



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **348225**

(22) Data zgłoszenia: **22.06.2001**

(51) Int.Cl.
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12P 1/68 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

Opis patentowy
przedrukowano ze względu
na zauważone błędy

(54) **Cząsteczka DNA umożliwiająca identyfikację rośliny kukurydzy tolerującej glifosat, para cząsteczek DNA, sposób wykrywania obecności cząsteczki DNA, cząsteczka DNA, sposób wbudowywania cechy tolerancji na glifosat, zestaw do wykrywania DNA, roślina kukurydzy tolerująca glifosat, transgeniczna komórka roślinna z tolerancją glifosatu, sposób wytwarzania rośliny kukurydzy i sposób hodowli rośliny kukurydzy**

(30) Pierwszeństwo:

22.06.2000,US,60/213,567
13.10.2000,US,60/240,014
13.10.2000,US,60/241,215

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

02.01.2002 BUP 01/02

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.11.2008 WUP 11/08

(73) Uprawniony z patentu:

Monsanto Technology LLC.,St. Louis,US

(72) Twórca(y) wynalazku:

Carl F. Behr,Wildwood,US
Gregory R. Heck,Crystal Lake Park,US
Catherina Hironaka,Pleasanton,US
Jinsong You,Ballwin,US

(74) Pełnomocnik:

Urszula Bartnik,
Rzecznik Patentowy, POLSERVICE,
Kancelaria Rzeczników Patentowych Sp. z o.o.

(57) Wynalazek dostarcza konstrukt DNA, który nadaje tolerancję na glifosat transgenicznej roślinie zbożowej. Dostarcza także m.in. prób do wykrywania obecności przypadku rośliny zbożowej PV-ZMGT32(nk603) w oparciu o sekwencje DNA rekombinowanego konstrukt wstawionego do genomu rośliny zbożowej i flankujące miejsce wstawki sekwencje genomowe.

Opis wynalazku

Niniejszy wynalazek dotyczy cząsteczki DNA umożliwiającej identyfikację rośliny kukurydzy tolerującej glifosat, pary cząsteczek DNA, sposobu wykrywania obecności cząsteczki DNA, cząsteczka DNA, sposobu wbudowywania cechy tolerancji na glifosat, zestaw do wykrywania DNA, rośliny kukurydzy tolerującej glifosat, transgenicznej komórki roślinnej z tolerancją glifosatu, sposobu wytwarzania rośliny kukurydzy i sposobu hodowli rośliny kukurydzy.

Kukurydza jest ważną rośliną uprawną i podstawowym źródłem pożywienia w wielu rejonach świata. W celu poprawienia cech agronomicznych i jakości produktu w stosunku do kukurydzy zastosowane były sposoby biotechnologiczne. Jedną z takich cech agronomicznych jest tolerancja na herbicyd, zwłaszcza tolerancja na herbicyd glifosfatowy. Cechę tą kukurydzy nadawano przez ekspresję transgenu w roślinach kukurydzy (Patent St. Zjedn. Ameryki nr 6,040,497).

Jak wiadomo, obce geny w roślinach wpływają poprzez ich miejsce w chromosomie, być może w związku z strukturą chromatyny (np. heterochromatyny) lub z bliskością transkrypcyjnych elementów regulujących (np. wzmacniaczy) ściśle przylegających do miejsc integracji (Weising i wsp., *Ann. Rev. Genet* 22:421-477, 1988). Z tego powodu, często koniecznym jest zbadanie dużej liczby przypadków w celu identyfikacji przypadku charakteryzującego się optymalną ekspresją wprowadzanego, będącego przedmiotem zainteresowania genu. Na przykład, obserwuje się u roślin i u innych organizmów, że w wielu przypadkach może istnieć duża zmienność poziomów ekspresji wprowadzonych genów. Mogą także istnieć różnice w układach przestrzennych i czasowych, na przykład, różnice we względnej ekspresji transgenu w różnych tkankach roślinnych, które mogą nie odpowiadać wzorom jakie są spodziewane z transkrypcyjnych elementów regulatorowych obecnych we wprowadzonym konstrukcie genowym. Z tego powodu powszechnym jest wytwarzanie od setek do tysięcy różnych przypadków i przeglądanie tych przypadków w celu znalezienia jednego przypadku, posiadającego do celów komercyjnych pożądane poziomy i wzorce ekspresji transgenu. Przypadek, który ma pożądane poziomy lub wzorce ekspresji transgenu jest użyteczny do introgresji transgenu do innego genetycznego tła poprzez płciowy outcrossing stosując konwencjonalne sposoby hodowli. Potomstwo takich krzyżówek utrzymuje charakterystykę ekspresji transgenu oryginalnego transformantu. Strategia taka stosowana jest w celu zapewnienia pewnej ekspresji genowej w wielu odmianach, które są dobrze dostosowane do miejscowych warunków wzrostowych.

Korzystna byłaby możliwość wykrywania obecności poszczególnych przypadków w celu ustalenia czy potomstwo krzyżówki płciowej zawiera transgen. Ponadto, sposób wykrywania poszczególnego przypadku byłoby pomocne do zastosowania w przepisach i uregulowaniach wymagających na przykład wstępnej aprobaty handlowej i oznakowania żywności pochodzącej z rekombinantowych roślin zbożowych. Możliwe jest wykrycie obecności transgenu, każdą dobrze znaną metodą wykrywania kwasu nukleinowego, taką jak łańcuchowa reakcja polimerazowa (PCR) lub hybrydyzacja DNA stosując sondy kwasu nukleinowego. Te sposoby wykrywania generalnie koncentrują się na często stosowanych elementach genetycznych, takich jak promotory, terminatory, geny markerowe, itp. Ponieważ wynik takich metod może być nieskuteczny do rozróżnienia pomiędzy różnymi przypadkami, zwłaszcza stosując te same konstrukty DNA chyba, że sekwencja DNA chromosomalnego DNA przylegająca do wstawionego DNA (DNA flankujące) jest znana. Próba PCR specyficzna dla tego przypadku jest dyskutowana np. przez Windels i wsp. (*Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent* 64/5b:459-462, 1999), którzy zidentyfikowali przypadek tolerancji na glifosfat u soi 40-3-2 przez zastosowanie zestawu primerów w PCR spinających połączenie pomiędzy wstawką a DNA flankującym, zwłaszcza jednego primera, który włączał jedną sekwencję z wstawki i drugiego primera, który obejmował sekwencję DNA flankującego.

Przedmiotem wynalazku jest zatem cząsteczka DNA umożliwiająca identyfikację roślin kukurydzy pV-ZMGT32 (nk603) tolerujących glifosat, charakteryzująca się tym, że zawiera sekwencję nukleotydową zidentyfikowaną jako SEQ ID nr:7 lub SEQ ID nr: 8. Korzystnie cząsteczka DNA według wynalazku jest obecna w roślinie kukurydzy, nasieniu kukurydzy, tkance kukurydzy lub w jądrze komórkowym kukurydzy.

Następnie przedmiotem wynalazku jest para cząsteczek DNA składająca się z: pierwszej cząsteczki DNA i z drugiej cząsteczki DNA, charakteryzująca się tym, że cząsteczki DNA są o wystarczającej długości sąsiednich nukleotydów o sekwencji SEQ ID nr: 7 lub ich komplementów do działania jako primery DNA lub sondy diagnostyczne dla DNA ekstrahowanego z rośliny kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) lub jej potomstwa.

Wynalazek dotyczy także pary cząsteczek DNA składającej się z: pierwszej cząsteczki DNA i z drugiej cząsteczki DNA, tak, że cząsteczki DNA są o wystarczającej długości sąsiednich nukleotydów o sekwencji SEQ ID nr: 8 lub ich komplementów do działania jako primery DNA lub sondy diagnostyczne dla ekstrahowanego DNA z rośliny kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) lub jej potomstwa.

Następnym przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania obecności cząsteczki DNA wybranej z grupy składającej się z SEQ ID nr: 7 i SEQ ID nr: 8 w próbce DNA, polegający na tym, że

- (a) ekstrahuje się próbkę DNA z rośliny kukurydzy;
- (b) kontaktuje się próbkę DNA z DNA pary primera zawierającą cząsteczki DNA primera o wystarczającej długości sąsiadujących nukleotydów SEQ ID nr: 7 lub jego komplementu;
- (c) dostarcza się warunki reakcji do amplifikacji kwasu nukleinowego;
- (d) przeprowadza się reakcję amplifikacji kwasu nukleinowego, wytwarzając w ten sposób cząsteczkę ampliconu DNA; i
- (e) wykrywa się cząsteczkę DNA ampliconu.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób wykrywania obecności cząsteczki DNA wybranej z grupy składającej się z SEQ ID nr: 7 i SEQ ID nr: 8 w próbce DNA, polegający na tym, że

- (a) ekstrahuje się próbkę DNA z rośliny kukurydzy;
- (b) kontaktuje się próbkę DNA z cząsteczką DNA zidentyfikowaną jako SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr: 11 lub SEQ ID nr: 12, przy czym wspomniana cząsteczka DNA jest sondą DNA, która hybrydyzuje w ścisłych warunkach hybrydyzacji z cząsteczką DNA wybraną z grupy składającej się z SEQ ID nr: 7 lub SEQ ID nr: 8, i nie hybrydyzuje w ścisłych warunkach hybrydyzacji z próbką DNA zawierającą cząsteczkę DNA zidentyfikowaną jako SEQ ID nr: 7 lub SEQ ID nr: 8;
- (c) poddaje się próbkę i sondę warunkom ścisłej hybrydyzacji i wykrywa się hybrydyzację sondy z DNA.

Wynalazek dotyczy również cząsteczki DNA wybranej z grupy składającej się z SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr: 11, SEQ ID nr: 12 i ich komplementów. Korzystnie, taka cząsteczka DNA jest obecna w roślinie kukurydzy, nasieniu kukurydzy, tkance kukurydzy lub w jądrze komórkowym kukurydzy.

Następnym przedmiotem wynalazku jest sposób wbudowywania cechy tolerancji na glifosat do roślin kukurydzy, znamienny tym, że

- (a) ekstrahuje się próbkę DNA z potomnych roślin kukurydzy;
- (b) kontaktuje się próbkę DNA z markerową cząsteczką kwasu nukleinowego wybraną z grupy składającej się z SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr: 11, SEQ ID nr: 12 i ich komplementami;
- (c) prowadzi się sposób wspomaganego markerem wbudowywania cechy tolerancji na glifosat, przy czym cecha tolerancji na glifosat jest genetycznie związana z komplementem cząsteczki markerowego kwasu nukleinowego.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zestaw do wykrywania DNA zawierający co najmniej jedną cząsteczkę DNA o dostatecznej długości sąsiadujących nukleotydów homologicznych lub komplementarnych do SEQ ID nr: 7 lub SEQ ID nr: 8, które działają jako primer DNA lub specyficzna sonda dla przypadku kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) i jej potomstwa.

Następnym przedmiotem wynalazku jest transgeniczna komórka roślinna z tolerancją glifosatu, zawierająca włączoną w genom tej komórki roślinnej cząsteczkę DNA kodującą tolerancyjną na glifosat EPSPS oraz DNA o sekwencji nukleotydowej zdefiniowanej w SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 i SEQ ID NO: 12.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania rośliny kukurydzy, która toleruje stosowanie herbicydu glifosatu, polegający na tym, że

- a) krzyżuje się roślinę zawierającą włączoną w jej genom cząsteczkę DNA kodującą tolerancyjną na glifosat EPSPS, regiony złącza SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 i SEQ ID NO: 12, z inną rośliną kukurydzy;
- b) otrzymuje się co najmniej jedno pokolenie roślin potomnych pochodzących z krzyżówki (a); i
- c) dokonuje się selekcji potomstwa, które jest tolerancyjne na glifosat i zawiera regiony złącza SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 i SEQ ID NO: 12.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób hodowli rośliny kukurydzy, która toleruje stosowanie herbicydu glifosatu, polegający na tym, że

- a) sadzi się co najmniej jedno nasienie rośliny kukurydzy zawierające włączoną w jego genom cząsteczkę DNA kodującą tolerancyjną na glifosat EPSPS i regiony łącznika SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 oraz SEQ ID NO: 12,

b) prowadzi się wzrost z tego nasienia i uzyskuje się roślinę kukurydzy;

c) pokrywa się tą roślinę herbicydem glifosatem tak, że wspomniana roślina ma mniejsze uszkodzenia wegetatywne i mniejsze uszkodzenie plonowania w porównaniu do innych roślin kukurydzy, które nie zawierają SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 i SEQ ID NO: 12. Korzystnie etapem selekcyjnym w c) w tym sposobie jest pokrywanie glifosatem.

Również korzystnie, etap selekcyjny w części c) zawiera etapy:

(i) ekstrakowania próbki DNA z potomnych roślin kukurydzy;

(ii) kontaktowania próbki DNA z markerową cząsteczką kwasu nukleinowego wybraną z grupy składającej się z SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr: 11, SEQ ID nr: 12 i ich komplementami;

(iii) prowadzenia sposobu wspomagania wbudowywania markera cechy tolerancji na glifosat, przy czym cecha tolerancji na glifosat jest genetycznie powiązana do komplementu cząsteczki markerowego kwasu nukleinowego.

Cząsteczka DNA charakteryzuje się tym, że wspomniana cząsteczka DNA jest obecna w roślinie kukurydzy, nasieniu kukurydzy, tkance kukurydzy lub w jądrze komórkowym kukurydzy.

Przedmiotem wynalazku jest nowa cząsteczka DNA 5' ACCAAGCTTTTATAATAG 3' (SEQ ID nr: 12) i jej komplement, przy czym ta cząsteczka DNA jest nowa w obrębie PV-ZMGT32(nk603) i w jej potomstwie. Roślina kukurydzy i jej nasiona zawierające tą cząsteczkę są przedmiotem wynalazku.

Zgodnie z innym aspektem wynalazku, przedmiotem wynalazku są cząsteczki DNA, które zawierają nowy region transgenowo/genomowy wstawki SEQ ID nr:7 i SEQ ID nr:8 i są homologiczne lub komplementarne do SEQ ID nr:7 i SEQ ID nr:8.

Cząsteczki DNA zawierające wystarczającą długość części sekwencji DNA transgenu SEQ ID nr: 7 i podobną wystarczającą długość flankującej 5' sekwencji DNA transgenu, przy czym te cząsteczki DNA są użyteczne jako DNA primerowe w metodach amplifikacji co dostarcza będącego przedmiotem wynalazku - produkt DNA amplikonu, zwłaszcza wytworzonego z DNA PV-ZMGT32(nk603) i jego potomstwa. Primery DNA homologiczne lub komplementarne do długości SEQ ID nr:7 i SEQ ID nr:8 są przedmiotem wynalazku. Amplikony wytworzone przy zastosowaniu primerów DNA, które są diagnostyczne dla przypadku kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) i jej potomstwa są również przedmiotem wynalazku.

Zgodnie z innym aspektem wynalazku, dostarczane są sposoby wykrywania obecności DNA odpowiadającej przypadkowi kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) w próbce. Sposoby takie obejmują: (a) kontaktowanie próbki zawierającej DNA z zestawem primerowym DNA, który jeżeli użyty jest w reakcji amplifikacji kwasu nukleinowego z wyekstrahowanym z przypadku kukurydzy PV-ZMGT32 (nk603) genomowym DNA, wytwarza amplikon, który jest diagnostyczny dla przypadku kukurydzy PV-ZMGT32(nk603); (b) przeprowadzenie reakcji amplifikacji kwasu nukleinowego, wytwarzając w ten sposób amplikon; i (c) wykrywanie amplikonu. Para cząsteczek DNA zawierająca zestaw primerowy homologiczny lub komplementarny do SEQ ID nr:7 lub SEQ ID nr:8 działający w reakcji amplifikacji kwasu nukleinowego do wytworzenia cząsteczki DNA amplikonu diagnostycznej dla PVZMGT32(nk603). Bardziej szczegółowo, para cząsteczek DNA zawierająca zestaw primerowy DNA, przy czym cząsteczki DNA są zidentyfikowane jako SEQ ID nr:13 lub ich komplementy i SEQ ID nr:14 lub ich komplementy; SEQ ID nr:15 lub jej komplementy i SEQ ID nr:16 lub jej komplementy. Amplikon zawierający cząsteczki DNA SEQ ID nr: 13 i SEQ ID nr: 14. Amplikon zawierający DNA SEQ ID nr: 15 i SEQ ID nr:16. Amplikon wytwarzany powyżej opisanym sposobem może hybrydyzować w ścisłych warunkach z SEQ ID nr:9, SEQ ID nr:10, SEQ ID nr:11 lub SEQ ID nr:12.

Zgodnie z innym aspektem, przedmiotem wynalazku są sposoby wykrywania obecności cząsteczki DNA odpowiadającej przypadkowi PV-ZMGT32(nk603) w próbce, metody te obejmują: (a) kontaktowanie próbki zawierającej DNA wyekstrahowane z rośliny kukurydzy z cząsteczką sondy DNA hybrydującej w ścisłych warunkach hybrydyzacji z genomowym DNA z przypadku kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) lecz nie hybrydującej w ścisłych warunkach hybrydyzacji z kontrolnym DNA kukurydzy; (b) poddaje się próbkę i sondę ścisłym warunkom hybrydyzacji i (c) wykrywa hybrydyzację sondy do tego DNA. Bardziej szczegółowo, sposób wykrywania obecności cząsteczki DNA odpowiadającej przypadkowi PV-ZMGT32(nk603) w próbce, sposób ten polega na (a) kontaktowaniu próbki zawierającej DNA ekstrakowanej z rośliny kukurydzy z cząsteczką sondy DNA, która składa się z SEQ ID nr:9, SEQ ID nr:10, SEQ ID nr:11 lub SEQ ID nr:12, przy czym wspomniana cząsteczka DNA hybryduje w ścisłych warunkach hybrydyzacji z genomowymi DNA z przypadkiem kukurydzy PV-ZMGT32 (nk603) i nie hybryduje w ścisłych warunkach hybrydyzacji z kontrolną cząsteczką DNA; (b) poddaje się próbkę i sondę ścisłym warunkom hybrydyzacji; i (c) wykrywa się hybrydyzację sondy DNA.

Zgodnie z innym aspektem, wynalazek dostarcza sposobu wyboru roślin kukurydzy według wynalazku z tolerancją na glifosfat i ich potomstwa, obejmujący ekstrakcję DNA z próbki rośliny, kontaktowanie tego DNA z cząsteczką markerowego kwasu nukleinowego wybraną z grupy obejmującej SEQ ID nr:9, SEQ ID nr:10, SEQ ID nr:11 lub SEQ ID nr:12, lub ich komplementami/wykrywanie hybrydyzacji DNA tej wspomnianej markerowej cząsteczki kwasu nukleinowego i przeprowadzenie analizy hodowli przy pomocy tego markera dla genetycznego powiązania cechy tolerancji na glifosfat z cząsteczką markerowego kwasu nukleinowego.

Niniejszy wynalazek dostarcza sposobu wytwarzania rośliny kukurydzy z tolerancją herbicydu glifosfatowego obejmujący transformowanie komórki kukurydzy konstruktem DNA (pMON25496), wybieranie komórki kukurydzy z tolerancją na traktowanie skuteczną dawką glifosfatu, a następnie hodowlę tej komórki kukurydzy do wyprowadzenia płodnej rośliny kukurydzy. Płodna roślina kukurydzy może być samopylna lub krzyżowana z kompatybilnymi odmianami kukurydzy do wytworzenia potomstwa z tolerancją glifosfatu.

Wynalazek dotyczy także zestawu do wykrywania DNA obejmującego co najmniej jedną cząsteczkę DNA o wystarczającej długości sąsiadujących nukleotydów homologicznych lub komplementarnych do SEQ ID nr:7 lub SEQ ID nr:8, która działa jako primer DNA lub sonda specyficzna dla przypadku PV-ZMGT32(nk603) lub jego potomstwa.

Powyższe i inne aspekty tego wynalazku staną się oczywiste z poniższego opisu szczegółowego i towarzyszących rysunków.

Wynalazek jest zilustrowany na Figurze, 1

Figura 1 przedstawia mapę plazmidu pMON25496

Definicje powszechnie znanych w biologii molekularnej określeń można także znaleźć w Rieger i wsp., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5 wydanie, Springer-Verlag: New York, 1991; i Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994. Nomenklatura zasad DNA jaka jest stosowana zgodna jest z 37 CFR § 1.822.

Tak jak zastosowane tutaj określenie „zboże” oznacza *Zea mays* lub kukurydzę i obejmuje odmiany roślin, które mogą być uprawiane z kukurydzą włącznie z gatunkami dzikiej kukurydzy. Tak jak stosuje się tutaj, określenie „zawierający” oznacza „obejmujący lecz nie ograniczony do”. „Glifosat” oznacza N-fosfonometyloglicynę i jej sole. Glifosat jest składnikiem aktywnym herbicydu Roundup® (Monsanto Co.). Traktowanie „glifosatowym herbicydem” odnosi się do traktowania herbicydem Roundup®, Roundupem Ultra®, Roundup Ultra Max® lub każdym innym preparatem herbicydowym zawierającym glifosat. Wybór poziomów stosowania preparatu glifosatu, który stanowi skuteczną biologicznie dawkę, jest w zakresie doświadczenia przeciętnego technika agrotechniki.

Określenie „sonda” oznacza wyizolowany kwas nukleinowy do którego dołączono wykrywany konwencjonalnie znacznik lub cząsteczkę reporterową, na przykład izotop radioaktywny, ligand, czynnik chemiluminescencyjny lub enzym. Taka sonda jest komplementarna do nici docelowego kwasu nukleinowego, w przypadku niniejszego wynalazku, do nici DNA genomowego z przypadku kukurydzy PV-ZMGT32(NK603) czy to rośliny kukurydzy czy próbki zawierającej DNA z tego przypadku. Sondy według niniejszego wynalazku, zawierają nie tylko kwasy deoksyrybonukleinowy lub rybonukleinowy ale także poliamidy i inne materiały sondy, wiążące się specyficznie do docelowej sekwencji DNA i mogące być zastosowane do wykrycia obecności tej docelowej sekwencji DNA.

„Primerami” są izolowane kwasy nukleinowe, które są rozplatane do komplementarnej nici docelowego DNA przez hybrydyzację kwasu nukleinowego z powstaniem hybrydy pomiędzy primerem i tą nicią docelowego DNA, następnie wydłużonej razem z nicią DNA docelowego, a następnie wydłużane razem a docelową nicią DNA przez polimerazę, na przykład polimerazę DNA. Pary primerów według niniejszego wynalazku odnoszą się do ich zastosowania do amplifikacji docelowych sekwencji kwasu nukleinowego, na przykład w reakcję polimerazy łańcuchowej (PCR) lub innymi konwencjonalnymi metodami amplifikacji kwasów nukleinowych.

Sondy i primery są wystarczającej długości nukleotydowej do związania docelowej sekwencji DNA, szczególnie w warunkach hybrydyzacji lub warunkach reakcji określonych przez operator. Ta długość może być każdą długością, która jest wystarczającą długością użyteczną do metody detekcji z wyboru. Generalnie, stosuje się nukleotydy o długości 11 lub więcej nukleotydów, korzystnie 18 nukleotydów lub więcej, bardziej korzystnie 24 lub więcej nukleotydów i najkorzystniej 30 lub więcej nukleotydów. Takie sondy i primery hybrydują specyficznie z sekwencją docelową w ścisłych warunkach hybrydyzacji. Korzystnie, sondy i primery, według wynalazku, mają pełne podobieństwo do sekwencji DNA sąsiednich nukleotydów z sekwencjami docelowymi, jednakże sondy różniące się od

sekwencji docelowych DNA i dlatego zachowujące zdolność do hybrydyzacji z docelowymi sekwencjami DNA można zaprojektować konwencjonalnymi metodami.

Sposoby przygotowywania i stosowania sond i primerów są opisane w na przykład w: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-wydanie, vol. 1-3, Sambrook i wsp., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989" (dalej nazywany w skrócie „Sambrook i wsp., 1989”); *Current Protocols in Molecular Biology*, wyd. Ausubel i wsp., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (z periodyczną aktualizacją) (dalej nazywany w skrócie, „Ausubel i wsp., 1992”); i Innis i wsp., *PCR Protocols: A Guide to methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. Pary PCR-primer mogą pochodzić ze znanych sekwencji, na przykład, przez zastosowanie programu komputerowego przeznaczonego do tego celu jak Primer (Version 0,5[©] 1991). Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Primery i sondy oparte na flankującym DNA i sekwencji wstawek ujawnione tutaj, mogą być stosowane do potwierdzenia (i, jeśli to konieczne do poprawienia) ujawnionych sekwencji metodami konwencjonalnymi, to znaczy przez reklonowanie i sekwencjonowanie takich sekwencji.

Sondy kwasu nukleinowego i primery według niniejszego wynalazku hybrydują w ścisłych warunkach z docelową sekwencją DNA. Każdy konwencjonalny sposób hybrydyzacji kwasu nukleinowego lub amplifikacji może być stosowany do identyfikacji w próbce obecności DNA z transgenicznych przypadków. Cząsteczki kwasu nukleinowego lub ich fragmenty są zdolne, w pewnych warunkach, do specyficznej hybrydyzacji z innymi cząsteczkami kwasu nukleinowego. Tak jak stosuje się tutaj, uważa się, że dwie cząsteczki kwasu nukleinowego są zdolne do specyficznej hybrydyzacji jedna z drugą, jeśli te dwie cząsteczki są zdolne do tworzenia naprzeciwległej, podwójnej struktury nici kwasu nukleinowego. Cząsteczki kwasu nukleinowego są uważane za „komplementarne” do innej cząsteczki kwasu nukleinowego jeśli wykazują one pełną zgodność. Tak jak stosuje się tutaj, uważa się cząsteczki wykazują „całkowitą zgodność” jeżeli każdy nukleotyd jednej cząsteczki jest komplementarny do nukleotydu innej cząsteczki. Dwie cząsteczki są uważane za „minimalnie komplementarne” jeżeli mogą one hybrydyzować z inną cząsteczką z wystarczającą stałością pozwalającą na rozplecenie jednej z drugą co najmniej w warunkach konwencjonalnej „niskiej ścisłości” konwencjonalnie. Podobnie, cząsteczki są uważane za „komplementarne” jeżeli mogą one hybrydyzować jedna z drugą z dostateczną stabilnością pozwalającą na pozostanie w stanie rozplecenia jedna z drugą w konwencjonalnie „ściśłych warunkach”. Konwencjonalna ścisłość warunków jest opisana przez Sambrook i wsp., 1089 i przez Haymes i wsp., W: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Odstępstwa od pełnej komplementarności są dlatego dopuszczalne tak długo jak takie odstępstwa nie wykluczą całkowicie zdolności tych cząsteczek do tworzenia struktury dwuniciowej. Po to, aby cząsteczka kwasu nukleinowego mogła służyć jako primer albo sonda potrzebuje ona wystarczająco komplementarnej sekwencji aby być zdolną do utworzenia stałej dwuniciowej struktury przy zastosowaniu szczególnego rozpuszczalnika i stężeń soli.

Tak jak stosuje się tutaj, zasadniczo homologiczna sekwencja jest cząsteczką kwasu nukleinowego, która będzie specyficznie hybrydyzowała z komplementarną cząsteczką kwasu nukleinowego do której jest porównywana w ścisłych warunkach hybrydyzacji. Odpowiednia ścisłość warunków promująca hybrydyzację DNA, na przykład 6,0x chlorek sodowy/cytrynian sodowy (SSC) w około 45°C, po którym następuje przemywanie w 2,0xSSC w 50°C, są znane fachowcom w tej dziedzinie lub które można znaleźć w *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Na przykład, stężenie soli w etapie przemywania może być wybrane z niskiej ścisłości o około 2,0xSSC przy 50°C do warunków wysokiej ścisłości o około 0,2xSSC przy 50°C. Ponadto, temperatura w etapie przemywania może wzrastać od warunków o niskiej ścisłości w temperaturze pokojowej, około 22°C do warunków o dużej ścisłości w około 65°C. Zarówno temperatura jak i sól mogą być różne, albo zarówno temperatura jak i stężenie soli mogą być stałe - podczas gdy inne zmienne podlegają zmianom. W korzystnej postaci, kwas nukleinowy według niniejszego wynalazku będzie hybrydyzował specyficznie z jedną lub większą ilością cząsteczek kwasu nukleinowego przedstawionych na SEQ ID nr : 9, 10, 11 i 121 lub z ich komplementami lub fragmentami zarówno w średnich warunkach ścisłości, na przykład przy 2,0 x SSC i około 65°C. W szczególnie korzystnej postaci, kwas nukleinowy według wynalazku będzie hybrydyzował specyficznie z jednym lub większą ilością cząsteczek kwasu nukleinowego przedstawionych na SEQ ID nr : 9 do SEQ ID nr 12: lub ich komplementami lub fragmentami również w ostrych warunkach hybrydyzacji. W jednym aspekcie wynalazku, korzystna cząsteczka markerowego kwasu nukleinowego, według niniejszego wynalazku, posiada sekwencje kwasu nukleinowego przedstawioną na SEQ ID nr : 9 do SEQ ID nr 12: lub ich komplementów lub fragmen-

tów. W innym aspekcie wynalazku, korzystna cząsteczka markerowego kwasu nukleinowego według wynalazku posiada pomiędzy 80% a 100% lub 90% a 100% identyczności sekwencji z sekwencją kwasu nukleinowego przedstawioną na SEQ ID nr: 9 do SEQ ID nr: 12 lub jej komplementami lub fragmentami. W dalszym aspekcie wynalazku, korzystna cząsteczka markerowego kwasu nukleinowego według wynalazku zajmuje pomiędzy 95% a 100% identyczności sekwencji z sekwencją przedstawioną na SEQ ID nr 9: do SEQ ID nr 12: lub ich komplementami lub fragmentami. Sekwencje SEQ ID nr: 9 do SEQ ID nr: 12 mogą być stosowane jako markery w sposobach hodowli roślin do identyfikowania potomstwa krzyżówek genetycznych, podobnych do sposobów opisywanych dla prostej analizy sekwencji powtórki sekwencji DNA markera w „DNA markers: Protocols, applications and overviews: (1997) 173-185, Cregan i wsp., wydawca Wiley-Liss NY; które w całości włączone jest przez zacytowanie. Hybrydyzacja sondy z docelową cząsteczką DNA może być wykrywana wieloma metodami znanymi w stanie techniki, obejmują one lecz nie są ograniczone do etykietek fluorescencyjnych, radioaktywnych, opartych, przeciwnie opartych o etykiety i etykietek chemiluminescencyjnych.

Odnosnie amplifikacji docelowej sekwencji kwasu nukleinowego (to znaczy przez PCR) stosując szczególną parę primerów amplifikacji, „warunki ścisłości” są warunkami które pozwalają tej parze primera na hybrydyzację jedynie z docelową sekwencją kwasu nukleinowego do której primer posiadający odpowiadającą sekwencję typu dzikiego (lub jej komplement) mógłby się wiązać i korzystnie wytwarzać unikalny produkt amplifikacji, amplikon, w reakcji amplifikacji termalnej DNA.

Określenie „specyficzny dla (sekwencja docelowa)” wskazuje, że sonda lub primer hybrydyzuje w ścisłych warunkach hybrydyzacji, tylko z sekwencją docelową, w próbce zawierającej tą sekwencją docelową.

Tak jak zastosowano tutaj „amplifikowane DNA” lub „amplikon” odnosi się do produktu amplifikacji docelowej sekwencji kwasu nukleinowego, będącej częścią wzorcowego kwasu nukleinowego. Na przykład, w celu określenia czy roślina kukurydzy pochodząca z krzyżówki płciowej zawiera przypadkowo transgenicznego genomowego DNA z tej rośliny kukurydzy według niniejszego wynalazku, DNA ekstrahowane z próbki tkanki roślinnej kukurydzy może być poddawane amplifikacji kwasu nukleinowego stosując parę primera DNA, który zawiera pierwszy primer pochodzący z sekwencji flankującej w genomie rośliny, przylegający do miejsca insercji wstawionego heterologicznego DNA i drugi primer pochodzący z wstawionego heterologicznego DNA w celu wytworzenia amplikonu, który jest diagnostyczny jeśli chodzi o obecność tego przypadku DNA. Amplikon ten może rozciągać się co do długości łącznej długości pary primerów plus jedna para zasad nukleotydowych, korzystnie plus około pięćdziesięciu par zasad nukleotydowych, bardziej korzystnie plus około sto pięćdziesięciu par zasad nukleotydowych. Ewentualnie, para zasad może pochodzić od sekwencji flankującej oba miejscach wstawionego DNA, co daje produkcję amplikonu, który obejmuje pełną wstawioną sekwencję (np., fragment DNA M1u1 z konstruktów ekspresji pMON25490, Fig. 1, około 6706 par zasad nukleotydowych). Przedstawiciel pary primera pochodzącej z sekwencji genomowej rośliny może być umiejscowiony w pewnej odległości od wstawionej sekwencji DNA, odległość ta może obejmować od jednej pary zasad nukleotydowych aż do granicy reakcji amplifikacji, lub do około dwudziestu tysięcy par zasad nukleotydowych. Zastosowanie terminu „amplikon” szczególnie wyłącza primery dimeryczne, które mogą być tworzone w reakcji termalnej DNA.

Amplifikacja kwasu nukleinowego może być dokonana wieloma różnymi metodami znanymi w stanie techniki, włączając w to łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Wiele sposobów amplifikacji znanych jest ze stanu techniki i opisanych jest między innymi w opisach patentach St. Zjedn. Am. o numerach nr 4,683,195 i 4,683,202 oraz w Protokołach PCR: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Wydawca Innis i wsp., Academic Press, San Diego, 1990. Sposoby amplifikacji PCR były rozwijane w celu zamplifikowania do 22 kb genomowego DNA i do 42 kb bakteriofagowego DNA (Cheng i wsp., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Te, jak również inne znane ze stanu techniki, sposoby amplifikacji DNA, mogą być stosowane w praktyce niniejszego wynalazku. Sekwencja heterologicznej wstawki DNA lub sekwencja flankująca DNA z przypadku kukurydzy PV-ZMGT32 (nk603) mogą być weryfikowane (i jeśli to konieczne poprawiane) przez amplifikację takich sekwencji z DNA ekstrahowanego z nasion lub roślin złożonych w depozycie ATCC o numerze dostępu nr PTA-2478, stosując primery DNA pochodzące z sekwencji dostarczonych tutaj a następnie przez standardowe sekwencjonowanie DNA amplikonu PCR (-owego) lub klonowanego.

Amplikon wytworzony tymi sposobami może być wykryty wieloma różnymi technikami. Jedną taką metodą jest Genetic Bit Analysis (Nikiforov i wsp., Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) gdzie zaprojektowane DNA oligonukleotydowe obejmuje zarówno przylegającą sekwencją flankującą geno-

mowego DNA jak i sekwencję wstawionego DNA. Oligonukleotyd jest unieruchomiony w studzienkach płytki z mikrostudzienkami. Po przeprowadzeniu PCR regionu będącego przedmiotem zainteresowania (stosując jeden primer w sekwencji wstawki i jeden w przylegającej flankującej sekwencji genomowej), pojedynczo-łańcuchowy produkt PCR może być hybrydyzowany z unieruchomionym oligonukleotydem i służyć jako wzorzec dla reakcji wydłużenia pojedynczą zasadą, stosując polimerazę DNA i znakowany ddNPT, specyficzny dla spodziewanej następnej zasady. Odczyt może być dokonany w oparciu o fluorescencję lub o ELISA. Sygnał wskazuje obecność sekwencji wstawkowej/flankującej odpowiedzialnych za pomyślną amplifikację, hybrydyzację i wydłużenie pojedynczą zasadą.

Inną metodą jest technika Pyrosequencing, jaka została opisana przez Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). W tej metodzie oligonukleotyd jest zaprojektowany tak, że obejmuje przylegające genomowe DNA i wstawkowe DNA. Oligonukleotyd jest zhybrydyzowany z jednołańcuchowym produktem PCR z regionu będącego przedmiotem zainteresowania (jeden primer we wstawionej sekwencji i jeden we flankującej sekwencji genomowej DNA) i inkubowany w obecności polimerazy DNA, ATP, sulfurylasy, lucyferazy, apyrazy, adenosyno-5'-fosfosulfatu i lucyferyny. DNTP są dodawane indywidualnie i włączenie daje w wyniku sygnał świetlny, który jest mierzony. Sygnał świetlny wskazuje na obecność wstawki insert transgenu/sekwencja flankująca jako wyniku skutecznej amplifikacji, hybrydyzacji i wydłużenia pojedynczego lub wielozasadowego.

Fluorescencja Polaryzacyjna opisana przez Chen i wsp., (Genome Res. 9:492-498, 1999) jest sposobem, który może być stosowany do wykrywania ampliconu według wynalazku. Stosując ten sposób, oligonukleotyd tak jest zaprojektowany aby pokryć genomowe flankujące oraz wstawowe połączenia DNA. Oligonukleotyd ten jest zhybrydyzowany z jednołańcuchowym produktem PCR z regionu będącego przedmiotem zainteresowania (jeden primer we wstawionej sekwencji DNA i jeden we flankującej sekwencji genomowego DNA) i inkubowany w obecności polimerazy DNA i fluorescencyjnie znakowanego ddNTP. Przedłużenie o jedną zasadę skutkuje włączeniem ddNTP. Włączenie może być mierzone jako zmiana polaryzacji przy zastosowaniu fluorometru. Zmiana w polaryzacji wskazuje na obecność transgenicznego wstawki/sekwencji flankującej jako wyniku skutecznej amplifikacji, hybrydyzacji i wydłużenia pojedynczego zasadowego.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) jest opisany jako sposób wykrywania i oznaczania ilościowego obecności sekwencji DNA i jest w pełni zrozumiały w postaci instrukcji dostarczonej przez producenta. W skrócie, sonda oligonukleotydowa FRET jest tak zaprojektowana aby pokryć genomowe flankowanie oraz połączenie wstawki DNA. Sonda FRET i primery PCR (jeden primer we wstawionej sekwencji DNA i jeden w flankującej sekwencji genomowej) są poddawane cyklizacji w obecności ciepłostabilnej polimerazy i dNTP. Hybrydyzacja sondy FRET daje w wyniku odczepienie i uwolnienie cząstki fluorescencji od oziębianej cząstki sondy FRET. Sygnał fluorescencyjny wskazuje na obecność flankującej/wstawkowej sekwencji transgenu wynikłych ze skutecznej amplifikacji i hybrydyzacji.

Cząsteczkowy Beacons był opisany do stosowania w wykrywaniu sekwencji jak opisano w Tyngi i wsp., (Nature Biotech. 14:303-308, 1996). W skrócie, sonda oligonukleotydowa FRET jest tak zaprojektowana aby nałożyć się na połączenie genomowe flankujące i DNA wstawkowe. Unikalna budowa sondy FRET polega na tym, że zawiera ona strukturę drugorzędową która utrzymuje cząsteczki fluorescencji i cząsteczki wygaszające w ścisłej bliskości. Sonda FRET i primery PCR (jeden primer we wstawkowej sekwencji DNA i jeden w flankującej sekwencji genomowej) są poddawane cyklizacji w obecności termostabilnej polimerazy i dNTP. Pomyślna amplifikacja PCR, hybrydyzacja sondy FRET do docelowej sekwencji daje w wyniku usunięcie drugorzędowej struktury sondy i przestrzenne oddzielenie cząsteczek fluorescencji i cząsteczek wygaszających. Sygnał fluorescencyjny wskazuje na obecność flankującej/wstawkowej sekwencji transgenu wynikających ze skutecznej amplifikacji i hybrydyzacji.

P r z y k ł a d y

P r z y k ł a d 1

PV-ZMGT32 (nk603) (dalej zwane jako nk603) przypadek transgenicznego kukurydzy był generowany przez bombardowanie mikropociskami zarodków kukurydzy (Songstad i wsp., In Vitro Cell Plant 32:179-183, 1996) stosując liniowy fragment DNA Mlu I pochodzący z pMON25496 (Figura 1). Ten fragment DNA zawiera dwie transgeniczne kasety ekspresji, które wspólnie nadają roślinie tolerancję na glifosat. Pierwsza kasetka jest złożona z promotora aktywności 1 ryżu i wstawki (P-Os.Act1 i I-Os.Act1, patent St. Zjedn. Am. nr 5,641,876), operacyjnie związanych z przejściowym peptydem chloroplastu Arabidopsis EPSPS (TS-At.EPSPS:CTP2, Klee i wsp., Mol. Gen. Genet. 210:47-442,

1987), operacyjnie połączony z syntazą 5-enolopiruwiloshikimato-3-fosforanową (EPSPS) z *Agrobacterium* sp. szczepu CP4 (Agrtu.aroA:CP4, opis patentowy St. Zjedn. Am.) i operacyjnie połączony z terminatorem transkrypcji syntazy nopaliny (T-AGRTU. nos, Fraley i wsp., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807, 1983). Drugą kasetą ekspresyjną transgenu stanowi promotor wirusa mozaiki kalafiora 35S zawierający tandemową duplikację regionu wzmacniacza (P-CaMV.35S, Kay i wsp., Science 236:1299-1302, 1987; opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 5,164,316), związany operacyjnie z intronem Hsp70 *Zea mays* (I-Zm.Hsp70, opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 5,326,865), operacyjnie związany z przejściowym peptydem chloroplastu *Arabidopsis* EPSPS (TS-At.EPSPS:CTP2, Klee i wsp., Mol. Gen. Genet. 210:47-442, 1987), operacyjnie połączony z tolerującą glifosat syntazą 5-enolopiruwiloshikimato-3-fosforanową (EPSPS) z *Agrobacterium* sp. szczepu CP4 (AGRTU. aroA:CP4, opis patentowy St. Zjedn. Am.) i operacyjnie połączony z terminatorem transkrypcji syntazy nopaliny (T-AGRTU.nos, Fraley i wsp., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807, 1983). Transgeniczny kalus z tolerancją na glifosat, powstały po bombardowaniu, oddzielano z medium zawierającego 3mM glifosat i rośliny następnie regenerowano. Wyprodukowano trzysta cztery rośliny z 91 niezależnych transgenicznych przypadków z populacji, wybrano nk603 w oparciu o złożoną kombinację charakterystyk włączając w to tolerancję na glifosat, działania agrotechniczne i pojedynczą wstawkę transgeniczną. Ocena przypadku nk603 i pochodzącego z niego potomstwa, prowadzona w szklarni i na polu, wskazuje że ta transgeniczna wstawka nadaje tolerancję, która przekracza handlowe dokumentację dla pełnej wegetatywnej i reprodukcyjnej tolerancji na 340 g glifosatu/akr (840 g glifosatu/hektar; 32 oz Roundup Ultra/akr) kiedy zastosowano w stadium V4 i V8 liści.

Przykład 2

Tolerancję na glifosat kukurydzy nk603 porównano do bieżących standardów handlowych, GA21 (Opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 6,040,497), dla tolerancji na glifosat uszkodzeń wegetatywnych i wpływu na wydajność. GA21 zawiera co najmniej 3 transgeniczne kasety ekspresyjne ułożone w tandem w genomie kukurydzy przypadku (SCP/GM/232-Finał, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General). Kasetę transgenu GA21 składa się z promotora aktywny ryżu 1 i intronu połączonego z chloroplastowym peptydem przejściowym karboksylazy rybulozo-1,5-bisfosforanu połączonym ze zmodyfikowanym opornym na glifosat kukurydzowym EPSPS i regionem terminacji transkrypcji 3' syntazy nopaliny. Rośliny nk603 i GA21 były uprawiane w rzędach w powtórzonych poletkach doświadczalnych. Stosowano następujące zabiegi: 1) bez oprysków, 2) opryski w ilości 64 uncji/akr Roundup Ultra® w stadium V4 liści i ponownie 64 uncje/akr Roundup Ultra® w stadium V8 liści, 3) oprysk 96 uncji/akr Roundup Ultra® w stadium V4 liści i ponownie 96 uncji/akr Roundup Ultra® w stadium V8 liści. Tolerancja wegetatywna mierzona była jako procent uszkodzeń wegetatywnych oznaczonych jako ilość malformacji liścia obserwowanych 10 dni po traktowaniu herbicydem w stadium V8 liścia. Wydajność z każdego poletka mierzona była w buszlach /akr i procent redukcji wydajności oznaczono dla każdego zabiegu z herbicydem w porównaniu do zabiegów gdzie nie stosowano oprysku. Wyniki przedstawione w Tabeli 1 pokazują, że nk603 wykazuje mniejszy procent uszkodzeń wegetatywnych niż rośliny GA21 i ten obserwowany procent redukcji wydajności jest także mniejszy dla przypadku nk603. Niska ilość przypadków uszkodzeń wegetatywnych obserwowana była w poletkach nie opryskiwanych, obserwacja ta może zależeć od różnych czynników środowiskowych, innych niżeli wystawienie na herbicyd glifosatu. Podwójna kasetę ekspresyjną pMON25496 w nk603, porównana została do uszkodzeń wegetatywnych i wskaźnik płodności z 3 niezależnych przypadków kukurydzy otrzymanych jedynie z promotora CaMV.35S prowadzącego ekspresję genu tolerancji glifosatu (AGRTU. aroA:CP4). Obserwowano, że podwójna kasetę ekspresji nadawała wyższy poziom tolerancji wegetatywnej i tolerancji rozrodczej, niż trzy niezależne przypadki kukurydzy (ev 1, ev 2 i ev 3) zawierające tylko kasetę ekspresji, w których ekspresja genu tolerancji na glifosat była prowadzona przez promotora CaMV.35S. Wyższy poziom tolerancji wegetatywnej na uszkodzenia herbicydem glifosatu był obserwowany dla nk603 plus 3 dodatkowe przypadki kukurydzy pochodzące z pMON25496, porównując do średniego uszkodzenia w 6 przypadkach kukurydzy pochodzących z konstrukt, w którym ekspresja genu tolerancji glifosatu była prowadzona tylko przez promotora aktywny ryżu i intron (P-Os. Act1/I-Os. Act1). Rośliny transformowane podwójną kasetę ekspresji posiadają wyższy poziom tolerancji glifosatu na uszkodzenie wegetatywne i upośledzenie płodności, niż rośliny pochodzące z transformacji pojedynczymi kasetami ekspresji, dającej poprawienie oporności dającej utratę wydajności w wyniku stosowania herbicydu glifosatu. Konstrukt pMON25496 dostarcza dwóch roślinnych kaset

ekspresji o pojedynczej lokalizacji w nk603, nadających wyższy poziom tolerancji glifosatowej niż potrójny tandem wstawki występujący w standardzie handlowym - GA21.

Tabela 1
Tolerancja glifosfatu przez nk603 - Uszkodzenia wegetatywne, Wydajność i Ocena Płodności

Przypadek	Traktowanie	% Uszkodzeń weg.	Wydajność (buszle/akr)	% redukcji wydajności
GA21	bez oprysków	0,3	142,2	
	64 oz Roundup Ultra® przy V4 a następnie 64 oz przy V8	5,3	134,1	5,7
	96 02 Roundup Ultra® przy V4 a następnie 96 oz przy V8	8,3	129,1	9,2
nk603	bez oprysków	0,9	145,6	
	64 oz Roundup Ultra® przy V4 a następnie 64 oz przy V8	2,9	138,5	4,9
	96 oz Roundup Ultra® przy V4 a następnie 96 oz przy V8	4,7	140,1	3,8

	Traktowanie	Ocena płodności**
nk603	64 oz Roundup Ultra® przy V8	4,5
CaMV.35S ev 1	64 oz Roundup Ultra® przy V8	2,0
CaMV.35S ev 2	64 oz Roundup Ultra® przy V8	2,2
CaMV.35S ev 3	64 oz Roundup Ultra® przy V8	2,4
		śred. % uszkodzeń weg.
nk603 plus 3 dodatkowe przypadki pMON25496	128 oz Roundup Ultra® przy V4 a następnie przez 128oz przy V8	22,9
Sześć P-Os.Act1 przypadków o pojedynczej kasecie	128 oz Roundup Ultra® przy V4 a następnie przez 128oz przy V8	28,9

* Uszkodzenia Weg obserwowane 10 dni po traktowaniu V8 jest jednym pomiarem zrobionym w celu oceny uszkodzeń wegetatywnych w odpowiedzi na traktowanie glifosatem.

** stopień płodności męskiej: 4-5 = pełna płodność; 3 = znaczące zredukowanie wyrzucenia pyłku; 0-2 = pełna sterylność - wysoka sterylność, nie odpowiednie do stosowania w handlu.

Przykład 3

Odpowiednią cząsteczkę flankującą DNA od nk603 klonowano stosując zligowane adaptory i gniazda PCR jak opisano w zestawie Genome Walker™ (katalog # K1807-1, CloneTech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA). Pierwszy genomowy DNA z przypadku nk603 był oczyszczony metodą CTAB (Rogers i wsp., Plant Mol. Biol 5:69-76, 1985). Genomowe biblioteki DNA do amplifikacji były przygotowywane zgodnie z instrukcją producenta (Genome Walker™ CloneTech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA). W odrębnych reakcjach, genomowy DNA był trawiony przez noc w 37°C następującymi restrykcyjnymi endonukleazami tępych końców EcoRV, ScaI, DraI, PvuII i StuI (CloneTech Laboratories, Inc, Palo Alto, Ca). Mieszanina reakcyjna była ekstrahowana fenol : chloroform, DNA strącano przez dodanie etanolu do fazy wodnej, osadzano przez odwirowanie a następnie ponownie zawieszano w buforze Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). Oczyszczone fragmenty DNA z tępymi końcami ligowano do adapterów Genome Walker™ zgodnie z protokołem producenta. Po ligacji, każda reakcja była ogrzewana (70°C przez 5 min) do zatrzymania reakcji a następnie rozcieńczana 10-krotnie w buforze Tris-EDTA. Tylko 1 z każdej przeprowadzonej ligacji była następnie amplifikowana w 50 µl reakcji, która obejmowała 1 µl odpowiedniej, zligowanej do adaptera, biblioteki, 1 µl 10 µM adaptera

primera Genome Walker™ API (5' GTATATCGACTCACTATAGGGC 3', SEQ ID nr: 1), 1 µl 10 mM nk603 specyficznego wobec transgenu nukleotydu.

(5' TGACGTATCAAAGTACCGACAAAACATCC 3' SEQ ID nr: 2) 1 µl 10 mM deoksyrybonukleotydu, 2,5 µl sulfotlenku dimetylowego, 5 µl 10X buforu PCR zawierającego MgCl₂, 0,5 µl (2,5 jednostki) termostabilnej polimerazy DNA Amplitaq (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), i H₂O do 50 µl. Rekcje prowadzono w termocyklerze stosując wyliczoną temperaturę kontrolną i następujące warunki cyklizacji: 1 cykl w 95°C przez 9 min; 7 cykli w 94°C przez 2 sek., 70°C przez 3 min; 36 cykli w 94°C przez 2 sek., 65°C przez 3 min; 1 cykl w 65°C przez 4 min. Jeden µl każdej pierwotnej reakcji rozcieńczano 50-krotnie wodą i amplifikowano w drugorzędowej reakcji (1 µl odpowiedniego rozcieńczenia z reakcji pierwotnej), 1 µl 10 µM Genome Walker™ zagnieżdżonego adaptera primera AP2

(5' ACTATAGGGCACGCGTGGT 3', SEQ ID nr 3, dostarczonego przez producenta), 1 µl 10 µM transgeno-specyficznego wobec nk603 zagnieżdżonego oligonukleotydu.

(5' CTTTGTTTTATTTGGACTATCCCGACTC 3', SEQ ID nr 4), 1 µl 10 mM deoksyrybonukleotydu, 2,5 µl sulfotlenku dimetylowego, 5 µl 10X buforu PCR zawierającego MgCl₂, 0,5 µl (2,5 jednostki) termostabilnej polimerazy DNA Amplitaq (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), i H₂O do 50 µl, stosując następujące warunki cyklizacji: 1 cykl w 95°C przez 9 min; 5 cykli w 94°C przez 2 sek., 70°C przez 3 min; 24 cykle w 94°C przez 2 sek., 65°C przez 3 min; 1 cykl w 65°C przez 4 min.

Produkty PCR, reprezentujące 5 regionów, które spinają połączenie pomiędzy transgenicznym insertem nk603 i sąsiadującym DNA flankującym kukurydzy, były oczyszczane elektroforezą na żelu agarozowym a następnie oczyszczane z matrycy agarozowej stosując zestaw QIAquick Gel Extraction Kit (katalog#28704, Qiagen Inc., Valencia, CA) i klonowane wprost do wektora pGEM-T Easy vector (katalog. # A1360, Promega, Madison, WI). Tożsamość klonowanych produktów PCR i powiązanie z fragmentem Mlu I pMON25496 została potwierdzona przez analizę sekwencji DNA (ABI Prism™377, PE Biosystems, Foster City, CA i oprogramowanie do analizy sekwencji DNA-STAR Inc., Madison, WI).

Podobnie, nk603 3'-flankująca sekwencja DNA kukurydzy była amplifikowana i klonowana stosując specyficzne primery zagnieżdżonego genu, takie jak, SEQ ID nr 5 (5' AGATTGAATCCTGT-TGCCGGTCTTGC 3' i SEQ ID nr: 6 (5' GCGGTGTCATCTATGTTAACTAGATCGGG 3') która topi się do T-AGRTU.nos terminatora transkrypcyjnego. Dwa transkrypcyjne terminatory T-AGRTU.nos są obecne w transgeniczno/genomowej wstawce nk603, jedna wewnętrzna w konstrukcie i jedna przy końcu 3' konstrukt przyległego do genomowego DNA kukurydzy. Produkty PCR wytworzone w tej reakcji były sekwencjonowane i sekwencja DNA spinająca połączenie pomiędzy sekwencją transgeniczną a flankującą były oddzielone od produktów wewnętrznego T-AGRTU przez porównanie do znanych elementów sekwencji genetycznych konstrukt pMON25496 jak opisano poprzednio.

Sekwencja DNA kukurydzy flankująca oba miejsca transgenicznej wstawki była oznaczana w odniesieniu do wykrywania nk603 przez sekwencjonowanie produktów amplifikacji pochodzących z Genome Walker™ i następnie porównanie do znanej sekwencji transgenu. Przy końcu 5' wstawki transgenicznej, oznaczono sekwencję segmentu 498 kz otaczającego złącze wstawki (SEQ ID nr 7). Stanowiła ona sekwencję o 304 parach zasad (kz) flankującą genomowe DNA kukurydzy (nukleotydy 1-304 w SEQ ID nr: 7), 45 kz pMON25496 sekwencji konstrukt DNA (nukleotydy 305-349 w SEQ ID nr: 7) i 149 kz sekwencji DNA z końca 5' P-Os.Act1 (nukleotydy 350-498 w SEQ ID nr: 7).

Sekwencję DNA oznaczano dla segmentu 1183 kz dookoła złącza wstawki (SEQ ID nr 8), która rozpoczyna się od 164 kz terminatora transkrypcyjnego T-AGRTU.nos (nukleotydy 1-164 w SEQ ID nr; 8), sekwencji DNA konstrukt o 217 kz pMON25496 (nukleotydy 165-381 w SEQ ID nr: 8), 305 kz genów plastydu kukurydzy, rps 11 i rpo (segmenty częściowe każdego genu odpowiadające zasadom 63-363 akcesji X07810 Genbank, odpowiadające zasadom 382-686 w SEQ ID nr: 8), i pozostała sekwencja DNA stanowiąca genomową sekwencję DNA.

Cząsteczki złącza DNA, SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr 11, i SEQ ID nr: 12 są nowymi cząsteczkami DNA w nk603 i są diagnostyczne dla rośliny kukurydzy nk603 i jej potomstwa. Cząsteczki złącza DNA, SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: 10 i SEQ ID nr: 11 stanowią około 9 nukleotydów po każdej stronie transgenowego fragmentu DNA i genomowego DNA kukurydzy. SEQ ID nr: 9 stwierdzono w pozycji nukleotydowej 259-314 SEQ ID nr 7.

Cząsteczki złącza, SEQ ID nr: 10 i 11 są zlokalizowane w pozycjach nukleotydowych SEQ ID nr: 8, odpowiednio - 373-390 i 678-695, reprezentując łączącą cząsteczkę DNA konstrukt sekwencji DNA z sekwencją DNA plastydu kukurydzy (SEQ ID nr 10) i konstruktową sekwencją z genomową sekwencją DNA kukurydzy (SEQ ID nr: 11). SEQ ID n: 12 zlokalizowana jest w pozycji nukleoty-

dowej 156-173 w SEQ ID nr: 8 i reprezentuje nową cząsteczką DNA w nk603 wynikającą z jej wystąpienia w fuzji terminatora sekwencji T-AGRTU.nos z odwróconym fragmentem sekwencji promotora aktywności ryżu.

Przykład 4

Pary primerów przypadku DNA są stosowane do wytworzenia amplikonu diagnostycznego dla nk603. Ten przypadek pary primerów obejmuje ale nie jest ograniczony do SEQ ID nr: 13 i SEQ ID nr: 14 dla cząsteczki DNA amplikonu i SEQ ID nr: 15 i SEQ ID nr: 16 dla 3' cząsteczki DNA. Poza tymi parami primerów dodatkowo każda para primera pochodząca z SEQ ID nr: 7 i SEQ ID nr: 8, gdy stosowana jest w reakcji amplifikacji DNA, wytwarza diagnostyczny amplikon dla nk603, jest przedmiotem niniejszego wynalazku. Warunki amplifikacji dla tej analizy są przedstawione w Tabeli 2 i Tabeli 3 dla regionu połączenia 5' wstawka transgenowa/połączenie genomowe. Ta sama metoda jest zastosowana do amplifikacji cząsteczki 3' DNA amplikonu stosując cząsteczki DNA primera SEQ ID nr: 15 i SEQ ID nr: 16, jakkolwiek, każda modyfikacja tych sposobów stosujących cząsteczki DNA lub ich komplemety do wytworzenia cząsteczki DNA diagnostycznej dla nk603 mieści się w zakresie umiejętności fachowca w tej dziedzinie. Ponadto, kontrolna para primera (SEQ ID nr: 17 i 18) do amplifikacji endogennego genu kukurydzy jest włączona jako standard wewnętrzny do warunków reakcji. Analiza próbki ekstraktu DNA z tkanek rośliny nk603 powinna zawierać pozytywną kontrolę ekstraktu tkankowego DNA z nk603, negatywną kontrolę ekstraktu DNA z rośliny kukurydzy, która nie jest nk603 i negatywną kontrolę która nie zawiera wzorca ekstraktu DNA kukurydzy. Dodatkowe cząsteczki DNA primera o dostatecznej długości mogą być wybrane z SEQ ID nr: 7 i SEQ ID nr: 8 przez fachowców biegłych w sposobach amplifikacji DNA i warunkach optymalizacji produkcji amplikonu, który może różnić się od sposobów wskazanych w Tabeli 2 i Tabeli 3, lecz daje w wyniku diagnostyczny amplikon dla nk603. Zastosowanie tych sekwencji DNA primerów z modyfikacjami do Tabeli 2 i 3 mieści się w zakresie wynalazku. Amplikon, w którym co najmniej jedna cząsteczka DNA primera o dostatecznej długości pochodziła z SEQ ID nr: 7 i SEQ ID nr: 8, to 1A, jest diagnostyczna dla nk603, jest przedmiotem wynalazku. Amplikon, w którym co najmniej jedna cząsteczka DNA primera o dostatecznej długości pochodziła z którychkolwiek genetycznych elementów pMON25496 jest diagnostyczna dla nk603, jest również przedmiotem wynalazku. Próba dla amplikonu nk603 może zostać przeprowadzona przy zastosowaniu Stratagene Robocycler, MJ Engine, Parkin-Elmer 9700 lub Eppendorf Mastercycler Gradient termocyklizator jak pokazano na Tabeli 3 lub sposobami i aparaturą znanymi w stanie techniki.

Tabela 2

Procedura PCR i mieszanina reakcyjna dla potwierdzenia w nk603 regionu złącza - 5' wstawka transgen/genomowy

Etap	Odczynnik	Ilość	Komentarz
1	2	3	4
1	Woda wolna od nukleazy	dodana do końcowej objętości 20 μ l	-
2	10X bufor reakcyjny (z $MgCl_2$)	2,0 μ l	1X stężenie końcowe buforu, 1,5 mM stężenie końcowe $MgCl_2$
3	10 mM roztwór dATP, dCTP, dGTP i dTTP	0,4 μ l	200 μ M stężenie końcowe każdego cNTP
4	przypadek primera (SEQ ID nr 13) (zawieszony w 1X bufor TE lub wodzie wolnej od nukleazy do stężenia 10 μ M)	0,4 μ l	0,2 μ M stężenie końcowe
5	przypadek primera (SEQ ID nr 14) (zawieszony w 1X bufor TE lub wodzie wolnej od nukleazy do stężenia 10 μ M)	0,4 μ l	0,2 μ M stężenie końcowe
6	przypadek primera (SEQ ID nr 17) (zawieszony w 1X bufor TE lub wodzie wolnej od nukleazy do stężenia 10 μ M)	0,2 μ l	0,1 μ M stężenie końcowe

cd. tabeli 1

1	2	3	4
7	przypadek primera (SEQ ID nr 18) (zawieszony w 1X bufor TE lub wodzie wolnej od nukleazy do stężenia 10 μ M)	0,2 μ l	0,1 μ M stężenie końcowe
8	bez Rnazy, Dnazay	0,1 μ l	50 ng/reakcję
9	REDTaq polimeraza DNA (1 jednostka/ μ l)	1 μ l zaleca się zmienić pipety przed następnym etapem)	1 jednostka/reakcji
10	Ekstrahowane DNA (wzorce): <ul style="list-style-type: none"> • Próbkki do analizy • poszczególne liście • zgrupowane liście (maksimum 50 liści/grupę) • Kontrola negatywna • Kontrola negatywna • Kontrola pozytywna 	<ul style="list-style-type: none"> • 10-200 ng genomowego DNA • 200 ng genomowego DNA • 50 ng genomowego DNA nk603 bez wzorca DNA • 50 ng genomowego DNA 	

Tabela 3

Sugerowane parametry dla różnych termocyklerów

Delikatne mieszanie, jeśli jest potrzebne (bez ogrzewania górnej powierzchni termocyklera) dodanie 1-2 kropli oleju mineralnego na wierzch reakcji. PCR przeprowadzać w Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 lub Eppendprf Mastercycler Gradient termocyklerze stosując następujące parametry cyklizacji.

Uwaga: MJ Engine lub termocykler Eppendprf Mastercycler Gradient powinny poruszać się w określonym trybie. Praca termocyklera Perkin-Elmer 9700 z prędkością jednostajną nastawioną na maksimum.

Numer cyklu	Ustawienia : Stratagene Robocycler
1	94°C 3 minuty
38	94°C 1 minuta 60°C 1 minuta 72°C 1 minuta 30 sekund
1	72°C 10 minut
	Ustawienia: MJ Engine lub Perkin-Elmer 9700
1	94°C 3 minuty
38	94°C 10 sekund 60°C 30 sekund 72°C 1 minuta
1	72°C 10 minut
	Ustawienia: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94°C 3 minuty
38	94°C 15 sekund
	Ustawienia: Eppendorf Mastercycler Gradient
	60°C 15 sekund 72°C 1 minuta
1	72°C 10 minut

WYKAZ SEKWENCJI

<110> Monsanto Co
Behr, Carl
Hironaka, Catherine
Heck, Gregory
You, Jinsong

<120> Przypadek rośliny zbożowej PV-ZMGT32 (nk603) i kompozycje i sposoby jej wykrywania

<130> 38-21(52258)B

<150> 60/213,567

<151> 2000-06-22

<150> 60/241,215

<151> 2000-10-13

<150> 60/240,014

<151> 2000-10-13

<160> 16

<170> PatentIn wersja 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> sztuczny

<220>

<221> źródło

<222> (1)..(22)

<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 1

gtatatcgac tcactatagg gc

22

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> sztuczny

<220>

<221> źródło

<222> (1)..(30)

<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 2

tgacgtatca aagtaccgac aaaaacatcc

30

<210> 3

<211> 19
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(19)
<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 3
actatagggc acgcgtggt

19

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(29)
<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 4
ctttgtttta ttttgacta tcccgactc

29

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(26)
<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 5
agattgaatc ctggtgccgg tcttgc

26

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(28)
<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 6
gcggtgtcat ctatgttact agatcggg 28

<210> 7
<211> 498
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(498)
<223> 1-304 genomowy DNA Zea maize
305-349 DNA konstruktora wektora
350-498 DNA promotora aktywny 1 ryżu

<400> 7
aatcgatcca aaatcgcgac tgaaatggtg gaagaaagag agaacagaga gcctcacggt 60
tccaggggtga agtatcagag gatttaccgc ccatgccttt tatggagaca agaaggggag 120
gaggtaaaca gatcagcatc agcgcctcgaa agtttcgtca aaggatgctg aactgtttcc 180
agccgcccgtc gccattcggc cagactctc ctctctcggc atgagccgat cttttctctg 240
gcatttccaa ccttagagac gtgcgtccct ggtgggctgc tcggccagca agcctttag 300
cggcccacgc gtggtaccaa gcttgatata cctagggcgg ccgctgtaac aagcttactc 360
gaggtcattc atatgcttga gaagagagtc gggatagtcc aaaataaac aaaggtaaga 420
ttaccgggtca aaagtgaaaa catcagttaa aagggtgtata aagtaaaata tcggtaataa 480
aagggtggccc aaagtgaa 498

<210> 8
<211> 1183
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(1183)
<223> 1-164 terminator nos 3' Agrobacterium tumefaciens
165-381 DNA konstruktora wektora
382-686 geny plastydowe Zea maize rps11 i rpoA
687-1183 genomowy DNA Zea maize

<400> 8
gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatcgc 60
gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgctgctggtg tgctcatctat 120

gttactagat cggggatata cccggggaat tcggtaccaa gcttttataa tagtagaaaa 180
 gagtaaattt cactttgggc caccttttat taccgatatt ttactttata ccacctttta 240
 actgatgttt tcacttttga ccaggtaatc ttacctttgt tttattttgg actatcccga 300
 ctctcttctc aagcatatga atgacctcga gtaagcttgt taacgcggcc gccctaggga 360
 tatcaagctt ggtaccacgc gacacacttc cactctagtg tttgagtgga tcctgttata 420
 tcttctcgaa ccataacaga ctagtattat ttgatcattg aatcgtttat ttctctttaa 480
 agcggtttca ttttttttta cagacgtctt ttttaggag gtgcacatcc attatgcggc 540
 atagggtgta catcgcgtat acaactaac cgtacaccac ttttagcaat ggctcgtaat 600
 gcggcatctc ttcgctacc agcacctttt accataactt ctgctcgttg caaacccact 660
 gtacgaatag catctactgc tgttctgctg actttatttt ttttaataaa gtgaaaaacc 720
 ataaaatgga caacaacacc ctgcccttca ctaccggtcg gagcgacgcc gaagatgggg 780
 ttcaacacgg tcgcgacacg gatgcaacgg accctccaag ccaatactcg aggccggacc 840
 gacgacgtag gcaggggtgg ccataacgac ggtggcggca tccaacttgt tctttccctt 900
 tctctgtctt caacttgctc cggcagtctg ctagaccag gggatgctgt gtggaggaga 960
 ggtcgcgggg cccgattttt atagcctggg cgaggacgag cttggccgaa ccgatccaga 1020
 gctctgcgca aatcacgaag aaccagtggg gccgctcgcg cctagcccac cgccaggagc 1080
 ggggcttggt gcgagccgta gcgtcgggaa ggggacgacc cgctaggggg gcccatgctc 1140
 cagcggccag agagaaaaaa agaaaggaag gcgcgagatg atg 1183

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> sztuczny

<220>

<221> źródło

<222> (1) .. (19)

<223> genomowe i wektorowe DNA i Zea maize

<400> 9

tgtagcggcc cacgcgtgg

19

<210> 10

<211> 18

<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(18)
<223> plastydowe i wektorowe DNA Zea maize

<400> 10
taccacgca cacacttc

18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(18)
<223> genomowe i wektorowe DNA Zea maize

<400> 11
tgctgttctg ctgacttt

18

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(18)
<223> DNA Agrobacterium tumefaciens terminatora nos 3' i promotora aktywny ryżu

<400> 12
accaagcttt tataatag

18

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(22)
<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 13
aatcgatcca aaatcgcgac tg 22

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(22)
<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 14
ttcactttgg gccacctttt at 22

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(22)
<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 15
gacgttattt atgagatggg tt 22

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> sztuczny

<220>
<221> źródło
<222> (1)..(22)
<223> w pełni zsyntetyzowany

<400> 16
catcatctcg cgccttcctt tc 22

Zastrzeżenia patentowe

1. Częsteczką DNA umożliwiającą identyfikację roślin kukurydzy pV-ZMGT32 (nk603) tolerujących glifosat, **znamienna tym**, że zawiera sekwencję nukleotydową zidentyfikowaną jako SEQ ID nr/7 lub SEQ ID nr: 8.

2. Para cząsteczek DNA składająca się z: pierwszej cząsteczki DNA i z drugiej cząsteczki DNA, **znamienna tym**, że cząsteczki DNA są o wystarczającej długości sąsiednich nukleotydów o sekwencji SEQ ID nr: 7 lub ich komplementów do działania jako primery DNA lub sondy diagnostyczne dla DNA ekstrahowanego z rośliny kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) lub jej potomstwa.

3. Para cząsteczek DNA składająca się z: pierwszej cząsteczki DNA i z drugiej cząsteczki DNA, **znamienna tym**, że cząsteczki DNA są o wystarczającej długości sąsiednich nukleotydów o sekwencji SEQ ID nr: 8 lub ich komplementów do działania jako primery DNA lub sondy diagnostyczne dla ekstrahowanego DNA z rośliny kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) lub jej potomstwa.

4. Sposób wykrywania obecności cząsteczki DNA wybranej z grupy składającej się z SEQ ID nr: 7 i SEQ ID nr: 8 w próbce DNA, **znamienny tym**, że

(a) ekstrahuje się próbkę DNA z rośliny kukurydzy;

(b) kontaktuje się próbkę DNA z DNA pary primera zawierającą cząsteczki DNA primera o wystarczającej długości sąsiadujących nukleotydów SEQ ID nr: 7 lub jego komplementu; lub SEQ ID nr 8 lub jej komplementu;

(c) dostarcza się warunki reakcji do amplifikacji kwasu nukleinowego;

(d) przeprowadza się reakcję amplifikacji kwasu nukleinowego, wytwarzając w ten sposób cząsteczkę amplikonu DNA; i

(e) wykrywa się cząsteczkę DNA amplikonu.

5. Sposób wykrywania obecności cząsteczki DNA wybranej z grupy składającej się z SEQ ID nr: 7 i SEQ ID nr: 8 w próbce DNA, **znamienny tym**, że

(a) ekstrahuje się próbkę DNA z rośliny kukurydzy;

(b) kontaktuje się próbkę DNA z cząsteczką DNA zidentyfikowaną jako SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr: 11 lub SEQ ID nr: 12, przy czym wspomniana cząsteczka DNA jest sondą DNA która hybryduje w ścisłych warunkach hybrydyzacji z cząsteczką DNA wybraną z grupy składającej się z SEQ ID nr: 7 lub SEQ ID nr: 8, i nie hybryduje w ścisłych warunkach hybrydyzacji z próbką DNA nie zawierającą cząsteczki DNA zidentyfikowanej jako SEQ ID nr: 7 lub SEQ ID nr: 8;

(c) poddaje się próbkę i sondę warunkom ścisłej hybrydyzacji i wykrywa się hybrydyzację sondy z DNA.

6. Częsteczka DNA wybrana z grupy składającej się z SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr: 11, SEQ ID nr: 12 i ich komplementów.

7. Sposób wbudowywania cechy tolerancji na glifosat do roślin kukurydzy, **znamienny tym**, że

(a) ekstrahuje się próbkę DNA z potomnych roślin kukurydzy;

(b) kontaktuje się próbkę DNA z markerową cząsteczką kwasu nukleinowego wybraną z grupy składającej się z SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr: 11, SEQ ID nr: 12 i ich komplementami;

(c) prowadzi się sposób wspomaganego markerem wbudowywania cechy tolerancji na glifosat, przy czym cecha tolerancji na glifosat jest genetycznie związana z komplementem cząsteczki markerowego kwasu nukleinowego.

8. Zestaw do wykrywania DNA zawierający co najmniej jedną cząsteczkę DNA o dostatecznej długości sąsiadujących nukleotydów homologicznych lub komplementarnych do SEQ ID nr: 7 lub SEQ ID nr: 8, które działają jako primer DNA lub specyficzna sonda dla przypadku kukurydzy PV-ZMGT32(nk603) i jej potomstwa.

9. Transgeniczna komórka roślinna z tolerancją glifosatu, zawierająca włączoną w genom tej komórki roślinnej cząsteczkę DNA kodującą tolerancyjną na glifosat EPSPS oraz DNA o sekwencji nukleotydowej zdefiniowanej w SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 i SEQ ID NO: 12.

10. Sposób wytwarzania rośliny kukurydzy która toleruje stosowanie herbicydu glifosatu, **znamienny tym**, że

a) krzyżuje się roślinę zawierającą włączoną w jej genom cząsteczkę DNA kodującą tolerancyjną na glifosat EPSPS, regiony złącza SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 i SEQ ID NO: 12, z inną rośliną kukurydzy;

b) otrzymuje się co najmniej jedno pokolenie roślin potomnych pochodzących z krzyżówki (a); i

c) dokonuje się selekcji potomstwa, które jest tolerancyjne na glifosat i zawiera regiony złącza SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 i SEQ ID NO: 12.

11. Sposób hodowli rośliny kukurydzy, która toleruje stosowanie herbicydu glifosat, **znamienny tym**, że

a) sadi się co najmniej jedno nasienie rośliny kukurydzy zawierające włączoną w jego genom cząsteczkę DNA kodującą tolerancyjną na glifosat EPSPS i regiony złącza SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 oraz SEQ ID NO: 12,

b) prowadzi się wzrost z tego nasienia i uzyskuje się roślinę kukurydzy;

c) pokrywa się tą roślinę herbicydem glifosatem tak, że wspomniana roślina ma mniejsze uszkodzenia wegetatywne i mniejsze uszkodzenie plonowania w porównaniu do innych roślin kukurydzy, które nie zawierają SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 i SEQ ID NO: 12.

12. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że etapem selekcyjnym w c) jest pokrywanie glifosatem.

13. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że etap selekcyjny w części c) zawiera etapy:

(i) ekstrahowania próbki DNA z potomnych roślin kukurydzy;

(ii) kontaktowania próbki DNA z markerową cząsteczką kwasu nukleinowego wybraną z grupy składającej się z SEQ ID nr: 9, SEQ ID nr: 10, SEQ ID nr: 11, SEQ ID nr: 12 i ich komplementami;

(iii) prowadzenia sposobu wspomagania wbudowywania markera cechy tolerancji na glifosat, przy czym cecha tolerancji na glifosat jest genetycznie powiązana do komplementu cząsteczki markerowego kwasu nukleinowego.

14. Cząsteczka DNA według zastrz. 1, **znamienna tym**, że wspomniana cząsteczka DNA jest obecna w roślinie kukurydzy, nasieniu kukurydzy, tkance kukurydzy lub w jądrze komórkowym kukurydzy.

15. Cząsteczka DNA według zastrz. 6, **znamienna tym**, że wspomniana cząsteczka DNA jest obecna w roślinie kukurydzy, nasieniu kukurydzy, tkance kukurydzy lub w jądrze komórkowym kukurydzy.

Rysunek

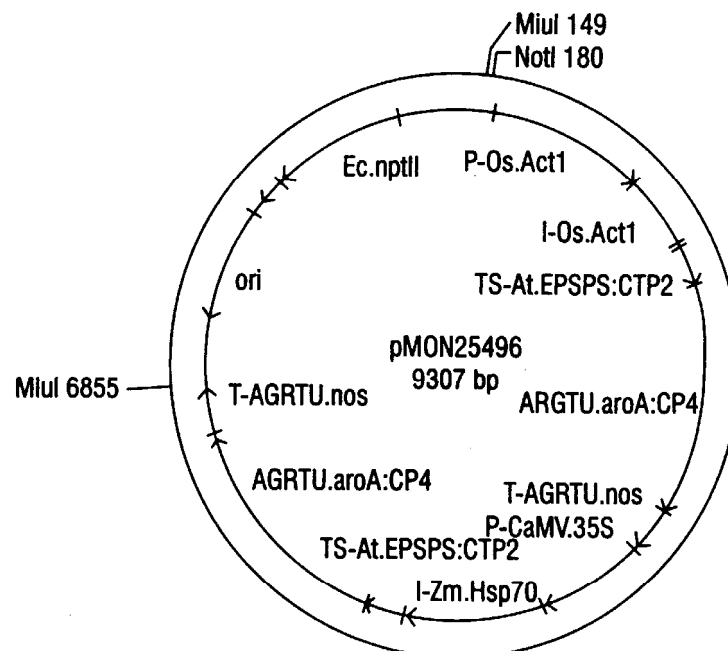


FIG. 1

