

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036015**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.14

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

(21) Номер заявки
201590004

(22) Дата подачи заявки
2013.06.19

(54) РАСТЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДАМ

(31) **61/661,364; 12172557.6**

(32) **2012.06.19**

(33) **US; EP**

(43) **2015.05.29**

(86) **PCT/EP2013/062744**

(87) **WO 2013/189984 2013.12.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАСФ АГРО Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Апонтэ Рафаель, Треш Штефан,
Витшель Маттиас, Лерхль Энс (DE),
Паулик Джиль Мэри, Броммер Чэд
(US), Зайсер Тобиас, Масса Дарио
(DE)**

(74) Представитель:
Юрчак Л.С. (KZ)

(56) X. LI: "Development of Protoporphyrinogen Oxidase as an Efficient Selection Marker for Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Maize", PLANT PHYSIOLOGY, vol. 133, no. 2, 11 September 2003 (2003-09-11), pages 736-747, XP055078106, ISSN: 0032-0889, DOI: 10.1104/pp.103.026245, abstract

US-A1-2010100988

US-A-5939602

HAO GE-FEI ET AL.: "Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitor: An Ideal Target for Herbicide Discovery", CHIMIA, SCHWEIZERISCHE CHEMISCHE GESELLSCHAFT, CH, vol. 65, no. 12, 1 December 2011 (2011-12-01), pages 961-969, XP009172290, ISSN: 0009-4293, abstract; figure 4, Section 3

WO-A2-2011018486

WO-A1-2012080975

(57) Изобретение относится к способу борьбы с нежелательными растениями на месте культивирования растений, включающему стадию обеспечения в указанном месте культивируемого растения, которое содержит как минимум одну нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую мутированную протопорфириноген оксидазу (мут-ППО), которая устойчива или толерантна к ППО ингибирующему гербициду, и стадию применения в указанном месте эффективного количества указанного гербицида, где нуклеотидная последовательность а) включает последовательность SEQ ID NO: 1 или 3 или её вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 3, и где кодированная мут-ППО представляет собой вариант SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором а) аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln и б) аминокислота в позиции 420 представляет собой Val, Met, Ala, Ile Leu. Изобретение далее относится к растениям, имеющим повышенную толерантность к ППО ингибирующим гербицидам, способу борьбы с нежелательными растениями на месте культивирования указанного растения. Также изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей мут-ППО полипептид, к мут-ППО полипептиду, предоставляющему указанному растению повышенную устойчивость или толерантность к ППО ингибирующему гербициду, к клетке трансгенного растения, к трансгенному растению, к семени, произведенному трансгенным растением, которые имеют повышенную устойчивость к ППО-ингибирующему гербициду, к способам получения указанных трансгенных клеток растений и трансгенного растения с повышенной устойчивостью к ППО-ингибирующему гербициду.

036015 B1

036015 B1

Область изобретения

Данное изобретение относится вообще к способам создания у растений сельскохозяйственного уровня толерантности к гербициду. В частности, изобретение относится к растениям, имеющим повышенную толерантность к ППО ингибирующим гербицидам, способу борьбы с нежелательными растениями на месте культивирования указанного растения, содержащего нуклеиновую кислоту согласно изобретению, кодирующую мутированную протопорфириноген оксидазу (мут-ППО). Также изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей мут-ППО полипептид, к мут-ППО полипептиду, предоставляющему указанному растению повышенную устойчивость или толерантность к ППО ингибирующему гербициду, к клетке трансгенного растения, к трансгенному растению, к семени, произведенному трансгенным растением, которые имеют повышенную устойчивость к ППО-ингибирующему гербициду, к способам получения указанных трансгенных клеток растений и трансгенного растения с повышенной устойчивостью к ППО-ингибирующему гербициду.

Предпосылки изобретения

Гербициды, которые ингибируют протопорфириноген оксидазу (на которую здесь ссылаются как на протоке или ППО; ЕС:1.3.3.4), ключевой энзим в биосинтезе протопорфирина IX, используются для селективного контроля сорняков начиная с 1960-х гг. ППО катализирует последнюю общую стадию в биосинтезе хлорофилла и гемма, которая представляет собой окисление протопорфириногена IX в протопорфирин IX. (Matringe et al., 1989, Biochem. 1, 260: 231). ППО ингибирующие гербициды включают много различных структурных классов молекул (Duke et al., 1991, Weed Sci., 39: 465; Nandihalli et al., 1992, Pesticide Biochem. Physiol., 43: 193; Matringe et al., 1989, FEBS Lett., 245: 35; Yanase и Andoh, 1989, Pesticide Biochem. Physiol., 35: 70). Эти гербицидные соединения включают простые дифениловые эфиры {например, лактофен, (+)-2-этокси-1-метил-2-оксоэтил 5-{2-хлор-4-(трифторметил)фенокси}-2-нитробензоат; ацифлуорфен, 5-{2-хлор-4-(трифторметил)фенокси}-2-нитробензойную кислоту; ее сложный метиловый эфир или оксифлуорфен, 2-хлор-1-(3-этокси-4-нитрофенокси)-4-(трифтор-бензол)}, оксидиазолы, (например, оксидиазон, 3-{2,4-дихлор-5-(1-метилэтокси)фенил}-5-(1,1-диметилэтил)-1,3,4-оксидиазол-2-(3H)-он), циклические имиды (например, S-23142, N-(4-хлор-2-фтор-5-пропаргил-оксифенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид; хлорофталим, N-(4-хлорфенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид), фенилпиразолы (например, TNPP-этил, этил 2-{1-(2,3,4-трихлорфенил)-4-нитропиразолил-5-окси}-пропионат; M&B 39279), производные пиридина (например, LS 82-556), и фенопилат и его О-фенилпирролидино- и пиперидинокарбаматные аналоги. Многие из этих соединений конкурентноспособно ингибируют нормальные реакции, катализируемые энзимами, по-видимому действуя как субстратные аналоги.

Применение ППО ингибирующих гербицидов приводит к аккумуляции протопорфириногена IX в хлоропласте и митохондри, про который полагают, что он утекает в цитозол, где он окисляется пероксидазой. Если экспонировать на свету, протопорфирин IX вызывает образование синглетного кислорода в цитозоле и образование других реакционных кислородных частиц, которые могут вызывать пероксидацию липида и разрыв мембран, вызывающий быструю гибель клетки (Lee et al., 1993, Plant Physiol., 102:881).

Не все ППО энзимы являются чувствительными к гербицидам, которые ингибируют растительные ППО энзимы. Как *Escherichia coli*, так и *Bacillus subtilis* ППО энзимы (Sasarmen et al., 1993, Can. J. Microbiol., 39: 1155; Dailey et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 813) являются устойчивыми к этим гербицидным ингибиторам. Сообщалось о мутанте одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, устойчивом к фенилимидазному гербициду S-23142 (Kataoka et al., 1990, J. Pesticide Sci., 15:449; Shibata et al., 1992, в Research in Photosynthesis, Vol. III, N. Murata, ed. Kluwer: Netherlands, p. 567-70). Оказалось, что как минимум один из этих мутантов имеет измененную ППО активность, которая приводит к устойчивости не только к гербицидному ингибитору, на котором проводилась селекция мутанта, но также к другим классам протокс ингибиторов (Oshio et al., 1993, Z. Naturforsch., 48c: 339; Sato et al., 1994, в ACS Symposium on Porphyrin Pesticides, S. Duke, ed. ACS Press: Washington, D.C.). Также сообщалось о мутантной линии клеток табака, которая устойчива к ингибитору S-21432 (Che et al., 1993, Z. Naturforsch., 48c: 350). Ауксотрофичные *E.coli* мутанты были использованы для подтверждения устойчивости к гербицидам клонированных растений к ППО ингибирующим гербицидам.

Три главные стратегии доступны для производства растений, толерантных к гербицидам, т.е. (1) детоксифицирование гербицида с помощью энзима, который трансформирует гербицид или его активный метаболит в нетоксичные продукты, такие как, например, энзимы толерантности к бромоксинилу или к баста (EP 242236, EP 337899); (2) мутирование мишенного энзима в функциональный энзим, который менее чувствителен к гербициду или к его активному метаболиту, таких как, например, энзимы для толерантности к глифосату (EP 293356, Padgett S.R. et al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991); или (3) сверхэкспрессирование чувствительного энзима таким образом, чтобы получить количества мишенного энзима в растении, которого достаточно по отношению к гербициду, с учетом кинетических констант этого энзима, так что имеется достаточно доступного функционального энзима, несмотря на присутствие его ингибитора. Третья стратегия была описана для успешного получения растений, которые были толерантными к ППО ингибиторам (см., например, US 5767373 или US 5939602 и члены их патентной семьи).

Кроме того, в US 2010/0100988 и WO 2007/024739 раскрыты нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности, которые имеют такую энзиматическую активность, что аминокислотная последовательность является устойчивой к ППО ингибиторному гербицидному химикату, в частности к 3-фенилурасил ингибитору специфические ППО мутанты.

До настоящего времени не были описаны толерантные к ППО-гербициду растения, содержащие как минимум одну дикого типа или мутированную ППО нуклеиновую кислоту согласно данному изобретению. Ранее не были описаны толерантные к ППО ингибирующему гербициду сельскохозяйственные растения, содержащие мутацию на геномах, отличных от генома, из которого был получен ППО ген. Поэтому то, что требуется специалистам, состоит в идентификации генов толерантности к ППО ингибирующему гербициду из дополнительных геномов и видов. В чем также есть необходимость в настоящее время, так это сельскохозяйственные растения, имеющие повышенную толерантность к гербицидам, таким как ППО ингибирующие гербициды, и содержащие как минимум одну дикого типа и/или мутированную ППО нуклеиновую кислоту. Также необходимы способы контроля роста сорняков по соседству с такими сельскохозяйственными растениями. Эти композиции и способы позволят использовать технику для спреев, когда применяют гербициды на площадях, содержащих сельскохозяйственные растения, или на сельскохозяйственные растения.

Краткий обзор изобретения

Эта проблема решается с помощью данного изобретения, которое относится к способу борьбы с нежелательными растениями на месте культивирования растения, включающему следующие стадии:

(a) обеспечение в указанном месте культивируемого растения, которое содержит как минимум одну нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую мутированную протопорфириноген оксидазу (мут-ППО), которая устойчива или толерантна к ППО ингибирующему гербициду; и

(b) применение в указанном месте эффективного количества указанного гербицида,

где нуклеотидная последовательность включает последовательность SEQ ID NO: 1 или 3 или её вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 3, и где кодированная мут-ППО представляет собой вариант SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором а) аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln и b) аминокислота в позиции 420 представляет собой Val, Met, Ala, Ile или Leu.

Другой объект изобретения относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей мут-ППО полипептид, причем нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3 или её вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 3, и где кодированный мут-ППО представляет собой вариант SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln и аминокислота в позиции 420 представляет собой Val, Met, Ala, Ile или Leu.

Другой объект изобретения относится к мут-ППО полипептиду, включающему последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором аминокислота в позиции 420 представляет собой Ala, Leu, Ile или Val и аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln, причем указанный мут-ППО полипептид предоставляет растению повышенную устойчивость или толерантность к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с диким типом растения.

Другой объект изобретения относится к клетке трансгенного растения, трансформированной вышеуказанной нуклеиновой кислотой, причем клетка обладает повышенной устойчивостью к ППО-ингибирующему гербициду по сравнению с клеткой дикого типа растения. Другой объект изобретения относится к трансгенному растению, содержащему указанную клетку растения, в котором экспрессия мут-ППО полипептида, кодирующего нуклеиновую кислоту в растении, приводит к повышенной устойчивости растения к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с диким типом растения.

Другой объект данного изобретения относится к трансгенному растению, содержащему вышеуказанную клетку, в котором экспрессия мут-ППО полипептида, кодирующего нуклеиновую кислоту в растении, приводит к повышенной устойчивости растения к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с диким типом растения.

Другим объектом изобретения является растение, которое экспрессирует мутагенизированный или рекомбинантный мут-ППО полипептид, включающий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором аминокислота в позиции 420 представляет собой Met или Val и аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln, и где указанная мут-ППО придает растению повышенную толерантность к гербициду по сравнению с соответствующим вариантом дикого типа растения, когда проводят его экспрессию.

Растения данного изобретения могут быть трансгенными или нетрансгенными.

Предпочтительно экспрессия нуклеиновой кислоты данного изобретения в растении приводит к повышенной устойчивости растений к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа растения.

Другой объект данного изобретения относится к семени, произведенному трансгенным растением, содержащим клетку растения данного изобретения, или вышеуказанным растением, причем семя является чистосортным, для повышенной устойчивости к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа семени.

Другой объект данного изобретения относится к способу получения трансгенных клеток растений с повышенной устойчивостью к ППО ингибирующим гербицидам по сравнению с вариантом дикого типа клетки растения, включающему трансформирование клетки растения с помощью экспрессионной кассеты, включающей вышеуказанную нуклеиновую кислоту.

Другой объект данного изобретения относится к способу получения трансгенного растения, включающему (а) трансформирование клетки растения с помощью экспрессионной кассеты, включающей вышеуказанную нуклеиновую кислоту, и (б) создание растения с повышенной устойчивостью к ППО ингибирующему гербициду из клетки растения.

Предпочтительно экспрессионная кассета дополнительно включает регуляторную область инициации транскрипции и регуляторную область иницирования трансляции, которые являются функциональными в растении.

Изобретение также может быть воплощено в очищенные мут-ППО белки, которые включают описанные здесь мутации, которые полезны при исследованиях с молекулярным моделированием, предназначенных для дальнейшего улучшения толерантности к гербициду. Способы очистки белков хорошо известны и могут быть легко проведены с использованием имеющихся в продаже веществ или специально предназначенных способов, как предложено, например, в книге Protein Biotechnology, Walsh и Headon (Wiley, 1994).

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано выравнивание аминокислотных последовательностей *Amaranthus tuberculatus* (*A.tuberculatus*), *Amaranthus tuberculatus* устойчивой (*A.tuberculatus* R), *Arabidopsis thaliana* длинной (*A.thaliana* 2), *Spinacia oleracea* короткой (*S.oleracea* 2), *Nicotiana tabacum* короткой (*N.tabacum* 2), *Glycine max* (*Glycine max*), *Arabidopsis thaliana* короткой (*A.thaliana* 1), *Nicotiana tabacum* длинной (*N.tabacum* 1), *Chlamydomonas reinhardtii* длинной (*C. reinhardtii* 1), *Zea mays* (*Z.mays*), *Oryza sativa* (*O.sativa* 1), *Solanum tuberosum* (*S.tuberosum*), *Cucumis sativus* (*C.sativus*), *Cichorium intybus* (*C.intybus* 1), *Spinacia oleracea* длинной (*S.oleracea* 1), *Polytomella* sp. Pringsheim 198.80 (*Polytomella*) ППО последовательностей. Сохраненные области показаны в виде светло-серых, серых и черных.

На фиг. 2 показана селекция штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*, устойчивых к ППО ингибирующему гербициду 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диону (CAS 1258836-72-4).

(А) Мутагенизированные клетки помещают слоем на твердую среду без селекционного агента.

(В) Мутагенизированные клетки помещают слоем на твердую среду, содержащую 1×10^{-7} М ППО ингибирующего гербицида 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диона (CAS 1258836-72-4).

Клетки, которые устойчивы к ППО ингибирующему гербициду, образуют колонии (обведенные кружком и пронумерованные 31 и 32), в то время как чувствительные клетки не растут. Большее число колоний на пластине А по сравнению с пластиной В, указывает на то, что колонии на пластине В устойчивы к ППО ингибирующему гербициду 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диону (CAS 1258836-72-4).

На фиг. 3 показаны ростовые характеристики отобранных штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*, как видно из фиг. 2 устойчивых к ППО ингибирующему гербициду 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диону (CAS 1258836-72-4).

(А) Кривая зависимости от дозы для клеток дикого типа, обработанных ППО ингибирующим гербицидом 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дионом (CAS 1258836-72-4) с соответственной IC_{50} .

(В) Кривая зависимости от дозы для мутагенизированных клеток (штамм 17), обработанных ППО ингибирующим гербицидом 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дионом (CAS 1258836-72-4) с соответственной IC_{50} . Штамм 17 (В), устойчивый к ППО ингибирующему гербициду 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диону (CAS 1258836-72-4), показывает значительно более низкий IC_{50} по сравнению с диким типом клеток.

На фиг. 4 показаны дикого типа и трансгенные Т1 растения соя-бобов, обработанные указанным расходом количеством спрея (г а.и./га) ППО ингибирующего гербицида с 1% MSO.

А: означает дикого типа растение соя-бобов.

В: означает растение соя-бобов, трансформированное нуклеиновой кислотой, кодирующей

мут-ППО SEQ ID NO: 2, в которой лейцин в позиции 397 замещен на аспарагиновую кислоту и фенилаланин в позиции 420 замещен на валин.

1 означает не обработанный спреем,

2 означает обработанный 150 г сафлуфенацила,

3 означает обработанный 100 г 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диона (CAS 1258836-72-4),

4 означает обработанный 150 г флумиоксазина,

5 означает обработанный 600 г фомесафена.

Таблица 1

Ключ к списку последовательностей

П О С Л . И Д №:	О п и с а н и е	О р г а н и з м	Г е н	№ д о с т у п а
1	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	PPX2L_WC	DQ386114
2	П П О а м и н о к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	ABD52326	
3	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	PPX2L_AC	DQ386117
4	П П О а м и н о к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	ABD52329	
5	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	PPX2L_CC_R	DQ386118
6	П П О а м и н о к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	ABD52330	
7	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	PPX2L_AC_R	DQ386116
8	П П О а м и н о к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	ABD52328	
9	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Arabidopsis	PPX	AB007650
10	П П О а м и н о к и с л о т а	Arabidopsis	BAB08301	
11	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Nicotiana (т а б а к)	ppxl	AF044128
12	П П О а м и н о к и с л о т а	Nicotiana (т а б а к)	AAD02290	
13	П П О н у к л е и н о в а я	Cichorium (ц и к о р и й)	PPX1	AF160961

	к и с л о т а			
14	П П О а м и н о к и с л о т а	Cichorium (ц и к о р и й)	AF160961_1	
15	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Spinacia (ш п и н а т)	SO-POX1	AB029492
16	П П О а м и н о к и с л о т а	Spinacia (ш п и н а т)	BAA96808	
17	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Spinacia (ш п и н а т)	SO-POX2	AB046993
18	П П О а м и н о к и с л о т а	Spinacia (ш п и н а т)	BAB60710	
19	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Solanum	П П О X	AJ225107
20	П П О а м и н о к и с л о т а	Solanum	CAA12400	
21	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Zea (к у к у р у з а)	ZM_BFc0091B03	BT063659
22	П П О а м и н о к и с л о т а	Zea (к у к у р у з а)	ACN28356	
23	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Zea (к у к у р у з а)	prpo2	NM_001111534
24	П П О а м и н о к и с л о т а	Zea (к у к у р у з а)	NP_001105004	
25	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Chlamydomonas	Ppx1	AF068635
26	П П О а м и н о к и с л о т а	Chlamydomonas	AAC79685	
27	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Polytomella	П П О	AF332964
28	П П О а м и н о к и с л о т а	Polytomella	AF332964_1	
29	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Sorghum (с о р г о)	Hyp. Protein	XM_002446665
30	П П О а м и н о к и с л о т а	Sorghum (с о р г о)	XP_002446710	
31	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Chlorella (х л о р е л л а)		

32	П П О а м и н о к и с л о т а	Chlorella (х л о р е л л а)		51538
33	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Oryza	П П О X1	AB057771
34	П П О а м и н о к и с л о т а	Oryza	BAB39760	
35	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	PPX2	DQ386113
36	П П О а м и н о к и с л о т а	Amaranthus (а м а р а н т)	ABD52325	
37	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Arabidopsis (а м а р а н т)	П П О X	NM_178952
38	П П О а м и н о к и с л о т а	Arabidopsis	NP_849283	
39	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Nicotiana (т а б а к)	ppxII	AF044129
40	П П О а м и н о к и с л о т а	Nicotiana (т а б а к)	AAD02291	
41	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Glycine (с о я)	hemG	AB025102
42	П П О а м и н о к и с л о т а	Glycine (с о я)	BAA76348	
43	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Cucumis	CsП П О	AB512426
44	П П О а м и н о к и с л о т а	Cucumis	BAH84864.1	
45	П П О н у к л е и н о в а я к и с л о т а	Oryza (р и с)	Hyp. Protein	AL606613
46	П П О а м и н о к и с л о т а	Oryza (р и с)	CAE01661	

Подробное описание

Используемые в описании и прилагаемых пунктах изобретения формы в единственном числе включают также ссылки на них во множественном числе, если контекст не указывает явно иное, например, выражение включающий в себя, состоит, состоит из следует понимать как включение указанного элемента, целого или стадии, или группы элементов, целых или стадий, однако не означает исключение любого другого элемента, целого или стадии, или любой другой группы элементов, целых или стадий.

Данное изобретение относится к способу контроля нежелательной вегетации в месте культивирования растений, этот способ включает стадии:

(а) обеспечение в указанном месте растения, которое содержит как минимум одну нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую дикий тип протопорфириноген оксидазы или мутированную протопорфириноген оксидазу (мут-ППО), которое устойчиво или толерантно к ППО ингибирующему гербициду;

(b) применение в указанном месте эффективного количества указанного гербицида.

Термин "контроль нежелательной вегетации" следует понимать как означающий уничтожение сорняков и/или иные действия, замедляющие или ингибирующие нормальный рост сорняков. Под сорняками в широком понимании этого слова следует понимать такие растения, которые произрастают в местах, где они нежелательны. Сорняки согласно данному изобретению включают, например, двудольные и однодольные сорняки.

Двудольные сорняки включают, но не ограничиваются ими, сорняки родов: Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus и Taraxacum.

Однодольные сорняки включают, но не ограничиваются ими, сорняки родов: Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus и Apera.

Кроме того, сорняки согласно данному изобретению могут включать, например, сельскохозяйственные растения, которые произрастают в нежелательных местах. Например, случайное растение кукурузы, которое находится в поле, на котором растут преобладающие растения соя-бобов, можно рассматривать как сорняк, если растение кукурузы нежелательно на поле растений соя-бобов.

Термин "растение" используется в самом широком смысле, насколько оно относится к органическому материалу, и подразумевает включение в себя эукариотических организмов, которые являются членами царства растений, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, сосудистые растения, овощи, зерновые культуры, цветы, деревья, травы, кустарники, листовые травы, виноград, папоротники, мхи, грибы и водоросли, и т.д., а также клоны, ответвления и части растений, используемые для бесполого размножения (т.е. черенки, дудки, ростки, корневища, подземные стволы, чурбаки, венцы, луковицы, клубнелуковицы, клубни, ризомы, растения/ткани произведенные в тканевой структуре и т.д.). Термин "растение" далее охватывает растения целиком, предков и потомков растений и части растений, включая семена, всходы, стволы, листья, корни (включая клубни), цветы, цветочки, плоды, цветоножки, стебельки, тычинки, пыльники, рыльца, пестики, завязи, лепестки, чашелистики, плодолистики, верхушку корня, шапку корня, волоски корня, волоски листьев, волоски семян, пыльцу зерна, микроспору, семяздолю, гипокотиль, эпикотиль, ксилему, флоэму, паренхиму, эндосперм, спутниковую клетку, охранную клетку и любые другие известные органы, ткани и клетки растения и ткани и органы, причем каждый из вышеупомянутых содержит представляющую интерес ген/нуклеиновую кислоту. Термин "растение" также охватывает клетки растения, суспензионные культуры, мозолевые ткани, эмбрионы, меристематическую область, гаметофиты, спорофиты, цветочную пыльцу и микроспоры, опять же, причем каждый из вышеупомянутых содержит представляющую интерес ген/нуклеиновую кислоту.

Растения, которые особенно полезны в способах данного изобретения, включают все растения, которые принадлежат к надсемейству Viridiplantae, в частности однодольные и двудольные растения, включая пищевые или фуражные бобы, декоративные растения, сельскохозяйственные культуры, деревья или кустарники, выбираемые из списка, который включает *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (т.е. *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (т.е. *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [канола, рапс с маслянистыми семенами, турнепс]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (т.е. *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (т.е. *Glycine max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (т.е. *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (т.е. *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (т.е. *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (т.е. *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (т.е. *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* или *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaui*, *Triticum* spp. (т.е. *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* или *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., амарант, артишок, спаржа, брокколи, брюссельская капуста, капуста кочанная, канола, морковь, капуста цветная, сельдерей, collard greens, лен, капуста кормовая, чечевица, масличный рапс, окра, лук, картофель, рис, соя-бобы, клубника, сахарная свекла, сахарный тростник, подсолнечник, томаты, тыква, чай и водоросли, среди других.

Согласно предпочтительному варианту данного изобретения растение представляет сельскохозяйственное растение. Примеры сельскохозяйственных растений включают среди других соя-бобы, подсолнечник, канолу, люцерну, семенной рапс, хлопчатник, томаты, картофель или табак. Далее предпочти-

тельно, что растение является однодольным растением, таким как сахарный тростник. Далее предпочтительно, что растение является зерновой культурой, такой как рис, кукуруза, пшеница, ячмень, просо, рожь, сорго или овес.

В предпочтительном варианте растение было предварительно получено способом, включающим рекомбинантное препарирование растения путем введения и сверхэкспрессии дикого типа или мут-ППО трансгена согласно данному изобретению, как более детально описано ниже.

В другом предпочтительном варианте растение было предварительно получено способом, включающим *in situ* мутагенизирование клеток растения для получения клеток растения, которые экспрессируют мут-ППО.

Как раскрыто здесь, нуклеиновые кислоты данного изобретения находят применение для увеличения толерантности к гербицидам у растений, которые содержат в своих геномах ген, кодирующий толерантность к гербициду в диком типе или мут-ППО белке. Такой ген может быть эндогенным геном или трансгеном, как описано ниже. Кроме того, в некоторых вариантах нуклеиновые кислоты данного изобретения могут быть перетасованы с любой комбинацией полинуклеотидных последовательностей, представляющих интерес, для того чтобы создать растения с желательным фенотипом. Например, нуклеиновые кислоты данного изобретения могут быть перетасованы с любым другим полинуклеотидом, кодирующим полипептиды, имеющие пестицидную и/или инсектицидную активность, такие как, например, *Bacillus thuringiensis* токсинные белки (описанные в патентах U.S. 5366892; 5747450; 5737514; 5,723,756; 5593881 и в статье Geiser et al., (1986), Gene 48: 109), 5-энолпирувиллицилат-3-фосфат синтаза (EPSPS), глифосат ацетил трансфераза (GAT), цитохром P450 монооксигеназа, фосфинотрицин ацетил трансфераза (PAT), ацетогидрокси кислоты синтаза (AHAS; EC 4.1.3.18, также известная как ацетолактат синтаза или ALS), гидроксифенил пируват диоксигеназа (HPPD), фитоен десатураза (PD) и диамбу, разрушающие энзимы, как раскрыто в WO 02/068607, или феноксиуксусную кислоту и феноксипропионовую кислоту, разрушающие энзимы, как раскрыто в WO 2008/141154 или WO 2005/107437. Созданные комбинации могут также включать многократные копии любого из представляющих интерес нуклеотидов.

Как правило, термин "гербицид", используемый здесь, означает активный ингредиент, который убивает, контролирует или другим образом неблагоприятно модифицирует рост растений.

Предпочтительное количество или концентрация гербицида является "эффективным количеством" или "эффективной концентрацией." Под "эффективным количеством" и "эффективной концентрацией" подразумевается количество и концентрация соответственно, которое достаточно для убивания или ингибирования роста подобных дикого типа растений, тканей растений, клеток растений или клеток хозяина, однако это указанное количество не должно убивать или опасно ингибировать рост устойчивых к гербициду растений, тканей растений, клеток растений или клеток хозяина данного изобретения. Типично, эффективное количество гербицида является количеством, которое рутинно применяется в системе сельскохозяйственного производства для уничтожения представляющих интерес сорняков. Такие количества известны специалистам. Гербицидная активность проявляется гербицидами, полезными в данном изобретении, когда их применяют непосредственно на растение или на место роста растения на любой стадии роста, или перед посадкой или всходами. Наблюдаемый эффект зависит от подлежащего контролю вида растений, стадии роста растения, параметрам применения разбавления и размеров капель спрея, размеров частиц твердых компонентов, условий окружающей среды во время применения, специфичных применяемых соединений, специфичных вспомогательных средств и применяемых носителей, типа почвы и т.п., а также от количества применяемого химического препарата. Эти и другие факторы могут быть подогнаны, как известно специалистам, для способствования неселективному или селективному гербицидному действию. Как правило, предпочтительно применение гербицидов после всходов на относительно незрелую нежелательную вегетацию для достижения максимального контроля сорняков.

Под "толерантным к гербициду" или "устойчивым к гербициду" растением подразумевают растение, которое является толерантным или устойчивым как минимум к одному гербициду при уровне, который будет нормально убивать или ингибировать рост нормального или дикого типа растения. Под "толерантным к гербициду диким типом или мут-ППО белком" или "устойчивым к гербициду диким типом или мут-ППО белком" подразумевается, что ППО белок показывает более высокую ППО активность по отношению к ППО активности дикого типа ППО белка, если в присутствии как минимум одного гербицида, о котором известно, что он вмешивается в ППО активность, и при концентрации или уровне гербицида, о которой известно, что она ингибирует ППО активность дикого типа и мут-ППО белка. Кроме того, ППО активность такого толерантного к гербициду или устойчивого к гербициду мут-ППО белка может быть здесь отнесена к "толерантной к гербициду" или "устойчивой к гербициду" ППО активности.

Как правило, если ППО ингибирующие гербициды А и/или гербицидные соединения В, как описано здесь, которые могут быть применены в контексте данного изобретения, способны образовать геометрические изомеры, например Е/З изомеры, то возможно применение как чистых изомеров, так и их смесей в композициях согласно данному изобретению. Если ППО ингибирующие гербициды А и/или гербицидные соединения В, как описано здесь, имеют один или несколько хиральных центров и, как следствие, присутствуют как энантиомеры, так и диастереомеры, то можно применять как чистые энантиомеры и диастереомеры, так и их смеси в композициях согласно данному изобретению. Если ППО ингибирую-

щие гербициды А и/или гербицидные соединения В, как описано здесь, имеют ионизируемые функциональные группы, то их можно также применять в виде их сельскохозяйственно приемлемых солей. Пригодными являются, как правило, соли таких катионов и соли присоединения к кислотам таких кислот, чьи катионы и анионы соответственно не оказывают вредного эффекта на активность активных соединений. Предпочтительными катионами являются ионы щелочных металлов, предпочтительно лития, натрия и калия, щелочноземельных металлов, предпочтительно кальция и магния, и переходных металлов, предпочтительно марганца, меди, цинка и железа, далее аммония и замещенного аммония, в котором один из четырех водородных атомов замещен на (C₁-C₄)алкил, гидрокси(C₁-C₄)алкил, (C₁-C₄)алкокси-(C₁-C₄)алкил, гидрокси(C₁-C₄)алкокси-(C₁-C₄)алкил, фенил или бензил, предпочтительно аммоний, метиламмоний, изопропиламмоний, диметиламмоний, диизопропиламмоний, триметиламмоний, гептиламмоний, додециламмоний, тетрадециламмоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, тетрабутиламмоний, 2-гидроксиэтиламмоний (оламиновая соль), 2-(2-гидроксиэтил-1-окси)этил-1-иламмоний (дигликольаминовая соль), ди(2-гидроксиэтил-1-ил)аммоний (диоламиновая соль), трис-(2-гидроксиэтил)-аммоний (троламиновая соль), трис-(2-гидроксипропил)аммоний, бензилтриметиламмоний, бензилтриэтиламмоний, N,N,N-триметилэтаноламмоний (холиновая соль), кроме того, фосфониевые ионы, сульфониевые ионы, предпочтительно три((C₁-C₄)алкил)сульфоний, такой как триметилсульфоний, и сульфоксониевые ионы, предпочтительно три((C₁-C₄)алкил)сульфоксоний, и, наконец, соли полиосновных аминов, такие как N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин и диэтилентриамин. Анионами полезных солей присоединения к кислотам являются в первую очередь хлориды, бромиды, фториды, йодиды, гидросульфаты, метилсульфаты, сульфаты, дигидрофосфаты, гидрофосфаты, нитраты, бикарбонаты, карбонаты, гексафторсиликат, гексафторфосфат, бензоат, а также анионы (C₁-C₄)алкановых кислот, предпочтительно формат, ацетат, пропионат и бутират.

ППО ингибирующие гербициды А и/или гербицидные соединения В, как описано здесь, имеющие карбоксильную группу, могут применяться в виде кислоты, в виде сельскохозяйственно приемлемой соли, как сказано выше, или в виде сельскохозяйственно приемлемого производного, например в виде амида, такого как моно- или ди(C₁-C₆)алкиламида или ариламида, в виде сложного эфира, например в виде аллилового сложного эфира, пропаргилового сложного эфира, (C₁-C₁₀)алкилового сложного эфира, алкоксиалкилового сложного эфира, тефуриловых ((тетрагидрофуран-2-ил)метилового) сложных эфиров, а также сложных тиоэфиров, например в виде сложных (C₁-C₁₀)алкилтиоэфиров. Предпочтительными моно- и ди(C₁-C₆)алкиламидами являются метил- и диметиламида. Предпочтительными ариламидами являются, например, анилиды и 2-хлоранилиды. Предпочтительными сложными алкиловыми эфирами являются, например, метиловый, этиловый, пропиловый, изопропиловый, бутиловый, изобутиловый, пентиловый, мексильный (1-метилгексильный), мептиловый (1-метилгептиловый), гептиловый, октиловый или изооктиловый (2-этилгексильный) сложный эфир. Предпочтительными сложными (C₁-C₄)алкокси-(C₁-C₄)алкиловыми эфирами являются линейные или разветвленные сложные (C₁-C₄)алкоксиэтиловые эфиры, например сложный 2-метоксиэтиловый, 2-этоксиэтиловый, 2-бутоксиэтиловый (бутотильный), 2-бутоксипропиловый или 3-бутоксипропиловый эфир. Примером линейного или разветвленного сложного (C₁-C₁₀)алкилтиоэфира является сложный этилтиоэфир.

Примерами ППО ингибирующих гербицидов, которые могут быть использованы согласно данному изобретению, являются

ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бифенокс, бутафенацил, карфентразон, карфентразон-этил, хлometоксифен, цинидон-этил, флуазолат, флуфенпир, флуфенпир-этил, флумиклорак, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, флуорогликофен, флуорогликофен-этил, флутиацет, флутиацет-метил, фомесафен, галосафен, лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифлуорфен, пентоксазон, профлуазол, пираклонил, пирафлуфен, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон, тидиазимин, тиафенацил, хлорнитрофен, флумипроп, флуоронитрофен, флупропацил, фурилоксифен, нитрофлуорфен,

этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридил-окси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100),

N-этил-3-2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9),

N-тетрагидрофурурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметил-фенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9),

N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7),

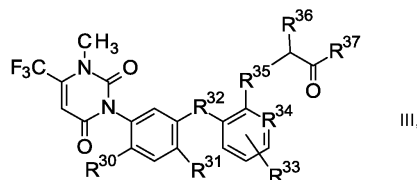
N-тетрагидрофурурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7),

3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион (CAS 451484-50-7),

1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]-оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4),

2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидроизоиндол-1,3-дион (CAS 1300118-96-0),

1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион,
 метил (Е)-4-[2-хлор-5-[4-хлор-5-(дифторметокси)-1Н-метилпиразол-3-ил]-4-фторфенокси]-3-метоксибут-2-еноат [CAS 948893-00-3],
 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1Н-пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4)
 и урацилы формулы III



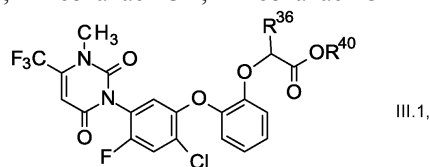
где R^{30} и R^{31} независимо один от другого означают F, Cl или CN;
 R^{32} означает O или S;
 R^{33} означает H, F, Cl, CH_3 или OCH_3 ;
 R^{34} означает CH или N;
 R^{35} означает O или S;
 R^{36} означает H, CN, CH_3 , CF_3 , OCH_3 , OC_2H_5 , SCH_3 , SC_2H_5 , $(CO)OC_2H_5$ или CH_2R^{38} , где R^{38} означает F, Cl, OCH_3 , SCH_3 , SC_2H_5 , CH_2F , CH_2Br или CH_2OH ;
 R^{37} означает (C_1-C_6) -алкиламино-, (C_1-C_6) -диалкиламиногруппу, $(NH)OR^{39}$, OH, OR^{40} или SR^{40} ,
 где R^{39} означает CH_3 , C_2H_5 или фенил;
 R^{40} означают независимо один от другого (C_1-C_6) -алкил, (C_2-C_6) -алкенил, (C_3-C_6) -алкинил, (C_1-C_6) -галоидалкил, (C_1-C_6) -алкокси (C_1-C_6) -алкил, (C_1-C_6) -алкокси (C_1-C_6) -алкокси (C_1-C_6) -алкил, (C_2-C_6) -цианоалкил, (C_1-C_4) -алкоксикарбонил (C_1-C_4) -алкил, (C_1-C_4) -алкилкарбониламиногруппу, (C_1-C_6) -алкилсульфинил (C_1-C_6) -алкил, (C_1-C_6) -алкилсульфонил (C_1-C_6) -алкил, (C_1-C_6) -диалкокси (C_1-C_6) -алкил, (C_1-C_6) -алкилкарбонилокси (C_1-C_6) -алкил, фенилкарбонил (C_1-C_6) -алкил, три $((C_1-C_3)$ -алкил)силил (C_1-C_6) -алкил, три $((C_1-C_3)$ -алкил)силил (C_1-C_6) -алкенил, три $((C_1-C_3)$ -алкил)силил (C_1-C_6) -алкинил, три $((C_1-C_3)$ -алкил)силил (C_1-C_6) -алкокси (C_1-C_6) -алкил, диметиламиногруппу, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил (C_1-C_3) -алкил, фенил (C_1-C_6) -алкокси (C_1-C_6) -алкил, фенил (C_1-C_3) -алкил, пиридил (C_1-C_3) -алкил, пиридил, фенил,
 причем пиридины и фенилы независимо один от другого замещены от одного до пяти заместителями, выбираемыми из группы, включающей галоид, (C_1-C_3) -алкил или (C_1-C_2) -галоидалкил; (C_3-C_6) -циклоалкил или (C_3-C_6) -циклоалкил (C_1-C_4) -алкил,

причем циклоалкилы независимо один от другого не замещены или замещены от одного до пяти заместителями, выбираемыми из группы, включающей галоид, (C_1-C_3) -алкил и (C_1-C_2) -галоидалкил, включая их сельскохозяйственно приемлемые соли щелочных металлов или аммониевые соли.

К предпочтительным ППО ингибирующим гербицидам, которые можно применять согласно данному изобретению относятся:

ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон,
 бензфендизон, бутафенацил, карфентразон-этил, цинидон-этил, флуфенпир-этил, флумиклорак-
 пентил, флумиоксазин, флуорогликофен-этил, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, ок-
 садиазон, оксифлуорфен, пентоксазон, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон,
 этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-
 ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100),
 N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-
 92-9),
 N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-
 карбоксамид (CAS 915396-43-9),
 N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифтор-метилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS
 452099-05-7),
 N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметил-фенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-
 карбоксамид (CAS 452100-03-7),
 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-
 [1,3,5]триазиан-2,4-дион (CAS 451484-50-7),
 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-
 бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4),
 2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-
 тетрагидроизоиндол-1,3-дион (CAS 1300118-96-0),
 1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-
 6-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион (CAS 1304113-05-0),
 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1Н-
 пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4) и

урацилы формулы III.1 (соответствующие урацилам формулы III, где R^{30} означает F; R^{31} означает Cl; R^{32} означает O; R^{33} означает H; R^{34} означает CH; R^{35} означает O и R^{37} означает OR^{40}):

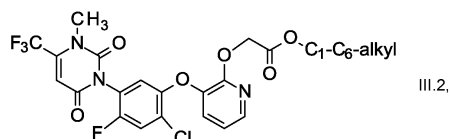


где R^{36} означает OCH_3 , OC_2H_5 , SCH_3 или SC_2H_5 ;

R^{40} означает (C_1-C_6) алкил, (C_2-C_6) алкенил, (C_3-C_6) алкинил, (C_1-C_6) галоидалкил, (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкил, (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкил, (C_1-C_3) цианоалкил, фенил (C_1-C_3) алкил, пиридил (C_1-C_3) алкил, (C_3-C_6) циклоалкил или (C_3-C_6) циклоалкил (C_1-C_4) алкил,

причем циклоалкилы не замещены или замещены от одного до пяти заместителями, выбираемыми из группы, включающей галоид, (C_1-C_3) алкил и (C_1-C_2) галоидалкил; и

урацилы формулы III.2 (соответствующие урацилам формулы III, где R^{30} означает F; R^{31} означает Cl; R^{32} означает O; R^{33} означает H; R^{34} означает N; R^{35} означает O и R^{37} означает OR^{40} , где R^{40} означает (C_1-C_6) алкил):



Более предпочтительными ППО ингибирующими гербицидами, которые могут применяться согласно данному изобретению, являются:

ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, карфентразоне-этил, цинидон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон,

этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)феноксид]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100),

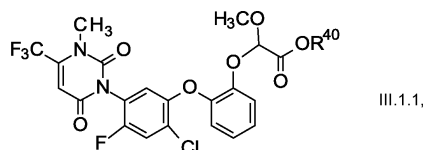
3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион (CAS 451484-50-7),

1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4),

2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидроизоиндол-1,3-дион (CAS 1300118-96-0),

1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион (CAS 1304113-05-0) и

урацилы формулы III.1.1 (соответствующие урацилам формулы III, где R^{30} означает F; R^{31} означает Cl; R^{32} означает O; R^{33} означает H; R^{34} означает CH; R^{35} означает O; R^{36} означает OCH_3 и R^{37} означает OR^{40}):

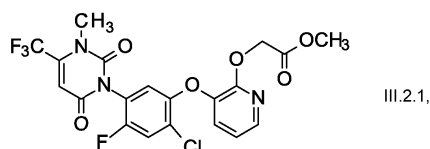


где R^{40} означает (C_1-C_6) алкил, (C_2-C_6) алкенил, (C_3-C_6) алкинил, (C_1-C_6) галоидалкил, (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкил, (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкил, (C_1-C_3) цианоалкил, фенил (C_1-C_3) алкил, пиридил (C_1-C_3) алкил, (C_3-C_6) циклоалкил или (C_3-C_6) циклоалкил (C_1-C_4) алкил,

причем циклоалкилы не замещены или замещены от одного до пяти заместителями, выбираемыми из группы, включающей галоид, (C_1-C_3) алкил и (C_1-C_2) галоидалкил;

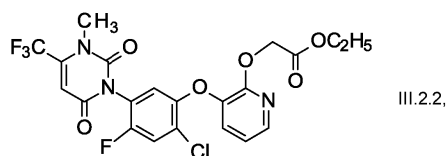
означает предпочтительно CH_3 , $CH_2CH_2OC_2H_5$, CH_2CHF_2 , циклогексил, (1-метилциклопропил)-метил или CH_2 (пиридин-4-ил);

урацилы формулы III.2.1 (соответствующие урацилам формулы III, где R^{30} означает F; R^{31} означает Cl; R^{32} означает O; R^{33} означает H; R^{34} означает N; R^{35} означает O и R^{37} означает OR^{40} , где R^{40} означает CH_3):



и урацилы формулы III.2.2 (соответствующие урацилам формулы III, где R^{30} означает F; R^{31} означа-

ет Cl; R³² означает O; R³³ означает H; R³⁴ означает N; R³⁵ означает O и R³⁷ означает OR⁴⁰, где R⁴⁰ означает C₂H₅):



Особенно предпочтительными ППО ингибирующими гербицидами являются ППО ингибирующие гербициды A.1 - A.14 приведенные в табл. А.

Таблица А

A.1	Ацифлуорфен
A.2	Бутафенацил
A.3	Карфентразон-этил
A.4	Цинидон-этил
A.5	Флумиоксазин
A.6	флутиацет-метил
A.7	Фомесафен
A.8	Лактофен
A.9	Оксадиаргил
A.10	Оксифлуорфен
A.11	Сафлуфенацил
A.12	Сульфентразон
A.13	Этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидро-пиримидин-3-ил)феноксид]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6)
A.14	1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4)

ППО ингибирующие гербициды, описанные выше, которые полезны при осуществлении данного изобретения, часто лучше применять в сочетании с одним или более других гербицидов для обеспечения контроля более широкого разнообразия нежелательной вегетации. Например, ППО ингибирующие гербициды могут далее применяться в сочетании с дополнительными гербицидами, к которым сельскохозяйственное растение естественно толерантно или к которым оно устойчиво через экспрессию одного или более дополнительных трансгенов, как отмечено выше. В случае, когда применяют в сочетании с другими нацеленными гербицидами, заявленные теперь соединения могут быть приготовлены в виде препарата с другим гербицидом или другими гербицидами, в виде смеси в большом резервуаре с другим гербицидом или другими гербицидами или применены последовательно с другим гербицидом или другими гербицидами.

Подходящими компонентами для смеси являются, например, выбираемые из гербицидов классов b1) - b15).

В) Гербициды классов b1) - b15):

- b1) ингибиторы биосинтеза липидов;
- b2) ацетолактат синтазы ингибиторы (ALS ингибиторы);
- b3) ингибиторы фотосинтеза;
- b4) ингибиторы протопорфириноген-IX оксидазы,
- b5) отбеливания гербициды;
- b6) энолпирувил шикимат 3-фосфат синтазы ингибиторы (EPSP ингибиторы);
- b7) глутамин синтазы ингибиторы;
- b8) 7,8-дигидроптероат синтазы ингибиторы (DHP ингибиторы);
- b9) ингибиторы митоза; b10) ингибиторы синтеза очень длинноцепных жирных кислот (VLCFA ингибиторы);
- b11) ингибиторы биосинтеза целлюлозы;
- b12) разъединяющие гербициды;
- b13) ауксиновые гербициды;
- b14) ингибиторы транспорта ауксина и
- b15) другие гербициды, выбираемые из группы, включающей бромобутид, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, цинметилин, кумилурон, далапон, дазомет, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, диметипин, DSMA, димрон, эндотал и его соли, этобензанид, флампроп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-М-изопропил, флампроп-М-метил, флуренол, флуренол-бутил, флурпримидол, фосамин, фосамин-аммоний, инданофан, индазифлам, малеиновый гидразид, мефлуидид, метам, метиозолин (CAS 403640-27-7), метил-азид, метилбромид, метил-димрон, метилйодид, MSMA, олеиновая кислота, оксацикломефон, пеларгоновая кислота, пирибутикарб, квинокламин, триазилам, тридифан и 6-хлор-3-(2-циклопропил-6-метилфеноксид)-4-пиридазинол (CAS 499223-49-3) и его соли и сложные эфиры,

включая их сельскохозяйственно приемлемые соли или производные.

К примерам гербицидов В, которые могут применяться в сочетании с ППО ингибирующими гербицидами согласно данному изобретению, относятся:

b1) из группы ингибиторов биосинтеза липида:

АСС-гербициды, такие как аллоксидим, аллоксидим-натрий, бутроксидим, клетодим, клодинафоп, клодинафоп-пропаргил, циклоксидим, цигалофоп, цигалофоп-бутил, диклофоп, диклофоп-метил, феноксапроп, феноксапроп-этил, феноксапроп-Р, феноксапроп-Р-этил, флуазифоп, флуазифоп-бутил, флуазифоп-Р, флуазифоп-Р-бутил, галоксифоп, галоксифоп-метил, галоксифоп-Р, галоксифоп-Р-метил, метамифоп, пиноксаден, профоксидим, пропаквизафоп, квизалфоп, квизалфоп-этил, квизалфоп-тефурил, квизалфоп-Р, квизалфоп-Р-этил, квизалфоп-Р-тефурил, сетоксидим, тепралоксидим, тралкоксидим,

4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1312337-72-6);

4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1312337-45-3);

4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1033757-93-5);

4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3,5(4Н,6Н)-дион (CAS 1312340-84-3);

5-(ацетилокси)-4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1312337-48-6);

5-(ацетилокси)-4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил-[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он;

5-(ацетилокси)-4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1312340-82-1);

5-(ацетилокси)-4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1033760-55-2);

метилловый эфир 4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1312337-51-1);

метилловый эфир 4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил-[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты;

метилловый эфир 4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1312340-83-2);

метилловый эфир 4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1033760-58-5) и

не АСС гербициды, такие как бенфуресат, бутилат, циклоат, далапон, димепиперат, ЕРТС, эспрокарб, этофумесат, флупропанат, молинат, орбенкарб, пебулат, просульфокарб, ТСА, тиобенкарб, тиокарбазил, триаллат и вернолат;

b2) из группы ALS ингибиторов:

сульфонилмочевины, такие как амидосульфурон, азимсульфурон, бенсульфурон, бенсульфурон-метил, хлоримурон, хлоримурон-этил, хлорсульфурон, циносульфурон, циклосульфамурон, этаметсульфурон, этаметсульфурон-метил, этоксисульфурон, флазасульфурон, флуцетосульфурон, флуписульфурон, флуписульфурон-метил-натрий, форамсульфурон, галосульфурон, галосульфурон-метил, имазосульфурон, йодосульфурон, йодосульфурон-метил-натрий, иофенсульфурон, иофенсульфурон-натрий, мезосульфурон, метазосульфурон, метсульфурон, метсульфурон-метил, никосульфурон, ортосульфамурон, оксасульфурон, примисульфурон, примисульфурон-метил, пропирисульфурон, просульфурон, пирозосульфурон, пирозосульфурон-этил, римсульфурон, сульфометурон, сульфометурон-метил, сульфосульфурон, тифенсульфурон, тифенсульфурон-метил, триасульфурон, трибенурон, трибенурон-метил, трифлорисульфурон, трифлусульфурон, трифлусульфурон-метил и тритосульфурон, имидазолиноны, такие как имазаметабенз, имазаметабенз-метил, имазамокс, имазапик, имазапир, имазаквин и имазетапир, триазолопиримидиновые гербициды и сульфониланилиды, такие как хлорансулам, хлорансулам-метил, диклосулам, флуметсулам, флорасулам, метосулам, пенокссулам, пиримисульфамин и пирокссулам, пиримидинилбензоаты, такие как биспирибак, биспирибак-натрий, пирибензоксим, пирифталид, пириминобак, пириминобак-метил, пиритиобак, пиритиобак-натрий,

1-метилэтиловый эфир 4-[[[2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]фенил]метил]амино]бензойной кислоты (CAS 420138-41-6),

пропиловый эфир 4-[[[2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]фенил]метил]амино]бензойной кислоты (CAS 420138-40-5),

N-(4-бромфенил)-2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]-бензолметанамин (CAS 420138-01-8),

сульфониламинокарбонилтриазиноновые гербициды, такие как флукарбазон, флукарбазон-натрий, пропоксикарбазон, пропоксикарбазон-натрий, тиенкарбазон и тиенкарбазон-метил; и триафамон.

Среди этих, предпочтительный вариант данного изобретения относится к таким смесям, которые содержат как минимум один имидазолиновый гербицид;

b3) из группы ингибиторов фотосинтеза:

амикарбазон, ингибиторы фотосистемы II, т.е. триазиновые гербициды, включая хлоротриазины, триазины, триазиндионы, метилтиотриазины и пиридазины, такие как аметрин, атразин, хлоридазон, цианазин, десметрин, диметаметрин, гексазион, метрибузин, прометон, прометрин, пропазин, симазин, симетрин, тербуметон, тербутилазин, тербутрин и триэтазин, арилмочевина, такая как хлоробромурон, хлоротолурон, хлороксурон, диметурон, диурон, флуометурон, изопротурон, изоурон, линурон, метамитрон, метабензтиазурон, метобензурон, метоксурон, монолинурон, небурон, сидурон, тебутиурон и тиадиазурон, фенилкарбаматы, такие как десмедифам, карбутилат, фенмедифам, фенмедифам-этил, нитрильные гербициды, такие как бромфеноксим, бромоксинил и его соли и сложные эфиры, иоксинил и его соли и сложные эфиры, урацилы, такие как бромацил, ленацил и тербацил, и бентазон и бентазон-натрий, пиридат, пиридафол, пентанохлор и пропанил, и ингибиторы фотосистемы I, такие как дикват, дикват-дибромид, паракват, паракват-дихлорид и паракват-диметилсульфат.

Среди этих, предпочтительный вариант данного изобретения относится к таким смесям, которые содержат как минимум один арилмочевинный гербицид.

Среди этих, также предпочтительный вариант данного изобретения относится к таким смесям, которые содержат как минимум один триазиновый гербицид.

Среди этих, также предпочтительный вариант данного изобретения относится к таким смесям, которые содержат как минимум один нитрильный гербицид;

b4) из группы протопорфириноген-IX оксидазы ингибиторов:

ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бифенокс, бутафенацил, карфентразон, карфентразон-этил, хлومتоксифен, цинидон-этил, флуазолат, флуфенпир, флуфенпир-этил, флумиклорак, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, флуорогликофен, флуорогликофен-этил, флутиацет, флутиацет-метил, фомесафен, галосафен, лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифлуорфен, пентоксазон, профлуазол, пираклонил, пирафлуфен, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон, тидиазимин, тиафенацил,

этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100),

N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9),

N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9),

N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7),

N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7),

3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4),

2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидроизоиндол-1,3-дион,

1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион (CAS 1304113-05-0),

метил (Е)-4-[2-хлор-5-[4-хлор-5-(дифторметокси)-1Н-метилпиразол-3-ил]-4-фторфенокси]-3-метоксибут-2-еноат [CAS 948893-00-3] и

3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1Н-пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4);

b5) из группы отбеливающих гербицидов:

PDS ингибиторы: бифлубутамид, дифлуфеникан, флуридон, флуорхлоридон, флуртамон, норфлуразон, пиколинафен и 4-(3-трифторметилфенокси)-2-(4-трифторметилфенил)пиримидин (CAS 180608-33-7),

HPPD ингибиторы: бензобициклон, бензофенап, кломазон, изоксафлутол, мезотрион, пирасульфотол, пиразолинат, пиразоксифен, сулкотрион, тефурилтрион, темботрион, топрамезон и бициклопирон, отбеливатели с неизвестной мишенью: аклонифен, амитрол и флуметурон;

b6) из группы EPSP синтазы ингибиторов:

глифосат, глифосат-изопропиламмоний, глифосат-калий и глифосат-тримезий (сульфосат);

b7) из группы глутамин синтазы ингибиторов:

билафос (биалафос), билафос-натрий, глюфосинат, глюфосинат-Р и глюфосинат-аммоний;

b8) из группы DHP синтазы ингибиторов: асулам;

b9) из группы ингибиторов митоза:

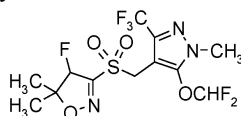
соединения группы K1: динитроанилины, такие как бенфлуралин, бутралин, динитрамин, эталфлуралин, флухлоралин, оризалин, пендиметалин, продиамин и трифлуралин, фосфорамидаты, такие как ампифос, ампифос-метил и бутафос, бензойноксилотные гербициды, такие как хлортал, хлортал-

диметил, пиридины, такие как дитиопир и тиазопир, бензамиды, такие как пропизамид и тебутам;

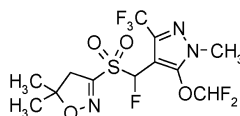
соединения группы K2: хлорпрофам, профам и карбетамида, среди этих предпочтительны соединения группы K1, в частности, динитроанилины;

b10) из группы VLCFA ингибиторов:

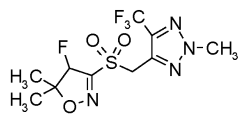
хлорацетамида, такие как ацетохлор, алахлор, бутахлор, диметахлор, диметенамид, диметенамид-Р, метазахлор, метолахлор, метолахлор-S, петоксамид, претилахлор, пропахлор, пропизохлор и тенилхлор, оксиацетанилиды, такие как флуфенацет и мефенацет, ацетанилиды, такие как дифенамид, напроанилид и напропамид, тетразолины, такие как фентразамид, и другие гербициды, такие как анилофос, кафенстрол, феноксасульфен, ипфенкарбазон, пиперофос, пироксасульфен и изоксазолиновые соединения формул II.1-II.9



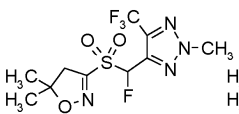
II.1



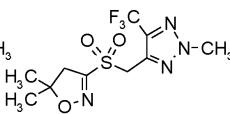
II.2



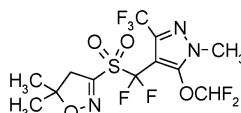
II.3



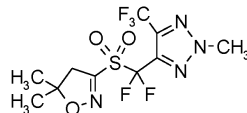
II.4



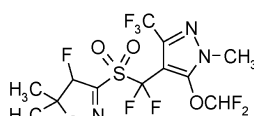
II.5



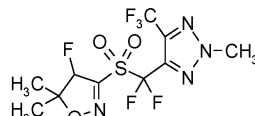
II.6



II.7



II.8



II.9

Изоксазолиновые соединения формулы (I) известны к настоящему времени, например, из WO 2006/024820, WO 2006/037945, WO 2007/071900 и WO 2007/096576;

среди VLCFA ингибиторов предпочтение отдается хлорацетамидам и оксиацетамидам;

b11) из группы ингибиторов биосинтеза целлюлозы:

хлортиамид, дихлобензил, флупоксам, индазифлам, триазилам, изоксабен и 1-циклогексил-5-пентафторфенилокси-1⁴-[1,2,4,6]-тиатриазин-3-иламин;

b12) из группы разьединительных гербицидов:

диносеб, динотерб и DNOC и его соли;

b13) из группы гербицидов ауксина:

2,4-D и ее соли и сложные эфиры, такие как клацифос, 2,4-DB и ее соли и сложные эфиры, аминоклопирахлор и его соли и сложные эфиры, аминоклопирахлор и его соли, такие как аминоклопирахлор-трис-(2-гидроксипропил)аммоний и его соли и сложные эфиры, беназолин, беназолин-этил, хлорамбен и его соли и сложные эфиры, кломепроп, клопирахлор и его соли и сложные эфиры, дикамба и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп-Р и его соли и сложные эфиры, флуорокси-пир, флуорокси-пир-бутометил, флуорокси-пир-метил, галаукифен и его соли и сложные эфиры (CAS 943832-60-8); МСРА и его соли и сложные эфиры, МСРА-тиоэтил, МСРВ и его соли и сложные эфиры, мекопроп и его соли и сложные эфиры, мекопроп-Р и его соли и сложные эфиры, пиклорам и его соли и сложные эфиры, квинклолак, квинмерак, ТВА (2,3,6) и его соли и сложные эфиры и триклопир и его соли и сложные эфиры;

b14) из группы ингибиторов транспорта ауксина: дифлуфензопир, дифлуфензопир-натрий, наптам и наптам-натрий;

b15) из группы других гербицидов: бромобутид, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, цинметилин, кумилурон, циклопириморат (CAS 499223-49-3) и его соли и сложные эфиры, далапон, дазомет, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, диметипин, DSMA, димрон, эндотал и его соли, этобензанид, флампроп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-М-изопропил, флампроп-М-метил, флуренол, флуренол-бутил, флупримидол, фосамин, фосамин-аммоний, инданофан, индазифлам, малеиновый гидразид, мефлуидид, метам, метиозолин (CAS 403640-27-7), метилазид, метилбромид, метил-димрон, метилйодид, MSMA, олеиновая кислота, оксацикломефон, пеларгоновая кислота, пирибутикарб, квинокламин, триазилам и тридифан.

Предпочтительными гербицидами В, которые могут применяться в смесях с ППО ингибирующими гербицидами согласно данному изобретению, являются:

b1) из группы ингибиторов биосинтеза липида:

клетодим, клодинафоп-пропаргил, циклоксидим, цигалофоп-бутил, диклофоп-метил, феноксапроп-Р-этил, флуазифоп-Р-бутил, галоксифоп-Р-метил, метамифоп, пиноксаден, профоксидим, пропаквизафоп, квизалфоп-Р-этил, квизалфоп-Р-тефурил, сетоксидим, тепралоксидим, тралкоксидим,

4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1312337-72-6);

4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1312337-45-3);

4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3(6Н)-он (CAS 1033757-93-5);

4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3,5(4Н,6Н)-дион (CAS 1312340-84-3);

5-(ацетилокси)-4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1312337-48-6);

5-(ацетилокси)-4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил-[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он;

5-(ацетилокси)-4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1312340-82-1);

5-(ацетилокси)-4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1033760-55-2);

метилловый эфир 4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1312337-51-1);

метилловый эфир 4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты;

метилловый эфир 4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1312340-83-2);

метилловый эфир 4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1033760-58-5);

бенфуресат, димепиперат, ЕРТС, эспрокарб, этофумесат, молинат, орбенкарб, просульфокарб, тиобенкарб и триаллат;

b2) из группы ALS ингибиторов:

амидосульфурон, азимсульфурон, бенсульфурон-метил, биспирибак-натрий, хлоримурон-этил, хлорсульфурон, клорансулам-метил, циклосульфамурон, диклосулам, этаметсульфурон-метил, этокси-сульфурон, флазасульфурон, флорасулам, флукарбазон-натрий, флуцетосульфурон, флуметсулам, флу-пирсульфурон-метил-натрий, форамсульфурон, галосульфурон-метил, имазаметабенз-метил, имазамокс, имазапик, имазапир, имазапир, имазапир, имазетаквин, имазетаквин, имазетаквин, йодосульфурон-метил-натрий, йофенсульфурон, йофенсульфурон-натрий, мезосульфурон, метазосульфурон, метосулам, мет-сульфурон-метил, никосульфурон, ортосульфамурон, оксосульфурон, пеноксулам, примисульфурон-метил, пропоксикарбазон-натрий, пропирисульфурон, просульфурон, пиразосульфурон-этил, пирибен-зоксим, пиримисульфам, пирифталид, пириминобак-метил, пирипиобак-натрий, пирокссулам, римсуль-фурон, сульфометурон-метил, сульфосульфурон, тиенкарбазон-метил, тифенсульфурон-метил, триа-сульфурон, трибенурон-метил, трифлорисульфурон, трифлусульфурон-метил, тритосульфурон и триа-фамон;

b3) из группы ингибиторов фотосинтеза:

аметрин, амикарбазон, атразин, бентазон, бентазон-натрий, бромоксинил и его соли и сложные эфиры, хлоридазон, хлоротолурон, цианазин, десмедифам, дикват-дибромид, диурон, флуометурон, гек-сазион, иоксинил и его соли и сложные эфиры, изопротурон, ленацил, линурон, метамитрон, метабен-зтиазурон, метрибуцин, паракват, паракват-дихлорид, фенмедифам, пропанил, пиридат, симазин, тербут-рин, тербутилазин и тидиазурон;

b4) из группы протопорфириноген-IX оксидазы ингибиторов:

ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бутафенацил, кар-фентразон-этил, цинидон-этил, флуфенпир-этил, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, флуорогликофен-этил, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифлуорфен, пентоксазон, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон,

этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100);

Н-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9);

N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9);

N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7);

N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7);

3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион;

1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[b][1,4]-оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4);

2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидроизоиндол-1,3-дион;

1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1H-пиримидин-2,4-дион и

3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1H-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1H-пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4);

b5) из группы отбеливающих гербицидов:

аклонифен, бенфлбутамид, бензобициклон, кломазон, дифлуфеникан, флуорохлоридон, флуртамон, изоксафлутол, мезотрион, норфлуразон, пиколинафен, пирасульфотол, пиразолинат, сулкотрион, тефурилтрион, темботрион, топрамезон, бициклопирон, 4-(3-трифторметилфенокси)-2-(4-трифторметилфенил)пиримидин (CAS 180608-33-7), амитрон и флуметурон;

b6) из группы EPSP синтазы ингибиторов:

глифосат, глифосат-изопропиламмоний, глифосат-калий и глифосат-тримезий (сульфосат);

b7) из группы глутамин синтазы ингибиторов: глуфосинат, глуфосинат-Р, глуфосинат-аммоний;

b8) из группы DHP синтазы ингибиторов: асулам;

b9) из группы ингибиторов митоза:

бенфлуралин, дитиопир, этафлуралин, оризалин, пендиметалин, тиазопир и трифлуралин;

b10) из группы VLCFA ингибиторов:

ацетохлор, алахлор, анилофос, бутахлор, кафенстрол, диметенамид, диметенамид-Р, фентразамид, флуфенацет, мефенацет, метазахлор, метолахлор, S-метолахлор, напроанилид, напропамид, претилахлор, феноксасульфон, ипфенкарбазон, пироксасульфон, тенихлор и изоксазолиновые соединения формул II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.8 и II.9, как упомянуто выше;

b11) из группы ингибиторов биосинтеза целлюлозы:

дихлобенил, флупоксам, изоксабен и 1-циклогексил-5-пентафторфенилокси-1⁴-[1,2,4,6]тиатриазин-3-иламин;

b13) из группы гербицидов ауксина:

2,4-D и его соли и сложные эфиры, аминоклопирахлор и его соли и сложные эфиры, аминоклопиралид и его соли, такие как аминоклопиралид-трис-(2-гидроксипропил)аммоний и его сложные эфиры, клопиралид и его соли и сложные эфиры, дикамба и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп-Р и его соли и сложные эфиры, флуорокси-мептил, галауксифен и его соли и сложные эфиры (CAS 943832-60-8), МСРА и его соли и сложные эфиры, МСРВ и его соли и сложные эфиры, мекопроп-Р и его соли и сложные эфиры, пиклорам и его соли и сложные эфиры, квинклолак, квинмерак и триклопир и его соли и сложные эфиры;

b14) из группы ингибиторов транспорта ауксинов:

дифлуфензопир и дифлуфензопир-натрий;

b15) из группы других гербицидов:

бромобутид, цинметилин, кумилурон, циклопириморат (CAS 499223-49-3) и его соли и сложные эфиры, далапон, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, DSMA, димрон (= даймурон), флампроп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-М-изопропил, флампроп-М-метил, инданофан, индазифлам, метам, метилбромид, MSMA, оксацикломефон, пирибутикарб, триазифлам и тридифан.

Более предпочтительные гербицидами В, которые могут применяться в смесях с ППО ингибирующими гербицидами согласно данному изобретению, являются:

b1) из группы ингибиторов биосинтеза липида:

клодинафоп-пропаргил, циклоксидим, цигалофоп-бутил, феноксапроп-Р-этил, пиноксаден, профоксидим, тепралоксидим, тралоксидим,

4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2H-пиран-3(6H)-он (CAS 1312337-72-6);

4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2H-пиран-3(6H)-он (CAS 1312337-45-3);

4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-2H-пиран-3(6H)-он (CAS 1033757-93-5);

4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3,5(4Н,6Н)-дион (CAS 1312340-84-3);

5-(ацетилокси)-4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1312337-48-6);

5-(ацетилокси)-4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил-[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он;

5-(ацетилокси)-4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1312340-82-1);

5-(ацетилокси)-4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-3,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-2Н-пиран-3-он (CAS 1033760-55-2);

метилловый эфир 4-(4'-хлор-4-циклопропил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1312337-51-1);

метилловый эфир 4-(2',4'-дихлор-4-циклопропил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты;

метилловый эфир 4-(4'-хлор-4-этил-2'-фтор[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1312340-83-2);

метилловый эфир 4-(2',4'-дихлор-4-этил[1,1'-бифенил]-3-ил)-5,6-дигидро-2,2,6,6-тетраметил-5-оксо-2Н-пиран-3-илкарбоновой кислоты (CAS 1033760-58-5);

эспрокарб, просульфоккарб, тиобенкарб и триаллат;

b2) из группы ALS ингибиторов:

бенсульфурон-метил, биспирибак-натрий, циклосульфамурон, диклосулам, флуметсулам, флупир-сульфурон-метил-натрий, форамсульфурон, имазамокс, имазапик, имазапир, имазакин, имазетапир, имазосульфурон, йодосульфурон, йодосульфурон-метил-натрий, иофенсульфурон, иофенсульфурон-натрий, мезосульфурон, метазосульфурон, никосульфурон, пенокксулам, пропоксикарбазон-натрий, прописульфурон, пиразосульфурон-этил, пирокксулам, римсульфурон, сульфосульфурон, тиенкарбазон-метил, тритосульфурон триафамон;

b3) из группы ингибиторов фотосинтеза:

аметрин, атразин, диурон, флуометурон, гексазинон, изопротурон, линурон, метрибуцин, паракват, паракват-дихлорид, пропанил, тербутрин и тербутилазин;

b4) из группы протопорфириноген-IX оксидазы ингибиторов:

ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон,

этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100),

3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо[1,3,5]-триазиан-2,4-дион,

1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]-оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4),

2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидроизоиндол-1,3-дион и

1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион;

b5) из группы отбеливающих гербицидов:

кломазон, дифлуфеникан, флуорохлоридон, изоксафлутол, мезотрион, пиколтнафен, сулкотрион, тефурилтрион, темботрион, топрамезон, бициклопирон, амитрол и флуметурон;

b6) из группы EPSP синтазы ингибиторов:

глифосат, глифосат-изопропиламмоний и глифосат-тримезий (сульфосат);

b7) из группы глутамин синтазы ингибиторов:

глуфосинат, глуфосинат-Р и глуфосинат-аммоний;

b9) из группы ингибиторов митоза: пендиметалин и трифлуралин;

b10) из группы VLCFA ингибиторов:

ацетохлор, кафенстрол, диметенамид-Р, фентразамид, флуфенацет, мефенацет, метазахлор, метолахлор, S-метолахлор, феноксасульфен, ипфенкарбазон и пироксасульфен; таким же образом, предпочтение отдается изоксазолиновым соединениям формул II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.8 и II.9, упомянутым выше;

b11) из группы ингибиторов биосинтеза целлюлозы: изоксабен;

b13) из группы гербицидов ауксина:

2,4-D и его соли и сложные эфиры, такие как клацифос, и аминоклопирахлор и его соли и сложные эфиры, аминоклопирахлорид и его соли и сложные эфиры, клопирахлорид и его соли и сложные эфиры, диамба и его соли и сложные эфиры, флуороксибир-метил, квинклолак и квинмерак;

b14) из группы ингибиторов транспорта ауксина:

дифлуфензопир и дифлуфензопир-натрий, b15) из группы других гербицидов: димрон (= дайму-рон), инданофан, индазифлам, оксазикломефон и триазифлам.

Кроме того, может оказаться полезным, когда ППО ингибирующие гербициды применяют в смеси с соединением В, описанным выше, также добавление в смесь защитных веществ. Защитные вещества являются химическими соединениями, которые предотвращают или уменьшают повреждение полезных растений, не оказывая большого влияния на гербицидное действие гербицидов в отношении нежелательных растений. Их можно применять или до посева (т.е. для обработки семян, ростков или рассады), или при предвсходовом применении или послевсходовом применении на полезных растениях.

Кроме того, защитные вещества С, ППО ингибирующие гербициды и/или гербициды В могут применяться одновременно или последовательно.

К подходящим защитным веществам относятся, например:

(хинолин-8-окси)уксусные кислоты,

1-фенил-5-галоидалкил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновые кислоты,

1-фенил-4,5-дигидро-5-алкил-1Н-пиразол-3,5-дикарбоновые кислоты,

4,5-дигидро-5,5-диарил-3-изоксазолкарбоновые кислоты,

дихлорацетамиды, альфа-оксиминофенилацетонитрилы, ацетофеноноксиды,

4,6-дигалоид-2-фенилпиримидины,

N-[[4-(аминокарбонил)фенил]сульфонил]-2-бензойные амиды,

1,8-нафталевый ангидрид, 2-галоид-4-(галоидалкил)-5-тиазолкарбоновые кислоты,

фосфориолаты и N-алкил-О-фенилкарбаматы и их сельскохозяйственно приемлемые соли и их сельскохозяйственно приемлемые производные, такие как амиды, сложные эфиры и сложные тиоэфиры при условии, что они содержат кислотную группу.

Примерами предпочтительных защитных веществ С являются беноксакор, клоквинтоцет, циометринил, ципросульфамид, дихлормид, дициклонон, диэтолат, фенхлоразол, фенклорим, флуразол, флуксофеним, фурилазол, изоксадифен, мефенпир, мефенат, нафталевый ангидрид, оксабетринил, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3) и 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4).

Более предпочтительными защитными веществами С являются беноксакор, клоквинтоцет, ципросульфамид, дихлормид, фенхлоразол, фенклорим, флуразол, флуксофеним, фурилазол, изоксадифен, мефенпир, нафталевый ангидрид, оксабетринил, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3) и 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4).

Еще более предпочтительными защитными веществами С являются беноксакор, клоквинтоцет, ципросульфамид, дихлормид, фенхлоразол, фенклорим, фурилазол, изоксадифен, мефенпир, нафталевый ангидрид, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3) и 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4).

Также предпочтительными защитными веществами С являются беноксакор, клоквинтоцет, ципросульфамид, дихлормид, фенхлоразол, фенклорим, фурилазол, изоксадифен, мефенпир, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3) и 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4).

Особенно предпочтительными защитными веществами С, которые в качестве компонента С являются составной частью смеси согласно данному изобретению, являются защитные вещества С, которые определены выше; в частности защитные вещества С.1 - С.12 перечисленные в табл. С.

Таблица С

	З а щ и т н о е в е щ е с т в о С
	С.1 б е н о к с а к о р
	С.2 к л о к в и н т о ц е т
	С.3 ц и п р о с у л ь ф а м и д
	С.4 д и х л о р м и д
	С.5 ф е н х л о р а з о л
	С.6 ф е н к л о р и м
	С.7 ф у р и л а з о л
	С.8 и з о к с а д и ф е н
	С.9 м е ф е н п и р
	С.10 а н г и д р и д н а ф т а л е в о й к и с л о т ы
	С.11 4-(д и х л о р а ц е т и л)-1-о к с а -4-а з а с п и р о [4.5]д е к а н (MON4660, CAS 71526-07-3)
	С.12 2,2,5-т р и м е т и л -3-(д и х л о р а ц е т и л)-1,3- о к с а з о л и д и н (R-29148, CAS 52836-31-4)

ППО ингибирующие гербициды и активные соединения В групп b1)-b15) и активные соединения С являются известными гербицидами и защитными веществами, см., например, The Compendium of Pesticide Common Names (<http://www.alanwood.net/pesticides/>); Farm Chemicals Handbook, 2000, volume 86, Meister Publishing Company, 2000; B. Hock, C. Fedtke, R.R. Schmidt, Herbicide, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995; W.H. Ahrens, Herbicide Handbook, 7th edition, Weed Science Society of America, 1994; и K.K. Hatzios, Herbicide Handbook, Supplement for the 7th edition, Weed Science Society of America, 1998. 2,2,5-Триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин [CAS No. 52836-31-4] также именуется как R-29148. 4-(Дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан [CAS No. 71526-07-3] также именуется как AD-67 и MON 4660.

Отнесение активных соединений к соответствующим механизмам действия основано на современном уровне знаний. Если несколько механизмов действия связаны с одним активным соединением, то соединение относят только к одному механизму действия.

Активные соединения В и С, имеющие карбоксильную группу, могут применяться в виде кислоты, в виде подходящей сельскохозяйственной соли, упомянутой выше, или также в виде подходящего для сельского хозяйства производного в смесях согласно данному изобретению.

В случае дикамба, подходящие соли включают такие, у которых противоион представляет собой сельскохозяйственно приемлемый катион. Например, подходящими солями дикамба являются дикамба-натрий, дикамба-калий, дикамба-метиламмоний, дикамба-диметиламмоний, дикамба-изопропиламмоний, дикамба-дигликольамин, дикамба-оламин, дикамба-диоламин, дикамба-троламин, дикамба-N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин и дикамба-диэтилентриамин.

Примерами подходящих сложных эфиров являются дикамба-метил и дикамба-бутотил.

Подходящие соли 2,4-D являются 2,4-D-аммоний, 2,4-D-диметиламмоний, 2,4-D-диэтиламмоний, 2,4-D-диэтанолламмоний (2,4-D-диоламин), 2,4-D-триэтанолламмоний, 2,4-D-изопропиламмоний, 2,4-D-триизопропанолламмоний, 2,4-D-гептиламмоний, 2,4-D-додециламмоний, 2,4-D-тетрадециламмоний, 2,4-D-триэтиламмоний, 2,4-D-трис-(2-гидроксипропил)аммоний, 2,4-D-трис-(изопропил)-аммоний, 2,4-D-троламин, 2,4-D-литий, 2,4-D-натрий.

К примерам подходящих сложных эфиров 2,4-D относятся 2,4-D-бутотил, 2,4-D-2-бутоксипропил, 2,4-D-3-бутоксипропил, 2,4-D-бутил, 2,4-D-этил, 2,4-D-этилгексил, 2,4-D-изобутил, 2,4-D-изооктил, 2,4-D-изопропил, 2,4-D-метил, 2,4-D-метил, 2,4-D-октил, 2,4-D-пентил, 2,4-D-пропил, 2,4-D-тефурил и клацифос.

Подходящими солями 2,4-DB являются, например, 2,4-DB-натрий, 2,4-DB-калий и 2,4-DB-диметиламмоний. Подходящими сложными эфирами 2,4-DB являются, например, 2,4-DB-бутил и 2,4-DB-изоктил.

Подходящими солями дихлорпропа являются, например, дихлорпроп-натрий, дихлорпроп-калий и дихлорпроп-диметиламмоний. Примерами подходящих сложных эфиров дихлорпропа являются дихлорпроп-бутотил и дихлорпроп-изоктил.

Подходящие соли и сложные эфиры МСРА включают МСРА-бутотил, МСРА-бутил, МСРА-диметиламмоний, МСРА-диоламин, МСРА-этил, МСРА-тиоэтил, МСРА-2-этилгексил, МСРА-изобутил, МСРА-изоктил, МСРА-изопропил, МСРА-изопропиламмоний, МСРА-метил, МСРА-оламин, МСРА-калий, МСРА-натрий и МСРА-троламин.

Подходящей солью МСРВ является МСРВ натрий. Подходящим сложным эфиром МСРВ является МСРВ-этил.

Подходящими солями клопиралида являются клопиралид-калий, клопиралид-оламин и клопиралид-трис-(2-гидроксипропил)аммоний. Примером подходящего сложного эфира клопиралида является клопиралид-метил.

Примерами подходящих сложных эфиров флуроксипира являются флуроксипир-метил и флуроксипир-2-бутоксипропил-1-метилэтил, причем, флуроксипир-метил более предпочтителен.

Подходящими солями пиклорама являются пиклорам-диметиламмоний, пиклорам-калий, пиклорам-триизопропанолламмоний, пиклорам-триизопропиламмоний и пиклорам-троламин. Подходящим сложным эфиром пиклорама является пиклорам-изоктил.

Подходящей солью триклопира является триклопир-триэтиламмоний. Подходящими сложными эфирами триклопира являются, например, триклопир-этил и триклопир-бутотил.

Подходящие соли и сложные эфиры хлорамбена включают хлорамбен-аммоний, хлорамбен-диоламин, хлорамбен-метил, хлорамбен-метиламмоний и хлорамбен-натрий.

Подходящие соли и сложные эфиры 2,3,6-ТВА включают 2,3,6-ТВА-диметиламмоний, 2,3,6-ТВА-литий, 2,3,6-ТВА-калий и 2,3,6-ТВА-натрий.

Подходящие соли и сложные эфиры аминопиралида включают аминопиралид-калий и аминопиралид-трис-(2-гидроксипропил)аммоний.

Подходящими солями глифосата являются, например, глифосат-аммоний, глифосат-диаммоний, глифосат-диметиламмоний, глифосат-изопропиламмоний, глифосат-калий, глифосат-натрий, глифосат-тримезий, а также этаноламиновые и диэтаноламиновые соли, более предпочтительны глифосат-диаммоний, глифосат-изопропиламмоний и глифосат-тримезий (сульфосат).

Подходящей солью глуфосината является, например, глуфосинат-аммоний.

Подходящей солью глуфосината-Р является, например, глуфосинат-Р-аммоний.

Подходящими солями и сложными эфирами бромоксинила являются, например, бромоксинил-бутират, бромоксинил-гептаноат, бромоксинил-октаноат, бромоксинил-калий и бромоксинил-натрий.

Подходящими солями и сложными эфирами иоксинила являются, например, иоксинил-октаноат, иоксинил-калий и иоксинил-натрий.

Подходящие соли и сложные эфиры мекопропа включают мекопроп-бутотил, мекопроп-диметиламмоний, мекопроп-диоламин, мекопроп-этадил, мекопроп-2-этилгексил, мекопроп-изоктил, мекопроп-метил, мекопроп-калий, мекопроп-натрий и мекопроп-троламин.

Подходящими солями мекопропа-Р являются, например, мекопроп-Р-бутотил, мекопроп-Р-диметиламмоний, мекопроп-Р-2-этилгексил, мекопроп-Р-изобутил, мекопроп-Р-калий и мекопроп-Р-натрий.

Подходящей солью дифлуфензопира является, например, дифлуфензопир-натрий.

Подходящей солью напалама является, например, напалам-натрий.

Подходящими солями и сложными эфирами аминоциклопирахлора являются, например, аминоциклопирахлор-диметиламмоний, аминоциклопирахлор-метил, аминоциклопирахлор-триизопропанол-аммоний, аминоциклопирахлор-натрий и аминоциклопирахлор-калий.

Подходящей солью квинклорака является, например, квинклорак-диметиламмоний.

Подходящей солью квинмерака является, например, квинмерак-диметиламмоний.

Подходящей солью имазамокса является, например, имазамокс-аммоний.

Подходящими солями имазапика являются, например, имазапик-аммоний и имазапик-изопропиламмоний.

Подходящими солями имазапира являются, например, имазапир-аммоний и имазапир-изопропиламмоний.

Подходящей солью имазакина является, например, имазакин-аммоний.

Подходящими солями имазетапира являются, например, имазетапир-аммоний и имазетапир-изопропиламмоний.

Подходящей солью топрамезона является, например, топрамезон-натрий.

Под предпочтительными вариантами данного изобретения, упомянутыми здесь ниже, следует понимать как предпочтительные или независимо один от другого или в смеси одного с другим.

Согласно предпочтительному варианту данного изобретения смесь включает в качестве компонента В как минимум один, более предпочтительно точно один гербицид В.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает как минимум два, более предпочтительно точно два гербицида В, отличных один от другого.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает как минимум три, более предпочтительно точно три гербицида В, отличных один от другого.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает в качестве компонента А как минимум один, более предпочтительно точно один ППО ингибирующий А, более предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100; 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), особенно предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), и в качестве компонента В как минимум один, предпочтительно точно один гербицид В.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает в качестве компонента А как минимум один, более предпочтительно точно один ППО ингибирующий А, более предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительны сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4) и как минимум два, более предпочтительно точно два гербицида В, отличные один от другого.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает в качестве компонента А как минимум один, более предпочтительно точно один ППО ингибирующий А, более предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил,

сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4) и как минимум три, предпочтительно точно три гербицида В, отличающихся один от другого.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и более предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b1), в частности, выбираемое из группы, которая включает клотодим, клодинафоп-пропаргил, циклоксидим, цигалофоп-бутил, феноксапроп-Р-этил, флуазифоп, пинакаден, профоксидим, квизалофоп, сетоксидим, тепралоксидим, тралоксидим, эспрокарб, просульфокарб, тиобенкарб и триаллат.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b2), в частности, выбираемое из группы, которая включает бенсульфурон-метил, биспирибак-натрий, клорансулам-метил, циклосульфамурон, диклосулам, флуметсулам, флу-пирсульфурон-метил-натрий, форамсульфурон, галосульфурон-метил, имазамокс, имазапик, имазапир, имазакин, имазетапир, имазосульфурон, йодосульфурон, йодосульфурон-метил-натрий, мезосульфурон-метил, метазосульфурон, никосульфурон, пеноксиулам, пропоксикарбазон-натрий, пиразосульфурон-этил, пиритиобак-натрий, пирокссулам, римсульфурон, сульфосульфурон, тиенкарбазон-метил, тифен-сульфурон-метил, трифлорисульфурон и тритосульфурон.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b3), в частности, выбираемое из группы, которая включает аметрин, атразин, бентазон, бромоксинил, диурон, флуометурон, гексазион, изопротурон, линурон, метрибузин, паракват, паракват-дихлорид, прометрин, пропанил, тербутрин и тербутилазин.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b4), в частности, выбираемое из группы, которая включает ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бифенокс, бутафенацил, карфентразон, карфентразон-этил, хлومتоксифен, цинидон-этил, флуазолат, флуфенпир, флуфенпир-этил, флумикло-рак, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, флуорогликофен, флуорогликофен-этил, флутиацет, флутиацет-метил, фомесафен, галосафен, лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифлуорфен, пентоксазон,

профлуазол, пираклонил, пирафлуфен, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон, тидиазмин, тиафенацил, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)феноксид]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифтор-метилфеноксид)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9), N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфеноксид)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9), N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфеноксид)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7), N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфеноксид)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7), 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо[1,3,5]триазиан-2,4-дион, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), 2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидроизоиндол-1,3-дион, 1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион, метил (Е)-4-[2-хлор-5-[4-хлор-5-(дифторметокси)-1Н-метилпиразол-3-ил]-4-фтор-феноксид]-3-метокси-бут-2-еноат [CAS 948893-00-3], 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1Н-пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4).

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)феноксид]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b5), в частности, выбираемое из группы, которая включает кломазон, дифлуфеникан, флуорохлоридон, изоксафлутол, мезотрион, пиколинафен, сулкотрион, тефурилтрион, темботрион, топрамезон, бициклопирон, амитрол и флуметурон.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)феноксид]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b6), в частности, выбираемое из группы, которая включает глифосат, глифосат-изопропиламмоний и глифосат-тримезий (сульфосат).

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)феноксид]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b7), в частности, выбираемое из группы, которая включает глюфосинат, глюфосинат-Р и глюфосинат-аммоний.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)феноксид]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b9), в частности, выбираемое из группы, которая включает пендиматалин и трифлуралин.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b10), в частности, выбираемое из группы, которая включает ацетохлор, кафенстрол, диметенамид-Р, фентразамид, флуфенацет, мефенацет, метазахлор, метолахлор, S-метолахлор, феноксасульфен и пироксасульфен. Подобным образом, предпочтение отдается смесям, которые включают, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b10), в частности, выбираемое из группы, которая включает изоксазолиновые соединения формул II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.8 и II.9, как описано выше.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b13), в частности, выбираемое из группы, которая включает 2,4-D и его соли и сложные эфиры, аминоклопирахлор и его соли и сложные эфиры, аминопиралид и его соли, такие как аминопиралид-трис-(2-гидроксипропил)аммоний, и его сложные эфиры, клопиралид и его соли и сложные эфиры, дикамба и его соли и сложные эфиры, флуроксипир-мептил, квинклорак и квинмерак.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b14), в частности, выбираемое группы, которая включает дифлуфензопир и дифлуфензопир-натрий.

Согласно другому предпочтительному варианту изобретения смесь включает, в дополнение к ППО ингибирующему А, предпочтительно ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, цинидон-этил, карфентразон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), более предпочтительно сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), как минимум одно и предпочтительно точно одно гербицидно активное соединение из группы b15), в частности, выбираемое из группы, которая включает димрон (= даймунон), инданофан, индазифлам, оксацикломефон и триазифлам.

Здесь и ниже термин "бинарная смесь" включает смеси, которые содержат одно или более, например 1, 2 или 3, активных соединений из ППО ингибирующих А и любой один или более, например 1, 2 или 3, гербицидов В.

В бинарных смесях, содержащих как минимум один ППО ингибирующий А в качестве компонента А и как минимум один гербицид В, весовое отношение активных соединений А:В находится, как правило, в интервале от 1:1000 до 1000:1, предпочтительно в интервале от 1:500 до 500:1, более предпочтительно в интервале от 1:250 до 250:1 и еще более предпочтительно в интервале от 1:75 до 75:1.

Особенно предпочтительными гербицидами В являются гербициды В, как определено выше, в частности гербициды В.1 - В.229 приведенные в табл. В.

Таблица В

	Гербицид В
В.1	Клетодим
В.2	Клодинафоп-пропаргил
В.3	Циклоксимид
В.4	Цигалофоп-бутил
В.5	Феноксапроп-этил
В.6	Феноксапроп-Р-этил
В.7	Флуазифоп
В.8	Метамифоп
В.9	Пиноксаден
В.10	Пофоксидим
В.11	Квизалофоп
В.12	Сетоксидим
В.13	Тепралоксидим
В.14	Тралоксидим
В.15	Эспрокарб
В.16	Этофумесат
В.17	Молинат
В.18	Просульфокарб
В.19	Тиобенкарб
В.20	Триаллат
В.21	Бенсульфурон-метил
В.22	Биспирибак-натрий
В.23	Клорансулам-метил
В.24	Хлорсульфурон
В.25	Клоримурон

	Гербицид В
В.26	Циклосульфамурон
В.27	Диклосулам
В.28	Флорасулам
В.29	Флуметсулам
В.30	Флупирсульфурон-метил-натрий
В.31	Форамсульфурон
В.32	Галосульфурон-метил
В.33	Имазамокс
В.34	Имазамокс-аммоний
В.35	Имазапик
В.36	Имазапик-аммоний
В.37	Имазапик-изопропиламмоний
В.38	Имазапир
В.39	Имазапир-аммоний
В.40	Имазапир-изопропиламмоний
В.41	Имазаквин
В.42	Имазаквин-аммоний
В.43	Имазетапир
В.44	Имазетапир-аммоний
В.45	Имазетапир-изопропиламмоний
В.46	Имазосульфурон
В.47	Иодосульфурон-метил-натрий
В.48	Иофенсульфурон
В.49	Иофенсульфурон-натрий
В.50	Мезосульфурон-метил

V.51	Метазосульфурон
V.52	Метосульфурон-метил
V.53	Метосулам
V.54	Никосульфурон
V.55	Пенокссулам
V.56	Пропоксикарбазон-натрий
V.57	Пиразосульфурон-этил
V.58	Пирибензоксим
V.59	Пирифталид
V.60	Пиритиобак-натрий
V.61	Пирокссулам
V.62	Пропиписульфурон
V.63	Римосульфурон
V.64	Сульфосульфурон
V.65	Тиенкарбазон-метил
V.66	Тиенсульфурон-метил
V.67	Трибенурон-метил
V.68	Трифлуксисульфурон
V.69	Тритосульфурон
V.70	Триафамон
V.71	Аметрин
V.72	Атразин
V.73	Бентазон
V.74	Бромоксинил
V.75	Бромоксинил-октаноат
V.76	Бромоксинил-гептаноат
V.77	Бромоксинил-калий
V.78	Диурон
V.79	Флуометурон
V.80	Гексазион
V.81	Изопротурон
V.82	Линурон
V.83	Метамитрон
V.84	Метрибузин
V.85	Прометрин
V.86	Пропанил
V.87	Симазин
V.88	Тербутилазин
V.89	Тербутрин
V.90	Паракват-дихлорид
V.91	Ацифлуорфен
V.92	Ацифлуорфен-натрий
V.93	Азафенидин
V.94	Бенкарбазон
V.95	Бензфендизон
V.96	Бифенокс
V.97	Бутафенацил

V.98	Карфентразон
V.99	Карфентразон-этил
V.100	Хлометоксифен
V.101	Цинидон-этил
V.102	Флуазолат
V.103	Флуфенпир
V.104	Флуфенпир-этил
V.105	Флумиклорак
V.106	Флумиклорак-пентил
V.107	Флумиоксазин
V.108	Флуорогликофен
V.109	Флуорогликофен-этил
V.110	Флутиацет
V.111	флутиацет-метил
V.112	Фомесафен
V.113	Галосафен
V.114	Лактофен
V.115	Оксадиаргил
V.116	Оксадиазон
V.117	Оксифлуорфен
V.118	Пентоксазон
V.119	Профлуазол
V.120	Пираклонил
V.121	Пирафлуфен
V.122	Пирафлуфен-этил
V.123	Сафлуфенацил
V.124	Ссульфентразон
V.125	Тидиазмин
V.126	Тиафенацил
V.127	Этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6)
V.128	1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[<i>b</i>][1,4]-оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4)
V.129	N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифтор-метилфенокси)-5-метил-1 <i>H</i> -пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9)
V.130	N-тетрагидрофурурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1 <i>H</i> -пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9)
V.131	N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1 <i>H</i> -пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7)

V.132	N-тетрагидрофурурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1 <i>H</i> -пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7)
V.133	3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2 <i>H</i> -бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазинан-2,4-дион
V.134	2-(2,2,7-Трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2 <i>H</i> -бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-изоиндол-1,3-дион
V.135	1-Метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2 <i>H</i> -бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1 <i>H</i> -пиримидин-2,4-дион
V.136	метил (<i>E</i>)-4-[2-хлор-5-[4-хлор-5-(дифторметокси)-1 <i>H</i> -метил-пиразол-3-ил]-4-фтор-фенокси]-3-метоксибут-2-еноат [CAS 948893-00-3]
V.137	3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1 <i>H</i> -бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1 <i>H</i> -пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4)
V.138	Бензобизциклон
V.139	Кломазон
V.140	Дифлуфеникан
V.141	Флуорохлоридон
V.142	Изоксафлутол
V.143	Мезотрион
V.144	Норфлуразон
V.145	Пикололинафен
V.146	Сулкотрион
V.147	Тефурилтрион
V.148	Темботрион
V.149	Топрамезон
V.150	Топрамезон-натрий
V.151	Бициклопирон
V.152	Амитрол
V.153	Флуометурон
V.154	Глифосат
V.155	Глифосат-аммоний
V.156	Глифосат-диметиламмоний
V.157	Глифосат-изопропиламмоний
V.158	Глифосат-тримезий (сульфосат)
V.159	Глифосат-калий
V.160	Глуфосинат
V.161	Глуфосинат-аммоний
V.162	Глуфосинат-Р
V.163	Глуфосинат-Р-аммоний
V.209	Квинмерак
V.210	Квинмерак-диметиламмоний
V.211	Аминоциклопирахлор
V.212	Аминоциклопирахлор-калий
V.213	Аминоциклопирахлор-метил
V.214	Дифлуфензопир
V.215	Дифлуфензопир-натрий
V.216	Димрон
V.217	Инданофан
V.218	Индазифлам
V.219	Оксацикломефон

V.164	Пендиметалин
V.165	Трифлуралин
V.166	Ацетохлор
V.167	Бутахлор
V.168	Кафенстрол
V.169	Диметенамид-Р
V.170	Фентразамид
V.171	Флуфенацет
V.172	Мефенацет
V.173	Метазахлор
V.174	Метолахлор
V.175	S-метолахлор
V.176	Претилахлор
V.177	Феноксасульффон
V.178	Изоксабен
V.179	Ипфенкарбазон
V.180	Пироксасульффон
V.181	2,4-D
V.182	2,4-D-изобутил
V.183	2,4-D-диметиламмоний
V.184	2,4-D-N,N,N-триметилэтанолламмоний
V.185	Аминопиралид
V.186	Аминопиралид-метил
V.187	Аминопиралид-трис(2-гидроксипропил)аммоний
V.188	Клопиралид
V.189	Клопиралид-метил
V.190	Клопиралид-оламин
V.191	Дикамба
V.192	Дикамба-бутотил
V.193	Дикамба-дигликольамин
V.194	Дикамба-диметиламмоний
V.195	Дикамба-диоламин
V.196	Дикамба-изопропиламмоний
V.197	Дикамба-калий
V.198	Дикамба-натрий
V.199	Дикамба-троламин
V.200	Дикамба-N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин
V.201	Дикамба-диэтиленetriамин
V.202	Флуроксипир
V.203	Флуроксипир-метил
V.204	МСРА
V.205	МСРА-2-этилгексил
V.206	МСРА-диметиламмоний
V.207	Квинклорак
V.208	Квинклорак-диметиламмоний
V.220	Триазифлам
V.221	II.1
V.222	II.2
V.223	II.3
V.224	II.4
V.225	II.5
V.226	II.6
V.227	II.7
V.228	II.8
V.229	II.9

Более предпочтительны смеси 1.1 - 1.229, включающие ацифлуорфен и вещество(а), как определено в соответствующем ряду табл. В-1.

Таблица В-1

Смеси 1.1 - 1.229

Смесь №.	Гербицид В
1.1	В.1
1.2	В.2
1.3	В.3
1.4	В.4
1.5	В.5
1.6	В.6
1.7	В.7
1.8	В.8
1.9	В.9
1.10	В.10
1.11	В.11
1.12	В.12
1.13	В.13
1.14	В.14
1.15	В.15
1.16	В.16
1.17	В.17
1.18	В.18
1.19	В.19
1.20	В.20
1.21	В.21
1.22	В.22
1.23	В.23
1.24	В.24
1.25	В.25
1.26	В.26
1.27	В.27

1.28	В.28
1.29	В.29
1.30	В.30
1.31	В.31
1.32	В.32
1.33	В.33
1.34	В.34
1.35	В.35
1.36	В.36
1.37	В.37
1.38	В.38
1.39	В.39
1.40	В.40
1.41	В.41
1.42	В.42
1.43	В.43
1.44	В.44
1.45	В.45
1.46	В.46
1.47	В.47
1.48	В.48
1.49	В.49
1.50	В.50
1.51	В.51
1.52	В.52
1.53	В.53
1.54	В.54

1.55	В.55
1.56	В.56
1.57	В.57
1.58	В.58
1.59	В.59
1.60	В.60
1.61	В.61
1.62	В.62
1.63	В.63
1.64	В.64
1.65	В.65
1.66	В.66
1.67	В.67
1.68	В.68
1.69	В.69
1.70	В.70
1.71	В.71
1.72	В.72
1.73	В.73
1.74	В.74
1.75	В.75
1.76	В.76
1.77	В.77
1.78	В.78
1.79	В.79
1.80	В.80
1.81	В.81

1.82	B.82
1.83	B.83
1.84	B.84
1.85	B.85
1.86	B.86
1.87	B.87
1.88	B.88
1.89	B.89
1.90	B.90
1.91	B.91
1.92	B.92
1.93	B.93
1.94	B.94
1.95	B.95
1.96	B.96
1.97	B.97
1.98	B.98
1.99	B.99
1.100	B.100
1.101	B.101
1.102	B.102
1.103	B.103
1.104	B.104
1.105	B.105
1.106	B.106
1.107	B.107
1.108	B.108
1.109	B.109
1.110	B.110
1.111	B.111
1.112	B.112
1.113	B.113
1.114	B.114
1.115	B.115
1.116	B.116
1.117	B.117
1.118	B.118
1.119	B.119
1.120	B.120
1.121	B.121
1.122	B.122
1.123	B.123
1.124	B.124
1.125	B.125
1.126	B.126
1.127	B.127
1.128	B.128
1.129	B.129
1.226	B.226
1.227	B.227
1.228	B.228
1.229	B.229

1.130	B.130
1.131	B.131
1.132	B.132
1.133	B.133
1.134	B.134
1.135	B.135
1.136	B.136
1.137	B.137
1.138	B.138
1.139	B.139
1.140	B.140
1.141	B.141
1.142	B.142
1.143	B.143
1.144	B.144
1.145	B.145
1.146	B.146
1.147	B.147
1.148	B.148
1.149	B.149
1.150	B.150
1.151	B.151
1.152	B.152
1.153	B.153
1.154	B.154
1.155	B.155
1.156	B.156
1.157	B.157
1.158	B.158
1.159	B.159
1.160	B.160
1.161	B.161
1.162	B.162
1.163	B.163
1.164	B.164
1.165	B.165
1.166	B.166
1.167	B.167
1.168	B.168
1.169	B.169
1.170	B.170
1.171	B.171
1.172	B.172
1.173	B.173
1.174	B.174
1.175	B.175
1.176	B.176
1.177	B.177

1.178	B.178
1.179	B.179
1.180	B.180
1.181	B.181
1.182	B.182
1.183	B.183
1.184	B.184
1.185	B.185
1.186	B.186
1.187	B.187
1.188	B.188
1.189	B.189
1.190	B.190
1.191	B.191
1.192	B.192
1.193	B.193
1.194	B.194
1.195	B.195
1.196	B.196
1.197	B.197
1.198	B.198
1.199	B.199
1.200	B.200
1.201	B.201
1.202	B.202
1.203	B.203
1.204	B.204
1.205	B.205
1.206	B.206
1.207	B.207
1.208	B.208
1.209	B.209
1.210	B.210
1.211	B.211
1.212	B.212
1.213	B.213
1.214	B.214
1.215	B.215
1.216	B.216
1.217	B.217
1.218	B.218
1.219	B.219
1.220	B.220
1.221	B.221
1.222	B.222
1.223	B.223
1.224	B.224
1.225	B.225

Также особенно предпочтительны смеси 2.1 - 2.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А ацифлуорфен-натрий.

Также особенно предпочтительны смеси 3.1 - 3.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А азафенидин.

Также особенно предпочтительны смеси 4.1 - 4.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А бенкарбазон.

Также особенно предпочтительны смеси 5.1 - 5.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А бензфендизон.

Также особенно предпочтительны смеси 6.1 - 6.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А бифенокс.

Также особенно предпочтительны смеси 7.1 - 7.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.227 только тем, что они содержат в качестве компонента А бутафенацил.

Также особенно предпочтительны смеси 38.1 - 38.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*]-[1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4).

Также особенно предпочтительны смеси 39.1 - 39.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9).

Также особенно предпочтительны смеси 40.1 - 40.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А N-тетрагидрофурурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9).

Также особенно предпочтительны смеси 41.1 - 41.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7).

Также особенно предпочтительны смеси 42.1 - 42.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А N-тетрагидрофурурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7).

Также особенно предпочтительны смеси 43.1 - 43.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион.

Также особенно предпочтительны смеси 44.1 - 44.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А метил (Е)-4-[2-хлор-5-[4-хлор-5-(дифторметокси)-1Н-метилпиразол-3-ил]-4-фторфенокси]-3-метоксибут-2-еноат (CAS 948893-00-3).

Также особенно предпочтительны смеси 45.1 - 45.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1Н-пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4).

Также особенно предпочтительны смеси 46.1 - 46.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А 2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидроизоиндол-1,3-дион.

Также особенно предпочтительны смеси 47.1 - 47.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они содержат в качестве компонента А 1-метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион.

Также особенно предпочтительны смеси 48.1 - 48.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат беноксакор в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 49.1 - 49.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат клоквинтоцет в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 50.1 - 50.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат ципросульфамид в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 51.1 - 51.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат дихлормид в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 52.1 - 52.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат фенхлоразол в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 53.1 - 53.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат фенклорим в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 54.1 - 54.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат фурилазол в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 55.1 - 55.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат изоксадифен в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 56.1 - 56.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат мефенпир в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 57.1 - 57.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3) в качестве защитного вещества С.

Также особенно предпочтительны смеси 58.1 - 58.229, которые отличаются от соответствующих смесей 1.1 - 1.229 только тем, что они дополнительно содержат 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4) в качестве защитного вещества С.

Вообще предпочтительно применение соединения данного изобретения в смеси с гербицидами, которые являются селективными по отношению к сельскохозяйственной культуре, подлежащей обработке, и которые дополняют спектр сорняков, контролируемых этими соединениями при применяемых расходных количествах. Далее также вообще предпочтительно применение соединений данного изобретения и других дополнительных гербицидов в то же самое время или в виде смешанного препарата, или в виде смеси, приготавливаемой в большом резервуаре.

Было обнаружено, что полинуклеотидные молекулы и полипептиды данного изобретения охватывают полинуклеотидные молекулы и полипептиды, включающие нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которая является достаточно идентичной к нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или 3, или аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2 или 4. Термин "достаточно идентичный" используется здесь для ссылки на первую аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая содержит достаточное или минимальное число идентичных или эквивалентных (т.е. с похожими боковыми цепями) аминокислотных остатков или нуклеотидов по отношению ко второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, так что эти первая и вторая аминокислотные или нуклеотидные последовательности имеют общий структурный домен и/или общую функциональную активность.

Как правило, "идентичность последовательности" относится к степени, в которой две оптимально выровненные ДНК или аминокислотные последовательности являются инвариантными по всему окну выравнивания компонентов, т.е. нуклеотидов или аминокислот. "Идентичная доля" для выровненных сегментов тестируемой последовательности и последовательности для сравнения определяется числом идентичных компонентов, которые присутствуют в обеих выровненных последовательностях, деленным на общее число компонентов в сравниваемом сегменте последовательности, например, полная сравниваемая последовательность или меньшая определенная часть сравниваемой последовательности. "Процент идентичности" равен идентичной доле, умноженной на 100. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения хорошо известно специалистам и может быть проведено с помощью таких инструментов, как алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана (Smith и Waterman), алгоритм выравнивания гомологии Нидлмана-Вунша (Needleman и Wunsch), способ поиска сходства ПEARсона и Липпмана (Pearson и Lipman) и предпочтительно компьютеризованных реализаций этих алгоритмов, таких как GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA, доступных как часть GCG, Wisconsin Package, (Accelrys Inc. Burlington, Mass.).

Полинуклеотиды и олигонуклеотиды.

Под "изолированным полинуклеотидом", включая ДНК, РНК или их комбинацию, с единичной или двойной прядью, в сенс или антисенс ориентации или комбинации обеих, dsРНК или другие, подразумевается полинуклеотид, который, как минимум, частично отделен от полинуклеотидных последовательностей, с которыми он ассоциирован или связан в его нативном состоянии. Предпочтительно изолированный полинуклеотид как минимум на 60% свободен, более предпочтительно как минимум на 75% свободен, еще более предпочтительно как минимум на 90% свободен от других компонентов, с которыми он естественно ассоциирован. Как и ожидается опытными специалистами, изолированный полинуклеотид может быть экзогенным полинуклеотидом, присутствующим, например, в трансгенном организме, который, естественно, не должен включать этот полинуклеотид. Кроме того, термин "полинуклеотид(ы)", "нуклеиновокислотная(ые) последовательность(и)", "нуклеотидная(ые) последовательность(и)", "нуклеиновая(ые) кислота(ы)", "молекула нуклеиновой кислоты" используются здесь взаимозаменяемо и относятся к нуклеотидам, или рибонуклеотидам или дезоксирибонуклеотидам или к комбинации обоих, в полимерной неразветвленной форме любой длины.

Термин "мут-ППО нуклеиновая кислота" относится к ППО нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, которая мутировала из дикого типа ППО нуклеиновой кислоты и которая придает повышенную толерантность к ППО ингибирующему гербициду в растении, в котором она была экспрессирована. Кроме того, термин "мутированная протопорфириноген оксидаза (мут-ППО)" относится к замещению аминокислоты дикого типа в первичных последовательностях SEQ ID NO: 2 или 4 или варианте. Экспрессия "мутированной аминокислоты" будет использована ниже для обозначения аминокислоты, которая замещена на другую аминокислоту, таким образом обозначая место мутации в первичной последовательности белка.

Термин "вариант" по отношению к последовательности (т.е. полипептидная или нуклеиновокислотная последовательность, такая как, например, транскрипцию регулирующая нуклеотидная последовательность изобретения) предполагает, что имеются в виду в существенной мере похожие последовательности. Поскольку нуклеотидные последовательности включают открытый считываемый каркас, варианты включают такие последовательности, которые, в связи с тем, что дегенерирован генетический код, кодируют идентичную аминокислотную последовательность нативного белка. Естественно возникающие

аллельные варианты, такие как эти, могут быть идентифицированы с использованием хорошо известных технологий молекулярной биологии, таких как, например, полимеразных цепных реакций (PCR) и гибридизационных технологий. Вариант нуклеотидных последовательностей также включает синтетически полученные нуклеотидные последовательности, такие как генерированные, например, при использовании направленного по месту мутагенеза и для открытых считываемых каркасов, кодируя нативный белок, а также такие, которые кодируют полипептид, имеющий аминокислотное замещение по отношению к нативному белку. Вообще варианты нуклеотидных последовательностей данного изобретения имеют как минимум 30, 40, 50, 60 до 70%, например, предпочтительно 71, 72, 73%, 74, 75, 76, 77, 78 до 79%, как правило, как минимум 80%, например, 81-84%, как минимум 85%, например, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 до 98 и 99% "идентичности нуклеотидной последовательности" к нуклеотидным последовательностям SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45. Процент (%) идентичности полинуклеотида определяют с помощью GAP (Needleman и Wunsch, 1970) анализа (GCG программа) со штрафом создания щели = 5 и со штрафом расширения щели = 0,3. Если не оговорено по-другому, то рассматриваемая последовательность имеет как минимум 45 нуклеотидов в длину и GAP (общего профиля доступа) анализ выравнивает две последовательности в области как минимум 45 нуклеотидов. Предпочтительно рассматриваемая последовательность имеет как минимум 150 нуклеотидов в длину, и GAP анализ выравнивает две последовательности по области как минимум 150 нуклеотидов. Более предпочтительно рассматриваемая последовательность имеет как минимум 300 нуклеотидов в длину? и GAP анализ выравнивает две последовательности по области как минимум 300 нуклеотидов. Еще более предпочтительно, когда GAP анализ выравнивает две последовательности по их полной длине.

Полипептиды.

Под "существенно очищенным полипептидом" или "очищенным" полипептидом подразумевают, что он был отделен от одного или более липидов, нуклеиновых кислот, других полипептидов или других загрязняющих молекул, с которыми он соединен в его нативном состоянии. Предпочтительно, чтобы существенно очищенный полипептид был как минимум на 60% свободен, более предпочтительно как минимум на 75% свободен и еще более предпочтительно как минимум на 90% свободен от других компонентов, с которыми он естественно соединен. Как себе могут представить опытные специалисты, очищенный полипептид может быть рекомбинантно полученным полипептидом. Термины "полипептид" и "белок" вообще используют взаимозаменяемо, и они относятся к одиночной полипептидной цепи, которая может быть или не может быть модифицирована добавлением не аминокислотных групп. Понятно, что такие полипептидные цепи могут соединяться с другими полипептидами или белками или другими молекулами, такими как кофакторы. Термин "белки" и "полипептиды", как используется здесь, также включает варианты, мутанты, модификации, аналоги и/или производные полипептидов данного изобретения, как описано здесь.

Процент (%) идентичности полипептида определяют способом GAP (Needleman и Wunsch, 1970) анализа (GCG программа) со штрафом создания щели = 5 и со штрафом расширения щели = 0,3. Рассматриваемая последовательность имеет как минимум 25 аминокислот в длину, и GAP анализ выравнивает две последовательности по области как минимум 25 аминокислот. Более предпочтительно рассматриваемая последовательность имеет как минимум 50 аминокислот в длину, и GAP анализ выравнивает две последовательности по области как минимум 50 аминокислот. Еще более предпочтительно рассматриваемая последовательность имеет как минимум 100 аминокислот в длину, и GAP анализ выравнивает две последовательности по области как минимум 100 аминокислот. А еще более предпочтительно рассматриваемая последовательность имеет как минимум 250 аминокислот в длину, и GAP анализ выравнивает две последовательности по области как минимум 250 аминокислот. Наиболее предпочтительно GAP анализ выравнивает две последовательности по всей их длине.

По отношению к определенному полипептиду должно быть определено, что числа процентов идентичности более высокие, чем таковые, которые обеспечены выше, будут охватывать предпочтительные варианты. Так, приемлемо в свете минимальных чисел процентной идентичности, что является предпочтительным, когда ППО полипептид данного изобретения может включать аминокислотную последовательность, которая является как минимум на 40%, более предпочтительно как минимум на 45%, более предпочтительно как минимум на 50%, более предпочтительно как минимум на 55%, более предпочтительно как минимум на 60%, более предпочтительно как минимум на 65%, более предпочтительно как минимум на 70%, более предпочтительно как минимум на 75%, более предпочтительно как минимум на 80%, более предпочтительно как минимум на 85%, более предпочтительно как минимум на 90%, более предпочтительно как минимум на 91%, более предпочтительно как минимум на 92%, более предпочтительно как минимум на 93%, более предпочтительно как минимум на 94%, более предпочтительно как минимум на 95%, более предпочтительно как минимум на 96%, более предпочтительно как минимум на 97%, более предпочтительно как минимум на 98%, более предпочтительно как минимум на 99%, более предпочтительно как минимум на 99,1%, более предпочтительно как минимум на 99,2%, более предпочтительно как минимум на 99,3%, более предпочтительно как минимум на 99,4%, более предпочтительно как минимум на 99,5%, более предпочтительно как минимум на 99,6%, более предпочтительно как ми-

нимум на 99,7%, более предпочтительно как минимум на 99,8%, еще более предпочтительно как минимум на 99,9% идентичной SEQ ID NO: 2 или 4.

Под "вариантом" полипептида подразумевают полипептид, полученный из белка SEQ ID NO: 2 или 4 путем стирания (так называемого усечения) или добавления одной или более аминокислот к N-конечному и/или C-конечному концу нативного белка; стирания или добавления одной или более аминокислот в одном или более месте в нативном белке или замещения одной или более аминокислот в одном или более месте в нативном белке. Такие варианты могут происходить, например, из генетического полиморфизма или манипуляций человека. Способы таких манипуляций вообще известны специалистам.

"Производные" белка охватывают пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие аминокислотные замещения, стирания и/или встраивания относительно немодифицированного рассматриваемого белка и имеющие похожую биологическую или функциональную активность, как и немодифицированные белки, из которых они были получены.

"Гомологи" белка включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие аминокислотные замещения, стирания и/или встраивания относительно имеющегося в виду немодифицированного белка и имеющие похожую биологическую и функциональную активность, как и немодифицированный белок, из которого они получены.

Стирание относится к удалению одной или нескольких аминокислот из белка.

Встраивание относится к одному или нескольким аминокислотным остаткам, введенным в заранее предназначенное место белка. Встраивания могут включать N-конечную и/или C-конечную фузию, а также встраивания внутрь последовательности единичной или мультиплетной аминокислоты. Как правило, встраивания внутрь аминокислотной последовательности являются меньшими, чем N- или C-конечные фузии, с порядком от 1 до 10 остатков. К примерам N- или C-конечных фузий белков или полипептидов относятся связывающий домен или активационный домен транскрипционного активатора, такой как используемый в дрожжевой двухгибридной системе, фаговых покровных белках, (гистидин)-6-таг, глутатион S-трансфераза-таг, белок A, связывающий мальтозу белок, дигидрофолатредуктаза, таг-100 эпитоп, с-тус эпитоп, FLAG®-эпитоп, lacZ, CMP (связывающий пептид калмодулин), HA эпитоп, белок C эпитопа и VSV эпитопа. Замещение относится к замещению аминокислот белка другими аминокислотами, имеющими похожие свойства (такие как похожая гидрофобность, гидрофильность, антигенность, предрасположенность к образованию или разрыву α -спиральных структур или β -листных структур). Аминокислотные замещения обычно проводятся единичными остатками, однако могут быть и кластерными, в зависимости от функциональных напряжений, помещенных после полипептида, и могут простирались от 1 до 10 аминокислот; встраивания обычно имеют порядок от 1 до 10 аминокислотных остатков. Аминокислотные замещения являются предпочтительно консервативными аминокислотными замещениями. Таблицы консервативных аминокислотных замещений хорошо известны специалистам (см., например, Creighton (1984), Proteins. W.H. Freeman и Company (Eds).

Таблица 2

Примеры консервативных аминокислотных замещений

Остаток	Консервативные замещения	Остаток	Консервативные замещения
Ala (аланин)	Ser (серин)	Leu (лейцин)	Ile (изолейцин); Val (валин)
Arg (аргинин)	Lys (лизин)	Lys (лизин)	Arg (аргинин); Gln (глутамин)
Asn (аспарагин)	Gln (глутамин); His (гистидин)	Met (метионин)	Leu (лейцин); Ile (изолейцин)
Asp (аспарагиновая кислота)	Glu (глутаминовая кислота)	Phe (фенилаланин)	Met (метионин); Leu (лейцин); Tyr (тирозин)
Gln (глутамин)	Asn (аспарагин)	Ser (серин)	Thr (треонин); Gly (глицин)
Cys (цистеин)	Ser (серин)	Thr (треонин)	Ser (серин); Val (валин)
Glu (глутаминовая кислота)	Asp (аспарагиновая кислота)	Trp (триптофан)	Tyr (тирозин)
Gly (глицин)	Pro (пролин)	Tyr (тирозин)	Trp (триптофан); Phe (фенилаланин)
His (гистидин)	Asn (аспарагин); Gln (глутамин)	Val (валин)	Ile (изолейцин); Leu (лейцин)
Ile (изолейцин)	Leu (лейцин), Val (валин)		

Аминокислотные замещения, стирания и/или встраивания можно легко проводить, используя технологию синтеза пептидов, хорошо известную специалистам, такую как твердофазный синтез пептидов и тому подобные, или путем рекомбинантных превращений ДНК. Методы превращения ДНК последовательностей с осуществлением вариантов замещения, встраивания или стирания в белке хорошо известны специалистам. Например, технология получения мутаций замещения в специально предназначенных ме-

стах ДНК хорошо известна специалистам и включает M13 мутагенез, мутагенез T7-гена *in vitro* (USB, Cleveland, OH), направленный по месту мутагенез с быстрым замещением (Stratagene, San Diego, CA), PCR-опосредованный направленный по месту мутагенез или другие направленные по месту протоколы мутагенеза.

"Производные" далее включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, которые могут по сравнению с аминокислотными последовательностями естественно встречающихся форм белка, такими как представляющий интерес белок, включать замещение аминокислот не встречающимися в природе аминокислотными остатками или присоединение не встречающихся в природе аминокислотных остатков. "Производные" белка также включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, естественно встречающиеся измененные (гликозилированные, ацилированные, пренилированные, фосфорилированные, миристоилированные, сульфатированные и т.д.) или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, измененные по сравнению с аминокислотными последовательностями естественно встречающихся форм полипептидов. Производное может также включать один или более не аминокислотных заместителей или присоединений по сравнению с аминокислотной последовательностью, из которой оно получено, например репортерная молекула или другой лиганд, ковалентно или не ковалентно связанный с аминокислотной последовательностью, такой как репортерная молекула, которая присоединена для облегчения его обнаружения, и не естественно появляющиеся аминокислотные остатки по отношению к аминокислотной последовательности естественно существующего белка. Кроме того, "производные" также включают фузии естественно встречающихся форм белка с прикрепленными в виде меток пептидами, такими как FLAG, HIS6 или тиоредоксин (обзор по прикрепленным в виде меток пептидам, см. в Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523-533, 2003).

"Ортологи" и "паралоги" связаны с эволюционными концепциями, используемыми для описания наследственных взаимоотношений генов. Паралоги являются генами внутри того же биологического вида, из которого они получены путем дубликации одного наследственного гена; ортологи являются генами из отличных организмов, которые образуются путем видообразования и также получаются из обычных наследственных генов. Не ограничивающий список примеров таких ортологов показан в табл. 1.

Специалистам хорошо известно, что паралоги и ортологи могут составлять доли различных доменов, укрывающих подходящие аминокислотные остатки в заданных местах, таких как связывающие карманы для определенных субстратов или связывающие мотивы для взаимодействия с другими белками.

Термин "домен" относится к ряду аминокислот сохранных в специфических положениях вдоль выравнивания последовательностей эволюционно родственных белков. В то время как аминокислоты в других положениях могут варьироваться между гомологами, аминокислоты, которые в высокой степени сохранены в специфических положениях, индицируют аминокислоты, которые являются существенными для структуры, стабильности или функции белка. Идентифицируемые с высокой степенью их сохранности при выравнивании последовательностей семейства белковых гомологов, они могут быть использованы в качестве идентификаторов для того, чтобы определить, относится ли любой рассматриваемый полипептид к ранее идентифицированному семейству полипептидов.

Термин "мотив" или "консенсусная последовательность" относится к короткой сохраненной области в последовательности эволюционно родственных белков. Мотивы часто представляют собой в высокой степени сохраненные части доменов, однако могут включать только часть домена или быть локализованы вне сохраненного домена (в том случае, когда все аминокислоты мотива оказываются вне определенного домена).

Существуют специальные базы данных для идентификации доменов, например SMART (Schultz et al., (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5857-5864; Letunic et al., (2002), Nucleic Acids Res., 30, 242-244), InterPro (Mulder et al., (2003), Nucl. Acids Res., 31, 315-318), Prosite (Bucher и Bairoch (1994) и обобщенный профильный синтаксис для биомолекулярных последовательностей мотивов и их функций в автоматической интерпретации последовательностей (в) ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology; Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Eds., p. 53-61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., Nucl. Acids Res., 32:D134-D137, (2004)); или Pfam (Bateman et al., Nucl. Acids Research, 30(1): 276-280, (2002)). Ряд инструментов *in silico* анализа белковых последовательностей можно получить из ExPASy противомикс сервера (Шведский институт биоинформатики (Gasteiger et al., ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucl. Acids Res., 31:3784-3788, (2003)). Домены и мотивы можно также идентифицировать с помощью рутинной техники, такой как выравнивание последовательностей.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны специалистам, эти способы включают GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA TFASTA. GAP использует алгоритм Нидлмана-Вунша (Needleman и Wunsch, (1970), J. Mol. Biol., 48: 443-453) для нахождения всеобщего (т.е. охватывающего полные последовательности) отнесения двух последовательностей, который максимизирует число сравниваемых пар и минимизирует число щелей. BLAST алгоритм (Altschul et al., (1990), J. Mol. Biol., 215: 403-10) рассчитывает проценты идентичности последовательности и выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей. Программное обеспечение для осуществления BLAST

анализа открыто доступно через Национальный Центр Биотехнологической Информации (National Centre for Biotechnology Information (NCBI)). Гомологи могут быть легко идентифицированы с использованием, например, алгоритма выравнивания ClustalW мультиплетной последовательности (версия 1.83), с параметрами ошибки попарного выравнивания и способом меток в процентах. Общие проценты сходства и идентичности могут быть также определены с использованием способов из пакета программного обеспечения MatGAT (Campanella et al., BMC Bioinformatics, 2003, Jul 10; 4:29, MatGAT: применение, которое создает матрицы похожести/идентичности, используя белковые или ДНК последовательности). Незначительное редактирование вручную может быть проведено для оптимизации выравнивания между сохраненными мотивами, как это очевидно специалистам. Кроме того, вместо использования полной длины последовательностей для идентификации гомологов могут также использоваться специфические домены. Величины идентичности последовательностей могут быть определены по всей нуклеиновокислотной или аминокислотной последовательности или по выбранным доменам или сохраненному(ым) мотиву(ам), используя упомянутые выше программы с использованием параметров ошибок (отклонений). Для локального выравнивания особенно полезен алгоритм Смита-Ватермана (Smith T.F., Waterman M.S., (1981), J. Mol. Biol., 147(1); 195-7).

Изобретатели данного изобретения обнаружили, что замещение одного или более ключевых аминокислотных остатков может заметно увеличить толерантность или устойчивость к гербициду по сравнению с активностью дикого типа ППО энзимов с SEQ ID NO: 2 или 4. Предпочтительными замещениями мут-ППО являются такие, которые увеличивают толерантность к гербициду растения, однако оставляют в существенной мере неизменной биологическую активность оксидазной активности.

Соответственно, в другом объекте данного изобретения ключевой аминокислотный остаток ППО энзима и его вариант замещен любой другой аминокислотой.

В предпочтительном варианте ключевой аминокислотный остаток ППО энзима и его вариант замещен сохраненной аминокислотой, как показано в табл. 2.

Специалистам должно быть понятно, что аминокислоты, локализованные тесно поблизости от позиций аминокислот, упомянутых ниже, могут быть также замещены. Так, в другом варианте изобретения вариант SEQ ID NO: 2 или 4, вариант его включает мут-ППО, в котором одна аминокислота, находящаяся в ± 3 , ± 2 или ± 1 аминокислотной позиции от ключевой аминокислоты, замещена любой другой аминокислотой.

Основываясь на хорошо известные технологии, могут быть развиты высоко характеристические образцы последовательности, с помощью которых найдены дальнейшие мут-ППО претенденты с желательной активностью.

Поиск дальнейших мут-ППО претендентов с использованием подходящих образцов последовательностей также охватывается данным изобретением. Опытному читателю должно быть понятно, что представленные примеры последовательностей не ограничены точным расстоянием между двумя смежными аминокислотными остатками этих примеров. Каждое расстояние между двумя соседями в указанных выше примерах может, например, меняться независимо один от другого вплоть до ± 10 , ± 5 , ± 3 , ± 2 или ± 1 аминокислотных позиций без существенного влияния на желательную активность.

Кроме того, применяя способ направленного по месту мутагенеза, изобретатели данного изобретения идентифицировали специфические комбинации мутаций, причем комбинации относятся к замещению фенилаланинового остатка в позиции 420 в SEQ ID NO: 2 или 4, комбинированной со вторым замещением лейцина в позиции 397 в SEQ ID NO: 2 или 4.

Так, в более предпочтительном варианте изобретения вариант или производное мут-ППО SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 выбирают из комбинированных аминокислотных замещений, приведенных в табл. 3а.

Таблица 3а

SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 (комбинированные аминокислотные замещения, полученные путем направленного по месту мутагенеза)

Номер комбинации	SEQ ID NO:	Ключевая аминокислотная позиция комбинации	Предпочтительное замещение
1	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Gly (глицин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
2	2	Leu397 (лейцин)	Ala (аланин)
3	2 или 4	Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
		Leu397 (лейцин)	Ser (серин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
4	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Thr (треонин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
5	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Cys (цистеин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
6	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Val (валин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
7	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Ile (изолейцин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
8	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Met (метионин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
9	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Pro (пролин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
10	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Phe (фенилаланин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
11	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Tyr (тирозин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
12	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Trp (триптофан)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
13	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Asp (аспарагиновая кислота)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
14	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Glu (глутаминовая кислота)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
15	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Asn (аспарагин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
16	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Gln (глутамин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
17	2	Leu397 (лейцин)	His (гистидин)

	и ли 4	Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
18	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Lys (лизин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
19	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Arg (аргинин)
		Phe420 (фенилаланин)	Met (метионин)
20	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Gly (глицин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
21	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Ala (аланин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
22	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Ser (серин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
23	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Thr (треонин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
24	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Cys (цистеин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
25	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Val (валин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
26	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Ile (изолейцин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
27	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Met (метионин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
28	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Pro (пролин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
29	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Phe (фенилаланин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
30	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Tyr (тирозин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
31	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Trp (триптофан)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
32	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Asp (аспарагиновая кислота)
		Phe420	Val (валин)

		(фенилаланин)	
33	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Glu (глутаминовая кислота)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
34	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Asn (аспарагин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
35	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Gln (глутамин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
36	2 или 4	Leu397 (лейцин)	His (гистидин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
37	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Lys (лизин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)
38	2 или 4	Leu397 (лейцин)	Arg (аргинин)
		Phe420 (фенилаланин)	Val (валин)

В другом более предпочтительном варианте изобретения вариант или производное мут-ППО SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 выбирают из комбинированных аминокислотных замещений, приведенных в табл. 3b.

Таблица 3b

SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 (комбинированные аминокислотные замещения)

Номер комбинации	SEQ ID NO:	Ключевая аминокислотная позиция комбинации	Предпочтительные замещения
39	2 или 4	Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
40	2 или 4	Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
41	2 или 4	Phe204	Ala, Leu, Ile, Val
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
42	2 или 4	Thr208	Ser
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
43	2 или 4	Leu400	Ala
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
44	2 или 4	Phe204	Ile
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met

45	2 и л и 4	The208	Ser
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
46	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Thr208	Ser
47	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
48	2 и л и 4	Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe420	Val, Met, Ala, Ile, Leu
49	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Phe420	Val, Met, Ala, Ile, Leu
50	2 и л и 4	Phe420	Val, Met, Ala, Ile, Leu
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
51	2 и л и 4	Arg128	Ala, Leu, Ile, Val
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
52	2 и л и 4	Thr208	Ser
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
53	2 и л и 4	Phe204	Ile
		The208	Ser
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
54	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
55	2 и л и 4	Thr208	Ser
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
56	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Thr208	Ser
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
57	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
58	2 и л и 4	Thr208	Ser
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
59	2 и л и 4	Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
60	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
61	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Thr208	Ser
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
62	2 и л и 4	Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met

		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
63	2 и л и 4	Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
64	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
65	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Thr208	Ser
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
66	2 и л и 4	Thr208	Ser
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
67	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
68	2 и л и 4	Arg128	Ala, Leu, Ile, Val
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
69	2 и л и 4	Arg128	Ala, Leu, Ile, Val
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
70	2 и л и 4	Arg128	Ala, Leu, Ile, Val
		Phe204	Ile
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
71	2 и л и 4	Arg128	Ala, Leu, Ile, Val
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
72	2 и л и 4	Thr208	Ser
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
73	2 и л и 4	Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
74	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
75	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Thr208	Ser
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
76	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Thr208	Ser
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
77	2 и л и	Arg128	Ala, Leu, Ile, Val

	4	Phe204	Ile
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
78	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
79	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Thr208	Ser
		Leu397	Asp, Glu, Gln, Asn
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
80	2 и л и 4	Phe204	Ile
		Thr208	Ser
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val
81	2 и л и 4	Arg128	Ala, Leu, Ile, Val
		Phe204	Ile
		Leu400	Ala, Ile, Val, Met
		Phe420	Met, Ala, Leu, Ile, Val
		Phe457	Met, Ala, Leu, Ile, Val

Понятно, что любая аминокислота, которая упомянута в табл. 3, может быть использована в качестве заместителя. Испытания по тестированию функциональности таких мутантов являются доступными специалистам и соответственно описаны в разделе примеров данного изобретения.

В предпочтительном варианте аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности ППО SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 в одной или более из следующих позиций: 397, 420.

Примеры различий этих аминокислотных позиций включают, но не ограничиваются ими, один или более из следующих:

аминокислота в позиции 397 является отличной от лейцина (Leu);

аминокислота в позиции 420 является отличной от фенилаланина (Phe).

В некоторых вариантах мут-ППО энзим SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 включает одно или более из следующего:

аминокислота в позиции 397 является Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln;

аминокислота в позиции 420 является Val, Met, Ala, Ile или Leu.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Tyr, Trp, Asp, Glu, Asn, Gln, His, Lys или Arg и аминокислота в позиции 420 является Met, Ala, Leu, Ile или Val.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Gly и аминокислота в позиции 420 является Met.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Gly и аминокислота в позиции 420 является Ala.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Gly и аминокислота в позиции 420 является Leu.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Gly и аминокислота в позиции 420 является Ile.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Gly и аминокислота в позиции 420 является Val.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Ala и аминокислота в позиции 420 является Met.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Ala и аминокислота в позиции 420 является Ala.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Ala и аминокислота в позиции 420 является Leu.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, в которой аминокислота в позиции 397 является Ala и аминокислота в позиции 420 является Ile.

В другом предпочтительном варианте мут-ППО включает последовательность SEQ ID NO: 2, вариант ее, гомолог, в которой аминокислота в позиции 397 является Ala и аминокислота в позиции 420 явля-

[illegible]

Под "контрольной клеткой" или "подобным, дикого типа растением, тканью растения, клеткой растения или клеткой хозяина" понимают растение, ткань растения, клетку растения или клетку хозяина соответственно, у которых отсутствуют характеристики устойчивости к гербицидам и/или характерный полинуклеотид данного изобретения, который раскрыт здесь. Использование термина "дикий тип" не должно в связи с этим предполагать, что у растения, ткани растения, клетки растения или другой клетки хозяина отсутствуют рекомбинантные ДНК в их геномах и/или что они не обладают характеристиками устойчивости к гербицидам, которые отличны от таковых, раскрытых здесь.

Устойчивость или толерантность можно определить путем создания трансгенного растения или клетки хозяина, предпочтительно клетки растения, включающей нуклеиновокислотную последовательность библиотеки со стадии а) и сравнения этого трансгенного растения с контрольным растением или клеткой хозяина, предпочтительно клеткой растения.

Доступны много способов, хорошо известных специалистам, для получения подходящих претендентных нуклеиновых кислот для идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мут-ППО из ряда различных возможных источников организмов, включая микробы, растения, грибы, водоросли, смешанные культуры и т.д., а также источников ДНК из окружающей среды, таких как почва. Эти способы включают, среди прочего, приготовление библиотек сДНК или геномных ДНК, использование подходящих вырожденных олигонуклеотидных инициаторов, использование проб, базирующихся на известных последовательностях или комплементарных опытах (например, для выращивания в присутствии тирозина), а также таких, как использование мутагенеза или тасования, для того чтобы обеспечить рекомбинированные или тасованные мут-ППО кодирующие последовательности.

Нуклеиновые кислоты, включающие претендентную и контрольную ППО кодирующие последовательности, можно экспрессировать в дрожжах, в линии хозяина бактерии, в водоросли или в высшем растении, таком как табак или *Arabidopsis*, и провести скрининг относительных уровней внутренне присущей толерантности ППО кодирующих последовательностей согласно видимому индикатору фенотипа трансформированной линии растения в присутствии различных концентраций выбранного ППО ингибирующего гербицида. Реакция на дозу и относительные сдвиги в реакции на дозу, связанные с этим индикаторным фенотипом (образование коричневого окрашивания, рост ингибирования, гербицидный эффект и т.д.), удобно выражаются в терминах, например GR50 (концентрация, при которой рост уменьшается на 50%) или MIC (минимальная ингибирующая концентрация) величины возрастают по величине в соответствии с внутренне присущей толерантностью экспрессированной ППО. Например, при относительно быстрой системе испытаний, базирующейся на трансформации бактерии, такой как *E.coli*, каждая мут-ППО кодирующая последовательность может быть экспрессирована, например, такая как DNA последовательность под экспрессионным контролем контролируемого промотора, такого как *lacZ* промотор, и принимая во внимание, например, при использовании синтетической ДНК такие воздействия, как использование кодона, для того чтобы получить сравнимый по возможности уровень экспрессии различных ППО последовательностей. Такие линии экспрессирующих нуклеиновых кислот, включающие альтернативные претендентные ППО последовательности, можно поместить в различные концентрации выбранных ППО ингибирующих гербицидов, при необходимости, в среду, дополненную тирозином, и определить относительные уровни внутренне присущей толерантности экспрессированных ППО энзимов на основе степени и MIC для ингибирования с образованием коричневого, хромотичного пигмента.

В другом варианте претендентные нуклеиновые кислоты, трансформированные в растительный материал для создания трансгенного растения, регенерируют в морфологически нормальные фертильные растения, которые затем измеряют на различие толерантности к выбранным ППО-ингибирующим гербицидам.

Специалистам хорошо известны многие пригодные способы трансформирования с использованием подходящих селекционных маркеров, таких как канамицин, бинарные векторы, такие как из *Agrobacterium*, и регенерации растения, такого как, например, из дисков табачных листьев. При желании, контрольную популяцию растений таким же образом трансформируют нуклеиновой кислотой, экспрессируя контрольную ППО. Альтернативно, нетрансформированное двудольное растение, такое как *Arabidopsis* или *Tobacco*, может быть использовано в качестве контроля, так как оно в любом случае экспрессирует собственный эндогенный ППО. Среднее и распределение уровней толерантности к гербицидам ряда первичных событий трансформаций растений или их прогенов к ППО ингибирующим гербицидам, описанное выше, определяют нормальным образом, опираясь на повреждение растения, меристематические симптомы отбеливания и т.д. при ряде различных концентраций гербицидов. Эти данные могут быть выражены в терминах, например, GR50 величин, получаемых из кривых доза/отклик, в которых "дозу" откладывают на х-оси и "процент убивания", "гербицидный эффект", "число появившихся зеленых растений" и т.д. откладывают на у-оси, причем возросшие GR50 значения соответствуют повышенному уровню собственной присущей толерантности экспрессированных ППО. Гербициды в зависимости от обстоятельств могут применяться перед всходами или после всходов.

Термин "экспрессия/экспрессирование" или "экспрессия гена" означает транскрипцию специфического гена или специфических генов или специфической генной конструкции. Термин "экспрессия" или "экспрессия гена", в частности, означает транскрипцию гена или генов или генной конструкции в струк-

турные РНК (rРНК, tРНК) или мРНК с или без последующей трансляции последней в белок. Процесс включает транскрипцию ДНК и обработку результирующего мРНК продукта.

Для получения желательного эффекта, т.е. растений, которые толерантны или устойчивы к ППО ингибирующему гербициду, производному гербициду данного изобретения, должно быть понятно, что как минимум одна нуклеиновая кислота должна быть "сверхэкспрессированной" способами и путями, которые известны специалистам.

Термин "повышенная экспрессия" или "сверхэкспрессия", как используется здесь, означает форму экспрессии, которая является дополнительной к оригинальному дикого типа уровню экспрессии. Способы повышения экспрессии генов и генных продуктов хорошо задокументированы по видам и включают, например, сверхэкспрессию, управляемую подходящими промоторами, использование транскрипционных усиливающих агентов или трансляционных усиливающих агентов. Изолированные нуклеиновые кислоты, которые служат в качестве промоторных или усиливающих элементов, могут быть введены в подходящую позицию (типично выше по течению) негетерологической формы полинуклеотида таким образом, чтобы регулировать сверхэкспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей интересующий полипептид. Например, эндогенные промоторы могут быть изменены *in vivo* путем мутации, стирания и/или замещения (см. Kmiec, US 5565350; Zarling et al., WO 93/22443) или могут быть введены изолированные промоторы в клетку растения в подходящей ориентации и в подходящем расстоянии от гена данного изобретения, для того чтобы контролировать экспрессию гена.

Если желательна экспрессия полипептида, то, как правило, желательно включение области полиаденилирования у 3'-конца области, кодирующей полинуклеотид. Область полиаденилирования может быть получена из естественного гена, из ряда других растительных генов или из Т-ДНК. 3'-концевая последовательность, которую следует добавить, может быть получена, например, из гена нопалин синтазы или октопин синтазы, или, альтернативно, из другого растительного гена, или менее предпочтительно из любого другого эукариотического гена.

Интронная последовательность может быть также добавлена к 5'-нетранслированной области (UTR) или кодирующей последовательности частично кодирующей последовательности, для того чтобы увеличить число зрелых сообщений, которые аккумулируются в цитозоле. Было показано, что включение способного к сращиванию интрона в транскрипционную единицу как в растительную, так и в животную экспрессионные конструкции приводит к увеличению уровней экспрессии гена как в мРНК, так и в белке до 1000-кратных (Buchman и Berg, (1988), *Mol. Cell Biol.*, 8: 4395-4405; Callis et al., (1987), *Genes Dev.*, 1:1183-1200). Такое интронное повышение экспрессии гена является типически самым большим, если размещают вблизи 5'-конца транскрипционной единицы. Использование кукурузных интронов Adh1-S интрон 1, 2 и 6, бронзы-1 интрона известно специалистам. Для общей информации см. *The Maize Handbook*, Chapter 116, Freeling и Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994).

Термин "введение" или "трансформация", как ссылаются здесь, охватывает перенос экзогенного полинуклеотида в клетку хозяина безотносительно от использованного способа переноса. Растительные ткани, способные к последующему клональному размножению в результате или органогенеза, или эмбриогенеза, могут быть трансформированы с помощью генетических конструкций данного изобретения, и из них регенерируют целое растение. Характерные выбранные ткани могут варьироваться в зависимости от доступной клональной системы размножения и лучше подходящей для того, чтобы подходящие виды были трансформированы. Примеры целевых тканей включают диски листьев, цветочную пыльцу, эмбрионы, семядоли, гипокотили, мегагаметофиты, каллусовую ткань, существующие меристематические ткани (например, верхушечная меристема, пазушные зародыши и корневые меристемы) и индуцированные меристемные ткани (например, меристема семядоли и меристема гипокотили). Полинуклеотид может быть временно или стабильно введен в клетку хозяина и может быть установлен не интегрировано, например, в качестве плазмиды. Альтернативно он может быть интегрирован в геном хозяина. Результирующая трансформированная растительная клетка может быть затем использована для регенерации трансформированного растения известным специалистам образом.

Перенос чужих генов в геном растения называется трансформацией. Трансформация вида растения представляет сейчас рутинную технику. Преимущественно может быть использован любой из нескольких способов трансформации, для того чтобы ввести представляющий интерес ген в прародительскую клетку. Способы, описанные для трансформации и регенерации растений из растительных тканей или растительных клеток, могут быть использованы для временной или стабильной трансформации. Способы трансформации включают использование липосом, электропорации, химикалий, которые увеличивают свободное поглощение ДНК, инъекцию ДНК напрямую в растение, пушку для бомбардировки частицами, трансформации, используя вирусы или цветочную пыльцу и микропроектию. Способы могут быть выбраны из кальций/полиэтиленгликолевого способа для протопластов (Krens, F.A. et al., (1982), *Nature*, 296, 72-74; Negrutiu I. et al., (1987), *Plant Mol. Biol.*, 8:363-373); электропорации протопластов (Shillito R.D. et al., (1985), *Bio/Technol.*, 3, 1099-1102); микроинъекции в растительный материал (Crossway A. et al., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 202:179-185); бомбардировки частицами, покрытыми ДНК или РНК (Klein T.M. et al., (1987), *Nature*, 327:70), инфекции (неинтегративной) вирусами и т.п. Трансгенные растения, включая трансгенные сельскохозяйственные растения, предпочтительно получают че-

рез *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию. Полезный способ трансформации представляет собой трансформацию в растении. Наконец, можно, например, позволить *agrobacteria* воздействовать на семена растений или привить *agrobacteria* растительной меристеме. Оказалось особенно целесообразным в согласии с данным изобретением позволить суспензии трансформированной *agrobacteria* воздействовать на неповрежденное растение или, как минимум, на первичный цветок. Растение затем выращивают до получения семян обработанного растения (Clough и Bent, *Plant J.*, (1998), 16, 735-743). Способы *Agrobacterium*-опосредованной трансформации риса включают хорошо известные способы трансформации риса, такие как описанные в одном из следующих источников: Европейская патентная заявка EP 1198985 A1, Aldemita и Hodges (*Planta*, 199: 612-617, 1996); Chan et al., (*Plant Mol. Biol.*, 22 (3):491-506, 1993), Hiei et al., (*Plant J.*, 6(2):271-282, 1994), эти раскрытия включены здесь в качестве ссылки в полном объеме. В случае трансформации кукурузы предпочтителен способ, который описан или Ishida et al. (*Nat. Biotechnol.*, 14(6):745-50, 1996), или Frame et al. (*Plant Physiol.*, 129(1):13-22, 2002), причем эти раскрытия включены здесь в качестве ссылки в полном объеме. Эти способы далее описаны, например, в статье B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, в книге: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung и R. Wu, Academic Press (1993), 128-143, и в Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 42, (1991) 205-225). Нуклеиновая кислота или конструкция, подлежащая экспрессии, предпочтительно клонируется в вектор, который пригоден для трансформирования *Agrobacterium tumefaciens*, например pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.*, 12, (1984), 8711). *Agrobacteria*, трансформированная таким вектором, может быть затем использована известным образом для трансформации растений, таких как растения, используемые в качестве моделей, подобные *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* в пределах охвата данного изобретения не рассматривается как сельскохозяйственное растение), или сельскохозяйственные растения, такие как, например, растения табака, например, путем погружения растолченных листьев или рубленых листьев в агробактериальный раствор и последующего их культивирования в подходящей среде. Трансформация растений посредством *Agrobacterium tumefaciens* описана, например, Höfgen и Willmitzer в *Nucl. Acid Res.*, (1988) 16, 9877 или известна, среди прочего, из F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*, в книге *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung и R. Wu, Academic Press, 1993, p. 15-38.

В дополнение к трансформации соматических клеток, которые затем подлежат регенерации в неповрежденные растения, также возможно трансформирование клеток меристем растения и, в частности, таких клеток, которые развиваются в гаметы. В этом случае трансформированные гаметы следуют естественному развитию растения, давая начало трансгенным растениям. Так, например, семена *Arabidopsis* обрабатывают агробактерией и получают семена от развившихся растений, из которых определенная часть оказалась трансформированной и, таким образом, трансгенной [Feldman, K.A. и Marks M.D., (1987), *Mol. Gen Genet.*, 208:274-289; Feldmann K., (1992), в книге: C. Koncz, N.-H. Chua и J. Shell, eds, *Methods in Arabidopsis Research*, Word Scientific, Singapore, p. 274-289]. Альтернативные способы основываются на повторном удалении соцветий и инкубировании места вырезания в центре розетки с трансформированной агробактерией, в соответствии с этим трансформированные семена могут быть получены аналогичным образом в более позднее время (Chang, (1994), *Plant J.*, 5:551-558; Katavic, (1994), *Mol. Gen Genet.*, 245: 363-370). Однако очень эффективным способом является способ вакуумной инфильтрации с его модификациями, такими как способ "окунания цветка". В случае вакуумной инфильтрации *Arabidopsis* неповрежденные растения при пониженном давлении обрабатывают агробактериальной суспензией [Bechthold, N., (1993), *C R Acad Sci. Paris Life Sci.*, 316:1194-1199], в то время как в случае способа "окунания цветка" развивающуюся ткань цветка недолго инкубируют с обработанной поверхностно-активным веществом агробактериальной суспензией [Clough, S.J. и Bent A.F., (1998), *The Plant J.*, 16, 735-743]. Определенную долю трансгенных семян собирают в качестве урожая в обоих случаях, и эти семена могут отличаться от нетрансгенных растений путем выращивания при описанных выше селективных условиях. Кроме того, подходящая трансформация пластидов является предпочтительной, так как пластиды являются наследующими по материнской линии, что в большинстве сельскохозяйственных культур уменьшает или устраняет риск переноса трансгенов через пыльцу. Трансформация генома хлоропласта, как правило, достигается с помощью процесса, который схематически представлен в Klaus et al., 2004, [*Nature Biotechnology*, 22(2), 225-229]. Кратко говоря, последовательности, подлежащие трансформированию, клонируют вместе с селекционным маркерным геном между боковыми последовательностями, гомологическими к хлоропластовому геному. Эти гомологические боковые последовательности направляют место специфического интегрирования в пластом. Пластидные трансформации были описаны для многих различных видов растений и обзор по этому вопросу приведен в Bock, (2001), *Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology*, *J. Mol. Biol.*, 2001, Sep 21; 312(3):425-38 или в Maliga, P., (2003), *Progress towards commercialization of plastid transformation technology*, *Trends Biotechnol.*, 21, 20-28. О дальнейшем биотехнологическом прогрессе недавно сообщалось в форме маркера свободного пластидного трансформанта, который может быть получен путем временного соинтегрированного маркерного гена (Klaus et al., 2004, *Nature Biotechnology*, 22(2), 225-229). Генетически измененная клетка растения может быть регенерирована всеми способами, с которыми хорошо знакомы специалисты. Подходящие способы можно найти в упомянутых выше публикациях S.D. Kung и R. Wu, Potrykus или Höfgen и

Willmitzer.

Как правило, после трансформации проводят отбор растительных клеток или групп клеток по присутствию одного или более маркеров, которые закодированы растительно-экспрессионными генами, соперенесенными с представляющими интерес генами, после чего трансформированный материал регенерируют в целое растение. Для того чтобы отобрать трансформированные растения, растительный материал, полученный при трансформации, подвергают, как правило, условиям отбора, так что трансформированные растения можно отличить от нетрансформированных растений. Например, семена, полученные описанным выше способом, могут быть высажены и после начального периода роста подвергнуты отбору (селекции) путем опрыскивания. Другая возможность состоит в выращивании семян, при необходимости после стерилизации, на агаровых пластинках с использованием подходящих селекционных агентов, так что только трансформированные семена могут вырасти в растения. Альтернативно, проводят скрининг трансформированных растений на присутствие селективного маркера, такого как один из описанных выше.

В дальнейшем возможные трансформированные растения с ДНК переносом и регенерацией могут быть также определены, например, при использовании Southern анализа на присутствие представляющих интерес генов, число копий и/или геномную организацию. Альтернативно или дополнительно, можно провести мониторинг экспрессионных уровней вновь введенной ДНК с использованием Northern и/или Western анализа, обе технологии хорошо известны специалистам в этой области.

Созданные трансформированные растения могут быть размножены различными путями, такими как клональное размножение или классические технологии размножения. Например, первое поколение (или T1) трансформированного растения может быть самоопылено и отобрана гомозиготная вторая генерация (или T2) трансформированных растений, и T2 растения могут быть далее размножены с помощью классических технологий размножения. Созданные трансформированные организмы могут принимать ряд форм. Например, они могут быть химерами трансформированных клеток и не трансформированных клеток; клональными трансформантами (например, все клетки трансформированы с содержанием экспрессионной кассеты); живцами трансформированных и не трансформированных тканей (например, в растениях трансформированный корневой побег превращается в не трансформированный росток).

Предпочтительно мут-ППО нуклеиновая кислота включает полинуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, которая включает:

- а) полинуклеотид, как показано в SEQ ID NO: 1 или 3, или его вариант;
- б) полинуклеотид, кодирующий полипептид, как показано в SEQ ID NO: 2 или 4, или его вариант.

Предпочтительно экспрессия нуклеиновой кислоты в растении приводит к повышенной устойчивости растения к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа растения.

В другом варианте изобретение относится к растению, предпочтительно трансгенному растению, включающему клетку растения согласно данному изобретению, в котором экспрессия нуклеиновой кислоты в растении приводит к повышенной устойчивости растения к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа растения.

Описанные здесь растения могут быть или трансгенными сельскохозяйственными растениями или не трансгенными растениями.

Для целей данного изобретения термины "трансгенный", "трансген" или "рекомбинантный" означают по отношению, например, к нуклеиновокислотной последовательности, экспрессионную кассету, генную конструкцию или вектор, включающий нуклеиновокислотную последовательность, или организм, трансформированный нуклеиновокислотной последовательностью, экспрессионной кассетой или вектором согласно данному изобретению, все такие конструкции связаны с рекомбинантными способами, в которых:

(а) нуклеиновокислотные последовательности, которые кодируют белки, полезные в способах данного изобретения; или

(б) генетическая контрольная(ые) последовательность(и), которая оперативно связана с нуклеиновокислотной последовательностью согласно данному изобретению, например промотор; или

(с) а) и б)

не локализованы в их естественном генетическом окружении или были модифицированы рекомбинантными способами, существует возможность для модификации принимать форму, например, замещения, дополнения, стирания, перестановки или введения одного или более нуклеотидных остатков.

Под естественным генетическим окружением понимают по смыслу естественный геномный или хромосомный локус в оригинальном растении или присутствие в геномной библиотеке. В случае геномной библиотеки естественное генетическое окружение нуклеиновокислотной последовательности предпочтительно сохраняется, как минимум, частично. Окружающие фланги нуклеиновокислотной последовательности как минимум на одной стороне имеют длину последовательности как минимум 50 п.о. (пар оснований), предпочтительно как минимум 500 п.о., более предпочтительно как минимум 1000 п.о., еще более предпочтительно как минимум 5000 п.о. Естественно встречающаяся экспрессионная кассета, например естественно встречающаяся комбинация естественного промотора нуклеиновокислотных последовательностей с соответствующей нуклеиновокислотной последовательностью, кодирующей полипеп-

тид, полезный в способах данного изобретения, как определено выше, становится трансгенной экспрессионной кассетой, когда эта экспрессионная кассета модифицирована не естественными, синтетическими ("искусственными") способами, такими как, например, мутагенная обработка. Подходящие способы описаны, например, в US 5565350 или WO 00/15815.

Под трансгенным растением для целей данного изобретения, таким образом, следует понимать, как указано выше, такое, у которого нуклеиновая кислота, используемая в способе изобретения, находится не в ее естественном локусе в геноме этого растения, существует возможность того, что нуклеиновая кислота может быть экспрессирована гомологично или гетерологично. Однако, как упоминалось, трансгенный также означает, что, в то время как нуклеиновые кислоты согласно данному изобретению или используемые в способе данного изобретения находились в их естественной позиции в геноме растения, последовательность была модифицирована по отношению к естественной последовательности и/или что регуляторные последовательности естественных последовательностей были изменены. Под трансгенным предпочтительно следует понимать как означающее экспрессию нуклеиновых кислот согласно данному изобретению в не естественном локусе в геноме, т.е. имеет место гомологическая или предпочтительно гетерологическая экспрессия нуклеиновых кислот. Предпочтительные трансгенные растения упомянуты здесь. Кроме того, термин "трансгенный" относится к любому растению, клетке растения, каллуса, ткани растения или части растения, которая содержит весь или часть как минимум одного рекомбинантного полинуклеотида. Во многих случаях весь или часть как минимум одного рекомбинантного полинуклеотида стабильно интегрирована в хромосому или стабильный экстрахромосомный элемент, так что он передается последующим поколениям. Для целей данного изобретения термин "рекомбинантный полинуклеотид" относится к полинуклеотиду, который был изменен, перегруппирован или модифицирован с помощью генной инженерии. Примеры включают любой клонированный полинуклеотид или полинуклеотиды, которые соединены или присоединены к гетерологическим последовательностям. Термин "рекомбинантный" не относится к изменениям полинуклеотидов, которые являются результатом естественно происходящих событий, таких как спонтанные мутации, или не спонтанный мутагенез, за которым следует селективное размножение.

Растения, содержащие мутации, возникающие при не спонтанном мутагенезе, и селективно размноженные, отнесены здесь к не трансгенным растениям и включены в данное изобретение. В вариантах, в которых растение является трансгенным и включает многочисленные мут-ППО нуклеиновые кислоты, нуклеиновые кислоты могут быть получены из различных геномов или из одного и того же генома. Альтернативно, в вариантах, в которых растение не является трансгенным и включает многочисленные мут-ППО нуклеиновые кислоты, нуклеиновые кислоты локализованы в различных геномах или в одном и том же геноме.

В некоторых вариантах данное изобретение включает устойчивые к гербицидам растения, которые получены мутационным размножением. Такие растения включают полинуклеотид, кодирующий мут-ППО, и являются толерантными к одному или более ППО ингибирующих гербицидов. Такие способы включают, например, экспонирование растений или семян в присутствии мутагена, в частности химического мутагена, такого как, например, этилметансульфонат (ЭМС), и селекции растений, которые имеют повышенную толерантность как минимум к одному или более ППО ингибирующим гербицидам.

Однако данное изобретение не ограничивается толерантными к гербициду растениями, которые получают в результате способов мутагенеза, включая химический мутаген ЭМС. Любые способы мутагенеза, известные специалистам, могут быть использованы для получения устойчивых к гербициду растений данного изобретения. Такие способы мутагенеза включают, например, любой один или более из следующих мутагенов: радиация, такая как X-лучи, гамма-лучи (например, кобальт 60 или цезий 137), нейтроны (например, продукты ядерного распада урана 235 в атомном реакторе), бета-радиация (например, эмитированная радиоизотопами, такими как фосфор 32 или углерод 14), ультрафиолетовое излучение (предпочтительно от 250 до 290 нм) и химический мутагенез, такой как аналоги основания (например, 5-бромоурацил), родственные соединения (например, 8-этоксикофеин), антибиотики (например, стрептонигрин), алкилирующие агенты (например, серные горчицы, азотные горчицы, эпоксиды, этиленамины, сульфаты, сульфонаты, сульфоны, лактоны), азиды, гидроксилламин, азотистая кислота или акридины. Устойчивые к гербициду растения могут быть также получены при использовании способов тканевых культур для отбора клеток растений, включающих мутации, устойчивые к гербицидам, и последующего регенерирования из них устойчивых к гербицидам растений, см., например, патенты США № 5773702 и 5859348, каждый из которых включен здесь во всей полноте в качестве ссылки. Другие подробности мутационного размножения можно найти в книге "Principals of Cultivar Development", Fehr, 1993, Macmillan Publishing Company, раскрытые там сведения включены здесь в качестве ссылки.

В дополнение к приведенным выше определениям, термин "растение" подразумевает охват сельскохозяйственных растений на любой стадии зрелости или развития, а также любых тканей или органов (частей растения), взятых или полученных из любого такого растения, за исключением другого, о котором ясно указано в контексте. Части растения включают, но не ограничиваются ими, стволы, корни, цветы, семяпочки, тычинки, листья, эмбрионы, меристематические области, ткани каллуса, пыльниковые культуры, гаметофиты, спорофиты, пыльцу, микроспоры, протопласты и т.п.

Растение данного изобретения включает как минимум одну мут-ППО нуклеиновую кислоту или сверхэкспрессированную дикого типа ППО нуклеиновую кислоту и имеет повышенную толерантность к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа растения. Существует возможность того, что растения данного изобретения имеют многие дикого типа или мут-ППО нуклеиновые кислоты из различных геномов, поскольку эти растения могут содержать более чем один геном. Например, растение содержит два генома, обычно относимые как А и В геномы. В связи с тем, что ППО является необходимым метаболическим ферментом, предполагают, что каждый геном имеет как минимум один ген, кодирующий ППО фермент (например, как минимум один ППО ген). Как использовано здесь, термин "локус ППО гена" относится к позиции ППО гена в геноме и термины "ППО ген" и "ППО нуклеиновая кислота" относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей ППО фермент. ППО нуклеиновая кислота в каждом геноме отличается в ее нуклеотидной последовательности от ППО нуклеиновой кислоты на другом геноме. Специалисты могут определить геном происхождения каждой ППО нуклеиновой кислоты путем скрещивания генов и/или способами определения последовательностей или способами ферментативного расщепления экзонуклеазы, которые известны специалистам.

Данное изобретение включает растения, охватывающие один, два, три или более мут-ППО аллелей, причем растение имеет повышенную толерантность к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа растения. Мут-ППО могут охватывать нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, включающей такой полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 1 или 3, или их вариант, полинуклеотид кодирующий такой полипептид, как определено в SEQ ID NO: 2 или 4, или их вариант.

"Аллели" или "аллельные варианты" являются альтернативными формами данного гена, локализованными в той же хромосомной позиции.

Аллельные варианты охватывают единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNPs), а также небольшие встраивания/стирания полиморфизмы (INDELs). Размеры INDELs обычно меньше чем 100 п.о. (пар оснований). SNPs и INDELs формируют самый большой ряд вариантов последовательностей в естественно встречающихся полиморфных линиях большинства организмов.

Термин "разновидность" относится к группе растений внутри вида, определяемых наличием общего ряда характеристик или свойств, принимаемых специалистами в качестве достаточных для различения одного культурного сорта растения или разнообразия от другого культурного сорта растения или разнообразия. Ни в одном из терминов не предполагается, что все растения любого данного культурного сорта растения или разнообразия являются генетически идентичными на каждом из всех генов или молекулярных уровней или что любое данное растение будет гомозиготным во всех локусах. Культурный сорт растения или разнообразие рассматривается "чистосортный" для определенного свойства, если чистосортный культурный сорт растения или разнообразие является самоопыляемым, все прогены имеют это свойство. Термины "линия размножения" или "линия" относятся к группе растений внутри культурного сорта растения, определяемых наличием общего ряда характеристик или свойств, принимаемых специалистами в качестве достаточных для различения одной линии размножения или линии от другой линии размножения или линии. Ни в одном из терминов не предполагается, что все растения любой данной линии размножения или линии являются генетически идентичными на каждом из всех генов или молекулярных уровней или что любое данное растение будет гомозиготным во всех локусах. Линия размножения или линия рассматривается как "чистосортная" для определенного свойства, если чистосортная линия или размноженная линия является самоопыляемой, все прогены имеют это свойство. В данном изобретении свойство возникает в результате мутации в ППО гене растения или семени.

Устойчивые к гербицидам растения данного изобретения, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие мут-ППО полипептиды, также находят применение в способах увеличения устойчивости к гербицидам растения путем обычного размножения растений, включая половую репродукцию. Эти способы включают скрещивание первого растения, которое является устойчивым к гербициду растением данного изобретения, со вторым растением, которое может быть или не быть устойчивым к тому же самому гербициду или гербицидам, что и первое растение, или может быть устойчивым к гербициду или гербицидам, отличным от таковых первого растения. Второе растение может быть любым растением, которое способно производить жизнеспособные потомственные растения (например, семена), когда его скрещивают с первым растением. Типично, но неизбежно, когда первое растение и второе растение относятся к тому же самому виду. Способы могут при необходимости включать селекцию потомственных растений, которые включают мут-ППО полипептиды первого растения и характеристики устойчивости к гербициду второго растения. Потомственные растения, полученные способом данного изобретения, обладают повышенной устойчивостью к гербициду, если сравнивать с первым или вторым растением или с обоими. В том случае, когда первое и второе растения устойчивы к различным гербицидам, потомственные растения будут иметь комбинированные характеристики толерантности к гербицидам первого и второго растений. Способы данного изобретения могут далее включать одно или более поколений перекрестного скрещивания потомственных растений первого скрещивания с растением той же самой линии или генотипа, как первое растение или как второе растение. Альтернативно, потомки первого скрещивания или любого последующего скрещивания могут быть скрещены с третьим растением, которое относится к

отличающейся линии или генотипу, чем первое или второе растение. Данное изобретение также обеспечивает растения, органы растений, ткани растений, клетки растений, семена и не человеческие клетки хозяина, которые трансформированы как минимум одной полинуклеотидной молекулой, экспрессионной кассетой или трансформационным вектором данного изобретения. Такие трансформированные растения, органы растений, ткани растений, клетки растений, семена и не человеческие клетки хозяина имеют повышенную толерантность или устойчивость как минимум к одному гербициду при уровнях гербицида, которые убивают или ингибируют рост не трансформированных растений, органов растений, тканей растений, клеток растений, семян и не человеческих клеток хозяина соответственно. Предпочтительно трансформированные растения, органы растений, ткани растений, клетки растений и семена данного изобретения представляют собой *Arabidopsis thaliana* и сельскохозяйственные растения.

Понятно, что соединение данного изобретения может содержать дикий тип ППО нуклеиновой кислоты в дополнение к мут-ППО нуклеиновой кислоте. Можно себе представить, что линии, толерантные к ППО ингибирующему гербициду, могут содержать мутацию только в одном множественном ППО изоэноме. Поэтому данное изобретение включает растение, содержащее одну или более мут-ППО нуклеиновых кислот в дополнение к одной или более дикого типа ППО нуклеиновых кислот.

В другом варианте изобретение относится к семени, произведенному трансгенным растением, содержащим клетку растения данного изобретения, причем семя растения является чистосортным для повышенной устойчивости к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа семени.

В другом варианте изобретение относится к способу получения клетки трансгенного растения с повышенной устойчивостью к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа клетки растения, включающему трансформирование клетки растения экспрессионной кассетой, содержащей мут-ППО нуклеиновую кислоту.

В другом варианте изобретение относится к способу получения трансгенного растения, включающему:

- (а) трансформирование клетки растения экспрессионной кассетой, содержащей мут-ППО нуклеиновую кислоту; и
- (b) создание растения с повышенной устойчивостью к ППО ингибирующему гербициду из этой клетки растения.

Следовательно, мут-ППО нуклеиновыми кислотами данного изобретения обеспечены экспрессионные кассеты для экспрессии представляющих интерес растений. Кассета включает регуляторные последовательности, оперативно связанные с мут-ППО нуклеиновокислотной последовательностью данного изобретения. Термин "регуляторный элемент", как использовано здесь, относится к полинуклеотиду, который способен регулировать транскрипцию оперативно связанного полинуклеотида. Он включает, но не ограничивается ими, промоторы, усиливающие агенты, интроны, 5' UTRs и 3' UTRs. Под "оперативно связанным" понимают функциональную связь между промотором и второй последовательностью, причем промоторная последовательность инициирует и опосредует транскрипцию ДНК последовательности, соответствующей второй последовательности. Как правило, оперативно связанный означает, что нуклеиновокислотные последовательности будучи связанными являются непрерывными и, если необходимо связать две кодирующие белок области, непрерывны и находятся в том же самом считывающем каркасе. Кассета может дополнительно содержать как минимум один дополнительный ген, для того что быть со-трансформированной в организм. Альтернативно, дополнительный(ые) ген(ы) может(гут) быть обеспечен(ы) на множественных экспрессионных кассетах.

Такая экспрессионная кассета обеспечивается множеством ограничивающих мест для встраивания мут-ППО нуклеиновокислотной последовательности, которая должна быть под транскрипционным регулированием регуляторной области. Экспрессионная кассета может дополнительно содержать селекционные маркерные гены.

Экспрессионная кассета данного изобретения должна включать в 5'-3' направлении транскрипции транскрипционную и трансляционную инициационную область (например, промотор), мут-ППО нуклеиновокислотную последовательность данного изобретения и транскрипционную или трансляционную завершающую область (например, завершающую область), функциональную в растениях. Промотор может быть родным или аналоговым или чужим или гетерологическим по отношению к растению-хозяину и/или к мут-ППО нуклеиновокислотной последовательности данного изобретения. Кроме того, промотор может быть естественной последовательностью или, альтернативно, синтетической последовательностью. Если промотор является "чужим" или "гетерологическим" к растению-хозяину, то это подразумевает, что промотор не обнаружен в родном растении, в которое введен этот промотор. Если промотор является "чужим" или "гетерологическим" по отношению к мут-ППО нуклеиновокислотной последовательности данного изобретения, то подразумевается, что этот промотор не является родным или естественно встречающимся промотором для оперативно связанной мут-ППО нуклеиновокислотной последовательности данного изобретения. Как использовано здесь, химерный ген включает кодирующую последовательность, оперативно связанную с транскрипционной инициационной областью, которая является гетерологической по отношению к кодирующей последовательности.

Если это может оказаться предпочтительным для экспрессии мут-ППО нуклеиновых кислот данного изобретения, использующих гетерологические промоторы, то может быть использована родная промоторная последовательность. Такие конструкции будут менять экспрессионные уровни мут-ППО белка в растении или клетке растения. Таким образом, фенотип растения или клетки растения изменяется.

Завершающая область может быть родной с транскрипционной инициационной областью, может быть родной с оперативно связанной мут-ППО последовательностью, представляющей интерес, может быть родной с растением-хозяином или может быть получена из другого источника (например, чужого или гетерологического для промотора, мут-ППО нуклеиновокислотной последовательности представляющей интерес, для растения-хозяина или любой их комбинации). Подходящие завершающие области могут быть доступны из Ti-плазмиды *A.tumefaciens*, такие как завершающие области октопин синтазы и нопалин синтазы, см. также Guerineau et al., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 262:141-144; Proudfoot, (1991), *Cell*, 64:671-674; Sanfacon et al., (1991), *Genes Dev.*, 5:141-149; Mogen et al., (1990), *Plant Cell*, 2:1261-1272; Munroe et al., (1990), *Gene*, 91:151-158; Ballas et al., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17:7891-7903 и Joshi et al., (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15:9627-9639, где соответственно ген(ы) может быть оптимизирован для увеличенной экспрессии в трансформированном растении. Дело в том, что гены могут быть синтезированы, используя предпочтительные для растения кодоны для улучшенной экспрессии, см., например, Campbell и Gowri, (1990), *Plant Physiol.*, 92:1-11 относительно обсуждения использования предпочтительных для хозяина кодонов. Способы доступны специалистам для синтеза предпочтительных для растения генов, см., например, патенты США № 5380831 и 5436391 и Murray et al., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17:477-498, включенные здесь в качестве ссылки.

Известны дополнительные модификации последовательности для повышения экспрессии гена в клетке хозяина. Они включают удаление последовательности, кодирующей ложные сигналы полиаденилирования, сигналы места срачивания экзон-интрона, подобные транспозону повторы и другие, такие как хорошо характеризуемые последовательности, которые могут быть вредны для экспрессии гена. G-C содержание последовательности может быть отрегулировано до уровней средних для данной клетки хозяина, как рассчитано по отношению к известным генам, экспрессированным в клетке хозяина. Если возможно, последовательность модифицируют для избегания предсказанных шпилек вторичных мРНК структур. Нуклеотидные последовательности для повышенной экспрессии гена могут также использоваться в экспрессионных векторах растения. Они включают интроны кукурузы *Adh1*, интрон1 гены (Callis et al., *Genes and Development*, 1: 1183-1200, 1987) и ведущие последовательности, (W-последовательность) из вирусов Tobacco Mosaic Virus (TMV), Maize Chlorotic Mottle Virus и Alfalfa Mosaic Virus (Gallie et al., *Nucleic Acids Res.*, 15:8693-8711, 1987, и Skuzeski et al., *Plant Mol. Biol.*, 15:65-79, 1990). Было показано, что первый интрон из редуцированного-1 локуса кукурузы увеличивает экспрессию генов в химерных генных конструкциях. В патентах США № 5424412 и 5593874 раскрыто использование специфических интронов в генных экспрессионных конструкциях, а Gallie et al., (*Plant Physiol.*, 106:929-939, 1994) также показали, что интроны являются полезными для регулирования экспрессии гена на специфической основе ткани. Для дальнейшего повышения или для оптимизации мут-ППО генной экспрессии экспрессионные векторы растения данного изобретения могут также содержать ДНК последовательности, содержащие матричные присоединительные области (MARs). Клетки растений, трансформированные такой модифицированной экспрессионной системой, затем могут показывать сверхэкспрессию или устанавливающую экспрессию нуклеотидной последовательности данного изобретения.

Экспрессионные кассеты данного изобретения могут дополнительно содержать 5' ведущие (лидерные) последовательности в конструкции экспрессионной кассеты. Такие ведущие последовательности могут вызывать увеличение трансляции. Трансляционные лидеры известны специалистам и включают пикорнавирусные лидеры, например EMCV лидер (энцефаломиокардитис 5' некодирующая область) (Elroy-Stein et al., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:6126-6130);

поливирусные лидеры, например TEV лидер (Tobacco Etch Virus) (Gallie et al., (1995), *Gene*, 165(2):233-238), MDMV лидер (Maize Dwarf Mosaic Virus) (*Virology*, 154:9-20), и человеческий белок иммуноглобулина, связывающий тяжелые цепи (BiP) (Macejak и др., (1991), *Nature*, 353:90-94);

нетрансляционный лидер из покровной белковой мРНК мозаичного вируса люцерны (AMV РНК 4) (Jobling et al., (1987), *Nature*, 325:622-625);

табачного мозаичного вируса лидер (TMV) (Gallie et al., (1989), в книге *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), p. 237-256); и

кукурузный хлорозных пятен вируса лидер (MCMV) (Lommel et al., (1991), *Virology*, 81:382-385), см. также Della-Cioppa et al., (1987), *Plant Physiol.*, 84:965-968.

Другие известные способы повышения трансляции также могут быть использованы, например, интроны и т.п.

При изготовлении экспрессионной кассеты можно манипулировать различными ДНК фрагментами так, что обеспечиваются ДНК последовательности в надлежащей ориентации и, как присуще, в подходящем читающем каркасе. В сторону этого конца могут быть использованы адаптеры или линкеры, для того чтобы соединить ДНК фрагменты, или могут быть использованы другие манипуляции, для того

чтобы обеспечить ограничительные участки, переместить избыточные ДНК, переместить ограничительные участки или т.п. Для этой цели могут быть вовлечены *in vitro* мутагенез, восстановление инициатора, ограничение, отжиг, перезамещения, например перемещения и трансверсии.

В практике данного изобретения может быть использован ряд промоторов. Промоторы могут быть выбраны, основываясь на желательном исходе. Нуклеиновые кислоты могут комбинироваться с определяющими, предпочтительными для ткани или другими промоторами для экспрессии в растениях. Такие определяющие промоторы включают, например, промотор ядра в Rsyn7 промоторе и другие определяющие промоторы, раскрытые в WO 99/43838 и U.S. 6072050; ядра CaMV 35S промотор (Odell et al., (1985), *Nature*, 313:810-812); риса актин (McElroy et al., (1990), *Plant Cell*, 2: 163-171); убиквитин (Christensen et al., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 12:619-632 и Christensen et al., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 18:675-689); pEMU (Last et al., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81:581-588); MAS (Velten et al., (1984), *EMBO J.*, 3:2723-2730); ALS промотор (U.S. 5659026) и т.п. Другие определяющие промоторы включают, например, приведенные в патентах США № 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 и 6177611.

Предпочтительные тканевые промоторы могут быть использованы для целевой повышенной мут-ППО экспрессии внутри определенной ткани растения. Такие предпочтительные тканевые промоторы включают, но не ограничиваются ими, предпочтительные листовые промоторы, предпочтительные корневые промоторы, предпочтительные семенные промоторы и предпочтительные стеблевые промоторы. Предпочтительные тканевые промоторы описаны в работах Yamamoto et al., (1997), *Plant J.*, 12(2):255-265; Kawamata et al., (1997), *Plant Cell Physiol.*, 38(7):792-803; Hansen et al., (1997), *Mol. Gen. Genet.*, 254(3):337-343; Russell et al., (1997), *Transgenic Res.*, 6(2):157-168; Rinehart et al., (1996), *Plant Physiol.*, 112(3): 1331-1341; Van Camp et al., (1996), *Plant Physiol.*, 112(2):525-535; Canevascini et al., (1996), *Plant Physiol.*, 112(2):513-524; Yamamoto et al., (1994), *Plant Cell Physiol.*, 35(5):773-778; Lam, (1994), *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco et al., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. [alpha]. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(20):9586-9590 и Guevara-Garcia et al., (1993), *Plant J.* 4(3):495-505. Такие промоторы могут быть модифицированы, если необходимо, для слабой экспрессии. В одном варианте представляющие интерес нуклеиновые кислоты нацелены на хлоропласт для экспрессии. При этом образе действий, когда представляющая интерес нуклеиновая кислота не напрямую встроена в хлоропласт, экспрессионная кассета будет дополнительно содержать мишенную хлоропластовую последовательность, включающую нуклеотидную последовательность, которая кодирует хлоропластовый переходный пептид, для того чтобы направить представляющий интерес генный продукт в хлоропласты. Такие переходные пептиды известны специалистам. Касательно хлоропластовых мишенных последовательностей, "оперативно связанный" означает, что нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая переходный пептид (например, хлоропластовая мишенная последовательность), связана с мут-ППО нуклеиновой кислотой данного изобретения таким образом, что две последовательности являются прилегающими и находятся в том же самом читающем каркасе. См., например, Von Heijne et al., (1991), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:104-126; Clark et al., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264:17544-17550; Della-Cioppa et al., (1987), *Plant Physiol.*, 84:965-968; Romer et al., (1993), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196:1414-1421 и Shah et al., (1986), *Science*, 233:478-481. В том случае, когда мут-ППО белки данного изобретения включают родные хлоропластовые переходные пептиды, любой хлоропластовый переходный пептид, известный специалистам, может быть вращен в аминокислотную последовательность зрелого мут-ППО белка данного изобретения путем оперативного связывания хлоропластовой мишенной последовательности в 5'-конец нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелый мут-ППО белок данного изобретения. Хлоропластовые мишенные последовательности известны специалистам и включают хлоропластовые малые субъединицы рибулозе-1,5-бисфосфат карбоксилазы (Rubisco) (de Castro Silva Filho et al., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 30:769-780; Schnell et al., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266(5):3335-3342); 5-(энолпирувил)шкимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) (Archer et al., (1990), *J. Bioenerg. Biomemb.*, 22(6):789-810); триптофан синтазы (Zhao et al., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270(11):6081-6087); пластоцианина (Lawrence et al., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272(33):20357-20363); хорисмат синтазы (Schmidt et al., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268(36):27447-27457) и легкого урожайного хлорофилла a/b связывающий белок (LHBP) (Lamppa et al., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263:14996-14999). См. также Von Heijne et al., (1991), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:104-126; Clark et al., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264:17544-17550; Della-Cioppa et al., (1987), *Plant Physiol.*, 84:965-968; Romer et al., (1993), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196:1414-1421 и Shah et al., (1986), *Science*, 233:478-481.

Способы трансформации хлоропластов известны специалистам. См., например, Svab et al., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8526-8530; Svab и Maliga, (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:913-917; Svab и Maliga, (1993), *EMBO J.*, 12:601-606. Способ опирается на доставку пушкой для частиц ДНК содержащего селекционного маркера и нацеливание ДНК на пластидный геном через гомологическую рекомбинацию. Кроме того, трансформация пластида может сопровождаться транскрипцией трансгена молчания, вносимого пластидом в результате предпочтительной экспрессии ткани ядерно кодируемой и пластидом направляемой РНК полимеразы. О такой системе сообщалось в статье McBride et al., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7301-7305. Представляющие интерес нуклеиновые кислоты, нацеленные на хлоропласт, могут быть оптимизированы для экспрессии в хлоропласте, для того чтобы принять во вни-

мание различие в использовании кодона между ядрами растения и его органеллой. При этом образе действий представляющие интерес нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы с использованием предпочтительных для хлоропласта кодонов. См., например, патент США № 5380831, включенный здесь в качестве ссылки.

Предпочтительно экспрессионная кассета данного изобретения дополнительно включает регуляторную область иницирования транскрипции и регуляторную область иницирования трансляции, которые являются функциональными в растении.

В связи с тем, что полинуклеотиды данного изобретения находят применение в селективных маркерных генах для трансформации растения, экспрессионные кассеты данного изобретения могут включать другие селективные маркерные гены для селекционных или трансформированных клеток. Селективные маркерные гены, включая таковые данного изобретения, используют для селекции (отбора) трансформированных клеток или тканей. Маркерные гены включают, но не ограничиваются ими, гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам, такие как кодирующие неомицин фосфотрансферазу II (NEO) и гигромицин фосфотрансферазу (HPT), а также такие гены, которые придают устойчивость к гербицидным соединениям, таким как глюфосинат аммоний, бромоксинил, имидазолиноны и 2,4-дихлорфеноксиацетат (2,4-D). См., как правило, Yarranton, (1992), *Curr. Opin. Biotech.*, 3:506-511; Christophers et al., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6314-6318; Yao et al., (1992), *Cell*, 71:63-72; Reznikoff, (1992), *Mol. Microbiol.*, 6:2419-2422; Barkley et al., (1980) в *The Operon*, p. 177-220; Hu et al., (1987), *Cell*, 48:555-566; Brown et al., (1987), *Cell*, 49:603-612; Figge et al., (1988), *Cell*, 52:713-722; Deuschle et al., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5400-5404; Fuerst et al., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2549-2553; Deuschle et al., (1990), *Science*, 248:480-483; Gossen, (1993), Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1917-1921; Labow et al., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, 10:3343-3356; Zambretti et al., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3952-3956; Bairn et al., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5072-5076; Wyborski et al., (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19:4647-4653; Hillenand-Wissman, (1989), *Topics Mol. Struc. Biol.*, 10:143-162; Degenkolb et al., (1991), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al., (1988), *Biochemistry*, 27:1094-1104; Bonin, (1993), Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551; Oliva et al., (1992), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36:913-919; Hlavka et al., (1985), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill et al., (1988), *Nature*, 334:721-724. Эти раскрытия включены здесь в качестве ссылки. Приведенный выше список селективных маркерных генов не является ограничивающим. Любой селективный маркерный ген может быть использован в данном изобретении.

Изобретение далее обеспечивает изолированный рекомбинантный экспрессионный вектор, включающий экспрессионную кассету, которая включает мут-ППО нуклеиновую кислоту, как описано выше, причем экспрессия вектора в клетке хозяина приводит к повышенной толерантности к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа клетки хозяина. Как используется здесь, термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она оказалась связанной. Одним типом вектора является "плазмид", который относится к круговой с двойной прядью ДНК петле, в который могут быть вставлены дополнительные ДНК сегменты. Другим типом вектора является вирусный вектор, в который дополнительные ДНК сегменты могут быть вставлены в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке хозяина, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации и эписомальные векторы млекопитающих животных). Другие векторы (например, не эписомальные векторы млекопитающих животных) интегрированы в геном клетки хозяина после введения в клетку хозяина и тем самым реплицируются вместе с геномом хозяина. Сверх того определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы относят здесь к "экспрессионным векторам". Как правило, экспрессионные векторы, используемые в рекомбинантной ДНК технике, часто находятся в форме плазмидов. В существующей в настоящее время спецификации "плазмид" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмид обычно чаще всего используется в форме вектора. Тем не менее, изобретение преднамеренно включает такие другие формы экспрессионных векторов, как вирусные векторы (например, репликационно дефективные ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые обеспечивают эквивалентные функции.

Рекомбинантный экспрессионный вектор данного изобретения включает нуклеиновую кислоту данного изобретения в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке хозяина, а это означает, что рекомбинантный экспрессионный вектор включает одну или более регуляторных последовательностей, выбираемых на основе клеток хозяина, подлежащих использованию при экспрессии, которые оперативно связаны с нуклеиновокислотной последовательностью, которую подлежит экспрессировать. Регуляторные последовательности включают такие, которые направляют определяющую экспрессию нуклеотидной последовательности во многих типах клеток хозяина, и такие, которые направляют экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках хозяина или при определенных условиях. Специалисты понимают, что конструкция экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как выбор подлежащей трансформированию клетки хозяина, желаемый уровень экс-

прессии полипептида и т.д. Экспрессионные векторы данного изобретения могут быть введены в клетку хозяина для того, чтобы произвести полипептиды или пептиды, включающие фузию (сплавнение) полипептидов или пептидов, кодируемых нуклеиновыми кислотами, как описано здесь (например, мут-ППО полипептиды, сплавленные полипептиды и т.д.).

В предпочтительном варианте данного изобретения мут-ППО полипептиды экспрессируют в растениях и клетках растений, таких как клетки одноклеточных растений (таких как водоросли) (см. Falcioratore et al., 1999, *Marine Biotechnology*, 1(3):239-251 и приведенные там ссылки) и клетки высших растений (например, сперматофиты, такие как сельскохозяйственные растения). Мут-ППО полинуклеотид может быть "введен" в клетку растения средствами, включающими трансфекцию, трансформацию или трансдукцию, электропорацию, бомбардировку частицами, агроинфекцию, биолистикс и т.п.

Подходящие способы трансформации или трансфекции клетки хозяина можно найти в Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) и других лабораторных справочниках, таких как *Methods in Molecular Biology*, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium protocols*, ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. В связи с тем, что повышенная толерантность к ППО ингибирующим гербицидам является общим желательным свойством, которое должно быть унаследовано широким разнообразием растений, таких как кукуруза, пшеница, рожь, овес, тритикале, рис, ячмень, соя-бобы, арахис, хлопчатник, рапс на семена и канола, маниока, перец, подсолнечник и тагеты, пасленовые растения, такие как картофель, табак, баклажан и томаты, *Vicia*-виды, горох, люцерна, кустарниковые растения (кофе, какао, чай), *Salix*-виды, деревья (масличная пальма, кокосовая пальма), многолетние травы и кормовые сельскохозяйственные растения, эти сельскохозяйственные растения также являются предпочтительными целевыми растениями для генетической инженерии в качестве одного из дальнейших вариантов данного изобретения. В предпочтительном варианте растение является сельскохозяйственным растением. Кормовые сельскохозяйственные растения включают, но не ограничиваются ими, пырей, канареечник Канарский, трава вида *Bromus*, трава вида дикой ржи, мятлик, орчардграсс, люцерна, салфон, трава треоил, низкорослый клевер, красный клевер и сладкий клевер.

В одном варианте данного изобретения трансфекция мут-ППО полинуклеотида в растение достигается переносом гена опосредованным *Agrobacterium*. Одним способом трансформации, известным специалистам, является окунание цветущего растения в раствор *Agrobacteria*, причем *Agrobacteria* содержит мут-ППО нуклеиновую кислоту, за которым следует размножение трансформированных гаметов. Трансформация растения, опосредованная *Agrobacterium*, может быть выполнена с использованием, например, GV3101(pMP90) (Koncz и Schell, 1986, *Mol. Gen. Genet.*, 204:383-396) или LBA4404 (Clontech) *Agrobacterium tumefaciens* линии. Трансформация может быть выполнена с помощью стандартной техники трансформации и регенерации (Deblaere et al., 1994, *Nucl. Acids. Res.*, 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. и Schilperoort, Robert A, *Plant Molecular Biology Manual*, 2nd Ed. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc *Zentrale Signatur*: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. и Thompson, John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Например, рапсовое семя может быть трансформировано путем трансформации семядоли или гипокоты (Moloney et al., 1989, *Plant Cell Report*, 8:238-242; De Block et al., 1989, *Plant Physiol.*, 91:694-701). Использование антибиотиков для селекции *Agrobacterium* и растений зависит от бинарного вектора и *Agrobacterium* линии, использованных для трансформации. Селекцию рапсового семени нормально проводят, используя канамицин в качестве селективного маркера растения.

Перенос гена на лен, опосредованный *Agrobacterium*, можно провести, например, посредством техники, описанной Mlynarova et al., 1994, *Plant Cell Report*, 13:282-285. Кроме того, трансформация соевых бобов может быть проведена с использованием, например, техники, описанной в европейском патенте EP 0424047, патенте США № 5322783, европейском патенте EP 0397687, патенте США № 5376543 или 5169770. Трансформация кукурузы может быть достигнута путем бомбардировки частицами, поглощением ДНК, опосредованным полиэтиленгликолем или посредством техники силикон карбидных волокон. (См., например, справочник Freeling и Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993), ISBN 3-540-97826-7). Специфические примеры трансформации кукурузы представлены в патенте США № 5990387, и специфические примеры трансформации пшеницы представлены в РСТ заявке WO 93/07256.

Согласно данному изобретению представленный мут-ППО полинуклеотид может быть встроен в клетку растения стабильно в том случае, когда он встроен в не хромосомный автономный репликон или интегрирован в хромосомы растения. Альтернативно, встроенный мут-ППО полинуклеотид может присутствовать во внехромосомном не репликативном векторе и временно экспрессирован или временно активен. В одном варианте может быть создан гомологический рекомбинантный микроорганизм, в котором мут-ППО полинуклеотид интегрирован в хромосому, приготавливают вектор, который содержит как минимум часть ППО гена, в который введено стирание, добавление или замещение в связи с изменением, например функциональным разрушением, эндогенного ППО гена и созданием мут-ППО гена. Для создания точки мутации через гомологическую рекомбинацию ДНК-РНК гибриды могут быть использованы в технике, известной как химерапластика (Cole-Strauss et al., 1999, *Nucleic Acids Research*, 27(5):1323-1330

и Kmiec, 1999, Gene therapy American Scientist, 87(3):240-247). Другие гомологические рекомбинантные процедуры в Triticum-видах также хорошо известны специалистам и предусмотрены для использования здесь.

В гомологическом рекомбинантном векторе мут-ППО ген может быть установлен на фланге у его 5'- и 3'-концов с помощью дополнительной молекулы нуклеиновой кислоты ППО гена для того, чтобы позволить появлению гомологической рекомбинации между экзогенным мут-ППО геном, переносимым вектором, и эндогенным ППО геном в микроорганизме или растении. Дополнительная фланговая ППО молекула нуклеиновой кислоты имеет достаточную длину для успешной гомологической рекомбинации с эндогенным геном. Типично несколько сотен пар оснований вплоть до 1000 пар оснований фланговой ДНК (обе у 5'- и 3'-концов) включены в вектор (см., например, Thomas, K.R. и Capecchi, M.R., 1987, Cell, 51:503 относительно описания гомологических рекомбинантных векторов или Strepp et al., 1998, PNAS, 95 (8):4368-4373 относительно основанной на сДНК рекомбинации в Physcomitrella patens). Однако, поскольку мут-ППО ген нормально отличается от ППО гена всего на несколько аминокислот, фланговая последовательность не всегда необходима. Гомологический рекомбинационный вектор вводят в микроорганизм или растение (например, через полиэтиленгликолем опосредованную ДНК) и клетки, в которых введенный мут-ППО ген гомологически рекомбинировал с эндогенным ППО геном, отбирают (селекционируют), используя технику, известную специалистам.

В другом варианте могут быть получены рекомбинантные микроорганизмы, которые содержат селективные системы, которые позволяют регулируемую экспрессию введенного гена. Например, включение мут-ППО гена в вектор ставит его под контроль lac оперона, позволяющего экспрессию мут-ППО гена только в присутствии IPTG. Такая регуляторная система хорошо известна специалистам.

Другой аспект данного изобретения относится к клеткам хозяина, в которые был введен рекомбинантный экспрессионный вектор данного изобретения. Термины "клетка хозяина" и "рекомбинантная клетка хозяина" здесь используются взаимозаменяемо. Понятно, что такие термины относятся не только к определенной субъектной клетке, но они также применимы к потомку или к потенциальному потомку такой клетки. В связи с тем, что некоторые модификации могут появиться в последующих поколениях, или в связи с мутацией, или в связи с влиянием окружающей среды, такие потомки не могут фактически быть идентичными родительской клетке, но все еще включены в охват терминов, как использовано здесь. Клетка хозяина может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например, мут-ППО полинуклеотид может быть экспрессирован в бактериальных клетках, таких как *C. glutamicum*, клетках насекомых, клетках грибов или клетках млекопитающих (таких как клетки яичника китайского хомяка (СНО) или COS клетки), водорослях, ресничках, клетках растений, грибах или других микроорганизмах, таких как *C. glutamicum*. Другие подходящие клетки хозяина известны специалистам.

Клетка хозяина данного изобретения, такая как прокариотическая или эукариотическая клетка хозяина в культуре, может быть использована для получения (т.е. экспрессии) мут-ППО полинуклеотида. Соответственно, данное изобретение далее обеспечивает способы получения мут-ППО полипептидов, используя клетки хозяина данного изобретения. В одном варианте способ включает культивирование клетки хозяина данного изобретения (в которую был введен рекомбинантный экспрессионный вектор, кодирующий мут-ППО полипептид или в геном которого был введен ген, кодирующий дикий тип или мут-ППО полипептид) в подходящей среде до тех пор, пока не будет произведен мут-ППО полипептид. В другом варианте способ далее включает выделение мут-ППО полипептидов из среды или клетки хозяина. Другой аспект данного изобретения относится к выделенным мут-ППО полипептидам и их биологически активной доле. "Выделенный" или "очищенный" полипептид или биологически активная доля его в существенной мере свободен от какого-либо клеточного материала, когда его получают путем рекомбинантной ДНК техники, или свободен от химических предшественников или других химических реактивов, когда его получают химическим синтезом. Выражение "в существенной мере свободен от клеточного материала" предусматривает препарирование мут-ППО полипептида, при котором полипептид отделяют от каких-либо клеточных компонентов клеток, в которых он получен естественным путем или рекомбинантно. В одном из вариантов выражение "в существенной мере свободен от клеточного материала" включает препарирование мут-ППО полипептида, имеющего менее чем около 30% (по сухому весу) не-мут-ППО материала (также называемого здесь как "загрязняющий полипептид"), более предпочтительно менее чем около 20% не-мут-ППО материала, еще более предпочтительно менее чем около 10% не-мут-ППО материала и наиболее предпочтительно менее чем около 5% не-мут-ППО материала.

Если мут-ППО полипептид или его биологически активная доля получен рекомбинантным путем, то он также предпочтительно в существенной мере свободен от среды культуры, т.е. среда культуры составляет менее чем около 20%, более предпочтительно менее чем 10% и более предпочтительно менее чем 5% объема препарирования полипептида. Выражение "в существенной мере свободен от химических предшественников или других химических реактивов" включает препарирование мут-ППО полипептида, при котором полипептид отделяют от химических предшественников или других химических реактивов, которые вовлечены в синтез полипептида. В одном варианте выражение "в существенной мере свободен от химических предшественников или других химических реактивов" включает препарирование

мут-ППО полипептида, содержащего менее чем около 30% (по сухому весу) химических предшественников или не-мут-ППО химических реактивов, более предпочтительно менее чем около 20% химических предшественников или не-мут-ППО химических реактивов, еще более предпочтительно менее чем около 10% химических предшественников или не-мут-ППО химических реактивов и наиболее предпочтительно менее чем около 5% химических предшественников или не-мут-ППО химических реактивов. В предпочтительных вариантах выделенный полипептид или биологически активная доля его означает отсутствие загрязняющих полипептидов из того же самого организма, из которого получен мут-ППО полипептид. Типично, такие полипептиды получают при рекомбинантной экспрессии, например, мут-ППО полипептида в отличающихся растениях или в микроорганизмах, таких как *C. glutamicum*, ресничках, водорослях или грибах.

Как описано выше, данное изобретение предлагает композиции и способы повышения толерантности к ППО ингибированию сельскохозяйственного растения или семени по сравнению с вариантом дикого типа растения или семени. В предпочтительном варианте толерантность к ППО ингибированию сельскохозяйственного растения или семени увеличена так, что растение или семя может устоять при применении ППО ингибирующего гербицида в количестве предпочтительно приблизительно 1-1000 г а.в./га, более предпочтительно 1-200 г а.в./га, еще более предпочтительно 5-150 г а.в./га и наиболее предпочтительно 10-100 г а.в./га. Как использовано здесь, "устоять" при применении ППО ингибирующего гербицида означает, что растение не убивается или не повреждается или умеренно повреждается при таком применении. Специалистам понятно, что применяемые количества могут варьироваться в зависимости от условий окружающей среды, таких как температура или влажность, и в зависимости от выбранного типа гербицида (активного вещества = а.в.).

Кроме того, данное изобретение обеспечивает способы, которые могут включать использование как минимум одного ППО ингибирующего гербицида, при необходимости, в смеси с одним или более гербицидными соединениями В и, при необходимости, с защитным веществом С, как подробно описано выше.

В этих способах ППО ингибирующий гербицид может быть применен любым известным специалистам способом, включая, но не ограничиваясь ими, обработку семян, обработку почвы и обработку листьев. Перед обработкой ППО ингибирующий гербицид может быть превращен в обычные препараты, например растворы, эмульсии, суспензии, пылевидные препараты, порошки, пасты и гранулы. Используемая форма зависит от определенной предназначенной цели; в каждом случае следует заботиться о тонком и ровном распределении соединения согласно данному изобретению.

При обеспечении растений, обладающих повышенной толерантностью к ППО ингибирующему гербициду, может быть использовано широкое разнообразие препаратов для защиты растений от сорняков, так что увеличивается рост растений и уменьшается конкуренция за питательные вещества. ППО ингибирующий гербицид можно применять сам по себе для предвсходового, послевсходового, предпосадочного и во время посадки контроля сорняков на площадях, окружающих описанные здесь сельскохозяйственные растения, или может быть использован препарат ППО ингибирующего гербицида, который содержит другие добавки. ППО ингибирующий гербицид можно также применять для обработки семян. Добавки, имеющиеся в препарате ППО ингибирующего гербицида, включают другие гербициды, моющие средства, вспомогательные вещества, агенты для опрыскивания, агенты для прилипания, стабилизирующие агенты и т.п. Препарат ППО ингибирующего гербицида может быть влажным или сухим препаратом и может включать, но не ограничиваясь ими, текучие порошки, эмульгируемые концентраты и жидкие концентраты. ППО ингибирующий гербицид и препарат гербицида можно применять в соответствии с обычными способами, например опрыскиванием, орошением, распылением и т.п.

Подходящие препараты описаны подробно в РСТ/ЕР 2009/063387 и РСТ/ЕР 2009/063386, которые включены здесь в качестве ссылки.

Следует также понимать, что сказанное выше также относится к предпочтительным вариантам данного изобретения и что здесь могут быть сделаны многочисленные изменения без отклонения от общего охвата данного изобретения. Изобретение далее иллюстрируется следующими примерами, которые ни в коем случае не предполагают ограничение его охвата. Напротив, должно быть ясно понятно, что можно обращаться к различным другим вариантам, модификациям и его эквивалентам, которые после прочтения этого описания могут казаться сами по себе специалистам, не отклоняющимися от сути данного изобретения и/или охвата прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Направленный по месту мутагенез в *Amaranthus* ППО.

Клонирование *Amaranthus* ППО.

Amaranthus tuberculatus кодирующая последовательность для ППО-чувствительной и -устойчивой изоформ и все мутантные комбинации и многократные мутации (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7) были синтезированы и клонированы фирмой Geneart (Geneart AG, Regensburg, Германия).

Плазмиды были выделены из *E. coli* TOP10 путем проведения минипрепарирования плазмиды и подтверждены ДНК упорядочением последовательностей.

Экспрессия и очистка рекомбинантной дикого типа и мутантной ППО.

(Взято из Franck E. Dayan, Pankaj R. Daga, Stephen O. Duke, Ryan M. Lee, Patrick J. Tranel, Robert J. Doerksen, Biochemical and structural consequences of a glycine deletion in the α -8 helix of protoporphyrinogen oxidase, Biochimica et Biophysica Acta, 1804 (2010), 1548-56).

Клоны в pRSET векторе были трансформированы в BL21(DE3)-pLysS линию E.coli. Клетки выращивали в 250 мл LB с 100 мкг/мл карбенициллина, встряхивая в течение ночи при температуре 37°C. Культуры были разбавлены в 1 л LB с антибиотиком и выращивали при температуре 37°C, встряхивая в течение 2 ч, индуцировали 1 mM IPTG и выращивали при температуре 25°C, встряхивая в течение более 5 ч. Урожай клеток собирали центрифугированием при 1600×g, промывали 0,09% NaCl и хранили при температуре -80°C.

Клетки подвергали лизису, используя французский пресс при 140 МПа в 50 mM фосфате натрия pH 7,5, 1 M NaCl, 5 mM имидазола, 5% глицерина и 1 мкг/мл леупептина. При следующем лизисе добавляют 0,5 U бензонаса (Novagen, EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ) и PMSF (конечная концентрация 1 mM). Удаляют осколки клеток центрифугированием при 3000×g. His-мишенные ППО белки очищают на активированной никелем Nitrap Chelating HP колонке (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), уравновешенной 20 mM фосфата натрия pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM имидазола, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA и 17% глицерина.

ППО элюируют с помощью 250 mM имидазола. Активный белок опресняют на PD-10 колонке (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), уравновешенной 20 mM фосфат натрия буфером, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA и 17% глицерина. Каждый литр культуры обеспечивал приблизительно 10 мг чистой ППО, которую хранили при температуре -20°C перед использованием в опытах.

Опыт по ППО активности.

Опыт с ППО энзимом (нерекомбинантным). ППО белок (ЕС 1.3.3.4) был экстрагирован из колеоптилей или ростков (150 г вес в свежем виде) выросшей в темноте кукурузы, черного паслена, утреннего цветка (morning glory) и velvetleaf рассады, как описано ранее (Grossmann et al., 2010). Перед снятием урожая рассаде дали возможность зеленеть в течение 2 ч на свету, для того чтобы достигнуть высшей специфической активности энзима в тилакоидных фракциях при низких концентрациях хлорофилла. При высоких концентрациях хлорофилла появляется значительное тушение флуоресценции, которое ограничивает количество зеленых тилакоидов, которые можно использовать при тестировании. Растительные материалы гомогенизируют на холоде с помощью блендера Брауна, используя отношение веса в свежем состоянии к объему, равное 1:4. Гомогенизационный буфер состоит из трис-(гидроксиметил)-аминометана (трис)-HCl (50 mM; pH 7,3), сахарозы (0,5 M), хлористого магния (1 mM), этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) (1 mM) и альбумина бычьей сыворотки (2 г/л). После фильтрования через четыре слоя Miracloth получают сырые препараты пластида путем центрифугирования при 10000×g в течение 5 мин и ресуспендирования в гомогенизационном буфере и последующего центрифугирования при 150×g в течение 2 мин для удаления сырых клеточных осколков. Надосадочную жидкость центрифугируют при 4000×g в течение 15 мин и фракцию катышей ресуспендируют в 1 мл буфера, содержащего трис-HCl (50 mM; pH 7,3), EDTA (2 mM), леупептин (2 мкМ), пепстатин (2 мкМ) и глицерин (200 мл/л) и хранят до использования при температуре -80°C. Белок определяют в экстракте энзима с помощью альбумина бычьей сыворотки в качестве стандарта. ППО активность определяют флуорометрически путем мониторинга скорости образования Прото из химически восстановленного протопорфириногена IX при условиях начальной скорости. Смесь для опыта состоит из трис-HCl (100 mM; pH 7,3), EDTA (1 mM), дитиотреитола (5 mM), Tween 80 (0,085%), протопорфириногена IX (2 мкМ) и 40 мкг экстрагированного белка в общем объеме 200 мкл. Реакцию инициируют добавлением субстрата протопорфириногена IX при температуре 22°C. Сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион, флумиоксазин, бутафенацил, ацифлуорфен, лактофен, бифенокс, сульфентразон плюс ингибитор фотосинтеза диурон, который использовали в качестве негативного контроля были приготовлены в растворе диметилсульфоксида (ДМСО) (0,1 mM концентрация ДМСО в опыте) и добавлены к смеси опыта с концентрацией от 0,005 пМ до 5 мкМ перед инкубацией. Мониторинг флуоресценции проводили напрямую со смесью опыта, используя прибор POLARstar Optima/Galaxy (фирмы BMG) с возбуждением при длине волны 405 нм, и мониторинг эмиссии проводили при длине волны 630 нм. Неэнзиматическая активность в присутствии инактивированного нагревом экстракта была ничтожной. Ингибирование активности энзима, индуцированное гербицидом, выражают в процентах ингибирования по отношению к необработанному контролю. Молярные концентрации соединения, которые требуются для 50% ингибирования энзима (IC₅₀ значения), были рассчитаны путем подстановки полученных значений в уравнение зависимости ответа от дозы с использованием анализа нелинейной регрессии.

Опыт с ППО энзимом (рекомбинантным).

Прото был получен от фирмы Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Протоген был получен согласно Якобсам (N.J. Jacobs, J.M. Jacobs, Assay for enzymatic protoporphyrinogen oxidation, a late step in heme synthesis, Enzyme, 28 (1982), 206-219). Опыты были проведены в 100 mM фосфате натрия pH 7,4 с 0,1 mM

EDTA, 0,1% Tween 20, 5 мкМ FAD и 500 мМ имидазола. Кривая ответа на дозу с ППО ингибиторами сафлуфенацилом, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дионом, флумиоксазином, бутафенацилом, ацифлуорфеном, лактофеном, бифеноксом, сульфентразоном плюс ингибитор фотосинтеза диурон, который был использован в качестве негативного контроля, и MC-15608 были получены в присутствии 150 мкМ протогена. Ширина линии возбуждения и эмиссии была установлена 1,5 и 30 нм соответственно. Все опыты были проделаны двукратно и трехкратно и измерения проводили на приборе POLARstar Optima/Galaxy (BMG) с возбуждением при длине волны 405 нм и мониторинг эмиссии проводили при длине волны 630 нм. Молярные концентрации соединения, которые требуются для 50% ингибирования энзима (IC_{50} значения), были рассчитаны путем подстановки полученных значений в уравнение зависимости ответа от дозы с использованием анализа нелинейной регрессии.

Значения ответа на дозу (IC_{50}) для замещенных ППО энзимов оказались выше, чем значение IC_{50} для дикого типа (незамещенного) ППО энзима (табл. 4а). Это указывает на то, что эти замещенные ППО энзимы имеют присущую им устойчивость к тестируемым ППО ингибирующим гербицидам. Замещенные ППО энзимы dG210 и R128L являются известными замещенными энзимами, найденными в *Amaranthus tuberculatus* и *Ambrosia artemisiifolia* соответственно, и было показано, что они отвечают за устойчивость ППО растений к множеству ППО гербицидов (Dayan et al., 2010, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:1548). Это указывает на то, что другие перечисленные замещенные ППО энзимы, которые также имеют более высокое значение IC_{50} , чем dG210 или R128L, также являются замещенными ППО энзимами, которые отвечают в растении за устойчивость растений по отношению к множеству ППО ингибирующих гербицидов (табл. 4а). Все замещенные ППО энзимы показывают сопоставимые энзимную активность, изменение единиц флуоресценции за минуту (FU/мин) по сравнению с диким типом ППО энзима (табл. 4а). Кроме того, все значения активности для замещенных ППО энзимов больше, чем у замещенных ППО энзимов dG210 или R128L. Замещенные ППО энзимы dG210 и R128L являются достаточно активными для действия в растении, как показано выше. Это указывает на то, что все замещенные ППО энзимы показывают также достаточную активность для действия в растении.

Таблица 4

IC_{50} (М) значения у дикого типа и аминокислотно-замещенного ППО энзима для ингибиторов сафлуфенацила и 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-диола

Аминокислотное замещение	ПОСЛ. ИД №	Относительная активность энзима (FU/мин)	Сафлу- фенацил	1,5-диметил-6- тиоксо-3-(2,2,7- трифтор-3-оксо-4- (проп-2-инил)-3,4- дигидро-2Н- бензо[<i>b</i>][1,4]оксазин -6-ил)-1,3,5- триазинан-2,4-дион
			IC_{50} (М)	
К ППО гербициду чувствительный ППО2 WC	2	1000	1,86E-09	5,17E-10
К ППО гербициду чувствительный ППО2 AC	4	800	1,78E-10	5,96E-11
dG210	6 и 8	80	1,60E-06	2,12E-09
R128L	2 и 4	700	2,22E-07	7,73E-10
R128A, L397D	2 и 4	100	1,00E-05	5,90E-09
R128L, L397D	2 и 4	НД	НД = не детектирован	
F204I, T208S	2 и 4	745	5,89E-11	1,29E-10
F204I, L397D	2 и 4	НД	НД	
F204I, L400A	2 и 4	150		4,57E-11
F204I, F420V	2 и 4	265		4,69E-09
F204I, F457M	2 и 4	200	1,89E-11	7,52E-11
T208S, L397D	2 и 4	150	4,08E-07	1,25E-10
T208S, L400A	2 и 4	НД	НД	
T208S, F420V	2 и 4	520	8,48E-07	2,34E-09
T208S, F457M	2 и 4	550	1,02E-10	1,95E-10
L397D, L400A	2 и 4	НД	НД	

036015

L397R, F420M	2 и 4	НД	НД	
L397N, F420M	2 и 4	90		1,63E-08
L397D, F420M	2 и 4	120	>0,00001	2,95E-08
L397A, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397R, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397N, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397Q, F420V	2 и 4	90	>0,00001	1,01E-07
L397K, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397F, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397P, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397W, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397V, F420V	2 и 4	150		1,21E-08
L397H, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397I, F420M	2 и 4	410		1,98E-10
L397M, F420K	2 и 4	НД	НД	
L397M, F420M	2 и 4	250		2,32E-10
L397F, F420M	2 и 4	НД	НД	
L397S, F420M	2 и 4	210		3,33E-09
L397W, F420M	2 и 4	НД	НД	
L397Y, F420M	2 и 4	НД	НД	
L397I, F420V	2 и 4	100		4,09E-09
L397A, F420M	2 и 4	150		4,53E-09
L397C, F420M	2 и 4	370		1,79E-09
L397D, F420V	2 и 4	60	>0,00001	1,16E-06
L397C, F420V	2 и 4	150		5,54E-08
L397E, F420V	2 и 4	105	>0,00001	1,41E-07
L397G, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397H, F420V	2 и 4	НД	НД	
L397M, F420V	2 и 4	140		8,79E-09
L397S, F420V	2 и 4	110		4,26E-08
L397T, F420V	2 и 4	150		1,31E-08
L397Q, F420M	2 и 4	110	1,00E-06	5,41E-09
L397E, F420M	2 и 4	340	1,00E-06	6,03E-09
L397G, F420M	2 и 4	80		6,06E-08
L397P, F420M	2 и 4	НД	НД	
L397T, F420M	2 и 4	НД	НД	
L397V, F420M	2 и 4	400		1,05E-09
L397D, F457M	2 и 4	НД	НД	
L400A, F420V	2 и 4	НД	НД	
L400A, F457M	2 и 4	160		1,35E-11
F420V, F457M	2 и 4	105		1,02E-09
R128A, F204I, F420V	2 и 4	НД	НД	
R128A, T208S, F420V	2 и 4	200	>0,00001	1,25E-08
R128A, L397D, F420V	2 и 4	НД	НД	
R128A, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД	

R128A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L397D	2 и 4	100	5,52E-11
F204I, T208S, L400A	2 и 4	105	2,64E-11
F204I, T208S, F420V	2 и 4	80	3,87E-09
F204I, T208S, F457M	2 и 4	200	4,21E-11
F204I, T208S, F457M	2 и 4	470	5,11E-11 1,70E-10
F204I, L397D, L400A	2 и 4	НД	НД
F204I, L397D, F420V	2 и 4	НД	НД
F204I, L397D, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, L400A, F420V	2 и 4	100	8,23E-08
F204I, L400A, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, F420V, F457M	2 и 4	80	2,10E-09
T208S, L397D, L400A	2 и 4	НД	НД
T208S, L397D, F420V	2 и 4	НД	НД
T208S, L397D, F457M	2 и 4	НД	НД
T208S, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
T208S, L400A, F457M	2 и 4	60	9,68E-12
T208S, F420V, F457M	2 и 4	90	3,41E-09
L397D, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
L397D, L400A, F457M	2 и 4	НД	НД
L397D, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, T208S, F420V	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, F420V, F457M	2 и 4	80	4,63E-08
R128A, F204I, L397D, F420V	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
R128A, T208S, L397D, F420V	2 и 4	НД	НД
R128A, T208S, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
R128A, T208S, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, L397D, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L397D, L400A	2 и 4	80	2,38E-09
F204I, T208S, L397D, F420V	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L397D, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L400A, F457M	2 и 4	100	2,88E-11
F204I, T208S, F420V, F457M	2 и 4	200	4,72E-09
F204I, L397D, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
F204I, L397D, L400A, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, L397D, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, L400A, F420A, F457M	2 и 4	60	3,69E-08

T208S, L397D, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
T208S, L397D, L400A, F457M	2 и 4	НД	НД
T208S, L397D, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
T208S, L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
L397D, L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, T208S, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, T208S, L397D, F420V	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, T208S, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, L397D, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, T208S, L397D, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, T208S, L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L397D, L400A, F420V	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L397D, L400A, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L397D, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L400A, F420V, F457M	2 и 4	60	9,24E-08
F204I, L397D, L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
T208S, L397D, L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, L400A, F420V, F457M	2 и 4	50	4,05E-07
R128A, F204I, T208S, L397D, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
R128A, F204I, T208S, L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД
F204I, T208S, L397D, L400A, F420V, F457M	2 и 4	НД	НД

Пример 2. Генная инженерия толерантных к ППО ингибирующим гербицидам растений, имеющих ППО последовательности дикого типа или мутированные.

Растения соя-бобов (*Glycine max*) или кукурузы (*Zea mays*) с производными ППО, толерантными к гербицидам, получают способом, который описан Olhoft et al., (патент США US 2009/0049567). Для того чтобы трансформировать соя-бобы или *Arabidopsis thaliana*, дикого типа или мутированные ППО последовательности клонируют с помощью стандартной техники клонирования, как описано в Sambrook et al., (Molecular cloning, (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press), в бинарный вектор, содержащий устойчивую маркерную генную кассету (AHAS) и мутированную ППО последовательность (помеченную как GOI) между убиквитинной промоторной (PcUbi) и нопаин синтазы терминаторной (NOS) последовательностями. Для того чтобы трансформировать кукурузу, дикого типа или мутированные ППО последовательности клонируют с помощью стандартной техники клонирования, как описано в Sambrook et al., (Molecular cloning, (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press) в бинарный вектор, содержащий устойчивую маркерную генную кассету (AHAS) и мутированную ППО последовательность (помеченную как GOI) между кукурузной убиквитинной промоторной (ZmUbi) и нопаин синтазы терминаторной (NOS) последовательностями. Бинарные плазмиды вводят в *Agrobacterium tumefaciens* для трансформации растения. Плазмидные конструкции вводят в соя-бобовые аксиллярные меристемные клетки у первичного узла эксплантатов семян через *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию. После инокуляции и совместного культивирования с *Agrobacterium* эксплантаты переносят в ростовую интродукционную среду без селекции на 1 неделю. Затем эксплантаты переносят в ростовую индукционную среду с 1-3 мкМ имазапир (фирмы Arsenal) на 3 недели для селекции трансформированных клеток. Эксплантаты со здоровыми каллус/росток подушками у первичного узла затем переносят в увеличивающую рост среду, содер-

жашую 1-3 мкМ имзапира, пока росток вытянется или эксплантат погибнет. Трансгенные растеньица, у которых появились корни, подвергают TaqMan анализу на присутствие трансгенов, переносят в почву и выращивают до зрелости в теплице. Трансформацию растений кукурузы проводят способами, описанными McElver и Singh (WO 2008/124495). Конструкция вектора трансформации растения, содержащего мутированные ППО последовательности, вводится в незрелые эмбрионы кукурузы путем *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Селекцию трансформированных клеток проводят в селекционной среде, дополненной 0,5-1,5 мкМ имзапира, в течение 3-4 недель. Трансгенные растеньица регенерируют в регенерирующей растительной среде и впоследствии окореняют. Трансгенные растеньица подвергают TaqMan анализу на присутствие трансгенов, а затем их пересаживают в горшечную смесь для выращивания и выращивают до зрелости в теплице. *Arabidopsis thaliana* трансформируют диким типом или мутированной ППО последовательностями способом окунания цветков, как описано McElver и Singh (WO 2008/124495). Трансгенные *Arabidopsis* растения подвергают TaqMan анализу для определения числа интеграционных локусов. Трансформация *Oryza sativa* (рис) проводится путем трансформации протопласта, как описано Peng et al. (US 6653529). T0 или T1 трансгенные растения соя-бобов, кукурузы и риса, содержащие мутированные ППО последовательности, тестируют на улучшенную толерантность к гербицидам у ППО-производных при исследованиях в теплице и исследованиях на небольших участках со следующими ППО ингибирующими гербицидами: сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион флумиоксазин, бутафенацил, ацифлуорфен, лактофен, бифенокс, сульфентразон плюс ингибитор фотосинтеза диурон, который был использован в качестве негативного контроля.

Трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* были испытаны на улучшенную толерантность к сафлуфенацилу, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-диону, флумиоксазину, бутафенацилу, ацифлуорфену, лактофену, бифеноксу, сульфентразону плюс ингибитору фотосинтеза диурону, который был использован в качестве негативного контроля, на пластинках с 48-углублениями. Для этого T2 семена стерилизуют на поверхности путем протирания в течение 5 мин в этаноле + вода (70 + 30 по объему), промывают один раз этанолом + вода (70 + 30 по объему) и два раза стерильной деионизованной водой. Семена ресуспенсируют в 0,1% агаре, растворенном в воде (в/о). В каждое углубление пластинки помещают четыре или пять семян на твердую питательную среду, включающую вполнину сильный Мурасиге-Скуга питательный раствор, pH 5,8 (Murashige и Skoog, (1962), *Physiologia Plantarum*, 15:473-497). Соединения растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавляют к среде перед отверждением (конечная ДМСО концентрация 0,1%). Пластинки с многочисленными углублениями инкубируют в ростовой комнате при температуре 22°C, относительной влажности воздуха 75% и 110 мкмоль фот * м⁻² * с⁻¹ с фотопериодом 14:10 ч света:темноты. Ингибирование роста определяют через 7-10 дней после посева по сравнению с диким типом растений. Дополнительно тестируют трансгенные T1 *Arabidopsis* растения на улучшенную толерантность к ППО ингибирующим гербицидам при тепличных исследованиях со следующими ППО ингибирующими гербицидами: сафлуфенацилом, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион, флумиоксазином, бутафенацилом, ацифлуорфеном, лактофеном, бифеноксом, сульфентразоном плюс ингибитором фотосинтеза диуроном, который был использован в качестве негативного контроля. Результаты приведены в табл. 5.

Таблица 5

Линия	Оценка ДПО (ДПО = Дней После Обработки)	ПОСЛ. ИД №	Замещение	Рейтинг повреждения 0 - 100%		
				(0 = нет повреждений, 100 = полный контроль)		
				300	150	75
				1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион г/а + 1% ДМСО		
1	7	2 и 4	L397D, F420V	100	30	98
1	19	2 и 4	L397D, F420V	98	65	95
2	7	2 и 4	L397D, F420V	30	98	100
2	19	2 и 4	L397D, F420V	60	100	100
3	7	2 и 4	L397D, F420V	35	98	80
3	19	2 и 4	L397D, F420V	80	100	95

Пример 3. Условия тканевой культуры.

Опыт *in vitro* мутагенеза тканевой культуры был развит для выделения и охарактеризовывания тканей растения (например, кукурузных и рисовых тканей), которая толерантна к протопорфириноген окси-

дазу (ППО) ингибирующим гербицидам, (например, сафлуфенацил, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[*b*][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион, флумиоксазин, бутафенацил, ацифлуорфен, лактофен, бифенокс, сульфентразон). В опыте используется соматоклональная вариация, которая обнаружена в *in vitro* тканевой культуре. Спонтанные мутации, полученные из соматоклональной вариации, могут быть увеличены путем химического мутагенеза и последующей селекции поэтапно, увеличивая концентрацию гербицида.

Данное изобретение обеспечивает условия тканевых культур для обнадеживающего роста ломкого, эмбрионного каллуса кукурузы или риса, который является регенерируемым. Каллусы были инициированы из четырех различных культур кукурузы или риса, охватывающих *Zea mays* и *Japonica* (Taipеi 309, Nipponbare, Koshihikari) и *Indica* (*Indica* 1) разнообразия соответственно. Семена стерилизуют на поверхности в 70%-ном этаноле в течение около 1 мин, за которым следует 20% коммерческий хлорокс отбеливатель в течение 20 мин. Семена промывают стерильной водой и помещают в индуцирующую каллус среду. Были протестированы различные индуцирующие каллус среды. Список ингредиентов для тестируемых сред представлен в табл. 6.

Таблица 6

Ингредиенты	Фирма поставщик	R001M	R025M	R026M	R327M	R008M	MS711R
B5 витамины	Sigma					1,0 X	
MS соли	Sigma			1,0 X	1,0 X	1,0 X	1,0 X
MS витамины	Sigma			1,0 X	1,0 X		
N6 соли	Phytotech	4,0 г /л	4,0 г /л				
N6 витамины	Phytotech	1,0 X	1,0 X				
L-пролин	Sigma	2,9 г /л	0,5 г /л				1,2 г /л
Казеино- кислоты	BD	0,3 г /л	0,3 г /л	2 г /л			
Казеин гидролизат	Sigma						1,0 г /л
L-Asp моногоидрат	Phytotech						150 мг /л
Никотиновая кислота	Sigma						0,5 мг /л
Пиридоксин HCl	Sigma						0,5 мг /л
Тиамин HCl	Sigma						1,0 мг /л
Мио -	Sigma						100 мг /л

и н о с и т о л							
MES	Sigma	500 м г /л	500 м г /л	500 м г /л	500 м г /л	500 м г /л	500 м г /л
М а л ь т о з а	VWR	30 г /л	30 г /л	30 г /л	30 г /л		
С о р б и т о л	Duchefa			30 г /л			
С а х а р о з а	VWR					10 г /л	30 г /л
NAA	Duchefa					50 м к г /л	
2,4-D	Sigma	2,0 м г /л					1.0 м г /л
MgCl ₂ ·6H ₂ O	VWR					750 м г /л	
→ pH		5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,7
Г е л ь р и т	Duchefa	4,0 г /л				2,5 г /л	
А г а р о з а т и п 1	Sigma		7,0 г /л	10 г /л	10 г /л		
→ А в т о к л а в		15 м и н	15 м и н	15 м и н	15 м и н	15 м и н	20 м и н
К и н е т и н	Sigma		2,0 м г /л	2,0 м г /л			
NAA	Duchefa		1,0 м г /л	1,0 м г /л			
ABA	Sigma		5,0 м г /л				
Ц е ф о т а к с и м	Duchefa		0,1 г /л	0,1 г /л	0,1 г /л		
В а н к о м и ц и н	Duchefa		0,1 г /л	0,1 г /л	0,1 г /л		
G418 Д и с у л ь ф а т	Sigma		20 м г /л	20 м г /л	20 м г /л		

R001M индуцирующая каллус среда была выбрана после тестирования многих вариантов. Культуры хранились в темноте при температуре 30°C. Эмбриогенный каллус был пересеян в свежую среду через 10-14 дней.

Пример 4. Селекция толерантного к гербициду каллуса.

Один раз были определены условия культуры ткани, дальнейшее установление условий селекции проводят путем анализа выживания тканей по кривым убивания под воздействием сафлуфенацила, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диона, флумиоксазина, бутафенацила, ацифлуорфена, лактофена, бифенокса, сульфентразона, плюс ингибитора фотосинтеза диурона, который был использован в качестве негативного контроля. Проводят внимательное рассмотрение аккумуляирования гербицида в ткани, а также его устойчивости и стабильности в клетках и культурной среде. В результате этих экспериментов может быть установлена сублетальная доза для первоначальной селекции мутированного материала.

После того как установлена начальная доза сафлуфенацила, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диона флумиоксазина, бутафенацила, ацифлуорфена, лактофена, бифенокса, сульфентразона плюс ингибитора фотосинтеза диурона, который был использован в качестве негативного контроля, в селекционной среде проводят отбор тканей поэтапным образом путем увеличения концентрации ППО ингибитора с каждым переносом, после того как клетки сильно восстанавливают этот рост в присутствии токсичных доз. Полученный каллус далее пересаживают в субкультуру каждые 3-4 недели к R001M с селекционным агентом. Свыше 26000 каллусов стали субъектом селекции для 4-5 субкультур, пока селекционное давление было выше токсичного уровня, как определено кривыми по убиванию и наблюдениями непрерывной культуры.

Альтернативно, жидкие культуры иницируют из каллусов в MS711R со слабым встряхиванием и недельными субкультурами. После того как жидкие культуры установлены, селекционный агент добавляют в колбу при каждой субкультуре. Следующие 2-4 цикла жидкой селекции культуры переносят на фильтры с твердой R001M средой для дальнейшего роста.

Пример 5. Регенерация растений.

Толерантные ткани регенерируют и характеризуют молекулярно на предмет мутации ППО генных последовательностей и/или биохимически на измененную ППО активность в присутствии селекционного агента. Кроме того, для генов, вовлеченных напрямую и/или опосредовано в пути биосинтеза тетрапирина и/или метаболизма, также были определены последовательности для охарактеризования мутаций. Наконец, для энзимов, которые изменяют поведение (например, метаболизм, транслокацию, транспор-

ровку), также были определены последовательности для охарактеризования мутаций.

Следующие полученные при гербицидной селекции каллусы были регенерированы с использованием режима среды R025M в течение 10-14 дней, R026M в течение около 2 недель, R327M, до тех пор пока не разовьются хорошо оформленные ростки, и R008S, до тех пор пока ростки хорошо окоренятся для переноса их в теплицу. Регенерация проводилась на свету. Не добавлялось никакого селекционного агента во время регенерации.

Как только было установлено наличие сильных корней, МО регенеранты пересаживают в теплицу в квадратные или круглые горшки. Пересаженные растения помещают под прозрачный пластмассовый колпак, пока они не адаптируются к условиям теплицы. В теплице был установлен цикл день/ночь с температурой 27°C/21°C (80°F/70°F) со светом от 600 ваттной натриевой лампы высокого давления дополнительный свет установлен на 14 ч длительности дня. Растения поливали согласно необходимости в зависимости от погоды и ежедневно удобряли.

Пример 6. Анализ последовательности.

Собирали ткани листьев от клонированных растений, отделенных для пересадки, и анализировали по отдельности. Геномную ДНК экстрагировали, используя набор Wizard® 96 Magnetic DNA Plant System kit (фирмы Promega, патент США № 6027945 и 6368800) согласно указаниям производителя. Выделенную ДНК подвергают PCR расширению с использованием подходящих передовых и реверсных праймеров (инициаторов).

PCR расширение проводят, используя Hotstar Taq ДНК полимеразу (фирмы Qiagen), с использованием посадочной термоциклической программы следующим образом: 96°C в течение 15 мин, затем следуют 35 циклов (96°C, 30 с; 58-0,2°C в каждом цикле, 30 с; 72°C, 3 мин и 30 с), 10 мин при 72°C.

PCR продукты были проверены на концентрацию и размеры фрагментов посредством агарозного гелевого электрофореза. Дефосфорилированные PCR продукты были проанализированы с помощью прямой последовательности, используя PCR праймеры (ДНК фирм Landmarks или Entelechon). Файлы следовых хроматограмм (.scf) были проанализированы на мутации по отношению к дикого типа гену, используя вектор NTI Advance 10™ (фирмы Invitrogen). Опираясь на информацию о последовательности, были идентифицированы мутации в некоторых особях. Анализ последовательности проводят по репрезентативным хроматограммам и соответствующим AlignX выравниваниям с заданием ошибок и редактированием для вызова вторичного пика.

Пример 7. Демонстрация толерантности к гербициду.

Отобранные мутанты и дички пересаживают в небольшие горшки. Сорта растений дикого типа проращивают из семени для сохранения в качестве контроля.

Примерно через 3 недели после пересаживания МО регенеранты опрыскивают, используя следовый опрыскиватель, сафлуфенацилом, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дионом, флумиоксазином, бутафенацилом, ацифлуорфеном, лактофеном, бифеноксом, сульфентразоном (плюс диурон), дополненных 0,1% метилированного масла семян. После того как растения адаптировались к условиям теплицы, подмножество было опрыскано дополнительным сафлуфенацилом или 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дионом. Сразу после опрыскивания растения выдерживают в засушливых условиях в течение 24 ч до того, как их снова полиют и удобряют. Опрысканные растения фотографируют и оценивают гербицидное повреждение через 1 и 3 недели после обработки. Не было обнаружено повреждения или были обнаружены слабые уровни повреждения у растений, содержащих гетерозиготную мутацию, в то время как контрольные растения и тканевые культуры дички (регенерированные растения отрицательны для мутаций последовательности) имели тяжелые повреждения после обработки.

Оценки толерантности для кукурузы и соя-бобов приведены в табл. 7а-7с.

Таблица 7а

Кукуруза

Амино- кислотное замещение	ПОСЛ. ИД №	Собы- тие	Сафлуфенацил (г а.в./га)				1,5-диметил-6- тиоксо-3-(2,2,7- трифтор-3-оксо-4- (проп-2-инил)-3,4- дигидро-2Н- бензо[б][1,4]оксазин- 6-ил)-1,3,5- триазинан-2,4-дион (г а.в./га)
			0	25	50	100	50
Нет	Нет	1	0	*	*	*	*
		2	3	*	*	*	*
		3	0	*	*	*	*
		4	0	*	*	*	*
		5	0	*	*	*	*
		6	0	*	*	*	*
		7	0	*	*	*	*
		8	*	*	7	*	*
		9	*	*	7	*	*
		10	*	*	*	7	*
		11	*	*	*	7	*
		12	*	*	*	8	*
		13	*	*	*	7	*
		14	*	*	*	8	*
		15	*	*	*	*	6
		16	*	*	*	*	7
		17	*	*	*	*	6
		18	*	*	*	*	6
		19	*	*	*	*	7
		20	*	*	*	*	6
Нет	40	1	*	7	*	*	*
		2	*	7	*	*	*
		3	*	*	*	*	*
		4	*	8	*	*	*
		5	*	7	*	*	*

036015

		6	*	*	8	*	*
		7	*	*	8	*	*
		8	*	*	7	*	*
		9	*	*	8	*	*
		1	*	*	8	*	*
		2	*	*	8	*	*
		3	*	*	*	7	*
		4	*	*	*	8	*
		5	*	*	*	8	*
		6	*	*	*	8	*
		7	*	*	*	8	*
		8	*	7	*	*	*
		9	*	7	*	*	*
		10	*	7	*	*	*
		11	*	4	*	*	*
		12	*	5	*	*	*
		13	*	4	*	*	*
		14	*	7	*	*	*
		15	*	*	7	*	*
		16	*	*	7	*	*
		17	*	*	7	*	*
		18	*	*	6	*	*
		19	*	*	7	*	*
		20	*	*	7	*	*
		21	*	*	7	*	*
		22	*	*	7	*	*
		23	*	*	7	*	*
		24	*	*	7	*	*
		25	*	*	6	*	*
		26	*	*	7	*	*
		27	*	*	7	*	*
		28	*	*	*	7	*
		29	*	*	*	7	*
		30	*	*	*	6	*
		31	*	*	*	6	*
		32	*	*	*	7	*
		33	*	*	*	8	*
		34	*	*	*	7	*
		35	*	*	*	7	*
		36	*	*	*	6	*
		37	*	*	*	8	*
		38	*	*	*	7	*
L369D, F392V	40	1	*	7	*	*	*
		2	*	4	*	*	*
		3	*	6	*	*	*
		4	*	6	*	*	*
		5	*	7	*	*	*

			6	*	6	*	*	*
			7	*	7	*	*	*
			8	*	*	7	*	*
			9	*	*	6	*	*
			10	*	*	7	*	*
			11	*	*	6	*	*
			12	*	*	8	*	*
			13	*	*	7	*	*
			14	*	*	7	*	*
			15	*	*	8	*	*
			16	*	*	6	*	*
			17	*	*	7	*	*
			18	*	*	7	*	*
			19	*	*	7	*	*
			20	*	*	7	*	*
			21	*	*	8	*	*
			22	*	*	9	*	*
			23	*	*	7	*	*
			24	*	*	4	*	*
			25	*	*	6	*	*
			26	*	*	7	*	*
			27	*	*	7	*	*
			28	*	*	8	*	*
			29	*	*	5	*	*
			30	*	*	*	8	*
			31	*	*	*	8	*
			32	*	*	*	7	*
			33	*	*	*	7	*
			34	*	*	*	7	*
			35	*	*	*	8	*
			36	*	*	*	7	*
			37	*	*	*	6	*
			38	*	*	*	7	*
			39	*	*	*	7	*
			40	*	*	*	8	*
			41	*	*	*	8	*
			42	*	*	*	8	*
			43	*	*	*	7	*
			44	*	*	*	8	*
			45	*	*	*	7	*
			46	*	*	*	7	*
			47	*	*	*	8	*
Н е т	2		1	*	7	*	*	*
			2	*	7	*	*	*
			3	*	8	*	*	*
			4	*	6	*	*	*
			5	*	6	*	*	*

036015

			6	*	7	*	*	*
			7	*	7	*	*	*
			8	*	7	*	*	*
			9	*	7	*	*	*
			10	*	6	*	*	*
			11	*	*	6	*	*
			12	*	*	6	*	*
			13	*	*	7	*	*
			14	*	*	8	*	*
			15	*	*	7	*	*
			16	*	*	6	*	*
			17	*	*	7	*	*
			18	*	*	6	*	*
			19	*	*	7	*	*
			20	*	*	7	*	*
			21	*	*	8	*	*
			22	*	*	8	*	*
			23	*	*	7	*	*
			24	*	*	8	*	*
			25	*	*	7	*	*
			26	*	*	8	*	*
			27	*	*	*	8	*
			28	*	*	*	7	*
			29	*	*	*	8	*
			30	*	*	*	7	*
			31	*	*	*	7	*
			32	*	*	*	8	*
			33	*	*	*	8	*
			34	*	*	*	7	*
			35	*	*	*	8	*
			36	*	*	*	7	*
			37	*	*	*	7	*
			38	*	*	*	8	*
			39	*	*	*	6	*
			40	*	*	*	7	*
			41	*	*	*	8	*
			42	*	*	*	7	*
F420V	2	1	0	*	*	*	*	*
		2	0	*	*	*	*	*
		3	*	6	*	*	*	*
		4	*	7	*	*	*	*
		5	*	6	*	*	*	*
		6	*	7	*	*	*	*
		7	*	6	*	*	*	*
		8	*	4	*	*	*	*
		9	*	6	*	*	*	*
		10	*	6	*	*	*	*

036015

			11	*	6	*	*	*
			12	*	7	*	*	*
			13	*	7	*	*	*
			14	*	7	*	*	*
			15	*	*	7	*	*
			16	*	*	8	*	*
			17	*	*	7	*	*
			18	*	*	7	*	*
			19	*	*	7	*	*
			20	*	*	7	*	*
			21	*	*	7	*	*
			22	*	*	7	*	*
			23	*	*	7	*	*
			24	*	*	6	*	*
			25	*	*	7	*	*
			26	*	*	8	*	*
			27	*	*	7	*	*
			28	*	*	6	*	*
			29	*	*	7	*	*
			30	*	*	7	*	*
			31	*	*	7	*	*
			32	*	*	7	*	*
			33	*	*	*	7	*
			34	*	*	*	7	*
			35	*	*	*	7	*
			36	*	*	*	7	*
			37	*	*	*	7	*
			38	*	*	*	7	*
			39	*	*	*	7	*
			40	*	*	*	8	*
			41	*	*	*	7	*
			42	*	*	*	8	*
			43	*	*	*	7	*
			44	*	*	*	7	*
			45	*	*	*	9	*
			46	*	*	*	8	*
			47	*	*	*	7	*
			48	*	*	*	7	*
			49	*	*	*	8	*
			50	*	*	*	7	*
			51	*	*	*	7	*
	L397D	2	1	0	*	*	*	*
			2	0	*	*	*	*
			3	0	*	*	*	*
			4	0	*	*	*	*
			5	0	*	*	*	*
			6	0	*	*	*	*

7	0	*	*	*	*
8	0	*	*	*	*
9	0	*	*	*	*
10	0	*	*	*	*
11	0	*	*	*	*
12	0	*	*	*	*
13	1	*	*	*	*
14	0	*	*	*	*
15	0	*	*	*	*
16	0	*	*	*	*
17	0	*	*	*	*
18	0	*	*	*	*
19	0	*	*	*	*
20	0	*	*	*	*
21	0	*	*	*	*
22	0	*	*	*	*
23	0	*	*	*	*
24	0	*	*	*	*
25	0	*	*	*	*
26	0	*	*	*	*
27	0	*	*	*	*
28	0	*	*	*	*
29	0	*	*	*	*
30	0	*	*	*	*
31	0	*	*	*	*
32	0	*	*	*	*
33	0	*	*	*	*
34	0	*	*	*	*
35	1	*	*	*	*
36	0	*	*	*	*
37	*	6	*	*	*
38	*	6	*	*	*
39	*	6	*	*	*
40	*	6	*	*	*
41	*	6	*	*	*
42	*	7	*	*	*
43	*	6	*	*	*
44	*	5	*	*	*
45	*	6	*	*	*
46	*	8	*	*	*
47	*	7	*	*	*
48	*	7	*	*	*
49	*	6	*	*	*
50	*	4	*	*	*
51	*	7	*	*	*
52	*	4	*	*	*
53	*	4	*	*	*

			54	*	*	6	*	*
			55	*	*	6	*	*
			56	*	*	6	*	*
			57	*	*	6	*	*
			58	*	*	6	*	*
			59	*	*	7	*	*
			60	*	*	6	*	*
			61	*	*	6	*	*
			62	*	*	4	*	*
			63	*	*	7	*	*
			64	*	*	7	*	*
			65	*	*	7	*	*
			66	*	*	7	*	*
			67	*	*	6	*	*
			68	*	*	6	*	*
			69	*	*	5	*	*
			70	*	*	4	*	*
			71	*	*	7	*	*
			72	*	*	7	*	*
			73	*	*	6	*	*
			74	*	*	7	*	*
			75	*	*	6	*	*
			76	*	*	7	*	*
			77	*	*	7	*	*
			78	*	*	7	*	*
			79	*	*	7	*	*
			80	*	*	7	*	*
			81	*	*	5	*	*
L397D, F420V	2	1	0	*	*	*	*	*
		2	0	*	*	*	*	*
		3	0	*	*	*	*	*
		4	0	*	*	*	*	*
		5	0	*	*	*	*	*
		6	0	*	*	*	*	*
		7	0	*	*	*	*	*
		8	0	*	*	*	*	*
		9	0	*	*	*	*	*
		10	0	*	*	*	*	*
		11	0	*	*	*	*	*
		12	0	*	*	*	*	*
		13	0	*	*	*	*	*
		14	0	*	*	*	*	*
		15	0	*	*	*	*	*
		16	0	*	*	*	*	*
		17	0	*	*	*	*	*
		18	0	*	*	*	*	*
		19	0	*	*	*	*	*

036015

		20	0	*	*	*	*
		21	0	*	*	*	*
		22	0	*	*	*	*
		23	0	*	*	*	*
		24	0	*	*	*	*
		25	0	*	*	*	*
		26	*	6	*	*	*
		27	*	5	*	*	*
		28	*	6	*	*	*
		29	*	7	*	*	*
		30	*	7	*	*	*
		31	*	6	*	*	*
		32	*	6	*	*	*
		33	*	*	4	*	*
		34	*	*	6	*	*
		35	*	*	6	*	*
		36	*	*	6	*	*
		37	*	*	6	*	*
		38	*	*	6	*	*
		39	*	*	7	*	*
		40	*	*	6	*	*
		41	*	*	7	*	*
		42	*	*	6	*	*
		43	*	*	7	*	*
		44	*	*	7	*	*
		45	*	*	7	*	*
		46	*	*	7	*	*
		47	*	*	7	*	*
		48	*	*	7	*	*
		49	*	*	7	*	*
		50	*	*	6	*	*
	F420L	1	0	*	*	*	*
		2	0	*	*	*	*
		3	0	*	*	*	*
		4	0	*	*	*	*
		5	*	6	*	*	*
		6	*	7	*	*	*
		7	*	6	*	*	*
		8	*	7	*	*	*
		9	*	7	*	*	*
		10	*	6	*	*	*
		11	*	7	*	*	*
		12	*	6	*	*	*
		13	*	7	*	*	*
		14	*	7	*	*	*
		15	*	6	*	*	*
		16	*	7	*	*	*

036015

	17	*	*	7	*	*
	18	*	*	8	*	*
	19	*	*	7	*	*
	20	*	*	7	*	*
	21	*	*	7	*	*
	22	*	*	7	*	*
	23	*	*	7	*	*
	24	*	*	7	*	*
	25	*	*	7	*	*
	26	*	*	7	*	*
	27	*	*	7	*	*
	28	*	*	7	*	*
	29	*	*	8	*	*
	30	*	*	7	*	*
	31	*	*	6	*	*
	32	*	*	7	*	*
	33	*	*	7	*	*
	34	*	*	7	*	*
	35	*	*	6	*	*
	36	*	*	7	*	*
	37	*	*	7	*	*
	38	*	*	7	*	*
	39	*	*	7	*	*
	40	*	*	*	8	*
	41	*	*	*	7	*
	42	*	*	*	7	*
	43	*	*	*	7	*
	44	*	*	*	7	*
	45	*	*	*	7	*
	46	*	*	*	7	*
	47	*	*	*	7	*
	48	*	*	*	7	*
	49	*	*	*	7	*
	50	*	*	*	7	*
	51	*	*	*	7	*
	52	*	*	*	7	*
	53	*	*	*	7	*
	54	*	*	*	7	*
	55	*	*	*	6	*
	56	*	*	*	8	*
	57	*	*	*	7	*
	58	*	*	*	8	*
	59	*	*	*	7	*
	60	*	*	*	7	*
F420M	2	1	0	*	*	*
		2	0	*	*	*
		3	0	*	*	*

	4	1	*	*	*	*
	5	0	*	*	*	*
	6	0	*	*	*	*
	7	0	*	*	*	*
	8	0	*	*	*	*
	9	0	*	*	*	*
	10	0	*	*	*	*
	11	0	*	*	*	*
	12	0	*	*	*	*
	13	0	*	*	*	*
	14	0	*	*	*	*
	15	0	*	*	*	*
	16	*	4	*	*	*
	17	*	6	*	*	*
	18	*	8	*	*	*
	19	*	7	*	*	*
	20	*	7	*	*	*
	21	*	5	*	*	*
	22	*	5	*	*	*
	23	*	6	*	*	*
	24	*	8	*	*	*
	25	*	*	7	*	*
	26	*	*	7	*	*
	27	*	*	6	*	*
	28	*	*	8	*	*
	29	*	*	8	*	*
	30	*	*	7	*	*
	31	*	*	7	*	*
	32	*	*	7	*	*
	33	*	*	7	*	*
	34	*	*	7	*	*
	35	*	*	8	*	*
	36	*	*	8	*	*
	37	*	*	8	*	*
	38	*	*	7	*	*
	39	*	*	7	*	*
L397E, F420V	2	1	0	*	*	*
		2	0	*	*	*
		3	0	*	*	*
		4	0	*	*	*
		5	0	*	*	*
		6	0	*	*	*
		7	0	*	*	*
		8	1	*	*	*
		9	0	*	*	*
		10	2	*	*	*
		11	0	*	*	*

12	1	*	*	*	*
13	0	*	*	*	*
14	0	*	*	*	*
15	0	*	*	*	*
16	0	*	*	*	*
17	0	*	*	*	*
18	2	*	*	*	*
19	1	*	*	*	*
20	0	*	*	*	*
21	1	*	*	*	*
22	2	*	*	*	*
23	1	*	*	*	*
24	2	*	*	*	*
25	2	*	*	*	*
26	1	*	*	*	*
27	2	*	*	*	*
28	1	*	*	*	*
29	*	1	*	*	*
30	*	0	*	*	*
31	*	0	*	*	*
32	*	3	*	*	*
33	*	1	*	*	*
34	*	0	*	*	*
35	*	1	*	*	*
36	*	*	1	*	*
37	*	*	1	*	*
38	*	*	0	*	*
39	*	*	2	*	*
40	*	*	0	*	*
41	*	*	1	*	*
42	*	*	3	*	*
43	*	*	2	*	*
44	*	*	0	*	*
45	*	*	2	*	*
46	*	*	1	*	*
47	*	*	2	*	*
48	*	*	2	*	*
49	*	*	3	*	*
50	*	*	2	*	*
51	*	*	*	0	*
52	*	*	*	0	*
53	*	*	*	1	*
54	*	*	*	3	*
55	*	*	*	2	*
56	*	*	*	2	*
57	*	*	*	2	*
58	*	*	*	1	*

		59	*	*	*	1	*
		60	*	*	*	*	3
		61	*	*	*	*	1
		62	*	*	*	*	2
		63	*	*	*	*	2
		64	*	*	*	*	3
L397Q, F420V	2	1	0	*	*	*	*
		2	0	*	*	*	*
		3	0	*	*	*	*
		4	0	*	*	*	*
		5	1	*	*	*	*
		6	0	*	*	*	*
		7	0	*	*	*	*
		8	0	*	*	*	*
		9	0	*	*	*	*
		10	*	*	*	4	*
		11	*	*	*	2	*
		12	*	*	*	3	*
		13	*	*	*	2	*
		14	*	*	*	7	*
		15	*	*	*	3	*
		16	*	*	*	3	*
		17	*	*	*	3	*
		18	*	*	*	5	*
		19	*	*	*	*	3
		20	*	*	*	*	2
		21	*	*	*	*	3
		22	*	*	*	*	3
		23	*	*	*	*	2
L397E, F420M	2	1	1	*	*	*	*
		2	0	*	*	*	*
		3	0	*	*	*	*
		4	0	*	*	*	*
		5	0	*	*	*	*
		6	0	*	*	*	*
		7	0	*	*	*	*
		8	0	*	*	*	*
		9	*	*	*	1	*
		10	*	*	*	0	*
		11	*	*	*	1	*
		12	*	*	*	0	*
		13	*	*	*	7	*
		14	*	*	*	1	*
		15	*	*	*	0	*
		16	*	*	*	1	*
		17	*	*	*	*	0
		18	*	*	*	*	1

036015

L397Q, F420M	2	1	0	*	*	*	*
		2	0	*	*	*	*
		3	0	*	*	*	*
		4	0	*	*	*	*
		5	1	*	*	*	*
		6	0	*	*	*	*
		7	0	*	*	*	*
		8	0	*	*	*	*
		9	1	*	*	*	*
		10	*	*	*	0	*
		11	*	*	*	0	*
		12	*	*	*	1	*
		13	*	*	*	1	*
		14	*	*	*	1	*
		15	*	*	*	1	*
		16	*	*	*	1	*
		17	*	*	*	*	3
		18	*	*	*	*	3
L397D, F420M	2	1	0	*	*	*	*
		2	0	*	*	*	*
		3	0	*	*	*	*
		4	0	*	*	*	*
		5	0	*	*	*	*
		6	0	*	*	*	*
		7	0	*	*	*	*
		8	0	*	*	*	*
		9	0	*	*	*	*
		10	0	*	*	*	*
		11	1	*	*	*	*
		12	1	*	*	*	*
		13	0	*	*	*	*
		14	0	*	*	*	*
		15	2	*	*	*	*
		16	1	*	*	*	*
		17	1	*	*	*	*
		18	1	*	*	*	*
		19	0	*	*	*	*
		20	1	*	*	*	*
		21	*	2	*	*	*
		22	*	2	*	*	*
		23	*	2	*	*	*
		24	*	3	*	*	*
		25	*	1	*	*	*
		26	*	3	*	*	*
		27	*	3	*	*	*
		28	*	3	*	*	*
		29	*	3	*	*	*

		30	*	3	*	*	*
		31	*	3	*	*	*
		32	*	*	1	*	*
		33	*	*	1	*	*
		34	*	*	2	*	*
		35	*	*	1	*	*
		36	*	*	1	*	*
		37	*	*	3	*	*
		38	*	*	3	*	*
		39	*	*	2	*	*
		40	*	*	0	*	*
		41	*	*	3	*	*
		42	*	*	3	*	*
		43	*	*	2	*	*
		44	*	*	1	*	*
		45	*	*	2	*	*
		46	*	*	2	*	*
		47	*	*	*	7	*
		48	*	*	*	3	*
		49	*	*	*	3	*
		50	*	*	*	3	*
		51	*	*	*	*	3
	L397Q	2	1	0	*	*	*
		2	2	1	*	*	*
		3	3	0	*	*	*
		4	4	1	*	*	*
		5	5	0	*	*	*
		6	6	0	*	*	*
		7	7	*	*	*	4
		8	8	*	*	*	4
		9	9	*	*	*	4
		10	10	*	*	*	4
		11	11	*	*	*	4
		12	12	*	*	*	5
		13	13	*	*	*	5
		14	14	*	*	*	5
		15	15	*	*	*	*
		16	16	*	*	*	*
		17	17	*	*	*	*
		18	18	*	*	*	*
		19	19	*	*	*	*

Таблица 7b

Соя

Амино- кислотное замещение	ПО- СЛ. ИД № сафлуфенацил (г а.в./га)							1,5-диметил-6- тиоксо-3-(2,2,7- трифтор-3-оксо-4- (проп-2-инил)-3,4- дигидро-2Н- бензо [b][1,4]оксазин- 6-ил)-1,3,5-триазиан- 2,4-дион (г а.в./га)			
								12,5	25	50	75
Нет	Нет	0	9	9	9	9	9	7	8	9	9
Нет	40	1	8	9	8	*	*	8	8	*	*
		1	9	9	*	*	*	8	9	*	*
		0	3	6	9	*	*	6	6	*	*
		2	4	6	8	*	*	6	7	*	*
		1	9	9	9	*	*	7	7	*	*
		0	9	9	9	*	*	8	8	*	*
		0	8	9	8	*	*	8	*	*	*
		0	8	9	9	*	*	7	9	*	*
		0	7	9	9	*	*	8	9	*	*
		0	9	9	9	*	*	8	9	*	*
		0	9	9	9	*	*	9	9	*	*
		0	8	9	8	*	*	7	8	*	*
		0	9	9	9	*	*	8	9	*	*
L369D, F392V	40	0	9	9	9	*	*	8	9	*	*
		0	7	9	9	*	*	8	8	*	*
		0	4	5	6	*	*	5	6	*	*
		0	5	6	7	*	*	8	8	*	*
		0	9	9	9	*	*	7	9	*	*
		0	6	7	7	*	*	8	7	*	*
		0	4	4	5	*	*	5	4	*	*
		2	5	6	6	*	*	6	7	*	*
		*	4	5	6	*	*	4	6	*	*
		0	5	6	6	*	*	5	7	*	*
		0	4	5	5	*	*	4	6	*	*
		0	*	6	9	9	*	*	8	8	*
		*	*	5	6	6	*	*	6	7	*
Нет	2	0	2	4	7	*	*	3	5	*	*
		0	4	3	7	*	*	7	7	*	*
		0	4	7	8	*	*	6	6	*	*
		0	7	9	9	*	*	6	8	*	*
		1	7	8	9	*	*	7	8	*	*
		0	8	7	9	*	*	5	6	*	*
		0	5	8	9	*	*	7	*	*	*
		5	7	8	9	*	*	7	*	*	*
		0	5	7	6	*	*	6	7	*	*
L397D	2	2	*	7	9	9	*	*	8	9	*
		1	*	2	4	4	*	*	4	5	*
		1	*	9	9	9	*	*	8	8	*
		1	*	2	3	4	*	*	4	4	*
		0	*	5	6	6	*	*	5	5	*
		0	*	3	5	5	*	*	4	5	*
L397E	2	*	*	2	4	6	*	*	5	6	*
		0	5	3	3	*	*	5	5	*	*

		1	4	6	6	*	*	7	8	*	*
		0	4	4	4	*	*	6	8	*	*
		*	4	5	6	*	*	4	6	*	*
		0	4	6	6	*	*	6	7	*	*
		1	4	6	6	*	*	6	8	*	*
		0	0	1	3	*	*	8	6	*	*
		0	5	4	4	*	*	5	8	*	*
		0	3	6	7	*	*	6	8	*	*
L397Q	2	0	4	3	8	*	*	7	9	*	*
F420L	2	1	*	9	9	*	*	9	9	*	*
		0	1	0	0	*	*	2	1	*	*
		1	0	2	2	*	*	*	3	*	*
		1	3	1	1	*	*	1	*	*	*
		0	*	2	3	4	*	*	4	6	*
		0	*	2	5	6	*	*	5	6	*
		0	*	2	3	5	*	*	5	6	*
		0	*	2	3	5	*	*	5	6	*
F420M	2	1	*	0	3	3	*	*	4	*	*
		0	*	4	6	5	*	*	*	3	*
		0	*	0	2	3	*	*	1	4	*
		0	*	4	3	3	*	*	4	*	*
		0	*	0	3	2	*	*	*	2	*
		0	*	0	3	3	*	*	1	2	*
		2	*	5	6	6	*	*	5	5	*
		0	*		9	9	9	*	8	9	*
L397D, F420V	2	0	*	3	6	6	*	*	5	4	*
		1	1	1	2	*	*	2	*	*	*
		1	0	0	1	*	*	3	1	*	*
		2	*	4	6	6	*	*	6	6	*
		0	*	6	7	7	*	*	6	6	*
		0	*	5	4	5	*	*	5	5	*
		0	*	5	4	4	*	*	6	*	*
		0	*	5	5	5	*	*	6	*	*
L397D, F420M	2	0	*	*	*	6	*	*	0	3	*
		*	*	*	9	9	*	*	*	9	8
		3	*	*	3	2	*	*	1	2	3
L397E, F420V	2	1	*	*	0	0	*	*	1	2	2
		0	*	*	8	8	*	*	7	8	8
		2	*	*	6	6	*	*	6	7	7
L397Q, F420V	2	0	*	*	3	5	*	*	5	4	6
		0	*	*	1	*	*	*	0	1	3
		0	*	*	6	7	*	*	7	7	7
		0	*	*	8	9	*	*	9	8	9
		2	*	*	2	2	*	*	5	4	7
		*	*	*	3	3	*	*	4	4	4
		1	*	*	9	9	*	*	8	8	9
		0	*	*	0	2	*	*	0	1	1
		0	*	*	0	3	*	*	2	4	5
		0	*	*	0	0	*	*	4	5	5
		0	*	*	7	7	*	*	6	7	7
L397E, F420M	2	0	*	*	1	2	*	*	2	2	2
		0	*	*	0	0	*	*	1	1	3
		0	*	*	2	1	*	*	0	1	1
L397Q, F420M	2	0	*	*	0	0	*	*	3	2	3
		1	*	*	6	7	*	*	7	7	7
		1	*	*	6	7	*	*	7	7	8
		1	*	*	1	3	*	*	2	3	4
		0	*	*	0	3	*	*	0	4	5
		0	*	*	0	0	*	*	2	4	4
		*	*	*	5	6	*	*	6	6	6
		2	*	*	4	6	*	*	6	6	*
		3	*	*	0	0	*	*	3	5	5
		1	*	*	0	1	*	*	2	1	2
		0	*	*	1	2	*	*	2	3	4
		0	*	*	1	2	*	*	2	3	4

Таблица 7с

Соя-бобы, толерантность к ППО ингибирующим соединениям дикого типа и трансгенные выделенные Т1 индивидуумы из двух независимых событий

Амино- кислотное замещение	ПОСЛ ИД №		Сафлу- фенацил	1,5-диметил-6- тиоксо-3-(2,2,7- трифтор-3-оксо-4- (проп-2-инил)-3,4- дигидро-2Н- бензо[б][1,4]оксазин -6-ил)-1,3,5- триазинан-2,4-дион	Фомеса- фен	Флумиокс- азин	Сульфен- тразон	Сульфен- тразон	Оксифлуор- фен	Оксифлуор- фен
		Не опрыскан	150 г а.в./га	100 г а.в./га	600 г а.в./га	150 г а.в./га	350 г а.в./га	700 г а.в./га	600 г а.в./га	1200 г а.в./га
Нет	Нет	0	9	9	5	9	9	9	8	9
		0	9	9	5	9	9	9	7	9
		0	9	9	4	9	7	9	8	9
		0	9	9	4	9	7	9	9	9
		0	9	9	4	9	8	9	7	8
		1	9	8	5	9	9	9	8	9
		*	9	9	4	9	9	9	9	9
		*	9	9	5	9	9	9	7	8
L397D_ F420V Событие А	2	0	3	9	1	9	9	2	4	5
		0	5	4	2	6	*	3	4	5
		0	3	4	0	6	6	7	5	4
		0	4	4	0	5	3	7	6	4
		0	6	4	1	5	5	4	6	3
		0	4	9	0	4	3	4	9	4
		*	3	4	2	4	5	6	4	4
		*	5	4	4	6	6	4	4	5
L397D_ F420V Событие В	2	1	3	4	2	5	4	4	6	5
		0	2	3	4	6	4	5	4	5
		0	3	3	1	6	4	5	8	4
		0	3	3	3	5	5	4	4	5
		0	4	4	2	6	5	5	4	4
		0	4	3	1	4	4	6	5	6
		*	3	4	3	5	6	6	4	5
		*	4	4	3	4	4	5	6	5

Ниже приведены определения оценки повреждений, которые измерены выше:

Оценка, описание повреждений.

0 - Нет повреждений.

1 - Минимальное повреждение, только несколько клочков повреждения листьев или хлороза.

2 - Минимальное повреждение со слегка более сильным хлорозом. Все точки роста остаются не поврежденными.

3 - Слегка более сильное повреждение тканей вторичных листьев, но первичные листья и точки роста еще не повреждены.

4 - Вся морфология растения слегка отлична, некоторый хлороз и некроз во вторичных точках роста и тканях листьев. Стебли не повреждены. Подрост очень возможен в течение 1 недели.

5 - Вся морфология растения четко отлична, некоторый хлороз и некроз на нескольких листьях и точках роста, но первичные точки роста не повреждены. Ткани стеблей еще зеленые. Подрост очень вероятен в течение 1 недели.

6 - Сильное повреждение можно видеть на новых растущих листочках. Растение имеет высокую вероятность выжить только посредством подроста в различных точках роста. Большинство листьев являются хлорозными/некротическими, но стеблевые ткани еще зеленые. Может происходить подрост, но с заметными проявлениями повреждений.

7 - Большинство активных точек роста являются некротическими. Возможна единственная точка роста, которая выжила, и может быть частично хлорозной или зеленой и частично некротической. Два листа могут быть только хлорозными с некоторой зеленью; остальная часть растения, включая стебель, является некротической.

8 - Растение почти погибло, и все точки роста являются некротическими. Один лист может быть хлорозным с небольшой зеленью. Остальная часть растения некротическая.

9 - Растение погибло.

* - Не тестировано.

Пример 8. Гербицидная селекция с использованием тканевой культуры.

Выбирают среду для использования и получают кривые гибели, как подробно указано выше. Для селекции была использована различная техника. Использовалась или постадийная селекция или сразу

применяли летальный уровень гербицида. В каждом случае все каллусы переносят для каждого нового цикла селекции. Селекция состояла из 4-5 циклов культуры с 3-5 неделями для каждого цикла. Каллусы помещают на нейлоновые мембраны для облегчения переноса (листы с порами 200 мкм, фирм Biodesign, Saco, Maine). Мембраны разрезали для помещения в чашки Петри размером 100×20 мм и обрабатывали в автоклаве перед использованием, помещали 25-35 каллусов (средний вес/каллус был 22 мг) на каждую пластинку. Кроме того, ряд каллусов были объектом селекции в жидкой культурной среде с недельной субкультурой, после чего следовала дальнейшая селекция на полутвердой среде.

Селекцию мутантных линий проводили с использованием сафлуфенацила, 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-диона, флумиоксазина, бутафенацила, ацифлуорфена, лактофена, бифенокса, сульфентразона.

Эффективность получения мутантов была высокой, опираясь или на процентное содержание каллусов, которые давали начало регенерируемой, мутантной линии, или на число линий, как определено 1 г использованной ткани.

Пример 9. Скрининг мутагенизированных клеток водорослей для идентификации толерантных к гербициду клонов и идентификации причинных мутаций в ППО генах.

Для того чтобы создавать мутации в ППО генах, которые придают устойчивость к "ППО ингибирующим гербицидам", можно использовать скрининг популяции химически или УФ мутагенизированных клеток. Особенно полезны одноклеточные организмы, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*, для идентификации доминантных мутаций, которые придают устойчивость к гербициду (Kataoka M. et al., 1990, J. of Pest. Sci., 15:449-451; Oshio H. et al., 1993, Zeitschrift fur Naturforschung, 48:339-344).

Клетки водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* линий CC-503 и CC-1691 (Duke University, Durham, USA) были размножены в TAP среде (Gorman и Levine, 1965, PNAS, 54: 1665-1669) при постоянном встряхивании при 100 об/мин, температуре 22°C и облучении светом 30 мкмоль фот * м⁻² * с⁻². Скрининг соединений проводили при облучении светом 450 мкмоль фот * м⁻² * с⁻². Чувствительные линии *Chlamydomonas reinhardtii* были мутагенизированы 0,14 М этилметансульфоната (ЭМС) в течение 1 ч, как описано Лопесом (Loppes, 1969, Mol. Gen. Genet., 104: 172-177). Толерантные линии были идентифицированы путем скрининга мутагенизированных клеток на пластинках с твердой TAP средой, содержащих "ППО ингибирующий гербицид", такой как сафлуфенацил или 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион при летальных для дикого типа концентрациях, зависящих от активности соединения в CC-503 или CC-1691 линии.

Стандартная техника была использована для выделения РНК и сДНК синтеза, как описано в Sambrook et al. (Molecular cloning, (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press). Расширение ППО генов из дикого типа и устойчивого *Chlamydomonas reinhardtii* из геномной ДНК или копии ДНК в качестве шаблона было проведено стандартной PCR техникой с ДНК олигонуклеотидами, которые приведены в табл. 5. Полученные в результате ДНК молекулы были клонированы в стандартном программированном векторе (pJET1) и программированы стандартной программной техникой. Мутации идентифицируют путем сравнения дикого типа и мутантной ППО последовательностей с помощью инструмента выравнивания последовательностей Align X (вектор NTI Advance Software версия 10.3, фирма Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Таблица 8

PCR праймер для расширения Cr ППО

Название праймера	Последовательность праймера (5' – 3')
Cr_П П О 1_Fw	ATGATGTTGACCCAGACTCCTGGGAC
Cr_П П О 1_Rv	TTAGGCCTTGACTGCGGCCTTGGAC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ борьбы с нежелательными растениями на месте культивирования растения, этот способ включает стадии:

а) обеспечение в указанном месте культивируемого растения, которое содержит как минимум одну нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую мутированную протопорфириноген оксидазу (мут-ППО), которая устойчива или толерантна к "ППО ингибирующему гербициду"; и

б) применение в указанном месте эффективного количества указанного гербицида, где нуклеотидная последовательность а) включает последовательность SEQ ID NO: 1 или 3 или её вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 3, и где кодированная мут-ППО представляет собой вариант SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором:

а) аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln;

б) аминокислота в позиции 420 представляет собой Val, Met, Ala, Ile или Leu.

2. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мут-ППО полипептид, причем нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3 или её вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 3, и где кодированный мут-ППО полипептид представляет собой вариант SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln и аминокислота в позиции 420 представляет собой Val, Met, Ala, Ile или Leu.

3. Мут-ППО полипептид, включающий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором аминокислота в позиции 420 представляет собой Ala, Leu, Ile или Val и аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln, причем указанный мут-ППО полипептид предоставляет растению повышенную устойчивость или толерантность к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с диким типом растения.

4. Клетка трансгенного растения, трансформированная нуклеиновой кислотой, как определено в п.3, обладающая повышенной устойчивостью к ППО-ингибирующему гербициду по сравнению с клеткой дикого типа растения.

5. Трансгенное растение, содержащее клетку растения, как определено в п.4, в котором экспрессия мут-ППО полипептида, кодирующего нуклеиновую кислоту в растении, приводит к повышенной устойчивости растения к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с диким типом растения.

6. Растение, которое экспрессирует мутагенизированный или рекомбинантный мут-ППО полипептид, включающий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в котором аминокислота в позиции 420 представляет собой Met или Val и аминокислота в позиции 397 представляет собой Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Met, Pro, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Asn, Asp, Glu или Gln, и где указанная мут-ППО придает растению повышенную толерантность к гербициду по сравнению с соответствующим вариантом дикого типа растения, когда проводят его экспрессию.

7. Семя, произведенное трансгенным растением, содержащим клетку растения, как определено в п.4, или растением, как определено в п.5 или 6, где семя является чистосортным, для повышенной устойчивости к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа семени.

8. Способ получения трансгенных клеток растений с повышенной устойчивостью к ППО ингибирующему гербициду по сравнению с вариантом дикого типа клетки растения, включающий трансформирование клетки растения с помощью экспрессионной кассеты, включающей нуклеиновую кислоту, как определено в п.2.

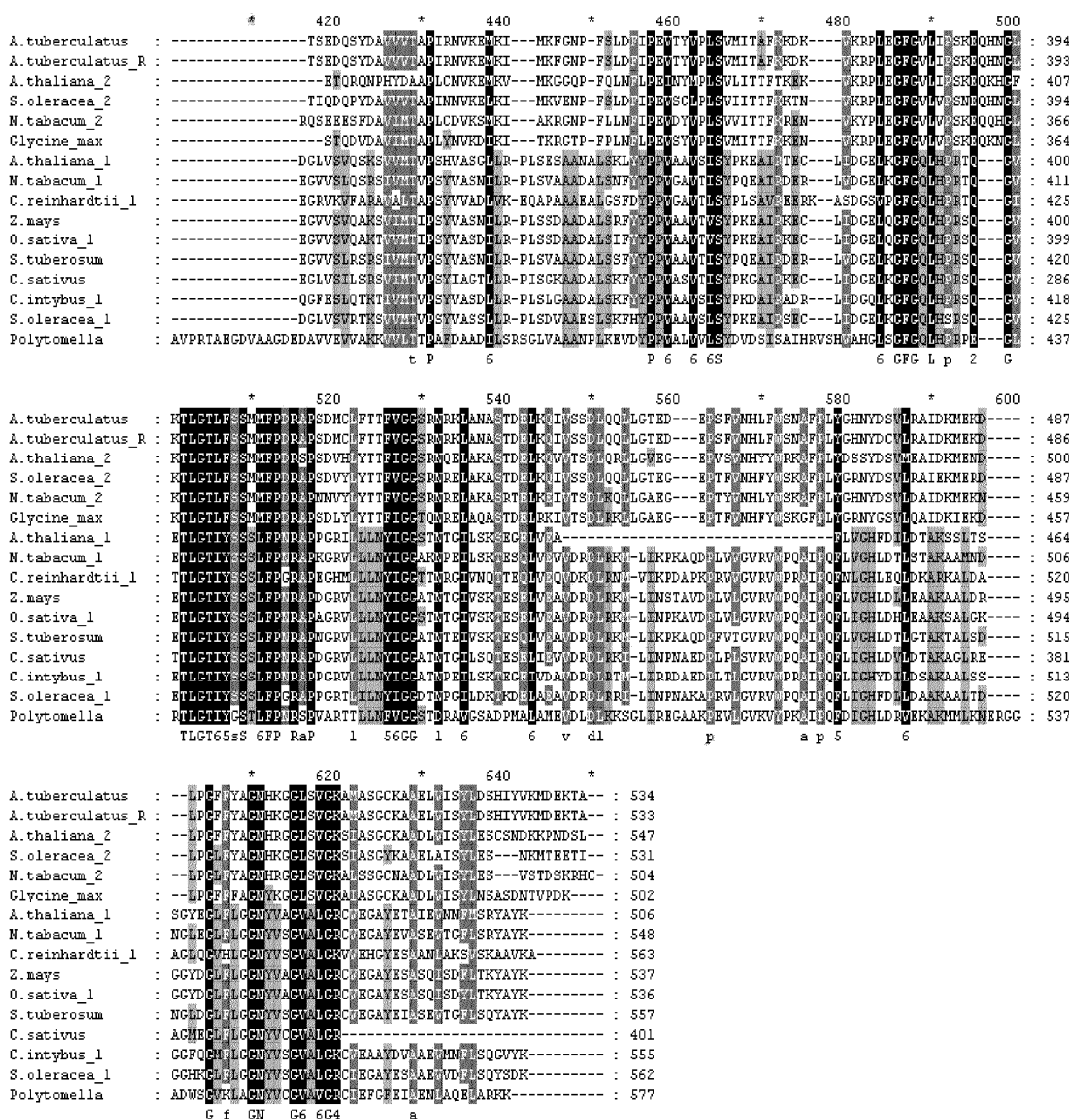
9. Способ получения трансгенного растения, включающий (а) трансформирование клетки растения с помощью экспрессионной кассеты, включающей нуклеиновую кислоту, как определено в п.2; и (б) создание растения с повышенной устойчивостью к ППО ингибирующему гербициду из клетки растения.

10. Способ по любому из пп.8, 9, в котором экспрессионная кассета дополнительно включает регуляторную область иницирования транскрипции и регуляторную область иницирования трансляции, которые являются функциональными в растении.

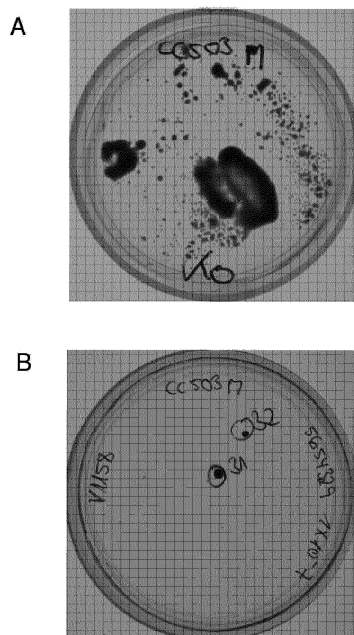
[illegible]

		*	220	*	240	*	260	*	280	*	300																																																																							
A.tubercuclatus	:	A	L	T	S	N	L	S	A	K	S	Q	I	Q	M	L	R	P	L	R	K	H	N	A	T	L	D	E	H	V	E	S	V	G	G	F	F	F	F	F	V	D	V	D	F	F	V	A	C	T	G	C	G	D	P	S	E	M	H	T	I	P	V	N	E	R	K	-	R	F	S	G	P	A	L	I	Q	S	T	:	243	
A.tubercuclatus_R	:	A	L	T	S	N	L	S	A	K	S	Q	I	Q	M	L	R	P	L	R	K	H	N	A	T	L	D	E	H	V	E	S	V	G	G	F	F	F	F	F	F	V	D	V	D	F	F	V	A	C	T	G	C	G	D	P	S	E	M	H	T	I	P	V	N	E	R	K	-	R	F	S	G	P	A	L	I	Q	S	T	:	243
A.thaliana_2	:	E	V	T	S	N	L	S	A	K	S	Q	I	Q	M	L	R	P	L	R	K	H	N	A	T	L	D	E	H	V	E	S	V	G	G	F	F	F	F	F	F	V	D	V	D	F	F	V	A	C	T	G	C	G	D	P	S	E	M	H	T	I	P	V	N	E	R	K	-	R	F	S	G	P	A	L	I	Q	S	T	:	243
S.oleracea_2	:	A	L	T	S	N	L	S	A	K	S	Q	I	Q	M	L	R	P	L	R	K	H	N	A	T	L	D	E	H	V	E	S	V	G	G	F	F	F	F	F	F	V	D	V	D	F	F	V	A	C	T	G	C	G	D	P	S	E	M	H	T	I	P	V	N	E	R	K	-	R	F	S	G	P	A	L	I	Q	S	T	:	243
N.tubacum_2	:	D	I	K	S	N	L	S	A	K	S	Q	I	Q	M	L	R	P	L	R	K	H	N	A	T	L	D	E	H	V	E	S	V	G	G	F	F	F	F	F	F	V	D	V	D	F	F	V	A	C	T	G	C	G	D	P	S	E	M	H	T	I	P	V	N	E	R	K	-	R	F	S	G	P	A	L	I	Q	S	T	:	243
Glycine_max	:	A	L	K	S	N	L	S	A	K	S	Q	I	Q	M	L	R	P	L	R	K	H	N	A	T	L	D	E	H	V	E	S	V	G	G	F	F	F	F	F	F	V	D	V	D	F	F	V	A	C	T	G	C	G	D	P	S	E	M	H	T	I	P	V	N	E	R	K	-	R	F	S	G	P	A	L	I	Q	S	T	:	211
A.thaliana_1	:	D	I	P	F	F	D	I	M	S	I	P	G	I	R	A	C	L	G	A	I	C	L	I	N	G	---	S	P	D	R	S	E	S	V	F	F	V	R	N	D	I	E	L	L	E	F	F	S	G	V	A	D	C	P	S	R	L	M	A	R	G	C	V	E	L	N	G	---	S	I	N	G	E	T	R	A	I	:	253		
N.tubacum_1	:	D	I	P	F	F	D	I	M	S	I	P	G	I	R	A	C	L	G	A	I	C	L	I	N	G	---	S	P	D	R	S	E	S	V	F	F	V	R	N	D	I	E	L	L	E	F	F	S	G	V	A	D	C	P	S	R	L	M	A	R	G	C	V	E	L	N	G	---	S	I	N	G	E	T	R	A	I	:	253		
C.reinhardtii_1	:	D	A	F	T	F	D	I	M	S	I	P	G	I	R	A	C	L	G	A	I	C	L	I	N	G	---	A	M	P	S	E	S	V	F	F	V	R	N	D	I	E	L	L	E	F	F	S	G	V	A	D	C	P	S	R	L	M	A	R	G	C	V	E	L	N	G	---	S	I	N	G	E	T	R	A	I	:	276			
Z.mays	:	D	I	P	F	F	D	I	M	S	I	P	G	I	R	A	C	L	G	A	I	C	L	I	N	G	---	S	P	D	R	S	E	S																																																

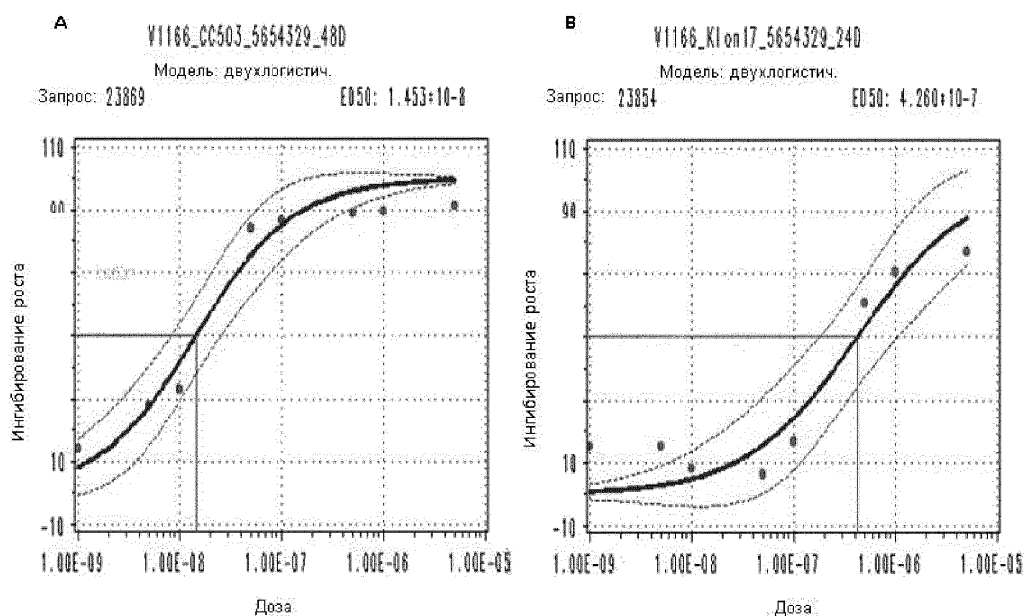
		*	320	*	340	*	360	*	380	*	400			
A.tuberculatus	: LLSK		KEKGGN-ASNGK	PRVRCSPSSQCCQ	QTLVTRKQ	QCEG	ELHLLQCHLS	SYNQ	QIPSLGNS	SSSMNN		: 318		
A.tuberculatus_R	: LLSK		KEKGGN-ASNGK	PRVRCSPSSQCCQ	QTLVTRKQ	QCEG	ELHLLQCHLS	SYNQ	QIPSLGNS	SSSMNN		: 317		
A.thaliana_2	: FAAN		GGKSDTKSSQ	PTKRGSRGSS	SHGCGQ	QLEP	CHPS	SHD	ELHDS	SKGLSS	SYN	- GSGPQNGNS	SSCVHNN	: 313
S.oleracea_2	: LSSK		KEKGGN-ASNGK	PRVRCSPSSQCCQ	QTLVTRKQ	QCEG	ELHLLQCHLS	SYNHGSL	SKTNGNS	SSSMNS			: 336	
N.tabacum_2	: LSPKN		EKKGGPPKTSANK	KHRCGRSS	ELGCGQ	QTLVTRKQ	QCEG	ELHLLQCHLS	SYN	QCTSD	SAID	SSSS	SHKSPHK	: 289
Glycine_max	: LFAF		REKTCGNAL	RHNRKGRSS	PSQCCQ	QTLVTRKQ	QCEG	ELHLLQCHLS	SYN	QCTSD	SAID	SSSS	SHKSPHK	: 290
A.thaliana_1	: QEFK		NAPKARD	PHLP	KPGQTVCS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 322
N.tabacum_1	: KEKS		STPKAPD	PHLP	KPGQTVCS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 332
C.reinhardtii_1	: QEFQ		SNPAPPED	PHLP	PKKHGQTVCS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 346
Z.mays	: QEFK		KMPKPPD	PHALP	KPGQTVAS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 322
O.sativa_1	: QEFQ		KMPKPPD	PHLP	TPKQTVAS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 321
S.tuberosum	: KEKS		KMPKPPD	PHLP	TPKQTVCS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 342
C.sativus	: QEFN		KTKKPPD	PHLP	KPGQTVCS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 208
C.intybus_1	: QDFK		NSQKPPD	PHLP	KPGQTVCS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 340
S.oleracea_1	: QEFK		DMKPPD	PHLP	KPGQTVCS	SRGK	ITLM	DAISTG	C	SKVLL	SWGLSS	STKLEKGG		: 347
Polycornella	: MNRK		REARTG	GKARD	GTVPL	NELTA	RKSS	SPPT	SS	SG	SG	SG	SG	: 340



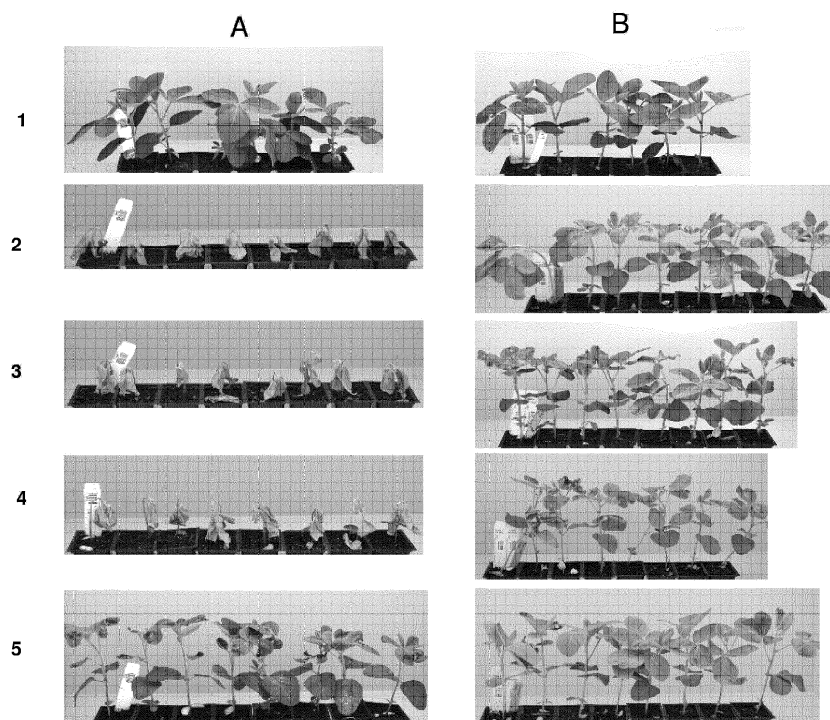
Фиг. 1



ФИГ. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

