази. За допомогою молекулярного клонування охарактеризували ряд мітосомальних видів P450, що беруть участь в метаболізмі ксенобіотиків у ссавців. Повідомляють, що деякі з них ефективно метаболізують декілька гербіцидів. Таким чином, трансгенні рослини з P450 рослин або ссавців можуть демонструвати резистентність до декількох гербіцидів.

Одним з переважних варіантів здійснення викладеного вище є застосування cP450 для резистентності до ацетохлору (продукти на основі ацетохлору включають гербіциди Surpass®, Keystone®, Keystone LA, FulTime® і TopNotch®) і/або трифлураліну (такому як Treflan®). Деякі переважні варіанти здійснення включають таку резистентність у сої і/або кукурудзи. Додаткові інструкції, що стосуються таких варіантів здійснення, див., наприклад, в Inui et al., "A selectable marker using cytochrome P450 monooxygenases for Arabidopsis transformation, " Plant Biotechnology 22, 281-286 (2005) (селекції, що стосуються системи для трансформації Arabidopsis thaliana за допомогою Agrobacterium tumefaciens, в якій використовують цитохром-P450-монооксигенази людини, метаболізуючі гербіциди; стійкі до гербіцидів саджанці трансформували і піддавали селекції з використанням гербіцидів ацетохлор, ампрофос-метил, хлорпрофам, хлорсульфурон, норфлуразон і пендиметалін); Siminszky et al., "Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides, " PNAS Vol. 96, Issue 4, 1750-1755, Feb. 16, 1999; Sheldon et al, Weed Science: Vol. 48, No. 3, pp. 291-295, "A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10)

confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*"; "and Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19," J Agric Food Chem. 2006 Apr. 19; 54(8):2985-91 (що стосуються тестування цитохром-р450-монооксигенази людини в рисі, де, як повідомляють, рослини рису демонстрували високу стійкість до хлорацетамідів (ацетохлору, алахлору, метоахлору, претилахлору і тенілхлору), оксіяцетамідів (мефенацету), піридазинонів (норфлуразону), 2,6-динітроаналінів (трифлураліну і пендиметаліну), фосфамідатів (аміпрофос-метилу, тіокарбаматів (пірибутикарбу) і сечовини (хлортолуруну)).

Також можна змінювати або використовувати різні хімічні складі 2,4-D, щоб зробити гени AAD-12 за даним винаходом більш ефективними. Такі можливі зміни включають отримання кращих субстратів і кращих відхідних груп (більшої електронегативності). Для підвищення гербіцидної активності разом з 2,4-D також можна використовувати інгібітори транспорту ауксинів (наприклад, дифлуфензопір).

Якщо конкретно не указано або очевидно інше, терміни в однині означають "щонайменше один", як застосовують в даному описі. Всі патенти, патентні заявки, попередні заявки і публікації, вказані або процитовані в даному описі, включені в даний опис як посилання в повному об'ємі доти, поки вони не суперечать представленому в даному описі.

Далі приведені приклади, в яких ілюструють способи практичного здійснення винаходу.

Ці приклади не можна тлумачити як такі, обмежувальні. Всі процентні частки являють собою частки по масі, і всі пропорції в сумішах розчинників є пропорціями по об'єму, якщо не указано інакше.

#### ПРИКЛАДИ

##### ПРИКЛАД 1

Спосіб ідентифікації генів, що додають резистентності до 2,4-D в польових умовах

Як спосіб ідентифікації генів, що мають властивості деградації гербіцидів в польових умовах, можна здійснювати пошук в існуючих на даний момент загальнодоступних базах даних, таких як NCBI (National Center for Biotechnology Information). Для початку необхідно мати вже ідентифіковану послідовність функціонального гена, що кодує білок з бажаними властивостями (тобто активність  $\alpha$ -кетоглутаратдіоксигенази). Потім цю білкову послідовність використовують як ввідну інформацію для алгоритму BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) для порівняння з доступними білковими послідовностями, що зберігаються в NCBI. Використовуючи параметри за умовчанням, за допомогою цього пошуку отримують приблизно 100 гомологічних білкових послідовностей на різних рівнях. Вони знаходяться в діапазоні від високоідентичних (85-98 %) до малоідентичних (23-32 %) на рівні амінокислот. Як правило, очікують, що тільки послідовності з високою гомологією будуть зберігати властивості, схожі з властивостями ввідної послідовності. У цьому випадку будуть вибирати тільки послідовності з  $\geq 50$  % гомології. Як приведено в даному описі як приклад, можна використовувати клонування і гомологів, які рекомбінантно експресуються, всього з 31 % консервативних амінокислот (відносно *tfdA* з *Ralstonia eutropha*) для надання комерційних рівнів резистентності не тільки до передбачуваного гербіциду, але також і до субстратів, раніше ніколи не тестованими з цими ферментами.

За допомогою бази даних NCBI (див. веб-сайт [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov); обліковий № AF516752) як гомолога всього з 31 % ідентичності амінокислот відносно *tfdA* ідентифікували єдиний ген (*sdpA*). Процент ідентичності визначали, спочатку переводячи послідовності ДНК *sdpA* і *tfdA*, що зберігаються в базі даних, в білки, потім використовуючи ClustalW в пакеті програм VectorNTI для здійснення множинного вирівнювання послідовностей.

##### ПРИКЛАД 2

Оптимізація послідовності для експресії в рослинах і бактеріях

Для досягнення більш високих рівнів експресії гетерологічних генів в рослинах переважним може бути реконструювання кодуєчої білок послідовності генів таким чином, щоб вони більш ефективно експресувались в рослинних клітинах. Кукурудза є однією з таких рослин, де переважним може бути реконструювання гетерологічної області, що кодує білок, перед трансформацією для підвищення рівня експресії гена і рівня білка, що кодується в рослині. Таким чином, додатковим етапом в конструюванні генів, що кодують бактеріальний білок, є реконструювання гетерологічного гена для оптимальної експресії.

Таблиця 2

Узагальнення даних про вміст G+C в областях генів кукурудзи, що кодують білок

Клас білка	Діапазон % G+C	Середній % G+C <sup>b</sup>
Метаболічні ферменти (76)	44,4-75,3	59,0 (±8,0)
Структурні білки (18)	48,6-70,5	63,6 (±6,7)
Регуляторні білки (5)	57,2-68,8	62,0 (±4,9)
Неохарактеризовані білки (9)	41,5-70,3	64,3 (±7,2)
Всі білки (108)	44,4-75,3	60,8 (±5,2) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Кількість генів в класі приведена в дужках<sup>b</sup>Стандартне відхилення приведенне в дужках<sup>c</sup>Середнє для об'єднаних груп ігнорують в обчисленнях середнього

Однією з причин реконструювання бактеріального білка для експресії в кукурудзі є неоптимальний вміст G+C в нативному гені. Наприклад, дуже низький вміст G+C в багатьох нативних бактеріальних генах (і подальше зміщення у бік високого вмісту A+T) приводить до утворення послідовностей, що імітують або дублюють послідовності контролю гена рослини, які, як відомо, є, значною мірою багатими A+T. Наявність деяких A+T-багатих послідовностей в ДНК генів, що вбудовуються в рослини (наприклад, областей ТАТА-бокс, генів, що в нормі виявляються в промоторах), може приводити до аномальної транскрипції генів. З іншого боку, наявність інших регуляторних послідовностей в транскрибованій мРНК (наприклад, послідовностей сигналу поліаденілування (AAUAAA) або послідовностей, комплементарних малій ядерній РНК, що бере участь в сплайсингу пре-мРНК) може приводити до нестабільності РНК. Таким чином, однією з цілей при конструюванні генів, що кодують бактеріальний білок, для експресії в кукурудзі, більш переважно, що позначаються як гени, оптимізовані для рослин, є отримання послідовності ДНК, що має більш високий вміст G+C, і, переважно, близький до такого в генах кукурудзи, що кодують метаболічні ферменти. Іншою метою при конструюванні генів, які оптимізовані для рослин і кодують бактеріальний білок, є отримання послідовності ДНК, в якій модифікації послідовності не перешкоджають трансляції.

У таблиці 2 показано, наскільки високим є вміст G+C в кукурудзі. Що стосується даних в таблиці 2, кодуючі області генів отримували із записів в GenBank (випуск 71), і композиції основ обчислювали з використанням програми MacVector™ (Accelrys, San Diego, Calif.). При обчисленнях ігнорували послідовності інтронів.

Внаслідок пластичності, що забезпечується надмірністю/виродженістю генетичного коду (тобто деякі амінокислоти визначаються декількома кодонами), еволюція геномів в різних організмах або класах організмів привела до різного використання надмірних кодонів. Це "відхилення частоти використання кодонів" відображене в середній композиції основ в областях, що кодують білок. Наприклад, організми з відносно низьким вмістом G+C використовують кодони, що містять А або Т в третьому положенні надмірних кодонів, в той час як організми, що має високий вміст G+C, використовують кодони, що містять G або C в третьому положенні. Вважають, що наявність "мінорних" кодонів в мРНК може знижувати абсолютну швидкість трансляції цієї мРНК, особливо коли відносний надлишок навантаженої тРНК, відповідної мінорному кодону, є низьким. Продовженням цього є те, що зниження швидкості трансляції за допомогою окремих мінорних кодонів буде, щонайменше, адитивний для численних мінорних кодонів. Таким чином, мРНК, що має високий відносний вміст мінорних кодонів, буде мати, відповідно, низьку швидкість трансляції. Ця швидкість буде відбиватися в подальших низьких рівнях білка, що кодується.

Таблиця 3

Переважні кодони для амінокислот в білках,  
які експресуються в кукурудзі

Амінокислота	Кодон *
Аланін	GCC/GCG
Цистеїн	TGC/TGT
Аспарагінова кислота	GAC/GAT

Таблиця 3

Переважні кодони для амінокислот в білках,  
які експресуються в кукурудзі

Амінокислота	Кодон *
Глутамінова кислота	GAG/GAA
Фенілаланін	TTC/TTT
Гліцин	GGC/GGG
Гістидин	CAC/CAT
Ізолейцин	ATC/ATT
Лізин	AAG/AAA
Лейцин	CTG/CTC
Метіонін	ATG
Аспарагін	AAC/AAT
Пролін	CCG/CCA
Глутамін	CAG/CAA
Аргінін	AGG/CGC
Серин	AGC/TCC
Треонін	ACC/ACG
Валін	GTG/GTC
Триптофан	TGG
Тирозин	TAC/TAT
Стоп-кодон	TGA/TAG

При конструюванні генів, що кодують бактеріальний білок, для експресії в кукурудзі (або іншій рослині, такій як бавовна або соя) визначають відхилення частоти використання кодонів в рослині. Відхилення частоти використання кодонів в кукурудзі є статистичним розподілом кодонів, які рослина використовує для кодування своїх білків, і переважне використання кодонів представлено в таблиці 3. Після визначення відхилення визначають процентну частоту кодонів в генах, які цікавлять. Необхідно визначати переважні первинні кодони в рослині, а також переважні кодони другого, третього і четвертого вибору, якщо існує можливість множинного вибору. Потім можна конструювати нову послідовність ДНК, що кодує амінокислотну послідовність в бактеріальному білку, але нова послідовність ДНК відрізняється від нативної бактеріальної послідовності ДНК (що кодує білок) замінами на кодони рослини (перші переважні, другі переважні, треті переважні або четверті переважні) для визначення амінокислот в кожному положенні в амінокислотній послідовності білка. Потім нову послідовність аналізують на предмет ділянок розпізнавання рестрикційних ферментів, які можна отримувати за допомогою модифікації. Ідентифіковані ділянки додатково модифікують, замінюючи кодони переважними кодами першого, другого, третього або четвертого вибору. Іншими ділянками в послідовності, які можуть впливати на транскрипцію або трансляцію гена, який цікавить, є екзон-інтронні зчленування (5' або 3'), сигнали поліаденілування або сигнали термінації для РНК-полімерази. Послідовність додатково аналізують і модифікують для зниження частоти ТА- або GC-дуплетів. У доповнення до дуплетів, блоки G або C в послідовності, що містять приблизно більше чотирьох однакових залишків, можуть впливати на транскрипцію послідовності. Таким чином, ці блоки також модифікують, замінюючи кодони першого або другого вибору і т. д. переважними кодами наступного вибору.

Переважно, гени, які оптимізовані для рослин і кодують бактеріальний білок, містять приблизно 63 % кодонів першого вибору, від приблизно 22 % до приблизно 37 % кодонів другого вибору і від приблизно 15 % до приблизно 0 % кодонів третього або четвертого вибору, де загальна процентна частка становить 100 %. Найбільш переважно, гени, оптимізовані для рослин, містять приблизно 63 % кодонів першого вибору, щонайменше приблизно 22 % кодонів другого вибору, приблизно 7,5 % кодонів третього вибору і приблизно 7,5 % кодонів четвертого вибору, де загальна процентна частка становить 100 %. Спосіб, що описується вище, дозволяє фахівцям в цій галузі модифікувати гени, які є чужорідними для конкретної рослини, таким чином, що гени оптимально експресуються в рослинах. Спосіб додатково проілюстрований в заявці РСТ WO 97/13402.

Таким чином, для конструювання генів, які оптимізовані для рослин і кодують бактеріальний білок, послідовність ДНК конструюють кодуною амінокислотну послідовність вказаного білка з використанням надмірного генетичного коду, встановленого по таблиці відхилень частот

використання кодонів, складений з послідовностей генів конкретної рослини або рослин. Послідовність ДНК, що отримується, має більш високий ступінь різноманітності кодонів, бажану композицію основ, може містити стратегічно розташовані ділянки розпізнавання рестрикційних ферментів і не містить послідовності, які можуть перешкоджати транскрипції гена або трансляції продукту мРНК. Таким чином, для трансформації хазяїв, включаючи рослини, можна використовувати синтетичні гени, функціонально еквівалентні білкам/гену за даним винаходом. Додаткові інструкції, що стосуються отримання синтетичних генів можна знайти, наприклад, в патенті США № 5380831.

Аналіз перебудов в AAD-12 рослин: При широкому аналізі 876 пар основ (п.н.) послідовності ДНК, що кодує області нативного AAD-12 (SEQ ID NO: 1), виявляли наявність декількох мотивів послідовності, які, як вважають, є несприятливими для оптимальної експресії в рослині, а також неоптимальну композицію кодонів. Білок, що кодується SEQ ID NO: 1 (AAD-12), представлений як SEQ ID NO: 2. Для поліпшення продукції рекомбінантного білка в однодольних, а також дводольних рослинах, розробляли "оптимізовану для рослин" послідовність ДНК AAD-12 (v1) (SEQ ID NO: 3), що кодує білок (SEQ ID NO: 4), що є тим же, що і нативний SEQ ID NO: 2, за винятком додавання залишку аланіну у другому положенні (підкреслено в SEQ ID NO: 4). Додатковий кодон для аланіну (GCT; підкреслений в SEQ ID NO: 3) кодує частину ділянки розпізнавання рестрикційного ферменту NcoI (CCATGG), що перекривається з ініціюючим трансляцію кодоном ATG. Таким чином, він служить подвійній меті полегшення подальших дій по клонуванню одночасно з поліпшенням контексту послідовності, що оточує ініціаторний кодон ATG, для оптимізації ініціації трансляції. Білки, що кодуються нативною і оптимізованою для рослин (v1) кодуючими областями, є на 99,3 % ідентичними, відрізняючись тільки по амінокислоті в положенні 2. На відміну від цього, нативні і оптимізовані для рослин (v1) послідовності ДНК кодуючих областей є тільки на 79,7 % ідентичними.

У таблиці 4 показані відмінності композицій кодонів нативної (колонки A і D) і оптимізованої для рослин (колонки B і E) послідовностей, і приведені порівняння з теоретичною оптимізованою для рослин послідовністю (колонки C і F).

При розгляді таблиці 4 видно, що нативна і оптимізована для рослин кодуючі області, хоч і кодують приблизно ідентичні білки, істотно відрізняються одна від одної. Версія, оптимізована для рослин, (v1) точно імітує композицію кодонів в теоретичній оптимізованій для рослин кодуючій області, що кодує білок AAD-12.

"Amino acid" - "Амінокислота", "Native #" - "Кількість в нативній послідовності", "Plant Opt v1 #" - "Кількість в оптимізованій для рослин версії (v1)", "Theor. Plant Opt. #" - "Кількість в теоретичній оптимізованій для рослин версії", "Totals" - "Всього".

Таблиця 4

Порівняння композиції кодонів кодуючих областей нативної AAD-12, оптимізованої для рослин версії (v1) і теоретичної оптимізованої для рослин версії

Аміно-кислота	Кодон	А	В	С	Аміно-кислота	Кодон	Д	Е	Ф
ALA (A)	GCA	1	10	11	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	35	16	15		CTC	1	8	8
	GCG	7	0	0		CTG	23	0	0
	GCT	0	18	17		CTT	0	8	8
ARG (R)	AGA	0	4	5	LYS (K)	TTA	0	0	0
	AGG	0	4	6		TTG	0	8	8
	CGA	0	0	0		AAA	1	1	2
	CGC	15	6	4		AAG	5	5	4
	CGG	3	0	0	MET (M)	ATG	10	10	10
ASN (N)	CGT	0	4	3		TTC	7	5	5
	AAC	3	2	2	PHE (F)	TTT	1	3	3
	AAT	1	2	2		CCA	0	5	6
ASP (D)	GAC	15	9	9		CCC	9	4	4
	GAT	2	8	8		CCG	5	0	0
CYS (C)	TGC	3	2	2		CCT	0	5	5
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	5	4	3

Таблиця 4

Порівняння композиції кодонів кодуючих областей нативної AAD-12, оптимізованої для рослин версії (v1) і теоретичної оптимізованої для рослин версії

Аміно-кислота	Кодон	A	B	C	Аміно-кислота	Кодон	D	E	F
		Кількість в нативній послідовності	Кількість в оптимізованій для рослин версії (v1)	Кількість в теоретичній оптимізованій для рослин версії			Кількість в нативній послідовності	Кількість в оптимізованій для рослин версії (v1)	Кількість в теоретичній оптимізованій для рослин версії
END	TAA	1	0	1		AGT	0	0	0
	TAG	0	0			TCA	0	3	3
	TGA	0	1			TCC	2	3	3
GLN (Q)	CAA	1	8	7	THR (T)	TCG	6	0	0
	CAG	13	6	7		TCT	0	3	3
GLU (E)	GAA	3	4	4		ACA	1	4	5
	GAG	8	7	7	TRP (W)	ACC	11	7	7
GLY (G)	GGA	0	8	7		ACG	5	0	0
	GGC	24	7	7		ACT	1	7	6
	GGG	1	3	4	TYR (Y)	TGG	8	8	8
	GGT	0	7	7		TAC	4	3	3
HIS (H)	CAC	8	9	9	VAL (V)	TAT	1	2	2
	CAT	8	7	7		GTA	0	0	0
ILE (I)	ATA	0	2	2		GTC	6	8	7
	ATC	10	4	5		GTG	18	8	9
	ATT	1	5	4		GTT	0	8	8
	Усього	163	164	163		Усього	130	130	130

Перебудова для експресії в *E. coli*: Спеціально сконструйовані штами *Escherichia coli* і відповідні векторні системи часто використовують для отримання відносно великих кількостей білків для біохімічних і аналітичних досліджень. Іноді виявляють, що нативний ген, який кодує бажаний білок, погано підходить для високорівневої експресії в *E. coli*, навіть якщо організмом-джерелом гена може бути інший рід бактерій. У таких випадках можна і бажано реконструювати кодуючу білок область гена, щоб зробити його більш відповідним для експресії в *E. coli*. Гени *E. coli* класу II визначають як ті, які на високому рівні і безперервно експресуються протягом експонентної фази росту клітин *E. coli*. (Henaut, A. and Danchin, A. (1996) in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology, vol. 2, pp. 2047-2066. Neidhardt, F., Curtiss III, R., Ingraham, J., Lin, E., Low, B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. (eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C.). Досліджуючи композиції кодонів кодуючих областей генів *E. coli* класу II, можна розробляти середню композицію кодонів для цих кодуючих областей генів *E. coli* класу II.

Вважають, що кодуюча білок область, яка має середню композицію кодонів, що імітує таку в генах класу II, буде підходити для експресії протягом експонентної фази росту *E. coli*. Використовуючи ці посібники, нову послідовність ДНК, яка кодує білок AAD-12 (SEQ ID NO: 4), що включає додатковий аланін у другому положенні, як указано вище, конструювали відповідно до середньої композиції кодонів кодуючих областей генів класу II *E. coli*. Вихідну послідовність, конструювання якої ґрунтувалося тільки на композиції кодонів, додатково реконструювали для включення конкретних послідовностей ділянок розпізнавання рестрикційних ферментів, відповідних для клонування у вектори, які експресуються в *E. coli*. Уникали несприятливих меж послідовності, таких як структури "стебло-петля" з високою стабільністю, а також внутрішньогенні послідовності, гомологічні 3'-кінцю рибосомальної РНК 16S (тобто послідовності Шайна-Дальгарно). *E. coli*-оптимізовану послідовність (v2) описують як SEQ ID NO: 5, і вона кодує білок, що описується як SEQ ID NO: 4.

Нативна і *E. coli*-оптимізована (v2) послідовності ДНК є на 84,0 % ідентичними, в той час як оптимізована для рослин (v1) і *E. coli*-оптимізована (v2) послідовності ДНК є на 76,0 % ідентичними. У таблиці 5 представлені композиції кодонів нативної кодуючої області AAD-12 (колонки A і D), що кодує області AAD-12, оптимізованої для експресії в *E. coli* (v2; колонки B і E), і композиція кодонів теоретичної кодуючої області для білка AAD-12, що має оптимальну композицію кодонів генів класу II *E. coli* (колонки C і F).

При розгляді таблиці 6 видно, що нативна і *E. coli*-оптимізована кодуючі області, хоча і кодують приблизно ідентичні білки, істотно відрізняються одна від одної. *E. coli*-оптимізована

версія (v2) точно імітує композицію кодонів в теоретичній E. coli-оптимізованій кодуючій області, що кодує білок AAD-12.

Таблиця 5

Порівняння композиції кодонів кодуючих областей нативної AAD-12, E coli-оптимізованої версії (v2) і теоретичної версії, оптимізованої для генів класу II E coli

Аміно-кислота	Кодон	А	В	С	Аміно-кислота	Кодон	Д	Е	Ф
		Кількість в нативній послідовності	Кількість в E. coli-оптимізованій версії (v2)	Кількість в теоретичній версії, оптимізованій для генів класу II E. coli #			Кількість в нативній послідовності	Кількість в E. coli-оптимізованій версії (v2)	Кількість в теоретичній версії, оптимізованій для генів класу II E. coli
ALA (A)	GCA	1	13	13	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	35	0	0		CTC	1	2	0
	GCG	7	18	17		CTG	23	20	24
	GCT	0	13	14		CTT	0	1	0
ARG (R)	AGA	0	0	0	LYS (K)	TTA	0	1	0
	AGG	0	0	0		TTG	0	0	0
	CGA	0	0	0	MET (M)	AAA	1	4	5
	CGC	15	6	6		AAG	5	2	1
	CGG	3	0	0	PHE (F)	ATG	10	10	10
	CGT	0	12	12		TTC	7	6	6
ASN (N)	AAC	3	4	4	PRO (P)	TTT	1	2	2
	AAT	1	0	0		CCA	0	3	2
ASP (D)	GAC	15	10	9		CCC	9	0	0
	GAT	2	7	8		CCG	5	11	12
CYS (C)	TGC	3	2	2	SER (S)	CCT	0	0	0
	TGT	0	1	1		AGC	5	4	4
END	TAA	1	1	1		AGT	0	0	0
	TAG	0	0	0		TCA	0	0	0
	TGA	0	0	0		TCC	2	5	4
GLN (Q)	CAA	1	3	3		TCG	6	0	0
	CAG	13	11	11		TCT	0	4	5
GLU (E)	GAA	3	8	8	THR (T)	ACA	1	0	0
	GAG	8	3	3		ACC	11	12	12
GLY (G)	GGA	0	0	0		ACG	5	0	0
	GGC	24	12	11		ACT	1	6	6
	GGG	1	0	0	TRP (W)	TGG	8	8	8
	GGT	0	13	14		TAC	4	3	3
HIS (H)	CAC	8	11	11	TYR (Y)	TAT	1	2	2
	CAT	8	5	5		GTA	0	6	6
ILE (I)	ATA	0	0	0		GTC	6	0	0
	ATC	10	7	7		GTG	18	8	7
	ATT	1	4	4		GTT	0	10	11
Усього		163	164	164	Усього		130	130	130

- 5 Конструювання послідовності ДНК з відхиленням у використанні кодонів для сої, що кодує EPSPS сої, що має мутації, які додають стійкості до гліфосату. У цьому прикладі описують конструювання нової послідовності ДНК, що кодує мутантну 5-енолпірувілшкімат-3-фосфатсинтетазу (EPSPS) сої, але оптимізованої для експресії в клітинах сої. Амінокислотну послідовність EPSPS сої з трьома мутаціями описують як SEQ ID NO: 5 в WO 2004/009761.
- 10 Мутантні амінокислоти в послідовності знаходяться в положенні 183 (треонін нативного білка, замінений ізoleyцином), положенні 186 (аргінін нативного білка, замінений лізином) і положенні 187 (пролін нативного білка, замінений серином). Таким чином, можна отримувати амінокислотну послідовність нативного білка EPSPS сої, замінюючи заміщені амінокислоти SEQ ID NO:5 в WO 2004/009761 нативними амінокислотами у відповідних положеннях. Таку нативну білкову послідовність описують як SEQ ID NO: 20 в PCT/US2005/014737 (zareєстрованій 2 травня 2005 року). Послідовність білка EPSPS сої з двома мутаціями, яка містить мутацію в положенні 183 (треонін нативного білка, замінений ізoleyцином) і положенні 187 (пролін нативного білка, замінений серином), описують як SEQ ID NO: 21 в PCT/US2005/014737.
- 15 Таблицю використання кодонів в кодуючих білок послідовностях сої (з максимальним вмістом гліцину), обчисленого за допомогою 362096 кодонів (приблизно 870 кодуючих послідовностей) отримували на "веб-сайті kazusa.або.jp/codon". Ці дані перетворювали, як
- 20

показано в таблиці 6. В колонках D і H таблиці 6 представлені розподіли (у % використання всіх кодонів для цієї амінокислоти) синонімічних кодонів для кожної амінокислоти, як виявляють в кодуючих білок областях генів сої. Очевидно, що деякі синонімічні кодони для деяких амінокислот (амінокислоту можуть визначати 1, 2, 3, 4 або 6 кодонів) відносно рідко представлені в кодуючих білок областях сої (наприклад, порівняльне використання кодонів GCG і GCT, що визначають аланін).

Таблицю відхилень використання кодонів в сої обчислювали за допомогою даних з таблиці 6.

Ігнорували кодони, що виявляються в генах сої менше ніж приблизно у 10 % випадків від загальної частоти наявності конкретної амінокислоти. Для урівноваження розподілу кодонів, що залишилися, для амінокислот обчислювали середньозважену частоту для кожного кодону, використовуючи формулу:

$$\text{Середньозважений \% C1} = 1/(\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{і т.д.}) \times \%C1 \times 100,$$

де C1 є кодоном, що розглядається, C2, C3 і т. д. представляють синонімічні кодони, що залишилися, і значення % для відповідних кодонів взяті з колонок D і H таблиці 6 (ігноруючи значення для рідкісних кодонів, виділені напівжирним шрифтом).

Середньозважене % значення для кожного кодона представлений в колонках C і G таблиці 6. TGA умовно вибирали як термінатор трансляції. Потім відхилення частоти використання кодонів включали в спеціалізовану таблицю генетичного коду для використання в програмі для конструювання генів OptGene™ (Ocimum Biosolutions LLC, Indianapolis, Ind.).

Таблиця 6

Частота синонімічних кодонів в кодуючих білок послідовностях сої  
і обчислення відхилення частоти використання кодонів для конструювання  
синтетичного гена, оптимізованого для сої

A	B	C	D	E	F	G	H
Амінокислота	Кодон	Середньозважений %	% в сої	Амінокислота	Кодон	Середньозважений %	% в сої
ALA (A)	GCA	33,1	30,3	LEU (L)	CTA	DNU	9,1
	GCC	24,5	22,5		CTC	22,4	18,1
	GCG	DNU*	8,5		CTG	16,3	13,2
	GCT	42,3	38,7		CTT	31,5	25,5
ARG (R)	AGA	36,0	30,9	LYS (K)	TTA	DNU	9,8
	AGG	32,2	27,6		TTG	29,9	24,2
	CGA	DNU	8,2		AAA	42,5	42,5
	CGC	14,8	12,7		AAG	57,5	57,5
	CGG	DNU	6,0	MET (M)	ATG	100,0	100
	CGT	16,9	14,5	PHE (F)	TTC	49,2	49,2
ASN (N)	AAC	50,0	50,0	PRO (P)	TTT	50,8	50,8
	AAT	50,0	50,0		CCA	39,8	36,5
ASP (D)	GAC	38,1	38,1		CCC	20,9	19,2
	GAT	61,9	61,9		CCG	DNU	8,3
CYS (C)	TGC	50,0	50,0		CCT	39,3	36,0
	TGT	50,0	50,0	SER (S)	AGC	16,0	15,1
END	TAA	DNU	40,7		AGT	18,2	17,1
	TAG	DNU	22,7		TCA	21,9	20,6
	TGA	100,0	36,6		TCC	18,0	16,9
GLN (Q)	CAA	55,5	55,5		TCG	DNU	6,1
	CAG	44,5	44,5		TCT	25,8	24,2
GLU (E)	GAA	50,5	50,5	THR (T)	ACA	32,4	29,7
	GAG	49,5	49,5		ACC	30,2	27,7
GLY (G)	GGA	31,9	31,9		ACG	DNU	8,3
	GGC	19,3	19,3		ACT	37,4	34,3
	GGG	18,4	18,4	TRP (W)	TGG	100,0	100
	GGT	30,4	30,4	TYR (Y)	TAC	48,2	48,2
HIS (H)	CAC	44,8	44,8	VAL (V)	TAT	51,8	51,8
	CAT	55,2	55,2		GTA	11,5	11,5
ILE (I)	ATA	23,4	23,4		GTC	17,8	17,8
	ATC	29,9	29,9		GTG	32,0	32,0
	ATT	46,7	46,7		GTT	38,7	38,7



Для отримання оптимізованої для сої послідовності ДНК, що кодує білок EPSPS з двома мутаціями, білкову послідовність SEQ ID NO: 21 з PCT/US2005/014737 піддавали зворотній трансляції за допомогою програми OptGene™ з використанням представленого вище генетичного коду з відхиленням частот використання кодонів для сої. Потім отриману таким чином вихідну послідовність ДНК модифікували, компенсуючи зміни кодонів (зі збереженням загальних середньозважених частот кодонів) для зниження кількості CG- і TA-дуплетів між суміжними кодонами, підвищення кількості СТ- і TG-дуплетів між суміжними кодонами, видалення внутрішньоланцюжкових вторинних структур з високою стабільністю, видалення або додавання ділянок розпізнавання рестрикційних ферментів і видалення інших послідовностей, які можуть бути несприятливими для експресії або дій по клонуванню сконструйованого гена. Здійснювали додаткові поліпшення послідовності для усунення потенційних рослинних ділянок сплайсингу інтронів, довгих ділянок залишків А/Т або С/Г і інших мотивів, які можуть перешкоджати стабільності РНК, транскрипції або трансляції кодуєчої області в рослинних клітинах. Здійснювали інші зміни для усунення довгих внутрішніх відкритих рамок зчитування (рамок, інших, ніж +1). Всі ці зміни здійснювали в межах обмежень для збереження композиції кодонів з відхиленням частот використання кодонів для сої, як описано вище, і одночасно зберігаючи амінокислотну послідовність, що описується як SEQ ID NO: 21 в PCT/US2005/014737.

Послідовність ДНК з відхиленням частот використання кодонів для сої, що кодує білок EPSPS SEQ ID NO: 21, описують як основи 1-1575 SEQ ID NO: 22 в PCT/US2005/014737. Синтез фрагмента ДНК, що містить SEQ ID NO: 22 з PCT/US2005/014737, здійснював комерційний постачальник (PicoScript, Houston Tex.).

### ПРИКЛАД 3

Клонування експресуючих векторів і векторів для трансформації

Конструювання *E. coli*, експресуючий вектор pET: Використовуючи рестрикційні ферменти, відповідні ділянкам, доданим разом з додатковими лінкерами для клонування, (Xba 1, Xho 1) AAD-12 (v2) вирізали з вектора Picoscript і лігували у вектор pET280 з резистентністю до стрептоміцину/спектиноміцину. Потім за допомогою лігованих продуктів трансформували *E. coli* TOP10F' і вміщували їх на чашки з агаром з бульйоном Лурія+50 мкг/мл стрептоміцину і спектиноміцину (LB S/S).

Щоб розрізняти продукти лігування AAD-12 (v2):pET280 і pCR2.1:pET280 приблизно 20 виділених колоній вміщували в 6 мл LB-S/S і вирощували при 37 °C протягом 4 годин зі струшуванням. Потім кожен культуру наносили на чашки LB+50 мкг/мл канаміцину, які інкубували при 37 °C протягом ночі. Колонії, вирощені на LB-K, вважали такими, що містять лігований вектор pCR2.1 і відбраковували. З культур, що залишилися, виділяли плазмід, як указано вище, і перевіряли на відповідність за допомогою розщеплення XbaI/XhoI. Кінцевий експресуючий конструкції присвоювали позначення pDAB3222.

Конструювання експресуючого вектора для *Pseudomonas*: Відкриту рамку зчитування AAD-12 (v2) спочатку клонували в модифікований експресуючий вектор pET (Novagen), "pET280 S/S", як фрагмент XbaI-XhoI. Отриману плазмід pDAB725 підтверджували розщепленням рестрикційними ферментами і реакціями секвенування. Відкриту рамку зчитування AAD-12 (v2) з pDAB725 переносили в експресуючий вектор для *Pseudomonas*, pMYC1803, як фрагмент XbaI-XhoI. Позитивні колонії підтверджували за допомогою розщеплення рестрикційними ферментами. За допомогою завершеної конструкції pDAB739 трансформували експресуючі штами *Pseudomonas* MB217 і MB324.

Завершення конструювання бінарних векторів: Оптимізований для рослин ген AAD-12 (v1) отримували з Picoscript (завершували реконструювання гена (див. вище) і залучали Picoscript для конструювання) і внутрішньо підтверджували послідовність (SEQ ID NO: 3), щоб пересвідчитися у відсутності змін в очікуваній послідовності. Здійснювали реакції секвенування з прямим (SEQ ID NO: 6) і зворотним (SEQ ID NO: 7) праймерами M13 з використанням реагентів "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" Beckman Coulter, як указано вище. Аналізували дані про послідовність, і результати свідчили про відсутність аномалій в оптимізованій для рослин послідовності ДНК AAD-12 (v1). Ген AAD-12 (v1) клонували в pDAB726 як фрагмент NcoI-SacI. Отриману конструкцію означали як pDAB723, що містить: [промотор AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-12 (v1): Nt OSM3' UTR: ORF1 polyA 3'UTR] (перевірену за допомогою рестрикції PvuII і NotI). Потім фрагмент NotI-NotI, що містить касету, що описується, клонували по ділянці NotI бінарного вектора pDAB3038. Отриманий бінарний вектор pDAB724, що містить наступну касету [промотор AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-12 (v1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: промотор CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR] піддавали рестрикції (з

використанням BamHI, NcoI, NotI, SacI і XmnI) для перевірки правильної орієнтації. Перевірену завершено конструкцію (pDAB724) використовували для трансформації *Agrobacterium*.

Клонування додаткових конструкцій для трансформації: Всі інші конструкції, отримані для трансформації відповідних видів рослин, конструювали з використанням аналогічних способів, як представлені вище в даному описі, і інших стандартних способів молекулярного клонування (Maniatis et al., 1982).

#### ПРИКЛАД 4

Трансформація арабідопсису і селекція

Умови вирощування *Arabidopsis thaliana*: Насіння арабідопсису дикого типу суспендували в 0,1 % розчині агарозу (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Суспендоване насіння зберігали при 4 °C протягом 2 днів для виконання вимог спокою і забезпечення синхронного проростання насіння (стратифікації).

Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, Wash.) покривали дрібнозернистим вермикулітом і здійснювали підґрунтове зрошування розчином Хогланда до зволоження. Ґрунтові суміші дозволяли дрениватися протягом 24 годин. Стратифіковане насіння висівали на вермикуліт і закривали куполами-зволожувачами (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) на 7 днів.

Насіння проростало і рослини вирощували в Conviron (моделі CMP4030 і CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada) в умовах довгого дня (16 годин освітлення/8 годин темряви) при інтенсивності світла 120-150 мкмоль/м<sup>2</sup>·с при постійній температурі (22 °C) і вологості (40-50 %). Рослини зрошували спочатку розчином Хогланда, а потім деіонізованою водою, щоб зберігати ґрунт вологим, але не мокрим.

Трансформація *Agrobacterium*: Для отримання колонії для інокуляції 4 мл препаративної культури (рідка LB+еритроміцин) використовували чашку з LB + агар з еритроміцином (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) (200 мг/л) або спектиноміцином (100 мг/л), що містить штрихову колонію DH5α. Культури інкубували протягом ночі при 37 °C з постійним струшуванням. Для очищення плазмідною ДНК використовували Qiagen (Valencia, Calif.) Spin Mini Preps, здійснюючи очищення по інструкціях виробника.

Електрокомпетентні клітини *Agrobacterium tumefaciens* (штамів Z707s, EHA101s і LBA4404s) отримували з використанням протоколу з Weigel and Glazebrook (2002). Компетентні клітини *Agrobacterium* трансформували з використанням способу електропорації, адаптованого з Weigel and Glazebrook (2002). 50 мкл компетентних клітин *Agrobacterium* розморожували на льоду і додавали до клітин 10-25 нг бажаної плазмід. Суміш ДНК і клітин додавали в заздалегідь охолоджені кювети для електропорації (2 мм). Для трансформації використовували Eppendorf Electroporator 2510 з наступними параметрами: напруга: 2,4 кВ, тривалість імпульсу: 5 мс.

Після електропорації в кювету додавали 1 мл бульйони YEP (на літр: 10 г дріжджового екстракту, 10 г бакто-пептону, 5 г NaCl), і суспензію клітин-YEP перенесли в культивальну пробірку місткістю 15 мл. Клітини інкубували при 28 °C на водяній бані з постійним струшуванням протягом 4 годин. Після інкубації культуру вміщували в чашки з YEP + агар з еритроміцином (200 мг/л) або спектиноміцином (100 мг/л) і стрептоміцином (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) (250 мг/л). Чашки інкубували протягом 2-4 днів при 28 °C.

Вибирали колонії, наносили штрихами на свіжі чашки з YEP + агар з еритроміцином (200 мг/л) або спектиноміцином (100 мг/л) і стрептоміцином (250 мг/л) і інкубували при 28 °C протягом 1-3 днів. Для перевірки наявності вбудованого гена вибирали колонії для ПЛР-аналізу з використанням праймерів, специфічних для вектора. Для виділення плазмідної ДНК з вибраних колоній *Agrobacterium* використовували Qiagen Spin Mini Preps, здійснюючи виділення по інструкціях виробника з наступним виключенням: для очищення ДНК використовували аліквоти по 4 мл з 15 мл нічної препаративної культури (рідкий YEP + еритроміцин (200 мг/л) або спектиноміцин (100 мг/л)) і стрептоміцину (250 мг/л)). Альтернативою використанню Qiagen Spin Mini Prep DNA був лізис трансформованих клітин *Agrobacterium*, суспендованих в 10 мкл води, при 100 °C протягом 5 хвилин. Плазмідну ДНК з бінарного вектора, що використовується при трансформації *Agrobacterium*, включали як контроль. Реакцію ПЛР проводили з використанням Taq ДНК-полімерази від Takara Minis Bio Inc. (Madison, Wis.) по інструкціях виробника в 0,5-кратних концентраціях. Реакції ПЛР здійснювали в термоциклері MJ Research Peltier, запрограмованому на наступні умови: 1) 94 °C протягом 3 хвилин, 2) 94 °C протягом 45 секунд, 3) 55 °C протягом 30 секунд, 4) 72 °C протягом 1 хвилини, протягом 29 циклів, потім 1 цикл при 72 °C протягом 10 хвилин. Після завершення циклів реакційну суміш зберігали при 4 °C. Продукти ампліфікації аналізували за допомогою електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі і візуалізували за допомогою фарбування бромистий етидієм. Вибирали колонії, продукт ПЛР яких був ідентичним контрольної плазміді.

Трансформація арабідопсису: Арабідопсис трансформували з використанням способу занурення квіткових бруньок. Вибрану колонію використовували для інокуляції однієї або декількох 15-30 мл прекультур в бульйоні YEP, що містить еритроміцин (200 мг/л) або спектиноміцин (100 мг/л) і стрептоміцини (250 мг/л). Культури інкубували протягом ночі при 28 °C з постійним струшуванням при 220 об./хв. Кожну прекультуру використовували для інокуляції двох 500 мл культур в бульйоні YEP, що містить еритроміцин (200 мг/л) або спектиноміцин (100 мг/л) і стрептоміцини (250 мг/л), і інкубували культури протягом ночі при 28 °C з постійним струшуванням. Потім клітини осаджували при приблизно 8700×g протягом 10 хвилин при кімнатній температурі і викидали отриманий супернатант. Клітинний осад обережно ресуспендували в 500 мл інфільтраційних середовищ, що містять: ½ x солей Мурашиге і Скуга/вітамінів B5 по Гамборгу, 10 % (мас./об.) сахарози, 0,044 мкМ бензиламінопурина (10 мкл/літр стокового розчину 1 мг/мл в DMSO) і 300 мкл/літр Silwet L-77. Рослини віком приблизно 1 місяць занурювали в середовища на 15 секунд, будучи упевненими в зануренні самих нових суцвіть. Потім рослини клали набік і закривали (прозорим або непрозорим матеріалом) на 24 години, потім промивали водою і вміщували вертикально. Рослини вирощували при 22 °C з фотоперіодом 16 годин освітлення/8 годин темряви. Приблизно через 4 тижні після занурення збирали насіння.

Селекція трансформованих рослин: Свіжозібраному насінню T1 [ген AAD-12 (v1)] дозволяли висушуватися протягом 7 днів при кімнатній температурі. Насіння T1 висівали в лотки для пророщування розміром 26,5×51 см (T.O. Plastics Inc., Clearwater, Minn.), в кожний з яких вносили аліквоти по 200 мг стратифікованого насіння T1 (приблизно 10000 насінин), яке заздалегідь суспендоване в 40 мл 0,1 % розчину агарози і зберігалось при 4 °C протягом 2 днів для виконання вимог спокою і забезпечення синхронного проростання насіння.

Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, Wash.) покривали дрібнозернистим вермикулітом і здійснювали підґрунтове зрошування розчином Хогланда до зволоження, потім дозволяючи йому дренажуватися під дією сили ваги. Кожну аліквоту по 40 мл стратифікованого насіння рівномірно висівали на вермикуліт за допомогою піпетки і закривали куполами-зволожувачами (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) на 4-5 днів. Куполи знімали за 1 день до початкової селекції трансформантів з використанням післясходового обприскування глүфосинатом (селекція на котрансформований ген PAT).

Через сім днів після посадки (DAP) і знову через 11 DAP рослини T1 (фази сім'ядолі і 2-4-листки, відповідно) обприскували 0,2 % розчину гербіциду Liberty (200 г активного інгредієнта глүфосинату/л, Bayer Crop Sciences, Kansas City, Mo.) при об'ємі розчину для обприскування 10 мл/лоток (703 л/га) з використанням пневматичного розпилювача DeVilbiss для доставки ефективної кількості 280 г активного інгредієнта глүфосинату/га на нанесення. Рослини, які вижили (активно зростаючі рослини), визначали через 4-7 днів після останнього розпилення і переносили окремо в 3-дюймові горщики з підготованими горщиковими середовищами (Metro Mix 360). Перенесені рослини покривали куполами-зволожувачами на 3-4 дні і вміщували у вегетаційну камеру з температурою 22 °C до вміщення в теплицю або безпосередньо в теплиці. Потім куполи знімали і рослини вирощували в теплиці (22±5 °C, 50±30 % RH, 14 годин освітлення:10 годин темряви, мінімум 500 мЕ/м²·с¹ природного + додаткового освітлення) щонайменше 1 день до тестування на здатність AAD-12 (v1) (гена, оптимізованого для рослин) забезпечувати резистентність до феноксиауксинових гербіцидів.

Потім рослинам T1 випадковим чином розподіляли різні кількості 2,4-D. У випадку арабідопсису 50 г ке/га 2,4-D є ефективною дозою для розрізнення сприйнятливих рослин і рослин зі значущими рівнями резистентності. Також для визначення відносних рівнів резистентності наносили кількості, що підвищуються (50, 200, 800 або 3200 г ке/га).

Все нанесення ауксинового гербіциду здійснювали з використанням розпилювача DeVilbiss, як описано вище, для нанесення об'єму розчину для обприскування 703 л/га (0,4 мл розчин/3-дюймовий горщик) або наносили за допомогою автоматичного пристрою для обприскування при об'ємі розчину для обприскування 187 л/га. Використовуваний 2,4-D був 2,4-D технічної категорії (Sigma, St. Louis, Mo.), розчиненим в DMSO і розведеним у воді (кінцева концентрація DMSO <1 %), або комерційним складом диметиламінової солі (456 г ке/л, NuFarm, St Joseph, Mo.). Використовуваний дихлорпроп був дихлорпропом комерційної категорії, складеним у вигляді калієвої солі R-дихлорпропу (600 г активного інгредієнта/л, AH Marks). При підвищенні кількостей гербіцидів вище 800 г ке/га рН розпилюваного розчину стає надто кислим, приводячи до опіку листя молодих вразливих рослин арабідопсису і ускладнення оцінки первинних ефектів гербіцидів. Загальноприйнятою практикою стало нанесення цих великих кількостей гербіцидів в 200 мМ буфері HEPES, pH 7,5.

Деякі окремі рослини T1 піддавали впливу альтернативних комерційних гербіцидів замість феноксіауксину. Одним з пунктів було визначення того, чи можуть піридиліоксіацетатауксинові гербіциди, триклопір і флуроксіпір, ефективно піддаватись деградації в польових умовах. Гербіциди наносили на рослини T1 з використанням автоматичного пристрою для обприскування при об'ємі розчину для обприскування 187 л/га. Рослини T1, що виявляють стійкість до 2,4-D DMA, додатково оцінювали в поколінні T2.

Результати селекції трансформованих рослин: Перші трансформації арабідопсису здійснювали з використанням AAD-12 (v1) (гена, оптимізованого для рослин). Спочатку трансформантів T1 вибирали за даними про нетрансформоване насіння з використанням схеми селекції з використанням глүфосинату. Більше 300000 насінин T1 піддавали скринінгу і ідентифікували 316 резистентних до глүфосинату рослин (ген PAT), що порівнюються до частоти трансформації/селекції 0,10 %, яка потрапляє в нормальний діапазон частоти селекції конструкцій, де для селекції використовували PAT+Liberty. Потім рослини T1, піддані селекції, як указано вище, переносили в окремі горщики і обприскували різними кількостями комерційних ариллоксіалканілатних гербіцидів.

Таблиця 7

Відповідь рослин Arabidopsis T1, трансформованих з використанням AAD-12 v1 (оптимізованого для рослин), на діапазон кількостей 2,4-D, що наноситься в післясходовий період, в порівнянні з популяцією резистентних рослин (T<sub>4</sub>), гомозиготних по AAD-1 v3, рослинами, трансформованими з використанням Pat-Cry1F, ауксин-сприйнятливим контролем

Трансформанти T <sub>1</sub> по гену AAD-12 v1 Середні	% пошкоджень			% пошкоджень	
	<20 %	20-40 %	>40 %	Середнє	Стандартне відхилення
Необроблений контроль - буфер	6	0	0	0	0
50 г ке/га 2,4-D	6	0	2	16	24
200 г ке/га 2,4-D	6	1	1	11	18
800 г ке/га 2,4-D	5	2	1	15	20
3200 г ке/га 2,4-D	8	0	0	6	6
PAT/Cry1F (трансформований контроль) Середні	% пошкоджень			% пошкоджень	
	<20 %	20-40 %	>40 %	Середнє	Стандартне відхилення
Необроблений контроль - буфер	10	0	0	0	0
50 г ке/га 2,4-D	4	1	5	31	16
200 г ке/га 2,4-D	0	0	10	70	2
800 г ке/га 2,4-D	0	0	10	81	8
3200 г ке/га 2,4-D	0	0	10	91	2
Трансформанти T <sub>1</sub> по гену AAD-12 v1 Середні	% пошкоджень			% пошкоджень	
	<20 %	20-40 %	>40 %	Середнє	Стандартне відхилення
Необроблений контроль - буфер	10	0	0	0	0
50 г ке/га 2,4-D	10	0	0	0	0
200 г ке/га 2,4-D	10	0	0	0	0
800 г ке/га 2,4-D	10	0	0	0	0
3200 г ке/га 2,4-D	9	1	0	2	6

У таблиці 7 порівнюють відповідь AAD-12 (v1) і контрольних генів по наданню резистентності до 2,4-D трансформантів T1 Arabidopsis. Відповідь представлена в термінах % видимих пошкоджень через 2 WAT. Дані представлені у вигляді гістограми окремих рослин, що виявляють невеликі пошкодження або їх відсутність (<20 %), помірні пошкодження (20-40 %) або важкі пошкодження (>40 %). Оскільки кожна рослина T1 є незалежним трансформантом, можна очікувати значної варіації індивідуальних відповідей рослин T1 в межах вказаної кількості. Для кожної обробки представлені арифметичне середнє і стандартне відхилення. У

останній колонці також вказаний діапазон індивідуальної відповіді для кожної кількості і трансформації. PAT/Cry1F-трансформовані *Arabidopsis* служили як ауксин-сприйнятливий трансформований контроль. Ген AAD-12 (v1) додавав резистентності до гербіцидів окремим рослинам T1 *Arabidopsis*. У межах вказаної обробки рівень відповіді рослин значно варіювався, і це можна приписати тому, що кожна рослина являє собою незалежний трансформант.

Таблиця 8

Відповідь рослин T<sub>1</sub> *Arabidopsis* на діапазон кількостей R-дихлорпропу, що наноситься в післясходовий період

Ген AAD-12 v1 Середні	% пошкоджень			% пошкоджень	Стандартне відхилення
	<20%	20-40%	>40%	Середнє	
Необроблений контроль	6	0	0	0	0
50 г ке/га R-дихлорпропу	0	0	8	63	7
200 г ке/га R-дихлорпропу	0	0	8	85	10
800 г ке/га R-дихлорпропу	0	0	8	96	4
3200 г ке/га R-дихлорпропу	0	0	8	98	2
PAT/Cry1F Середні	% пошкоджень			% пошкоджень	Стандартне відхилення
	<20%	20-40%	>40%	Середнє	
Необроблений контроль	10	0	0	0	0
50 г ке/га R-дихлорпропу	0	10	0	27	2
200 г ке/га R-дихлорпропу	0	0	10	69	3
800 г ке/га R-дихлорпропу	0	0	10	83	6
3200 г ке/га R-дихлорпропу	0	0	10	90	2
Рослини T <sub>4</sub> , гомозиготні по гену AAD-1 (v3)	% пошкоджень			% пошкоджень	Стандартне відхилення
	<20%	20-40%	>40%	Середнє	
Необроблений контроль	10	0	0	0	0
50 г ке/га R-дихлорпропу	10	0	0	0	0
200 г ке/га R-дихлорпропу	10	0	0	0	0
800 г ке/га R-дихлорпропу	10	0	0	0	0
3200 г ке/га R-дихлорпропу	10	0	0	0	0

Важливо зазначити, що при кожній тестованій кількості 2,4-D окремі рослини залишалися непошкодженими, в той час як деякі рослини мали важкі пошкодження. Середнє значення пошкоджень у всій популяції на норму внесення представлено в таблиці 7 виключно для демонстрації значущої відмінності між рослинами, трансформованими з використанням AAD-12 (v1), і рослин дикого типу або PAT/Cry1F-трансформованих контролів. Рівні пошкодження мали тенденцію до підвищення, і частка непошкоджених рослин була більш низькою при підвищенні норм внесення до 3200 г ке/га (або ~6-кратною нормою внесення в польових умовах). Також при цих високих нормах внесення розчин для обприскування ставав сильноокислим, якщо його не забуферювали. *Arabidopsis*, вирощений, головним чином, у вегетаційній камері, має дуже тонку кутикулу, і важкі опікові ефекти можуть утруднювати тестування при цих підвищених нормах внесення. Проте, багато окремих рослин виживали при 3200 г ке/га 2,4-D з невеликими пошкодженнями або без них.

У таблиці 8 представлений аналогічно проведений аналіз дозозалежної відповіді рослин T1 *Arabidopsis* на феноксипропіонову кислоту, дихлорпроп. Дані свідчать про те, що гербіцидно активний (R-) ізомер дихлорпропу не є відповідним субстратом для AAD-12 (v1). Те, що AAD-1 досить добре буде метаболізувати R-дихлорпроп для надання комерційно прийнятної стійкості, є однією з відмітних характеристик, що розділяють два гени (таблиця 8). AAD-1 і AAD-12 вважають R- і S-специфічними  $\alpha$ -кетоглутаратдіоксигеназами, відповідно.

AAD-12 (v1) як селективний маркер: Початково можливість використання AAD-12 (v1) як селективного маркер при використанні 2,4-D як селективного засобу аналізували за допомогою арабідопсису, трансформованого, як описано вище. Приблизно 50 насінин *Arabidopsis* покоління

T4 (гомозиготних по AAD-12 (v1)) додавали до приблизно 5000 насінин дикого типу (сприйнятливим). Порівнювали декілька обробок, для кожного з лотків з рослинами використовували один або два часи нанесення 2,4-D по одній з наступних схем обробок: через 7 DAP, через 11 DAP або через 7, потім 11 DAP. Оскільки всі окремі рослини також містили ген PAT в тому ж векторі для трансформації, AAD-12, що піддається селекції за допомогою 2,4-D, можна напряму порівнювати з PAT, що піддається селекції за допомогою глюфосинату.

Обробки проводили з використанням розпилювача DeVilbiss, як описано вище. Рослини ідентифікували як резистентні або сприйнятливі через 17 DAP. Оптимальна обробка являла собою 75 г ке/га 2,4-D, що наноситься через 7 і 11 днів після посадки (DAP), була однаково ефективною по частоті селекції і приводила до меншого пошкодження гербіцидами окремих трансформованих рослин, ніж при схемі селекції з використанням Liberty. Ці результати свідчать про те, що AAD-12 (v1) можна ефективно використовувати як альтернативний селективний маркер для популяції трансформованого *Arabidopsis*.

Успадкування: Велика кількість об'єктів T1 самозапильовались з утворенням насіння T2. Це насіння було потомством, що тестується за допомогою нанесення 2,4-D (200 г ке/га) на 100 випадкових сибсів T2. Кожну окрему рослину T2 переносили в 7,5-см квадратні горщики перед обприскуванням (автоматичний пристрій для обприскування з об'ємом розчину для обприскування 187 л/га). Сімдесят п'ять процентів сімейств T1 (рослин T2) розщеплювалися відповідно до передбачуваної моделі 3 резистентних: 1 сприйнятлива рослина для домінантно успадкованого єдиного локусу з менделевським успадкуванням, як визначали за допомогою аналізу з використанням критерію  $\chi^2$ -квадрату ( $P > 0,05$ ).

Збирали насіння від 12 до 20 окремих рослин T2 (насіння T3). Двадцять п'ять сибсів T3 з кожного з восьми випадково вибраних сімейств T2 були потомством, що тестується, як описано вище. У кожній лінії ідентифікували приблизно третину сімейств T2, як передбачають, гомозигот (нерозщеплювані популяції). Ці дані свідчать про те, що AAD-12 (v1) стабільно інтегрується і успадковується по менделевському типу щонайменше в трьох поколіннях.

Таблиця 9

Порівняння відповіді рослин T<sub>2</sub> з AAD-12 (v1) і трансформованих контрольних рослин *Arabidopsis* на некореневе нанесення різних ауксинових гербіцидів

Pyridyloxyacetic auxins		
Обробка гербіцидом	Середній % пошкоджень через 14 DAT	
	Розщеплення рослини T <sub>2</sub> з AAD-12 (v1) (pDAB724.01.120)	Pat/Cry1f - Контроль
280 г ке/га триклопіру	0	52
560 г ке/га триклопіру	3	58
1120 г ке/га триклопіру	0	75*
2240 г ке/га триклопіру	3	75*
280 г ке/га флуороксипіру	0	75*
560 г ке/га флуороксипіру	2	75*
1120 г ке/га флуороксипіру	3	75*
2240 г ке/га флуороксипіру	5	75*
Неактивний метаболіт DCP		
280 г ке/га 2,4-DCP	0	0
560 г ке/га 2,4-DCP	0	0
1120 г ке/га 2,4-DCP	0	0
2240 г ке/га 2,4-DCP	0	0

Додатковий аналіз резистентності до гербіцидів у AAD-12 *Arabidopsis* за допомогою некореневого нанесення: Здатність AAD-12 (v1) забезпечувати резистентність до інших арилоксіалканоатауксинових гербіцидів у трансгенного арабідопсису визначали за допомогою некореневого нанесення різних субстратів. Насіння *Arabidopsis* покоління T2 стратифікували і висівали в лотки для селекції так само, як і у *Arabidopsis*. Аналогічно саджали трансформовану контрольну лінію, що містить PAT і ген резистентності до комах Cry1F. Розсаду переносили в окремі 3-дюймові горщики в теплицю. Всі рослини обприскували з використанням автоматичного пристрою для обприскування, встановленого на 187 л/га. Рослини обприскували

з використанням діапазону піридиллоксіацетатних гербіцидів: 280-2240 г ке/га триклопіру (Garlon 3A, Dow AgroSciences) і 280-2240 г ке/га флуроксіпіру (Starane, Dow AgroSciences); і метаболіт 2,4-D, отриманий внаслідок активності AAD-12, 2,4-дихлорфенол (DCP, Sigma) (в молярному еквіваленті 280-2240 г ке/га 2,4-D, використовували DCP технічної категорії). Всі розчини для нанесення складали у воді. Кожну обробку повторювали 3-4 рази. Рослини оцінювали через 3 і 14 днів після обробки.

Не спостерігали ефекту метаболіту 2,4-D, 2,4-дихлорфенолу (DCP), відносно трансгенного контрольного *Arabidopsis* (Pat/Cry1F) без AAD-12. AAD-12-трансформовані рослини також були визначено захищеними від пошкодження гербіцидами триклопіром і флуроксіпіром, що спостерігається у трансформованих нерезистентних контролів (див. таблицю 9). Ці результати підтверджують, що AAD-12 (v1) у *Arabidopsis* забезпечує резистентність до тестованих піридиллоксіоцетових ауксинів. Це перше повідомлення про фермент зі значущою активністю відносно гербіцидів на основі піридиллоксіоцетової кислоти. Не повідомляли про інший деградуючий 2,4-D фермент з аналогічною активністю.

Молекулярний аналіз *Arabidopsis* з AAD-12 (v1): Аналіз Invader (способи по процедурах набору Third Wave Agbio) для аналізу копійності гена PAT здійснювали з використанням тотальної ДНК, отриманої за допомогою набору Qiagen DNeasy, на численних лініях, гомозиготних по AAD-12 (v1), для визначення стабільної інтеграції одиниці трансформації рослини, що містить PAT і AAD-12 (v1). При аналізі оцінювали пряме фізичне зчеплення цих генів, оскільки вони містяться в одній плазміді.

Результати показали, що всі аналізовані резистентні до 2,4-D рослини містили PAT (і, таким чином, як мають на увазі, AAD-12 (v1)). Аналіз копійності показав, що загальна кількість вставок знаходиться в діапазоні від 1 до 5 копій. Це також корелює з даними про експресію білка AAD-12 (v1), що свідчать про те, що наявність ферменту приводить до значно високих рівнів резистентності до всіх комерційно доступних феноксіоцетових і піридиллоксіоцетових кислот.

*Arabidopsis*, трансформований з використанням молекулярного стекінгу AAD-12 (v1) і гена резистентності до гліфосату: Отримували насіння *Arabidopsis* T1, як описано вище, що містить плазмиду pDAB3759 (AAD-12 (v1) + EPSPS), яка кодує передбачувану ознаку резистентності до гліфосату. Трансформанти T1 піддавали селекції з використанням AAD-12 (v1) як селективного маркера, як описано вище. Рослини T1 (об'єкти, трансформовані окремо) отримували в першому досліді по селекції і переносили в тридцятилітрові горщики в теплицю, як описано вище. Також тестували три різні контрольні лінії *Arabidopsis*: Columbia-0 дикого типу, лінії, гомозиготні по AAD-12 (v1)+PAT T4 (трансформовані з використанням pDAB724), і лінію, гомозиготну по PAT+Cry1F (трансформований контроль). Рослини, трансформовані з використанням pDAB3759 і pDAB724, піддавали попередній селекції по стійкості до 2,4-D на стадії сходів. Через чотири дні після пересадження рослини рівномірно розділяли для некореневої обробки за допомогою автоматичного пристрою для обприскування, як описано вище, з 0, 26,25, 105, 420 або 1680 г ке/га гліфосату (Glyphomax Plus, Dow AgroSciences) у воді. Всі обробки повторювали від 5 до 20 разів. Рослини оцінювали через 7 і 14 днів після обробки.

"AAD-12 v1 gene" - "ген AAD-12 v1", "Averages" - "Середні", "% Injury" - "% пошкодження", "Ave" - "Середнє", "Std Dev" - "Стандартне відхилення", "Untreated control" - "Необроблений контроль", "g ae/ha" - "г ке/га гліфосату", "Wild type" - "Дикий тип".

Таблиця 10

Відповідь *Arabidopsis* на діапазон кількостей гліфосату, що наноситься в післясходовий період (через 14 DAT)

Ген AAD-12 v1+EPSPS+HptII (pDAB3759) (Середні)	%пошкодження			% пошкодження Середнє	Стандартне відхилення
	<20 %	20-40%	>40 %		
Необроблений контроль	5	0	0	0	0
26.25 г ке/га гліфосату	13	2	1	11	16
105 г ке/га гліфосату	10	1	5	34	38
420 г ке/га гліфосату	5	6	5	44	37
1680 г ке/га гліфосату	0	0	16	85	9

Таблиця 10

Відповідь Arabidopsis на діапазон кількостей гліфосату, що наноситься в післясходовий період (через 14 DAT)

PAT/Cry1F Середні	% пошкодження			% пошкодження	Стандартне відхилення
	<20 %	20-40%	>40 %	Середнє	
Необроблений контроль	5	0	0	0	0
26.25 г ке/га гліфосату	0	0	5	67	7
105 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0
420 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0
1680 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0
Дикий тип (Col-0) Середні	% пошкодження			% пошкодження	Стандартне відхилення
	<20 %	20-40 %	>40 %	Середнє	
Необроблений контроль	5	0	0	0	0
26.25 г ке/га гліфосату	0	0	5	75	13
105 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0
420 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0
1680 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0
pDAB724 T4 (PAT+AAD-12) Середні	% пошкодження			% пошкодження	Стандартне відхилення
	<20 %	20-40%	>40 %	Середнє	
Необроблений контроль	5	0	0	0	0
26.25 г ке/га гліфосату	0	0	5	66	8
105 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0
420 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0
1680 г ке/га гліфосату	0	0	5	100	0

Рослини, визначені при початковій оцінці резистентності як стійкі до 2,4-D, згодом визначали як стійкі до гліфосату при порівнянні з відповіддю трьох контрольних ліній. Ці результати свідчать про те, що рослинам можна додавати резистентність до двох гербіцидів з різними механізмами дії, включаючи стійкість до 2,4-D і гліфосату, що дозволяє використовувати обидва гербіциди в післясходовий період. Крім того, AAD-12+2,4-D ефективно використовували як селективний маркер для точної селекції по резистентності.

Arabidopsis з AAD-12, підданий генетичному стекінгу з AAD-1 для досягнення більш широкого спектра стійкості до гербіцидів: Рослини з AAD-12 (v1) (pDAB724) і AAD-1 (v3) (pDAB721) піддавали реципрокному схрещуванню і збирали насіння F1. Вісім насінин F1 саджали і дозволяли вирости для отримання насіння. З восьми рослин F1 отримували зразки тканин і піддавали їх аналізу вестерн-блотингу для підтвердження наявності обох генів. Робили висновок про те, що всі 8 тестованих рослин експресували білки AAD-1 і AAD-12. Насіння збирали і дозволяли йому висушуватися протягом тижня перед посадкою.

Висівали одну сотню насінин F2 і наносили 280 г активного інгредієнта/га глүфосинату. Дев'яносто шість рослин F2 виживали після селекції з використанням глүфосинату, що відповідає очікуваному співвідношенню розщеплення для двох незалежно підібраних локусів резистентності до глүфосинату (15 R:1 S). Потім резистентні до глүфосинату рослини обробляли 560 г ке/га R-дихлорпропу +560 г ке/га триклопіру, що наноситься на рослини то тій же схемі обприскування, яку використовували для інших тестів. Рослини класифікували в 3 і 14 DAT. Шістдесят три з 96 рослин, що вижили після селекції з використанням глүфосинату, також виживали після нанесення гербіцидів. Ці дані відповідають очікуваному профілю розщеплення (9R: 6S) двох незалежно підібраних домінантних ознак, де кожна додає резистентності тільки до одного з ауксинових гербіцидів (R-дихлорпропу або триклопіру). Результати свідчать про те, що AAD-12 (pDAB724) можна успішно піддавати стекінгу з AAD-1 (pDAB721), таким чином, збільшуючи спектр гербіцидів, які можна наносити на сільськогосподарську культуру, яка цікавить [(2,4-D+R-дихлорпроп) і (2,4-D+флүроксипір+триклопір), відповідно. Це можна



застосовувати для надання надто сприйнятливим видам стійкості до 2,4-D за допомогою загальноприйнятого стекингу двох окремих генів резистентності до 2,4-D. Додатково, якщо ген використовують як селективний маркер для третього і четвертого генів, які цікавлять, за допомогою незалежних трансформацій, то кожен пару генів можна об'єднувати за допомогою загальноприйнятих способів схрещування, а потім піддавати селекції в поколінні F1 за допомогою парного обприскування гербіцидами, що є виключаючими між ферментами AAD-1 і AAD-12 (як показано з використанням R-дихлорпропу і триклопіру для AAD-1 і AAD-12, відповідно).

Інші стеки з AAD також входять в об'єм даного винаходу. Білок TfdA, приведений де-небудь в даному описі (Streber et al.), наприклад, можна використовувати разом з генами AAD-12 за даним винаходом для надання трансгенним рослинам за даним винаходом спектрів резистентності до гербіцидів.

#### ПРИКЛАД 5

Віскер-опосередкована трансформація кукурудзи з використанням селекції імазетапіром  
 Клонування AAD-12 (v1): Ген AAD-12 (v1) вирізали з проміжного вектора pDAB3283 у вигляді фрагмента NcoI/SacI. Його лігували безпосередньо в аналогічно рестрикований вектор pDAB3403, що містить промотор ZmUbi1 для однодольних рослин. Два фрагменти лігували з використанням ДНК-лігази T4 і з їх використанням трансформували клітини DH5 $\alpha$ . Отримували мініпрорости отриманих колоній з використанням набору Qiagen QIA Spin mini prep, і колонії піддавали розщепленню ферментами для перевірки орієнтації. Ця перша проміжна конструкція (pDAB4100) містить касету ZmUbi1:AAD-12 (v1). Цю конструкцію розщеплювали NotI і PvuI для виділення генетичної касети і розщеплення небажаного кістяка. Її лігували в рестрикований NotI pDAB2212, що містить AHAS як селективний маркер, промотором актину рису, що запускається OsAct1. Кінцеву конструкцію позначали як pDAB4101 або pDAS1863, і вона містила ZmUbi1/AAD-12 (v1)/ZmPer5:OsAct1/AHAS/LZmLip.

Ініціація суспензійної культури калюсу: Для отримання незрілих ембріонів для ініціації культури калюсу здійснювали схрещування F1 між вирощеними в теплиці Hi-II батьками A і B (Armstrong et al. 1991). При досягненні ембріонами розміру 1,0-1,2 мм (приблизно 9-10 днів після запилення) збирали качани і стерилізували їх поверхню за допомогою чищення милом Liqui-Nox®, занурювали в 70 % етанол на 2-3 хвилини, потім занурювали в 20 % комерційний відбілювач (0,1 % гіпохлорит натрію) на 30 хвилин.

Качани промивали в стерильній дистильованій воді, асептично відділяли незрілі зиготні ембріони і культивували їх в середовищі 15Ag10 (середовище N6 (Chu et al., 1975), 1,0 мг/л 2,4-D, 20 г/л сахарози, 100 мг/л гідролізату казеїну (ферментативно розщепленого), 25 мМ L-пролін, 10 мг/л AgNO $_3$ , 2,5 г/л Gelrite, pH 5,8) протягом 2-3 тижнів з видаленням щитків з середовища. Тканину, що демонструє правильну морфологію (Welter et al., 1995), вибірково переносили через двотижневі інтервали в свіже середовище 15Ag10 приблизно на 6 тижнів, потім через двотижневі інтервали її переносили в середовище 4 (середовище N6, 1,0 мг/л 2,4-D, 20 г/л сахарози, 100 мг/л гідролізату казеїну (ферментативно розщепленого), 6 мМ L-пролін, 2,5 г/л Gelrite, pH 5,8) приблизно на 2 місяці.

Для ініціації ембріогенної суспензійної культури приблизно 3 мл об'єму клітин (PCV) тканини калюсу, отриманої з одного ембріона, додавали в приблизно 30 мл рідкого середовища H9CP+ (базова суміш солей MS (Murashige and Skoog, 1962), модифіковані вітаміни MS, що містять в 10 раз менше ніотинової кислоти і в 5 раз більше хлориду тіаміну, 2,0 мг/л 2,4-D, 2,0 мг/л  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (NAA), 30 г/л сахарози, 200 мг/л гідролізату казеїну (кислотний витяг), 100 мг/л міоїнозиту, 6 мМ L-пролін, 5 % об./об. кокосового молока (доданого безпосередньо перед субкультивуванням), pH 6,0). Суспензійні культури підтримували в умовах темряви в конічних колбах Ерленмейєра місткістю 125 мл в термошейкері, встановленому на 125 об./хв. при 28 °C. Клітинні лінії, як правило, стають стабільними протягом від 2 до 3 місяців після ініціації. Протягом періоду стабілізації суспензії субкультивували кожні 3,5 дні, додаючи 3 мл PCV клітин і 7 мл кондиціонованого середовища в 20 мл свіжого рідкого середовища H9CP+ з використанням піпетки з широким отвором. Коли починалося подвоєння зростання тканини, суспензії укрупнювали і підтримували у флаконах ємністю 500 мл, при цьому 12 мл PCV клітин і 28 мл кондиціонованого середовища переносили в 80 мл середовища H9CP+. Коли суспензії повністю стабілізувалися, їх піддавали кріоконсервації для подальшого використання.

Кріоконсервація і розмороження суспензій: Через два дні після субкультивування 4 мл PCV клітин суспензії і 4 мл кондиціонованого середовища додавали в 8 мл кріопротектора (розчиненого в середовищі H9CP+ без кокосового молока, з 1 М гліцерином, 1 М DMSO, 2 М сахарозою, стерилізованою фільтрацією) і дозволяли струшуватися при 125 об./хв. і 4 °C протягом 1 години у флаконі місткістю 125 мл. Через 1 годину 4,5 мл додавали в охолоджену

посудину для кріоконсервації Corning місткістю 5,0 мл. Після наповнення окремі посудини зберігали протягом 15 хвилин при 4 °C в програмованому кріозаморожувачі, потім дозволяли їм заморожуватися зі швидкістю -0,5 °C/хвилина до досягнення кінцевої температури -40 °C. Після досягнення кінцевої температури посудини переносили в коробки в штативах всередині кріосховища Cryoplus 4 (Form a Scientific), наповненого парами рідкого азоту.

Для розмороження посудини витягували з кріосховища і вміщували в закритий контейнер з сухим льодом, потім занурювали у водяну баню, що підтримується при 40-45 °C, до зниження "кипіння". При розмороженні вміст виливали на стос з ~8 стерильних фрагментів фільтрувального паперу Whatman товщиною 70 мм (№ 4) в закриті чашки Петрі 100×25 мм. Протягом декількох хвилин рідини дозволяли вбиратися в фільтри, потім верхній фільтр, що містить клітини, переносили на середовище GN6 (середовище N6, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 2,5 г/л Gelrite, pH 5,8) на 1 тиждень. Через 1 тиждень тільки тканину з морфологією, яка становить інтерес, переносили з фільтрувального паперу безпосередньо на свіже середовище GN6. Цю тканину субкультивували кожні 7-14 днів до отримання від 1 до 3 грамів для ініціації суспензійної культури в приблизно 30 мл середовища H9CP+ в конічних колбах Ерленмейєра місткістю 125 мл. Три мілілітри PCV субкультивували в свіжому середовищі H9CP+ кожні 3,5 дні до отримання загалом 12 мл PCV, після чого субкультивування здійснювали, як описано вище.

Стабільна трансформація: Приблизно за 24 години до трансформації 12 мл PCV раніше підданої кріоконсервації суспензії ембріонних клітин кукурудзи і 28 мл кондиціонованого середовища субкультивували в 80 мл рідкого середовища GN6 (середовище GN6 без Gelrite) в конічній колбі Ерленмейєра місткістю 500 мл і вміщували на шейкер при 125 об./хв. і 28 °C. Це повторювали 2 рази з використанням однієї і тієї ж клітинної лінії таким чином, що всього 36 мл PCV розподіляли по 3 флаконах. Через 24 години рідкі середовища GN6 видаляли і замінювали їх 72 мл осмотичного середовища GN6 S/M (середовище N6, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 45,5 г/л сорбіту, 45,5 г/л маніту, 100 мг/л міоїнозиту, pH 6,0) на флакон для здійснення плазмолізу клітин. Флакони вміщували на шейкер при 125 об./хв. в темряву на 30-35 хвилин при 28 °C, і протягом цього часу отримували суспензію 50 мг/мл віскерів з карбіду кремнію, додаючи відповідний об'єм 8,1 мл рідкого середовища GN6 S/M в ~405 мг заздалегідь автоклавованих стерильних віскерів з карбіду кремнію (Advanced Composite Materials, Inc.).

Після інкубації в GN6 S/M вміст кожного флакона об'єднували в колбі для центрифугування місткістю 250 мл. Коли всі клітини осаджувались на дно, відбирали все рідке середовище GN6 S/M, крім ~44 мл, збирали в стерильний флакон місткістю 1 л для подальшого використання. Заздалегідь зволожену суспензію віскерів центрифугували на вортексі протягом 60 секунд при максимальній швидкості, а потім 8,1 мл додавали в бутель, в який як останній етап додавали 170 мкг ДНК. Бутель негайно вміщували в модифікований комерційний змішувач для фарби Red Devil 5400 і перемішували протягом 10 секунд. Після перемішування суміш клітин, середовищ, віскерів і ДНК додавали до вмісту флакона місткістю 1 л разом з 125 мл свіжого рідкого середовища GN6 для відновлення розчину, що встановлює осмотичний градієнт. Клітинам дозволяли відновлюватися на шейкері при 125 об./хв. протягом 2 годин при 28 °C перед фільтрацією через фільтрувальний папір Whatman № 4 (5,5 см) з використанням скляного колектора для клітин, сполученого з вакуумним трубопроводом.

Приблизно 2 мл диспергованої суспензії піпетували на поверхні фільтра одночасно з впливом вакууму. Фільтри вміщували на чашки розміром 60×20 мм із середовища GN6. Чашки культивували протягом 1 тижня при 28 °C в закритій коробці.

Через 1 тиждень фільтрувальний папір переносили на чашки розміром 60×20 мм із середовищем GN6 (3P) (середовище N6, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 100 мг/л міоїнозиту, 3 мкМ імазетапір від Pursuit® DG, 2,5 г/л Gelrite, pH 5,8). Чашки вміщували в коробки і культивували протягом додаткового тижня.

Через два тижні після трансформації тканину заливали, зішкрібаючи всі клітини на чашці в 3,0 мл розплавленого середовища GN6 з агарозою (середовище N6, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 100 мг/л міоїнозиту, 7 г/л легкоплавкої агарози, pH 5,8, автоклавована протягом всього 10 хвилин при 121 °C), що містить 3 мкМ імазетапіру від Pursuit® DG. Тканину руйнували і 3 мл агарози і тканини рівномірно виливали на поверхню планшета розміром 100×15 мм з GN6 (3P). Це повторювали для всіх інших чашок. Після заливки чашки окремо запечатували з використанням Nescofilm® або Parafilm M®, а потім культивували до появи передбачуваних ізолятів.

Спосіб виділення ізолятів і регенерації: Ймовірно трансформовані об'єкти виділяли з запечатаних чашок, які містять Pursuit®, приблизно через 9 тижнів після трансформації за допомогою перенесення на свіже селекційне середовище тієї ж концентрації в чашки 60×20 мм.

Якщо приблизно через 2-3 тижні стійке зростання було очевидним, об'єкт вважали резистентним і відбирали його для молекулярного аналізу.

"Event" - "Об'єкт", "Spray treatment" - "Обприскування", "% Injury" - "% пошкодження", "AAD-12 ELISA" - "ELISA на AAD-12", "AAD-12 PCR" - "ПЛР на AAD-12", "cloning region" - "область клонування", "AHAS Copy #" - "Копійність AHAS", "g ae/ha" - "г ке/га імазетапіру", "Band smaller than expected" - "Смуга менше очікуваної".

Таблиця 11

Характеристика рослин кукурудзи T0, трансформованих з використанням AAD-12

Об'єкт	Обприскування	% пошкодження (14 DAT)	ELISA на AAD-12 (ppm TSP)	ПЛР на AAD-12 (область клонування)	ПЛР на AAD-12 (PTU)	Копійність AHAS (Invader)
4101(0)003.001	2240 г ке/га 2,4-D	0	146,9	+	+	1
4101(0)003.003	2240 г ке/га 2,4-D	0	153,5	+	+	1
4101(0)005.001	2240 г ке/га 2,4-D	0	539,7	+	+	9
4101(0)005.0012	0 г ке/га 2,4-D	0	562,9	+	+	7
4101(0)001.001	70 г ке/га імазетапіру	5	170,7	+	+	6
4101(0)002.001	0 г ке/га імазетапіру	0	105,6	+	-	2
4101(0)002.002	70 г ке/га імазетапіру	0	105,3	+	-	2
4101(0)003.002	70 г ке/га імазетапіру	0	0	+	Смуга менше очікуваної	15

Ініціювали регенерацію, переносячи тканину калюсу в індукційне середовище з цитокінінами 28 (ЗР), що містить 3 мкМ імазетапір від Pursuit.RTM. DG, солі і вітаміни MS, 30,0 г/л сахарози, 5 мг/л BAP, 0,25 мг/л 2,4-D, 2,5 г/л Gelrite; pH 5,7. Клітинам дозволяли рости при низькій освітленості ( $13 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) протягом одного тижня, потім при більшій освітленості ( $40 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) протягом ще одного тижня перед перенесенням в регенераційне середовище 36 (ЗР), ідентичне 28 (ЗР), за винятком відсутності регуляторів росту рослин. Видаляли невеликі (3-5 см) проростки і вміщували їх в культуральні пробірки розміром 150×25 мм, що містять неселекційне середовище SHGA (базові солі і вітаміни Шенка і Хільдебрандта, 1972; 1 г/л міоінозиту, 10 г/л сахарози, 2,0 г/л Gelrite, pH 5,8). При розвитку у проростків достатньої кореневої системи і системи пагонів, їх пересажували в ґрунт в теплиці.

У 4 експериментах повні проростки, що складаються з пагону і кореня, утворювалися in vitro на залитих селекційних чашках в умовах темряви без проходження загальноприйнятої фази калюсу. Тканини листя дев'яти з цих "ранніх регенераторів" піддавали ПЛР кодуючої області і ПЛР транскрипційної одиниці рослин (PTU) для визначення гена AAD-12 і генетичної касети, відповідно. Всі містили інтактну кодуючу область AAD-12, в той час як 3 не мали повнорозмірної PTU (таблиця 11). Ці "ранні регенератори" ідентифікували як об'єкти 4101, щоб відрізнити їх від отриманих загальноприйнятим способом об'єктів, ідентифікованих як об'єкти "1283". Рослини від 19 додаткових об'єктів, отриманих стандартною селекцією і регенерацією, відправляли в теплицю, вирощували до дозрівання і перехресно запилювали з патентованою інбредною лінією для отримання насіння T1. Деякі з об'єктів, ймовірно, є клонами один одного в зв'язку зі схожим характером утворення смуг при Саузерн-блотингу, таким чином, отримували тільки 14 унікальних об'єктів. Рослини T0 від об'єктів були стійкими до 70 г/га імазетапіру. При аналізі Invader (ген AHAS) виявляли копійність вставки в діапазоні від 1 до >10 копій. Тринадцять об'єктів містили повну кодуючу область AAD-12; однак, при подальшому аналізі виявляли, що у випадку дев'яти об'єктів повна транскрипційна одиниця рослин не вбудувалася. Жоден з аномальних об'єктів 1863 не пропускали далі стадії T1 і для подальшого визначення характеристики використовували об'єкти 4101.

Молекулярний аналіз - Кукурудза, матеріали і способи: Збір тканини, виділення ДНК і кількісний аналіз. Свіжу тканину вміщували в пробірки і ліофілізували при 4 °C протягом 2 днів. Після повного висушування тканини, в пробірку вміщували гранулу вольфраму (Valenite) і зразки піддавали сухому подрібненню протягом 1 хвилини з використанням кульового млина Kelco. Потім здійснювали стандартний спосіб виділення ДНК з використанням DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Потім аліквоту виділеної ДНК забарвлювали Pico Green (Molecular Probes P7589) і аналізували за допомогою флуориметра (BioTek) з відомими стандартами для отримання концентрації в нг/мкл.

Аналіз Invader: Зразки ДНК розбавляли до 20 нг/мкл, потім піддавали денатурації за допомогою інкубації в термоциклері при 95 °C протягом 10 хвилин. Потім отримували суміш Signal Probe mix з використанням наданої суміші олігонуклеотидів і MgCl<sub>2</sub> (Third Wave Technologies). Аліквоту 7,5 мкл вміщували в кожну ямку планшета для аналізу Invader, потім аліквоту 7,5 мкл контролів, стандартів і 20 нг/мкл розбавлених невідомих зразків. Кожну ямку покривали 15 мкл мінерального масла (Sigma). Потім планшети інкубували при 63 °C протягом 1 години і аналізували за допомогою флуориметра (Biotek).

За допомогою обчислення % сигналу вище фону для цільового зонда, розділеного на % сигналу вище фону для зонда внутрішнього контролю, отримували співвідношення. Співвідношення для стандартів з відомою копійністю, отримане і валідоване за допомогою аналізу Саузерн-блотингу, використовували для визначення приблизної копійності для невідомих об'єктів.

Полімеразна ланцюгова реакція: Як матрицю використовували всього 100 нг тотальної ДНК. Використовували 20 мМ кожного праймера з набором Takara Ex Taq PCR Polimerase kit (Minis TAKRR001A). Праймерами для PTU AAD-12 (v1) були прямий GAACAGTTAGACATGGTCTAAAGG (SEQ ID NO: 8) і зворотний GCTGCAACACTGATAAATGCCAACTGG (SEQ ID NO: 9). Реакцію ПЛР здійснювали в термоциклері 9700 Geneamp (Applied Biosystems), піддаючи зразки впливу 94 °C протягом 3 хвилин і 35 циклам впливу 94 °C протягом 30 секунд, 63 °C протягом 30 секунд і 72 °C протягом 1 хвилини і 45 секунд, потім 72 °C протягом 10 хвилин.

Праймерами для ПЛР кодуєчої області AAD-12 (v1) були прямий ATGGCTCAGACCACTCTCCAAA (SEQ ID NO: 10) і зворотний AGCTGCATCCATGCCAGGGA (SEQ ID NO: 11). Реакцію ПЛР здійснювали в термоциклері 9700 Geneamp (Applied Biosystems), піддаючи зразки впливу 94 °C протягом 3 хвилин і 35 циклам впливу 94 °C протягом 30 секунд, 65 °C протягом 30 секунд, і 72 °C протягом 1 хвилини і 45 секунд, потім 72 °C протягом 10 хвилин. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі, що забарвлюється EtBr.

Аналіз Саузерн-блотингу: Аналіз Саузерн-блотингу здійснювали з використанням геномної ДНК, отриманої за допомогою набору Qiagen DNeasy. Всього 2 мкг геномної ДНК з листя або 10 мкг геномної ДНК з калюсю протягом ночі піддавали розщепленню рестрикційними ферментами BsmI і SwaI для отримання даних про PTU.

Після розщеплення протягом ночі аліквоту ~100 нг аналізували з використанням 1 %-ного гелю, щоб пересвідчитися в повному розщепленні. Після цієї перевірки зразки аналізували з використанням великого 0,85 %-ного агарозного гелю протягом ночі при 40 Вольтх. Потім гель піддавали денатурації в 0,2 М NaOH, 0,6 М NaCl протягом 30 хвилин. Потім гель піддавали нейтралізації в 0,5 М Tris-HCl, 1,5 М NaCl, pH 7,5, протягом 30 хвилин. Потім використовували пристрій для блотингу, що містить 20-кратний SSC, для здійснення перенесення гелю на нейлонову мембрану (Millipore INYC00010) під дією сили ваги протягом ночі. Після перенесення протягом ночі мембрану піддавали впливу УФ-випромінювання за допомогою крослінкера (Stratagene UV stratalinker 1800) при 1200×100 мікроджоулях. Потім мембрану промивали в 0,1 % SDS, 0,1 SSC протягом 45 хвилин. Після промивання протягом 45 хвилин мембрану сушили протягом 3 годин при 80 °C, а потім зберігали при 4 °C до гібридизації. Фрагмент матриці для гібридизації отримували за допомогою вказаної вище ПЛР кодуєчої області з використанням плазмідної ДНК. Продукт піддавали електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі і вирізали, а потім екстрагували з гелю з використанням способу екстракції з гелю Qiagen (28706). Потім мембрану піддавали прегібридизації на етапі 60 °C протягом 1 години в буфері Perfect Hyb (Sigma H7033). Спосіб Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) використовували для отримання зонда на основі p32 (Perkin Elmer). Зонд очищали з використанням колонок Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Два мільйони CPM використовували для гібридизації Саузерн-блотів протягом ночі. Після гібридизації протягом ночі блоти піддавали двом промиванням по 20 хвилин при 65 °C в 0,1 % SDS, 0,1 % SSC. (Потім блоти експонували з плівкою протягом ночі, інкубуючи при -80 °C.

Післясходову стійкість до гербіцидів у кукурудзи T0, трансформованої з використанням AAD-12: Чотирьом об'єктам T0 дозволяли акліматизуватися в теплиці і вирощували до появи 2-4 нових, які виглядають нормальними листків з кільця (тобто рослини перейшли від культури тканин в умови вирощування в теплиці). Рослини вирощували при 27 °C в теплиці в умовах 16 годин освітлення: 8 годин темряви. Потім рослини обробляли комерційними складами Pursuit® (імазетапір) або 2,4-D-амін 4. Pursuit® розпилювали для демонстрації функціонування гена селективного маркера, присутнього в тестованих об'єктах. Нанесення гербіцидів здійснювали з використанням автоматичного пристрою для обприскування при об'ємі розчину для обприскування 187 л/га, висота розпилення 50 см. Рослини обприскували летальною дозою імазетапіру (70 г ке/га) або кількістю солі 2,4-D DMA, здатною значно ушкоджувати нетрансформовані лінії кукурудзи (2240 г ке/га). Летальну дозу визначали як кількість, що викликає >95 % пошкодження у інбредних Hi-II. Hi-II являє собою генетичний фон для трансформантів за даним винаходом.

Деякі окремі рослини були неушкодженими після обробки гербіцидами, резистентність до яких їм додали відповідні гени. Однак, окремий клон '001' об'єкта "001" (так званий 4101(0)-001-001) отримав незначних пошкоджень, але відновився до 14 DAT. Три з чотирьох об'єктів використовували надалі, окремі рослини схрещували з 5XH751 і отримували наступне покоління. Кожна стійка до гербіциду рослина була позитивною на наявність кодуєчої області AAD-12 (аналіз ПЛР) або наявність гена AHAS (аналіз Invader) у випадку рослин, стійких до 2,4-D і імазетапіру, відповідно. Білок AAD-12 визначали у всіх стійких до 2,4-D рослин T0, що містять інтактну кодуєчу область. Копійність трансгенів (AHAS і, як мають на увазі, AAD-12) значно варіювалася від 1 до 15 копій. Окремі рослини T0 вирощували до дозрівання і перехресно запилювали з патентованою інбредною лінією для отримання насіння T1.

Верифікація високої стійкості до 2,4-D у кукурудзи T1: Насіння T1 з AAD-12 (v1) висівали в 3-дюймові горщики, що містять середовища Metro Mix, і в фазу 2 листя рослини обприскували 70 г ке/га імазетапіру для усунення рослин, що не містять вставку. Рослини, що вижили, пересаджували в 1-галлонні горщики, що містять середовища Metro Mix, і вміщували в ті ж умови вирощування, які описані вище. У фазу V3-V4 рослини обприскували в автоматичному пристрої для обприскування, встановленому на 187 л/га при 560 або 2240 г ке/га 2,4-D DMA. Рослини класифікували в 3 і 14 DAT і порівнювали з контрольними рослинами 5XH751 x Hi-II. Шкалу оцінок 0-10 (від відсутності пошкоджень до критичних пошкоджень ауксинами) розробляли для розрізнення пошкоджень опорного кореня. Оцінку опорного кореня здійснювали в 14 DAT для демонстрації стійкості до 2,4-D. 2,4-D викликає деформацію опорного кореня, що є відповідним індикатором пошкодження ауксиновими гербіцидами у кукурудзи. Дані оцінки опорного кореня (як видно з таблиці нижче) свідчать про те, що 2 з 3 тестованих об'єктів були стабільно стійкими до 2240 г ке/га 2,4-D DMA. Об'єкт "pDAB4101(0)001.001" був очевидно нестабільним; однак, два інших об'єкти були стабільно стійкими до 2,4-D і 2,4-D + імазетапір або 2,4-D + гліфосат (див. таблицю 12).

"Herbicide" - "Гербіцид", "Untransformed control" - "нетрансформований контроль", "g ae/ha" - "г ке/га", "A scale of 0-10, 10 being the highest, was used for grading the 2,4-D DMA injury. Results are a visual average of four replications per treatment" - "Шкалу від 0 до 10, де 10 є найвищим балом, використовували для класифікації пошкоджень від 2,4-D DMA. Результати являють собою середнє при візуальній оцінці для чотирьох повторень на обробку".

Таблиця 12

Пошкодження опорного кореня трансформованих з використанням AAD-12 (v1) рослин T1 і нетрансформованих контрольних рослин кукурудзи: середнє пошкодження опорного кореня(шкала 0-10)

Гербіцид	Нетрансформований контроль	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 003.003	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 001.001	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 005.001
0 г ке/га 2,4-D DMA	0	0	0	0
2240 г ке/га 2,4-D DMA	9	1	8	0

Шкалу від 0 до 10, де 10 є найвищим балом, використовували для класифікації пошкоджень від 2,4-D DMA. Результати являють собою середнє при візуальній оцінці для чотирьох повторень на обробку

Успадкування AAD-12 (v1) у кукурудзи: Також проводили тестування потомства семи сімей T1 з AAD-12 (v1), схрещених з 5XH751. Насіння саджали в тридцятилітрові горщики, як описано вище. У фазу трьох листків всі рослини обприскували 70 г ке/га імазетапіру в автоматичному пристрої для обприскування, як описано вище. Через 14 DAT підраховували резистентні і сприйнятливі рослини. Чотири з шести тестованих ліній розщеплювалися відповідно до єдиного локусу, домінантної ознаки з менделевським успадкуванням (1R:1S), як визначали при аналізі з використанням хі-квадрату. Потім рослини, що вижили, обприскували 2,4-D і всі рослини вважали стійкими до 2,4-D (кількості >560 г ке/га). AAD-12 успадковується як стійкий ген резистентності до арилоксіалканоатауксинів в багатьох видах при реципрокному схрещуванні з комерційним гібридом.

Стекінг AAD-12 (v1) для підвищення спектра гербіцидів: AAD-12 (v1) (pDAB4101) і елітну інбредну лінію Roundup Ready (BE1146RR) реципрокно схрещували і збирали насіння F1. Саджали насіння від двох ліній F1 і обробляли 70 г ке/га імазетапіру в фазу V2 для усунення рослин, що не містять вставку. З рослин, що вижили, повторювані розділяли і обробляли 1120 г ке/га 2,4-D DMA+70 г ке/га імазетапіру (для підтвердження наявності гена AHAS) або 1120 г ке/га 2,4-D DMA+1680 г ке/га гліфосату (для підтвердження наявності гена Round Up Ready) в автоматичному пристрої для обприскування, відкаліброваному на 187 л/га. Рослини класифікували в 3 і 16 DAT. Дані обприскування показали, що AAD-12 (v1) можна загальноприйнятим чином піддавати стекінгу з геном стійкості до гліфосату (такому як ген Roundup CP4-EPSPS) або іншими генами стійкості до гербіцидів для отримання збільшеного спектра гербіцидів, які можна безпечно наносити на кукурудзу. Аналогічно, у рослин F1 спостерігали стійкість до імідазолінону + 2,4-D + гліфосату і не спостерігали негативного фенотипу при молекулярних або бридингових стекових комбінаціях цих численних трансгенів.

Таблиця 13

Дані, що демонструють збільшення спектра стійкості до гербіцидів в результаті AAD-12 (v1) і BE1146RR (елітної стійкої інбредної лінії, що скорочено позначається як AF) у F1: середній % пошкодження через 16 DAT

Гербіцид	Нетрансформований контроль	2P782 (Контроль Roundup Ready)	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 003.R003.AF	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 005.R001.AF
0 г ке/га 2,4-D DMA	0	0	0	0
1120 г ке/га 2,4-D DMA	21	19	0	0
1120 г ке/га 2,4-D DMA+ 70 г ке/га імазетапіру	100	100	5	1
1120 г ке/га 2,4-D DMA+ 1680 г ке/га гліфосату	100	71	2	5

Стійкість трансформованих рослин кукурудзи pDAB4101 до гербіцидів 2,4-D, триклопіру і флуороксипіру в польових умовах: Польові випробування рівня стійкості проводили на двох об'єктах з AAD-12 (v1) pDAB4101 (4101(0)003.R.003.AF і 4101(0)005. R001.AF) і одному контрольному гібриді Roundup Ready (RR) (2P782) в Fowler, Ind. і Wayside, Miss. Насіння саджали з використанням конічної сівалки з міжрядною відстанню 40 дюймів в Wayside і 30 дюймів в Fowler. Дизайн експерименту являв собою рандомізований повноблоковий план з 3 повтореннями. Варіанти експерименту являли собою 2,4-D (диметиламінова сіль) при 1120, 2240 і 4480 г ке/га, триклопір при 840 г ке/га, флуороксипір при 280 г ке/га і необроблений контроль. Об'єкти з AAD-12 (v1) містили ген AHAS як селективний маркер. Об'єкти кукурудзи F2 розщеплювалися, тому рослини з AAD-12 (v1) обробляли імазетапіром при 70 г ке/га для видалення рослин, що не містять вставку. Коли кукурудза досягала фази V6, здійснювали обробки гербіцидами з використанням пневматичного ранцевого обприскувача, що випускає об'єм розчину для обприскування 187 л/га під тиском 130-200 кПа. Візуальну оцінку пошкоджень здійснювали в 7, 14 і 21 дні після обробки. Оцінку пошкодження опорного кореня здійснювали на 28 DAT по шкалі 0-10, де 0-1 представляє зрощення опорного кореня, 1-3 - помірне потовщення опорного кореня/відхилення і проліферація кореня, 3-5 - помірне зрощення опорного кореня, 5-9 - важке зрощення опорного кореня і деформація, і 10 представляє повне інгібування опорного коріння.

Відповідь об'єкта з AAD-12 (v1) на 2,4-D, триклопір і флуороксипір через 14 днів після обробки представлена в таблиці 14. Пошкодження сільськогосподарської культури було найбільш

важким через 14 DAT. Контрольна кукурудза RR (2P782) була важко пошкодженою (44 % через 14 DAT) 2,4-D при 4480 г ке/га, що являє собою 8-кратну (8 x) норму внесення в польових умовах. Всі об'єкти з AAD-12 (v1) демонстрували виняткову стійкість до 2,4-D через 14 DAT при 0 % пошкоджень при 1-, 2- і 4-кратних нормах внесення, відповідно. Контрольна кукурудза (2P782) була важко пошкодженою (31 % через 14 DAT) при 2-кратній нормі внесення триклопіру (840 г ке/га). Об'єкти з AAD-12 (v1) демонстрували стійкість при 2-кратній нормі внесення триклопіру в середньому з 3 % пошкодження через 14 DAT для двох об'єктів. Флуоксипір при 280 г ке/га викликав 11 % видимих пошкоджень кукурудзи дикого типу через 14 DAT. Об'єкти з AAD-12 (v1) демонстрували підвищену стійкість в середньому з 8 % пошкодження через 5 DAT.

Таблиця 14

Видимі пошкодження об'єктів з AAD-12 і кукурудза дикого типу після некореневих обробок 2,4-D, триклопіром і флуоксипіром в польових умовах:  
% видимих пошкоджень через 14 DAT

Обробка	Норма внесення (г ке/га)	AAD-12 4101(0) 003 R.003.AF	AAD-12 4101(0) 005.001.AF	2P782 контроль
Необроблені	0	0	0	0
2,4-D	1120	0	0	9
2,4-D	2240	0	1	20
2,4-D	4480	0	1	34
Флуоксипір	280	1	5	11
Триклопір	840	3	4	31
Дикамба	840	8	8	11

Обробка ауксиновими гербіцидами кукурудзи в фазі росту V6 може викликати деформацію опорного коріння. У таблиці 15 представлена тяжкість пошкодження опорного кореня, що викликається 2,4-D, триклопіром і флуоксипіром. Триклопір при 840 г ке/га спричиняв найбільш важке зрощення опорного кореня і деформацію, пошкодження опорного кореня, що приводять до середньої оцінки у контрольної кукурудзи дикого типу 2P782 в 7 балів.

"Treatment" - "Обробка", "Rate (g ae/ha)" - "Норма внесення (г ке/га)", "control" - "контроль", "Untreated" - "Необроблені", "Fluoxypyr" - "Флуоксипір", "Triclorpyr" - "Триклопір", "Dicamba" - "Дикамба".

Таблиця 15

Оцінка пошкодження опорного кореня у рослин кукурудзи з AAD-12 і дикого типу у відповідь на 2,4-D, триклопір і флуоксипір в польових умовах:  
Оцінка пошкодження опорного кореня (по шкалі 0-10) через 28 DAT

Обробка	Норма внесення (г ке/га)	AAD-12 4101(0) 003 R.003.AF	AAD-12 4101(0) 005.001.AF	2P782 контроль
Необроблені	0	0	0	0
2,4-D	1120	0	0	3
2,4-D	2240	0	0	5
2,4-D	4480	0	0	6
Флуоксипір	280	0	0	2
Триклопір	840	0	0	7
Дикамба	840	1	1	1

Обидва об'єкти кукурудзи з AAD-12 (v1) демонстрували відсутність пошкодження опорного кореня після обробки триклопіром. Пошкодження опорного кореня у кукурудзи 2P782 підвищувалося з підвищенням норм внесення 2,4-D. При 4480 г ке/га 2,4-D об'єкти з AAD-12 спостерігали відсутність пошкодження опорного кореня; в той час як у гібрида 2P782 спостерігали важке зрощення опорного кореня і деформацію. Флуоксипір спричиняв тільки помірне потовщення і відхилення опорного кореня у кукурудзи дикого типу, при цьому у об'єктів з AAD-12 (v1) не спостерігали пошкодження опорного кореня.

Ці дані чітко свідчать про те, що AAD-12 (v1) додає кукурудзі високий рівень стійкості до 2,4-D, триклопіру і флуоксипіру при нормах внесення, що сильно перевищують комерційно

використовувані і викликають у кукурудзи без AAD-12 (v1) важкі видимі пошкодження і пошкодження опорного кореня.

#### ПРИКЛАД 6

##### Трансформація тютюну

5 Трансформацію тютюну з використанням *Agrobacterium tumefaciens* здійснювали способом аналогічним, але ідентичним, опублікованим способом (Horsch et al., 1988). Для отримання джерела тканини для трансформації насіння тютюну (*Nicotiana tabacum* cv. KY160) поверхнево стерилізували і висівали на поверхню середовища TOB, що являє собою середовище Мурашиге-Скуга без гормонів (Murashige and Skoog, 1962), отверджене агаром. Рослини  
10 вирощували протягом 6-8 тижнів в освітленій інкубаторній кімнаті при 28-30 °C і стерильно збирали листя для використання в трансформації. З цього листя стерильно вирізали фрагменти розміром приблизно один квадратний сантиметр, виключаючи середню жилку. Культури штамів *Agrobacterium* (EHA101S, що містить pDAB3278, що також позначається як pDAS1580, AAD-12 (v1)+PAT), вирощені протягом ночі у флаконі на шейкері, встановленому на 250 об./хв., при  
15 28 °C, осаджували центрифугуванням, ресуспендували в стерильних солях Мурашиге-Скуга і доводили до кінцевої оптичної густини 0,5 при 600 нм. Фрагменти листя занурювали в цю бактеріальну суспензію приблизно на 30 секунд, потім висушували на стерильних паперових серветках, вміщували правою стороною вгору на середовище TOB+ (середовище Мурашиге-Скуга, що містить 1 мг/л індоліл-3-оцтової кислоти і 2,5 мг/л бензиладеніну) і інкубували в темряві при 28 °C. Через два дні фрагменти листя переміщували на середовище TOB+, що  
20 містить 250 мг/л цефотаксиму (Agri-Bio, North Miami, Fla.) і 5 мг/л глюфосинату амонію (активний інгредієнт в Basta, Bayer Crop Sciences), і інкубували при 28-30 °C при освітленні. Фрагменти листя переміщували на свіже середовище TOB+ з цефотаксимом і Basta двічі в тиждень протягом перших двох тижнів і разів в тиждень згодом. Через 4-6 тижнів після обробки фрагментів листя з використанням бактерій невеликої рослини, які розвинулися з  
25 трансформованих вогнищ, видаляли з цього препарату тканини і висаджували в середовище TOB, що містить 250 мг/л цефотаксиму і 10 мг/л Basta, в посудини Phytatray™ II (Sigma). Ці проростки вирощували в освітленій інкубаторній кімнаті. Через 3 тижні отримували фрагменти стебел і перевкорінювали в тих же середовищах. Рослини були готові до відправки в теплицю ще через 2-3 тижні.

Рослини переміщували в теплицю, змиваючи агар з коріння, пересаджуючи в ґрунт в квадратні горщики 13,75 см, вміщуючи горщик в мішок Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), вміщуючи водопровідну воду на дно мішка, і вміщуючи його під посереднє освітлення в теплицю при 30 °C на один тиждень. Через 3-7 відкривали мішки; рослини удобрювали і дозволяли їм  
35 рости у відкритому мішку до акліматизації рослин в теплиці, коли мішок видаляли. Рослини вирощували в загальноприйнятих теплих умовах в теплиці (30 °C, 16 годин освітлення, 8 годин темряви, мінімальне природне + додаткове світло = 500 мЕ/м² с¹).

До розмноження з рослин T0 брали зразки на аналіз ДНК для визначення копійності вставки. Для зручності аналізували ген PAT, молекулярно пов'язаний з AAD-12 (v1). Свіжу тканину  
40 вміщували в пробірки і ліофілізували при 4 °C протягом 2 днів. Після повного висушування тканини в пробірку вміщували гранулу вольфраму (Valenite) і зразки піддавали сухому подрібненню протягом 1 хвилини з використанням кульового млина Kelco. Потім здійснювали стандартне виділення ДНК з використанням DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Потім аліквоту виділеної ДНК забарвлювали Pico Green (Molecular Probes P7589) і аналізували за допомогою  
45 флуориметра (BioTek) з відомими стандартами для отримання концентрації в нг/мкл.

Зразки ДНК розбавляли до 9 нг/мкл, а потім піддавали денатурації за допомогою інкубації в термоциклері при 95 °C протягом 10 хвилин. Потім отримували суміш Signal Probe mix з використанням наданої суміші олігонуклеотидів і MgCl<sub>2</sub> (Third Wave Technologies). Аліквоту 7,5  
50 мкл вміщували в кожну ямку планшета для аналізу Invader, потім аліквоту 7,5 мкл контролів, стандартів і 20 нг/мкл розбавлених невідомих зразків. Кожну ямку покривали 15 мкл мінерального масла (Sigma). Потім планшети інкубували при 63 °C протягом 1,5 годин і аналізували за допомогою флуориметра (Biotek).

При обчисленні % сигналу вище фона для цільового зонда, розділеного на % сигналу вище фона для зонда внутрішнього контролю, отримували співвідношення. Співвідношення для  
55 стандартів з відомою копійністю, отриманих і валідованих за допомогою аналізу Саузерн-блотингу, використовували для ідентифікації приблизної копійності для невідомих об'єктів.

Всі об'єкти також аналізували на наявність гена AAD-12 (v1) за допомогою ПЛР з використанням тих же виділених зразків ДНК. Як матрицю всього використовували 100 нг  
60 тотальної ДНК. Використовували 20 мМ кожного праймера з набором Takara Ex Taq PCR Polimerase. Праймерами для ПЛР транскрипційної одиниці рослин (PTU) AAD-12 були



- (SdpacodF: ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO: 12) і (SdpacodR: CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO: 13). Реакцію ПЛР здійснювали в термоциклері 9700 Geneamp (Applied Biosystems), піддаючи зразки впливу 94 °C протягом 3 хвилин і 35 циклам впливу 94 °C протягом 30 секунд, 64 °C протягом 30 секунд і 72 °C протягом 1 хвилини і 45 секунд, потім 72 °C протягом 10 хвилин. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі, що забарвлюється EtBr. 4-12 клональних ліній від кожного з 18 ПЛР-позитивних об'єктів з 1-3 копіями гена PAT (і, очевидно, AAD-12 (v1), оскільки ці гени фізично пов'язані) піддавали регенерації і переносили в теплицю.

Таблиця 16

Об'єкти тютюну T0, трансформовані з використанням pDAS1580 (AAD-12 (v1)+PAT)

№ пробірки	ID рослини	Копійність PAT	ПЛР на предмет РТУ AAD-12	Повна РТУ і менше 2	Повна РТУ і 1 копія	Відносна стійкість до гербіцидів
1	1580[1]-001	6	+			Не тестували
2	1580[1]-002	8	+			Не тестували
3	1580[1]-003	10	+			Не тестували
4	1580[1]-004	1	+	*	*	Висока
5	1580[1]-005	2	+	*		Змінна
6	1580[1]-006	6	+			Не тестували
7	1580[1]-007	4	+			Не тестували
8	1580[1]-008	3	+			Змінна
9	1580[1]-009	4	+			Не тестували
10	1580[1]-010	8	+			Не тестували
11	1580[1]-011	3	+			Висока
12	1580[1]-012	12	+			Не тестували
13	1580[1]-013	13	+			Не тестували
14	1580[1]-014	4	+			Не тестували
15	1580[1]-015	2	+	*		Висока
16	1580[1]-016	1?	+	*	*	Висока
17	1580[1]-017	3	+			Висока
18	1580[1]-018	1	+	*	*	Змінна
19	1580[1]-019	1	+	*	*	Змінна
20	1580[1]-020	1	+	*	*	Не тестували
21	1580[1]-021	1	+	*	*	Не тестували
22	1580[1]-022	3	+			Змінна
23	1580[1]-023	1	+	*	*	Змінна
24	1580[1]-024	1	+	*	*	Змінна
25	1580[1]-025	5	+			Не тестували
26	1580[1]-026	3	+			Змінна
27	1580[1]-027	3	+			Низька
28	1580[1]-028	4	+			Не тестували
29	1580[1]-029	3	+			Змінна
30	1580[1]-030	1	+	*	*	Висока
31	1580[1]-031	1	+	*	*	Висока
32	1580[1]-032	2	+	*		Висока

Для розрізнення показників стійкості до гербіцидів була необхідна оцінка відносної стійкості при обробці 560 г ке/га флуоксипіру, де стійкість варіювалася серед об'єктів

10

- Післясходова стійкість до гербіцидів в трансформованих рослинах тютюну T0 з AAD-12 (v1): Рослини T0 від кожного з 19 об'єктів перевіряли з використанням широкого діапазону 2,4-D, триклопіру або флуоксипіру, що розпилюються на рослини висотою 3-4 дюйми. Обприскування здійснювали, як описано вище, з використанням автоматичного пристрою для обприскування при об'ємі розчину для обприскування 187 л/га. На відповідні клони від кожного об'єкта наносили диметиламінову сіль 2,4-D (Riverside Corp), змішану з деіонізованою водою, в кількості 0, 140, 560 або 2240 г ке/га. Флуоксипір наносили аналогічно в кількості 35, 140 або

15

560 г ке/га. Триклопір наносили в кількості 70, 280 або 1120 г ке/га. Кожну обробку повторювали 1-3 рази. Оцінки пошкоджень проводили в 3 і 14 DAT. Кожний тестований об'єкт був більш стійким до 2,4-D, ніж нетрансформована контрольна лінія KY160. У декількох об'єктах виникала деяка початкова епінастія, пов'язана з ауксиновими гербіцидами, при дозах 560 г ке/га 2,4-D або менше. Деякі об'єкти були непошкодженими, коли 2,4-D наносили в кількості 2240 г ке/га (еквівалентно 4-кратній нормі внесення). Загалом, об'єкти з AAD-12 (v1) були більш сприйнятливими до флуороксипіру, потім - триклопіру, і менше усього ушкоджувалися 2,4-D. Якість об'єктів відносно величини резистентності визначали з використанням відповідей рослин T0 на 560 г ке/га флуороксипіру. Резистентність об'єктів класифікували як "низьку" (>40 % пошкоджень через 14 DAT), "середню" (20-40 % пошкоджень), "високу" (<20 % пошкоджень). Деякі об'єкти мали непостійну відповідь серед дублюючих рослин, і їх вважали "змінними".

Підтвердження високої стійкості до 2,4-D у тютюну T1: Від кожного об'єкта зберігали від двох до чотирьох окремих рослин T0, що вижили після впливу високих доз 2,4-D і флуороксипіру, і дозволяли їм самозапильоватися в теплиці для отримання насіння T1. Насіння T1 стратифікували і висівали в лотки для селекції, так само, як у випадку *Arabidopsis*, з подальшим вибіркоким видаленням нетрансформованих рослин без вставок в цій розщепленій популяції з використанням 560 г активного інгредієнта/га глүфосинату (селекція по гену PAT). Рослини, що вижили, переносили в окремі 3-дюймові горщики в теплицю. Ці лінії забезпечували високі рівні резистентності до 2,4-D в поколінні T0. У рослин T1, отриманих не безпосередньо з культури тканини, передбачали поліпшену постійність відповіді. Ці рослини порівнювали з тютюном дикого типу KY160. Всі рослини обприскували з використанням автоматичного пристрою для обприскування, встановленого на 187 л/га. Рослини обприскували кількостями диметиламінової солі (DMA) 2,4-D в діапазоні 140-2240 г ке/га, триклопіру - в діапазоні 70-1120 г ке/га, або флуороксипіру - в діапазоні 35-560 г ке/га. Всі розчини для обприскування складали у воді. Кожну обробку повторювали 2-4 рази. Рослини оцінювали через 3 і 14 днів після обробки. Рослинам присвоювали ступінь пошкодження відносно уповільненого зростання, хлорозу і некрозу. Покоління T1 розщеплювалося, тому чекали деяку змінну відповідь внаслідок відмінностей в зиготності.

Таблиця 17

Відповідь рослин тютюну T<sub>1</sub>, які розщеплюються, з AAD-12 на фенокси- і піридиллоксіяуксинові гербіциди

Гербіцид	KY160 - дикий тип	1580(1)-004 (висока стійкість в поколінні T <sub>0</sub> )	1580(1)-018 (висока стійкість в поколінні T <sub>0</sub> )
	Середній % пошкоджень у дублюючих рослин через 14 DAT		
140 г ке/га 2,4-D DMA	45	0	0
560 г ке/га 2,4-D DMA	60	0	0
2240 г ке/га 2,4-D DMA	73	0	0
70 г ке/га триклопіру	40	0	5
280 г ке/га триклопіру	65	0	5
1120 г ке/га триклопіру	80	0	8
35 г ке/га флуороксипіру	85	0	8
140 г ке/га флуороксипіру	93	0	10
560 г ке/га флуороксипіру	100	3	18

У випадку 2,4-D не спостерігали пошкоджень при 4-кратній нормі внесення (2240 г ке/га) або нижче. Деякі пошкодження спостерігали при обробках триклопіром в одній лінії об'єктів, але найбільші пошкодження спостерігали при обробці флуороксипіром. Пошкодження флуороксипіром були короточасними, і приріст на одному об'єкті був практично невідмітним від необробленого контролю на 14 DAT (таблиця 17). Важливо зазначити, що нетрансформований тютюн надзвичайно сприйнятливий до флуороксипіру. Ці результати свідчать про те, що за допомогою AAD-12 (v1) можна отримувати комерційний рівень стійкості до 2,4-D, навіть у надто сприйнятливої до ауксинів дводольної сільськогосподарської культури, такої як тютюн. Ці результати також показали, що можна додавати резистентність до гербіцидів на основі піридиллоксіоцевої кислоти, триклопіру і флуороксипіру. Наявність можливості призначати обробку стійкої до гербіцидів сільськогосподарської культури, захищеної AAD-12, з

використанням різних активних інгредієнтів, що мають різні спектри контролю бур'янів, є надто застосовним для сільгоспвиробників.

Успадкування AAD-12 (v1) у тютюну: Також здійснювали тестування 100 рослин-нащадків в семи лініях T1 з ліній з AAD-12 (v1). Насіння стратифікували, висівали і пересаджували відповідно до способу, що описується вище, за винятком того, що рослини, які не містять вставку, не видаляли за допомогою селекції з використанням Liberty. Потім всі рослини обприскували 560 г ке/га 2,4-D DMA, як описано вище. Через 14 DAT підраховували резистентні і сприйнятливі рослини. П'ять з семи тестованих ліній розщеплювалися відповідно до одного локусу, доміантної ознаки з менделевським успадкуванням (3R: 1S), як визначали за допомогою аналізу з використанням хі-квадрату. AAD-12 успадковується як стійкий ген резистентності до арилоксіалканатауксинів в багатьох видах.

Стійкість рослин тютюну з pDAS1580 до гербіцидів 2,4-D, дихлорпропу, триклопіру і флуроксіпіру в польових умовах: Польові випробування рівня стійкості здійснювали на трьох лініях з AAD-12 (v1) (об'єкти pDAS1580-[1]-018.001, pDAS1580-[1]-004.001 і pDAS1580-[1]-020.016) і однієї лінії дику типу (KY160) на польових станціях в Indiana і Miss. Саджанці тютюну вирощували в теплиці за допомогою посадки насіння T1 в 72-ямкові піддони для розсади (Hummert International), що містять середовища Metro 360, згідно з вказаними вище умовами вирощування. Рослини без вставки вибірково видаляли за допомогою селекції з використанням Liberty, як описано вище. Саджанці переносили на польові станції і саджали з інтервалом 14 або 24 дюймів з використанням промислових розсадопосадкових машин. Для підтримки інтенсивного зростання рослин на станції в Міссісіпі використовували краплинне зрошування, а на станції в Індіані - зрошування дощуванням.

Дизайн експерименту являв собою план з розщепленими ділянками з 4 повтореннями. Основною ділянкою була обробка гербіцидом, і підділянкою була лінія тютюну. Варіанти експерименту являли собою 2,4-D (диметиламінова сіль) в кількості 280, 560, 1120, 2240 і 4480 г ке/га, триклопір в кількості 840 г ке/га, флуроксіпір в кількості 280 г ке/га і необроблений контроль. Дослідні ділянки містили один ряд по 25-30 футів. Обробки гербіцидами здійснювали через 3-4 тижні після пересадження з використанням пневматичного ранцевого обприскувача, що випускає об'єм розчину для обприскування 187 л/га під тиском 130-200 кПа. Візуальну оцінку пошкоджень, інгібування зростання і епінастії проводили на 7, 14 і 21 день після обробки.

Таблиця 18

Відповідь рослин тютюну з AAD-12 на 2,4-D, триклопір і флуроксіпір в польових умовах

Обробка гербіцидом		Середній % пошкоджень на території через 14 DAT			
Активний інгредієнт	Кількість	Дикий тип	PDAS1580-[1]-004.001	PDAS1580-[1]-020.016	PDAS1580-[1]-018.001
2,4-D	280 г ке/га	48	0	0	0
2,4-D	560 г ке/га	63	0	0	2
2,4-D	1120 г ке/га	78	1	1	2
2,4-D	2240 г ке/га	87	4	4	4
2,4-D	4480 г ке/га	92	4	4	4
Триклопір	840 г ке/га	53	5	5	4
Флуроксіпір	280 г ке/га	99	11	11	12

Відповідь об'єктів з AAD-12 (v1) на 2,4-D, триклопір і флуроксіпір представлений в таблиці 18. Нетрансформована лінія тютюну була важко пошкодженою (63 % через 14 DAT) 2,4-D при 560 г ке/га, що розглядається як 1-кратна норма внесення. Всі лінії AAD-12 (v1) демонстрували виняткову стійкість до 2,4-D через 14 DAT із середніми пошкодженнями 1, 4 і 4 % пошкодження, що спостерігаються при 2-, 4- і 8-кратних нормах внесення, відповідно. Нетрансформована лінія тютюну була важко пошкодженою (53 % через 14 DAT) 2-кратною нормою внесення триклопіру (840 г ке/га); в той час як лінії з AAD-12 (v1) демонстрували стійкість в середньому з 5 % пошкодження через 14 DAT серед трьох ліній. Флуроксіпір при 280 г ке/га викликав важкі пошкодження (99 %) у нетрансформованій лінії через 14 DAT. Лінії з AAD-12 (v1) демонстрували підвищену стійкість в середньому з 11 % пошкодження через 14 DAT.

Ці результати свідчать про те, що лінії трансформованих об'єктів з AAD-12 (v1) виявляють високий рівень стійкості до 2,4-D, триклопіру і флуроксіпіру при кратному підвищенні комерційно використовуваних норм внесення, які є летальними або викликають важкі епінастичні деформації у нетрансформованого тютюну в типових польових умовах.

Захист за допомогою AAD-12 (v1) від підвищених кількостей 2,4-D: Результати, що демонструють захист за допомогою AAD-12 (v1) від підвищених кількостей 2,4-D DMA в теплиці, представлені в таблиці 19. Рослини T1 з AAD-12 (v1) від об'єкта розщеплювалися як 3R:1S при селекції з використанням 560 г активного інгредієнта/га Liberty з використанням того ж способу, як описано вище. Насіння T1 з AAD-1 (v3) також саджали як трансформовані контролю тютюну (див. PCT/US2005/014737). Нетрансформовані KY160 служили як сприйнятливий контроль. Рослини обприскували з використанням автоматичного пристрою для обприскування, встановленого на 187 л/га при 140, 560, 2240, 8960 і 35840 г ке/га 2,4-D DMA, і оцінювали на 3 і 14 DAT.

AAD-12 (v1) і AAD-1 (v3) ефективно захищали тютюн від пошкодження 2,4-D при дозах до 4-кратної комерційно використовуваної норми внесення. Однак, рослини з AAD-12 (v1) чітко демонстрували значну перевагу в порівнянні з AAD-1 (v3), захищаючи від 64-кратних стандартних норм внесення.

"Treatment" - "Обробка", "control" - "контроль", "Average % Injury of Replicates 14 DAT" - "Середній % пошкоджень у дублюючих рослин через 14 DAT", "g ae/ha" - "г ке/га".

Таблиця 19

Результати, які демонструють захист від підвищених кількостей 2,4-D, який забезпечується AAD-12 (v1) і AAD-1 (v3)

Обробка	KY160 контроль	AAD-1 (v3)	AAD-12 (v1)
	Середній % пошкоджень у дублюючих рослин через 14 DAT		
2240 г ке/га 2,4-D	95	4	0
8960 г ке/га 2,4-D	99	9	0
35840 г ке/га 2,4-D	100	32	4

Стекінг AAD-12 для підвищення гербіцидного спектра: Реципрокно схрещували рослини, гомозиготні по AAD-12 (v1) (pDAS1580) і AAD-1 (v3) (pDAB721) (див. PCT/US2005/014737 у випадку останнього), і збирали насіння F1. Насіння F1 від двох реципрокно схрещених рослин з кожним геном стратифікували і обробляли 4 дублюючі рослини від кожного схрещування по тій же схемі обприскування, яку використовували для інших тестів з однією з наступних обробок: 70, 140, 280 г ке/га флуроксипіру (селекція по гену AAD-12 (v1)); 280, 560, 1120 г ке/га R-дихлорпропу (селекція по гену AAD-1 (v3)); або 560, 1120, 2240 г ке/га 2,4-D DMA (для підтвердження стійкості до 2,4-D). Також саджали гомозиготні рослини T2 з кожним геном для використання як контролю. Рослини класифікували через 3 і 14 DAT. Результати обприскування представлені в таблиці 20.

Результати підтверджують, що AAD-12 (v1) можна успішно піддавати стекінгу з AAD-1 (v3), таким чином, підвищуючи спектр гербіцидів, які можна наносити на сільськогосподарську культуру, яка цікавить (феноксіцетові кислоти + феноксипропіонові кислоти vs. феноксіцетових кислот + піридиллоксіцетових кислот для AAD-1 і AAD-12, відповідно). Доповнююча природа патернів перехресної резистентності до гербіцидів робить можливою зручне використання двох цих генів як доповнюючі і здатні до стекінгу селективні маркери в польових умовах. У випадку сільськогосподарських культур, у яких стійкість при використанні одного гена може бути незначною, фахівцям в цій галузі буде зрозуміло, що можна підвищувати стійкість за допомогою стекінгу з іншим геном стійкості до того ж гербіциду. Це можна здійснювати з використанням того ж гена з тими ж або іншими промоторами; однак, як спостерігали в цьому випадку, стекінг і трекінг двох доповнюючих ознак можна полегшувати за допомогою перехресного захисту, що розрізняється, від феноксипропіонових кислот [за допомогою AAD-1 (v3)] або піридиллоксіцетових кислот [за допомогою AAD-12 (v1)].

Порівняння перехресної стійкості до ауксинових гербіцидів у рослин T2 з AAD-12 (v1) (pDAS1580) і AAD-1 (v3) (pDAB721) з гібридом F1 AAD-12 x AAD-1 і диким типом

Обробка	Середній % пошкоджень через 14 DAT			
	KY160 контроль дикого типу	AAD-12 (v1) (pDAS1580)	AAD-1 (v3) (pDAB721)	AAD-12 (v1) x AAD (v3) F1
560 г ке/га 2,4-D	63	0	0	0
1120 г ке/га 2,4-D	80	0	4	0
2240 г ке/га 2,4-D	90	0	9	0
280 г ке/га R-дихлорпропу	25	15	0	0
560 г ке/га R-дихлорпропу	60	50	0	0
1120 г ке/га R-дихлорпропу	80	70	3	0
70 г ке/га флуороксипіру	40	0	40	0
140 г ке/га флуороксипіру г ке/га флуороксипіру	65	0	60	0
280 г ке/га флуороксипіру	75	3	75	3

#### ПРИКЛАД 7

##### Трансформація сої

- 5 Поліпшення сої здійснюють за допомогою способів перенесення генів для таких ознак як стійкість до гербіцидів (Padgett et al., 1995), модифікація амінокислот (Falco et al., 1995) і резистентність до комах (Parrott et al., 1994). Для введення чужорідних ознак в сільськогосподарську культуру необхідні способи, які зроблять можливим рутинне отримання трансгенних ліній з використанням послідовностей селективних маркерів, що містять прості вставки. Для спрощення розведення трансгени повинні успадковуватися як єдиний функціональний локус. Повідомляють про доставку чужорідних генів в культурну сою за допомогою бомбардування мікрочастинками рубчика зиготного ембріона (McCabe et al., 1988) або соматичних ембріогенних культур (Finer and McMullen, 1991) і опосередкованої *Agrobacterium* трансформації експлантатів сім'ядолі (Hinchey et al., 1988) або зиготних ембріонів (Chee et al., 1989).

- Трансформанти, отримані за допомогою опосередкованої *Agrobacterium* трансформації, як правило, містять прості вставки з низькою копійністю (Birch, 1991). Існують переваги і недоліки, пов'язані з кожною з трьох тканин-мішеней, що досліджуються на предмет перенесення генів в сою, рубчиком зиготних ембріонів (Chee et al., 1989; McCabe et al., 1988), сім'ядолей (Hinchey et al., 1988) і соматичними ембріогенними культурами (Finer і McMullen, 1991). Останні з них інтенсивно досліджують як тканина-мішень для прямого перенесення генів. Ембріогенні культури, як правило, добре проліферують, і їх можна підтримувати протягом тривалого періоду. Однак термін зберігання ембріогенних суспензій пов'язаний зі стерильністю і хромосомною аберацією первинних трансформантів (Singh et al., 1998), і, таким чином, для систем трансформації сої з використанням цієї тканини, ймовірно, необхідна безперервна ініціація нових культур. Для цієї системи необхідний високий рівень 2,4-D, концентрація 40 мг/л, для ініціації ембріогенного калюсу, і це представляє фундаментальну проблему у використанні гена AAD-12 (v1), оскільки трансформований локус не може розвиватися надалі з 2,4-D в середовищі. Таким чином, трансформація з використанням меристеми є ідеальною для розробки резистентних до 2,4-D рослин з використанням AAD-12 (v1).

- Gateway-клонування бінарних конструкцій: Кодуючу послідовність AAD-12 (v1) клонували в п'ять різних донорних векторів Gateway, що містять різні промотори рослин. Потім отримані експресуючі касети AAD-12 (v1) для рослин клонували в кінцевий бінарний вектор Gateway за допомогою реакції клонази LR (Invitrogen Corporation, Carlsbad Calif., кат. №11791-019).

- 35 Фрагмент NcoI-SacI, що містить кодуючу послідовність AAD-12 (v1), вирізали з DASPICO12 і лігували по відповідних ділянках рестрикції NcoI-SacI в наступні донорні вектори Gateway: pDAB3912 (attL1//промотор CsVMV//AtuORF23 3'UTR//attL2); pDAB3916 (attL1//промотор AtUbi10//AtuORF23 3'UTR//attL2); pDAB4458 (attL1//промотор AtUbi3//AtuORF23 3'UTR//attL2); pDAB4459 (attL1//промотор ZmUbi1//AtuORF23 3'UTR//attL2) і pDAB4460 (attL1//промотор AtAct2//AtuORF23 3'UTR//attL2). Отримані конструкції, що містять наступні експресуючі касети для рослин, позначали як: pDAB4463 (attL1//промотор CsVMV//AAD-12 (v1)//AtuORF23

3'UTR//attL2); pDAB4467 (attL1//промотор AtUbi10//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//attL2); pDAB4471 (attL1//промотор AtUbi3//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//attL2); pDAB4475 (attL1//промотор ZmUbi1//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//attL2) і pDAB4479 (attL1//промотор AtAct2//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//attL2). Ці конструкції перевіряли за допомогою розщеплення рестрикційними ферментами і секвенування.

Експресуючі касети для рослин піддавали рекомбінації в кінцевий бінарний вектор Gateway pDAB4484 (RB7 MARv3//attR1-ccdB-резистентність до хлорамфеніколу-attR2//промотор CsVMV//PATv6//AtuORF1 3'UTR) за допомогою реакції клонази LR Gateway. У технології Gateway використовують сайт-специфічну рекомбінацію на основі фагу лямбда замість використання рестрикційної ендонуклеази і лігази для вбудовування гена, який цікавить, в експресуючий вектор. Invitrogen Corporation, Gateway Technology: A Universal Technology to Clone DNA Sequences for Functional Analysis and Expression in multiple Systems, Technical Manual, Catalog #'s 12535-019 and 12535-027, Gateway Technology Version E, Sep. 22, 2003, #25-022. Рекомбінаційний послідовності ДНК (attL, і attR, ) і суміш ферментів клонази LR дозволяють перенести будь-який фрагмент ДНК, фланкований ділянкою рекомбінації, в будь-який вектор, що містить відповідну ділянку. Ділянка attL1 донорного вектора відповідає attR1 бінарного вектора. Аналогічно, ділянка attL2 донорного вектора відповідає attR2 бінарного вектора. Використовуючи технології Gateway експресуючу касету для рослин (з донорного вектора), фланковану ділянками attL, можна рекомбінувати по ділянках attR бінарного вектора. Отримані конструкції, що містять наступні експресуючі касети для рослин, позначали як: pDAB4464 (RB7 MARv3//промотор CsVMV//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//промотор CsVMV//PATv6 AtuORF1 3'UTR); pDAB4468 (RB7 MARv3//промотор AtUbi10//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//промотор CsVMV//PATv6//AtuORF1 3'UTR); pDAB4472 (RB7 MARv3//промотор AtUbi3//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//промотор CsVMV//PATv6//AtuORF1 3'UTR); pDAB4476 (RB7 MARv3//промотор ZmUbi1//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//промотор CsVMV//PATv6 AtuORF1 3'UTR); і pDAB4480 (RB7 MARv3//промотор AtAct2//AAD-12 (v1)//AtuORF23 3'UTR//промотор CsVMV//PATv6//AtuORF1 3'UTR). Ці конструкції перевіряли за допомогою розщеплення рестрикційними ферментами і секвенування.

Спосіб трансформації 1 - Трансформація, опосередкована *Agrobacterium*: У перших повідомленнях про трансформацію сої використовували меристемні клітини в області сім'ядольного вузла (Hinchee et al., 1988) і розмноження пагонів з апікальної меристеми (McCabe et al., 1988). У способі з використанням *A. tumefaciens* і сім'ядольного вузла отримували експлантат і за допомогою композиції середовищ для культивування стимулювали проліферацію ауксиллярної меристеми у вузлі (Hinchee et al., 1988). Залишається неясним, чи ініціюється насправді культура диференційованого, але тотипотентного, калюсу за допомогою цих обробок. Виділення численних клонів об'єкта трансформації з одного експлантата і рідке виділення химерних рослин (Clemente et al., 2000; Olhoft et al., 2003) свідчать про походження з однієї клітини з подальшим розмноженням трансгенних клітин для отримання культури проліферуєючої трансгенної меристеми або рівномірно трансформованого пагона, що надалі піддається розмноженню пагонів. Початково спосіб розмноження пагонів сої оснований на бомбардуванні мікрочастинками (McCabe et al., 1988), але нещодавно його адаптували для опосередкованої *Agrobacterium* трансформації (Martinell et al., 2002), що очевидно не досягає того ж рівня або типу диференціювання, як при способі з використанням сім'ядольного вузла, оскільки система основана на успішній ідентифікації химер зародкової лінії. Крім того, цей спосіб не оснований на використанні 2,4-D, що буде ідеальним для системи селекції з 2,4-D. Таким чином, спосіб з використанням сім'ядольного вузла може бути способом вибору для розробки резистентних до 2,4-D культурних сортів сої.

Отримання стійких фенотипів з AAD-12 (v1) за допомогою трансформації рослин. Для отримання трансгенних рослин з AAD-12 (v1) використовували отримані з насіння "експлантати Maverick" і спосіб опосередкованої *Agrobacterium* трансформації сім'ядольного вузла.

Отримання *Agrobacterium* і інокуляція: Для ініціації трансформації використовували штам *Agrobacterium* EHA101 (Hood et al. 1986), який несе кожний з п'яти бінарних векторів pDAB (таблиця 8). Кожний бінарний вектор містить касету гена AAD-12 (v1) і гена для селекції рослин (PAT) в області Т-ДНК. Плазміди вносили в штам *Agrobacterium* EHA101 за допомогою електропорації. Потім вибрані колонії аналізували на предмет вбудовування генів перед обробкою *Agrobacterium* експлантатів сої. Насіння Maverick використовували у всіх експериментах по трансформації, і його отримували з University of Missouri, Columbia, Mo.

Здійснювали опосередковану *Agrobacterium* трансформацію сої (*Glycine max*) з використанням гена PAT як селективного маркера разом з гербіцидом глюфосинатом як селективним засобом. Насіння пророщували на мінімальному середовищі B5 (Gamborg et al.

1968), отвердженому 3 г/л фітагелю (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.). Потім вибрані пагони переносили на середовище для вкорінення. Оптимальною схемою селекції було використання глуфосинату в концентрації 8 мг/л в середовищі в фазі появи першого і другого пагонів і в концентрації 3-4 мг/л в середовищі протягом зростання пагону в довжину.

5 Перед перенесенням пагонів (3-5 см), що зросли в довжину, на середовище для вкорінення відрізаний кінець міжвузлів занурювали в 1 мг/л індоліл-3-масляної кислоти на 1-3 хв. для стимуляції вкорінення (Khan et al. 1994). У пагонів пророщували коріння в скляних культуральних пробірках 25×100 мм, що містять середовище для вкорінення, а потім їх переносили в ґрунтову суміш для акліматизації проростків в Metro-mix 200 (Hummert International, Earth City, Mo.) у відкритих коробках Magenta в Conviron. При появі і зростанні пагона в довжину для селекції використовували глуфосинат, активний інгредієнт гербіциду Liberty (Bayer Crop Science). Укорінені проростки піддавали акліматизацію у відкритих коробках Magenta протягом декількох тижнів перед скринінгом і перенесенням в теплицю для подальшої акліматизації і оцінки.

15 Аналіз передбачувано трансформованих проростків і аналізи для оцінки рослин T0 в теплиці: Для скринінгу на предмет передбачуваних трансформантів на кінцеві листочки з вибраного листа цих проростків наносили 50 мг/л глуфосинату двічі з тижневим інтервалом для спостереження результатів. Потім піддані скринінгу проростки переносили в теплицю і після акліматизації на листя знов наносили глуфосинат для підтвердження стійкості цих проростків в 20 GH і вважали їх передбачуваними трансформантами.

Надалі рослини, перенесені в теплицю, можна аналізувати на наявність активного гена PAT неструктивним способом за допомогою нанесення на частину листка первинного трансформанта T0 або його нащадка розчину глуфосинату [0,05-2 % об./об. гербіциду Liberty, переважно - 0,25-1,0 % (об./об.) = 500-2000 м. ч. глуфосинату, Bayer Crop Science]. Залежно від 25 використовуваної концентрації оцінку пошкодження глуфосинатом можна здійснювати через 1-7 днів після обробки. Рослини також можна тестувати на стійкість до 2,4-D неструктивним способом за допомогою вибіркового нанесення розчину 2,4-D у воді (0,25-1 % об./об. комерційного складу диметиламінової солі 2,4-D, переважно - 0,5 % об./об. = 2280 м. ч. 2,4-D ке) на кінцевий листочок нових трилисточкових вузлів, що розпустилися, одного або двох, 30 переважно - двох, нижче останнього трилисточкового вузла, що з'явився. Цей аналіз дозволяє оцінювати сприйнятливості до 2,4-D рослини через період від 6 годин до декількох днів після нанесення за допомогою оцінки переорієнтації або обертання листа на >90 градусів відносно площини суміжних листочків. Рослини, стійкі до 2,4-D, не будуть відповідати на 2,4-D. Рослинам T0 дозволяли самозапилюватися в теплиці для отримання насіння T1. Рослини T1 (і в тій мірі, 35 достатній для отримання клонів рослин T0) будуть обприскувати з використанням діапазону доз гербіцидів для визначення рівня захисту від гербіцидів, що забезпечується генами AAD-12 (v1) і PAT в трансгенній сої. Норми внесення 2,4-D, що використовуються для рослин T0, як правило, будуть містити одну або дві вибіркові норми внесення в діапазоні 100-1120 г ке/га, що 40 наносяться з використанням автоматичного пристрою для обприскування, як описано вище. Рослини T1 будуть обробляти гербіцидом з більш широким діапазоном доз 50-3200 г ке/га 2,4-D. Аналогічно, рослини T0 і T1 можна піддавати скринінгу на резистентність до глуфосинату за допомогою післясходової обробки 200-800 і 50-3200 г ке/га глуфосинату, відповідно. Ген резистентності до гліфосату (у рослин, трансформованих з використанням конструкцій, що 45 містять EPSPS) або іншої стійкості до гліфосату можна оцінювати в поколінні T1 за допомогою післясходового нанесення гліфосату в діапазоні доз 280-2240 г ке/га гліфосат. Окремі рослини T0 оцінювали на наявність кодуєчої області гена, який цікавить (AAD-12 (v1) або PAT v6), і копієність. Визначення успадкування AAD-12 (v1) будуть здійснювати з використанням розщеплення потомства T1 і T2 відносно стійкості до гербіцидів, як описано в представлених вище прикладах.

50 Субпопуляцію вихідних трансформантів оцінювали в поколінні T0 вказаними вище способами. Будь-яка рослина, для якої підтверджували наявність кодуєчої області AAD-12 (v1), незалежно від промотору, що запускає транскрипцію гена, не відповідала на нанесення 2,4-D на листя, на відміну від сої дикого типу Maverick. Рослини, трансформовані виключно з використанням PAT, відповідали на нанесення 2,4-D на листя так само, як і рослини дикого 55 типу.

Субпопуляцію рослин, що мають розмір, схожий з розміром контрольних рослин дикого типу, обробляли 2,4-D з використанням 560 або 1120 г ке 2,4-D. Всі рослини, що містять AAD-12 (v1), були очевидно резистентними до обробки гербіцидом в порівнянні з соєю дикого типу Maverick. У двох рослин з AAD-12 (v1) спостерігали незначний рівень пошкоджень (на 2 DAT), 60 однак, пошкодження були тимчасовими, і на 7 DAT пошкоджень не спостерігали. Контрольні

рослини дикого типу були важко пошкодженими через 7-14 DAT при 560 г ке/га 2,4-D і гинули при 1120 г ке/га. Ці дані відповідають тому факту, що AAD-12 (v1) може додавати високу стійкість (>2-кратної норми внесення) сприйнятливій сільськогосподарській культурі, такий як соя. Потім відбирали зразки підданих скринінгу рослин для молекулярних і біохімічних аналізів для підтвердження вбудовування генів AAD-12 (v1), копійності і рівнів експресії генів.

Молекулярні аналізи - Соя: Збір тканини, виділення ДНК і кількісний аналіз. Свіжу тканину вміщували в пробірки і ліофілізували при 4 °C протягом 2 днів. Після повного висушування тканини в пробірку вміщували гранулу вольфраму (Valenite) і зразки піддавали сухому подрібненню з використанням кульового млина Kelco протягом 1 хвилини. Потім здійснювали стандартне виділення ДНК з використанням DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Потім аліквоту виділеної ДНК забарвлювали Pico Green (Molecular Probes P7589) і аналізували за допомогою флуориметра (BioTek) з відомими стандартами для отримання концентрації в нг/мкл.

Полімеразна ланцюгова реакція: як матрицю використовували всього 100 нг тотальної ДНК. Використовували 20 мМ кожного праймера з набором Takara Ex Taq PCR Polymerase (Minis TAKRR001A). Праймерами для PTU AAD-12 (v1) були (прямий ATAATGCCAGCCTGTAAACGCC) (SEQ ID NO: 8) і (зворотний CTCAAGCATATGAATGACCTCGA) (SEQ ID NO: 9). Реакцію ПЛР здійснювали в термоциклері 9700 Geneamp (Applied Biosystems), піддаючи зразки впливу 94 °C протягом 3 хвилин і 35 циклам впливу 94 °C протягом 30 секунд, 63 °C протягом 30 секунд, і 72 °C протягом 1 хвилини і 45 секунд, потім 72 °C протягом 10 хвилин. Праймерами для ПЛР кодуєної області AAD-12 (v1) були (прямий ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO: 10) і (зворотний CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO: 11). Реакцію ПЛР здійснювали в термоциклері 9700 Geneamp (Applied Biosystems), піддаючи зразки впливу 94 °C протягом 3 хвилин і 35 циклам впливу 94 °C протягом 30 секунд, 65 °C протягом 30 секунд, і 72 °C протягом 1 хвилини і 45 секунд, потім 72 °C протягом 10 хвилин. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі, що забарвлюється EtBr.

Аналіз Саузерн-блотингу: Здійснювали аналіз Саузерн-блотингу з використанням тотальної ДНК, отриманої за допомогою набору Qiagen DNeasy. Всього 10 мкг геномної ДНК піддавали розщепленню протягом ночі для отримання даних про вбудовування. Після розщеплення протягом ночі аліквоту ~100 нг аналізували за допомогою 1 %-гелю, щоб пересвідчитися в повному розщепленні. Після цієї перевірки зразки аналізували за допомогою великого 0,85 %-ного агарозного гелю протягом ночі при 40 Вольтх. Потім гель піддавали денатурації в 0,2 М NaOH, 0,6 М NaCl протягом 30 хвилин. Потім гель піддавали нейтралізації в 0,5 М Tris-HCl, 1,5 М NaCl, pH 7,5, протягом 30 хвилин. Потім використовували пристрій для блотингу, що містить 20-кратний SSC, для здійснення перенесення гелю на нейлонову мембрану (Millipore INYC00010) під дією сили ваги протягом ночі. Після перенесення протягом ночі мембрану піддавали впливу УФ-випромінювання за допомогою крослінкера (Stratagene UV stratalinker 1800) при 1200×100 мікроджоулях. Потім мембрану промивали в 0,1 % SDS, 0,1 SSC протягом 45 хвилин. Після промивання протягом 45 хвилин мембрану сушили протягом 3 годин при 80 °C, а потім зберігали при 4 °C до гібридизації. Фрагмент матриці для гібридизації отримували за допомогою вказаної вище ПЛР кодуєної області з використанням плазмідної ДНК. Продукт піддавали електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі і вирізуали, а потім екстрагували з гелю з використанням способу екстракції з гелю Qiagen (28706). Потім мембрану піддавали прегібридизації на етапі 60 °C протягом 1 години в буфері Perfect Hyb (Sigma H7033). Спосіб Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) використовували для отримання зонда на основі p32 (Perkin Elmer). Зонд очищали з використанням колонок Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Два мільйони CPM використовували для гібридизації Саузерн-блотів протягом ночі. Після гібридизації протягом ночі блоти піддавали двом промиванням по 20 хвилин при 65 °C в 0,1 % SDS, 0,1 % SSC. Потім блоти експонували з плівкою протягом ночі, інкубуючи при -80 °C.

Біохімічні аналізи - Соя: Збір зразків тканини і виділення білка AAD-12 (v1) з листя сої. Приблизно 50 до 100 мг тканини листя збирали з листя N-2, підданого нанесенню 2,4-D, але після 1 DAT. Кінцевий листочок N-2 видаляли, розрізали на невеликі фрагменти або 2 диски з листя з окремого локусу (~0,5 см в діаметрі) і негайно заморожували на сухому льоду. Таким чином, здійснювали аналіз білка (ELISA і аналіз вестерн-блотингу).

Оцінка потомства T1: Рослинам T0 дозволяли самозапилюватися для отримання сімейств T1. Тестування потомства (аналіз розщеплення) здійснювали з використанням глүфосинату в концентрації 560 г активного інгредієнта/га як селективного засобу, що наноситься в фазу росту V1-V2. Потім рослини, що вижили, аналізували на предмет стійкості до 2,4-D в одну або декілька фаз зростання V2-V6. Насіння отримували за допомогою самозапилення, щоб зробити можливим більш широке тестування гербіцидів на трансгенній сої.



Трансгенні по AAD-12 (v1) рослини сої Maverick отримували за допомогою системи опосередкованої *Agrobacterium* трансформації. Отримані рослини T0 були стійкими до нанесення 2-кратної норми внесення 2,4-D і давали фертильне насіння. Частота фертильних трансгенних рослин сої становила до 5,9 %. Вбудовування гена AAD1-12 (v1) в геном сої підтверджували аналізом Саузерн-блотингу. Цей аналіз показав, що більшість трансгенних рослин містила низьку кількість копій. Рослини, піддані скринінгу з використанням антитіл проти AAD-12 (v1), демонстрували позитивний результат при ELISA і відповідну смугу при аналізі Вестерн-блотингу.

Спосіб трансформації 2 - Aerosol-Beam опосередкована трансформація ембріогенної тканини калюсу сої: Культивування ембріогенної тканини калюсу сої і подальше beaming можна здійснювати, як описано в патенті США № 6809232 (Held et al.), для отримання трансформантів з використанням конструкцій, представлених в даному описі.

Спосіб трансформації 3 - Біолістичне бомбардування сої: Цей спосіб можна здійснювати з використанням зрілої меристеми рубчика, отриманої з насіння (McCabe et al. (1988)). Після здійснення способів біолістичного бомбардування можна очікувати відновлення трансформованих рослин сої.

Спосіб трансформації 4 - Віскер-опосередкована трансформація: Отримання віскерів і трансформацію з використанням віскерів можна здійснювати способами, що описуються раніше Terakawa et al. (2005)). Після здійснення способів біолістичного бомбардування можна чекати відновлення трансформованих рослин сої.

Насіння Maverick поверхнево стерилізували в 70 % етанолі протягом 1 хв. з подальшим зануренням в 1 % гіпохлорит натрію на 20 хвилин, а потім промиванням три рази в стерильній дистильованій воді. Насіння замочували в дистильованій воді на 18-20 годин. З насіння вирізали ембріональні рубчики і оголяли апікальну меристему, видаляючи первинне листя. Ембріональні рубчики апікальною областю вгору вміщували в середовище для бомбардування [BM: MS (Murashige and Skoog 1962) базове сольове середовище, 3 % сахарози і 0,8 % фітагелю Sigma, pH 5,7] в 5-см чашки для культивування, які містять 12 мл середовища для культивування.

Спосіб трансформації 5 - Трансформацію ембріогенної тканини калюсу, опосередковану бомбардуванням мікрочастинками, можна оптимізувати описаними раніше способами (Khalafalla et al., 2005; El-Shemy et al., 2004, 2006).

#### ПРИКЛАД 8

AAD-12 (v1) в бавовні

Спосіб трансформації бавовни: Насіння бавовни (генотип Co310) поверхнево стерилізували в 95 % етанолі протягом 1 хвилини, промивали, стерилізували 50 % комерційним відбілювачем протягом двадцяти хвилин, а потім промивали 3 рази стерильною дистильованою водою перед пророщуванням на середовищі G-media (таблиця 21) в посудинах Magenta GA-7 і зберіганням при високій інтенсивності освітлення 40-60  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  з фотоперіодом, встановленим на 16 годин освітлення і 8 годин темряви, при 28 °C.

Квадратні сегменти сім'ядолі (~5 мм) отримували з проростків віком 7-10 днів і вміщували в рідкі середовища M (таблиця 21) в чашках Петрі (Nunc, кат. №0875728). Вирізані сегменти обробляли розчином, що містить *Agrobacterium*, (протягом 30 хвилин), потім переносили на напівтверде середовище M (таблиця 21) і піддавали спільному культивуванню протягом 2-3 днів. Після спільного культивування сегменти переносили на середовище MG (таблиця 21). Карбеніцилін є антибіотиком, що використовується для знищення *Agrobacterium*, а глюфосинат-амоній є селективним засобом, що дозволяє рости тільки клітинам, що містять перенесений ген.

Отримання *Agrobacterium*: 35 мл середовища Y (таблиця 21) (що містить стрептоміцин (стоковий розчин 100 мг/мл) і еритроміцин (стоковий розчин 100 мг/мл)) інокулювали з використанням однієї петлі бактерій для вирощування протягом ночі в темряві при 28 °C при струшуванні при 150 об./хв. На наступний день розчин, який містить *Agrobacterium*, виливали в стерильну пробірку Oak Ridge (Nalge-Nunc, 3139-0050) і центрифугували в Beckman J2-21 при 8000 об./хв. протягом 5 хвилин. Виливали супернатант, ресуспендували осад в 25 мл рідкого середовища M (таблиця 21) і центрифугували на вортексі. Вміщували аліквоту в скляну культуральну пробірку (Fisher, 14-961-27) для зчитування з використанням Klett (Klett-Summerson, модель 800-3). Розбавляли нову суспензію з використанням рідких середовищ M для зчитування за допомогою колориметра Klett при 10 колонієутворювальних одиницях на мл із загальним об'ємом 40 мл.

Через три тижні з сегментів сім'ядолі виділяли калюс і переносили на свіже середовище MG. Калюс переносили на середовище MG ще на 3 тижні. При безпосередньому порівнянні середовища MG можна доповнювати дихлорпропом (що додається в середовища в

- концентраціях 0,01 і 0,05 мг/л) для доповнення деградації 2,4-D, оскільки дихлорпроп не є субстратом ферменту AAD-12, однак дихлорпроп більш активний відносно бавовни, ніж 2,4-D. При роздільному порівнянні сегменти вміщували на середовище MG, що не містить регуляторів росту в порівнянні зі стандартним середовищем MG, вони демонстрували знижене калюсоутворення, але калюс все одно ріс. Потім калюс переносили на середовище CG (таблиця 21) і через три тижні знов переносили на свіже селекційне середовище. Ще через три тижні тканину калюс переносили на середовище D (таблиця 21) без регуляторів росту рослин для індукції ембріогенного калюсу. Через 4-8 тижнів на цьому середовищі утворювався ембріогенний калюс, і його можна відрізнити від неембріогенного калюсу за його жовтуватобілим кольором і гранулярними клітинами. Незабаром після цього починалася регенерація ембріонів, і вони ставали помітно зеленими за кольором. Регенерація і утворення ембріонів бавовни може зайняти час, одним зі способів прискорення цього процесу є піддавання тканини стресу. Загальноприйнятим способом для здійснення цього є десикація за допомогою змін в мікрооточенні тканини і чашки з використанням меншої кількості середовищ для культивування і/або різних способів поміщення чашки (замотування стрічкою в порівнянні з парафільмом).

Таблиця 21

## Середовища для трансформації бавовни

Інгредієнти на 1 літр	G	M рідке	M	MG	CG	D	DK	Y
Солі LS (5X)	200 мл	200 мл	200 мл	200 мл	200 мл			
Глюкоза		30 г	30 г	30 г	30 г	20 г		
Модифіковане d B5 vit (1000x)	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	10 мл	1 мл	
Кінетин (1 мМ)		1 мл	1 мл	1 мл	4,6 мл		0,5мл	
2,4-D (1 мМ)		1 мл	1 мл	1 мл				
Агар	8 г		8 г	8 г	8 г	8 г	8 г	
Солі DKW (D190)						1 пачка	1 пачка	
міоїнозитол (100x)						1 мл	10 мл	
Сахароза 3 %	30 г						30 г	10 г
NAA								
Карбеніцилін (250 мг/мл)				2 мл	0,4 мл			
GLA (10 мг/мл)				0,5 мл	0,3 мл			
Пептон								10 г
Дріжджовий екстракт								10 г
NaCl								5 г

- Виділяли добре розвинені ембріони більшого розміру і переносили їх на середовища DK (таблиця 21) для розвитку ембріонів. Через 3 тижні (або коли ембріони розвинулися) пророслі ембріони переносили на свіжі середовища для пророщування пагону і кореня. Через 4-8 тижнів будь-які добре розвинені рослини переносили в ґрунт і вирощували до дозрівання. Через декілька місяців рослини зростали до такої міри, коли їх можна обприскувати для визначення того, чи мають вони резистентність до 2,4-D.

- Трансформація клітин: Починали декілька експериментів, в яких сегменти сім'ядолі обробляли *Agrobacterium*, що містять pDAB724. Більше 2000 отриманих сегментів обробляли з використанням різних варіантів ауксинів для проліферації калюсу бавовни з pDAB724: 0,1 або 0,5 мг/л R-дихлорпропу, 2,4-D в стандартній концентрації і без обробки ауксинами. Калюс піддавали селекції з глуфосинатом амонію внаслідок включення гена PAT в конструкцію. Аналіз лінії калюсу в формі ПЛР і *Invader* будуть використовувати для визначення і перевірки наявності гена на стадії калюсу; потім лінії калюсу, які є ембріогенними, будуть відправляти на аналіз вестерн-блотингу. Ембріогенний калюс бавовни піддавали стресу з використанням способів десикації для поліпшення якості і кількості виділеної тканини. Майже 200 об'єктів калюсу піддавали скрінінгу на інтактну PTU і експресію з використанням аналізу вестерн-блотингу на ген AAD-12 (v1).

- Регенерація рослин: Лінії бавовни з AAD-12 (v1), за допомогою яких отримували рослини згідно з вказаним вище способом, будуть відправляти в теплицю. Для демонстрації того, що ген AAD-12 (v1) забезпечує резистентність бавовни до 2,4-D, рослини бавовни з AAD-12 (v1) і рослини бавовни дикого типу обприскували з використанням автоматичного пристрою для обприскування, що випускає 560 г ке/га 2,4-D при об'ємі розчину для обприскування 187 л/га. Рослини будуть оцінювати через 3 і 14 днів після обробки. Рослини, що вижили, при селективній

нормі внесення 2,4-D, будуть піддавати самозапиленню для отримання насіння T1 або ауткросингу з елітною лінією бавовни для отримання насіння F1. Отримане потім насіння будуть вирощувати і оцінювати на резистентність до гербіцидів, як описано вище. Об'єкти з AAD-12 (v1) можна комбінувати з іншими бажаними ознаками HT або IR.

#### 5 ПРИКЛАД 9

Трансформація інших сільськогосподарських культур з використанням *Agrobacterium*

У світлі даного опису за даним винаходом можна трансформувати додаткові сільськогосподарські культури з використанням відомих в цій галузі способів. Опосередковану *Agrobacterium* трансформацію жита див., наприклад, в Popelka and Altpeter (2003). Опосередковану *Agrobacterium* трансформацію сої див., наприклад, в Hinchee et al., 1988. Опосередковану *Agrobacterium* трансформацію сорго див., наприклад, в Zhao et al., 2000. Опосередковану *Agrobacterium* трансформацію ячменю див., наприклад, в Tingay et al., 1997. Опосередковану *Agrobacterium* трансформацію пшениці див., наприклад, в Cheng et al., 1997. Опосередковану *Agrobacterium* трансформацію рису див., наприклад, в Hiei et al., 1997.

Латинські назви цих і інших рослин представлені нижче. Потрібно розуміти, що ці і інші (без *Agrobacterium*) способи трансформації можна використовувати для трансформації з використанням AAD-12 (v1), наприклад, цих і інших рослин, включаючи, як необмежувальні приклади, кукурудзу (*Zea mays*), пшеницю (*Triticum spp.*), рис (*Oryza spp.* і *Zizania spp.*), ячмінь (*Hordeum spp.*), бавовну (*Abroma augusta* і *Gossypium spp.*), сою (*Glycine max*), цукровий і столовий буряк (*Beta spp.*), цукрову тростину (*Arenga pinnata*), помідор (*Lycopersicon esculentum* і інші *spp.*, *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* і інші *spp.*, і *Cyphomandra betacea*), картоплю (*Solanum tuberosum*), батат (*Ipomoea batatas*), жито (*Secale spp.*), перець (*Capsicum annuum*, *sinense* і *frutescens*), латук (*Lactuca sativa*, *perennis* і *pulchella*), капусту (*Brassica spp.*), селеру (*Apium graveolens*), баклажан (*Solanum melongena*), арахіс (*Arachis hypogea*), сорго (всі види сорго), люцерну (*Medicago sativa*), моркву (*Daucus carota*), квасолю (*Phaseolus spp.* і інші роди), овес (*Avena sativa* і *strigosa*), горох (*Pisum*, *Vigna* і *Tetragonolobus spp.*), соняшник (*Helianthus annuus*), гарбуз гігантський (*Cucurbita spp.*), огірок (*Cucumis sativa*), тютюн (*Nicotiana spp.*), арабідопсис (*Arabidopsis thaliana*), газонну траву (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon* і інші роди), конюшину (*Tifolium*), горошок (*Vicia*). Такі рослини, наприклад, з генами AAD-12 (v1), включені в даний винахід.

AAD-12 (v1) має потенціал для підвищення застосовності ключових ауксинових гербіцидів для сезонного використання в багатьох листяних і хвойних системах лісництва. Види дерев, резистентні до триклопіру, 2,4-D і/або флуроксіпіру будуть підвищувати гнучкість надмірного використання цих гербіцидів без побоювань, пов'язаних з пошкодженнями. Ці види будуть включати, як необмежувальні приклади: вільху (*Alnus spp.*), ясен (*Fraxinus spp.*), види осики і тополі (*Populus spp.*), бук (*Fagus spp.*), березу (*Betula spp.*), вишню (*Prunus spp.*), евкаліпт (*Eucalyptus spp.*), гікорі (*Carya spp.*), клен (*Acer spp.*), дуб (*Quercus spp.*) і сосну (*Pinus spp.*). Використання резистентності до ауксинів для селективного контролю бур'янів у декоративних і плодоносних видів також входить в об'єм даного винаходу. Приклади можуть включати, як необмежувальні приклади, троянду (*Rosa spp.*), бересклет (*Euonymus spp.*), петунію (*Petunia spp.*), бегонію (*Begonia spp.*), рододендрон (*Rhododendron spp.*), яблуню лісову або яблуню (*Malus spp.*), грушу (*Pyrus spp.*), персик (*Prunus spp.*) і чорнобривці (*Tagetes spp.*).

#### ПРИКЛАД 10

Додатковий доказ несподіваних результатів: AAD-12 в порівнянні з AAD-2

Вихідне клонування AAD-2 (v1): Інший ген з бази даних NCBI (див. веб-сайт [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov); реєстр. № AP005940) ідентифікували як гомолог з ідентичністю відносно *tfdA* всього 44 % амінокислот. Для зручності цей ген в даному описі позначають як AAD-2 (v1). Процент ідентичності визначали, спочатку перетворюючи послідовності ДНК AAD-2 і *tfdA* (SEQ ID NO: 12 з PCT/US2005/014737 і реєстраційний номер GenBank M16730, відповідно) в білки (SEQ ID NO: 13 з PCT/US2005/014737 і реєстраційний номер GenBank M16730, відповідно), потім використовуючи ClustalW в пакеті програм VectorNTI для здійснення множинного вирівнювання послідовностей.

3 Northern Regional Research Laboratory отримували штам *Bradyrhizobium japonicum*, що містить ген AAD-2 (v1) (NRRL, штам №B4450). Ліофілізований штам відновлювали згідно з протоколом NRRL і зберігали при -80 °C в 20 % гліцерині для внутрішнього використання як бактеріального штаму Dow DB 663. Потім чашку з триптичним соєвим агаром засівали петлею клітин з цього замороженого стоку для виділення і інкубували при 28 °C протягом 3 днів. Окрему колонію використовували для інокуляції 100 мл триптичного соєвого бульйону в колбі з відбійниками ємністю 500 мл, який інкубували протягом ночі при 28 °C в підлоговій качалці при 150 об./хв. З нього виділяли тотальну ДНК з використанням грамнегативного протоколу для

набору Qiagen's DNeasy (Qiagen, кат. №69504). Для ампліфікації гена-мішені з геномної ДНК конструювали наступні праймери, прямий: 5'-ACTAGTAACAAAGAAGGAGATATACCATGACGAT-3' [(brjar 5'(speI) SEQ ID NO: 14 з PCT/US2005/014737 (з доданою ділянкою рестрикції Spe I і ділянкою зв'язування рибосоми (RBS))], і зворотний: 5'-TTCTCGAGCTATCACTCCGCCGCTGCTGCTGC-3' [(brjar 3' (xhoI) SEQ ID NO: 15 з PCT/US2005/014737 (з доданою ділянкою рестрикції XhoI)].

Реакційні суміші об'ємом п'ятдесят мікролітрів складали таким чином: буфер Fail Safe Buffer-25 мкл, ea. праймер - 1 мкл (50 нг/мкл), геномна ДНК - 1 мкл (200 нг/мкл), H.sub.2O-21 мкл, Taq-полімераза - 1 мкл (2,5 Од./мкл). Три буфери Fail Safe Buffer-A, B і C використовували в трьох окремих реакціях. Потім здійснювали ПЛР в наступних умовах: цикл термічної денатурації при 95 °C протягом 3,0 хвилин; 95 °C - 1,0 хвилина, 50 °C - 1,0 хвилина, 72 °C - 1,5 хвилини протягом 30 циклів; з подальшим кінцевим циклом при 72 °C протягом 5 хвилин, з використанням системи FailSafe PCR System (Epicenter, кат. №F599100). Для підтвердження нуклеотидної послідовності отриманий продукт ПЛР розміром ~1 т. п. н. клонували в рCR 2.1 (Invitrogen, кат. № K4550-40), слідуючи включеному протоколу, з використанням хімічно-компетентних TOP10F' E. coli як штаму-акцептора.

Десятьма з отриманих білих колоній інокулювали 3 мкл бульйону Лурія + 1000 мкг/мл ампіциліну (LB Amp) і вирощували протягом ночі при 37 °C зі струшуванням. З кожної культури виділяли плазмиди, використовуючи набір Nucleospin Plus Plasmide Miniprep Kit (BD Biosciences, кат. № K3063-2) і слідуючи включеному протоколу. Здійснювали рестрикцію виділеної ДНК для підтвердження наявності продукту ПЛР у векторі рCR2.1. Плазмідну ДНК розщеплювали з використанням рестрикційного ферменту EcoRI (New England Biolabs, кат. № R0101S). Секвенування здійснювали за допомогою набору Beckman CEQ Quick Start Kit (Beckman Coulter, кат. №608120) з використанням праймерів M13, прямого [5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'] (SEQ ID NO: 6) і зворотного [5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'] (SEQ ID NO: 7), по інструкціях виробника. Цій послідовності гена і відповідному їй білку давали нове загальне позначення AAD-2 (v1) для внутрішньої узгодженості.

Отримання бінарного вектора AAD-2 (v1): Ген AAD-2 (v1) ампліфікували за допомогою ПЛР з рDAB3202. При реакції ПЛР здійснювали зміни в праймерах для вбудовування ділянок рестрикції AflIII і SacI в 5'-праймер і 3'-праймер, відповідно. ДИВ. PCT/US2005/014737. "Праймери NcoI of Brady" [5'-TATACCACATGTGATCGCCATCCGGCAGCTT-3'] (SEQ ID NO: 14) і "SacI of Brady" [5'-GAGCTCCTATCACTCCGCCGCTGCTGCTGCAC-3'] (SEQ ID NO: 15) використовували для ампліфікації фрагментів ДНК з використанням системи Fail Safe PCR System (Epicentre). Продукт ПЛР клонували в клонуючий вектор рCR2.1 TOPO TA (Invitrogen) і підтверджували послідовність за допомогою прямого і зворотного праймерів M13 з використанням реагентів для "секвенування Beckman Coulter Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit". За допомогою даних про послідовність ідентифікували клон з правильною послідовністю (рDAB716). Потім фрагмент гена AflIII/SacI AAD-2 (v1) клонували у вектор NcoI/SacI рDAB726. Отриману конструкцію (рDAB717); промотор AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-2 (v1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR підтверджували за допомогою рестрикції (з використанням NcoI/SacI). Цю конструкцію клонували в бінарний вектор рDAB3038 як фрагмент ДНК NotI-NotI. Отриману конструкцію (рDAB767); промотор AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-2 (v1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: промотор CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR піддавали рестрикції (з використанням Nod, EcoRI, HindIII, NcoI, PvuII і SalI) для підтвердження правильної орієнтації. Потім завершену конструкцію (рDAB767) використовували для трансформації Agrobacterium.

Оцінка трансформованого арабідопсису: Свіжозібране насіння T1, трансформоване з використанням оптимізованого для рослин гена AAD-12 (v1) або нативного гена AAD-2 (v1), вирощували і піддавали селекції на резистентність до глюфосинату, як описано вище. Потім рослинам випадковим чином присвоювали різні норми внесення 2,4-D (50-3200 г ке/га). Нанесення гербіциду здійснювали за допомогою автоматичного пристрою для обприскування при об'ємі розчину для обприскування 187 л/га. Використовуваний 2,4-D був комерційним складом диметиламінової солі (456 г ке/л, NuFarm, St Joseph, Mo.), змішаний в 200 мМ буфері Тріс (pH 9,0) або 200 мМ буфері HEPES (pH7,5).

AAD-12 (v1) і AAD-2 (v1) забезпечували детектовану резистентність до 2,4-D в порівнянні з трансформованими і нетрансформованими контрольними лініями; однак, окремі конструкції були широко варіабельними по своїй здатності додавати резистентність до 2,4-D окремих рослин арабідопсису T1. Несподівано, трансформанти з AAD-2 (v1) і AAD-2 (v2) були набагато менш резистентними до 2,4-D, ніж з геном AAD-12 (v1), по частці високо стійких рослин, а також загальним середнім пошкодженням. Рослини, трансформовані з використанням AAD-2 (v1), не виживали при 200 г ке/га 2,4-D відносно непошкодженими (<20 % видимих пошкоджень), і

загальні пошкодження в популяції становили приблизно 83 % (див. PCT/US2005/014737). На відміну від цього, AAD-12 (v1) мали середні пошкодження в популяції приблизно 6 % при обробці 3200 г ке/га 2,4-D. Стійкість дещо поліпшувалася у випадку оптимізованого для рослин AAD-2 (v2) в порівнянні з нативним геном; однак порівняння обох генів AAD-12 і AAD-2, оптимізованих для рослин, вказує на значну перевагу AAD-12 (v1) в польових умовах.

Ці результати є несподіваними з урахуванням того, що при порівнянні AAD-2 (v1) (див. PCT/US2005/014737) і AAD-12 (v2) *in vitro* виявили, що обидва були високоефективними в деградації 2,4-D і обидва мали специфічність S-типу відносно хіральних арилоксіалканоатних субстратів. AAD-2 (v1) експресується в окремих рослинах T1 на різних рівнях; однак цей білок, який експресується, додавав невеликий захист від пошкоджень 2,4-D. Не спостерігали значущих відмінностей в рівні експресії білка (в польових умовах) для нативних і оптимізованих для рослин генів AAD-2 (див. PCT/US2005/014737). Ці дані підтверджують отримані раніше результати, які роблять несподіваною функціональну експресію AAD-12 (v1) в польових умовах і резистентність, що є її результатом до гербіцидів 2,4-D і піридиліоксіацетатних гербіцидів.

#### ПРИКЛАД 11

Використання феноксіауксинових гербіцидів для посівів сої, бавовни і інших дводольних сільськогосподарських культур, трансформованих тільки з використанням AAD-12 (v1)

AAD-12 (v1) може зробити можливим використання феноксіауксинових гербіцидів (наприклад, 2,4-D і MCPA) і піридиліоксіауксинів (триклопіру і флуороксипіру) для контролю широкого спектра широколистяних бур'янів безпосередньо у випадку сільськогосподарських культур, в нормі сприйнятливих до 2,4-D. За допомогою нанесення 2,4-D в кількості від 280 до 2240 г ке/га можна контролювати більшість видів широколистяних бур'янів, присутніх в агрономічних умовах. Частіше використовують 560-1120 г ке/га. У випадку триклопіру норми внесення, як правило, будуть знаходитися в діапазоні 70-1120 г ке/га, частіше - 140-420 г ке/га. У випадку флуороксипіру норми внесення, як правило, будуть знаходитися в діапазоні 35-560 г ке/га, частіше - 70-280 ке/га.

Перевагою цього додаткового інструмента є надто низька вартість гербіцидного компонента для широколистяних рослин і потенційний короточасний післядіючий контроль бур'янів, що забезпечується більш високими кількостями 2,4-D, триклопіру і флуороксипіру при їх використанні, в той час як не післядіючий гербіцид, такий як гліфосат, не буде забезпечувати контролю пророслих надалі бур'янів. Цей інструмент також забезпечує механізм комбінування механізмів дії гербіциду із зручністю HTC як інтегрованої стратегії резистентності до гербіцидів і регуляції зсувів в популяціях бур'янів.

Додатковою перевагою, що забезпечується цим інструментом, є можливість отримання бакової суміші гербіцидів для контролю широкого спектра широколистяних бур'янів (наприклад, 2,4-D, триклопіру і флуороксипіру) із загальноновживаними післядіючими гербіцидами для контролю бур'янів. Ці гербіциди, як правило, наносять до посадки або під час неї, але часто вони менш ефективні відносно пророслих, укорінених бур'янів, які можуть існувати на полі до посадки. Підвищуючи застосовність цих арилоксіауксинових гербіцидів до включення посадкових, передсходових або передпосівних обробок, збільшують гнучкість програм післядіючого контролю бур'янів. Фахівцеві в цій галузі буде зрозуміло, що програми з використанням післядіючих гербіцидів будуть відрізнятися з урахуванням сільськогосподарської культури, яка цікавить, але типові програми будуть включати гербіциди з груп хлорацетамідних і динітроанілінових гербіцидів, а також гербіциди, такі як кломазон, сульфентразон і множини ALS-інгібуючих, PPO-інгібуючих і HPPD-інгібуючих гербіцидів.

Додаткові переваги можуть включати стійкість до 2,4-D, триклопіру або флуороксипіру, необхідну до посадки після нанесення ауксинових гербіцидів на основі арилоксіоцтової кислоти (див. приклад вище); і менша кількість проблем з контамінаційними пошкодженнями дводольних сільськогосподарських культур, що є результатом неповного очищення наливних цистерн, що містили 2,4-D, триклопір або флуороксипір. Дикамбу (і багато які інші гербіциди) все одно можна використовувати для подальшого контролю AAD-12 (v1)-трансформованих дводольних самосійних сільськогосподарських культур.

Фахівцям в цій галузі також буде зрозуміло, що вказаний вище приклад можна застосувати до будь-якої сприйнятливої до 2,4-D (або іншого арилоксіауксинового гербіциду) сільськогосподарської культури, яка буде захищена за допомогою гена AAD-12 (v1) у випадку стабільної трансформації. Тому фахівцеві в галузі контролю бур'янів буде зрозуміло, що використання різних комерційних фенокси- або піридиліоксіауксинових гербіцидів окремо або в комбінації з гербіцидом стає можливим завдяки трансформації з використанням AAD-12 (v1). Конкретні кількості інших гербіцидів, характерні для цих хімічних речовин, можна визначати за допомогою маркувань гербіцидів, зібраних в книзі CPR (Crop Protection Reference), або

аналогічному збірнику або будь-яких комерційних або академічних джерелах по захисту сільськогосподарських культур, такий як Crop Protection Guide від Agrilience (2005). Кожний альтернативний гербіцид, який можна використовувати в НТС завдяки AAD-12 (v1), що використовується окремо, в баковій суміші або послідовно, вважають таким, що входить в об'єм даного винаходу.

#### ПРИКЛАД 12

Використання феноксіяуксинових і піридилوکсіяуксинових гербіцидів для посівів кукурудзи, рису і інших однодольних видів, трансформованих тільки з використанням AAD-12 (v1)

Аналогічно, трансформація видів трав (як необмежувальні приклади, такі як, кукурудза, рис, пшениця, ячмінь або газонна трава і пасовищні злаки) з використанням AAD-12 (v1) буде робити можливою використання високоефективних фенокси- і піридилوکсіяуксинів у випадку сільськогосподарських культур, де в нормі селективність є невизначеною. Більшість видів трав мають природну стійкість до ауксинових гербіцидів, таких як феноксіяуксини (тобто 2,4-D). Однак відносно низький рівень селективності сільськогосподарських культур приводить до зниженої застосовності у випадку цих сільськогосподарських культур внаслідок укороченого часового вікна нанесення або неприйнятного ризику пошкодження. Таким чином, однодольні сільськогосподарські культури, трансформовані з використанням AAD-12 (v1), будуть робити можливими використання аналогічної комбінації обробок, що описується для дводольних сільськогосподарських культур, таких як нанесення 2,4-D при нормі внесення від 280 до 2240 г ке/га для контролю більшості видів широколистяних бур'янів. Частіше використовують 560-1120 г ке/га. У випадку триклопіру норми внесення, як правило, будуть знаходитися в діапазоні 70-1120 г ке/га, частіше - 140-420 г ке/га. У випадку флуроксіпіру норми внесення, як правило, будуть знаходитися в діапазоні 35-560 г ке/га, частіше - 70-280 г ке/га.

Перевагою цього додаткового інструмента є надто низька вартість гербіцидного компонента для широколистяних рослин і потенційний короточасний післядіючий контроль бур'янів, що забезпечується більш високими кількостями 2,4-D, триклопіру або флуроксіпіру. На відміну від цього, не післядіючий гербіцид, такий як гліфосат, не буде забезпечувати контроль пророслих надалі бур'янів. Цей інструмент також буде забезпечувати механізм чергування механізмів дії гербіцидів зі зручністю НТС як інтегрованої стратегії резистентності до гербіцидів і регуляції зсувів в популяціях бур'янів в стратегії комбінування стійких до гліфосату сільськогосподарських культур/НТС AAD-12 (v1) при чергуванні видів сільськогосподарських культур або його відсутності.

Додатковою перевагою, що забезпечується цим інструментом, є можливість отримання бакової суміші гербіцидів для контролю широкого спектра широколистяних бур'янів (наприклад, 2,4-D, триклопіру і флуроксіпіру) із загальновикористовуваними післядіючими гербіцидами для контролю бур'янів. Ці гербіциди, як правило, наносять до посадки або під час неї, але часто вони менш ефективні відносно пророслих, укорінених бур'янів, які можуть існувати на полі до посадки. Підвищуючи застосовність цих арилоксіауксинових гербіцидів до включення посадкових, передсходових або передпосівних обробок, збільшують гнучкість програм післядіючого контролю бур'янів. Фахівцям в цій галузі буде зрозуміло, що програми з використанням післядіючих гербіцидів будуть відрізнятися з урахуванням сільськогосподарської культури, яка цікавить, але типові програми будуть включати гербіциди з груп хлорацетамідних і динітроанілінових гербіцидів, а також гербіциди, такі як кломазон, сульфентразон і множини ALS-інгібуючих, PPO-інгібуючих і HPPD-інгібуючих гербіцидів.

Підвищена стійкість кукурудзи, рису і інших однодольних рослин до фенокси- або піридилوکсіяуксинів повинна дозволити використовувати ці гербіциди для посівів без обмежень, пов'язаних з фазами росту або потенційним нахилом сільськогосподарських культур, розвитку явищ, таких як "щурячий хвіст", нахил сільськогосподарських культур, ламкості, що індукується регуляторами росту стебла у кукурудзи або деформація опорного коріння. Кожний альтернативний гербіцид, який можна використовувати в НТС завдяки AAD-12 (v1), що використовується окремо, в баковій суміші або послідовно, вважають таким, що входить в об'єм даного винаходу.

#### ПРИКЛАД 13

##### AAD-12 (v1) в рисі

Опис середовищ: Використовувані середовища для культивування доводили до pH 5,8 за допомогою 1 М КОН і отверджували за допомогою 2,5 г/л фітагелю (Sigma). Ембріогенні калюси культивували в чашках Петрі розміром 100×20 мм, що містять 40 мл напівтвердого середовища. Проростки рису вирощували на 50 мл середовища в коробках Magenta. Клітинні суспензії підтримували в конічних колбах ємністю 125 мл, що містять 35 мл рідкого середовища, і обертати при 125 об./хв. Індукцію і підтримку ембріогенних культур здійснювали в темряві при

25-26 °C, і регенерацію рослин і культивування цілих рослин здійснювали при фотоперіоді 16 годин (Zhang et al. 1996).

Індукцію і підтримку ембріогенного калюсу здійснювали на мінімальному середовищі NB, описаному раніше (Li et al. 1993), але адаптованому для утримування 500 мг/л глутаміну. Суспензійні культури ініціювали і підтримували в рідкому середовищі SZ (Zhang et al. 1998) з включенням 30 г/л сахарози замість мальтози. Осмотичне середовище (NBO) складалося з середовища NB з додаванням 0,256 М маніту і сорбіту. Калюс, резистентний до гігromіцину В, піддавали селекції на середовищі NB, доповненому 50 мг/л гігromіцину В, протягом 3-4 тижнів. Попередню регенерацію здійснювали на середовищі (PRH50), що складається з середовища NB без 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-D), але з додаванням 2 мг/л 6-бензиламінопурину (BAP), 1 мг/л  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (NAA), 5 мг/л абсцизової кислоти (ABA) і 50 мг/л гігromіцину В, протягом 1 тижня. Потім здійснювали регенерацію проростків за допомогою культивування на середовищі для регенерації (RNH50), що містить середовище NB без 2,4-D, і доповнене 3 мг/л BAP, 0,5 мг/л NAA і 50 мг/л гігromіцину В, до регенерації пагонів. Пагони переносили на середовище для вкорінення з половинною концентрацією базових солей Мурашиге і Скуга і вітамінів В5 по Гамборгу, доповнене 1 % сахарозою і 50 мг/л гігromіцину В (1/2MSH50).

Отримання культури тканини: Зріле зневоднене насіння *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 стерилізували, як описано в Zhang et al. 1996. Індукували ембріогенні тканини, культивуючи стерильне зріле насіння рису на середовищі NB в темряві. Первинний калюс діаметром приблизно 1 мм відділяли від щитка і використовували для ініціації клітинної суспензії в рідкому середовищі SZ. Потім суспензії підтримували, як описано в Zhang 1995. Отримані за допомогою суспензії ембріогенні тканини видаляли з рідкої культури через 3-5 днів після попереднього субкультивування, вміщували на осмотичне середовище NBO для отримання кола діаметром приблизно 2,5 см на чашці Петрі і культивували протягом 4 годин перед бомбардуванням. Через 16-20 годин після бомбардування тканини переносили із середовища NBO на селективне середовище NBH50 з гігromіцином В, перевіряючи, щоб поверхня, бомбардована, знаходилася зверху, і інкубували в темряві протягом 14-17 днів. Потім калюс, що знову утворився, відділяли від початкових підданих бомбардуванню експлантатів і вміщували поблизу на те ж середовище. Ще через 8-12 днів візуально визначали відносно щільний, непрозорий калюс і переносили його на середовище для попередньої регенерації PRH50 на 7 днів в темряві. Потім зростаючий калюс, що став більш щільним і непрозорим, субкультивували на середовищі для регенерації RNH50 протягом 14-21 днів з фотоперіодом 16 годин. Регенерувавши пагони переносили в коробки Magenta, що містять середовище 1/2 MSH50. Численні рослини, регенерувавши з одного експлантата, вважали сибсами і розглядали як одну незалежну лінію рослин. Рослину оцінювали як позитивну по гену *hph*, якщо вона давала товсте біле коріння і активно росла на середовищі 1/2 MSH50. Коли проростки досягали верху коробок Magenta, їх переносили в ґрунт в 6-см горщик при 100 % вологості на тиждень, потім переміщували у вегетаційну камеру з періодом освітлення 14 годин при 30 °C і періодом темряви при 21 °C на 2-3 тижні до пересадження в 13-см горщики в теплиці. Насіння збирали і висушували при 37 °C протягом одного тижня перед зберіганням.

Бомбардування мікрочастинками: Всі бомбардування здійснювали з використанням системи Biolistic PDS-1000/He™ (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Три міліграми частинок золота діаметром 1,0 мікромметр промивали однократно 100 % етанолом, двічі - стерильною дистильованою водою і ресуспендували в 50 мкл води в силіконізованій пробірці Eppendorf. П'ять мікрограмів плазмідної ДНК, що представляє pDOW3303 (*Hpt*-вмісний вектор) і pDAB4101 (AAD-12 (v1)+AHAS) в молярному співвідношенні 1:6, 20 мкл спермідину (0,1 М) і 50 мкл хлориду кальцію (2,5 М) додавали до суспензії золота. Суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хв., центрифугували при 10000 об./хв. протягом 10 сек., ресуспендували в 60 мкл холодного 100 % етанолу і розподіляли по 8-9 мкл на кожний макроносій. Зразки тканини бомбардували при 1100 фунт/дюйм<sup>2</sup> і вакуумі 27 дюймів ртутного стовпа, як описано в Zhang et al. (1996).

Післясходова стійкість до гербіцидів у рису T0, трансформованого з використанням AAD-12 (v1): Проростки рису в фазі 3-5 листків обприскували летальною дозою 0,16 % (об./об.) розчину Pursuit (для підтвердження наявності гена AHAS), що містить 1 % Sunit II (об./об.) і 1,25 % UAN (об./об.), з використанням автоматичного пристрою для обприскування, відкаліброваного на 187 л/га. Оцінку сприйнятливості або резистентності здійснювали через 36 днів після обробки (DAT). Десять з 33 об'єктів, відправлених в теплицю, були стабільно стійкими до Pursuit; інші демонстрували різні рівні пошкодження гербіцидами. Відбирали рослини і здійснювали молекулярний аналіз, при якому визначали сім з цих 10 об'єктів як такі, що містять і PTU AAD-12 (v1), і повну кодуючу область AHAS.

Успадкування AAD-12 (v1) у рису T1: Тестування 100 рослин-нащадків здійснювали на п'яти лініях T1 з ліній з AAD-12 (v1), що містять і PTU AAD-12 (v1), і кодуєчу область AHAS. Насіння висаджували з урахуванням вказаного вище способу і обприскували 140 г ке/га імазетапіру з використанням автоматичного пристрою для обприскування, як описано вище. Через 14 DAT підраховували резистентні і сприйнятливі рослини. Дві з п'яти тестованих ліній розщеплювалися відповідно до єдиного локусу, домінантної ознаки з менделевським успадкуванням (3R: 1S), як визначали за допомогою аналізу з використанням хі-квадрату. AAD-12 успадковувався спільно з селективним маркером AHAS, як визначали за допомогою вказаного нижче тестування на стійкість до 2,4-D.

Підтвердження високої стійкості до 2,4-D у рису T1: Наступні лінії T1, що розщеплюються по AAD-12 (v1), як єдиному локусу, висаджували в 3-дюймові горщики, що містять середовища Metro Mix: pDAB4101(20)003 і pDAB4101(27)002. У фазі 2-3 листки їх обприскували 140 г ке/га імазетапіру. Видаляли рослини, що не містять вставку, і окремі рослини обприскували в фазі V3-V4 в автоматичному пристрої для обприскування, встановленому на 187 л/га при 1120, 2240 або 4480 г ке/га 2,4-D DMA (2-кратна, 4-кратна і 8-кратна типові норми внесення для комерційного використання, відповідно). Рослини класифікували через 7 і 14 DAT і порівнювали з нетрансформованим комерційним культиваром рису "Lamont" як рослини негативного контролю.

Таблиця 22

Відповідь рослин T1 з AAD-12 (v1) і нетрансформованого контролю на різні рівні 2,4-D DMA: середній % пошкодження через 14 DAT

Гербіцид	Нетрансформований контроль Lemont	pDAB4101 (20)003	pDAB4101 (27)002
1120 г ке/га 2,4-D DMA	20	10	10
2240 г ке/га 2,4-D DMA	35	15	30
4480 г ке/га 2,4-D DMA	50	23	40

Дані про пошкодження (таблиця 22) свідчать про те, що лінії, трансформовані з використанням AAD-12 (v1), є більш стійкими до великих кількостей 2,4-D DMA, ніж нетрансформовані контролю. Лінія pDAB4101(20)003 була більш стійкою до високих рівнів 2,4-D, ніж лінія pDAB4101(27)002. Дані також свідчать про те, що стійкість до 2,4-D є стабільною протягом щонайменше двох поколінь.

Збір тканини, виділення ДНК і кількісний аналіз: Свіжу тканину вміщували в пробірки і ліофілізували при 4 °C протягом 2 днів. Після повного висушування тканини в пробірку вміщували гранулу вольфраму (Valenite) і зразки піддавали сухому подрібненню з використанням кульового млина Kelco протягом 1 хвилини. Потім здійснювали стандартне виділення ДНК з використанням DNeasy (Qiagen, Dneasy 69109). Потім аліквоту виділеної ДНК забарвлювали Pico Green (Molecular Probes P7589) і сканували на флуориметрі (BioTek) з відомими стандартами для отримання концентрації в нг/мкл.

Експресія AAD-12 (v1): Всі 33 лінії трансгенного рису T0 і 1 нетрансгенний контроль аналізували на експресію AAD-12 з використанням ELISA-блот. AAD-12 визначали в клонах 20 ліній, але не в лінії контрольних рослин Taipei 309. Дванадцять з 20 ліній, що містять деяку кількість клонів, стійких до імазетапіру, експресували білок AAD-12, були позитивним при ПЛР на PTU AAD-12 і позитивним на кодуєчу область AHAS. Рівні експресії знаходилися в діапазоні від 2,3 до 1092,4 м. ч. загального розчинного білка.

Стійкість рослин рису з pDAB4101 до гербіцидів 2,4-D і триклопіру в польових умовах: Польове випробування рівня стійкості здійснювали з використанням об'єкта з AAD-12 (v1) pDAB4101[20] і одного рису дикого типу (Clearfield 131) (нетрансгенного резистентного до імідазолінону сорту) в Wayside, Miss. Дизайн експерименту являв собою рандомізований повноблоковий план з одним повторенням. Варіанти експерименту являли собою 2-кратні норми внесення 2,4-D (диметиламінової солі) при 2240 г ке/га і триклопіру при 560 г ке/га разом з необробленим контролем. У рамках кожного варіанту експерименту два ряди pDAB4101[20] покоління T1 і два ряди рису Clearfield висаджували з використанням невеликої сівалки з відстанню між рядами 8 дюймів. Рис pDAB4101[20] містив ген AHAS як селективний маркер для гена AAD-12 (v1). Імазетапір наносили в фазу одного листка як селективний засіб для видалення з дослідних ділянок яких-небудь рослин без AAD-12 (v1). Коли рис досягав фази 2 листки, виробляли обробки гербіцидами з використанням пневматичного ранцевого



обприскувача, що випускає об'єм розчину для обприскування 187 л/га під тиском 130-200 кПа. Візуальну оцінку пошкоджень проводили через 7, 14 і 21 днів після обробки.

Відповіді об'єкта з AAD-12 (v1) на 2,4-D і триклопір представлені в таблиці 23. Нетрансформована лінія рису (Clearfield) була важко пошкодженою (30 % через 7 DAT і 35 % через 15 DAT) 2,4-D при 2240 г ке/га, що вважають 4-кратною нормою внесення для комерційного використання. Об'єкт з AAD-12 (v1) демонстрував виняткову стійкість до 2,4-D без видимих пошкоджень через 7 або 15 DAT. Нетрансформований рис був важко пошкодженим (15 % через 7 DAT і 25 % через 15 DAT) 2-кратною нормою внесення триклопіру (560 г ке/га). Об'єкт з AAD-12 (v1) демонстрував виняткову стійкість до 2-кратних норм внесення триклопіру без пошкоджень, що спостерігаються через 7 або 15 DAT.

Ці результати свідчать про те, що трансформований рис з AAD-12 (v1) демонстрував високий рівень резистентності до 2,4-D і триклопіру при нормах внесення, що викликають важкі видимі пошкодження у рису Clearfield. Вони також свідчать про можливість стекингу численних генів стійкості до гербіцидів з AAD-12 I у множині видів для забезпечення резистентності до більш широкого спектра ефективних хімічних речовин.

Таблиця 23

Відповідь рослин рису з AAD-12 покоління T1 на 2,4-D і триклопір в польових умовах

Обробка гербіцидами		% видимих пошкоджень			
		Через 7 DAT		Через 15 DAT	
Активний інгредієнт	Норма внесення	Об'єкт з AAD-12 (v1) pDAB4101-[20]	Дикий тип Clear-field	Об'єкт з AAD-12 (v1) pDAB4101-[20]	Дикий тип Clear-field
2,4-D	2240 г ке/га	0	15	0	35
Триклопір	840 г ке/га	0	30	0	25
Необроблений		0	0	0	0

#### ПРИКЛАД 14

##### AAD-12 (v1) в канолі

Трансформація канолі: Ген AAD-12 (v1), що додає резистентності до 2,4-D, використовували для трансформації *Brassica napus* var. *Nexera*\*710 за допомогою опосередкованої *Agrobacterium* трансформації і плазмиди pDAB3759. Конструкція містила ген AAD-12 (v1), що запускається промотором CsVMV, і ген Pat, що запускається промотором AtUbi10, і ознаку резистентності до гліфосату EPSPS, що запускається промотором AtUbi10.

Насіння поверхнево стерилізували 10 % комерційним відбілювачем протягом 10 хвилин і промивали 3 рази стерильною дистильованою водою. Потім насіння вміщували на мінімальне середовище MS з половинною концентрацією (Murashige and Skoog, 1962) і підтримували в режимі зростання при 25 °C і фотоперіоді 16 годин освітлення/8 годин темряви.

Сегменти гіпокотилу (3-5 мм) вирізали з 5-7-денних проростків і вміщували на середовище для індукції калюсу K1D1 (середовище MS з 1 мг/л кінетину і 1 мг/л 2,4-D) на 3 дні як попередню обробку. Потім сегменти переносили на чашку Петрі, обробляли штамом *Agrobacterium* Z707S або LBA4404, що містить pDAB3759. *Agrobacterium* вирощували протягом ночі при 28 °C в темряві на шейкері при 150 об./хв., потім ресуспендували в середовищі для культивування.

Через 30 хв. обробки сегментів гіпокотилу *Agrobacterium*, їх вміщували назад на середовище для індукції калюсу на 3 дні. Після спільного культивування сегменти вміщували на K1D1TC (середовище для індукції калюсу, що містить 250 мг/л карбеніциліну і 300 мг/л тиментину) на один або два тижні відновлення. Альтернативно, сегменти вміщували безпосередньо на селективне середовище K1D1H1 (вказане вище середовище з 1 мг/л Herbiase). Карбеніцилін і тиментин були антибіотиками, що використовуються для знищення *Agrobacterium*. Селективний засіб Herbiase дозволяє рости трансформованим клітинам.

Потім прищеплені сегменти гіпокотилу вміщували на середовище для регенерації пагонів B3Z1H1 (середовище MS, 3 мг/л бензиламінопурину, 1 мг/л зеатину, 0,5 г/л MES [2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти], 5 мг/л нітрату срібла, 1 мг/л Herbiase, карбеніциліну і тиментину). Через 2-3 тижні пагони починали регенерувати. Сегменти гіпокотилу разом з пагонами переносили на середовище B3Z1H3 (середовище MS, 3 мг/л бензиламінопурину, 1 мг/л зеатину, 0,5 г/л MES [2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти], 5 мг/л нітрату срібла, 3 мг/л Herbiase, карбеніциліну і тиментину) ще на 2-3 тижні.

Пагони відрізали від сегментів гіпокотилу і переносили на середовище для подовження пагонів MESH5 або MES 10 (MS, 0,5 г/л MES, 5 або 10 мг/л Herbiase, карбеніциліну, тиментину)

на 2-4 тижні. Пагони, що подовжилися, культивували для індукції коріння на MSI.1 (MS з 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти). Коли у рослин з'являлася добре розвинена коренева система, їх переносили в ґрунт. Рослини піддавали акліматизації в контрольованих умовах навколишнього середовища в Conviron протягом 1-2 тижня перед перенесенням в теплицю.

- 5 Молекулярний аналіз - Канола, матеріали і способи: Збір тканини, виділення ДНК і кількісний аналіз. Свіжу тканину вміщували в пробірки і ліофілізували при 4 °C протягом 2 днів. Після повного висушування тканини в пробірку вміщували гранулу вольфраму (Valenite) і зразки піддавали сухому подрібненню з використанням кульового млина Kelco протягом 1 хвилини. Потім здійснювали стандартне виділення ДНК з використанням DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109).  
10 Потім аліквоту виділеної ДНК забарвлювали Pico Green (Molecular Probes P7589) і аналізували за допомогою флуориметра (BioTek) з відомими стандартами для отримання концентрації в нг/мкл.

Полімеразна ланцюгова реакція: Як матрицю використовували всього 100 нг тотальної ДНК. Використовували 20 мМ кожного праймера з набором Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Minis TAKRR001A). Праймерами для ПЛР кодуєчої області AAD-12 (v1) були (SEQ ID NO: 10) (прямий) і (SEQ ID NO: 11) (зворотний). Реакцію ПЛР здійснювали в термоциклері 9700 Geneamp (Applied Biosystems), піддаючи зразки впливу 94 °C протягом 3 хвилин і 35 циклам 94 °C протягом 30 секунд, 65 °C протягом 30 секунд і 72 °C протягом 2 хвилин, потім 72 °C протягом 10 хвилин. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі, що забарвлюється EtBr. 35 зразків від 35 рослин з AAD-12 (v1) при тестуванні були позитивними. Три зразки негативного контролю при тестуванні були негативними.

ELISA: Використовуючи загальноприйнятий ELISA, що описується в попередньому розділі, визначали білок AAD-12 в 5 різних трансформованих об'єктах каноли. Рівні експресії знаходилися в діапазоні від 14 до більше 700 м. ч. загального розчинного білка (TSP). Зразки трьох різних нетрансформованих рослин тестували паралельно без детектованого сигналу, що свідчить про те, що антитіла, що використовуються в аналізі, мають мінімальну перехресну реактивність з клітинним матриксом каноли. Ці зразки також підтверджували як позитивні при аналізі вестерн-блотингу. Короткий виклад результатів представлений в таблиці 24.

Таблиця 24

Рівні експресії AAD-12 (v1) в рослинах каноли

Зразок №	[TSP] (мкг/мл)	[AAD-12] (нг/мл)	Експресія (м. ч. TSP)(ELISA)	Вестерн-блотинг
31	5614,96	1692,12	301,36	++++
33	4988,26	2121,52	425,30	++++
38	5372,25	3879,09	722,06	++++
39	2812,77	41,36	14,71	+
40	3691,48	468,74	126,98	+++
Контроль 1	2736,24	0,00	0,00	-
Контроль 2	2176,06	0,00	0,00	-
Контроль 3	3403,26	0,00	0,00	-

Післясходову стійкість до гербіцидів у каноли T0, трансформованої з використанням AAD-12(v1): Сорок п'ять об'єктів T0 з трансформованих з використанням pDAB3759 відправляли в теплицю на період часу і дозволяли їм акліматизуватися. Рослини вирощували до появи 2-4 нових, що виглядають нормальними листків (тобто рослини переносили з умов культивування тканини в умови зростання в теплиці). Потім рослини обробляли летальною дозою комерційних складів 2,4-D-Амін 4 при нормі внесення 560 г ке/га. Нанесення гербіциду здійснювали з використанням автоматичного пристрою для обприскування при об'ємі розчину для обприскування 187 л/га, висоті обприскування 50 см. Летальну дозу визначають як кількість, що викликає >95 % пошкоджень у нетрансформованих контролів.

Двадцять чотири з об'єктів були стійкими до нанесення гербіциду 2,4-D DMA. Деякі об'єкти мали незначні пошкодження, але відновлювалися через 14 DAT. Об'єкти вдосконалювали до T1 (і покоління T2) за допомогою самозапилення в контрольованих умовах в мішках.

Успадкування AAD-12 (v1) у каноли: Також проводили тестування 100 рослин-нащадків на 11 лініях T1 з AAD-12 (v1). Насіння висівали і пересаджували в 3-дюймові горщики, наповнені середовищами Metro Mix. Потім всі рослини обприскували 560 г ке/га 2,4-D DMA, як описано вище. Через 14 DAT підраховували резистентні і сприйнятливі рослини. Сім з 11 тестованих ліній розщеплювалися відповідно до єдиного локусу, домінантної ознаки з менделевським

успадкування (3R:1S), як визначали за допомогою аналізу з використанням хі-квадрату. AAD-12 успадковується як стабільний ген резистентності до арилоксіалканоатауксинів у багатьох видів, і його можна піддавати стекінгу з одним або декількома додатковими генами резистентності до гербіцидів.

5 Успадкування AAD-12 (v1) у канолі: Також проводили тестування 100 рослин-нащадків на 11 лініях T1 з AAD-12 (v1). Насіння висівали і пересаджували в 3-дюймові горщики, наповнені середовищами Metro Mix. Потім всі рослини обприскували 560 г ке/га 2,4-D DMA, як описано вище. Через 14 DAT підраховували резистентні і сприйнятливі рослини. Сім з 11 тестованих ліній розщеплювалися відповідно до єдиного локусу, домінантної ознаки з менделевським успадкуванням (3R:1S), як визначали за допомогою аналізу з використанням хі-квадрату. AAD-12 успадковується як стабільний ген резистентності до арилоксіалканоатауксинів у багатьох видів, і його можна піддавати стекінгу з одним або декількома додатковими генами резистентності до гербіцидів.

10 Підтвердження високої стійкості до 2,4-D у канолі T1: У випадку T1 з AAD-12 (v1) 5-6 мг насіння стратифікували, висівали і додавали тонкий шар середовища Sunshine Mix #5 як верхній шар ґрунту. Пророслі рослини піддавали селекції з використанням 560 г ке/га 2,4-D через 7 і 13 днів після посадки.

Таблиця 25

Відповідь T1 з AAD-12 (v1) і нетрансформованого контролю на післясходову обробку різними кількостями 2,4-D DMA: Середній % пошкоджень через 14 DAT

Гербіцид 2,4-D DMA	Нетрансформований контроль	pDAB3759 (33) 013.001	pDAB3759 (18) 009.001	pDAB3759 (18) 022.001	pDAB3759 (18) 030.001	pDAB3759 (18) 023.001
1120 г ке/га	90	0	0	13	5	3
2240 г ке/га	95	1	5	83	31	6

20 Рослини, що вижили, пересаджували в 3-дюймові горщики, що містять середовища Metro Mix. Рослини, що вижили, з нащадків T1, підданих селекції з використанням 560 г ке/га 2,4-D, також пересаджували в 3-дюймові горщики, наповнені ґрунтом Metro Mix. У фазу 2-4 листки рослини обприскували 280, 560, 1120 або 2240 г ке/га 2,4-D DMA. Рослини класифікували через 3 і 14 DAT і порівнювали з нетрансформованими контрольними рослинами. Вибірка даних про пошкодження об'єктів T1 через 14 DAT представлена в таблиці 25. Дані дозволяють передбачати, що численні об'єкти є стабільно резистентними до 2240 г ке/га 2,4-D, в той час як інші об'єкти демонстрували менш стабільну стійкість до норм внесення до 1120 г ке/га 2,4-D. Рослини, що вижили, пересаджували в горщики 51/4", що містять середовища Metro Mix, вміщували в ті ж умови вирощування, як описано вище, і піддавали самозапиленню для отримання тільки гомозиготного насіння.

30 Стійкість рослин канолі pDAB3759 до гербіцидів 2,4-D, дихлорпропу, триклопіру і флуроксипіру в польових умовах: Польове випробування рівня стійкості проводили на двох об'єктах з AAD-12 (v1) 3759(20)018.001 і 3759(18)030.001 і канолі дикого типу (Nex710) в Fowler, Ind. Дизайн експерименту являв собою рандомізований повноблоковий план з 3 повтореннями. 35 Варіанти експерименту являли собою 2,4-D (диметиламінова сіль) при 280, 560, 1120, 2240 і 4480 г ке/га, триклопір при 840 г ке/га, флуроксипір при 280 г ке/га і необроблений контроль. У рамках кожного варіанту експерименту висаджували один 20-футовий ряд/об'єкти для об'єкта 3759(18)030.0011, 3759(18)018.001 і лінії дикого типу (Nex710) з використанням 4-рядної сівалки з відстанню між рядами 8 дюймів. Коли канола досягала фази 4-6 листки, проводили обробки гербіцидами з використанням пневматичного ранцевого обприскувача, що випускає об'єм розчину для обприскування 187 л/га під тиском 130-200 кПа. Візуальну оцінку пошкоджень проводили через 7, 14 і 21 день після нанесення.

Таблиця 26

Відповідь рослин каноли з AAD-12 (pDAB3759) на 2,4-D, триклопір і флуроксіпір

Обробка гербіцидами		"% видимих пошкоджень через 14 DAT		
Активний інгредієнт	Норма внесення	Об'єкт з AAD-12 3759(20)018.001	Об'єкт з AAD-12 3759(18)030.001	Дикий тип (Nex710)
2,4-D	280 г ке/га	0 а	0 b	0 з
2,4-D	560 г ке/га	0 а	0 b	15 d
2,4-D	1120 г ке/га	2 а	2 ab	33 bc
2,4-D	2240 г ке/га	3 а	3 ab	48 а
Триклопір	840 г ке/га	6 а	6 ab	25 cd
Флуроксіпір	280 г ке/га	7 а	8 а	37 ab

Відповідь каноли на 2,4-D, триклопір і флуроксіпір представлений в таблиці 26. Канола дикого типу (Nex710) була важко пошкодженою (72 % через 14 DAT) 2,4-D при 2240 г ке/га, що вважають 4-кратною нормою внесення. Всі об'єкти з AAD-12 (v1) демонстрували виняткову стійкість до 2,4-D через 14 DAT із середніми пошкодженнями 2, 3 і 2 %, що спостерігаються при 1-, 2- і 4-кратних нормах внесення, відповідно. Канола дикого типу була важко пошкодженою (25 % через 14 DAT) 2-кратною нормою внесення триклопіру (840 г ке/га). Об'єкти з AAD-12 (v1) демонстрували стійкість при 2-кратних нормах внесення триклопіру із середніми пошкодженнями 6 % через 14 DAT для двох об'єктів. Флуроксіпір при 280 г ке/га викликав у нетрансформованої лінії важкі пошкодження (37 %) через 14 DAT. Об'єкти з AAD-12 (v1) демонстрували підвищену стійкість із середніми пошкодженнями 8 % через 5 DAT.

Ці результати свідчать про те, що об'єкти, трансформовані з використанням AAD-12 (v1), демонстрували високий рівень резистентності до 2,4-D, триклопіру і флуроксіпіру при нормах внесення, які були летальними або викликають важкі епінастичні деформації у нетрансформованої каноли. Показано, що AAD-12 має відносну ефективність відносно 2,4-D > триклопіру > флуроксіпіру.

## ПРИКЛАД 15

Трансформація і селекція об'єкта сої DAS-68416-4 з AAD-12

Трансгенний об'єкт сої (Glycine max) DAS-68416-4 отримували за допомогою опосередкованої Agrobacterium трансформації експлантів сім'ядольного вузла сої. Для ініціації трансформації використовували інактивованій штам Agrobacterium EHA101 (Hood et al., 2006), який несе бінарний вектор pDAB4468 (фіг. 2) з селективним маркером (pat) і геном, який цікавить (AAD-12), всередині Т-області ланцюга ДНК.

Здійснювали опосередковану Agrobacterium трансформацію. У короткому викладі, насіння сої (cv Maverick) пророщували на базових середовищах, виділяли сім'ядольні вузли і інфікували Agrobacterium. Середовища для ініціації проростання пагонів, подовження пагонів і вкорінення доповнювали цефотаксимом, тиментином і ванкомицином для видалення Agrobacterium. Використовували селекцію глуфосинатом для інгібування росту нетрансформованих пагонів. Піддані селекції пагони переносили на середовище для вкорінення для розвитку коріння, а потім переносили на ґрунтову суміш для акліматизації проростків.

На кінцеві листочки підданих селекції проростків наносили глуфосинат для скринінгу на предмет передбачуваних трансформантів. Піддані скринінгу проростки переносили в теплицю, дозволяли їм акліматизуватися, а потім на листя наносили глуфосинат для підтвердження стійкості і вважали їх передбачуваними трансформантами. Відбирали піддані скринінгу рослини і здійснювали молекулярні аналізи для підтвердження наявності гена селективного маркера і/або гена, який цікавить. Для отримання насіння Т1 рослинам Т0 дозволяли самозапильоватися в теплиці.

Рослини Т1 піддавали зворотному схрещуванню і піддавали інтрогресії в елітну ідіоплазму (Maverick). Цей об'єкт сої DAS-68416-4 отримували з незалежного трансформованого ізоляту. Об'єкт піддавали скринінгу з урахуванням його унікальних характеристик, таких як єдина ділянка інсерції, нормальне менделевське розщеплення і стабільна експресія, і чудова комбінація ефективності, включаючи стійкість до гербіцидів, і агрономічних характеристик при різному генетичному фоні і в багатьох місцевостях з різним кліматом. Додатковий опис об'єкта сої DAS-68416-4 представлений в WO 2011/066384, включеному як посилання в даний опис в повному об'ємі.

## ПРИКЛАД 16

Отримання агрономічних даних за 2008 рік

Агрономічне дослідження з використанням об'єкта сої DAS-68416-4 і нетрансгенного контролю (var. Maverick) проводили в 2008 році в шести місцях, що знаходяться в Айові, Іллінойсі, Індіані, Небрасці і Онтаріо, Канада (2 місці). Оцінювали агрономічні показники, включаючи підрахунок густини стояння/популяції, потужності проростка/рослини, висоту рослини, вилягання, частоту захворювань, пошкодження комахами і дні до цвітіння, для дослідження еквівалентності об'єкта сої DAS-68416-4 (з обробками гербіцидами і без них) в порівнянні з контрольною лінією Maverick. Це дослідження означають як Агрономічний експеримент S1.

Таблиця 27

Агрономічні показники, що оцінюються в агрономічному експерименті S1

Ознака	Час оцінки	Опис даних	Шкала
Рання популяція	VC-V2	Кількість рослин, пророслих в рядах кожної дослідної ділянки	Конкретна кількість на дослідну ділянку
Потужність проростків	VC-V2	Візуальна оцінка середньої потужності пророслих рослин на дослідну ділянку	Шкала 1-10 на основі зростання нетрансформованої сої 10=Еквівалентність зростанню нетрансформованих рослин 9=Життєздатність рослин становить 90 % в порівнянні з нетрансформованими, і т. д.
Потужність рослини/пошкодження	Після післясходових обробок гербіцидами	Пошкодження внаслідок обробок гербіцидами	Шкала 1-10 на основі зростання нетрансформованої сої 10=Еквівалентність зростанню нетрансформованих рослин 9=Життєздатність рослин становить 90 % в порівнянні з нетрансформованими, і т. д.
Висота рослин	Приблизно R6	Висота від поверхні ґрунту до кінчика найвищого листка, витягнутого рукою	Висота в см (середнє для 10 рослин на дослідну ділянку)
Вилягання	Приблизно R8	Візуальна оцінка тяжкості вилягання	Візуальна оцінка по шкалі 0-100 % з урахуванням кількості рослин, що вилягли
Кінцева популяція	Приблизно R8	Кількість рослин, що залишилися в рядах кожної дослідної ділянки	Точна кількість на дослідну ділянку, включаючи рослини, видалені при попередній вибірці

Насіння тестованої і контрольної сої висівали при нормі висіву приблизно 112 насінин на 25-футовий ряд з відстанню між рядами приблизно 30 дюймів (75 см). У кожній місцевості створювали три повторювані дослідні ділянки для кожного варіанту експерименту, при цьому кожна дослідна ділянка складалася з 2-25-футових рядів. Дослідні ділянки розподіляли згідно з рандомізованим повноблоковим планом (RCB) з унікальною рандомізацією в кожній місцевості. Кожну дослідну ділянку сої обмежували двома рядами нетрансгенної сої схожої зрілості. Все місце проведення випробувань оточували мінімум 10 футами нетрансгенної сої схожої відносної зрілості.

Обробки гербіцидами здійснювали при об'ємі розчину для обприскування приблизно 20 галонів на акр (187 л/га). Ці обробки планували для відтворення максимальної відміченої на маркуванні норми внесення, що використовується в комерційній практиці. 2,4-D наносили у вигляді трьох надмірних обробок розпиленням всього 3 фунта ке/акр за сезон. Окреме нанесення 1,0 фунта ке/акр (1,120 г/га) здійснювали передсходово і приблизно в фазі росту V4 і R2. Глуфосинат наносили у вигляді двох надмірних обробок розпиленням всього 0,74 фунта активного інгредієнта/акр (828 г активного інгредієнта/га) за сезон. Окреме нанесення 0,33 фунта активного інгредієнта/акр і 0,41 фунти активного інгредієнта/акр (374 і 454 г активного інгредієнта/га) здійснювали приблизно в фазі росту V6 і R1.

Для агрономічних даних проводили дисперсійний аналіз серед місць польових випробувань з використанням змішаної моделі (SAS версії 8; SAS Institute 1999). Вхідні елементи даних вважали фіксованими ефектами, а місцевість, блок всередині місцевості, місцевість по вхідних елементах даних, і вхідні елементи даних по блоку всередині місцевості позначали як випадкові ефекти. Значущість загального ефекту умов оцінювали з використанням критерію Фішера. За допомогою критерію Стюдента здійснювали попарне зіставлення між вхідними елементами даних для контролю і необприсканого трансгенного об'єкта сої DAS-68416-4 (необприсканий), об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканого глүфосинатом (об'єкт сої DAS-68416-4+глүфосинат), об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканого 2,4-D (об'єкт сої DAS-68416-4+2,4-D), і об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканого глүфосинатом і 2,4-D (об'єкт сої DAS-68416-4+обидва). Також обчислювали скориговані значення Р з використанням середньої частки помилкових відхилень гіпотези (FDR) для контролю ефекту множинних порівнянь (Benjamini and Hochberg, 1995).

Проводили аналіз агрономічних даних, зібраних для контролю, необприсканого об'єкта сої DAS-68416-4, об'єкта сої DAS-68416-4+2,4-D, об'єкта сої DAS-68416-4+глүфосинат, і об'єкта сої DAS-68416-4+обидва гербіциди. Не спостерігали статистично значущих відмінностей для підрахунку густини стояння, ранньої популяції, потужності проростків, пошкоджень після обробки, вилягання, кінцевого підрахунку густини стояння або днів до цвітіння (таблиця 28). У випадку висоти рослин обчислювали значущий двосторонній критерій Стюдента між контролем і об'єктом сої DAS-68416-4+обприскування 2,4-D. Однак, не спостерігали значущий загальний ефект умов, відмінності були дуже незначними між обробленим об'єктом сої DAS-68416-4 і контролем, і не спостерігали відмінностей між різними варіантами експерименту з об'єктом сої DAS-68416-4. Враховуючи ці результати, об'єкт сої DAS-68416-4 був агрономічно еквівалентним майже ізогенному нетрансгенному контролю.

Таблиця 28

## Аналіз агрономічних характеристик з агрономічного експерименту S1

Аналізований параметр	Загальний ефект умов (Pr>F) <sup>a</sup>	Контроль	Необприсканий (Значення Р <sup>b</sup> скоригов. Р) <sup>c</sup>	Обприсканий глүфосинатом (Значення Р скоригов. Р)	Обприсканий 2,4-D (Значення Р скоригов. Р)	Обприсканий обома (Значення Р скоригов. Р)
Підрахунок густоти стояння (Кількість рослин)	0,774	170	172 (0,709,0,824)	175 (0,311,0,575)	173 (0,476,0,672)	175 (0,269,0,575)
Рання популяція (% сходів) <sup>d</sup>	0,714	76,7	77,4 (0,738,0,824)	79,1 (0,301,0,575)	79,0 (0,327,0,575)	79,4 (0,256,0,575)
Потужність проростків <sup>e</sup>	0,547	9,72	9,39 (0,146,0,575)	9,50 (0,326,0,575)	9,44 (0,222,0,575)	9,39 (0,146,0,575)
Потужність/пошкодження App. 2 <sup>e</sup>	0,511	10,0	9,86 (0,461,0,671)	9,89 (0,555,0,718)	9,83 (0,378,0,611)	9,67 (0,087,0,575)
Потужність/пошкодження App. 3 <sup>e</sup>	0,462	10,0	10,0 (1,000,1,000)	9,89 (0,320,0,575)	9,83 (0,141,0,575)	9,89 (0,320,0,575)
Vigor/Injury App. 5 <sup>e</sup>	0,431	9,94	9,89 (0,721,0,824)	9,78 (0,289,0,575)	9,67 (0,085,0,575)	9,78 (0,289,0,575)
Висота (см)	0,144	101	98,1 (0,145,0,575)	99,2 (0,390,0,611)	96,1 (0,020,0,575)	97,2 (0,062,0,575)
Вилягання (%)	0,948	17,2	18,2 (0,885,0,904)	21,3 (0,551,0,718)	20,7 (0,606,0,746)	21,7 (0,511,0,700)
Кінцева густина стояння (Кількість рослин)	0,268	156	154 (0,770,0,840)	161 (0,335,0,575)	155 (0,817,0,853)	163 (0,127,0,575)
Дні до цвітіння <sup>f</sup>	0,452	49,0	49,5 (0,261,0,575)	49,4 (0,395,0,611)	48,7 (0,568,0,718)	49,2 (0,668,0,801)

<sup>a</sup>Загальний ефект умов оцінювали з використанням критерію Фішера

<sup>b</sup>Порівняння обприсканих і необприсканих рослин з контролем з використанням критерію Стюдента

<sup>c</sup>Значення Р коректували з використанням способу середньої частки хибних відхилень гіпотези (FDR)

<sup>d</sup>Шкала 0-100 %; (Підрахунок густоти стояння, розділений на кількість посіяного насіння)\*100

<sup>e</sup>Візуальна оцінка по шкалі 1-10; 10 = ріст, еквівалентний нетрансформованим рослинам

<sup>f</sup>Візуальна оцінка по шкалі 0-100 %; 0 % = відсутність пошкоджень

<sup>g</sup>Кількість днів від садіння до цвітіння

Значення Р, виділені напівжирним шрифтом, є значущими (<0,05)

## ПРИКЛАД 17

Отримання агрономічних даних за 2009 рік

- 5 Агрономічне дослідження з використанням об'єкта сої DAS-68416-4 і нетрансгенного контролю (var. Maverick) проводили в 2009 році в 8 місцях, що знаходяться в Арканзас, Айові, Іллінойсі, Індіані, Міссурі і Небрасці. Оцінювали агрономічні показники, включаючи підрахунок густини стояння/популяції, потужність проростка/рослини, висоту рослини частоту захворювань, пошкодження комахами і дні до цвітіння, для дослідження еквівалентності об'єкта сої DAS-68416-4 (з обробками гербіцидами і без них) контролю (таблиця 29).

Таблиця 29

Дані, зібрані в агрономічних дослідженнях і дослідженнях урожайності в 2009 році

Характеристика	Час оцінки	Опис	Реєстровані одиниці	Тест*
Сходи	VC-V2	Підрахунок густоти стояння в 1-метровій секції ряду, розділений на кількість посіяного насіння на метр	%	B
Потужність проростків	V1-V3	Загальна потужність проростків	От 1 (низька) до 10 (висока)	B
Видимі пошкодження	Після обробки V3	Видимі пошкодження через 1 день після обробки гербіцидом в фазу V3	%	S
Видимі пошкодження	Після обробки V3	Видимі пошкодження через 7 днів після обробки гербіцидом в фазу V3	%	S
Видимі пошкодження	Після обробки V3	Видимі пошкодження через 14 днів після обробки гербіцидом в фазу V3	%	S
Дні до цвітіння		Кількість днів от посадки до того, як 50 % рослин досягнуть фази R1	Дні	B
Підрахунок густоти стояння	R2	Кількість рослин в 1-метровій секції ряду		B
Видимі пошкодження	Після обробки R2	Видимі пошкодження через 1 день після обробки гербіцидом в фазу R2	%	S
Видимі пошкодження	Після обробки R2	Видимі пошкодження через 7 днів після обробки гербіцидом в фазу R2	%	S
Видимі пошкодження	Після обробки R2	Видимі пошкодження через 14 днів після обробки гербіцидом в фазу R2	%	S
Частота захворювань	~R6	Позапланове повідомлення про будь-яке захворювання, яке виникло в місцевості	%	B
Пошкодження комахами	~R6	Позапланове повідомлення про будь-яке пошкодження комахами, яке виникло в місцевості	%	B

Дані, зібрані в агрономічних дослідженнях і дослідженнях урожайності в 2009 році

Характеристика	Час оцінки	Опис	Реєстровані одиниці	Тест*
Висота рослин	R8	Кінцева висота рослин на дослідній ділянці в фазу R8	см	B
Достиглість	R8	Кількість днів от посадки до того, як 95 % рослин на дослідній ділянці досягнуть свого достиглого кольору	Дні	B
Вилягання	R8	Ступінь вилягання на дослідній ділянці	Від 1 (відсутність) до 5 (який плоско лежить)	B
Урожайність	R8	Маса насіння, зібраного з дослідної ділянки	бушель/акр	B
Маса 100 насіння	R8	Маса 100 випадково вибраних насінин при збиранні з дослідної ділянки	г	B

\*B - Тестування обприсканих і необприсканих рослин,  
S - тестування тільки обприсканих рослин

Для випробувань використовували рандомізований повноблоковий план. Вхідними елементами даних були об'єкт сої DAS-68416-4, контрольна лінія Maverick і комерційно доступні нетрансгенні лінії сої. Висівали насіння тестованої, контрольної і референсної сої при нормі висіву приблизно 112 насінин на ряд з відстанню між рядами приблизно 30 дюймів (75 см). У кожній місцевості створювали 4 повторювані дослідні ділянки для кожного варіанту експерименту, при цьому кожна дослідна ділянка складалася з 2-25-футовий рядів. Кожну дослідну ділянку сої обмежували 2 рядами нетрансгенної сої (Maverick). Все місце випробувань оточували мінімум 4 рядами (або 10 футами) нетрансгенної сої (Maverick). Для отримання агрономічно прийнятної сільськогосподарської культури здійснювали відповідні практики по контролю комах, бур'янів і захворювань.

Здійснювали обробки гербіцидами для відтворення максимальної відміченої на маркуванні норми внесення, що використовується в комерційній практиці. Варіанти експерименту склалися з необприсканого контролю і обробок гербіцидами 2,4-D, глюфосинатом, 2,4-D/глюфосинатом, що наносяться в конкретні фази росту. Для обробки 2,4-D гербіцид наносили при нормі внесення 1,0 фунт ке/акр (1,120 г ке/га) в фази росту V4 і R2. Для обробок глюфосинатом нанесення здійснювали на рослини в фази росту V4 і V6-R2. Для обробок обома гербіцидами глюфосинат наносили при нормі внесення 0,33 фунта активного інгредієнта/акр (374 г активного інгредієнта/га) і 0,41 фунти активного інгредієнта/акр (454 г активного інгредієнта/га) для нанесення в фази V4 і V6-R2, відповідно. Вхідними елементами даних для обробок обома гербіцидами були об'єкт сої DAS-68416-4 і контролю, включаючи нетрансгенну Maverick. Очікували, що дослідні ділянки з Maverick загинуть після нанесення гербіцидів.

Для агрономічних даних проводили дисперсійний аналіз серед місць польових випробувань з використанням змішаної моделі (SAS версії 8; SAS Institute 1999). Вхідні елементи даних вважали фіксованими ефектами, а місцевість, блок всередині місцевості, місцевість по вхідних елементах даних, і вхідні елементи даних по блоку всередині місцевості позначали як випадкові ефекти. Аналогічно здійснювали аналіз в окремих місцях проведення випробувань з вхідними елементами даних як фіксованими ефектами і блоком і вхідними елементами даних по блоку як випадковими ефектами. Для статистичного аналізу дані округляли. Описували значущі відмінності з 95 % рівнем значущості, і значущість загального ефекту умов оцінювали з використанням критерію Фішера. За допомогою критерію Стюдента здійснювали попарне зіставлення між необприсканим трансгенним об'єктом з AAD-12 (необприсканий), об'єктом з AAD-12, обприсканим глюфосинатом (AAD-12+глюфосинат), об'єктом з AAD-12, обприсканим 2,4-D (AAD-12+2,4-D), і об'єктом з AAD-12, обприсканим глюфосинатом і 2,4-D (AAD-12+2,4-D+глюфосинат), і контролем.



Внаслідок великої кількості зіставлень, здійснюваних в цьому дослідженні, проблемою був ефект множинних порівнянь. Ефект множинних порівнянь є проблемою, коли в одному дослідженні здійснюють велику кількість порівнянь для виявлення несподіваних ефектів. У цих умовах імовірність помилково визначених відмінностей на основі пов'язаних з порівняннями значень  $p$  є дуже високою ( $1-0,95^{\text{кількість порівнянь}}$ ). У цьому дослідженні здійснювали чотири порівняння на аналізований параметр (16 аналізованих типів спостережень для агрономічних даних), що приводять до 64 порівнянь для агрономічних даних. Таким чином, імовірність визначення однієї або декількох помилкових відмінностей на основі нескоригованих значень  $p$  становила 99 % для агрономічних даних ( $1-0,9564$ ).

Проводили аналіз агрономічних даних, зібраних для контролю, необприсканого об'єкта з AAD-12, AAD-12+глуфосинат, AAD-12+2,4-D, і AAD-12+2,4-D+глуфосинат. У випадку аналізу по всій місцевості не спостерігали статистично значущих відмінностей для потужності проростків, кінцевої популяції, потужності рослин/пошкодження (V4, R1), вилягання, частоти захворювань, пошкодження комахами, днів до цвітіння, днів до дозрівання, кількості бобів, кількості насіння, врожайності і висот рослини. У випадку підрахунку густини стояння і ранньої популяції обчислювали значущий двосторонній критерій Стюдента між контролем і AAD-12 + глуфосинат, але це не супроводжувалося значущим загальним ефектом умов або FDR-скоригованим значенням  $p$ . У випадку потужності рослин/пошкодження (R2) обчислювали значущий двосторонній критерій Стюдента і значущий загальний ефект умов між контролем і AAD-12+глуфосинат і AAD-12+2,4-D+глуфосинат, але це не супроводжувалося значущим FDR-скоригованим значенням  $p$ . Середні результати для всіх цих змінних також знаходилися в межах діапазону, що виявляється для референсних тестованих ліній в цьому дослідженні.

#### ПРИКЛАД 18

Трансформація і селекція об'єкта pDAS 1740-278 з AAD-1

Об'єкт pDAS 1740-278 з AAD-1 отримували за допомогою віскер-опосередкованої трансформації лінії кукурудзи Hi-II. Використовуваний спосіб трансформації описують в патентній заявці США № 20090093366. Лінію кукурудзи трансформували з використанням FspI-фрагмента плазмиди pDAS 1740 (фіг. 3), що також позначається як pDAB3812. Ця плазмідна конструкція містить експресуючу касету рослин, що містить RB7 MARv3: промотор убіквітину 1 Zea mays v2//AAD1 v3//PER5 3'UTR Zea mays: RB7 MARv4 транскрипційну одиницю рослин (PTU).

Отримували велику кількість об'єктів. Об'єктам, що вижили і продукують здорову, резистентну до галоксифопу тканину калюсу, присвоювали унікальні коди ідентифікації, що представляють передбачувані трансформовані об'єкти, і їх безперервно переносили на свіже селективне середовище. Рослини піддавали регенерації з тканини, отриманої від кожного унікального об'єкта, і переносили в теплицю.

Брали зразки листя для молекулярного аналізу для підтвердження наявності трансгена AAD-1 за допомогою Саузерн-блотингу, підтвердження меж ДНК і підтвердження супутнього геномного маркера. Позитивні рослини T0 запилювали з використанням інбредних ліній для отримання насіння T1. Рослини T1 об'єкта pDAS 1470-278-9 (DAS-40278-9) піддавали селекції, самозапиленню і охарактеризували протягом п'яти поколінь. У цей же час рослини T1 піддавали зворотному схрещуванню і інтрогресії в елітну ідіоплазму (XHH 13) за допомогою селекції за допомогою маркера протягом декількох поколінь. Цей об'єкт отримували з незалежного трансформованого ізоляту. Об'єкт піддавали селекції з урахуванням його унікальних характеристик, таких як єдина ділянка інсерції, нормальне менделевське розщеплення і стабільна експресія, краща комбінація ефективності, включаючи стійкість до гербіцидів, і агрономічних характеристик при різному генетичному фоні і в багатьох місцевостях з різним кліматом. Додатковий опис, що стосується об'єкта кукурудзи pDAS-1740-278-9, приведений в WO 2011/022469, включеному в даний опис як посилання в повному об'ємі.

#### ПРИКЛАД 19

Обробка гербіцидами і агрономічні дані

Обробки гербіцидами здійснювали з використанням об'єму розчину для обприскування приблизно 20 галонів на акрі (187 л/га).

Ці обробки здійснювали для відтворення максимальної відміченої на маркуванні норми внесення, що використовується в комерційній практиці. Використовували Weedar 64 (026491-0006) в концентрації 39 %, 3,76 фунти ке/галон, 451 г ке/л і Assure II (106155) в концентрації 10,2 %, 0,87 фунти активного інгредієнта/галон, 104 г активного інгредієнта/га.

2,4-D (Weedar 64) наносили у вигляді 3 надмірного нанесення розпиленням на тестовані вхідні елементи даних 4 і 5 (всього 3 фунта ке/акр за сезон). Окреме нанесення здійснювали в передсходовий період і приблизно в фази V4 і V8-V8,5. Для Weedar 64 окремі планові норми

внесення становили 1,0 фунт ке/акр або 1120 г ке/га. Точні норми внесення знаходилися в діапазоні 1096-1231 г ке/акр.

- 5 Квізалофоп (Assure II) наносили у вигляді одного надмірного нанесення розпиленням на тестовані вхідні елементи даних 3 і 5. Час нанесення доводився приблизно на фазу росту V6. Для Assure II планова норма внесення становила 0,0825 фунти активного інгредієнта/акр або 92 г активного інгредієнта/га. Точні норми внесення знаходилися в діапазоні 90,8-103 г активного інгредієнта/га. Агрономічні характеристики реєстрували для всіх тестованих елементів в блоках 2, 3 і 4 в кожній місцевості. У таблиці 30 представлені вимірювані характеристики.

Таблиця 30

## Агрономічні дані для об'єкта кукурудзи pDAS-1740-278-9

Ознака	Час оцінки	Опис даних
Рання популяція	V1 і V4	Кількість пророслих рослин на дослідну ділянку
Потужність проростків	V4	Візуальна оцінка середньої потужності пророслих рослин на дослідну ділянку
Потужність рослин/пошкодження	Приблизно через 1-2 тижні після обробок	Пошкодження внаслідок обробок гербіцидами
Час до колосіння маточкових стовпчиків	Приблизно 50 % колосіння маточкових стовпчиків	Кількість накопичених одиниць кількості тепла з моменту висівання до того, як у 50 % рослин станеться колосіння маточкових стовпчиків
Час до скинення пилка	Приблизно 50 % скинення пилка	Кількість накопичених одиниць кількості тепла з моменту висівання до того, як у 50 % рослин станеться скинення пилка
Життєздатність пилка	приблизно 50 %	Оцінка кольору і форми пилка за період часу
Висота рослини	Приблизно R6	Висота до кінчика султана
Висота качана	Приблизно R6	Висота до основи первинного качана
Виягання стебел	Приблизно R6	Візуальна оцінка процентної частки рослин на дослідній ділянці зі стеблами, зламаними нижче первинного качана
Виягання коріння	Приблизно R6	Візуальна оцінка процентної частки рослин на дослідній ділянці, що нахилиються на 30° або більше в перших ~1/2 метра від поверхні ґрунту
Кінцева популяція	Приблизно R6	Кількість рослин, що залишилися на дослідній ділянці
Дні до дозрівання	Приблизно R6	Кількість накопичених одиниць кількості тепла з моменту висівання до того, як 50 % рослин досягнуть фізіологічної зрілості
Ремонтантність	Приблизно R6	Загальний стан рослин
Частота захворювань	Приблизно R6	Візуальна оцінка частоти хвороб листя
Пошкодження комахами	Приблизно R6	Візуальна оцінка пошкодження комахами

Примітка: Одиниця кількості тепла = ((МАКС. темп. + МІН. темп.)/2) - 50 °F

10

- Проводили аналіз агрономічних даних, зібраних для контролю, необприсканого об'єкта з aad-1, aad-1+2,4-D, aad-1+квізалофоп, і aad-1+обидва гербіциди. У випадку аналізу по всій місцевості не спостерігали статистично значущих відмінностей для значень ранньої популяції (V1 і V4), потужності, кінцевої популяції, пошкоджень сільськогосподарської культури, часу до колосіння маточкових стовпчиків, часу до скинення пилка, виягання стебел, виягання коріння, частоти захворювань, пошкодження комахами, днів до дозрівання, висоти рослини і життєздатності пилка (форми і кольори) в зведеному аналізі по місцевості. У випадку ремонтантності і висоти качана обчислювали значущий двосторонній критерій Стюдента між контролем і об'єктом з aad-1+квізалофоп, але це не супроводжувалося значущим загальним ефектом умов або значеннями  $p$ , скоригованими по середній частці помилкових відхилень гіпотези (FDR) (таблиця 31).
- 15
- 20

Таблиця 31

Результати зведеного аналізу агрономічних характеристик по місцевостях для об'єкта кукурудзи DAS-40278-9 з aad-1 (обприсканого і необприсканого) і контролю

Аналізований параметр	Загальний ефект умов ( $p > F$ ) <sup>a</sup>	Контроль	Необприскані (Значення $P^b$ скоригов. $P$ ) <sup>c</sup>	Обприскані квізалофом (Значення $P$ скоригов. $P$ )	Обприскані 2,4-D (Значення $P$ скоригов. $P$ )	Обприскані обома (Значення $P$ скоригов. $P$ )
Рання популяція V1 (кількість рослин)	(0,351)	42,8	41,3 (0,303, 0,819)	41,7 (0,443, 0,819)	41,9 (0,556, 0,819)	44,1 (0,393, 0,819)
Рання популяція V4 (кількість рослин)	(0,768)	43,1	43,3 (0,883, 0,984)	43,7 (0,687, 0,863)	44,3 (0,423, 0,819)	44,8 (0,263, 0,819)
Потужність проростків <sup>d</sup>	(0,308)	7,69	7,39 (0,197, 0,819)	7,36 (0,161, 0,819)	7,58 (0,633, 0,819)	7,78 (0,729, 0,889)
Кінцева популяція (кількість рослин)	(0,873)	40,1	39,6 (0,747, 0,889)	39,7 (0,802, 0,924)	39,9 (0,943, 1,00)	41,1 (0,521, 0,819)
Пошкодження сільськогосподарської культури - 1-а обробка <sup>e</sup>	NAI	0	0	0	0	0
Пошкодження сільськогосподарської культури - 2-а обробка <sup>e</sup>	(0,431)	0	0 (1,00, 1,00)	0 (1,00, 1,00)	0 (1,00, 1,00)	0,28 (0,130, 0,819)
Пошкодження сільськогосподарської культури - 3-я обробка <sup>e</sup>	NA	0	0	0	0	0
Пошкодження сільськогосподарської культури - 4-а обробка <sup>e</sup>	NA	0	0	0	0	0
Час до колосіння маточкових стовпчиків (одиниці кількості тепла) <sup>f</sup>	(0,294)	1291	1291 (0,996, 1,00)	1293 (0,781, 0,917)	1304 (0,088, 0,819)	1300 (0,224, 0,819)
Час до скинення пилка (одиниці кількості тепла) <sup>f</sup>	(0,331)	1336	1331 (0,564, 0,819)	1342 (0,480, 0,819)	1347 (0,245, 0,819)	1347 (0,245, 0,819)
Форма пилка 0 хвилин (%) <sup>g</sup>	(0,872)	10,9	10,9 (0,931, 1,00)	11,3 (0,546, 0,819)	11,4 (0,439, 0,819)	11,3 (0,605, 0,819)
Форма пилка 30 хвилин (%)	(0,486)	49,2	50,8 (0,618, 0,819)	46,4 (0,409, 0,819)	48,1 (0,739, 0,889)	51,9 (0,409, 0,819)
Форма пилка 60 хвилин (%)	(0,724)	74,4	74,7 (0,809, 0,924)	73,6 (0,470, 0,819)	73,9 (0,629, 0,819)	75,0 (0,629, 0,819)
Форма пилка 120 хвилин (%)	(0,816)	82,6	82,6 (1,00, 1,00)	82,6 (1,00, 1,00)	82,6 (1,00, 1,00)	82,5 (0,337, 0,819)
Колір пилка 30 хвилин (%) <sup>h</sup>	(0,524)	51,9	52,5 (0,850, 0,960)	48,9 (0,306, 0,819)	50,3 (0,573, 0,819)	53,6 (0,573, 0,819)
Колір пилка 60 хвилин (%)	(0,332)	75,3	75,9 (0,612, 0,819)	74,2 (0,315, 0,819)	74,2 (0,315, 0,819)	75,9 (0,612, 0,819)
Колір пилка 120 хвилин (%)	NA	84,0	84,0	84,0	84,0	84,0
Вилигання стебел (%)	(0,261)	5,11	5,22 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)
Вилигання коріння (%)	(0,431)	0,44	0,17 (0,457, 0,819)	0,72 (0,457, 0,819)	0,17 (0,457, 0,819)	0,11 (0,373, 0,819)
Ремонтантність <sup>i</sup>	(0,260)	4,67	4,28 (0,250, 0,819)	3,92 (0,034m, 0,819)	4,17 (0,144, 0,819)	4,11 (0,106, 0,819)
Частота захворювань <sup>j</sup>	(0,741)	6,42	6,22 (0,383, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)
Пошкодження комахами <sup>k</sup>	(0,627)	7,67	7,78 (0,500, 0,819)	7,78 (0,500, 0,819)	7,72 (0,736, 0,889)	7,56 (0,500, 0,819)
Дні до дозрівання (одиниці кількості тепла) <sup>f</sup>	(0,487)	2411	2413 (0,558, 0,819)	2415 (0,302, 0,819)	2416 (0,185, 0,819)	2417 (0,104, 0,819)
Висота рослин (см)	(0,676)	294	290 (0,206, 0,819)	290 (0,109, 0,819)	291 (0,350, 0,819)	291 (0,286, 0,819)
Висота качана (см)	(0,089)	124	120 (0,089, 0,819)	118 (0,018m, 0,786)	121 (0,214, 0,819)	118 (0,016m, 0,186)

<sup>a</sup>Загальний ефект умов оцінювали з використанням критерію Фішера

<sup>b</sup>Порівняння обприсканих і необприсканих об'єктів з контролем з використанням критерію Стьюдента

<sup>c</sup>Значення P, скориговані з використанням способу середньої частки помилкових відхилень гіпотези (FDR)

<sup>d</sup>Візуальна оцінка по шкалі 1-9; 9 = високі рослини з великим грубим листям

<sup>e</sup>Шкала 0-100 %; при цьому 0 = відсутність пошкоджень і 100 = загинула рослина

<sup>f</sup>Кількість одиниць кількості тепла, накопичених з часу посадки

<sup>g</sup>Шкала 0-100 %; з % пилових зерен зі зруйнованими оболонками

<sup>h</sup>Шкала 0-100 %; з % пилових зерен з яскравим жовтим забарвленням

<sup>i</sup>Візуальна оцінка по шкалі 1-9, де 1 - відсутність видимої зеленої тканини

<sup>j</sup>Візуальна оцінка по шкалі 1-9, де 1 - погана резистентність до захворювань

<sup>k</sup>Візуальна оцінка по шкалі 1-9, де 1 - погана резистентність до комах

<sup>l</sup>NA = статистичний аналіз не здійснювали внаслідок відсутності варіабельності серед паралелей або обробок

<sup>m</sup>Статистичні відмінності, на які вказує значення  $P < 0,05$

## ПРИКЛАД 20

### Додаткові агрономічні випробування

Агрономічні характеристики лінії кукурудзи 40278 в порівнянні з майже ізогенною лінією кукурудзи оцінювали в різних умовах навколишнього середовища. Варіанти експериментів включали 4 генетично відмінні гібриди і відповідні їм майже ізогенні контрольні гібриди, що тестуються усього в 21 місцевості.

Чотири тестовані гібриди були гібридами з дозріванням від середнього до пізнього в діапазоні від 99 до 113 днів відносного дозрівання. У експерименті А тестували об'єкт DAS-40278-9 з генетичним фоном інбредної лінії C × конверсії BC3S1. Цей гібрид має відносно дозрівання 109 днів, і його тестували в 16 місцевостях (Таблиця 32). У експерименті В тестували гібрид з фоном інбредної лінії E × конверсії BC3S1, гібрид з відносним дозріванням 113 днів. Цей гібрид тестували в 14 місцевостях з використанням небагато відмінного набору місцевостей, ніж в експерименті А. В експериментах С і D тестували гібриди з фоном конверсії BC2S1 × інбредної лінії D і конверсії BC2S1 × інбредної лінії F, відповідно. Обидва ці гібриди мають відносно дозрівання 99 днів, і їх тестували в 10 однакових місцевостях.

Для кожного випробування використовували рандомізований повноблоковий план з двома повтореннями на місцевість і двоядними дослідними ділянками. Довжина ряду становила 20 футів, і кожний ряд висівали при 34 насіннях на ряд. При проведенні випробувань використовували стандартну регіональну агротехніку.

Дані збирали і аналізували за вісьма агрономічними характеристиками; висоті рослини, висоті качана, вилягання пагонів, вилягання коріння, кінцевій популяції, вологості зерна, тестовій масі і врожайності. Параметри висота рослини і висота качана представляють інформацію про зовнішній вигляд гібридів. Агрономічні характеристики процент вилягання стебел і вилягання коріння визначають збираність урожаю гібрида. За допомогою підрахунку кінцевої популяції вимірюють якість насіння і сезонні умови вирощування, що впливає на урожай. За допомогою процента вологості зерна при зборі визначають дозрівання гібрида, і за допомогою врожайності (бушелі/акр, скориговані по вологості) і тестової маси (маса в фунтах на бушель кукурудзи, скоригований по 15,5 % вологості) описують репродуктивну здатність гібрида.

Проводили дисперсійний аналіз по місцях польових випробувань з використанням лінійної моделі. Вхідний елемент даних і місцевість включали в модель як фіксовані ефекти. Вивчали змішані моделі, що включають місцевість і місцевість по вхідному елементу даних як випадкові ефекти, але місцевість по вхідному елементу даних пояснювала лише невелику частину дисперсії і її компонента дисперсії часто не відрізнялася значуще від нуля. У випадку вилягання стебел і коріння використовували логарифмічне перетворення для стабілізації дисперсії, однак середні значення і діапазони записували по початковій шкалі. Описували значущі відмінності з 95 % рівнем значущості. Значущість загального ефекту умов оцінювали з використанням критерію Стьюдента.

Результати цих досліджень агрономічних характеристик можна знайти в таблиці 32. Не спостерігали статистично значущих відмінностей для будь-якого з чотирьох гібридів 40278 в порівнянні з ізогенними контрольними лініями (при  $p < 0,05$ ) для параметрів висоти качана, вилягання стебел, вилягання коріння, вологості зерна, тестової маси і врожайності. Підрахунок

- кінцевої популяції і висота рослини були статистично значущими в експериментах А і В, відповідно, але не виявляли аналогічних відмінностей при порівняннях з іншими тестованими гібридами 40278. Деякі з коливань, що спостерігаються, можуть бути результатом низького рівня генетичної мінливості, що залишилися після зворотного схрещування об'єкта DAS-40278-9 в елітні інбредні лінії. Загальний діапазон значень всіх вимірюваних параметрів знаходиться в межах діапазону значень, що отримується для загальноприйнятих гібридів кукурудзи, і не приводить до висновку про підвищену засміченість бур'янами. На закінчення, агрономічні дані свідчать про те, що кукурудза 40278 біологічно еквівалентна загальноприйнятій кукурудзі.

Таблиця 32

Аналіз агрономічних характеристик

Експеримент А					
Параметр (одиниці)	Варіант експерименту	Середнє	Діапазон		Значення р
			Мін.	Макс.	
Висота рослин (дюйми)	AAD-1	96,31	94,00	99,00	0,6174
	Контроль	95,41	95,00	98,00	
Висота качана (дюйми)	AAD-1	41,08	30,00	48,00	0,4538
	Контроль	44,42	40,00	47,00	
Виліягання стебел (%)	AAD-1	3,64	0,00	27,70	0,2020
	Контроль	2,49	0,00	28,57	
Виліягання коріння (%)	AAD-1	1,00	0,00	7,81	0,7658
	Контроль	0,89	0,00	28,33	
Кінцева популяція (рослини/акр в тис.)	AAD-1	31,06	27,00	36,00	0,0230
	Контроль	32,17	27,00	36,00	
Вологість зерна (%)	AAD-1	22,10	14,32	27,80	0,5132
	Контроль	21,84	14,52	31,00	
Тестова маса (фунт/бушель)	AAD-1	54,94	51,10	56,80	0,4123
	Контроль	54,66	51,00	56,80	
Урожайність (бушелі/акр)	AAD-1	193,50	138,85	229,38	0,9712
	Контроль	187,05	99,87	256,72	
Експеримент В					
Параметр (одиниці)	Варіант експерименту	Середнє	Діапазон		Значення р
			Мін.	Макс.	
Висота рослин (дюйми)	AAD-1	106,92	104,00	108,00	0,0178
	Контроль	100,79	95,00	104,00	
Висота качана (дюйми)	AAD-1	51,75	49,00	50,00	0,1552
	Контроль	45,63	38,00	50,00	
Виліягання стебел (%)	AAD-1	1,24	0,00	15,07	0,1513
	Контроль	0,72	0,00	22,22	
Виліягання коріння (%)	AAD-1	0,64	0,00	6,15	0,2498
	Контроль	0,40	0,00	9,09	
Кінцева популяція (рослини/акр в тис.)	AAD-1	31,30	26,00	37,00	0,4001
	Контроль	30,98	25,00	35,00	
Вологість зерна (%)	AAD-1	23,71	14,34	28,70	0,9869
	Контроль	23,72	13,39	31,10	
Тестова маса (фунт/бушель)	AAD-1	56,96	50,90	59,50	0,2796
	Контроль	56,67	52,00	60,10	
Урожайність (бушелі/акр)	AAD-1	200,08	102,32	258,36	0,2031
	Контроль	205,41	95,35	259,03	

Таблиця 32

## Аналіз агрономічних характеристик

Експеримент С					
Параметр (одиниці)	Варіант експерименту	Середнє	Діапазон		Значення р
			Мін.	Макс.	
Висота рослин (дюйми)	AAD-1	95,92	94,00	96,00	0,1262
	Контроль	90,92	90,00	90,00	
Висота качана (дюйми)	AAD-1	47,75	41,00	50,00	0,4630
	Контроль	43,75	37,00	46,00	
Вилягання стебел (%)	AAD-1	6,74	0,00	27,47	0,4964
	Контроль	5,46	0,00	28,12	
Вилягання коріння (%)	AAD-1	0,3512	0,00	7,58	0,8783
	Контроль	0,3077	0,00	33,33	
Кінцева популяція (рослини/акр в тис.)	AAD-1	32,78	29,00	36,00	0,0543
	Контроль	31,68	24,00	35,00	
Вологість зерна (%)	AAD-1	19,09	13,33	25,90	0,5706
	Контроль	19,36	13,66	26,50	
Тестова маса (фунт/бушель)	AAD-1	54,62	42,10	58,80	0,1715
	Контроль	55,14	52,80	58,40	
Урожайність (бушелі/акр)	AAD-1	192,48	135,96	243,89	0,2218
	Контроль	200,35	129,02	285,58	
Експеримент D					
Параметр (одиниці)	Варіант експерименту	Середнє	Діапазон		Значення р
			Мін.	Макс.	
Вилягання стебел (%)	AAD-1	7,29	0,00	9,26	0,4364
	Контроль	4,17	0,00	39,06	
Кінцева популяція (рослини/акр в тис.)	AAD-1	29,93	27,00	34,00	0,0571
	Контроль	31,86	29,00	35,00	
Вологість зерна (%)	AAD-1	18,74	19,40	24,40	0,4716
	Контроль	19,32	13,35	25,70	
Тестова маса (фунт/бушель)	AAD-1	56,59	54,80	58,30	0,0992
	Контроль	55,50	52,70	57,40	
Урожайність (бушелі/акр)	AAD-1	203,55	196,51	240,17	0,7370
	Контроль	199,82	118,56	264,11	

Агрономічні характеристики гібридної кукурудзи, що містить об'єкт DAS-40278-9, в порівнянні з майже ізогенною лінією кукурудза збирали з множини місць польових випробувань в різних географічних областях протягом періоду вегетації. Результати для гібридних ліній кукурудзи, що містять об'єкт DAS-40278-9, в порівнянні з рослинами без вставки представлені в таблиці 33.

"Name" - "Назва", "Hybrid corn containing event DAS-40278-9" - "Гібридна кукурудза, що містить об'єкт DAS-40278-9", "Control hybrid corn" - "Контрольна гібридна кукурудза", "Yield" - "Врожайність", "Grain moisture" - "Вологість зерна", "Final population (plants/acre in 1000s)" - "Кінцева популяція (рослини/акр в тис.)".

Таблиця 33

Дані про врожайність, процент вологості зерна і кінцеву популяцію для гібридної кукурудзи, що містить об'єкт DAS-40278-9, в порівнянні з майже ізогенною контрольною лінією

Назва	Врожайність	Вологість зерна (%)	Кінцева популяція (рослини/акр в тис.)
Гібридна кукурудза, що містить об'єкт DAS-40278-9	218,1	21,59	31,69
Контрольна гібридна кукурудза	217,4	21,91	30,42

Агрономічні характеристики гібридних ліній кукурудзи, що містять об'єкт DAS-40278-9, і рослин без вставки, обприсканих гербіцидами квізалофопом (280 г ке/га) в фазі росту V3 і 2,4-D (2,240 г ке/га) в фазі росту V6, представлені в таблиці 34.

Таблиця 34

Агрономічні дані для об'єкта DAS 40278-9 в порівнянні з майже ізогенною контрольною лінією

Випробування	Урожайність	Вологість зерна (%)	Вилягання стебел (%)	Вилягання коріння (%)	Кінцева популяція (рослини/акр, приведена в тис.)
Випробування з обприскуванням					
Гібридна кукурудза №1 DAS-40278-9	214,9	23,4	0,61	2,19	30
Контрольна гібридна кукурудза №1	177,9	23,46	0,97	36,32	28,36
LSD (0,5)	13,3	1,107	0,89	10,7	1,1
Без обприскування					
Гібридна кукурудза №1 DAS-40278-9	219,6	22,3	0,95	1,78	30,8
Контрольна гібридна кукурудза №1	220,3	22,51	0,54	1,52	30,55
LSD (0,5)	6,9	0,358	0,98	1,65	0,7
Випробування з обприскуванням					
Гібридна кукурудза №2 DAS-40278-9	198,6	26,76	0,38	2,08	29,29
Контрольна гібридна кукурудза №2	172,3	23,76	1,5	39,16	28,86
LSD (0,5)	13,3	1,107	0,89	10,7	1,1
Без обприскування					
Гібридна кукурудза №2 DAS-40278-9	207,8	24,34	0,22	0,59	31
Контрольна гібридна кукурудза №2	206,2	24,88	0,35	0,12	30,94
LSD (0,5)	8,0	0,645	0,55	1,79	0,9

5

## ПРИКЛАД 21

2,4-D підвищує зростання резистентної до 2,4-D сої

Трансгенна соя з трансгеном AAD-12 забезпечує захист рослин сої, в той час як бур'яни знищують нанесенням 2,4-D. Несподівано спостерігали, що 2,4-D також підвищує зростання стійкої до 2,4-D сої. Це підвищене зростання приводить до підвищення висоти рослин і/або врожайності обприсканих дослідних ділянок в порівнянні з необприсканими дослідними ділянками.

Підвищення зростання рослин і/або врожайності, що є результатом обробки 2,4-D, описують для рослин сої, генетично сконструйованих стійкими до 2,4-D. Випробування проводили у множині місцевостей, що покривають область вирощування сої в Північній Америці. Вхідні елементи даних включали елітні лінії, в які інтрогресували об'єкт DAS-68416-4 (що зумовлює стійкість до 2,4-D). Варіанти експериментів склалися з необприсканих рослин і рослин, обприсканих 2,4-D в фазах росту V3 і R2. Дослідні ділянки досліджували на різні агрономічні характеристики протягом всього сезону, включаючи висоту рослини і урожай зерна. Бур'яни контролювали протягом всього сезону на обприсканих і необприсканих дослідних ділянках для усунення будь-якого конкурентного ефекту. На закінчення випробування при аналізі даних спостерігали значуще підвищення висоти рослин і врожайності для тих вхідних елементів даних, які обприскували 2,4-D, в порівнянні з необприсканими. Підвищення врожайності є додатковою перевагою контролю бур'янів, здійснюваного за допомогою 2,4-D відносно резистентної до 2,4-D сої.

Польові випробування починали в 2011 році для порівняння агрономічних характеристик об'єкта сої DAS-68416-4 (міжнародна патентна заявка № 2011/066384), обприсканого 2,4-D, з агрономічними характеристиками необприсканого об'єкта сої DAS-68416-4. Польові

випробування включали вхідні елементи даних 4 елітних ліній сої, в які інтрогресували об'єкт сої DAS-68416-4, і відповідні ізогенні лінії сої без вставок з 4 елітних ліній сої, що не містять об'єкт сої DAS-68416-4. Випробування проводили в різних географічних місцевостях (всього 10 місцевостей). Експеримент здійснювали у вигляді модифікованої розщепленої ділянки з двома повтореннями на місцевість. Цілі дослідні ділянки були варіантами експерименту, а підділянки були вхідними елементами даних. Кожна дослідна ділянка складалася з двох рядів довжиною 12,5 футів, посаджених з відстанню 30 дюймів. Обприскувані дослідні ділянки обробляли 2,4-D (1120 г ке/га), що наноситься в фазі росту V3 і R2. Протягом всього сезону польові дослідні ділянки підтримували відповідно до загальноприйнятої агротехніки і очищали від бур'янів.

Для визначення того, як обробка 2,4-D впливає на агрономічні характеристики сої, вимірювали різні агрономічні характеристики рослин сої. Тестовані агрономічні характеристики і фази росту на момент збору даних представлені в таблиці 35.

Таблиця 35

Список агрономічних характеристик, які вимірюються в дослідженнях урожаю 2011 року для порівняння обприсканого 2,4-D і необприсканого об'єкта сої DAS-68416-4

Вимірювана характеристика	Фаза росту на момент вимірювання
1. Проростання: Підрахунок густоти стояння (вказаний вище), розділений на кількість насінин, посіяних на 1-метрову секцію, помножений на 100.	Обчислюють на основі раннього підрахунку густоти стояння
2. Потужність проростків: Процент потужності, де 0 % являє собою дослідну ділянку з усіма рослинами, які загинули, а 100 % являє собою дослідні ділянки, де рослини виглядають дуже здоровими.	V1-V3
3. Дні до цвітіння: Дні з моменту посадки до того, як 50 % рослин на дослідній ділянці починають цвісти.	R1
4. Підрахунок густоти стояння в R2: Кількість рослин в типовій 1-метровій секції ряду в фазі росту R2.	R2
5. Частота захворювань: Тяжкість захворювань на дослідній ділянці, яка оцінюється по шкалі 0-100 %.	R6
6. Пошкодження комахами: Процентна частка тканини рослин на дослідній ділянці, пошкодженій комахами.	R6
7. Висота рослини: Середня висота рослин в сантиметрах на кожній дослідній ділянці, вимірювана від поверхні ґрунту до верхівки після опадання листя.	R8
8. Вилягання: Процент вилягання в момент збирання урожаю, де 0 % = відсутність вилягання і 100 % = всі рослини на дослідній ділянці лежать на землі.	R8
9. Дні до дозрівання. Дні з моменту посадки до того, як 95 % бобів на дослідній ділянці досягнуть кольору, відповідного своєму висушеному стану.	R8
10. Розтріскування: Процентна частка бобів, які розкрилися, на дослідну ділянку.	R8
11. Урожайність: Бушелі на акр, скориговані по 13 % вологості.	R8
12. Маса 100 насінин: Для кожної дослідної ділянки вибирають 100 насінин і записують їх масу в грамах.	R8

У кінці сезону вирощування сої об'єднували дані з всіх місцевостей і здійснювали аналіз по місцевостях. Аналіз даних здійснювали з використанням JMP® Pro 9.0.3 (SAS, Cary, NC). Середні значення, отримані при аналізі методом найменших квадратів, представлені в таблиці 28. Обробка 2,4-D об'єкта сої DAS-68416-4, що містить трансген AAD-12, приводила до кондиційного ефекту підвищення зростання. Підвищене зростання приводило до значно більш високої врожайності і висоти рослин, що вимірюється на польових дослідних ділянках, обприсканих 2,4-D, в порівнянні з польовими дослідними ділянками, необприсканими 2,4-D. Ці підвищення були очевидними, коли дані аналізували сукупно по всіх місцевостях. На відміну від цього, підвищена врожайність об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканого 2,4-D, знижувалася при аналізі взаємодії місцевість-варіант експерименту. Середня висота рослин і врожайність підвищувалися приблизно на 5 % при обробці 2,4-D (таблиця 36).



Таблиця 36

Середні значення, отримані методом найменших квадратів, в аналізі по місцевостях для порівняння об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканого 2,4-D, з необприсканими рослинами. Рівні, не помічені однією і тією ж буквою, значно відрізняються

Варіанти експерименту	2,4-D при 1120 г ке/га (в фазі росту V3 і R2)	Необприскані
Сходи (%)	77 (A)	74 (A)
Потужність V1-V3 (%)	87 (A)	87 (A)
Дні до цвітіння (Дні з моменту посадки)	44 (A)	44 (A)
Підрахунок густини стояння в R2 (рослини/м)	21 (A)	22 (A)
Частота захворювань в R6 (%)	1 (A)	1 (A)
Пошкодження комахами в R6 (%)	2 (A)	2 (A)
Висота (см)	81 (A)	77 (A)
Дозрівання (Дні з моменту посадки)	109 (A)	109 (A)
Вилягання (%)	10 (A)	8 (B)
Розтріскування (%)	0 (A)	1 (A)
Врожайність (бушелі/акр)	56,4 (A)	53,7 (B)
Маса 100 насіння (г)	14,8 (A)	14,8 (A)

- 5 Як показано в таблиці 37, щонайменше в одній з десяти місцевостей (місцевість № а3) зареєстрували значуще більш високу врожайність для необприсканих рослин об'єкта сої DAS-68416-4 в порівнянні з обприсканими 2,4-D рослинами об'єкта сої DAS-68416-4. При підсумовуванні результатів з всіх місцевостей, обробка 2,4-D об'єкта сої DAS-68416-4, що містить трансген AAD-12, демонструвала кондиційний ефект, що приводить до підвищеного зростання. Наприклад, врожайність рослин об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканих 2,4-D, становила 56,4 бушелів/акр, будучи істотно більшою, ніж врожайність необприсканих рослин об'єкта сої DAS-68416-4, що становить 53,7 бушелів/акр. Аналогічно, висота рослин об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканих 2,4-D, становила 81 см, будучи істотно більшою, ніж висота необприсканих рослин об'єкта сої DAS-68416-4, що становить 77 см.

Таблиця 37

Середні значення урожайності, отримані методом найменших квадратів, в конкретних місцевостях для порівняння об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканого 2,4-D, з необприсканими рослинами. Рівні, не помічені однією і тією ж буквою, значно відрізняються

Номер місцевості	Варіант експерименту	Урожайність (бушелі/акр)		Урожайність %
Місцевість № а1	Обприскані	51	A	121,5
	Необприскані	42	B	100
Місцевість № а2	Обприскані	67	A	115,6
	Необприскані	58	B	100
Місцевість № а3	Обприскані	44	B	88
	Необприскані	50	A	100
Місцевість № а4	Обприскані	68	A	97
	Необприскані	70	A	100
Місцевість № а5	Обприскані	75	A	102,8
	Необприскані	73	A	100
Місцевість № а6	Обприскані	57	A	132,6
	Необприскані	43	B	100
Місцевість № а7	Обприскані	48	A	102,2
	Необприскані	47	A	100
Місцевість № а8	Обприскані	39	A	91
	Необприскані	43	A	100
Місцевість № а9	Обприскані	57	A	101,8
	Необприскані	56	A	100

Таблиця 37

Середні значення урожайності, отримані методом найменших квадратів, в конкретних місцевостях для порівняння об'єкта сої DAS-68416-4, обприсканого 2,4-D, з необприсканими рослинами. Рівні, не помічені однією і тією ж буквою, значно відрізняються

Номер місцевості	Варіант експерименту	Урожайність (бушелі/акр)		Урожайність %
Місцевість № а10	Обприскані	59	A	107,3
	Необприскані	55	A	100
Середнє	Обприскані	-	-	106

## ПРИКЛАД 22

2,4-D підвищує зростання резистентної до 2,4-D сої в комбінації 2,4-D/гліфосат

5 У 2010 році здійснювали аналогічні польові випробування, що і в попередньому прикладі, але з двома обробками 2,4-D в комбінації з гліфосатом. Результати показали, що підвищене зростання резистентної до 2,4-D сої по висоті рослини і/або врожайності обприсканих дослідних ділянок в порівнянні з необприсканими дослідними ділянками є результатом обробки 2,4-D.

10 Спостерігали значущі ефекти умов для ряду вимірюваних параметрів. 2,4-D і гліфосат наносили в фази росту V3 і R2. Випробування проводили в різних географічних місцевостях (усього шість місцевостей). Тестовані агрономічні характеристики і фази росту на момент збору даних представлені в таблиці 30. У випадку обприсканої сої середня висота рослин підвищувалася на 6 %, і середня врожайність підвищувалася на 17 % (таблиця 38). Крім того, у випадку обприсканої сої середня маса насіння підвищувалася на 6 %.

Таблиця 38

Середні значення, отримані методом найменших квадратів, в аналізі по місцевостях для порівняння стійкої до 2,4-D сої, обприсканої 2,4-D і гліфосатом, з необприсканими рослинами. Рівні, не помічені однією і тією ж буквою, значно відрізняються

Варіанти експерименту	2,4-D і гліфосат при 1120 г ке/га (в фазі росту V3 і R2)	Необприскані
Сходи (%)	54 (A)	54 (A)
Потужність V1-V3 (%)	7 (A)	7 (A)
Дні до цвітіння (Дні з моменту посадки)	41 (A)	41 (A)
Підрахунок густини стояння в R2 (рослини/м)	15 (A)	15 (A)
Частота захворювань в R6 (%)	4 (A)	4 (A)
Пошкодження комахами в R6	17 (A)	14 (B)
Висота (см)	109 (A)	103 (B)
Дозрівання (Дні з моменту посадки)	117 (A)	116 (B)
Вилягання (%)	17 (A)	9 (B)
Розтріскування (%)	0 (A)	0 (A)
Врожайність (бушелі/акр)	43.4 (A)	37.0 (B)
Маса 100 насіння (г)	12.2 (A)	11.5 (B)

15

Як показано в таблиці 39, в цьому прикладі також спостерігали коливання по конкретних географічних місцевостях. У випадку обприсканої сої середня врожайність підвищувалася на 21,6 % (таблиця 39).

Таблиця 39

Середні значення урожайності, отримані методом найменших квадратів, в конкретних місцевостях для порівняння стійкої до 2,4-D сої, обприсканої 2,4-D і гліфосатом, з необприсканими рослинами

Номер місцевості	Варіант експерименту	Урожайність (бушелі/акр)		Урожайність %
Місцевість № b1	Обприскані	39	A	162,5
	Необприскані	24	B	100
Місцевість № b2	Обприскані	51	A	104,1
	Необприскані	49	A	100
Місцевість № b3	Обприскані	56	A	155,5
	Необприскані	36	B	100
Місцевість № b4	Обприскані	35	A	106,1
	Необприскані	33	A	100
Місцевість № b5	Обприскані	48	A	104,3
	Необприскані	46	A	100
Місцевість № b6	Обприскані	32	A	97,0
	Необприскані	33	A	100
Середнє	Обприскані	-	-	121,6

## ПРИКЛАД 23

Результати випробувань врожайності для порівняння варіантів експерименту з обприскуванням і без обприскування

Резистентні до 2,4-D трансгенні сільськогосподарські культури, трансформовані з використанням арилоксіалканоатдіоксигенази (AAD), приводили до підвищеної врожайності при обробці стимулюючою кількістю гербіциду, що містить залишок арилоксіалканоату. Об'єкти сої, що містять експресуючу касету гена AAD-12, тестували в повторних випробуваннях врожайності в умовах з обприскуванням і без нього. Проводили одну серію експериментів, що включали сою з раннім дозріванням, адаптовану до північних широт, і іншу серію експериментів, що включали сою з пізнім дозріванням, адаптовану до більш південних широт. У попередніх експериментах мали місце випадки, коли вхідні елементи даних сої, що містить експресуючу касету гена AAD-12, оброблені 2,4-D протягом сезону вирощування, виявляли підвищену врожайність відносно необприсканих контролів.

Для випробувань використовували модифікований план з розщепленими ділянками з 2 повтореннями. Кожна дослідна ділянка була шириною в 2 ряди з відстанню між рядами 30 дюймів і довжиною 12,5 футів. Створювали прохід шириною від 2,5 до 3 футів між дослідними ділянками, розташованими безперервним ланцюгом, для забезпечення руху протягом випробування протягом сезону. Обприскувані блоки обприскували послідовно (двічі) протягом сезону вирощування 2,4-D-холіном + гліфосатом (преміксом) при 2185 г ке/га + AMS при 2 % мас.

Таблиця 40

Список аналізованих місцевостей для випробувань врожайності з порівнянням варіантів експериментів з обприскуванням і без нього

Місцевість	Випробування
Atlantic, IA	з раннім дозріванням
Brookings, SD	з раннім дозріванням
Cherry Grove, MN	з раннім дозріванням
Deerfield, MI	з раннім дозріванням
Kirklin, IN	з раннім дозріванням
Otterbein, IN	з раннім дозріванням
Richland, IA	з раннім дозріванням
Wyoming, IL	з раннім дозріванням
Atlantic, IA	з пізнім дозріванням

Таблиця 40

Список аналізованих місцевостей для випробувань врожайності з порівнянням варіантів експериментів з обприскуванням і без нього

Місцевість	Випробування
Carlyle, IL	з пізнім дозріванням
Fisk, MO	з пізнім дозріванням
Otterbein, IN	з пізнім дозріванням
Seymour, IL	з пізнім дозріванням
Stewardson, IL	з пізнім дозріванням
Sycamore, GA	з пізнім дозріванням
Tallassee, AL	з пізнім дозріванням

Першу обробку здійснювали в фазу росту V3, а другу обробку - в фазу росту R2. Експериментальні і контрольні дослідні ділянки польових випробувань очищали від бур'янів протягом всього сезону з використанням загальноприйнятих гербіцидів або ручного прополювання. Збирали дані про сходах, потужності проростків, пошкодженнях сільськогосподарської культури, даті цвітіння, підрахунку густини стояння в R2, частоті захворювань, пошкодженні комахами, висоті рослин, дати дозрівання, вилягання, розтріскуванні, масі 100 насінин і врожайності. Дані аналізували з використанням JMP® Pro 9.0.3. У таблиці 40 приведені місцевості, використані для кінцевого аналізу. Деякі місцевості, в яких здійснювали посадку, не включали в аналіз по причині варіабельності по дослідній ділянці.

Аналіз по місцевостях здійснювали для випробувань сої з раннім дозріванням і пізнім дозріванням. У таблицях 41 і 42 представлений дисперсійний аналіз врожайності для випробувань сої з раннім дозріванням і пізнім дозріванням, відповідно.

Таблиця 41

Дисперсійний аналіз врожайності по місцевостях (8 місцевостей) у випробуваннях з порівнянням обприскованої і необприскованої сої з раннім дозріванням

Початкові дані	N параметрів	DF	DFDen	Значення критерію Фішера	Значення P>F
Назва	8	8	57,030	3,780	0,001
Ознака	1	1	5,989	12,409	0,013
Назва*Ознака	8	8	183,000	0,530	0,833

У випробуваннях сої і з раннім, і з пізнім дозріванням спостерігали значущий ефект назви (P=0,05). Це було очікуваним, оскільки кожна елітна лінія сої, в яку інтродукували об'єкт, мала різний генетичний фон.

Таблиця 42

Дисперсійний аналіз врожайності по місцевостях (8 місцевостей) у випробуваннях з порівнянням обприскованої і необприскованої сої з пізнім дозріванням

Вихідні дані	N параметрів	DF	DFDen	Значення критерію Фішера	Значення P>F
Назва	11	11	76,020	3,096	0,002
Ознака	1	1	7,039	3,050	0,124
Назва*Ознака	11	11	257,700	0,499	0,903

Визначали значущий ефект умов експерименту у випадку випробування сої з раннім дозріванням, що свідчить про те, що варіанти експерименту з обприскуванням і без нього відрізняються по врожайності. У випадку випробування сої з пізнім дозріванням не спостерігали значущого ефекту умов експерименту, що свідчить про те, що обприскані і необприскані дослідні ділянки не відрізняються по врожайності.

Таблиця 43

Таблиця середніх значень врожайності, отриманих методом найменших квадратів,  
у випробуванні врожайності сої з раннім дозріванням

Номер варіанту експерименту	Врожайність (бушелі/акр)	
289-1(НОМО), Необрисаний	42,0	A
289-1(НОМО), Обприсаний	46,0	A
289-2(НОМО), Необрисаний	41,8	A
289-2(НОМО), Обприсаний	45,7	A
7471638-26(НОМО), Необрисаний	38,2	B
7471638-26(НОМО), Обприсаний	42,9	A
76983-1(НОМО), Необрисаний	38,4	B
76983-1(НОМО), Обприсаний	42,5	A
76983-2(НОМО), Необрисаний	39,6	A
76983-2(НОМО), Обприсаний	42,9	A
75209(НОМО), Необрисаний	46,4	A
75209(НОМО), Обприсаний	47,6	A
75209[1](НОМО), Необрисаний	48,1	B
75209[1](НОМО), Обприсаний	52,7	A
75357-71(НОМО), Необрисаний	46,2	A
75357-71(НОМО), Обприсаний	49,5	A
99345-31[4](НОМО), Необрисаний	40,1	B
99345-31[4](НОМО), Обприсаний	46,0	A

У випадку випробувань сої і з раннім, і з пізнім дозріванням ефект взаємодії назва-варіант експерименту не був значущим, що свідчить про те, що ефект умов експерименту (або відсутність ефекту) був однаковим для кожного вхідного елемента даних в конкретному випробуванні.

У таблиці 43 представлена середня врожайність для кожної комбінації вхідний елемент даних-варіант експерименту у випробуванні сої з раннім дозріванням, де НОМО означає гомозиготу. Значення, після яких йде одна і та ж буква (в межах вказаного сорту), не відрізняються по критерію Стюдента при  $P=0,05$ . Спостерігали чотири вхідні елементи даних, що виявляють більш високу врожайність при послідовному обприскуванні в V3 і R3 з використанням 2,4-D-холіна + гліфосату (преміксу) при 2185 г ке/га + AMS.

У таблиці 44 представлена середня врожайність для кожної комбінації вхідний елемент даних-варіант експерименту. Значення, після яких йде одна і та ж буква (в межах вказаного сорту) не відрізняються по критерію Стюдента при  $P=0,05$ . Як вказано вище, у випадку випробування сої з пізнім дозріванням не спостерігали значущого ефекту умов експерименту або ефекту варіанту експерименту по вхідному елементу даних, тому множинні порівняння середніх не здійснювали. Буквами в таблиці вказано, що не спостерігали відмінностей між варіантами експерименту з обприскуванням і без нього при тестуванні сої з пізнім дозріванням.

Таблиця 44

Таблиця середніх значень врожайності, отриманих методом найменших квадратів,  
у випробуванні врожайності сої з раннім дозріванням 2012 року

Номер варіанту експерименту	Врожайність (бушелі/акр)	
348-1(НОМО), Необрисаний	54,5	A
348-1(НОМО), Обприсаний	54,7	A
348[3](НОМО), Необрисаний	51,1	A
348[3](НОМО), Обприсаний	54,5	A
4075433-15(НОМО), Необрисаний	59,6	A
4075433-15(НОМО), Обприсаний	60,4	A
75226-1(НОМО), Необрисаний	52,1	A
75226-1(НОМО), Обприсаний	55,2	A
75226-2(НОМО), Необрисаний	51,1	A

75226-2(НОМО), Обприсканий	52,2	A
75505(НОМО), Необрисканий	50,1	A
75505(НОМО), Обприсканий	54,6	A
99753-81(НОМО), Необрисканий	56,1	A
99753-81(НОМО), Обприсканий	55,4	A
75358-72(НОМО), Необрисканий	50,7	A
75358-72(НОМО), Обприсканий	53,8	A
75358-72[1](НОМО), Необрисканий	48,4	A
75358-72[1](НОМО), Обприсканий	50,1	A
99753-75[4](НОМО), Необрисканий	52,1	A
99753-75[4](НОМО), Обприсканий	53,4	A
Контроль-1, необприсканий	49,2	A
Контроль-1, Обприсканий	51,4	A
Контроль-2, необприсканий	49,6	A
Контроль-2, Обприсканий	52,0	A

Результати випробувань врожайності, представлені в цьому прикладі, знов свідчать про те, що в деяких умовах навколишнього середовища у випадку деяких генотипів сої можна спостерігати підвищення врожайності після обробки 2,4-D. У останні два роки таке підвищення врожайності спостерігали у випробуваннях врожайності, що проводяться в районі зростання MG 2.

#### ПРИКЛАД 24

Порівняння сої і кукурудзи

Результати по врожайності в польових випробуваннях сої, що містить трансген AAD-12, свідчать про те, що обробка 2,4-D може підвищувати врожайність сої в конкретних умовах навколишнього середовища для конкретних генотипів сої. Ці результати є несподіваними при порівнянні з трансгенними об'єктами кукурудзи, що містять трансген AAD-1. Врожайність AAD-1-трансгенних рослин кукурудзи не демонструвала стабільного статистично значущого підвищення врожайності після обприскування 2,4-D. Ці AAD-1-трансгенні рослини кукурудзи біологічно еквівалентні загальноприйнятій кукурудзі.

Додаткові польові випробування в різних географічних областях проводили з 2010 по 2012 рік на гібридних лініях кукурудзи. Протягом всьому цих польових випробувань врожайність ліній кукурудзи, обприсканих 2,4-D (2,185 г ке/га і 4,370 г ке/га), порівнювали з необробленими контрольними лініями кукурудзи (наприклад, необприсканими 2,4-D). Результати цих експериментів додатково підтверджують те, що рослини кукурудзи, що містять трансген AAD-1, не приводять до значущого підвищення врожайності внаслідок обприскування 2,4-D. Для порівняння, для деяких генотипів сої показане підвищення врожайності після обробки 2,4-D. Підвищення врожайності, що спостерігається у генотипів сої, що демонструється після обробки 2,4-D, є несподіваним удосконаленням, застосовним для підвищення врожайності сільськогосподарських культур. Описуваний спосіб можна поширити на використання обробки 2,4-D для підвищення врожайності трансгенних сільськогосподарських культур, наприклад, які експресують ген AAD-12.

Хоча викладений вище винахід для ясності розуміння досить детально описували за допомогою ілюстрацій і прикладів, буде очевидно, що конкретні зміни і модифікації можна здійснювати на практиці в об'ємі заявленої формули винаходу.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow AgroSciences LLC  
Hoffman, Thomas  
Cui, Yunxing  
Obourn, Malcolm  
Parkhurst, Dawn  
Wiggins, Barry  
Vercauteren, Michael

<120> СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ВРОЖАЙНОСТІ РЕЗИСТЕНТНИХ ДО 2,4-D  
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР

<130> 72747-US-NP

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 879  
<212> ДНК  
<213> *Delftia acidovorans*

<400> 1  
atgcagacga cgctgcagat tccccccaca ggccgccacc tggcgccac cgtcaccggc 60  
gtgcacctgg ccacgctgga cgacgccggc ttccgccccc tgcacgccgc ctggctgcag 120  
catgcgctgc tgatcttccc cggccagcac ctacgcaacg accagcagat cacttttgcc 180  
aaacgcttcg gcgcgatcga gcgcacggc ggccggcgaca tcgtggccat ctccaatgtc 240  
aaggccgatg gcacgggtgc ccagcacagc cccgccgagt gggacgacat gatgaaggtc 300  
atcgctggca acatggcctg gcatgccgac agcacctaca tgccggtgat ggcgcagggc 360  
gcggtgttct cggccgaagt ggtgcccgca gtggcggggc gcacctgctt cgcgcacatg 420  
cgccgccgct acgacgcgct ggacgaggcc acccgccccc tgggtgcacca gcgctcggcg 480  
cggcattcgc tgggtgtatt gcagagcaag ctggggccatg tgcagcaggc cggctcggcc 540  
tacatcggct acggcatgga caccaccgcc acgcccctgc gcccgctggt caagggtgcat 600  
cccgagaccg gccgcccctc gctgctgacg ggccgccatg cccatgccat cccgggcatg 660  
gacgccgccg aatccgagcg cttcctggaa ggccctggtcg actgggcctg ccaggcgccg 720  
cgggtgcatg cccaccaatg ggccgccggc gacgtggtgg tgtgggacaa ccgctgcctg 780  
ctgcaccgcg ccgagccctg ggatttcaag ctgcccgggg tgatgtggca cagccgcctg 840  
gccggccgcc ccgagaccga ggccgccgcc ctggtgtaa 879

<210> 2  
<211> 292  
<212> PRT  
<213> *Delftia acidovorans*

<400> 2

```

Met Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly Ala
1           5           10           15

Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe Ala
          20           25           30

Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro Gly
          35           40           45

Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe Gly
50           55           60

Ala Ile Glu Arg Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn Val
65           70           75           80

Lys Ala Asp Gly Thr Val Arg Gln His Ser Pro Ala Glu Trp Asp Asp
          85           90           95

Met Met Lys Val Ile Val Gly Asn Met Ala Trp His Ala Asp Ser Thr
          100          105          110

Tyr Met Pro Val Met Ala Gln Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val
          115          120          125

Pro Ala Val Gly Gly Arg Thr Cys Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr
          130          135          140

Asp Ala Leu Asp Glu Ala Thr Arg Ala Leu Val His Gln Arg Ser Ala
145           150           155           160

Arg His Ser Leu Val Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Val Gln Gln
          165          170          175

Ala Gly Ser Ala Tyr Ile Gly Tyr Gly Met Asp Thr Thr Ala Thr Pro
          180          185          190

Leu Arg Pro Leu Val Lys Val His Pro Glu Thr Gly Arg Pro Ser Leu
          195          200          205

Leu Ile Gly Arg His Ala His Ala Ile Pro Gly Met Asp Ala Ala Glu
210           215           220

Ser Glu Arg Phe Leu Glu Gly Leu Val Asp Trp Ala Cys Gln Ala Pro
225           230           235           240

```



Arg Val His Ala His Gln Trp Ala Ala Gly Asp Val Val Val Trp Asp  
245 250 255

Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu Pro  
260 265 270

Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu Gly  
275 280 285

Ala Ala Leu Val  
290

<210> 3  
<211> 882  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Нуклеотидна послідовність AAD-12 (v1), оптимізована для рослин

<400> 3  
atggctcaga ccactctcca aatcacaccc actgggtgcc ccttgggtgc cacagtcact 60  
ggtgttcacc ttgccacact tgacgatgct ggtttcgctg ccctccatgc agcctggctt 120  
caacatgcac tcttgatctt ccctgggcaa cacctcagca atgaccaaca gattaccttt 180  
gctaaacgct ttggagcaat tgagaggatt ggcggagggtg acattgtttgc catatccaat 240  
gtcaaggcag atggcacagt gcgccagcac tctcctgctg agtgggatga catgatgaag 300  
gtcattgtgg gcaacatggc ctggcacgcc gactcaacct acatgccagt catggctcaa 360  
ggagctgtgt tcagcgcaga agttgtccca gcagtgggg gcagaacctg ctttgtctgac 420  
atgagggcag cctacgatgc ccttgatgag gcaaccctg ctcttggtca ccaaaggctct 480  
gctcgtcact cccttggtga ttctcagagc aagttgggac atgtccaaca ggccgggtca 540  
gcctacatag gttatggcat ggacaccact gcaactcctc tcagaccatt ggtcaagggtg 600  
catcctgaga ctggaaggcc cagcctcttg atcgccgcc atgcccatgc catccctggc 660  
atggatgcag ctgaatcaga gcgcttcctt gaaggacttg ttgactgggc ctgccaggct 720  
cccagagtcc atgctcacca atgggctgct ggagatgtgg ttgtgtggga caaccgctgt 780  
ttgctccacc gtgctgagcc ctgggatttc aagttgccac gtgtgatgtg gcactccaga 840  
ctcgtgggac gccagaaaac tgagggtgct gccttggttt ga 882

<210> 4  
<211> 293  
<212> PRT

<213> Delftia acidovorans

<400> 4

```

Met Ala Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly
1           5           10           15

Ala Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe
          20           25           30

Ala Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro
          35           40           45

Gly Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe
50           55           60

Gly Ala Ile Glu Arg Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn
65           70           75           80

Val Lys Ala Asp Gly Thr Val Arg Gln His Ser Pro Ala Glu Trp Asp
          85           90           95

Asp Met Met Lys Val Ile Val Gly Asn Met Ala Trp His Ala Asp Ser
          100          105          110

Thr Tyr Met Pro Val Met Ala Gln Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val
          115          120          125

Val Pro Ala Val Gly Gly Arg Thr Cys Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala
          130          135          140

Tyr Asp Ala Leu Asp Glu Ala Thr Arg Ala Leu Val His Gln Arg Ser
145           150           155           160

Ala Arg His Ser Leu Val Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Val Gln
          165          170          175

Gln Ala Gly Ser Ala Tyr Ile Gly Tyr Gly Met Asp Thr Thr Ala Thr
          180          185          190

Pro Leu Arg Pro Leu Val Lys Val His Pro Glu Thr Gly Arg Pro Ser
          195          200          205

Leu Leu Ile Gly Arg His Ala His Ala Ile Pro Gly Met Asp Ala Ala
210           215           220

```

Glu Ser Glu Arg Phe Leu Glu Gly Leu Val Asp Trp Ala Cys Gln Ala  
225 230 235 240

Pro Arg Val His Ala His Gln Trp Ala Ala Gly Asp Val Val Val Trp  
245 250 255

Asp Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu  
260 265 270

Pro Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu  
275 280 285

Gly Ala Ala Leu Val  
290

<210> 5  
<211> 882  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Нуклеотидна послідовність AAD-12 (v1), оптимізована для  
E.coli

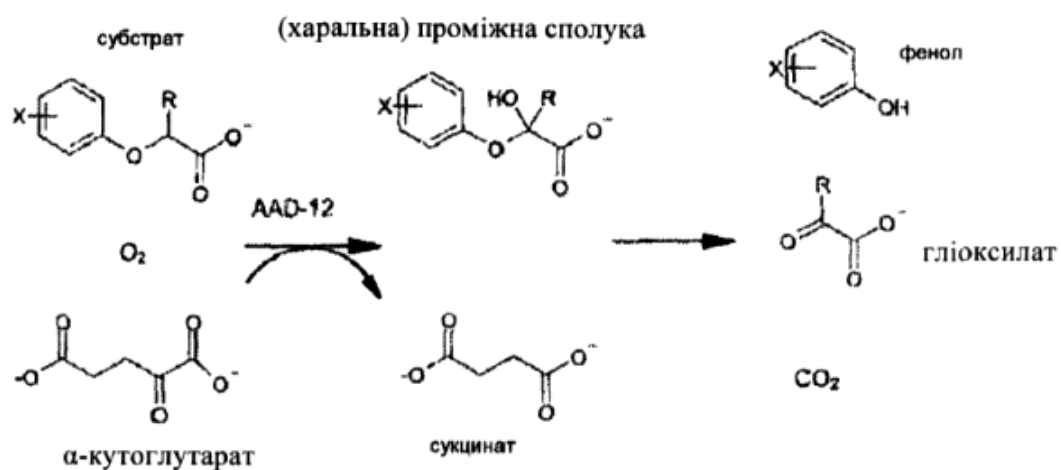
<400> 5  
atggctcaga ctaccctgca gattaccccg actggtgcca ccttgggtgc aaccgttacc 60  
ggcgcttacc tggcgactct ggatgacgca ggtttcgctg cgctgcacgc ggcttggctg 120  
caacatgctc tcttgatttt cccaggtcag cacctgtcca acgaccagca aatcactttt 180  
gcaaaacgct tcggtgcgat cgaacgtatc ggtggcggtg atattgtggc gatctccaac 240  
gtaaaagcgg atggtactgt acgtcagcac agcccgccgg agtgggacga tatgatgaag 300  
gtgatcgtag gcaacatggc atggcatgct gacagcacct acatgccggt tatggcgag 360  
ggtgcgggtt tctctgctga agtggttccg gcagtgggcg gtcgcacctg cttcgcagac 420  
atgcgtgcag cttacgacgc gtagacgaa gctaccgcg cactgggtaca ccagcgctct 480  
gcgcgtcact ctctggtgta ttcccagagc aaactgggcc acgttcagca agcgggctcc 540  
gcatatatcg gctacggtat ggataccact gcgacccgcg tgcgtccgct ggtaaaagtg 600  
catccggaaa ccggccgtcc gtctctcctg atcgccgctc acgctcatgc gattccgggt 660  
atggacgagg cagaatccga gcgtttcctg gaaggtctgg ttgattgggc ttgtcaggcg 720  
ccgcgtgtgc atgctcacca gtgggcagct ggcgacgtgg ttgtatggga taaccgctgc 780  
ctgcttcacc gtgcagaacc gtgggacttt aagctgccac gtgttatgtg gcacagccgt 840  
ctggcaggcc gccagaaaac cgagggcgcg gctctggttt aa 882

<210>	6	
<211>	16	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Прямий праймер M13	
<400>	6	
	gtaaaacgac ggccag	16
<210>	7	
<211>	17	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Зворотний праймер M13	
<400>	7	
	caggaaacag ctagac	17
<210>	8	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Прямий праймер для PTU AAD-12 (v1)	
<400>	8	
	gaacagttag acatggtcta aagg	24
<210>	9	
<211>	27	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Зворотний праймер для PTU AAD-12 (v1)	
<400>	9	
	gctgcaacac tgataaatgc caactgg	27
<210>	10	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Прямий праймер для ПЛР кодуєчої області AAD-12 (v1)	
<400>	10	
	atggctcaga ccaactctcca aa	22

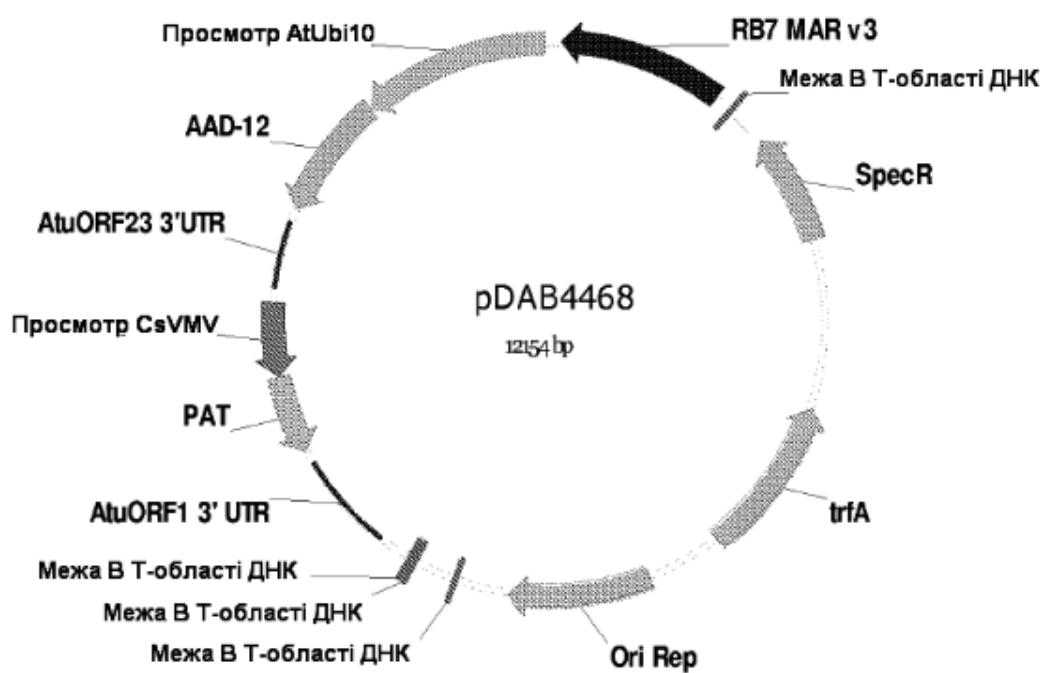
<210> 11  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Зворотний праймер для ПЛР кодуєчої області AAD-12 (v1)  
  
 <400> 11  
 agctgcatcc atgccaggga 20  
  
 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Праймер «sdpacodF» AAD-12 (v1)  
  
 <400> 12  
 atggctcatg ctgccctcag cc 22  
  
 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Праймер «sdpacodR» AAD-12 (v1)  
  
 <400> 13  
 cgggcaggcc taactccacc aa 22  
  
 <210> 14  
 <211> 32  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Праймер «Ncol of Brady»  
  
 <400> 14  
 tataccacat gtcgacgcc atccggcagc tt 32  
  
 <210> 15  
 <211> 32  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Праймер «SacI of Brady»  
  
 <400> 15  
 gagctcctat cactccgccg cctgctgctg ca 32

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

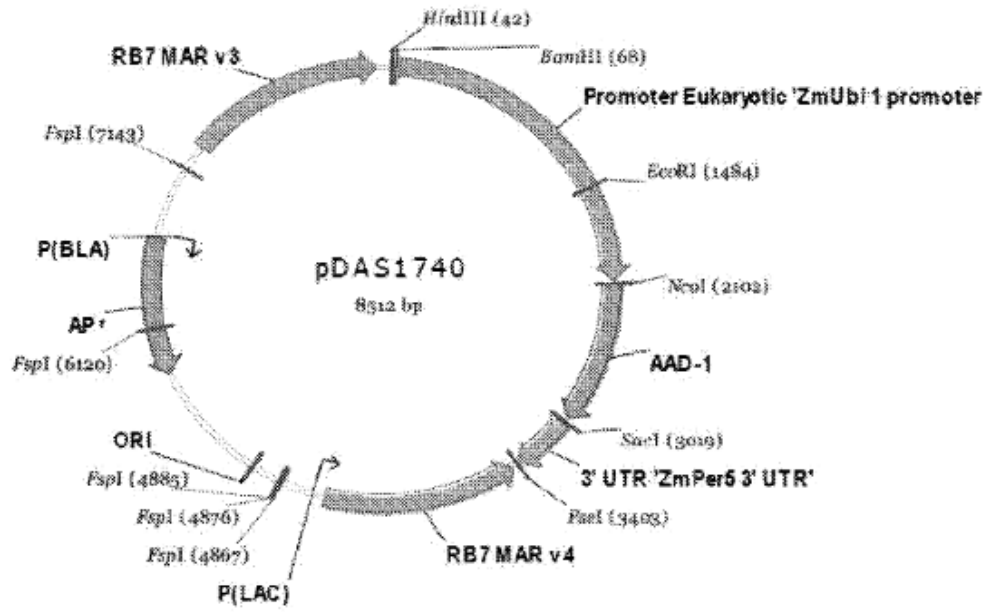
1. Спосіб підвищення врожайності резистентних до 2,4-D рослин сої в порівнянні з необробленими резистентними до 2,4-D рослинами сої, що включає обробку резистентних до 2,4-D рослин сої щонайменше двічі на стадіях росту V3 і R2 гербіцидом, що містить залишок арилоксіалканоату, в кількості від 25 г ке/га до 5000 г ке/га, де резистентні до 2,4-D рослини сої продукують трансгенний білок арилоксіалканоатдіоксигенази (AAD), який має щонайменше 95 % ідентичність послідовності, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 4.
2. Спосіб за п. 1, де гербіцид, що містить залишок арилоксіалканоату, є фенокси-гербіцидом або феноксицетовим гербіцидом.
3. Спосіб за п. 1, де гербіцид, що містить залишок арилоксіалканоату, є 2,4-D.
4. Спосіб за п. 3, де 2,4-D містить 2,4-D-холін або 2,4-D-диметиламін (DMA).
5. Спосіб за п. 1, де резистентні до 2,4-D рослини сої знаходяться в стані стресу.
6. Спосіб за п. 3, де резистентні до 2,4-D рослини сої для контролю бур'янів також обробляють гербіцидом, іншим ніж 2,4-D.
7. Спосіб за п. 6, де гербіцид, інший, ніж 2,4-D, є фосфорним гербіцидом або арилоксифеноксипропіоновим гербіцидом.
8. Спосіб за п. 7, де фосфорний гербіцид містить гліфосат, глюфосинат, їх похідні або їх комбінації.
9. Спосіб за п. 7, де фосфорний гербіцид знаходиться в формі солі амонію, солі ізопропіламонію, ізопропіламінової солі або солі калію.
10. Спосіб за п. 7, де арилоксифеноксипропіоновий гербіцид містить хлоразифоп, феноксапроп, флуазифоп, галоксифоп, квізалофоп, їх похідні або їх комбінації.
11. Спосіб за п. 3, де резистентні до 2,4-D рослини сої обробляють від 100 г ке/га до 2500 г ке/га 2,4-D.
12. Спосіб за п. 1, де гербіцид, що містить залишок арилоксіалканоату, потрапляє в резистентні до 2,4-D рослини сої за допомогою поглинання корінням.
13. Спосіб за п. 7, де фосфорний гербіцид потрапляє в резистентні до 2,4-D рослини сої за допомогою поглинання корінням.
14. Спосіб за п. 7, де арилоксифеноксипропіоновий гербіцид потрапляє в резистентні до 2,4-D рослини сої за допомогою поглинання корінням.
15. Спосіб за п. 1, що додатково включає:
  - (а) трансформацію рослинних клітин молекулою нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує арилоксіалканоатдіоксигеназу (AAD);
  - (b) селекцію трансформованих клітин;
  - (c) регенерацію рослин з трансформованих клітин.
16. Спосіб за п. 15, де молекула нуклеїнової кислоти містить селективний маркер, що не є арилоксіалканоатдіоксигеназою (AAD).
17. Спосіб за п. 16, де селективний маркер є геном фосфінотрицинацетилтрансферази (pat) або геном резистентності до біалафосу (bar).
18. Спосіб за п. 15, де молекула нуклеїнової кислоти містить кодони рослин для збільшеної експресії у рослині.
19. Спосіб за п. 1, де резистентними до 2,4-D рослинами сої є трансгенні рослини, трансформовані полінуклеотидом, що вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 5 і їх комплементів.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фиг. 3

Комп'ютерна верстка Т. Вахричева

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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