

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) 031999

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2019.03.29**
- (21) Номер заявки  
**201300707**
- (22) Дата подачи заявки  
**2011.12.09**

- (51) Int. Cl. *A01H 5/00* (2006.01)  
*A01H 5/10* (2006.01)  
*A01H 1/00* (2006.01)  
*C12N 9/02* (2006.01)  
*C12N 15/29* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)  
*C12N 15/05* (2006.01)  
*C12N 15/11* (2006.01)  
*C07H 21/00* (2006.01)  
*A01C 1/00* (2006.01)  
*A01N 41/10* (2006.01)  
*A01N 57/20* (2006.01)  
*A01P 13/00* (2006.01)  
*A01P 21/00* (2006.01)  
*C11B 1/10* (2006.01)  
*A23K 1/14* (2006.01)  
*A23J 1/14* (2006.01)  
*A23L 1/20* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

### (54) СОЕВОЕ СОБЫТИЕ SYHT0H2, А ТАКЖЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ

- (31) 61/423,131; 61/467,621  
(32) 2010.12.15; 2011.03.25  
(33) US  
(43) 2014.08.29  
(86) PCT/US2011/064143  
(87) WO 2012/082548 2012.06.21  
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЗИНГЕНТА ПАРТИСИПЕЙШНС АГ  
(CH)**  
(72) Изобретатель:  
**Хипскинд Джон, Бёрджин Кристина,  
Джейн Ракен, Терпстрап Каролин,  
Сигарева Марина, Дефрамон Анник,  
Брейтингер Бекки, Крамер Ванс, Гу  
Вэйнин (US)**  
(74) Представитель:  
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,  
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,  
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,  
Кузнецова Е.В. (RU)**

- (56) US-A1-20030176284  
US-A1-20100099859  
WO-A2-2008150473  
US-A1-20100197503  
US-B1-6268549  
US-A1-20040058427

LIU et al. "Single-site Mutations in the Carboxyltransferase Domain of Plastid Acetyl-CoA Carboxylase Confer Resistance to Grass-Specific Herbicides" Proceedings of the National Academy of Sciences. 27 February 2007 (27.02.2007), vol. 104, No. 9, pgs. 3627-3632 entire document

DUFOURMANTEL et al. "Generation and Characterization of Soybean and Marker-Free Tobacco Plastid Transformants Over-Expressing a Bacterial 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase which Provides Strong Herbicide Tolerance" Plant Biotechnology Journal. (2007), vol. 5, pgs. 118-133 entire document

- (57) Соевые растения, содержащие событие SYHT0H2, способы его обнаружения и применения, и соевые растения, содержащие гетерологичную вставку в том же сайте, что и SYHT0H2.

B1

031999

031999  
B1

### **Область изобретения**

Настоящее изобретение, в целом, относится к трансгенным растениям с устойчивостью к гербицидам. В частности, настоящее изобретение предоставляет соевые растения, которые включают трансформационное событие SYHT0H2, которое придает устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD и к глюфосинату. Также предоставляются способы обнаружения трансформационного события SYHT0H2 и способы применения раскрытых растений и частей растения.

### **Предпосылки изобретения**

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

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

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

### **Краткое описание настоящего изобретения**

Настоящее изобретение относится к соевому растению или его части, где растение или часть растения содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 и которое продуцирует диагностику ампликона для события SYHT0H2. Также предлагаются соевые продукты, полученные из соевого растения или части соевого растения.

Настоящее изобретение также предоставляет изолированные нукleinовые кислоты, которые являются диагностическими для соевого события SYHT0H2, например любую из SEQ ID NO: 1-6 и 9-10 или ее диагностические фрагменты.

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

Кроме того, предлагаются способы идентификации события SYHT0H2 в образце. В одном аспекте настоящего изобретения способ включает в себя этапы: (а) контактирования образца с первым и вторым

праймерами и (b) амплификации нуклеиновой кислоты, содержащей специфический участок SYHT0H2. В другом аспекте настоящего изобретения способ включает (а) контактирование образца по меньшей мере с одним зондом нуклеиновой кислоты, который гибридизуется в жестких условиях со специфическим участком SYHT0H2, и (b) обнаружение гибридизации по меньшей мере одного зонда нуклеиновой кислоты со специфическим участком SYHT0H2.

Также предлагаются способы получения соевого растения, устойчивого к ингибитору HPPD и/или глюфосинату, включающие введение в геном события SYHT0H2 соевого растения. Также предоставляются способы получения продуктов из сои с использованием таких растений.

Также предлагаются способы борьбы с сорняками в месте, содержащем соевые растения и сорняки, где соевые растения включают событие SYHT0H2, и где способ включает применение к месторасположению сорняков контрольного количества гербицидной композиции, содержащей один или несколько ингибиторов HPPD.

Также предлагаются способы повышения урожайности сои с использованием события SYHT0H2.

Также предлагаются способы борьбы с самосевными сельскохозяйственными растениями SYHT0H2 в месторасположении, где способ включает применение к месторасположению одного или нескольких гербицидов, эффективных в отношении соевых бобов и имеющих способ действия помимо ингибирования HPPD.

Также предлагаются способы борьбы с трансгенными событиями самосевов в месте, содержащем SYHT0H2 сельскохозяйственных растений, где события самосевов включают устойчивость к одному или нескольким гербицидам, но не включают устойчивость к ингибиторам HPPD, причем способ включает применение к месторасположению контрольного количества гербицидной композиции, содержащей один или несколько ингибиторов HPPD.

Также предлагаются способы применения гербицидных смесей к местоположению, где гербицидная смесь содержит ингибитор HPPD и по меньшей мере один дополнительный химикат, который возможно не является толерантным к SYHT0H2, с целью борьбы с вредителями (сорняками, болезнями, насекомыми, нематодами), где наличие события SYHT0H2 позволяет применять эту смесь либо до посадки, либо до всходов посредством защиты от остаточной активности HPPD. Также предлагается хромосомный целевой сайт сои для встраивания гетерологичной нуклеиновой кислоты, который соответствует месту встраивания события SYHT0H2. Также предлагаются соевые растения, части растений, а также товарные продукты, включающие гетерологичные нуклеиновые кислоты в хромосомном сайте события SYHT0H2, и способы их получения.

#### Краткое описание чертежа

Чертеж представляет собой изображение бинарного вектора 15954, содержащего соевый кодоноптимизированный Avena HPPD ген.

#### Краткое описание последовательностей в перечне последовательностей

Таблица 1

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

#### Подробное описание настоящего изобретения

Представляются композиции и способы, связанные с трансгенными растениями, устойчивыми к ингибитору HPPD. Композиции по настоящему изобретению включают соевые растения и части соевых растений, содержащие событие SYHT0H2, пищевые и кормовые продукты, полученные из них, а также реагенты для их обнаружения. Соевое растение, содержащее событие SYHT0H2, создали путем вставки

мутантного гена HPPD, полученного из *Avena* и гена фосфинотрицин ацетилтрансферазы из *S. Viridochromogenes*, как описано в примере 1.

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

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

Композиции дополнительно включают семена, внесенные в депозит № РТА-11226 Американской коллекции типовых культур (ATCC), а также растения, растительные клетки и семена, полученные из них. Заявитель внес депозит в размере не менее 2500 семян соевого события SYHT0H2 в ATCC, Манасас, Вирджиния 20110-2209 США, 21 июля 2010 г., и депозитам присвоили № РТА-11226 ATCC. Данные депозиты будут сохранены в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

В контексте данного документа термин "соя" означает *Glycine max* и включает в себя все сорта растений, которые могут быть выведены из сои. В контексте данного документа термин "растение" включает растительные клетки, органы растений, растительные протопласти, клеточные тканевые культуры растения, из которых растения могут быть восстановлены, каллус на растении, купы растений и растительные клетки, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как зародыши, пыльца, семяпочки, семена, листья, цветы, плоды, стебли, корни, корневые кончики, пыльники и тому подобное. Зерно означает зрелые семена, полученные фермерами-коммерсантами для отличных от выращивания или воспроизведения видов целей. Потомство, варианты и мутанты восстановленных растений включают в объем настоящего изобретения при условии, что эти части содержат событие SYHT0H2.

Композиции по изобретению дополнительно содержат продукт, как например пищевой или кормовой продукт, содержащий один или несколько из следующих продуктов соевого растения, содержащего событие SYHT0H2 или полученный из них: лецитин, жирные кислоты, глицерин, стерин, пищевое масло, обезжиренные соевые хлопья, соевые блюда, включая обезжиренные и поджаренные соевые блюда, соевое молоко, творог, тофу, соевую муку, соевый белковый концентрат, изолированный соевый белок, гидролизованный растительный белок, текстурированный соевый белок и волокна соевого белка.

Трансгенное "событие" получают путем трансформации растительных клеток конструкций(ями) гетерологичной ДНК, включая экспрессионную кассету нуклеиновой кислоты, которая содержит целевой трансген, регенерацию популяции растений, полученную в результате введения трансгена в геном растения, а также выбор определенного растения, характеризующийся вставкой в определенное место генома. Событие характеризуется фенотипически экспрессией трансгена(ов). На генетическом уровне событие является частью генетического строения растения. Термин "событие" относится к потомству, полученному путем генеративного ауткрессинга между трансформантом и другим сортом, который включает гетерологичную ДНК. Даже после повторного обратного скрещивания с рекуррентным родителем вставленная ДНК и фланкирующая ДНК из трансформированного родителя присутствуют в потомстве, полученном в результате скрещивания в том же хромосомном месторасположении. Термин "событие" относится к ДНК из первичного трансформанта, содержащего вставленную последовательность ДНК и фланкирующую последовательность ДНК, непосредственно примыкающие к встроенной ДНК, которая, как ожидается, будет передана потомству, которое получает встроенную ДНК, в том числе целевой трансген в результате генеративного скрещивания одной родительской клеточной линии, которая включает встроенную ДНК (например, первичный трансформант и потомство, полученное в результате самоопыления), и родительской клеточной линии, не содержащей вставленную ДНК.

Среднюю величину и распределение толерантности к гербициду или уровня устойчивости ряда основных трансформационных событий растения оценивают стандартным способом, основанным на повреждении растений, меристематических симптомах обесцвечивания и т.д. в диапазоне различных концентраций того или иного гербицида. Эти данные могут быть выражены в терминах, например, GR50 значений, полученных из кривых дозовой зависимости, имеющих "дозу", нанесенную на ось X, и "процент уничтожения", "гербицидное действие", "количество новых зеленых растений" и т.д., нанесенные на

ось Y, где повышенные GR50 значения соответствуют повышенным уровням наследственной толерантности к ингибитору (например, повышенное  $K_i/K_{m_{HPP}}$  значение) и/или уровню экспрессии экспрессируемого HPPD полипептида.

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

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

Растение, содержащее событие SYHT0H2 может быть выведено с помощью первого генеративного скрещивания первого родительского соевого растения, выращенного из трансгенного соевого растения SYHT0H2, и второго родительского соевого растения, которому не хватает фенотипа толерантности к гербициду, получая вследствие этого некоторое количество первого потомства растений; а затем отбора первого потомства растения, которое проявляет требуемую толерантность к гербициду и самоопыления первого потомства растений, получая вследствие этого некоторое количество второго потомства растений, а затем отбора из второго потомства растений, которые проявляют требуемую толерантность к гербициду. Эти этапы могут дополнительно включать обратное скрещивание устойчивого к гербицидам потомства растения со вторым родительским соевым растением или третьим родительским соевым растением, тем самым получая соевое растение, которое проявляет требуемую толерантность к гербициду. Также признают, что анализ потомства на фенотип не требуется. Различные способы и композиции, раскрыты в других местах данного документа, могут быть использованы для обнаружения и/или идентификации события SYHT0H2.

Известно, что два различных трансгенных растения могут быть генеративно скрещенными с получением потомства, которое содержит два независимо сегрегирующих добавленных экзогенных гена. Путем самоопыления соответствующего потомства можно получить растения, которые являются гомозиготными для обоих добавленных экзогенных генов. Обратное скрещивание с родительским растением и ауткроссинг с нетрансгенным растением рассматриваются как вегетативное размножение. Описание других способов селекции, которые обычно используются для различных признаков и культур, могут быть найдены в одной из нескольких ссылок, например Fehr, в Breeding Methods for Cultivar Development, 1987, Wilcos, J. (ed.), Американсское агрономическое общество, Мадисон, Висконсин.

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

"Линия" или "штамм" является группой индивидуумов одинакового происхождения, которые обычно являются инбредными до некоторой степени и которые обычно являются изогенными или близкими к изогенным.

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

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

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

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

В некоторых аспектах настоящего изобретения полинуклеотид, сообщающий событие SYHT0H2, сконструирован в молекулярном наборе. В других аспектах молекулярный набор дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный полинуклеотид, который придает толерантность к третьему гербициду. Например, последовательность может придавать толерантность к глифосату, при этом последовательность может включать EPSPS.

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

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

Примеры полинуклеотидов, которые можно состыковать с полинуклеотидами настоящего изобретения, кодирующими мутантный HPPD полипептид или его вариант, который сохраняет HPPD ферментативную активность, включают полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, сообщающие устойчивость к вредителям/патогенам, таким как вирусы, нематоды, насекомые или грибы и тому подобным. Примеры полинуклеотидов, которые можно состыковать с полинуклеотидами настоящего изобретения, включают полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, обладающие пестицидной и/или инсектицидной активностью, такие как токсичные белки *Bacillus thuringiensis* (описанные в патентах США №№ 5366892; 5747450; 5737514; 5723756 и 5593881; Geiser et al., Gene, 1986, 48:109), лектины (Van Damme et al., Plant Mol. Biol, 1994, 24:825), пентин (описанные в патенте США № 5981722) и тому подобные; признаки, желательные для устойчивости к болезням или к гербицидам (например, гены нейтрализации фумонизина (патент США № 5792931); гены невирулентности и устойчивости к болезням (Jones et al., Science, 1994, 266:789; Martin et al., Science, 1993, 262:1432; Mindrinos et al., Cell, 1993, 78:1089); мутанты ацето-лактатсингазы (ALS), которые приводят к устойчивости к гербицидам, такие как S4 и/или Hra мутации (устойчивость к гербицидам, включая сульфонилмочевины, имидазолиноны, триазолопиримидины, пиримидинил тиобензоаты); ген устойчивости к глифосату (например, ген 5-энол-пировил-шикимат-3-фосфат-сингазы (EPSPS), включая, но не ограничиваясь описанными в патентах США №№ 4940935, 5188642, 5633435, 6566587, 7674598, а также во всех связанных заявках, или ген глифосат N-ацетилтрансферазы (GAT), описанный в Castle et al., Science, 2004, 304:1151-1154, а также в опубликованных патентных заявках США №№ 20070004912, 20050246798 и 20050060767); устойчивость к глюфосинату (например, BAR, см., например, патент США № 5561236); устойчивость к 2,4-Д (например, арилоксиалканоата диоксигеназа или AAD-1, AAD-12 или AAD-13), устойчивость к HPPD (например, *Pseudomonas* HPPD) и устойчивость к PPO (например, фомезафен, ацифлуорфен-натрий, оксифлуорфен, лак-

тофен, флутиацет-метил, сафлуфенацил, флумиоксазин, флумиклорак-пентил, карфентразон-этил, сульфентразон); цитохром Р450 или его вариант, который придает устойчивость к гербицидам или устойчивость, в частности, к HPPD-ингибиторам гербицидам, РРО-ингибиторам гербицидам и ALS-ингибиторам гербицидам (опубликованная патентная заявка США № 20090011936; патенты США №№ 6380465; 6121512; 5349127; 6649814 и 6300544; а также международная публикация согласно РСТ № WO 2007/000077); устойчивость к дикамбе (например, дикамба монооксигеназной) и признаки, желательные для обработки или переработки продуктов, таких как продукты с высоким содержанием масла (например, патент США № 6232529); модифицированные масла (например, гены десатуразы жирной кислоты (патент США № 5952544, международная публикация согласно РСТ № WO 94/11516), модифицированные крахмалы (например, ADPG-пироfosфорилазы (AGPase), крахмал-сингтазы (SS), ветвящий фермент крахмала (SBE) и деветвящие ферменты крахмала (SDBE)), а также полимеры или биопластик (например, патент США № 5602321; бета-кетотиолаза, полигидроксибутират сингтазы и ацетоацетил-CoA-редуктаза (Schubert et al., J. Bacteriol., 1988, 170:5837-5847) облегчают экспрессию полиоксиалканоатов (PHAs)), раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения событие SYHT0H2 состыковывают с одним или несколькими полинуклеотидами, кодирующими полипептиды, которые придают устойчивость или толерантность к гербицидам, таким как ингибитор HPPD, глифосат, 2,4-Д, дикамба или глюфосинат.

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

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

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

Другие примеры признаков толерантности к гербициду, которые могут быть объединены с событием SYHT0H2, включают признаки, придающие толерантность по меньшей мере к одному гербициду в растении, таком как, например, соевое растение или мелколепестник канадский. Толерантные к гербицидам сорняки известны в данной области техники как растения, которые различаются в своей толерантно-

сти к определенным гербицидам (см., например, Green & Williams, "Correlation of Corn (*Zea mays*) Inbred Response to Nicosulfuron and Mesotrione", представленный на ежегодном собрании WSSA в Канзас-Сити, Миссури, 9-12 февраля 2004 года; Green (1998) Weed Technology 12: 474-477; Green & Ulrich, Weed Science 2003, 41:508-516). Признаки, ответственные за эти толерантности, могут быть объединены с помощью скрещивания или с помощью других способов с событием SYHT0H2 с получением растения по настоящему изобретению, а также способов его применения.

Описанные выше гены могут быть генетически сконструированы в событии SYHT0H2 или объединены с событием SYHT0H2 с помощью набора для скрещивания с новым или существующим событием, придавая толерантность одному из вышеупомянутых генов. Возможные события для использования в наборе для скрещивания включают, но не ограничиваются ими: MON89788 - толерантность к глифосату (патент США № 7632985 и связанные заявки и патенты), MON87708 - толерантность к дикамбе (опубликованная патентная заявка США № 2011/0067134 и связанные заявки и патенты), DP-356043-5 - толерантность к глифосату и ALS (опубликованная патентная заявка США № 2010/0184079 и связанные заявки и патенты), A2704-12 - толерантность к глюфосинату (опубликованная патентная заявка США № 2008/0320616 и связанные заявки и патенты), толерантность к DP-305423-1 - толерантность к ALS (опубликованная патентная заявка США № 2008/0312082 и связанные заявки и патенты), толерантность к A5547-127-глюфосинату (опубликованная патентная заявка США № 2008/0196127 и связанные заявки и патенты), толерантность к DAS-40278-9 - 2,4-дихлорфеноксикусной кислоте и арилоксиленоксипропионату (международная публикация согласно РСТ № WO 2011/022469, WO 2011/022470, WO 2011/022471 и связанные заявки и патенты), толерантность к 127-ALS (международная публикация согласно РСТ № WO 2010/080829 и связанные заявки и патенты), толерантность к GTS 40-3-2-глифосату, толерантность к DAS-68416-4 - 2,4-дихлорфеноксикусной кислоте и глюфосинату, толерантность к FG72-глифосату и изоксафлутолу, толерантность к BPS-CV127-9 - ALS и толерантность к GU262-глюфосинату, толерантность к SYHT04R-HPPD.

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

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

В другом аспекте настоящего изобретения событие SYHT0H2 может быть объединено с Rcg1 последовательностью или биологически активным вариантом или его фрагментом. Rcg1 последовательность является геном устойчивости к антракнозной гнили стебля в кукурузе (см., например, опубликованные патентные заявки США №№ 20060225151, 20060223102 и 20060225152, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки).

Описанные выше состыкованные комбинации можно создавать любым способом, включая, но не ограничиваясь ими, разведение растений с помощью любой традиционной или TopCross методологии или генетической трансформации. В случае если последовательности состыковываются посредством

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

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

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

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

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

"Трансляционная лидерная последовательность" относится к нуклеотидной последовательности, расположенной между промоторной последовательностью гена и кодирующей последовательностью. Трансляционная лидерная последовательность присутствует в полностью обработанной мРНК выше последовательности инициации трансляции. Трансляционная лидерная последовательность может влиять

на многочисленные параметры, включая процессинг первичных транскриптов в мРНК, стабильность мРНК и/или эффективность трансляции. Примеры трансляционных лидерных последовательностей были описаны (Turner & Foster, Mol. Biotechnol., 1995, 3:225-236). "3' некодирующие последовательности" относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным ниже кодирующей последовательности, и включают последовательности распознавания полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные воздействовать на процессинг мРНК или экспрессию генов. Сигнал полиаденилирования обычно характеризуется влиянием на добавление участков полиадениловой кислоты к 3'-концу предшественника мРНК. Использование различных некодирующих 3'-последовательностей иллюстрируется Ingelbrecht et al., Plant Cell, 1989, 1:671-680.

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

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

Предлагаются изолированные полинуклеотиды, которые могут быть использованы в различных способах обнаружения и/или определения соевого события SYHT0H2. "Изолированный" или "очищенный" полинуклеотид или его биологически активная часть является в значительной степени или практически свободной от компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с полинуклеотидом в его природной среде. Таким образом, изолированный или очищенный полинуклеотид практически свободен от другого клеточного материала или среды для культивирования при продуцировании рекомбинантными способами или практически свободен от химических предшественников или других химических веществ в случае, если он химически синтезирован. Оптимально "изолированный" полинуклеотид является свободным от последовательностей (оптимально кодирующих белок последовательностей), которые естественным образом flankируют полинуклеотид (например, последовательности, расположенные на 5' и 3' концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которой полинуклеотид происходит. Например, в различных аспектах изобретения выделенный полинуклеотид может содержать менее чем приблизительно 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 или 0.1 kb нуклеотидной последовательности, которая естественным образом flankирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой происходит этот полинуклеотид. Во избежание неясности "изолированная" последовательность все еще может быть в окружении другой ДНК либо *in vitro*, либо *in vivo* и может, например, встречаться в трансгенной клетке или организме.

В определенных аспектах настоящего изобретения полинуклеотиды содержат соединение ДНК последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-6. В других аспектах настоящего изобретения полинуклеотиды включают ДНК последовательности, представленные в SEQ ID NO: 11-12, а также их варианты и фрагменты. Фрагменты и варианты соединения ДНК последовательностей являются подходящими для дифференциально идентифицированного события SYHT0H2. Как обсуждалось в других местах данного документа, такие последовательности находят применение в качестве праймеров и/или зондов.

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

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

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

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

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

Специфические праймеры могут быть использованы для амплификации фрагмента интеграции с получением ампликона, который можно использовать в качестве "специфического зонда" или могут самообнаруживаться для идентификации события SYHT0H2 в биологических пробах. В качестве альтернативы зонд может быть использован в ходе реакции PCR с целью создания возможности для обнаружения амплификационного события (то есть TAKMAN® зонд или MGB™ зонд) (так называемая PCR в режиме реального времени). Когда зонд гибридизуют с полинуклеотидами биологического образца при условиях, которые создают возможность для связывания зонда с образцом, это связывание может быть обнаружено, и таким образом обеспечивают указание на наличие события SYHT0H2 в биологическом образце. Такая идентификация связанного зонда была описана в данной области. В одном аспекте настоящего изобретения специфический зонд представляет собой последовательность, которая при оптимальных условиях специфично гибридизируется с участком в 5'- или 3'-фланкирующей области события и содержит часть чужеродной ДНК, смежной с ним. Специфический зонд может содержать последовательность по меньшей мере с 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95% и от 95 до 100% идентичностью (или комплементарностью) со специфическим участком события SYHT0H2.

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

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

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

"Трансформация" относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном организма-хозяина, приводящему в результате к генетически стабильной наследственности. Организмы-хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновой кислоты, называют "трансгенными" организмами. Примеры способов трансформации растений включают трансформацию, опосредованную агробактериями (De Blaere et al., Meth. Enzymol., 1987, 143:277), а также технологии, ускоренной частица-

ми трансформации или "генной пушки" (Klein et al., *Nature*, 1987, 327:70-73; патент США № 4945050, включенный в данный документ посредством ссылки). Дополнительные способы преобразования представлены ниже.

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

Предоставляются различные способы и композиции для идентификации события SYHT0H2. Такие способы находят применение в идентификации и/или обнаружении события SYHT0H2 в любом биологическом материале. Такие способы включают, например, способы подтверждения чистоты семян и способы скрининга семян в партии семян для события SYHT0H2. В одном аспекте настоящего изобретения предложенный способ идентификации события SYHT0H2 в биологическом образце включает контактирование образца с первым и вторым праймерами, а также амплификацию полинуклеотида, содержащего специфический участок SYHT0H2.

Биологический образец может включать любой образец, в котором требуется определить наличие ДНК, имеющей событие SYHT0H2. Например, биологический образец может содержать любой растительный материал или материал, содержащийся в растительном материале или полученный из растительного материала, такого как, но не ограничиваясь ими, пищевые или кормовые продукты. В контексте данного документа "растительный материал" означает материал, который добыт или получен из растения или части растения. В конкретных аспектах изобретения биологический образец содержит соевую ткань.

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

Относительно амплификации целевого полинуклеотида (например, посредством PCR) с использованием конкретной пары праймеров амплификации "жесткие условия" представляют собой условия, которые позволяют паре праймеров гибридизоваться с целевым полинуклеотидом, к которому праймер, имеющий соответствующую последовательность дикого типа (или ее комплемент), будет создавать идентифицируемый продукт амплификации (ампликон), имеющий специфический участок SYHT0H2 в реакции термической амплификации ДНК. В случае PCR подхода, олигонуклеотидные праймеры могут предназначаться для использования в реакциях PCR для амплификации специфического участка SYHT0H2. Способы конструирования праймера для PCR и PCR-клонирования, как правило, известны в данной области и описаны в Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York; Innis et al. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 1990, Academic Press, New York; Innis & Gelfand (eds.), *PCR Strategies*, 1995, Academic Press, New York; и Innis & Gelfand (eds.), *PCR Methods Manual*. 1999, Academic Press, New York. Способы амплификации также описаны в патентах США №№ 4683195 и 4683202 и в Chen et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91:5695-5699. Данные способы амплификации ДНК, а также другие способы амплификации ДНК, известные в данной области, могут быть использованы в практической реализации других аспектов изобретения. Понятно, что ряд параметров в специфическом протоколе PCR может требовать адаптации к конкретным условиям лаборатории и может быть незначительно модифицирован, при этом все же обеспечить получение аналогичных результатов. Данные корректировки будут очевидны для специалистов в данной области.

Амплифицированный полинуклеотид (ампликон) может быть любой длины, которая создает возможности для обнаружения события SYHT0H2 или специфического участка SYHT0H2. Например, ампликон может быть приблизительно 10, 50, 100, 200, 300, 500, 700, 100, 2000, 3000, 4000, 5000 нуклеотидов в длину или длиннее.

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

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

Таким образом, в конкретных аспектах настоящего изобретения предлагается способ определения наличия соевого события SYHT0H2 или его потомства в биологическом образце. Способ включает в себя (а) извлечение образца ДНК из биологического образца, (б) получение пары молекул ДНК-праймера (например, любого сочетания SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21, и/или используемых фрагментов SEQ ID NO: 10 или ее комплемента, где сочетание амплифицирует специфический участок события SYHT0H2), включая, но не ограничиваясь ими, (i) праймеры, содержащие последовательности SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, (ii) праймеры, содержащие последовательности SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, (iii) праймеры, содержащие последовательности SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, (iv) праймеры, содержащие последовательности SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19, (v) праймеры, содержащие последовательности SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20, и (vi) праймеры, содержащие последовательности SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 21, (c) обеспечение условий для реакции амплификации ДНК, (d) выполнение реакции амплификации ДНК с получением таким образом молекулы ДНК ампликона и (e) обнаружение молекулы ДНК ампликона, где обнаружение молекулы ампликона ДНК в реакции амплификации ДНК указывает на нали-

чие соевого события SYHT0H2. Для того чтобы молекула нуклеиновой кислоты служила в качестве праймера или зонда, она должна быть только достаточно комплементарной в последовательности, чтобы быть способной образовывать стабильную двухщечечную структуру при определенном задействованном растворителе и определенных задействованных концентрациях солей.

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

В контексте данного документа в значительной степени идентичная или комплементарная последовательность представляет собой полинуклеотид, который будет специфически гибридизоваться с комплементом молекулы нукleinовой кислоты, с которой она сравняется в условиях высокой жесткости. Подходящие жесткие условия, которые способствуют ДНК-гибридизации, например 6X хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующей отмычкой в 2XSSC при 50°C, известны специалистам в данной области техники или могут быть найдены в Ausel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 1989, John Wiley & Sons, NY, 6.3.1-6.3.6. Как правило, жесткими условиями гибридизации и обнаружения будут те, в которых концентрация солей составляет менее чем приблизительно 1,5M Na<sup>+</sup> ион, обычно приблизительно от 0,01 до 1,0M Na<sup>+</sup> концентрация ионов (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, более чем 50 нуклеотидов).

Жесткие условия могут быть достигнуты при добавлении дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Типичные условия низкой жесткости включают гибридизацию с буферным раствором в 30-35%-ном формамиде, 1M NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрия) при 37°C и отмычку в IX-2X SSC (20X SSC=3,0M NaCl/0,3M тринатрийцитрат) при 50-55°C. Типичные условия средней жесткости включают гибридизацию в 40-45%-ном формамиде, 1,0M NaCl, 1% SDS при 37°C и отмычку в 0,5 X-IX SSC при 55-60°C. Типичные условия высокой жесткости включают гибридизацию в 50%-ном формамиде, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и отмычку в 0,1 X SSC при 60-65°C. Дополнительно, отмычочные буферы могут содержать от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% SDS. Продолжительность гибридизации обычно составляет менее приблизительно 24 ч, обычно от приблизительно 4 до приблизительно 12 ч. Продолжительность отмычки будет равна, по меньшей мере, периоду времени, достаточному для достижения равновесия.

В реакциях гибридизации специфичность является, как правило, функцией послегибридизационных отмылок, причем критическими факторами являются ионная сила и температура конечного отмычочного раствора. Для ДНК-ДНК гибридов Tm может быть приближена из уравнения Meinkoth & Wahl, Anal. Biochem., 1984, 138:267-284:  $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{форм.}) - 500/L$ , где M представляет собой молярность одновалентных катионов, %GC представляет собой процент нуклеотидов гуанозина и цитозина в ДНК, % форм. представляет собой процент формамида в растворе для гибридизации, и L представляет собой длину гибрида в парах оснований. Tm представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной целевой последовательности гибридизируется с идеально подходящим зондом. Tm уменьшается приблизительно на 1°C на каждый 1% несоответствия, таким образом, Tm, гибридизацию и/или условия отмычки можно регулировать для гибридизации до последовательностей нужной идентичности. Например, если добиваются последовательностей с >90% идентичностью, Tm может быть уменьшена на 10°C. Обычно выбирают жесткие условия, которые примерно на 5°C ниже, чем температура точки плавления (Tm) для конкретной последовательности и ее комплемента при определенной ионной силе и pH.

Тем не менее, в очень жестких условиях возможно использование гибридизации и/или отмычки при температуре на 1, 2, 3 или 4°C ниже, чем температура точки плавления (Tm), в умеренно жестких условиях возможно использование гибридизации и/или отмычки при температуре на 6, 7, 8, 9 или 10°C ниже, чем температура точки плавления (Tm); в условиях низкой жесткости возможно использование гибридизации и/или отмычки при температуре на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже, чем температура точки плавления (Tm). Используя уравнение, композиции для гибридизации и отмычки и нужную Tm, специалисты

поймут, что вариации жесткости растворов для гибридизации и/или для отмычки, по сути, описаны выше. Если требуемая степень несоответствия дает в результате  $T_m$  менее чем  $45^{\circ}\text{C}$  (водный раствор) или  $32^{\circ}\text{C}$  (раствор формамида), оптимальным является увеличение концентрации SSC, с тем чтобы более высокая температура могла быть применена. Подробное руководство к гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 1993, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY; Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Chapter 2, Greene Publishing и Wiley-Interscience, NY; Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY), а также Haymes et al., In: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, 1985, IRL Press, Washington, DC.

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

Настоящее изобретение далее относится к способам обнаружения присутствия ДНК, соответствующей событию SYHT0H2 в образце. В одном аспекте настоящего изобретения способ включает (а) контактирование биологического образца с полинуклеотидным зондом, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации с ДНК из соевого события SYHT0H2 и специфично обнаруживает событие SYHT0H2, (б) подвергание образца и зонда жестким условиям гибридизации, а также (с) определение гибридизации зонда с ДНК, где определение гибридизации указывает на наличие события SYHT0H2. В одном аспекте настоящего изобретения ДНК предварительно обрабатывают соответствующими ферментами до гибридизации события.

Для обнаружения специфического участка SYHT0H2 или его ампликона могут быть использованы различные способы, включая, но не ограничиваясь ими, генетический анализ бита (Nikiforov et al., Nucleic Acid Res., 1994, 22: 4167-4175). В одном способе разработан ДНК-олигонуклеотид, который перекрывает обе соседние фланкирующие последовательности ДНК и вставленные ДНК-последовательности. В других вариантах осуществления настоящего изобретения ДНК олигонуклеотиды предназначены для представления специфического ампликона SYHT0H2. Олигонуклеотид иммобилизуют в лунках микролуночного планшета. Следом за PCR целевого участка одноцепочечный PCR-продукт может быть гибридизирован с иммобилизованным олигонуклеотидом и служить в качестве шаблона для реакции достройки цепи на одно основание с помощью ДНК-полимеразы и маркированного ddNTPs, специфичных для заданного следующего основания. Считывание может быть флуоресцентным или основаным на ELISA. Сигнал указывает на наличие вставленной/фланкирующей последовательности, возникшей в результате успешной амплификации, гибридизации и удлинения цепи на одно основание.

Другим способом обнаружения является методика пиросеквенирования, описанная в Winge, Innov. Pharma. Tech., 2000, 00:18-24. В этом способе используют олигонуклеотид, предназначенный перекрывать смежную ДНК и вставленное ДНК соединение или пару олигонуклеотидов, которые могут амплифицировать специфический участок SYHT0H2. Олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечным продуктом PCR целевого участка (один праймер во вставленной последовательности и один во фланкирующей последовательности) и инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы, АТР, сульфурилазы, люциферазы, апиразы, аденоцина 5' фосфосульфата и люциферины. Отдельно добавляют dNTPs, и инкорпорация дает в результате световой сигнал, который измеряют. Световой сигнал указывает на присутствие трансгена вставленной/фланкирующей последовательности, возникшей в результате успешной амплификации, гибридизации и удлинения цепи на одно или несколько оснований.

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

TAQMAN ® (PE прикладные биосистемы, Фостер Сити, Калифорния) описан как способ обнаружения и количественного определения присутствия последовательности ДНК и полностью ясен из инструкции изготовителя. Коротко, создают FRET олигонуклеотидный зонд, который перекрывает фланки-

рующее и вставленное соединение ДНК, или задействуют пару олигонуклеотидов, которые могут амплифицировать специфический участок SYHT0H2. FRET зонд и праймеры для PCR (один праймер во вставленной ДНК последовательности и один во фланкирующей геномной последовательности) циркулируют в присутствии термостабильной полимеразы и dNTPs. Гибридизация FRET зондов приводит к расщеплению и высвобождению флуоресцентной части из гасящей части на FRET зонде. Флуоресцентный сигнал указывает на наличие фланкирующей/трансгенной вставленной последовательности, возникшей в результате успешной амплификации и гибридизации.

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

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

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

В определенных аспектах настоящего изобретения предлагается набор для идентификации события SYHT0H2 в биологическом образце. Набор включает в себя первый и второй праймеры, где первый и второй праймеры амплифицируют полинуклеотид, содержащий специфический участок SYHT0H2. В других аспектах изобретения набор включает полинуклеотид для обнаружения специфического участка SYHT0H2. Набор может содержать, например, первый праймер, содержащий фрагмент полинуклеотида SEQ ID NO: 10 или его комплемент, причем первый или второй праймер имеет достаточную гомологию или комплементарность последовательности к полинуклеотиду для амплификации специфического участка SYHT0H2. Например, пара праймеров может содержать фрагмент SEQ ID NO: 11 и фрагмент SEQ ID NO: 12 или их комплемент. В других аспектах настоящего изобретения первый и второй праймеры могут включать любую из последовательностей или любую комбинацию последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21. Праймеры могут иметь любую достаточную для амплификации участка SYHT0H2 длину, включая, например, по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 или 30 или приблизительно 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 нуклеотидов или длиннее. В некоторых аспектах настоящего изобретения первый и второй праймеры представляют собой SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19 соответственно, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20 соответственно или SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 21 соответственно. Например, указанные выше пары праймеров могут быть использованы для амплификации (a) последовательности, охватывающей LB1 соединение геномной ДНК сои и гетерологичную вставку, содержащую последовательность Avena HPPD (SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 17 и 18; SEQ ID NO: 17 и 19), или (b) последовательности, охватывающей LB2 соединение геномной ДНК сои и гетерологичную вставку, содержащую последовательность Avena HPPD (SEQ ID NO: 14 и 15, SEQ ID NO: 17 и 20, SEQ ID NO: 17 и 21).

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

Любой из полинуклеотидов и его фрагменты и варианты, используемые в способах и композициях, могут иметь идентичность последовательности с участком трансгенной вставки события SYHT0H2, соединением последовательности события SYHT0H2 или фланкирующей последовательностью события SYHT0H2. Известны способы определения взаимосвязи различных последовательностей. В контексте

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

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

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

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

GAP использует алгоритм Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol., 1970, 48:443-453 для нахождения выравнивания двух полных последовательностей, которые максимизируют количество совпадений и минимизируют число пробелов. GAP учитывает все возможные выравнивания и позиции пробела и создает выравнивание с наибольшим количеством совпадающих оснований и наименьшим количеством пробелов. Это создает возможность для введение в действие штрафа за возникновение пробелов и штрафа за

увеличение пробела в частях совпадающих оснований. GAP должен извлечь выгоду от штрафа за возникновение пробелов в ряду совпадений для каждого пробела, который он вставляет. Если выбирают штраф за расширение больше нуля, GAP должен, вдобавок, извлечь выгоду для каждого вставленного пробела в размере длины пробела, умноженной на штраф за увеличение пробела. Значения штрафа за создание пробелов по умолчанию и значения штрафа за увеличение пробела по умолчанию в версии 10 GCG Wisconsin Genetics Software Package для белковых последовательностей равны 8 и 2 соответственно. Для нуклеотидных последовательностей штраф за создание пробелов по умолчанию равен 50, в то время как штраф за увеличение пробела по умолчанию равен 3. Штрафы за создание пробелов и увеличение пробелов могут быть выражены как целое число, выбранное из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 200. Так, например, штрафы за создание пробелов и увеличение пробелов могут быть 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или больше.

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

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

В контексте данного документа "процент идентичности последовательности" означает значение, определенное путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывается путем определения числа позиций, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или идентичный аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях для получения числа совпадающих позиций, деля некоторое количество совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножая результат на 100 для получения процента идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к способу селективной борьбы с сорняками в месторасположении (то есть в области культивирования), содержащем культурные растения и сорняки, где культурные растения содержат SYHTOH2, при этом способ включает применение к месторасположению сорняков контролируемого количества гербицидной композиции, содержащей один или несколько HPPD ингибирующих гербицидов.

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

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

Способы включают засадку обрабатываемых земель соевыми семенами или растениями с

SYHT0H2, а в определенных аспектах настоящего изобретения применение к сельскохозяйственной культуре, семенам, сорнякам или их обрабатываемым землям борющемся с сорняками количества целевого гербицида. Признают, что гербициды могут быть применены до или после посадки сельскохозяйственной культуры в обрабатываемые земли. Такое применение гербицидов может включать применение ингибитора HPPD отдельно или в сочетании с другими гербицидами, которые переносятся сельскохозяйственным растением. Специалисту в данной области будет понятно, что борющееся с сорняками количество будет изменяться, например, в зависимости от типа и времени применения гербицида(ов), но прививается к количеству, которое обеспечивает желаемые уровни борьбы с сорняками, при этом не вызывая повреждений либо вызывая незначительные повреждения культурного растения. Для HPPD ингибирующего гербицида количество будет, как правило, от 15 до 500 г/га.

В другом аспекте изобретения гербицидная композиция содержит по меньшей мере два ингибитора HPPD. Ингибиторы HPPD могут быть применены в любой эффективной дозе, которая избирательно борется с сорняками и не приводит к существенному повреждению культурного растения.

В одном конкретном аспекте изобретения ингибитор HPPD выбран из группы, состоящей из бензобициклиона, бициклического, мезотриона, сулфотриона, темботриона, кетоспиратонса или его свободной кислоты, бензофенона, пирасульфотола, пиразолината, пиразоксифена, топрамезона, [2-хлор-3-(2-метокситетокси)-4-(метилсульфонил)фенил](1-этил-5-гидрокси-1Н-пиразол-4-ил)метанона, (2,3-дигидро-3,3,4-триметил-1,1-циоксидобензо[б]тиен-5-ил)(5-гидрокси-1-метил-1Н-пиразол-4-ил)метанона, изоксахлортола, изоксафлутола,  $\alpha$ -(циклогексилкарбонил)-2-(метилсульфонил)- $\beta$ -оксо-4-хлорбензенепропаненитрила и  $\alpha$ -(циклогексилкарбонил)-2-(метилсульфонил)- $\beta$ -оксо-4-(трифторметил)-бензенепропаненитрила или его подходящей в области сельского хозяйства соли. В особенно предпочтительном варианте ингибитором HPPD является мезотрион. В особенно предпочтительном варианте ингибитором HPPD является темботрион. В особенно предпочтительном варианте ингибитором HPPD является бициклический. В особенно предпочтительном варианте ингибитором HPPD является изоксафлутол. В особенно предпочтительном варианте ингибитором HPPD является пирасульфатол. В особенно предпочтительном варианте ингибитором HPPD является топрамезон.

Соевые растения, содержащие событие SYHT0H2 могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных участков полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, которые придают устойчивость к одному или нескольким дополнительным гербицидам, насекомым, грибковым, бактериальным и/или вирусным инфекциям. Примеры полипептида(ов), который придает устойчивость к гербицидам, включают, например, толерантную к глифосату 5-енол-пирувилшикимат-3-фосфат-синтазу (EPSPS) (например, раскрытою в патентах США №№ 5804425 и 6566587), глифосат N-ацетил трансферазу (GAT) (например, раскрытою в WO 02/036782), толерантную к гербицидам 4-гидроксипиридулдиоксигеназу (HPPD) (например, раскрытою в WO 02/46387), фосфинотрицин-ацетилтрансферазу (PAT) (например, раскрытою в патенте США 5273894), цитохром P450 (например, раскрытым в международной публикации согласно РСТ № WO 07/103567), глутатион S-трансферазу (GST) (например, раскрытою в международной публикации согласно РСТ № WO 01/21770), толерантную к гербицидам ацетил-КоА-карбоксилазу (ACCase), устойчивую к гербицидам ацетолактатсинтазу (ALS) (например, раскрытою в патенте США № 5013659), толерантную к гербицидам протопорфириноген-оксидазу (PPGO) (например, раскрытою в международной публикации согласно РСТ № WO 95/34659) бромоксиилнитрилазу (например, раскрытою в международной публикации согласно РСТ № WO 89/00193), толерантную к гербицидам фитоенедесатуразу (например, раскрытою в опубликованной европейской заявке № 0393690), арилоксиялканоатдиоксигеназу (например, раскрытою в международных публикациях согласно РСТ № WO 2005/107437 и WO 2007/053482) и дикамбаразрушающие ферменты (например, раскрытое в международной публикации согласно РСТ № WO 98/45424), в том числе известные мутировавшие или иначе модифицированные варианты этих полипептидов.

Соответственно гербицидные композиции, применяемые к месторасположению, могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных пестицидов, к которым соевое растение, содержащее событие SYTH0H2, является толерантным, например нематоцид, инсектицид, фунгицид и/или гербицид. Примеры подходящих пестицидов приведены в Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, 14<sup>th</sup> ed., 2006. Например, пестицид может быть одним или несколькими пестицидами, выбранными из следующих классов инсектицидно, акарицидно, нематоцидно или моллюскицидно активных ингредиентов: аланикарб, алдикарб, бендиокарб, бенфуракарб, бутокарбоксим, бутоксикарбоксим, карбарил, карбофуран, карбосульфан, этиофенкарб, фенобукарб, форметанат, фуратиокарб, изопрокарб, метиокарб, метомил, метолкарб, оксамил, пирамикарб, пропоксур, тиодикарб, тиофанокс, триазамат, триметакарб, ХМС, ксилилкарб; ацефат, азаметифос, азинфос-этил, азинфос-метил, кадусафос, хлорэтоксифос, хлорфенвинфос, хлормефос, хлорпирифос, хлорпирифос-метил, кумофос, цианофос, деметон-S-метил, диазинон, дихлорвос/DVDP, дикротофос, диметоат, диметилвинфос, дисульфотон, EPN, этион, этопрофос, фамфур, фенамифос, фенитротион, фентион, фостиазат, гепетнофос, имисуафос, изофенфос, изопропил-O-(митоксиаминотио-фосфорил)салцилат, изоксатион, малатион, мекарбам, метамидофос, метидатион, мевинфос, монокротофос, налед, ометоат, оксидеметон-метил, паратион, паратион-метил, фентоат, фо-

рат, фозалон, фосмет, фосфамидон, фоксим, пирамифос-метил, профенофос, пропетамфос, протиофос, пираклофос, пиридафентион, квиналфос, сульфотеп, тебутиромфос, темефос, тербуфос, тетрахлорвинфос, тиометон, триазофос, триклорфон, вамиодотион, циклодиен хлорогрганических соединений, хлордан, эндосульфан; этипрол, фипронил, акринатрин, аллэтрин, D-цис-транс-аллэтрин, D-транс-аллэтрин, бифентрин, биоаллэтрин, биоаллэтрин S-изомер циклопентенил, биоресметрин, циклопротрин, цифлутрин, бета-цифлутрин, цигалотрин, лямбда-цигалотрин, гамма-цигалотрин, циперметрин, альфа-циперметрин, бета-циперметрин, тета-циперметрин, зета-циперметрин, цифенотрин [(1R)-транс-изомеры], дельтаметрин, эмпентрин [(EZ)-(1R)-изомеры], эсфенвалерат, этофенпрокс, фенпропатрин, фенвалерат, флуцитринат, флуметрин, тауфлувалинат, халфенпрокс, имипротрин, кадетрин, перметрин, фенотрин [(1R)-транс-изомер], праллэтрин, пиретрин (пиретрум), рецметрин, силафлюофен, тефлутрин, тетраметрин, тетраметрин [(1R)-изомеры], траплометрин, трансфлутрин; ДЦТ; метоксихлор, ацетамиприд, клотианидин, динотефуран, имидаклоприд, нитенпирам, тиаклоприд, тиаметоксам; никотин, спинеторам, спиносад, абамектин, эмамектин бензоат, лепимектин, милбемектин, гидропрен, кинопрен, метопрен; феноксикарб; пирипроксифен, хлорпикрин; сульфурилфторид; бура; антимонил-тартрат калия, пиметрозин; флоникамид, клофентезин, гекситиазокс, дифловидазин, этоксазол. Бактерии *Bacillus thuringiensis* подвида *israelensis*, бактерии *Bacillus sphaericus*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *aizawai*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *kurstaki*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *tenebrionis*, BT-белки сельскохозяйственных культур: Сту1Ab, Сту1Ac, Сту1Fa, Сту2Ab, mСту3A, Сту3Ab, Сту3Bb, Сту34/35Ab1, диафентиурон, азоцилотин, цигексатин, фенбутатин оксид; пропаргит, тетрадифон, хлорфенапир, ДНОК, сульфурамид, бенсультап, картап гидрохлорид, тиоциклам, тиосультап-натрий, бистрифлурон, хлорфлуазурон, дифлубензурон, флуциклоксурон, флуфеноксурон, гексафлумурон, луфенурон, новалурон, новифлумурон, тефлубензурон, трифлумурон, бупрофезин, циромазин, хромафенозид, галофенозид, метоксифенозид, тебуфенозид, амитраз, гидраметилнон; ацеквиноцил; флуакрипирим, феназаквин, фенпироксимат, пирамидифен, пиридабен, тебуфенпирад, толфенпирад, ротенон (*Derris*), индоксакарб; метафлумизон, спиродиклофен, спиромезифен, спиротетрамат, фосфида алюминий, кальция фосфид, фосфин, фосфид цинка, циенопираfen, хлорантранилипирол, флубендиамид, амидофлумет, азадирахтин, бенклотиаз, бензоксимат, бифеназат, бромопропилат, хинометионат, криолит, циантранилипирол (циазипир), цифлуметофен, дикофол, дифловидазин, флуенсульфон, флуфенерим, флуфипрол, флуопирам, фуфенозид, имидаклотиз, ипродион, меперфлутрин, пиридалил, пирифлуквиназон, тетраметилфлутрин, йодметан; продукты на основе *Bacillus firmus* (включая, но не ограничиваясь им, штамм CNCM I-1582, такой как, например, VOTiVO™, BioNem); 3-бром-N-{2-бром-4-хлор-6-[(1-циклогексилкарбамоил)фенил]-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-карбоксамид (известный из WO 2005/077934), 4-[(6-бромпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5Н)-он (известный из WO 2007/115644), 4-[(6-фтор-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино}фуран-2(5Н)-он (известный из WO 2007/115644), 4-[(2-хлор-1,3-тиазол-5-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5Н)-он (известный из WO 2007/115644), 4-[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5Н)-он (известный из WO 2007/115644), флунипидифуруон, 4-[(6-хлор-5-фтор-3-ил)метил](метил)амино}фуран-2(5Н)-он (известный из WO 2007/115643), 4-[(5,6-дихлорпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5Н)-он (известный из WO 2007/115646), 4-[(6-хлор-5-фтор-3-ил)метил]-циклогексил-амино}-фуран-2(5Н)-он (известный из WO 2007/115643), 4-[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-циклогексил-амино}фуран-2(5Н)-он (известный из EP-A-0539588), 4-[(6-хлорпиридин-3-ил)-метил](метил)амино}фуран-2(5Н)-он (известный из EP-A-0539588), {[1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден}цианамид (известный из WO 2007/149134) и его диастереомеры {[1(R)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден}цианамид (А) и {[1(S)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден}цианамид (В) (также известный из WO 2007/149134), а также сульфоксафлор и его диастереомеры [(R)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден]-цианамид (А1) и [(S)-метил-(оксидо){(1S)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден]-цианамид (А2), называемые группой диастереомеров А (известный из WO 2010/074747, WO 2010/074751), [(R)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден]-цианамид (В1) и [(S)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден]-цианамид (В2), именуемый группой диастереомеров В (также известный из WO 2010/074747, WO 2010/074751) и 11-(4-хлор-2,6-диметилфенил)-12-гидрокси-1,4-диокса-9-азадиспиро[4.2.4.2]тетрадец-11-ен-10-он (известный из WO 2006/089633), 3-(4-фтор-2,4-диметилбифенил-3-ил)-4-гидрокси-8-оксо-1-азаспиро[4.5]дец-3-ен-2-он (известный из WO 2008/067911), 1-{2-фтор-4-метил-5-[(2,2,2-трифлуоретил)сульфинил]фенил}-3-(трифторметил)-1Н-1,2,4-тиазол-5-амин (известный из WO 2006/043635), [(3S,4aR,12R,12aS,12bS)-3-[(циклогексилкарбонил)окси]-6,12-дигидрокси-4,12b-диметил-11-оксо-9-(пиридин-3-ил)-1,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-декагидро-2H,11Н-бензо-[f]-пирано[4,3-b]хромен-4-ил]метилцикло-пропан-карбоксилат (известный из WO 2008/066153), 2-циано-3-(дифторметокси)-N,N-диметилбензол-сульфонамид (известный из WO 2006/056433), 2-циано-3-(дифторметокси)-N-метилбензол-сульфонамид (известный из WO 2006/100288), 2-циано-3-(дифторметокси)-N-этилбензол-сульфонамид (известный из WO 2005/035486), 4-(дифторметокси)-N-этил-N-метил-1,2-бензотиазол-3-амин-1,1-диоксид (известный из WO 2007/057407),

N-[1-(2,3-диметилфенил)-2-(3,5-диметилфенил)этил]-4,5-дигидро-1,3-тиазол-2-амин (известный из WO 2008/104503), {1'-(2E)-3-(4-хлорфенил)проп-2-ен-1-ил]-5-фторспиро[индол-3,4'-пиперидин]-1(2H)-ил}(2-хлорпиридин-4-ил)метанон (известный из WO 2003/106457), 3-(2,5-диметилфенил)-4-гидрокси-8-метокси-1,8-диазаспиро[4.5]дец-3-ен-2-он (известный из WO 2009/049851), 3-(2,5-диметилфенил)-8-метокси-2-оксо-1,8-диаза-спиро[4.5]дец-3-ен-4-ил этилкарбонат (известный из WO 2009/049851), 4-(бут-2-ин-1-илокси)-6-(3,5-диметилпиперидин-1-ил)-5-фторпириимидин (известный из WO 2004/099160), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафортрентил)(3,3,3-трифторпропил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафортрентил)(3,3,4,4,4-пентафтор-бутил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), 8-[2-(циклогептоштокси)-4-(трифторметил)феноксил]-3-[6-(трифторметил)-пиридазин-3-ил]-3-азабицикло[3.2.1]октан (известный из WO 2007/040280), фломестоквин, PF1364 (CAS-рег. № 1204776-60-2) (известный из JP 2010/018586), 5-[5-(3,5-дихлорфенил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 5-[5-(2-хлорпиридин-4-ил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 4-[5-(3,5-дихлорпропенил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-метил-N-{2-оксо-2-[{(2,2,2-трифторэтил)амино}]этил}бензамид (известный из WO 2005/085216), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-{(2,2-дифторэтил)-амино}}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-{(2,2-дифторэтил)-амино}}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](этил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он (все известны из WO 2010/005692), NNI-0711 (известный из WO 2002/096882), 1-ацетил-N-[4-(1,1,1,3,3-гексафортр-2-метокситропан-2-ил)-3-изобутилфенил]-N-изобутирил-3,5-диметил-1Н-пиразол-4-карбоксамид (известный из WO 2002/096882), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-хлор-3-метилбензоил]-2-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-этилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-метилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дигром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-1,2-диэтилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дигром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-2-этилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), (5RS,7RS;5RS,7RS)-1-(6-хлор-3-пиридиметил)-1,2,3,5,6,7-гексагидро-7-метил-8-нитро-5-пропоксиимидаzo[1,2-а]пиридин (известный из WO 2007/101369), N-[2-(5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-хлор-6-метилфенил]-3-бром-1-(3-хлор-пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-карбоксамид (известный из CN 102057925) и метил-2-[3,5-дигром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)бензоил]-2-этил-1-метилгидразин карбоксилат (известный из WO 2011/049233).

В качестве дополнительного примера фунгицид включает, но не ограничивается ими, один или несколько фунгицидов, выбранных из следующих: алдиморф, азаконазол, битертанол, бромуконазол, ци-проконазол, диклобутразол, дифеноконазол, диниконазол, диниконазол-М, додеморф, додеморф ацетат, эпоксоназол, этаконазол, фенаримол, фенбуконазол, фенгексамиd, фенпропидин, фенпропиморф, флу-квинконазол, флурпримидол, флусилазол, флутриафол, фурконазол, фурконазол-цис, гексаконазол, имазалил, имазалил сульфат, имибенконазол, ипконазол, метконазол, миклобутанил, нафтифин, нуаримол, окспоконазол, паклобутразол, пефуразоат, пенконазол, пипералин, прохлораз, пропиконазол, протиоконазол, пирибутикарб, пирифенокс, квинконазол, симеконазола, спироксамин, тебуконазол, тербинафин, тетраконазол триадимефон, триадименол, тридеморф, трифлумизол, трифорин, тритиконазол, униконазол, униконазол-р, виниконазол, вориконазол, 1-(4-хлорфенил)-2-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)циклогептанол, метил-1-(2,2-диметил-2,3-дигидро-1Н-инден-1-ил)-1Н-имидаzол-5-карбоксилат, N'-{5-(дифторметил)-2-метил-4-[3-(триметилсилил)пропокси]фенил}-N-этил-N-метилимидоформамиd, N-этил-N-метил-N-{2-метил-5-(трифторметил)-4-[3-(триметилсилил)пропокси]фенил}имидоформамиd, O-[1-(4-метоксифенокси)-3,3-диметилбутан-2-ил]-1Н-имидаzол-1-карботиоат, биксаfen, боскалид, карбоксин, дифлуметорим, фенфурам, флуопирам, флютоланил, флуксапироксад, фураметпир, фирмезициклокс, изопиразам (смесь синэпимерного рацемата 1RS, 4SR, 9RS и антиэпимерного рацемата 1RS, 4SR, 9SR), изопиразам (антиэпимерный рацемат 1RS, 4SR, 9SR), изопиразам (антиэпимерный энантиомер 1R, 4S, 9S), изопиразам (антиэпимерный энантиомер 1S, 4R, 9R), изопиразам (синэпимерный рацемат 1RS, 4SR, 9RS), изопиразам (синэпимерный энантиомер 1R, 4S, 9R), изопиразам (синэпимерный энантиомер 1S, 4R, 9S), мепронил, оксикарбоксин, пенфлуфен, пентиопираид, седаксан, тифлузамиd, 1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафортротокси)фенил]-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-4-карбоксамиd, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафортротокси)фенил]-1Н-пиразол-4-карбоксамиd, 3-(дифторметил)-N-[4-фтор-2-(1,1,2,3,3,3-гексафортропокси)фенил]-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамиd, N-[1-(2,4-дихлорфенил)-1-метоксипропан-2-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамиd, 5,8-дифтор-N-[2-(2-фтор-4-{4-(трифторметил)пиридин-2-ил}окси)фенил]этил[квиназолин-4-амин, N-[9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтален-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамиd, N-[1(S,4R)-9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтален-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамиd, N-[(1R,4S)-9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтален-5-ил]-3-

(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, аметоктрадин, амисульбром, азоксистробин, циазофамид, куметоксистробин, кумоксистробин, димоксистробин, энестробурин, фамоксадон, фенамидон, феноксистробин, флуоксастробин, крезоксим-метил, метоминостробин, орисастробин, пикоксистробин, пираклостробин, пираметостробин, пираоксистробин, пирибенкарб, триклоририкарб, трифлоксистробин, (2E)-2-(2-{{[6-(3-хлор-2-метилфенокси)-5-фторпиrimидин-4-ил]окси}フェニл}-2-(метоксиимино)-N-метилэтанамид, (2E)-2-(метоксиимино)-N-метил-2-(2-{{(1E)-1-[3-(трифторметил)フェニル]エチリデン}アミノ}окси)メチルフェニル)エタナミド, (2E)-2-(метоксиimiно)-N-метил-2-[2-(E)-{{1-[3-(трифторметил)フェニル]этокси}имино}метил]フェнил)ЭтанаМИД, (2E)-2-{2-[{{(1E)-1-(3-{{(E)-1-фтор-2-фенилэтенил}окси}フェニл)Этилиден}Амино}окси]метил]フェнил}-2-(метоксиimiно)-N-метилэтанамид, (2E)-2-{2-{{(2E,3E)-4-(2,6-дихлорфенил)бут-3-ен-2-илиден}Амино}окси)метил]フェнил}-2-(метоксиimiно)-N-метилэтанамид, 2-хлор-N-(1,1,3-триметил-2,3-дигидро-1Н-инден-4-ил)пиридин-3-карбоксамид, 5-метокси-2-метил-4-(2-{{(1E)-1-[3-(трифторметил)フェニル]エチリден}アмино}окси)メチルフェニル)-2,4-дигидро-3Н-1,2,4-триазол-3-он, метил-(2E)-2-{2-{{(циклогексил[(4-метоксифенил)имино]метил}сульфанил}метил]フェнил}-3-метоксипроп-2-еноат, N-(3-этил-3,5,5-триметилциклогексил)-3-(формиламино)-2-гидроксибензамид, 2-{2-{{(2,5-диметилфенокси)метил]フェニл}-2-метокси-N-метилацетамид, (2R)-2-{2-{{(2,5-диметилфенокси)метил]フェニл}-2-метокси-N-метилацетамид, беномил, карбендазим, хлорфеназол, диэтрафенкарб, этабоксам, флуопиколид, фуберидазол, пенцикурон, тиабендазол, тиофанат-метил, тиофанат, зоксамид, 5-хлор-7-(4-метилпиперидин-1-ил)-6-(2,4,6-трифторфенил)[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиrimидин, 3-хлор-5-(6-хлорпиридин-3-ил)-6-метил-4-(2,4,6-трифторфенил)пиридазин, бордосская жидкость, каптафол, каптан, хлорталонил, гидроксид меди, нафтенат меди, оксид меди, оксихлорид меди, сульфат меди (2+), дихлофлуанид, дитианон, додин, свободное основание додина, фербам, фторфоллет, фолпет, гуазатин, гуазатин ацетат, иминоктадин, иминоктадин албесилат, иминоктадин триацетат, манкоппер, манкозеб, манеб, метирам, метирам цинк, оксин меди, пропамидин, пропинеб, сера, соединения серы, включая полисульфид кальция, тирам, толилфлуанид, цинеб, зирам, ацибензолар-S-метил, изотианил, пробеназол, тиадинил, андоприм, бластицидин-S, ципродинил, касугамицин, касугамицин гидрохлорид гидрат, мепанипирам, пираметанил, 3-(5-фтор-3,3,4,4-тетраметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)хинолин, фентин ацетат, хлорид фентин, фентин гидроксид, силтиофам, бентиаваликарб, диметоморф, флуморф, ипроваликарб, манди-пропамид, полиоксины, полиоксорим, валидамицин A, валифеналат, бифенил, хлоронеб, диклоран, эди-фенфос, этидиазол, иодокарб, ипробенфос, изопротиолан, пропамокарб, пропамокарб гидрохлорид, протиокарб, пиразофос, квинтозен, текназен толклофос-метил, карпропамид, диклоцимет, феноксанил, фталид, пироквilon, трициклазол, 2,2,2-трифторэтил{{3-метил-1-[(4-метилбензоил)амино]бутиан-2-ил}карбамат, беналаксил, беналаксил-М (киралаксил), бупиримат, клозилакон, диметиримол, этиримол, фуралаксил, гимексазол, металаксил, металаксил-М (мефеноксам), офурас, оксадиксил, оксолиновая кислота, хлозолинат, фенпиклонил, флудиоксонил, ипродион, процимидон, квиноксилен, винклозолил, бинапакрил, динокап, феримзон, флуазинам, мептилдинокап, бентиазол, бетоксазин, капсимицин, карвон, хинометионат, пириофенон (хлазафенон), куфранеб, цифлуфенамид, цимоксанил, ципросульфамид, дазомет, дебакарб, дихлорофен, дикломезин, дифензокват, дифензокват метилсульфат, дифениламин, экомат, фенипразамин, флуметовер, фторимид, флусульфамид, флутианил, фоссетил-алюминий, фоссетил-кальций, фоссетил-натрий, гексахлорбензол, иримамицин, метасульфокарб, метил изотиоцианата, метрафенон, милдиомицин, натамицин, никель диметилдитиокарбамат, нитротал-изопропил, октилионон, оксамокарб, оксифентинин, пентахлорфенол и соли, фенотрин, фосфористая кислота и ее соли, пропамокарб-фоссетилат, пропанозин-натрий, проквиназид, пираморф, (2E)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, (2Z)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, пирролнитрин, тебуфлоквин, теклофталам, толнифанид, триазоксид, трихламид, зариламид, (3S,6S,7R,8R)-8-бензил-3-{{3-[(изобутирилокси)метокси]4-метокси}пиридин-2-ил}карбонил}амино]-6-метил-4,9-диоксо-1,5-диоксонан-7-ил-2-метилпропаноат, 1-(4-{{4-[(5R)-5-(2,6-дифторфенил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил}-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-{{4-[(5S)-5-(2,6-дифторфенил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил}-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-{{4-[(5-дифторфенил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил}-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-метоксиценокси)-3,3-диметилбутан-2-ил-1Н-имидазол-1-карбоксилат, 2,3,5,6-тетрахлор-4-(метилсульфонил)пиридин, 2,3-дигидро-6-хлортиено[2,3-d]пиrimидин-4(3H)-он, 2,6-диметил-1Н,5Н-[1,4]дитиино[2,3-c:5,6-c']дипиррол-1,3,5,7(2Н,6Н)-тетрон, 2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]-1-(4-{{4-[(5R)-5-фенил}-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)-2-бутоxси-6-иод-3-пропил-4Н-хромен-4-он, 2-хлор-5-[2-хлор-1-(2,6-дифтор-4-метокси)фенил]-4-метил-1Н-имидазол-5-ил]пиридин, 2-фенилфенол и соли, 3-(4,4,5-трифтор-3,3-диметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)хинолин, 3,4,5-трихлорпиридин-2,6-дикарбонитрил, 3-[5-(4-хлорфенил)-2,3-диметил-1,2-оксазолидин-3-ил]пиридин, 3-хлор-5-(4-хлорфенил)-4-(2,6-дифторфенил)-6-метилпиридазин, 4-(4-хлорфенил)-5-(2,6-дифторфенил)-3,6-диметилпиридазин, 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-тиол, 5-хлор-N'-

фенил-N'-(проп-2-ин-1-ил)тиофен-2-сульфоногидразид, 5-фтор-2-[(4-фторбензил)окси]пиrimидин-4-амин, 5-фтор-2-[(4-метилбензил)окси]пиrimидин-4-амин, 5-метил-6-октил[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиrimидин-7-амин, этил(2Z)-3-амино-2-циано-3-фенилпроп-2-еноат, N'-(4-[3-(4-хлорбензил)-1,2,4-тиадиазол-5-ил]окси}-2,5-диметилфенил)-N-этил-N-метилимidoформамид, N-(4-хлорбензил)-3-[3-метокси-4-(проп-2-ин-1-илокси)фенил]пропанамид, N-[4-(4-хлорфенил)(циано)метил]-3-[3-метокси-4-(проп-2-ин-1-илокси)фенил]пропанамид, N-[5-бром-3-хлорпиридин-2-ил]метил]-2,4-дихлорпиридин-3-карбоксамид, N-[1-(5-бром-3-хлорпиридин-2-ил)этил]-2,4-дихлорпиридин-3-карбоксамид, N-[1-(5-бром-3-хлорпиридин-2-ил)этил]-2-фтор-4-идопиридин-3-карбоксамид, N-{(E)}-[циклогропилметокси]имино|[6-(дифторметокси)-2,3-дифторфенил]метил}-2-фенилацетамид, N-{(Z)}-[циклогропилметокси]имино|[6-(дифторметокси)-2,3-дифтор-фенил]метил}-2-фенилацетамид, N'-{4-[3-трет-бутил-4-циано-1,2-тиазол-5-ил]окси}-2-хлор-5-метилфенил}-N-этил-N-метилимidoформамид, N-метил-2-(1-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-(1,2,3,4-тетрагидрофтален-1-ил)-1,3-тиазол-4-карбоксамид, N-метил-2-(1-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-[(1R)-1,2,3,4-тетрагидрофтален-1-ил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид, N-метил-2-(1-[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-[(1S)-1,2,3,4-тетрагидрофтален-1-ил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид, пентил{6-[{[(1-метил-1H-тиазол-5-ил)(фенил)-метилиден]-амино}окси]метил}пиридин-2-ил}карбамат, феназин-1-карбоновая кислота, хинолин-8-ол, хинолин-8-ол сульфат (2:1), трет-бутил{6-[{[(1-метил-1H-тиазол-5-ил)(фенил)метилен]-амино}окси]метил}пиридин-2-ил}карбамат, 1-метил-3-(трифторметил)-N-[2'-(трифторметил)бифенил-2-ил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-(4'-хлорбифенил-2-ил)-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-(2',4'-дихлорбифенил-2-ил)-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[4'- (трифторметил)бифенил-2-ил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-(2',5'-дифторбифенил-2-ил)-1-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[4'- (проп-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, 5-фтор-1,3-диметил-N-[4'- (проп-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, 2-хлор-N-[4'- (проп-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[4'- (3,3-диметилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-5-фтор-1,3-диметил-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-(4'-этинилбифенил-2-ил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-(4'-этинилбифенил-2-ил)-5-фтор-1,3-диметил-1H-пиразол-4-карбоксамид, 2-хлор-N-(4'-этинилбифенил-2-ил)пиридин-3-карбоксамид, 2-хлор-N-[4'- (3,3-диметилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-[4'- (3-метокси-3-метилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, 5-фтор-N-[4'- (3-метокси-3-метилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1,3-диметил-1H-пиразол-4-карбоксамид, 2-хлор-N-[4'- (3-метокси-3-метилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]пиридин-3-карбоксамид, (5-бром-2-метокси-4-метилпиридин-3-ил)(2,3,4-треметокси-6-метилфенил)метанон, N-[2-(4-[3-(4-хлорфенил)проп-2-ин-1-ил]окси}-3-метоксифенил]этил]-N2-(метилсульфонил)валинамид, 4-оксо-4-[(2-фенилэтил)амино]бутановая кислота, бут-3-ин-1-ил{6-[{(Z)-(1-метил-1H-тиазол-5-ил)(фенил)-метилен]-амино}окси]метил}пиридин-2-ил}карбамат.

Также примером добавочного пестицида может быть один или несколько гербицидов, выбранных из группы, состоящей из ацетохлора, ацифлуорфена, ацифлуорfen-натрия, аклонифена, алахлора, аллидохлора, аллоксидима, аллоксидим натрия, аметрина, амикарбазона, амидохлора, амидосульфурана, аминоциклоирахлора, аминоциклоирахлор-калия, аминоциклоирахлор-метила, аминопирамида, амитрола, аммониумсульфамата, анилофоса, азулами, атразина, азафенидина, азимсульфурана, бефлубутамида, беназолина, беназолин-этила, бенфуралина, бенфуресата, бенсульфурана, бенсульфурон-метила, бензулида, бентазона, бензобициклина, бензофенапа, бициклоирона, бифенокса, биланаfosа, биланафос-натрия, биспиребака, биспиребак-натрия, бромацила, бромобутида, бромфеноксима, бромоксинила, бромоксинил-бутират, -калия, -гептаноата и -октаноата, бузоксина, бутахлора, бутафенацила, бутамифоса, бутенахлора, бутралина, бутроксидима, бутилата, кафенстрола, карбетамида, карфентразона, карфентразон-этила, хлорамбена, хлорбромурана, хлорфенака, хлорфенак-натрия, хлорфенпропа, хлорфлуренола, хлорфлуренол-метила, хлоридазона, хлоримурана, хлоримурон-этила, хлорфталима, хлоротолурана, хлортал-диметила, хлорсульфурана, цинидона, цинидон-этила, цинметилина, циносульфурана, клетодима, клодинафопа, клодинафоп-пропаргила, кломазона, кломепропа, клопирамида, клоранслама, клорансулам-метила, кумилурана, цианамида, цианазина, циклоата, циклосульфамурана, циклоксидима, цигалофопа, цигалофоп-бутила, ципразина, 2,4-D, 2,4-D-бутотила, -бутила, -диметиламмония, -диоламина, -этила, 2-этилгексила, -дазомета, -изобутила, -изооктила, -изопропиламмония, калий-, -триисопропаноламмония и -троламина, 2,4-DB, 2,4-DB-бутил, -диметиламмония, изооктила, -калий и натрий-, даймурона (димрона), далапона, N-деканола, десмедилема, детосилпиразолата (DTP), дикамбы, дихлобенила, дихлорпропа, дихлорпроп-Р, диклофопа, диклофоп-метила, диклофоп-Р-метила, диклосулама, дифензоквата, дифлуфениканы, дифлуфензопира, дифлуфензопир-натрия, димефурана, димепиперата, диметахлора, диметаметрина, диметенамида, диметенамида-Р, диметрасульфурана, динитрамина, динотерба, дифенамида, дикваты-дигромида, дитиопира, дин-

рона, DNOC, эндотала, EPTC, эспрокарба, эталфуралина, этаметсульфурона, этаметсульфурон-метила, этиозина, этофумесата, этоксифена, этоксифен-этила, этоксисульфурона, этобензанида, F-5231, то есть N-{2-хлор-4-фтор-5-[4-(3-фторпропил)-5-оксо-4,5-дигидро-1Н-тетразол-1-ил]фенил}этансульфонамида, F-7967, то есть 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)пиридин-2,4(1Н, 3Н)-диона, феноксапропа, фенокеапропа-Р, феноксапроп-этила, феноксапроп-Р-этила, феноксасульфона, фентразамида, флампропа, флампроп-N-изопропила, флампроп-N-метила, флазасульфурона, флорасулама, флуазифопа, флуазифопа-Р, флуазифоп-бутила, флуазифоп-Р-бутила, флукарбазона, флукарбазон-натрия, флуцетосульфурона, флухлоралина, флуфенацета (тиафлуамида), флуфенпур, флуфенпур-этила, флуметсулема, флумиклорака, флумиклорак-пентила, флумиоксазина, флуометурона, флуренола, флуренол-бутила, -диметиламмоний и -метила, флуорогликофена, флуорогликофен-этила, флупропаната, флутирсульфурона, флутирсульфурон-метил-натрия, флуридона, флуорхлоридона, флуорксипира, флуорксипир-мептила, флуртамон флутиацета, флутиацет-метила, флутиамида, фомезафена, фомезафен-натрия, формасульфурона, фозамина, глусината, глусинат аммония, глусинат-Р-натрия, глусинат-Р-аммония, глусинат-Р-натрия, глифосата, глифосата аммония, -изопропиламмония, -диаммония, -диметиламмония, -калия, -натрия и -тримесиума, Н-9201, т.е. О-(2,4-диметил-6-нитрофенил)-О-этил изопропилфосфорамидотиоата, галозафена, галосульфурона, галосульфурон-метила, галоксифопа, галоксифопа-Р, галоксифоп-этоксиэтила, галоксифоп-Р-этоксиэтила, галоксифоп-метила, галоксифоп-Р-метила, гексазиона, HW-02, т.е. 1-(диметоксифосфорил)этил-(2,4-дихлорфенокси)ацетата, имазаметабенз-метила, имазамокса, имазамокс-аммония, имазапика, имазапик-аммония, имазапира, имазапир-изопропиламмония, имазахина, имазахина-аммоний, имазетапира, имазетапир-иммония, имазосульфурона, инданофана, индазифлама, иодосульфурона, иодосульфурон-метил-натрия, иоксинила, иоксинил-октаноата, -калия и -натрия, ипфенкарбазона, изопротурона, изоурона, изоксабена, изоксафлутола, карбутилата, КУН-043, т.е. 3-({[5-(дифторметил)-1-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-4-ил]сульфонил}-5,5-диметил-4,5-дигидро-1,2-оксазола, кетоспирадокса, лактофена, ксенацила, кинуруона, МСРА, МСРА-бутотила, -диметиламмония, -2-этилгексила, -изопропиламмония, -калия и -натрия, МСРВ, МСРВ-метила, -этила и -натрия, мекопропа, мекопроп-натрия и -бутотила, мекопроп-Р, мекопроп-Р-бутотила, диметиламмония, -2-этилгексила и -калия, мефенацета, мефлуидида, мезосульфурона, мезосульфурон-метила, мезотриона, метабензтиазурона, метама, метамифопа, метамитрона, метазахлора, метазосульфурона, метабензтиазурона, метиопирсульфурона, метиозолина, метил изотиоцианата, метобромуона, метолахлора, S-метолахлора, метосулама, метоксурона, метрибузина, метсульфурона, метсульфурон-метила, молината, монолинуона, моносульфурона, моносульфурон-эфира, МТ-128, т.е. 6-хлор-N-[(2Е)-3-хлорпроп-2-ен-1-ил]-5-метил-N-фенилпиридазин-3-амина, МТ-5950, т.е. N-(3-хлор-4-изопропилфенил)-2-метилпентан амида, NGGC-011, напрапамида, NC-310, т.е. [5-(бензилокси)-1-метил-1Н-пиразол-4-ил](2,4-дихлорфенил)метанона, небурона, никосульфурона, ноановой кислоты (пеларгоновой кислоты), норфлуразона, олеиновой кислоты (жирной кислоты), оренкарба, ортосульфамурон, орезалина, оксадиагила, оксадиазона, оксафульфурона, оксацикломефона, оксифлуорфена, параквата, дихлорида параквата, пебулата, пендиметалина, пеноксулама, пентахлорфенола, пентоксазона, петоксамида, нефтяных масел, фенмедифама, пиклорама, пиколинафена, пикоксадена, пиперофоса, претилахлора, примисульфурона, примисульфурон-метила, продиамина, прифлуралина, профоксидима, прометон прометрина, пропахлора, пропанила, пропаквизафопа, пропазина, профама, прописохлора, пропоксикарбазона, пропоксикарбазон-натрия, пропири сульфурона, пропизамида, просульфокарба, просульфурона, пираклонила, пирафлуфена, пирафлуфен-этила, пирасульфотола, пиразолината (пиразолата), пиразосульфурона, пиразосульфурон-этила, пиразоксифена, пирибамбенза, пирибамбенз изопропила, пропил-пирибамбенза, пирибензоксима, пирибутикарба, пиридафола, пиридата, пирифталида, пириминобака, пириминобак-метила, пириминусульфана, пиритиобака, пиритиобак-натрия, пироксасульфона, пироксулама, квинклорака, квинмерака, квинокламина, хизалофопа, квизалофоп-этила, квизалофопа-Р, квизалофоп-Р-этила, квизалофоп-Р-тефурила, римсульфурона, сафлуфенацила, сетоксидима, сидурона, симазина, симетрина, сулькотриона, сульфентразона, сульфометурона, сульфометурон-метила, сульфосульфурона, SW-065, SYN-523, SYP-249, т.е. 1-этокси-3-метил-1-оксобут-3-ин-2-ил-5-[2-хлор-4-(трифторметил)фенокси]-2-нитробензоата, SYP-300, т.е. 1-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-ин-1-ил)-3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-6-ил]-3-пропил-2-тиоксоимидазолидин-4,5-диона, 2,3,6-ТВА, ТСА (трихлоруксусной кислоты), ТСА-натрия, тебутиуона, тефурилтриона, темботриона, тепралоксидима, тербацила, тербукарба, тербуметона, тербутилазина, тербутирина, тенилхлора, тиазопира, тиенкарбазона, тиенкарбазон-метила, тифенсульфурона, тифенсульфурон-метила, тиобенкарба, топрамезона, траллоксидима, триафамона, три-аллата, триасульфурона, триазифлама, трибенуриона, трибенурон-метила, триклопира, триетазина, трифлоксисульфурона, трифлоксисульфурон-натрия, трифлуралина, трифлусульфурона, трифлусульфурон-метил тритосульфурона, сульфат мочевины, вернолата, ZJ-0862, т.е. 3,4-дихлор-N-{2-[(4,6-диметоксипиридин-2-ил)окси]бензил}анилина или регуляторов роста растений, выбранных из группы, содержащей ацибензолар, ацибензолар-S-метил, 5-аминолевулиновую кислоту, анцимидол, 6-бензиламинопурин, брассинолид, катехин, хлормекват хлорид, клопроп, цикланилид, 3-(циклогекс-1-енил)пропионовую кислоту, даминосид, дазомет, n-деканол, дикегулак, дикегулак-натрий, эндотал, эндотал-дикалий, -динатрий-и моно-(N,N-диметилалкиламмоний), этефон, флуметралин, флуренол, флу-

нол-бутил, фурпримидол, форхлорфенурон, гибберелловую кислоту, инабенфид, индол-3-уксусную кислоту (IAA), 4-индол-3-ил-масляную кислоту, изопротиолан, пробеназол, жасминовую кислоту, гидразид малеиновой кислоты, мепикватхлорид, 1-метилциклогепен, метилжасмонат, 2-(1-нафтил)-ацетамид, 1-нафтилуксусную кислоту, 2-нафтилуксусную кислоту, смесь нитрофенолата, паклобутразол, N-(2-фенилэтил)-бета-аланин, N-полуамид фенилфталевой кислоты, прогексадион, прогексадион-кальций, прогидрожасмон, салициловую кислоту, стриголактон, текназен, тидаизурон, триаконтанол, тринексапак, тринексапак-этил, цитодеф, униконазол, униконазол-Р или предпочтительных в области агрохимии солей или других форм.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гербицидная композиция, применяемая к месторасположению, дополнительно содержит глифосат и/или глюфосинат.

Таким образом, в зависимости от характера гербицидов в гербицидной композиции указанная композиция может быть применена к месторасположению до посадки, до всходов и/или после всходов. Под "до посадки" подразумеваю, что гербицидную композицию применяют до посадки сельскохозяйственной культуры в месторасположении, под "до всходов" подразумеваю, что гербицидную композицию наносят до того, как прорастающие семена сельскохозяйственной культуры выступают над поверхностью месторасположения и "после всходов" означает, что гербицидную композицию применяют, как только сельскохозяйственная культура покажется над поверхностью месторасположения. Эти индивидуальные схемы применения могут быть применены к месторасположению отдельно или в любой комбинации. Например, схема применения может содержать применение до посадки с последующим применением после всходов.

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

В другом аспекте настоящего изобретения предлагаются способы борьбы с самосевными SYHT0H2 культурными растениями в месторасположении, при этом способ включает применение к месторасположению одного или нескольких гербицидов, действенных в случае соевых бобов, и имеет способ действия помимо ингибирования HPPD.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагаются способы борьбы с трансгенными самосевами в месторасположении, содержащем SYHT0H2 культурных растений, где события самосевов обладают устойчивостью к одному или нескольким гербицидам, но не обладают устойчивостью к ингибиторам HPPD, при этом способ содержит применение к месторасположению контролирующего количества гербицидной композиции, содержащей один или несколько ингибиторов HPPD.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагаются способы применения гербицидных смесей к месторасположению, где гербицидная смесь содержит ингибитор HPPD и по меньшей мере одно дополнительное химическое вещество, которое возможно не переносится SYHT0H2, с целью борьбы с вредителями (сорняками, болезнями, насекомыми, нематодами), где наличие SYHT0H2 события создает возможность применения этой смеси либо до посадки или до всходов с помощью защиты от остаточной активности HPPD. Например, в одном аспекте типичный полностью сгорающий гербицид, такой как паракват, применяют к месторасположению в довсходовом или допосевном полностью сгорающем типе нанесения в сочетании с ингибитором HPPD.

В других аспектах настоящего изобретения SYHT0H2 растения используются для повышения урожайности. Например, соевое событие SYHT0H2 демонстрирует повышение урожайности по сравнению с

необработанным событием при распылении с мезотрионом до всходов или на ранней стадии вегетативного развития. Например, соевое событие SYHT0H2, которое получает 2Х нанесение мезотриона на досходовой или ранней стадии вегетативного размножения, может показать большую урожайность, чем необработанные события. Соответственно предлагаются способы повышения урожайности растения путем применения к соевому растению, содержащему событие SYHT0H2, стимулирующего рост количества ингибитора HPPD для повышения таким образом урожайности независимо от напора сорняков. Ингибитор HPPD может быть мезотрионом или другими ингибиторами HPPD. В контексте данного документа стимулирующее рост количество означает количество гербицида-ингибитора HPPD, достаточного для повышения урожайности растений по меньшей мере приблизительно в два раза, например по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 20 раз, по меньшей мере приблизительно в 50 раз, по меньшей мере приблизительно в 100 раз или более по сравнению с растениями SYHT0H2, которые не опрыскивают гербицидом-ингибитором HPPD. Стимулирующее рост количество может также означать количество гербицида-ингибитора HPPD, достаточного для повышения урожайности растений по меньшей мере приблизительно на 5%, например по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 100% или более, по сравнению с SYHT0H2 растениями, которые не опрыскивают гербицидом-ингибитором HPPD.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают обработку растения по настоящему изобретению и/или целевой области (например, поля или обрабатываемых земель) и/или сорняков всего лишь одним гербицидом или другими химическими веществами, такими как, например, ингибитор HPPD.

Способы также включают использование одновременных и/или последовательных применений нескольких классов гербицидов. В частности, гетерологичная вставка, содержащая последовательность Avena HPPD, также включает в себя последовательность фосфинотрицин ацетил трансферазы (PAT), которая придает устойчивость к ингибиторам глутамин-синтетазы, таким как глюфосинат (иначе именуемый фосфинотрицином). Фосфинотрицин (PTC, 2-амино-4-метилфосфиномасляная кислота) является структурным элементом антибиотика фосфинотрицилаланил-аланина, продуцируемого штаммом культуры бактерий *Streptomyces viridochromogenes* 494 Tu (DSM 40736, DSM 4112). Антибиотик активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также гриба *Botrytis cinerea*. PTC также действует как гербицид. Соответственно событие SYHT0H2 может быть использовано в сочетании с ингибиторами глутамин-синтетазы, например глюфозинатом. Образцы гербицидов глюфосината представлены на рынке как BASTA®, LIBERTY®, RELY®, CHALLENGE®, IGNITE® и FINALE®.

Различные химикаты, такие как гербициды, имеют разное "последействие", то есть разное количество времени, в течение которого обработка химикатами или гербицидами продолжает оказывать влияние на растения, проявляющиеся в обработанной области. Такой эффект может быть желательным или нежелательным в зависимости от желаемой будущей цели обработанной области (например, поля или обрабатываемых земель). Таким образом, схема чередования культур может быть выбрана на основе последействий от обработок, которые будут использоваться для каждой культуры и их влияния на культуру, которая будет впоследствии выращиваться в том же районе. Специалист в данной области техники знаком со способами, которые могут быть использованы для оценки последействия гербицидов, например, как правило, глифосат обладает очень незначительным последействием или совсем его не имеет на почве, в то время как гербициды, которые выполняют функцию ингибирования HPPD, различаются в своих уровнях последействия. Как известно, последействия для различных гербицидов, которые известны в данной области техники, зависят от различных факторов внешней среды, таких как, например, уровень влажности почвы, температура, pH и состав почвы (текстура и органическая примесь). Соевые растения SYHT0H2 находят особое применение в способах выращивания сельскохозяйственных культур, где повышенная устойчивость к последействию гербицидов является выгодной.

Например, в одном аспекте настоящего изобретения SYHT0H2 соевые растения высаживают для уменьшения риска повреждения от последействий HPPD гербицидов, используемых в предшествующих сельскохозяйственных культурах, например, когда бициклопирон и топрамезон использовали в посеве кукурузы в ходе предыдущей посадки.

Например, в одном аспекте настоящего изобретения SYHT0H2 соевые растения имеют повышенную толерантность к ингибиторным HPPD химическим составам при индивидуальном применении и дополнительно обеспечивают повышенную толерантность к сочетанию гербицидов. Кроме того, трансгенные растения, описанные в данном документе, обеспечивают повышенную толерантность к обработке дополнительными химикатами, обычно применяемыми к сельскохозяйственным культурам в сочетании с гербицидами, такими, как защитные вещества, вспомогательные вещества, такие как ионные поверхности-активные вещества, ионные поверхностно-активные вещества, сульфат аммония, а также маслянистый концентрат и тому подобные.

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

Обработка семян антидотами гербицида, в частности, применяют для селективной борьбы с сорняками, так как она физически ограничивает действие антидота на культурные растения. Таким образом, еще один применяемый аспект настоящего изобретения относится к способу избирательной борьбы с сорняками в поле, включая обработку семян, из которых выращивают сельскохозяйственные культуры эффективным в качестве противоядия количеством антидота и обработку поля эффективным количеством гербицида с целью борьбы с сорняками. Эффективные в качестве противоядия количества антидота могут быть легко определены специалистом в данной области с помощью простых экспериментов. Эффективное в качестве противоядия количество антидота присутствует там, где желаемое растение обрабатывают антидотом, с тем, чтобы уменьшить действие гербицида на растение по сравнению с действием гербицида на растение, которое не обрабатывали антидотом; как правило, эффективное в качестве противоядия количество антидота предупреждает повреждение или значительное повреждение растения, обработанного антидотом. Специалист в данной области техники способен определить, является ли применение антидота целесообразным и способен определить дозу, в которой антидот следует вводить сельскохозяйственным культурам.

В одном варианте осуществления обрабатывают семена, содержащие SYHT0H2 событие. Следующие химикаты приведены в качестве примера, а не в качестве ограничения возможных способов обработки семян: аланикарб, алдикарб, бендиокарб, бенфуракарб, бутокарбоксим, бутоксикарбоксим, карбапир, карбофуран, карбосульфан, этиофенкарб, фенобукарб, форметанат, фуратиокарб, изопрокарб, метиокарб, метомил, метолкарб, оксамил, пирамикарб, пропоксур, тиодикарб, тиофанокс, триазамат, триметакарб, ХМС, ксилилкарб; ацефат, азаметифос, азинфос-этил, азинфос-метил, кадусафос, хлорэтоксифос, хлорфенвинфос, хлормефос, хлорпирифос, хлорпирифос-метил, кумафос, цианофос, деметон-S-метил, диазинон, дихлорвос/DDVP, дикротофос, диметоат, диметилвинфос, дисульфотон, EPN, этион, этопрофос, фамфур, фенамифос, фениндротион, фентион, фостиазат, гептенофос, имициафос, изофенфос, изопропил О-(митоксиаминотио-фосфорил) салицилат, изоксатион, малатион, мекарбам, метамидофос, метидатион, мевинфос, монокротофос, налед, ометоат, оксидеметон-метил, паратион, паратиона-метил, фентоат, форат, фозалон, фосмет, фосфамидон, фоксим, пирамифос-метил, профенофос, пропетамфос, протиофос, пираклофос, пиридафентион, квиналфос, сульфотеп, тебутирифос, темефос, тербуфос, тетрахлорвинфос, тиометон, триазофос, триклорфон, вамиодотион, циклодиен хлороганических соединений, хлордан, эндосульфан; этипрол, фипронил, акринатрин, аллетрин, D-цис-транс-аллетрин, D-транс-аллетрин, бифентрин, биоаллетрин, S-изомер циклопентенил, биоресметрин, циклопротрин, циофлутрин, бета-циофлутрин, цигалотрин, лямбда-цигалотрин, гамма-цигалотрин, циперметрин, альфа-циперметрин, бета-циперметрин, тета-циперметрин, зета-циперметрин, циленотрин [(1R)-транс-изомеры], дельтаметрин, эмпентрин [(EZ)-(1R)-изомеры], эсфенвалерат, этофенпрокс, фенпропатрин, фенвалерат, флуцитринат, флюметрин, тауфлувалинат, халфенпрокс, имипротрин, кадетрин, перметрин, фенотрин [(1R)-транс-изомер], праллетрин, пиретрин (пиретрум), ресметрин, силафлуоfen, тефлутрин, тетраметрин, тетраметрин [(1R)-изомеры]], траплометрин, трансфлутрин; ДЦТ; метоксихлор, ацетамиприд, клотианидин, динотефуран, имидаклоприд, нитенпира, тиаклоприд, тиаметоксам; никотин, спи неторам, спиносад, абамектин, эмамектинбензоат, лепимектин, милбемектин, гидропрен, кинопрен, метопрен; феноксикарб; пирипроксифен, хлорпикрин; сульфурилфторид; бура; антимонил-тарtrат калия, пиметразин; флоникамид, клофентезин, хекситиазокс, дифловидазин, этоксазол, Bacillus thuringiensis подвида israelensis, Bacillus sphaericus, Bacillus Thuringiensis подвида aizawai, Bacillus Thuringiensis под-

вида kurstaki, Bacillus Thuringiensis подвида tenebrionis, ВТ-белки сельскохозяйственных культур: Ctry1Ab, Ctry1Ac, Ctry1Fa, Ctry2Ab, mCtry3A, Ctry3Ab, Ctry3Bb, Ctry34/35Ab1, диафентиурон, азоцилотин, цигексатин, фенбутатиноксид; пропаргит, тетрадифон, хлорфенапир, DNOC, сульфурамид, бенсультап, картап гидрохлорид, тиосультап-натрий, бистрифлурон, хлорфлуазурон, дифлубензурон, флуциклоксурон, флуфеноксурон, гексафлумурон, луфенурон, новалурон, новифлумурон, тефлубензурон, трифлумурон, бупрофезин, циромазин, хромафенозид, галофенозид, метоксифенозид, тебуфенозид, амитраз, гидраметилон; ацеквинацил; флуакрипирим, феназаквин, фенпироксимат, пирамидифен, пиридабен, тебуфентирад, толфенпирад, ротенон (Derris), индоксакарб; метафлумизон, спиродиклофен, спиромезифен, спиротетрамат, фосфида алюминия, кальция фосфид, фосфин, фосфид цинка, циенопирафен, хлорантранилипирол, флубендиамид, амидофлумет, азадирахтин, бенклотиаз, бензоксисмат, бифеназат, бромопропилат, хинометионат, криолит, циантранилипирол (циазипир), цифлуметофеин, дикофол, дифловидазин, флуенсульфон, флуфенерим, флуфипрол, флуопирам, фуфенозид, имидаклотиз, ипродион, меперфлутрин, пиридалил, пирифлуквиназон, тетраметилфлутрин, иодометан, продукты на основе *Bacillus firmus* (включая, но не ограничиваясь им, штамм CNCM I-1582, такой как, например, VOTiVO™, BioNem); 3-бром-N-[(2-бром-4-хлор-6-[(1-циклогексил)карбамоил]фенил)-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-карбоксамид (известный из WO 2005/077934), 4-{[(6-бромпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), 4-{[(6-фторпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), 4-{[(2-хлор-1,3-тиазол-5-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), флуриадифурон, 4-{[(6-хлор-5-фторпиридин-3-ил)метил](метил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115643), 4-{[(5,6-дихлорпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115646), 4-{[(6-хлор-5-фторпиридин-3-ил)метил]-циклогексил}амино}фуран-2(5H)-она (известный из WO 2007/115643), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-циклогексил}амино}фуран-2(5H)-он (известный из EP-A-0539588), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](метил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из EP-A-0539588), {[1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден}цианамид (известный из WO 2007/149134) и его диастереомеры {[1R)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден}цианамид (А) и {[1S)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден}цианамид (В) (также известный из WO 2007/149134), а также сульфоксафлор и его диастереомеры [(R)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден]-цианамид (A1) и [(S)-метил-(оксидо){(1S)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден]-цианамид (A2), называемые группой диастереомеров А (известный из WO 2010/074747, WO 2010/074751), [(R)-метил-(оксидо){(1S)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден]-цианамид (B1) и [(S)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ<sup>4</sup>-сульфанилиден]-цианамид (B2), именуемый группой диастереомера В (также известный из WO 2010/074747, WO 2010/074751) и 11-(4-хлор-2,6-диметилфенил)-12-гидрокси-1,4-диокса-9-азадиспиро[4.2.4.2]тетрадец-11-ен-10-он (известный из WO 2006/089633), 3-(4'-фтор-2,4-диметилбифенил-3-ил)-4-гидрокси-8-оксо-1-азаспиро[4.5]дец-3-ен-2-он (известный из WO 2008/067911), 1-{2-фтор-4-метил-5-[(2,2,2-трифторметил)сульфинил]фенил}-3-(трифторметил)-1H-1,2,4-тиазол-5-амин (известный из WO 2006/043635), [(3S,4aR,12aS,12bS)-3-[(циклогексил)окси]-6,12-дигидрокси-4,12b-диметил-11-оксо-9-(пиридин-3-ил)-1,3,4,4a,5,6,6a, 12,12a,12b-декагидро-2H, 11H-бензо-[f]-пирано[4,3-b]хромен-4-ил]метилцикло-пропан-карбоксилат (известный из WO 2008/066153), 2-циано-3-(дифторметокси)-N,N-диметилбензол-сульфонамид (известный из WO 2006/056433), 2-циано-3-(дифторметокси)-N-метилбензол-сульфонамид (известный из WO 2006/100288), 2-циано-3-(дифторметокси)-N-этилбензол-сульфонамид (известный из WO 2005/035486), 4-(дифторметокси)-N-этил-N-метил-1,2-бензотиазол-3-амина-1,1-диоксид (известный из WO 2007/057407), N-[1-(2,3-диметилфенил)-2-(3,5-диметилфенил)этил]-4,5-дигидро-1,3-тиазол-2-амин (известный из WO 2008/104503), {1'-(2E)-3-(4-хлорфенил)проп-2-ен-1-ил}-5-фторспиро[индол-3,4'-пиперидин]-1(2H)-ил}{(2-хлорпиридин-4-ил)метанон (известный из WO 2003/106457), 3-(2,5-диметилфенил)-4-гидрокси-8-метокси-1,8-диазаспиро[4.5]дец-3-ен-2-он (известный из WO 2009/049851), 3-(2,5-диметилфенил)-8-метокси-2-оксо-1,8-диаза-спиро[4.5]дец-3-ен-4-ил-этилкарбонат (известный из WO 2009/049851), 4-(бут-2-ин-1-илокси)-6-(3,5-диметилпиперидин-1-ил)-5-фторпириимида (известный из WO 2004/099160), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафторментил)(3,3,3-трифторметоксил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафторментил)(3,3,4,4,4-пентафторментил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), 8-[2-(циклогексилметокси)-4-(трифторметил)фенокси]-3-[6-(трифторметил)-пиридин-3-ил]-3-азабицикло[3.2.1]октан (известный из WO 2007/040280), флометоквин, PF1364 (CAS-рег. № 1204776-60-2) (известный из JP 2010/018586), 5-[5-(3,5-дифторметил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1H-1,2,4-тиазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 5-[5-(2-хлорпиридин-4-ил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-метил-N-{2-оксо-2-[(2,2,2-трифторметил)амино]-этил}бензамид (известный из WO 2005/085216), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-циклогексил}амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{[(6-

хлорпиридин-3-ил)метил]-(2,2-дифторэтил)амино}-1,3-оксазол-2(5Н)-он, 4-{{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](этил)амино}-1,3-оксазол-2(5Н)-он, 4-{{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](метил)амино}-1,3-оксазол-2(5Н)-он (все известны из WO 2010/005692), NNI-0711 (известный из WO 2002/096882), 1-ацетил-N-[4-(1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-метоксипропан-2-ил)-3-изобутилфенил]-N-изобутирил-3,5-диметил-1Н-пиразол-4-карбоксамид (известный из WO 2002/096882), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-хлор-3-метилбензоил]-2-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-этилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-1,2-диэтилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-2-этилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), (5RS,7RS;5RS,7RS)-1-(6-хлор-3-пиридиметил)-1,2,3,5,6,7-гексагидро-7-метил-8-нитро-5-пропоксиимидаzo[1,2-а]пиридин (известный из WO 2007/101369), N-[2-(5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-хлор-6-метилфенил]-3-бром-1-(3-хлор-пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-карбоксамид (известный из CN 102057925) и метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-2-этил-1-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2011/049233); алдиморф, азаконазол, битертанол, бромуконазол, ципроконазол, диклобутразол, дифеноконазол, диниконазол, диниконазол-М, додеморф, додеморф ацетат, эпоксиконазол, этаконазол, фенаримол, фенбуконазол, фенгексамид, фенпропидин, фенпропиморф, флуквинконазол, флурпримидол, флусилазол, флутриафол, фурконазол, фурконазол-цис, гексаконазол, имазалил, имазалил сульфат, имибенконазол, ипконазол, метконазол, миклобутанил, нафтифин, нуаримол, окспоконазол, паклобутразол, пефуразоат, пенконазолом, пипералин, прохлораз, пропиконазоло, протиоконазол, пирибутикарб, пирифенокс, квинконазол, симеконазол, спироксамин, тебуконазол, тербинафин, тетраконазол, триадимефон, триадименол, тридеморф, трифлумизол, трифорин, тритиконазол, униконазол, униконазол-р, виниконазол, вориконазол, 1-(4-хлорфенил)-2-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)циклогептанол, метил-1-(2,2-диметил-2,3-дигидро-1Н-инден-1-ил)-1Н-имидазол-5-карбоксилат, N'-{5-(дифторметил)-2-метил-4-[3-(треметилсилил)-пропокси]-фенил}-N-этил-N-метилимидоформамид, N-этил-N-метил-N'-{2-метил-5-(трифтор-метил)-4-[3(треметилсилил)пропокси]фенил}имидоформамид, O-[1-(4-метоксифен-окси)-3,3-диметилбутан-2-ил]-1Н-имидазол-1-карботиоат, биксаfen, боскалид, карбоксин, дифлуметорим, фенфурам, флуопирам, флотоланил, флуксапироксад, фураметпир, фурмецилокс, изопиразам(смесь синэпимерного рацемата 1RS, 4SR, 9RS и антиэпимерного рацемата 1RS, 4SR, 9SR), изопиразам (антиэпимерный рацемат 1RS, 4SR, 9SR), изопиразам (антиэпимерный энантиомер 1R, 4S, 9S), изопиразам (антиэпимерный энантиомер 1S, 4R, 9R), изопиразам (синэпимерный рацемат 1RS, 4SR, 9RS), изопиразам (синэпимерный энантиомер 1R, 4S, 9R), изопиразам (синэпимерный энантиомер 1S, 4R, 9S), мепронил, оксикарбоксин, пенфлуфен, пентиопирад, седаксан, тифлузамиd, 1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафторетокси)фенил]-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафторетокси)фенил]-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-[4-фтор-2-(1,1,2,3,3,3-гексафторпропокси)фенил]-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, N-[1-(2,4-дихлорфенил)-1-метоксипропан-2-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, 5,8-дифтор-N-[2-(2-фтор-4-[4-(трифторметил)пиридин-2-ил]окси)фенил]этил[квиназолин-4-амин, N-[9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтalen-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, N-[1(S,4R)-9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтalen-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, N-[1(R,4S)-9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтalen-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, аметоктрадин, амисульбром, азоксистробин, циазофамид, куметоксистробин, кумоксистробин, димоксистробин, энестробурин, фамоксадон, фенамидон, феноксистробин, флуокастробин, крезоксим-метил, метоминостробин, орисастробин, пикоксистробин, пираклостробин, пираметостробин, пираоксистробин, пирибенкарб, триклопирикарб, трифлоксистробин, (2E)-2-(2-{{[6-(3-хлор-2-метилфенокси)-5-фторпиридин-4-ил]окси}фенил)-2-(метоксимино)-N-метилэтанамиd, (2E)-2-(метоксиимино)-N-метил-2-(2-{{[1(E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден]амино}окси}метил)фенил)этанамиd, (2E)-2-(метоксимино)-N-метил-2-{2-[{{[1(E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден]амино}окси}метил]фенил)этанамиd, (2E)-2-(метоксимино)-N-метил-2-{2-[{{[1(E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден]амино}окси}метил]фенил)этанамиd, (2E)-2-{2-{{[1(E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден]амино}окси}метил}фенил)-2-(метоксимино)-N-метилэтанамиd, (2E)-2-{2-{{[1(E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден]амино}окси}метил}фенил)-2-(метоксимино)-N-метилэтанамиd, 2-хлор-N-(1,1,3- trimetil-2,3-дигидро-1Н-инден-4-ил)пиридин-3-карбоксамид, 5-метокси-2-метил-4-(2-{{[1(E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден]амино}окси}метил)фенил)-2,4-дигидро-3Н-1,2,4-триазол-3-он, метил-(2E)-2-{2-[(циклогептапиридин-2-ил)окси]метил}фенил)-2-(метоксимино)-N-метилэтанамиd, N-(3-этил-3,5,5-триметилциклогексил)-3-(формиламино)-2-гидроксибензамид, 2-{2-[(2,5-диметилфенокси)метил]фенил}-2-метокси-N-метилацемид, (2R)-2-{2-[(2,5-диметилфенокси)метил]фенил}-2-метокси-N-метилацемид, беномил, карбендазим, хлорфеназол, диэтрафенкарб, этабоксам, флуопиколид, фуберида-зол, пенцикурон, тиабендазол, тиофанат-метил, тиофанат, зоксамиd, 5-хлор-7-(4-метилпиридин-1-ил)-6-(2,4,6-трифторфенил)-1,2,4-триазоло [1,5-a]пиридин, 3-хлор-5-(6-хлорпиридин-3-ил)-6-метил-4-

(2,4,6-трифторменил) пиридин, бордосская жидкость, каптафол, каптан, хлороталонил, гидроксид меди, нафтенат меди, оксид меди, оксихлорид меди, сульфат меди (2+), дихлофлуанид, дитианон, додин, свободное основание додина, фербам, флуорофолпет, фолпет, гуазатин, гуазатин ацетат, иминоктадин, иминоктадин албесилат, иминоктадин триацетат, манкоппер, манкозеб, манеб, метирам, метирам цинк, оксин меди, пропамидин, пропинеб, сера, соединения серы, включая полисульфид кальция, тирам, толилфлуанид, цинеб, зирам, ацибензолар-8-метил, изотианил, пробеназол, тиадинил, андоприм, бластицидин-S, ципродинил, касугамицин, касугамицин гидрохлоридгидрат, мепанипирим, пираметанил, 3-(5-фторм-3,3,4,4-тетераметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)хинолин, фентин ацетат, хлорид фентин, фентин гидроксид, силтиофам, бентиаваликарб, диметоморф, флуморф, ипроваликарб, мандипропамид, полиоксины, полиоксорим, валидамицин А, валифеналат, бифенил, хлоронеб, диклоран, эдифенфос, этидиазол, иодокарб, ипробенфос, изопротиолан, пропамокарб, пропамокарб гидрохлорид, протиокарб, пиразофос, квинтоцен, текназен толклофос-метил, карпропамид, диклоцимет, феноксанил, фталид, пироквilon, трициклазол, 2,2,2-трифторметил{3-метил-1-[4-метилбензоил]амино}бутан-2-ил}карбамат, беналаксил, беналаксил-М (киралаксил), бупиримат, клозилакон, диметиримол, этиримол, фуралаксил, гимексазол, металаксил, металаксил-М (мифеноксам), офорас, оксадексил, оксолиновая кислота, хлозолинат, фенпиклонил, флудиоксанил, ипродион, процимидон, хиноксилен, винклозолил, бинапакрил, динокап, феримзон, флуазинам, метилдинокап, бентиазол, бетоксазин, капсимицин, карвон, хинометионат, пирифенон (хлазафенон), куфранеб, цифлуфенамид, цимоксанил, ципросульфамид, дазомет, дебакарб, дихлорофен, дикломезин, дифензокват, дифензокват метилсульфат, дифениламин, экомат, фенпиразамин, флуметовер, флуороимид, флусульфамид, флутинил, фосетил-алюминий, фосетил-кальций, фосетил-натрий, гексахлорбензол, иримамицин, метасульфокарб, метил изотиоцианат, метрафенон, милдиомицин, натамицин, никель диметилдитиокарбамат, нитротал-изопропил, октилион, оксамокарб, оксифентин, пентахлорфенол и соли, фенотрин, фосфористая кислота и ее соли, пропамокарб-фосетилат, пропанозин-натрий, проквиназид, пираморф, (2E)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, (2Z)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, пирапол-нитрин, тебуфлоквин, теклофталам, толнифанид, триазоксид, трихламид, зариламид, (3S,6S,7R,8R)-8-бензил-3-[{3-[{изобутирилокси}метокси]-4-метоксиридин-2-ил}карбонил]амино]-6-метил-4,9-диоксо-1,5-диоксонан-7-ил-2-метилпропаноат, 1-(4-{4-[{5R}-5-(2,6-дифторменил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-{4-[{5S}-5-(2,6-дифторменил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-{4-[5-(2,6-дифторменил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]этанон, 1-(4-{4-[5-(2,6-дифторменил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)-2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]этанон, 2-бутокси-6-иод-3-пропил-4Н-хромен-4-он, 2-хлор-5-[2-хлор-1-(2,6-дифторменил)-4-метил-1Н-имидаэол-5-ил]пиридин, 2-фенилфенол и соли, 3-(4,4,5-трифторм-3,3-диметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)хинолин, 3,4,5-трихлорпиридин-2,6-дикарбонитрил, 3-[5-(4-хлорфенил)-2,3-диметил-1,2-оксазолидин-3-ил]пиридин, 3-хлор-5-(4-хлорфенил)-4-(2,6-дифторменил)-6-метилширидин, 4-(4-хлорфенил)-5-(2,6-дифторменил)-3,6-диметилиширидин, 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-тиол, 5-хлор-N'-фенил-N'-(проп-2-ин-1-ил)тиофен-2-сульфонигидразид, 5-фторм-2-[{4-фторбензил}окси]пиридин-4-амин, 5-фторм-2-[{4-метилбензил}окси]пиридин-4-амин, 5-метил-6-октил[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-7-амин, этил(2Z)-3-амино-2-циано-3-фенилпроп-2-еноат, N'-{4-[3-(4-хлорбензил)-1,2,4-тиадиазол-5-ил]окси}-2,5-диметилфенил)-N-этил-N-метилимидоформамид, N-(4-хлорбензил)-3-[3-метокси-4-(проп-2-ин-1-илокси)фенил]пропанамид, N-[{4-хлорфенил}(циано)метил]-3-[3-метокси-4-(проп-2-ин-1-илокси)фенил]пропанамид, N-[{5-бром-3-хлорпиридин-2-ил}метил]-2,4-дихлорпиридин-3-карбоксамид, N-[{5-бром-3-хлорпиридин-2-ил}метил]-2-фтор-4-иод-пиридин-3-карбоксамид, N-({E}-[(циклогексилметокси)имино][{6-(дифторметокси)-2,3-дифторменил}метил]-2-фенил-ацетамид, N-({Z}-[(циклогексилметокси)имино][{6-(дифторметокси)-2,3-дифторменил}метил]-2-фенилацетамид, N'-{4-[3-трет-бутил-4-циано-1,2-тиазол-5-ил]окси}-2-хлор-5-метил фенил)-N-этил-N-метилимидоформамид, N-метил-2-(1-{5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил}ацетил)пиперидин-4-ил)-N-(1,2,3,4-тетрагидроафтален-1-ил)-1,3-тиазол-4-карбоксамид, N-метил-2-(1-{5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил}ацетил)пиперидин-4-ил)-N-[(1R)-1,2,3,4-тетрагидроафтален-1-ил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид, N-метил-2-(1-{5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил}ацетил)пиперидин-4-ил)-N-[(1S)-1,2,3,4-тетрагидроафтален-1-ил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид, пентил{6-[{[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)(фенил)-метилиден]-амино}окси]метил}пиридин-2-ил}карбамат, феназин-1-карбоновая кислота, хинолин-8-ол, хинолин-8-ол сульфат (2:1), трет-бутил{6-[{[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)(фенил)-метилен]-амино}окси]метил}пиридин-2-ил}карбамат, 1-метил-3-(трифторметил)-N-[2'-

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

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

В определенных аспектах настоящего изобретения соединение гербицидов-противоядий содержит первый ингибитор HPPD и второй ингибитор HPPD. В других аспектах настоящего изобретения эффект противоядия достигается путем применения эффективного количества соединения ингибитора HPPD и по меньшей мере одного дополнительного гербицида. Такие смеси обеспечивают повышенную толерантность сельскохозяйственной культуры (т.е. снижение гербицидной токсичности). Данный способ позволяет увеличить нормы предпосевных или послепосевных внесений химических составов.

В другом аспекте настоящего изобретения предоставляется сайт для нацеленной вставки гетерологичных нуклеиновых кислот, кроме Avena Sativa HPPD, которая находится в том же самом месте, что и SYHT0H2 (см. примеры 5 и 6).

В еще одном аспекте настоящего изобретения семена соевого растения, содержащего событие SYHT0H2, а также различные части соевого растения, могут быть использованы для питания человека, животноводческого корма, а также в качестве сырья в промышленности. Семена сои можно измельчать или компонент семян сои может быть извлечен для включения данного компонента в состав пищевых или кормовых продуктов.

Соя является ведущим в мире источником растительного масла и шрота. Масло, полученное из соевых бобов, используют в качестве кулинарного жира, маргарина и заправки для салатов. Соевое масло состоит из насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот. Оно имеет в составе типичную смесь 11% пальмитиновой, 4% стеариновой, 25% олеиновой, 50% линолевой и 9% линолено-вой жирных кислот ("Economic Implications of Modified Soybean Traits Summary Report", Iowa Soybean Promotion Board and American Soybean Association Special Report 92S, May 1990). Изменения в составе жирных кислот для повышения устойчивости к окислению и питательной ценности пользуется постоянным спросом. Промышленное использование соевого масла, которое подвергают дальнейшей переработке, включает ингредиенты для красок, пластмасс, волокон, моющих средств, косметических средств, смазочных материалов и биодизельного топлива. Соевое масло может быть расщепленным, интерэтери-

фицированным, сульфированным, эпоксидированным, полимеризованным, этоксилированным или расщепляемым. Разработка и получение производных соевого масла с улучшенной функциональностью и улучшенным химическим составом является быстро развивающейся областью. Типичная смесь триглицеридов, как правило, является расщепленной и разделенной на чистые жирные кислоты, которые затем смешивают со спиртами, полученными из нефти, или кислотами, азотом, сульфонатами, хлорином, или с жирными спиртами, полученными из жиров и масел.

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

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

Процесс производства данной продукции может протекать, например, следующим образом: (i) нагревание бобов до 82°C до содержания в них всего лишь 9% влаги; (ii) размещение в бочках в течение от 24 до 72 ч; (iii) дробление бобов с целью удаления оболочки так, что остатки составляют от  $\frac{1}{4}$  до  $\frac{1}{8}$  исходных бобов; (iv) удаление оболочки посредством всасывания воздуха, (v) нагревание остатков при 71°C в течение от 20 до 30 мин, (vi) прессование остатков в мелкие хлопья толщиной от 1,2 до 1,6 мм; (vii) обработка с созданием "сухариков" с помощью механического давления и пара; (viii) отмывание гексаном с целью разбавления жиров; (ix) нагревание при 100°C в течение 20 мин для испарения жиров (восстановленные жиры создают соевое масло), (x) дополнительный нагрев для удаления гексана, (xi) прессование сухариков частями от 2 до 4 мм с получением соевой муки или прессование в соевый кормовой жмых.

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

#### Соединения и применения.

В следующих таблицах приведены примеры возможных наборов для скрещивания, которые могут быть скрещены с SYHT0H2, включая (i) известные трансгенные события (см. табл. 2), (ii) возможные сочетания признаков, которые могут быть генетически сконструированы в SYHT0H2, или (iii) генетически сконструированные в новом трансгенном событии, а затем скрещенные с SYHT0H2 (см. табл. 3), а также возможные гербицидные композиции для использования в таких наборах (см. табл. 2 и 3).

Для любого из этих соединений всегда можно (i) использовать только ингибитор HPPD (например, от 25 до 500 г/га сулькотриона, от 25 до 250 г/га мезотриона, от 25 до 250 г/га бициклопираона, от 25 до 250 г/га изоксафлютоля, от 25 до 250 г/га темботриона, от 5 до 250 г/га топрамезона), от 5 до 250 г/га пирасульфатола, (ii) использовать соединение в виде баковой смеси и/или (iii) использовать применение в виде повторного применения. В этом смысле "+", указанный в приведенных ниже таблицах, означает любое применение указанных гербицидов к той же части растений. Оно включает как смеси, так и повторные применения, где время и порядок применения могут варьировать.

Таблица 2

		трифлоксисульфурана, трибенурон-метиля, тиазопира, дикосулама, клорансулам-метиля, флукарбазона, фуметусулама, тиенкарбазона, хлоримурон-этила
г.	5-250г/га пирасульфлат + (неизбыточно) 5-500 г/га любого гербицида или смеси гербицидов, выбранных из группы, состоящей из просульфурана, примильтурурана, триасульфурана, бенсульфурана, никосульфурана, римесульфурана, примильтурурана, тифенсульфурана, форамасульфурана, хлорсульфурана, галосульфурана, имазахина, имазапина, имазамина, имазетамина, имазамокса, иодосульфурана, метсульфурана, мезосульфурана, сульфосульфурана, трифлоксисульфурана, трибенурон-метиля, тиазопира, дикосулама, клорансулам-метиля, флукарбазона, фуметусулама, тиенкарбазона, хлоримурон-этила	
Устойчивость к глифосату	a. 25-500г/га сулькотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата	
например, EPSPS (например, GTS 40-3-2, MON89788, FG72, DP-356043-5) и устойчивость к глифосинату	b. 25-250г/га мезотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата	
например, рап/бар (например, A2704-12, DAS-68416-4, A5547-127, GU262)	c. 25-250г/га бишкотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата	
	d. 25-250г/га изоксафилотола + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата	
	e. 25-250г/га тембротриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата	
	f. 5-250г/га топрамезона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата	
	g. 5-250г/га пирасульфлато + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината+ (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата	
Устойчивость к глифосату	a. 25-500г/га сулькотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 50-2000 г/га дикамба	
например, EPSPS (например, GTS 40-3-2, MON89788, FG72, DP-356043-5) и устойчивость к глифосинату	b. 25-250г/га мезотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 50-2000 г/га дикамба	
например, рап/бар (например, A2704-12, DAS-68416-4, A5547-127, GU262) и толерантность к дикамбе (например, MON87708)	c. 25-250г/га бишкотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 50-2000 г/га дикамба	
	d. 25-250г/ра изоксафилотола + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 50-2000 г/га дикамба	
	e. 25-250г/ра тембротриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 50-2000 г/га дикамба	
	f. 5-250г/ра топрамезона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 50-2000 г/га дикамба	
	g. 5-250г/га пирасульфлато + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 50-2000 г/га дикамба	
Устойчивость к глифосату	a. 25-500г/га сулькотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 100-2000 г/га 2,4-D	
например, EPSPS (например, GTS 40-3-2, MON89788, FG72, DP-356043-5)	b. 25-250г/га мезотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 100-2000 г/га 2,4-D	
и устойчивость к глифосинату	c. 25-250г/га бишкотриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 100-2000 г/га 2,4-D	
например, рап/бар (например, A2704-12, DAS-68416-4, A5547-127, GU262) и толерантность к 2,4-D (например, DAS-68416-4, DAS-40278-9)	d. 25-250г/ра изоксафилотола + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 100-2000 г/га 2,4-D	
	e. 25-250г/ра тембротриона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 100-2000 г/га 2,4-D	
	f. 5-250г/ра топрамезона + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 100-2000 г/га 2,4-D	
	g. 5-250г/га пирасульфлато + (неизбыточно) 200-1500 г/га глюфосината + (неизбыточно) 350-2000 г/га глифосата + (неизбыточно) 100-2000 г/га 2,4-D	

Таблица 3

Молекулярный набор, содержащий в дополнение:	Гербицидная композиция, содержащая
Устойчивость к глифосату, например, EPSPS, GAT, GOX	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата b. 25-250г/га мезотриона + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата c. 25-250г/га бициклипирона + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата d. 25-250г/га изоксафилотола + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата e. 25-250г/га темботриона + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата f. 5-250г/га топрамезона + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата g. 5-250г/га пирацульфатола + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата
Устойчивость к глифосинату например, PAT, BAR	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глифосината b. 25-250г/га мезотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глифосината c. 25-250г/га бициклипирона + (необязательно) 200-1500 г/га глифосината d. 25-250г/га изоксафилотола + (необязательно) 200-1500 г/га глифосината e. 25-250г/га темботриона + (необязательно) 200-1500 г/га глифосината f. 5-250г/га топрамезона + (необязательно) 200-1500 г/га глифосината g. 5-250г/га пирацульфатола + (необязательно) 200-1500 г/га глифосината
Тolerантность к 2,4-D, например, tfdA, AAD-1, AAD-12, AAD-13	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D b. 25-250г/га мезотриона + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D c. 25-250г/га бициклипирона + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D d. 25-250г/га изоксафилотола + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D e. 25-250г/га темботриона + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D f. 5-250г/га топрамезона + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D g. 5-250г/га пирацульфатола + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D
Тolerантность к	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 50-2000 г/га дикамбам









	примисульфурана, триасульфурана, бенсульфурана, никосульфурана, римсульфурана, примисульфурана, тиофенсульфурана, формасульфурана, хлорсульфурана, галосульфурана, имазахина, имазапика, имазатира, имазамокса, иодосульфурана, метсульфурана, мезосульфурана, сульфосульфурана, трифлоксисульфурана, трибенурон-метила, тиазопира, диклосулама, клорансулам-метила, флукарбазона, флуметсулама, тиенкарбазона, хлоримурон-этила + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D
g.	5-250 г/га пирасульфатола + (необязательно) 200-1500 г/га глифосинат + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 5-500 г/га любого гербицида или смеси гербицидов, выбранных из группы, состоящей из просульфурана, примисульфурана, триасульфурана, бенсульфурана, никосульфурана, римсульфурана, примисульфурана, тиофенсульфурана, формасульфурана, хлорсульфурана, галосульфурана, имазахина, имазапика, имазатира, имазамокса, иодосульфурана, метсульфурана, мезосульфурана, сульфосульфурана, трифлоксисульфурана, трибенурон-метила, тиазопира, диклосулама, клорансулам-метила, флукарбазона, флуметсулама, тиенкарбазона, хлоримурон-этила + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D

Эти таблицы приведены исключительно в качестве примеров. Возможные признаки, которые могут быть включены в набор для скрещивания или генетически сконструированные в SYHT0H2, включают, но не ограничиваются именами, признаками, кодирующими устойчивость к глифосату (например, устойчивые растения или бактериальные EPSPS, GOX, GAT), устойчивость к глифосинату (например, PAT, BAR), ацетолактатсингазе (ALS), ингибирующей устойчивость к гербицидам (например, имидазолинам [таким, как имазетапир], сульфонилмочевинам, триазолопиримидин сульфонанилиду, пирмидинилтиобензоатам и другим химикатам), устойчивость к бромоксинилу (например, Bxn), устойчивость к ингибиторам НРРД (например, 4-гидроксилфенил-пируват-диоксигеназе из бактерий Pseudomonas, Avena Sativa) фермента, устойчивость к ингибиторам фитоин десатуразы (PDS), устойчивость к фотосистеме II, ингибирующей гербициды, (например, psbA), устойчивость к фотосистеме I, ингибирующей гербициды, устойчивость к протопорфирина IX (PPO)-ингибирующей гербициды (например, фомезафену, ацифлуорfen -натрию, оксифлуорфену, лактофену, флутиацет-метилу, сафлуфенацилу, флумиоксазину, флумиклорак-пентилу, карфентразон-этилу, сульфентразону), устойчивость к гербицидам на основе фенилмочевины (например, CYP76B1), устойчивость к 2,4-D (например, арилокси алканоат диоксигеназе или tfdA, AAD-1, AAD-12 или AAD-13), гомогентизату соланесилтрансферазы (например, HST) дикамба-разрушающим ферментам (например, DMO) и другим, могут быть состыкованы по отдельности или в различных соединениях, чтобы обеспечить способность эффективно бороться с миграциями сорняков или предупреждать их и/или устойчивость к гербицидам любого из упомянутых выше классов.

Приведенные выше индивидуализированные гербицидные композиции могут дополнительно содержать один или несколько соевых селективных гербицидов, выбранных из группы, состоящей из ацетохлора, ацифлуорфена, ацифлуорфен-натрия, аклонифена, алахлорома, аллидохлора, аллоксидима, аллоксидим натрия, аметрина, амикарбазона, амидохлора, амидосульфурана, аминоциклических хлорхлоров, аминоциклических хлорхлоров-калия, аминоциклических хлорхлоров-метила, аминопирамида, амитрола, аммониумсульфамата, анилофоса, азулама, атразина, азафенидина, азимсульфурана, бефлубутамида, беназолина, беназолин-этила, бенфлуралина, бенфуресата, бенсульфурана, бенсульфуран-метила, бензулид, бентазона, бензобициклина, бензофенапа, бициклопирона, бифенокс, биланафоса, биланафос-натрия, биспиребака, биспиребака-натрия, бромасила, бромобутида, бромфеноксима, бромоксина, бромоксинаил-бутират, калий-, гептаноат октаноат бисоксина, бутахлора, бутафенацила, бутамифоса, бутенахлора, бутрилина, бутроксидима, бутилатома, кафенстрола, карбетамида, карфентразона, карфентразон-этала, хлорамбена, хлорбромурана, хлорфенака, хлорфенак-натрия, хлорфенпропа, хлорфлуренола, хлорфлуренол-метила, хлоридазона, хлоримурона, хлоримурон-этала, хлорфталамида, хлоротулурона, хлортал-диметила, хлорсульфурана, цинидона, цинидон-этала, цинметилина, цинносульфурана, клетодима, клодинафопа, клодинафоп-пропаргила, кломазона, кломепропа, клопирамида, клорансулама, клорансулам-метила, кумилурана, цианамида, цианазина, циклоата, циклосульфамурана, циклоксидима, цигалофопа, цигалофоп-бутила, ципразина, 2,4-D, 2,4-D-бутила, -бутила, -диметиламмония, -диоламина, -этала, 2-этилгексила, дазомета, -изобутила, -изооктила, -изопропиламмония, -калия и -триисопропаноламмония троламина, 2,4-DB, 2,4-DB-бутил, -диметиламмония, -изооктила, -калия и натрия, даймурона (димронана), далапона, N-деканола, десмедифама, детосил-пиразолата (DTP), дикамбы, дихлобенила, дихлорпропа, дихлорпроп-P, диклофопа, диклофоп-метила, диклофоп-P-метила, диклосулама, дифензоквата, дифлуфениканы, дифлуфензопира, дифлуфензопир-натрия, димефурана, димепиперата, диметахлора, диметаметрина, диметенамида, диметенамида-P, диметрасульфурана, динитрамина, динотерба, дифенамида, дикватома, дикватом-дибромида, дитиопира, диурона, DNOC, эндотала, EPTC, эспрокарба, эталфлуралина, этаметсульфурана, этаметсульфуран-метила, этиозина, этофумесата, этоксифена, этоксифен-этала, этоксисульфурана, этоbenзанида, F-5231, например, N-{2-хлор-4-фтор-5-[4-(3-фторпропил)-5-оксо-4,5-дигидро-1Н-тетразол-1-ил]фенил}этансульфонамида, F-7967, например, 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)пирамидин-2,4(1Н,3Н)-диона, феноксапропа, феноксапропа-P, феноксапроп-этала, феноксапроп-P-этала, феноксасульфона, фентразамида, флампропа, флампроп-M-изопропила, флампроп-M-метила, флазасульфурана, флорасулама, флуазифопа, флуазифопа-P, флуазифоп-бутила, флуазифоп-P-бутила, флукарбазона, флукарбазон-натрия, флуцетосульфурана, флухлорали-

на, флуфенацета (тиафлуамида), флуфенпира, флуфенпур-этила, флуметсулама, флумиклорака, флумиклорак-пентила, флумоксазина, флуометурана, флуренола, флуренол-бутила, диметиламмоний-и-метила, флуорогликофена, флуорогликофен-этила, флуоропаната, флуорисульфурона, флуорисульфурон-метилнатрия, флуридона, флурохлоридона, флуроксипира, флуроксипир-меттила, флуртамон флутиацета, флутиацет-меттила, флутиамида, фомезафена, фомезафен-натрия, форамсульфурона, фозамина, глюфосината, глюфозинат-аммония, глюфосинат-Р-натрия, глюфосинат-Р-аммония, глюфосинат-Р-натрия, глифосата, глифосата аммония-изопропиламмония, диаммонийфосфат-, -диметиламмония, -калия, натрия и тримесиума, Н-9201, т.е. О-(2,4-диметил-6-нитрофенил)-О-этил-изопропилфосфорамидотиоата, галозафена, галосульфурона, галосульфурон-меттила, галоксифопа, галоксифопа-Р, галоксифоп-этоксиэтила, галоксифоп-Р-этоксиэтила, галоксифоп-меттила, галоксифоп-Р-меттила, гексазиона, HW-02, т.е 1-(диметоксифосфорил)этил-(2,4-дихлорфенокси)ацетата, имазаметабенза, имазаметабенз-меттила, имазамокса, имазамокс-аммония, имазапика, имазапик-аммония, имазапира, имазапир-изопропиламмония, имазахина, имазахина-аммоний, имазетапира, имазетапир-иммония, имазосульфурона, инданофана, индацифрама, иодосульфурона, иодосульфурон-метил-натрия, иоксинила, иоксинил-октаноат-калия и натрия, ипфенкарбазона, изопротурана, изуурана, изоксабена, изоксафлутола, карбутилата, КУН-043, т.е. 3-{[5-(дифторметил)-1-метил-3-(трифтористил)-1Н-пиразол-4-ил]метил}сульфонил)-5,5-диметил-4,5-дигидро-1,2-оксазола, кетоспирадокса, лактофена, кенацила, кинурана, МСРА, МСРА-бутотиля, -диметиламмония, -2-этилгексила, -изопропиламмония, -калия и -натрия, МСРВ, МСРВ-меттила, -этила и -натрия, мекопропа, мекопроп-натрия и -бутотиля, мекопропа-Р, мекопроп-Р-бутотиля, диметиламмония, -2-этилгексила и -калия, мефенацета, мефлуидила, мезосульфурона, мезосульфурон-меттила, мезотрион, метабензтиазурана, метама, метамифора, метамитрана, метазахлора, метазосульфурона, метабензтиазурана, метиопирсульфурона, метиозолина, метил изотиоцианата, метобромурана, метолахлорома, S-метолахлор, метосулама, метоксурона, метрибузина, метсульфурона, метсульфурон -меттила, молината, монолинурана, моносульфурона, моносульфурон-эфира, МТ-128, например 6-хлор-N-(2E)-3-хлорпроп-2-ен-1-ил]-5-метил-N-фенилпиридазин-3-амина, МТ-5950, т.е. N-(3-хлор-4-изопропилфенил)-2-метилпентан амида, NGG-011, напропамида, NC-310, т.е. [5-(бензилокси)-1-метил-1Н-пиразол-4-ил](2,4-дихлорфенил)метанона, небурана, никосульфурона, нонановой кислоты (пеларгоновой кислоты), норфлуразона, олеиновой кислоты (жирной кислоты), орбенкарба, ортосульфамурон, орезалин, оксади-аргил, оксадиазон, оксафульфурон, оксацикломефон, оксифлуорфена, параквата, дихлорида параквата, пебулата, пендиметалина, пеноксилама, пентахлорфенола, пентоксазона, петоксамида, нефтяных масел, фенмедифама, пиклорам пиколинафена, пиноксадена, пиперофоса, претилахлора, примисульфурона, примисульфурон-меттила, продиамина, прифлуралина, профоксидима, прометон прометрина, пропахлора, пропанила, пропаквизафора, пропазина, профама, прописохлора, пропоксикарбазона, пропоксикарбазон-натрия, пропирисульфурона, пропизамида, просульфокарба, просульфурона, пираклонила, пирафлуфена, пирафлуфен-этила, пирасульфотола, пиразолината (пиразолата), пиразосульфурона, пиразосульфурон-этила, пиразоксифена, пирибамбенза, пирибамбенз- изопропила, пропил-пирибамбенза, пирибензоксима, пирибутикарба, пиридафола, пиридата, пирифталида, пиrimинобака, пиrimинобак-меттила, пиримисульфана, пиритиобака, пиритиобак-натрия, пироксасульфона, пироксилама, квинклорака, квинмерака, квинокламина, хизалофопа, хизалофоп-этиал, хизалофопа-Р, хизалофоп-Р-этила, хизалофоп-Р-тефурила, римсульфурона, сафлуфенацила, сетоксидимома, сидурона, симазина, симетрина, сулькотриона, сульфентразона, сульфометурона, сульфометурон-меттила, сульфосульфурона, SW-065, SYN-523, SYP-249, т.е. 1-этокси-3-метил-1-оксобут-3-ин-2-ил 5-[2-хлор-4-(трифторметил)фенокси]-2-нитробензоата, SYP-300, т.е. 1-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-ин-1-ил)-3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-6-ил]-3-пропил-2-тиоксоимидазолидин-4,5-диона, 2,3,6-TBA, TGA (трихлоруксусной кислоты), ТСА-натрия, тебутиурон, тефуритриона, темботриона, тепралоксидима, тербацила, тербукарба, тербуметона, тербутилазина, тербутрин, тенилхлора, тиазопира, тиенкарбазона, тиенкарбазон-меттила, тифенсульфурона, тифенсульфурон-меттила, тиобенкарба, топрамезона, траллоксидим триафамона, три-аллата, триасульфурона, триазифлама, трибенурана, трибенуран-меттила, триклопира, триетазина, трифлоксисульфурона, трифлоксисульфурон-натрия, трифлуралина, трифлусульфурона, трифлусульфурон-метил тритосульфурона, мочевины, сульфат вернолата, ZJ-0862, т.е. 3,4-дихлор-N-{2-[(4,6-диметоксипирамидин-2-ил)окси]бензил}анилина или регуляторов роста растений, выбранных из группы, состоящей из ацибензолара, ацибензолар-S-меттила, 5-аминолевулиновой кислоты, анцимидола, 6-бензиламинопурина, брас-синолида, катехина, хлормекватхлорида, клоропра, цикланилида, 3-(циклогепт-1-енил)пропионовой кислоты, даминосизда, дазомета, n-деканола, дикегулака, дикегулак-натрия, эндотала, эндотал-дикалия, -динатрия и моно-(N,N-диметилалкиламмония), этефона, флуметралина, флуренола, флуренол-бутила, флурпримидола, форхлорфенурана, гиберелловой кислоты, инабенфида, индол-3-уксусной кислоты (IAA), 4-индол-3-ил-масляной кислоты, изопротиолана, пробеназола, жасминовой кислоты, гидразида малеиновой кислоты, мепикватхлорида, 1-метилсуклопропена, метил жасмоната, 2-(1-нафтил)-ацетамида, 1-нафтилуксусной кислоты, 2-нафтилуксусной кислоты, смеси нитрофенолата, паклобутразола, N-(2-фенилэтил)-бета-аланина, N-полуамид фенилфталевой кислоты, прогексадиона, прогексадион-кальция, прогидрожасмона, салициловой кислоты, стриголактона, текназена, тидаизурона, триаконтанола, тринексапака, тринексапак-этила, тсигодефа, униконазола-Р или подходящих в области

агрохимии солей или других их форм. Например, сочетание глифосата, мезотриона и S-метолахлора может быть применено к соевому растению, содержащему набор для скрещивания, содержащему в дополнение к SYTOH2 устойчивость к глифосату, например EPSPS (например, GTS 40-3-2, MON89788, FG72, DP-356043-5).

Приведенные выше индивидуализированные гербицидные композиции могут также содержать дополнительные HPPD-гербициды, в том числе до 2, 3, 4, 5, 6 или 7 гербицидов-ингибиторов HPPD. Примеры двунаправленных соединений гербицидов-ингибиторов HPPD включают: мезотрион+сулькотрион, мезотрион+темботрион, мезотрион+бициклопирон, мезотрион+топрамезон, мезотрион+изоксафлютол, мезотрион+пирасульфатол, сулькотрион+темботрион, сулькотрион+бициклопирон, сулькотрион+топрамезон, сулькотрион+изоксафлютол, сулькотрион+пирасульфатол, темботрион+бициклопирон, темботрион+топрамезон, темботрион+изоксафлютол, темботрион+пирасульфатол, бициклопирон+топрамезон, бициклопирон+изоксафлютол, бициклопирон+пирасульфатол, топрамезон+изоксафлютол, топрамезон+пирасульфатол, изоксафлютол+пирасульфатол. Примеры трехнаправленных комбинаций ингибиторов HPPD включают: мезотрион+сулькотрион+темботрион, мезотрион+сулькотрион+топрамезон, мезотрион+сулькотрион+бициклопирон, мезотрион+сулькотрион+изоксафлютол, мезотрион+сулькотрион+пирасульфатол, мезотрион+темботрион+топрамезон, мезотрион+темботрион+бициклопирон, мезотрион+темботрион+изоксафлютол, мезотрион+темботрион+пирасульфатол, мезотрион+бициклопирон+пирасульфатол, мезотрион+топрамезон+изоксафлютол, мезотрион+топрамезон+пирасульфатол, сулькотрион+темботрион+бициклопирон, сулькотрион+темботрион+топрамезон, сулькотрион+изоксафлютол, сулькотрион+топрамезон+изоксафлютол, сулькотрион+топрамезон+пирасульфатол, сулькотрион+бициклопирон+изоксафлютол, сулькотрион+бициклопирон+пирасульфатол, сулькотрион+изоксафлютол+пирасульфатол, темботрион+бициклопирон+топрамезон, темботрион+бициклопирон+изоксафлютол, темботрион+топрамезон+пирасульфатол, бициклопирон+топрамезон+изоксафлютол, бициклопирон+топрамезон+пирасульфатол, топрамезон+изоксафлютол+пирасульфатол.

### Примеры

Пример 1. Получение и определение соевого события SYHT0H2.

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

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

cAvHPPD-03

Начало: 1036 Конец: 2355

Соевой кодон-оптимизированный HPPD ген овса, кодирующий SEQ ID NO

14

cPAT-03-01

Начало: 3178 Конец: 3729

PAT Hoescht AO2774 синтетические S. viridoхромогены, кодоны растения

идентичные Q57146 фосфотриципин

Белок ацетилтрансферазы

cPAT-03-02

Начало: 4761 Конец: 5312

PAT Q57146 S. белок фосфотрицинацетилтрансферазы виридохромогенов, cPAT-03-

01 ДНК, но муттирует BamH1, Bgl2 сайты

cSpec-03

Начало: 6045 Конец: 6833

стрептомицин аденилтрансфераза; из Tn7 (aadA)

cVirG-01

Начало: 7133 Конец: 7858

G ген вирулентности из Agrobacterium tumefaciens (virGN54D,

содержащей TTG кодон начала) virGN54D, полученный из pAD1289, описанного в

Hansen et al. 1994, PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 91:7603-

7607

cRepA-01

Начало: 788 Конец: 8961  
 RepA, pVS1 белок репликации от A до G при nt735

eTMV-02  
 Начало: 965 Конец: 1032 (комплémentарный)  
 Вирус табачной мозаики (TMV\_Omega 5'UTR лидер последовательности, предназначенный для усиления экспрессии.

EMBL: TOTMV6  
 e35S-05  
 Начало: 608 Конец: 900 (Комплémentарный)  
 Вирус мозаики цветной капусты 35S участок энхансера с от C до T & C в т.и.п. изменениями.

eFMV-03  
 Начало: 408 Конец: 601 (Комплémentарный)  
 Энхансер вируса мозаики горичника.

bNRB-05  
 Начало: 4 Конец: 259 (Комплémentарный)  
 Правая граничная область Т-ДНК Agrobacterium tumefaciens нопалин типлаэмиды.

bNRB-01-01  
 Начало: 101 Конец: 125 (Комплémentарный)  
 Повтор правой границы Т-ДНК Agrobacterium tumefaciens нопалин типлаэмиды.

bNLB-03  
 Начало: 5636 Конец: 5765 (Комплémentарный)  
 Левая граничная область Т-ДНК Agrobacterium tumefaciens нопалин типлаэмиды.  
 (Zambryski *et al.* 1980, Science, 209:1385-1391) EMBL no: J01825.

bNLB-01-01  
 Начало: 5671 Конец: 5695 (Комплémentарный)  
 25 т.и.п. левой граничной области Т-ДНК нопалин типлаэмиды опухолеобразующей агробактерии.

pr35S-04-01  
 Начало: 2633 Конец: 3153  
 35S промотор; изначально определенный на карте длиной 64 т.и.п., точного соответствия в литературе не найдено (LF июль 2004 года)

prCMP-06  
 Начало: 4024 Конец: 4677  
 Промотор вириуса скручивания желтого листа Cestrum с лидерной последовательностью. Промотор транскрипта не полной длины. 528 пар оснований изменили с G на C для удаления внутреннего сайта RsrII.

oVS1-02  
 Начало: 9004 Конец: 9408  
 Исходная точка репликации и разбиения участка из плазиды pVS1 Pseudomonas (Itoh *et al.* 1984, Plasmid 11: 206-220); аналогичной номеру доступа GenBank U10487; служит в качестве источника репликации в хозяине опухолеобразующей агробактерии

oCOLE-06  
 Начало: 10086 Конец: 10892 (Комплémentарный)  
 ColE1 исходная точка функциональной репликации в E. coli

tNOS-05-01  
 Начало: 2372 Конец: 2624 (Комплémentарный)  
 NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы

tNOS-05-01  
 Начало: 3763 Конец: 4015  
 NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы

tNOS-05-01  
 Начало: 5341 Конец: 5593  
 NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы

Материал соевого растения можно соответствующим образом трансформировать, а плодоносящие растения регенерировать множеством способов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, плодоносящие морфологически нормальные трансгенные соевые растения могут быть получены путем 1) производства соматической эмбриогенетической ткани из, например, незрелой семядоли, гипокотиля или другой подходящей ткани; 2) трансформации путем бомбардировки частицами или инфицирования агробактериями и 3) регенерации растений. В одном примере, описанном в патенте США № 5024944, ткань семядоли вырезали из незрелых зародышей сои, необязательно с удаленной зародышевой осью и культивировали на гормонсодержащей среде с образованием соматического эмбриогенного растительного материала. Данный материал трансформируют в плодоносящие трансгенные соевые растения с использованием, например, прямых способов ДНК, баллистической трансфекции, покрытой ДНК, или инфицирования агробактериями, культивированными на подходящей селективной среде и регенерированными необязательно также в постоянном присутствии селективного агента. Селективными агентами могут быть антибиотики, такие как канамицин, гигромицин, или гербициды, такие как ингибитор HPPD, фосфинотрицин или глифосат, или в качестве альтернативы селекция может быть ос-

нована на экспрессии визуализируемого маркерного гена, такого как GUS. Целевые ткани для преобразования включают меристему, сомаклональную эмбриогенетическую ткань и цветочную или создающую цветок ткань. Другие примеры трансформации сои включают физические способы доставки ДНК, такие как бомбардировка частицами (см. например, Finer & McMullen, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1991, 27P:175-182; McCabe et al., *Bio/technology*, 1998, 6:923-926), усов (Khalafla et al., *African J. of Biotechnology*, 2006, 5:1594-1599), аэрозольное введение бобам (патент США № 7001754) или опосредованные агробактериями способы доставки (Hinchee et al., *BioTechnology*, 1988, 6:915-922; патент США № 7002058; опубликованные патентные заявки США №№ 20040034889 и 20080229447, Paz et al., *Plant Cell Report*, 2006, 25:206-213).

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

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

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

Вставку события SYHT0H2 и фланкирующие последовательности получали сочетанием двух способов: создания библиотеки лямбда и GENOMEWALKER™ (Clontech). Секвенирование события SYHT0H2 проводили, используя способ Сэнгера секвенирования ДНК. Анализ последовательности проводили с использованием программы анализа последовательности SEQUENCER® (Gene Codes Corporation). Геномную ДНК из соевого события SYHT0H2 изолировали для получения библиотеки лямбда путем изолирования геномной ДНК и ограничения расщепления рестрикционными ферментами BamHI, EcoRI и KpnI до завершения, описанного поставщиком рестриктазы (NEB). Неполное расщепление геномной ДНК завершали, применяя BfuCI при 0.15U/мкг ДНК при 37°C. Образцы отбирали через 2, 4, 6, 8 и 10 мин после добавления фермента. Образцы объединяли для загрузки в гель. Расщепленные образцы загружали в 1%-ный агарозный гель TAE и запускали в течение ночи при 20V. Фракции изолировали для каждого расщепления, BfuCI; 2-4 т.п.н., BamHI; 0.7-3,5 т.п.н. и EcoRI-KpnI, 3-6 т.п.н. ДНК выделяли из геля, используя® QIAQUICK Gel Extraction Kit, согласно описанию поставщика (Qiagen). Изолированные фракции сшивали с лямбда Zap Экспресс вектором (Lambda Zap Express vector) (Stratagene), разрезанным либо BamHI, либо EcoRI-KpnI. Организовали дотировки, применяя соотношение 1000 нг вектора на 100 нг вставки в 10 мкл объема с 200U лигазы в течение ночи при 6°C.

Библиотеки компоновали с использованием Maxplaq согласно описанию поставщика (Epicentre).

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

Библиотеку подвергали проверке на отдельные клонны, которые содержали вставленные гетерологичные последовательности. Бактериальные клетки, используемые для посева библиотеки XL-1MRA, приобретали у Stratagene. XL-1MRA клетки выращивали в бульоне NZY с добавлением 0,2% мальтозы в течение 6 ч перед использованием. Зараженные бактериальные клетки сеяли на планшетах с L-агаром, подготовленных путем заливки L-агара на 25×150 мм планшеты, нагретые при 37°C перед использованием. Бактериальные клетки собирали с помощью центрифугирования при 4К и ресуспенсирования клеток в SM буфере (Stratagene). 300 мкл бактериальных клеток и 50000 фага смешивали в 15 мл пробирке (Fisher Scientific) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. 9 мл NZY линейной агарозы добавляли и смешивали посредством инверсии, а полученную смесь распределяли по всей поверхности больших планшетов для сохранения гладкой поверхности. Изготавливали 10 планшетов на библиотеку. Для в общей сложности проверенных 500 000 фагов на библиотеку. Инокулированные планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день растения удаляли и оставляли при 4°C по меньшей мере на 1 ч.

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

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

Зонды получали посредством PCR с праймерами MT\_SOY\_F2 и MT\_SOY\_R3, используя pSYN15764 в качестве матрицы:

```
P_MTSOY_F2
TTTGTTGGTCGTCACTGCGTT
(SEQ ID NO: 25)

P_MTSOY_R3
CAGGATATATTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAA
(SEQ ID NO: 26)
```

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

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

Амплифицированный фрагмент изолировали в 1%-ном агарозном ТАЕ геле. ДНК очищали от агарозы, используя набор для удаления геля QIAQUICK (Qiagen). Зонд помечали случайными штрихами, используя REDIPRIME™ II набор (GE Amersham) с радиоактивным dCT<sup>32</sup>P. Зонд отделяли от единичной метки с помощью спин-колонки GE Amersham G-50. Зонд нагревали в течение 5 мин при 95°C перед добавлением к буферу для гибридизации. Гибридизация происходила в течение ночи при 62°C. Фильтры отмывали сначала 2X SSC, 0,5% SDS в течение 30 мин при 62°C, а затем с 0,2 X SSC, 0,2% SDS в течение 30 мин при 62°C. Фильтры оборачивали в полимерную пленку и подвергали воздействию пленки Kodak Biomax XAR в течение 16-24 ч при -80°C.

Позитивные капли закупоривали пробкой диаметром 8 мм и помещали в 500 мкл буфера SM с 25 мкл хлороформа и позволяли элюировать в течение ночи при 6°C. Фаги разбавляли 1/7500 SM в буфере для 2-го этапа скрининга. В общей сложности 1000 pfu (бляшкообразующих единиц) проверили во 2-ом этапе. В тестах 2-го этапа повторяют процесс, используемый для тестов 1-го этапа. Это делали для каждого положительного клона, выявленного в тестах 1-го этапа. Данный процесс можно повторять до изолирования отдельной бляшки.

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

В дополнение к описанному выше способу секвенирования сайт встраивания гетерологичной вставленной полинуклеотидной последовательностью соевого события SYHT0H2 также секвенировали,

используя универсальный комплект BD GENOMEWALKER™. Границу 1 (LB1), фланкирующую последовательности для события SYHT0H2, восстанавливали, используя комплект BD GENOMEWALKER™. Как указано в инструкции к набору, геномную ДНК из соевого события SYHT0H2 изолировали и полностью расщепляли путем соединения 8 мкл ДНК (~10 нг/мкл), 1 мкл 10X буфера EcoRV и 1 мкл EcoRV в стерильной микроцентрифужной пробирке и инкубирования при 37°C.

EcoRV расщепленную ДНК лигировали к адаптеру BD GENOMEWALKER™ согласно описанию в инструкции производителя. Для амплификации ДНК, которая содержит гетерологичную вставленную полинуклеотидную последовательность соевого события SYHT0H2, два генспецифичных праймера (GSP1 и GSP2) создавали на основе последовательности левой граничной области 15954 трансформационной векторной последовательности. GSP2 вкладывают в продукт PCR, созданный с помощью амплификации GSP1 и праймера, созданного на основе последовательности адаптера BD GENOMEWALKER™.

Таблица 4

Наименование праймера	Последовательность праймера
GSP1/FlkSeq 0027	GAGTCCCGCAATTATACATTAAATACGCGATAGAA SEQ ID NO: 27
GSP2/FlkSeq 0005	GGCCAGCATGCCGTATCCGCAATGTGTT SEQ ID NO: 28

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

Параметры последовательности, созданной с помощью и последовательности библиотеки лямбда, и секвенирования GENOMEWALKER™, объединяли для создания последовательности сайта встраивания соевого события SYTH0H2. Нуклеотидную последовательность завершенной вставки определяют как SEQ ID NO: 9, а нуклеотидную последовательность вставки, окруженной геномной ДНК, определяют как SEQ ID NO: 10. Дополнительные нуклеотидные последовательности, которые описывают LB2 и LB1 соединения вставленной и фланкирующей геномной ДНК, определяют как SEQ ID NO: 1-6 (см. табл. 1, с. 3).

Пример 2. PCR анализ трансформационного события.

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

CGGGCGGCCAGCATGGCGTATCCGCAATGTGTTATTAAAGTTGTCT

AAACCCSTAACCCAATGGCAC (SEQ ID NO: 24).

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

GGATGAAGAGATGAGAGAACCATCACAGAATTGACGCTTAGACAA

CTTAATAACACATTGCGGATACGGC (SEQ ID NO: 25)

Таблица 5

A1720	P10325 (праймер)	CGGGCGGCCAGCAT (SEQ ID NO: 11)
	P12721 (праймер)	GTGCCATTGGTTAGGGTTAGAC (SEQ ID NO: 12)
	P12722 (зонд)	FAM-ATCCGCAATGTGTTATTAA-MGB* (SEQ ID NO: 13)
A1721	P10043 (праймер)	GCCGTATCCGCAATGTGTTA (SEQ ID NO: 14)
	P12723 (праймер)	GGATGAAGAGATGAGAGAACCATCA (SEQ ID NO: 15)
	P12724 (зонд)	FAM-TAAGTTGTCTAACGTCAATT-MGB* (SEQ ID NO: 16)

FAM - карбоксифлуоресцин;

MGB - дигидроциклический трипептид, связывающийся с малой бороздой;

\*BGB - меченный зонд также может быть использован.

Таблица 6

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

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

Таблица 7

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

Таблица 8

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

#### Пример 3. Эффективность события SYHT0H2 в полевых условиях.

Событие SYHT0H2 соевых растений протестирували на эффективность действия в отношении мезотриона в 5 местах на территории Соединенных Штатов. Нетрансгенную линию сои Jack использовали в качестве контроля. Соевые растения, как SYHT0H2, так и Jack, обрабатывали 210 г а. и./га мезотриона на V2/V3 этапе, а затем оценивали на процентную долю листьев с повреждениями на 4-7 дней после обработки (DAT), 13-17 DAT и 25-33 DAT. Результаты в табл. 9 показывают эффективность OH2 в отношении мезотриона по сравнению с контрольной линией.

Таблица 9

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

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

Таблица 10

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

#### Пример 4. Маркеры для картирования и селекции скрещиванием.

Фланкирующую последовательность из LB2 (SEQ ID NO: 7) или фланкирующую последовательность LB1 (SEQ ID NO: 8) вставки SYHT0H2 привели в соответствие с 8Х базой данных генома сои (т.е. базой данных "Phytozome" в ведении объединенного института генома (Joint Genome Institute) и центра интегративной геномики (Center for Integrative Genomics), доступной во всемирной сети Интернет, см. также Schmutz et al., (2010) Nature 463:178-183) с помощью средства поиска основного локального выравнивания (BLAST; Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215:403-410; Altschul et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402), также доступного в сети Интернет. LB2 привели в соответствие с хромосомой номер 8 (группа сцепления A2) из нуклеотида 9905212-9905310. LB1 привели в соответствие с хромосомой 8 (группа сцепления A2) из нуклеотида 9905326-9905788. Физические позиции затем сравнивали с физическими позициями маркеров, перечисленных в консенсусной карте сои 4.0 (Hyten et al. Crop Sci., 2010, 50:960-968). Идентифицировали позицию сантиморганиды ближайшего маркера, все маркеры в пределах 10 сантиморганид приведены в табл. 9. Эти данные показывают, что вставка гетерологичной полинук-

леотидной последовательности в событии SYHT0H2 происходила на соевой хромосоме 8 в месте между парами оснований 9905310 и 9905326, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 24 между нуклеотидами 99 и 116. После вставки гетерологичной последовательности, содержащей последовательность HPPD, удаляют 16 пар оснований геномной последовательности, которые соответствуют нуклеотидам 100-115 SEQ ID NO: 24.

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

Таблица 11

Общепринятое название маркера	LG	cM	Тип
Sat_400	A2	43,8	SSR
BARC-032503-08989	A2	44,5	SNP
BARC-045047-08867	A2	45,6	SNP
BARC-028361-05839	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05840	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05841	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05842	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05843	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05844	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05845	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05846	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05847	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05848	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05849	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05850	A2	45,7	SNP
BARC-028361-05851	A2	45,7	SNP
BARC-018419-02910	A2	46,0	SNP
BARC-018419-02911	A2	46,0	SNP
BARC-018419-02912	A2	46,0	SNP
BARC-016861-02355	A2	46,1	SNP
Satt632	A2	46,3	SSR
Sat_157	A2	46,4	SSR
BARC-021329-04038	A2	46,4	SNP
BARC-021329-04039	A2	46,4	SNP
BARC-016685-03321	A2	46,4	SNP
Sat_162	A2	46,6	SSR
BARC-018023-02498	A2	46,7	SNP
BARC-018023-02499	A2	46,7	SNP
BARC-028309-05824	A2	46,8	SNP
BARC-028309-05825	A2	46,8	SNP
BARC-028309-05826	A2	46,8	SNP
BARC-040339-07714	A2	47,0	SNP
BARC-040339-07715	A2	47,0	SNP
BARC-030485-06876	A2	47,2	SNP
BARC-050171-09440	A2	47,3	SNP
BARC-012193-01743	A2	47,6	SNP
BARC-010097-00518	A2	47,6	SNP
Sat_215	A2	47,9	SSR
BARC-059853-16139	A2	48,0	SNP
BARC-015419-01822	A2	48,2	SNP
BARC-027690-06633	A2	49,0	SNP
BARC-021831-04219	A2	49,0	SNP
BARC-021831-04220	A2	49,0	SNP
BARC-027726-06646	A2	49,3	SNP
BARC-057257-14650	A2	49,3	SNP
Satt187	A2	49,9	SSR
BARC-027618-06620	A2	50,0	SNP
BARC-027618-06621	A2	50,0	SNP
BARC-027618-06622	A2	50,0	SNP
BARC-027618-06623	A2	50,0	SNP
BARC-027618-06624	A2	50,0	SNP
BARC-026091-05255	A2	50,4	SNP
Sat_212	A2	50,7	SSR
BARC-065571-19573	A2	51,3	SNP

BARC-040029-07638	A2	52,2	SNP
BARC-040029-07639	A2	52,2	SNP
BARC-040029-07640	A2	52,2	SNP
BARC-043119-08535	A2	52,3	SNP
BARC-038631-07266	A2	52,4	SNP
BARC-053809-12037	A2	52,4	SNP
BARC-018083-02511	A2	52,5	SNP
BARC-018083-02512	A2	52,5	SNP
BARC-013857-01257	A2	52,6	SNP
BARC-013857-01258	A2	52,6	SNP
BARC-017983-02492	A2	53,0	SNP
BARC-039145-07456	A2	53,1	SNP
BARC-039145-07457	A2	53,1	SNP
BARC-029007-06050	A2	53,4	SNP
Satt424	A2	53,6	SSR
BARC-020307-04547	A2	55,1	SNP
BARC-020307-04548	A2	55,1	SNP
BARC-020307-04549	A2	55,1	SNP
BARC-020307-04550	A2	55,1	SNP
BARC-020307-04551	A2	55,1	SNP
BARC-045081-08872	A2	55,1	SNP
BARC-019749-04349	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04350	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04351	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04352	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04353	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04354	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04355	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04356	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04357	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04358	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04359	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04360	A2	56,4	SNP
BARC-019749-04361	A2	56,4	SNP
BARC-013587-01167	A2	56,6	SNP
BARC-013587-01169	A2	56,6	SNP
BARC-013587-01170	A2	56,6	SNP
BARC-029671-06301	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06302	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06303	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06304	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06305	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06306	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06307	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06308	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06309	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06310	A2	56,7	SNP
BARC-029671-06311	A2	56,7	SNP
BARC-039393-07313	A2	56,7	SNP
BARC-027614-06615	A2	56,9	SNP
BARC-027614-06616	A2	56,9	SNP
BARC-027614-06617	A2	56,9	SNP
BARC-027614-06618	A2	56,9	SNP
BARC-027614-06619	A2	56,9	SNP
BARC-016661-02162	A2	57,2	SNP
BARC-016661-02163	A2	57,2	SNP
BARC-044327-08668	A2	58,2	SNP
BARC-044869-08827	A2	58,9	SNP
BARC-044869-08828	A2	58,9	SNP
BARC-018941-03041	A2	59,3	SNP
BARC-018941-03042	A2	59,3	SNP
BARC-030759-06940	A2	60,1	SNP
BARC-030759-06941	A2	60,1	SNP
BARC-030759-06942	A2	60,1	SNP
BARC-014665-01611	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01612	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01613	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01614	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01615	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01616	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01617	A2	61,1	SNP
BARC-014665-01618	A2	61,1	SNP
BARC-029865-06449	A2	61,5	SNP
BARC-044217-08646	A2	61,9	SNP
BARC-013567-01162	A2	62,2	SNP
BARC-013567-01163	A2	62,2	SNP

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

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

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

С помощью описанной выше идеи специалист может использовать способы, известные в области техники, для направления трансгенов к тому же сайту встраивания, что и в SYHT0H2, или к сайту в непосредственной близости от сайта встраивания в SYHT0H2. Один такой способ описан в опубликованной патентной заявке США № 20060253918, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Коротко, до 20 т.п.н. геномной последовательности, фланкирующей 5' к сайту встраивания (например, SEQ ID NO: 7, геномные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 7, и геномные последовательности, гомологичные SEQ ID NO: 7) и до 20 т.п.н. геномной последовательности, фланкирующей 3' к сайту встраивания (например, SEQ ID NO: 8, геномные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 8, и геномные последовательности, гомологичные SEQ ID NO: 8) используют для фланкирования целевого гена или генов, которые предназначают для вставки путем гомологичной рекомбинации, сайт интеграции которых находится у сайта события SYHT0H2 или вблизи него. Данные последовательности можно дополнительно фланкировать путем повторов границы Т-ДНК, как например, повторов последовательностей левой границы (LB) и правой границы (RB) и других усиливающих последовательностей для повышения эффективности доставки Т-ДНК. Целевой ген или гены могут быть размещены именно так, как в сайте встраивания SYHT0H2, или могут быть размещены в любом месте в пределах 20 т.п.н. участков вблизи сайтов встраивания SYHT0H2, чтобы обеспечить постоянный уровень экспрессии трансгенов без вредного воздействия на растения. ДНК-векторы, содержащие целевой ген или гены и фланкирующие последовательности, могут быть доставлены в клетки растений с помощью одного из нескольких способов, известных специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ею, опосредованную агробактериями трансформацию. Вставку ДНК вектора в целевой сайт SYHT0H2 можно дополнительно усилить одним из нескольких способов, включая, но не ограничиваясь ими, коэкспрессию или повышение экспрессии усиливающих рекомбинацию генов или снижение экспрессии эндогенных генов подавления рекомбинации. Более того, в данной области техники известно, что расщепление специфических последовательностей в геноме можно использовать для увеличения частоты гомологичной рекомбинации, поэтому вставка в сайт встраивания SYHT0H2 и ее фланкирующие участки могут быть усилены путем экспрессии природных или искусственно созданных распознавающих последовательность эндонуклеаз для расщепления этих последовательностей.

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

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

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

стью, фланкирующей сайт встраивания SYHT0H2, могут быть доставлены в клетки растений. Таким образом, окружая целевой ген или гены геномной последовательностью, фланкирующей сайт встраивания SYHT0H2, экспрессию таких генов стабилизируют в трансгенном растении-хозяине, включая как однодольные, так и двудольные растения.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Сингента Партиципейшнс АГ

<120> СОЕВОЕ СОБЫТИЕ SYHT0H2, А ТАКЖЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ

<130> 72722WOPCT

<150> US61/423131

<150> US61/467621

<160> 28

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 1

accatcacag aattgacgct

20

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 2

taaaccctaa accaatggca

20

<210> 3

<211> 40

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Получена из Glycine max и Avena sativa

<400> 3

agatgagaga accatcacag aattgacgct tagacaactt

40

<210> 4

<211> 40

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

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

<400> 4  
ttaagttgtc taaaccctaa accaatggca cacaaaaatt 40

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

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

<400> 5  
taggatgaag agatgagaga accatcacag aattgacgct tagacaactt aataacacat 60

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

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

<400> 6  
caatgtgtta ttaagttgtc taaaccctaa accaatggca cacaaaaatt cccatcctag 60

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

<400> 7  
acatatacta cataagaagg aggtggagaa agtgtatgt accgacaaca aaaaactaat 60  
aggatatatat aggatgaaga gatgagagaa ccatcacag 99

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

<400> 8  
accaatggca cacaaaaatt cccatcctag ttttgagt aattaatgaa ctagcaatta 60  
tataataagc tctgtatctg ttatattctg cattaatttt gttgaataaa aaacactgt 120  
aattaattgg tcatgtgtta tattttgcac actaatttt ttttaaaaa aggtggaga 180  
gcgtgatatt tttagttgtc cagaaaataa agattgaaaa atttgaatgt atttggcac 240  
tgggatactt taaaaattag aaggcacctt attgttact tcgatcggag aaaaataata 300  
aaatccttta tatgttaatt tatttcaatt tgtatgtctg tagtaggaat attaaagtag 360  
acatttatca ttaatctcat tattagtctt tcctttgtta gaatctcggt aattttatta 420

actaactttt aaataactct ctagaggaat gaacaaaata at	462
<210> 9	
<211> 7914	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Последовательность Avena sativa, оптимизированная для экспрессии в Glycine max	
<400> 9	
aattgacgct tagacaactt aataacacat tgccgatacg gccatgctgg ccgcggggc	60
atggtaacca attcccgatc tagtaacata gatgacaccg cgccgcataa tttatcctag	120
tttgcgcgt atattttgtt ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg gactctaattc	180
ataaaaaaccc atctcataaaa taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg	240
taattcaaca gaaatttatata gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag	300
aaactttatt gccaaatgtt tgaacgatcg gggaaattcg gggatctaga gctcgactca	360
tatctggta actggcctaa ctggccttgg aggagctggc aactcaaaat ccotttgcca	420
aaaaccaaca tcatgccatc caccatgctt gtatccagct gcgcgcaatg tacccgggc	480
tgtgtatccc aaagcctcat gcaaccta ac agatggatcg tttggaaggc ctataacagc	540
aaccacagac ttaaaacctt gcgcctccat agacttaagc aaatgtgtt acaatgtaga	600
tcctaggccc aaccttgat gcctatgtga cacgtaaaca gtactctcaa ctgtccaatc	660
gtaagcgttc ctagccttcc agggccagc gtaagcaata ccagccacaa caccctcaac	720
ctcagcaacc aaccaagggt atctatcttgc caacctctt agatcatcaa tccactcttgc	780
tgggtttgt ggctctgtcc taaagttcac tgttagacgtc tcaatgtaat ggttaacgtat	840
atcacaaacc gccccatata cagctgctgt agctggccta atctcaactg gtctcctctc	900
cggagacatg gtgggatcct gtaattgtaa atagtaatttga taatgttgg tgggtttgt	960
tgggtttgtt aattgttgta aaaatactcg agggttttagt ttttacaaa cgactccaac	1020
aaagtatcaa gttttattca aacagaatga tacagatttta aatatcggtt ttttacaaa	1080
ccatatgata tttatcaatt cagtgatcct atacggacgg tggagacaaa aatcatcaag	1140
aatcatctt gagatgagaa agcttagctc ttacctgttt tcgtcgtctt ggctttctt	1200
cttcctggcc acctgcctga atacttcgccc gccttgacta cttcttaggtt acttgctctc	1260
tttctctctc taggactatc tctctgagat tttgctccct taacaatgag ggaggggcta	1320
agtattttata gactgacggg tgagtggaca tttcccaaacc tacccctact tatttcgtaa	1380
gcccttacgt cattgctcca ttattggagt ctgaagatgc cttcacatgg tggaccccca	1440
cctgtcggcc acgaatctta tttgttcgtc agaaaaagcc aaaccgactg cacagtttt	1500

## 031999

ccatcggtt	agggaccact	tttgttattga	ttaaaggcag	ccgacctaac	ctttgtcaga	1560
cgcattattt	cacgcgtttt	cttttacaga	ttccatcttc	atttgtggaa	cagtatgtct	1620
gccactttgt	ctgccagtaa	ttaaacgcgg	tccggatcta	gtaacataga	tgacaccgcg	1680
cgcgataatt	tatcctagtt	tgcgcgctat	attttgtttt	ctatcgctta	ttaaatgtat	1740
aattgcggga	ctctaatacat	aaaaacccat	ctcataaata	acgtcatgca	ttacatgtta	1800
attattacat	gcttaacgta	attcaacaga	aatttatatga	taatcatcgc	aagaccggca	1860
acaggattca	atcttaagaa	actttattgc	caaatgtttt	aacgatctgc	aggtcgaccc	1920
atggcgccga	tatcactagt	tcagatctgg	gtaactggcc	taactggct	tggaggagct	1980
ggcaactcaa	aatccctttg	ccaaaaacca	acatcatgcc	atccaccatg	cttgtatcca	2040
gctgcgcgca	atgtaccccg	ggctgtgtat	ccaaagcct	catgcaacct	aacagatgga	2100
tcgtttggaa	ggcctataac	agcaaccaca	gacttaaaac	cttgcgcctc	catagactta	2160
agcaaatgtg	tgtacaatgt	ggatcctagg	cccaaccttt	gatgcctatg	tgacacgtaa	2220
acagtactct	caactgtcca	atcgtaagcg	ttccttagcct	tccagggccc	agcgtaagca	2280
ataccagcca	caacaccctc	aacctcagca	accaaccaag	ggtatctatc	ttgcaacctc	2340
tctagatcat	caatccactc	ttgtgggttt	tgtggctctg	tcctaaagtt	cactgtagac	2400
gtctcaatgt	aatggtaac	gatatcacaa	accgcggcca	tatcagctgc	tgtagctggc	2460
ctaattctcaa	ctggctcct	ctccggagac	atggtgact	agtgatttca	gcgtgtcctc	2520
tccaaatgaa	atgaacttcc	ttatatacag	gaagggctt	gcgaaggata	gtgggattgt	2580
cgctcatccc	ttacgtcagt	ggagatatca	catcaatcca	cttgcttga	agacgtggtt	2640
ggaacgtctt	cttttccac	gatgctcctc	gtgggtgggg	gtccatctt	gggaccactg	2700
tcggcagagg	catcttcaac	gatggccttt	cctttatcgc	aatgatggca	ttttaggag	2760
ccacccctt	tttccactat	cttcacaata	aagtgcacaga	tagctggca	atggaacctt	2820
tgctgctgca	catggacttg	ctgtcagatc	tgtggagct	taatatccgg	aaacccctc	2880
ggattccatt	gccccagctat	ctgtcacttt	attgtgaaga	tagtgaaaaa	ggaagggtggc	2940
tcctacaaat	gccatcattt	cgataaagga	aaggctatcg	ttgaagatgc	ctctgcccac	3000
agtggtccca	aagatggacc	cccacccacg	aggagcatcg	tggaaaaaaga	agacgttcca	3060
accacgtctt	caaagcaagt	ggattgtatgt	gatatctcca	ctgacgtaag	ggatgacgaa	3120
caatcccaact	atccttctgc	aggtcgactc	tagaggatcc	tataaatagg	aagttcattt	3180
cattttggaga	ggaaacacctg	agtattttta	caacaattac	caacaacaac	aaacaacaaa	3240
caacattaca	attactattt	acaattacac	atatgcctcc	aacaccagct	actgctactg	3300
gagctgctgc	tgctgccgtt	acaccagaac	atgctgcaag	gtcattccct	agagttgttc	3360
gcgttaaccc	taggtctgac	agattccctg	ttctgtcctt	ccatcatgtg	gagctttgggt	3420

gtgctgatgc agctagtgt gctggcggt tcagcttgc acttggagca ccacttgctg	3480
caagatctga tctgtctaca gggaaactcag cacatgcttc ttcctactt cgatctggag	3540
cattagcctt ctttttacc gtccttatg ctccacactcc acaagaagct gcaactgctg	3600
caactgcttc cattccctcc ttttcagcag atgctgcaag aaccttgct gctgcacatg	3660
gacttgctgt cagatctgtt ggagtaggg ttgctgatgc agctgaagca ttgcgtta	3720
gtgttgcgg aggagcaaga cctgctttg ctccaggcaga tcttggcac ggatttggac	3780
ttgctgaagt ggagctgtat ggagatgtgg ttctgagatt cgtgagctat cctgacgaaa	3840
ctgacctacc atttctccca ggattcgaga gggttcaag tccaggtgca gttgactacg	3900
gtttgactcg ctttgaccac gttgttggaa acgttccaga aatggctcct gtcatcgact	3960
acatgaaggg attccttgggt ttccacgagt tcgctgaatt cacagcagag gatgttggaa	4020
ccacagaatc tggactgaac agtgtggttc tagccaacaa cagtgaagct gttttctgc	4080
cattgaacga gcctgttcat ggaaccaaga gacgatctca gatccaaacc tacctcgaat	4140
accatggtgg accaggagtt caacacatcg cattggcttc taacgatgtg cttcgaactc	4200
tcagggaaat gagagccaga actccaatgg gagggttcga atttatggct cttccacaag	4260
ccaagtacta tgaaggagtc cgtagaatcg ctggagatgt cttgtcagag gaacagatca	4320
aggagtgtca agaactgggt gttctcggt atcgagacga tcaaggtgtg ctactccaga	4380
tcttcaccaa accagttgggt gatcgcccc ctttttcct cgaaatgatt cagcgaatag	4440
gatgcatttga gaaggatgaa gttggcaag agtaccagaa aggtggatgt ggtgggtttg	4500
gaaaggggaa cttttccgag ttgttcaagt ccatagagga ctacgagaag tcactggaag	4560
tcaaggcagtc tgtcggtgct cagaagagct aagagcttt catatgacga tcgttcaaacc	4620
atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgcgg gtcttgcgtt gattatcata	4680
taatttctgt tgaattacgt taagcatgtataaataaca tgtaatgcattt gacgttattt	4740
atgagatggg ttttatgt tagagtcccg caattataca tttaataacgc gatagaaaaac	4800
aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat	4860
cgcggaccca gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actgcgcgtt aagactggcg	4920
aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc gtcaacatgg	4980
tggagcacga cacgcttgc tactccaaa atatcaaaga tacagtctca gaagacaaa	5040
gggcaattga gactttcaa caaagatgac tttcaacaa agggtaatat ccggaaacct	5100
cctcggattt cattgcccag ctatctgtca ctttattgtt aagatgtgg aaaaggaagg	5160
tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc	5220
cgacagtggc cccaaagatg gaccccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt	5280

tccaaaccacg tcttcaaaggc aagtggattg atgtgatatac tccactgacg taagggatga	5340
cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttccctctata taaggaagtt catttcattt	5400
ggagaggaca cgctgaaatc actagtccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat	5460
taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtat atcgtaacc attacattga	5520
gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaaccacca caagagtggta ttgatgatct	5580
agagaggttg caagatagat acccttggtt ggttgcttag gttgagggtg ttgtggctgg	5640
tattgcttac gctggccct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtag	5700
tgtttacgtg tcacataggc atcaaagggtt gggcctagga tccacattgt acacacattt	5760
gcttaagtct atggaggcgc aaggtttaa gtctgtggtt gctgttatag gcottccaaa	5820
cgtccatct gtttaggtgc atgaggctt gggatacaca gcccgggta cattgcgcgc	5880
agctggatac aagcatggtg gatggcatga tggtggttt tggcaaaggg atttttagtt	5940
gccagctcct ccaaggccag ttaggccagt taccagatc tgaacttagt atatggcgc	6000
catgggtcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc	6060
tgttgccggc cttgcgatga ttatcatata atttctgtt aattacgtt aagoatgtat	6120
aattaacatg taatgcata cgttatttt gagatgggtt tttatgatta gagtccgc	6180
attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatacgcc gcaaactagg ataaattatc	6240
gcgcgcggc tcatctatgt tactagatcc ggaccgcgtt taattactgg cagacaaagt	6300
ggcagacata ctgtcccaca aatgaagatg gaatctgtaa aagaaaacgc gtgaaataat	6360
gcgtctgaca aaggttaggt cggctgcctt taatcaatac caaagtggtc cctaccacga	6420
tggaaaaact gtgcagtcgg ttggcttt tctgacgaac aaataagatt cgtggccgac	6480
aggtgggggt ccaccatgtg aaggcatctt cagactccaa taatggagca atgacgttaag	6540
ggcttacgaa ataagtaagg gtagttggg aaatgtccac tcacccgtca gtctataaat	6600
acttagcccc tccctcattt ttaagggagc aaaatctcag agagatagtc ctagagagag	6660
aaagagagca agtagcctag aagtagtcaa ggcggcgaag tattcaggca ggtggccagg	6720
aagaagaaaa gccaagacga cggaaacagg taagagctaa gctttctcat ctc当地atg	6780
attcttgcgtt atttttgtct ccaccgtccg tataggatca ctgaattgtat aaatatcata	6840
tgtttgtat aaaacccgtt atttaaatct gtatcattct gtttgaataa aacttgatac	6900
tttggggag tcgtttgtaa aaacataaaac cctcgagtat ttttacaaca attaccaaca	6960
acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac tatttacaat tacaggatcc caccatgtct	7020
ccggagagga gaccagttga gattaggcca gctacagcag ctgatatggc cgccgtttgt	7080
gatatcgta accattacat tgagacgtct acagtgaact ttaggacaga gccacaaaca	7140
ccacaagagt ggattgatga tctagagagg ttgcaagata gatacccttg gttgggttgct	7200

gagggttggg	gtgttgtggc	ttgttattgtctacgctgggc	cctggaaggc	taggaacgct	7260	
tacgattgga	cagttgagag	tactgtttac	gtgtcacata	ggcatcaaag	gttgggccta	7320
ggatctacat	tgtacacaca	tttgcttaag	tctatggagg	cgcaagggtt	taagtctgtg	7380
gttgctgtta	taggccttcc	aaacgatcca	tctgttaggt	tgcatgaggc	tttgggatac	7440
acagccccggg	gtacattgcg	cgcagctgga	tacaagcatg	gtggatggca	tgtatgttggt	7500
ttttggcaaa	gggattttga	gttgccagct	cctccaaggc	cagttaggcc	agttaccagg	7560
atatgagtcg	agctctagat	ccccgaattt	ccccgatcgt	tcaaacattt	ggcaataaaag	7620
tttcttaaga	ttgaatcctg	ttgccggtct	tgcgatgatt	atcatataat	tttgttgaa	7680
ttacgttaag	catgtaataa	ttaacatgta	atgcatgacg	ttatttatga	gatgggtttt	7740
tatgattaga	gtcccgcaat	tatacattta	atacgcgata	aaaaacaaaaa	tatagcgcgc	7800
aaactaggat	aaattatcgc	gcgcgggtgtc	atctatgtta	ctagatcggg	aattgggtac	7860
catgccccggg	cggccagcat	ggccgtatcc	gcaatgtgtt	attaagtgt	ctaa	7914

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9206

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Получена из Glycine max и Avena sativa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; иной\_признак

&lt;222&gt; (1)..(821)

&lt;223&gt; геномный участок, называемый LB2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; иной\_признак

&lt;222&gt; (822)..(8735)

&lt;223&gt; гетерологичная вставленная ДНК

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; иной\_признак

&lt;222&gt; (8736)..(9206)

&lt;223&gt; геномная flankирующая последовательность, называемая LB1

&lt;400&gt; 10

tgatcttaaa	aattcaaagt	ccacctaatt	tgacaaggaa	agcaccaggt	agcgtttcat	60	
ctaattgtttt	ctccatata	ttgactat	ttt acccaagt	ttc	atgacgatgt	caacaatgca	120
agttgtacga	ctaaacttct	tccttgc	ataaaatg	cc	atctattact	gtcacaaagg	180
aagtgtttta	ctgtcttata	agttagttt	g	attacataag	ttttatttag	taaacgagct	240
tattaattta	ttgcatttata	tttaggtggc	caaaatagaa	ta	gaggatcc	agagttatct	300
aataatttct	tatataaatg	ggtctagatt	taacaaaaat	gaatcaaaat	catttatgt	360	

**031999**

tgattattct actttatata tatgagggaaa cttaaaaggt tatttttta ttattatgtat	420
attgatatag aatatttatac aatttttttg aaaatttattt tttgatataa aatctgattg	480
accatttta ataaatttt tccttacaat gacgaaaa tatatacaag atgaatttaa	540
aatttaattt atggggatcg aatttaaata tcgattaatg acttaatgat actctaagct	600
aatttagtt tacataattt agaatgaggc accaacattc ttgtggtaat attaaattt	660
ctgttactt tttttacgt aaatgatact tgattagaag atgactaata aatgaaggct	720
ttacatatac tacataagaa ggaggtggag aaagtgtatg taaccgacaa caaaaaacta	780
ataggaatat ataggatgaa gagatgagag aaccatcaca gaattgacgc ttagacaact	840
taataacaca ttgcggatac ggccatgctg gccgccccgg catggtaccc aattcccgat	900
ctagtaacat agatgacacc gcgcgcgata atttaccta gtttgcgcgc tatattttgt	960
tttctatcgc gtattaaatg tataattgcg ggactctaata cataaaaaacc catctcataa	1020
ataacgtcat gcattacatg ttaatttattt catgcttaac gtaattcaac agaaattata	1080
tgataatcat cgcaagaccc gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt	1140
ttgaacgatc gggaaattc gggatctag agctcgactc atatctgggt aactggccta	1200
actggccttg gaggagctgg caactcaaaa tcccttgcc aaaaaccaac atcatgccat	1260
ccaccatgct tgtatccagc tgcgcaat gtacccccc ctgtgtatcc caaagcctca	1320
tgcacaccaa cagatggatc gtttggagg cctataacag caaccacaga cttaaaacct	1380
tgcgcctcca tagacttaag caaatgtgtg tacaatgttag atcctaggcc caacctttga	1440
tgcctatgtg acacgtaaac agtactctca actgtccaaat cgtaaggcggt cctagccttc	1500
cagggccccag cgtaagcaat accagccaca acaccccaa cctcagcaac caaccaaggg	1560
tatctatctt gcaacctctc tagatcatca atccactctt gtgggttttgg tggctctgtc	1620
ctaaagttca ctgttagacgt ctcaatgtaa tggtaacga tatcacaaac cgoggccata	1680
tcagctgctg tagctggcct aatctcaact ggttcctct ccggagacat ggtgggatcc	1740
tgttaattgta aatagtaatt gtaatgttgt ttgttgtttg ttgttgttgg taattgttgt	1800
aaaaatactc gagggtttat gttttacaa acgactccaa caaagtatca agttttattt	1860
aaacagaatg atacagattt aaatatcggg ttttatacaa accatatgat atttatcaat	1920
tcagtgatcc tatacggacg gtggagacaa aaatcatcaa gaatcatctt tgagatgaga	1980
aagcttagct cttacctgtt ttcgtcgct tggctttct tcttcctggc cacctgcctg	2040
aatacttcgc cgccttgact acttcttaggc tacttgctct ctttctctct ctaggactat	2100
ctctctgaga ttttgctccc ttaacaatga gggagggct aagtattttt agactgacgg	2160
gtgagtggac atttccaaa ctacccttac ttatcgta agcccttacg tcattgctcc	2220
attattggag tctgaagatg ctttcacatg gtggaccccc acctgtcgac cacgaatctt	2280

atttgttcgt cagaaaaagc caaacggact gcacagttt tccatgtgg tagggaccac	2340
tttggtattt attaaaggca gccgacctaa ccttgcgtac acgcattatt tcacgcgttt	2400
tctttacag attccatctt catttgcgtgg acagtatgtc tgccactttg tctgccagta	2460
attaaacgcg gtccggatct agtaacatag atgacaccgc gcgcgataat ttatcctagt	2520
ttgcgcgcta tattttgttt tctatcggtt attaaatgtt taattgcgtgg actctaatac	2580
taaaaaccca tctcataaat aacgtcatgc attacatgtt aattattaca tgottaacgt	2640
aattcaacag aaatttatatg ataatcatcg caagaccggc aacaggattc aatcttaaga	2700
aactttattt ccaaataatgttt gaacgatctg caggtcgacc catggcgccg atatcactag	2760
ttcagatctg ggtaactggc ctaactggcc ttggaggagc tggcaactca aaatcccctt	2820
gcacaaaacc aacatcatgc catccaccat gcttgcgtcc agctgcgcgc aatgtacccc	2880
gggctgtgtt tcccaaagcc tcatgcaacc taacagatgg atcggttggaa aggctataaa	2940
cagcaaccac agacttaaaa cttgcgcct ccatacgtt aagcaaatgt gtgtacaatg	3000
tggatcctag gcccaacctt tgatgcctat gtgacacgtt aacagtactc tcaactgtcc	3060
aatcgtaagc gttcctagcc ttccaggccc cagcgtaagc aataccagcc acaacaccct	3120
caacctcagc aaccaaccaa gggtatctat ctgcacacct ctctagatca tcaatccact	3180
cttgcgtgtt ttgtggctt gtcctaaagt tcactgttaga cgtctcaatg taatggttaa	3240
cgatatcaca aaccgcggcc atatcagctg ctgtagctgg cctaatctca actggctcc	3300
tctccggaga catgggtggac tagtgatttc agcgtgtcct ctccaaatga aatgaacttc	3360
cttatataga ggaagggtct tgcgaaggat agtgggattt tgcgtcatcc cttacgtcag	3420
tggagatatc acatcaatcc acttgctttt aagacgtgg tggAACGTCT tcttttcca	3480
cgtatgcctt cgtgggtggg ggtccatctt tggaccact gtcggcagag gcatcttcaa	3540
cgtatggcctt tccttatcg caatgtatggc atttgcgtt ggcaccccttcc tttccacta	3600
tcttcacaat aaagtgcacat atagctgggc aatggAACCT ttgcgtgtc acatggactt	3660
gctgtcagat ctgtggagc ttaatatccg gaaaccccttcc cgattccat tgcccagcta	3720
tctgtcactt tattgtgaag atagtgaaa aggaagggtgg ctctacaaa tgcgtatcatt	3780
gcgataaaagg aaaggctatc gttgaagatg cctctgccga cagtggccc aaagatggac	3840
ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag	3900
tggattgtatc tgatatctcc actgacgtaa gggatgacga acaatccac tatccttctg	3960
caggtcgact ctagaggatc ctataaatag gaagttcatt tcatttggag agggaaacctc	4020
gagtattttt acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattactatt	4080
tacaattaca catatgcctc caacaccaggc tactgctact ggagctgctg ctgctgccgt	4140

tacaccagaa catgctgcaa ggtcattccc tagagttgtt cgcgttaacc ctaggtctga	4200
cagattccct gttctgtcct tccatcatgt ggagcttgg tgtgctgatg cagctagtgc	4260
tgctggtcgt ttcagcttg cacttggagc accacttgct gcaagatctg atctgtctac	4320
agggaaactca gcacatgctt ctctcctact tcgatctgga gcattagcct tccttttac	4380
cgctccttat gtcacaccc cacaagaagc tgcaactgct gcaactgctt ccattccctc	4440
ctttcagca gatgctgcaa gaaccttgc tgctgcacat ggacttgctg tcagatctgt	4500
tggagtagg gttgctgatg cagctgaagc atttcgcgtt agtggctg gaggagcaag	4560
acctgctttt gtcacaccc atcttggtca cggatttggaa cttgctgaag tggagctgta	4620
tggagatgtg gttctgagat tcgtgagcta tcctgacgaa actgacccat catttctccc	4680
aggattcgag agggtttcaa gtccaggtgc agttgactac ggtttgactc gctttgacca	4740
cgttggggaa aacgttccag aaatggctcc tgtcatcgac tacatgaagg gattccttgg	4800
tttccacgag ttgcgtgaat tcacagcaga ggatggttggaa accacagaat ctggactgaa	4860
cagtgtgggtt ctagccaaca acagtgaagc tgttcttctg ccattgaacg agoctgttca	4920
tgaacccaag agacgatctc agatccaaac ctacctcgaa taccatggc gaccaggagt	4980
tcaacacatc gcattggctt ctaacgatgt gcttcgaact ctcaggaaa tgagagccag	5040
aactccaaatg ggagggttcg aatttatggc tcctccacaa gccaaatgtc atgaaggagt	5100
ccgtagaatc gctggagatg tcttgcaga ggaacagatc aaggagtgtc aagaactggg	5160
tgttctcggtt gatcgagacg atcaagggtt gctactccag atcttcacca aaccagggttgg	5220
tgtatcgccc actttttcc tcgaaatgtat tcagcgaata ggatgcattgg agaaggatga	5280
agttggggcaa gagtaccaga aaggtggatg tggtgggtt ggaaaggggaa actttccga	5340
gttgttcaag tccatagagg actacgagaa gtcactggaa gtcaaggcgt ctgtcggtgc	5400
tcagaagagc taagagctt tcatatgacg atcggttcaaa catttggcaa taaaatgttct	5460
taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg	5520
ttaaggcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga	5580
ttagagtcggc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatacg cgccaaact	5640
aggataaatt atcgccgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgcggaccc agtcaaagat	5700
tcaaatacg gacctaacag aactcgccgt aaagactggc gaacagtca tacagagtct	5760
cttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acacgcttgt	5820
ctactccaaa aatatcaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agactttca	5880
acaaagatga ctttcaaca aaggtaata tccggaaacc tcctcggtt ccattgcccc	5940
gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag gtggctcta caaatgccat	6000
cattgcgata aaggaaaggc catcggttgc gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat	6060

ggaccccccac ccacgaggag catcgtaaa aaagaagacg ttccaaccac gtottcaaaag 6120  
 caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccactatcct 6180  
 tcgcaagacc cttcccttat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac acgctgaaat 6240  
 cactagtcca ccatgtctcc ggagaggaga ccagttgaga ttaggccagc tacagcagct 6300  
 gatatggccg cggttgtga tatcgtaac cattacattt agacgtctac agtgaacttt 6360  
 aggacagagc cacaaacacc acaagagtgg attgatgatc tagagaggtt gcaagataga 6420  
 tacccttggt tggttgctga gtttgagggt gttgtggctg gtattgctta cgctgggccc 6480  
 tggaggcta ggaacgctta cgattggaca gttgagagta ctgtttacgt gtcacatagg 6540  
 catcaaaggt tgggcctagg atccacattt tacacacatt tgcttaagtc tatggaggcg 6600  
 caaggttta agtctgttgt tgctgttata ggccttccaa acgatccatc tgttaggtt 6660  
 catgaggctt tgggatacac acgggggtt acattgcgcg cagctggata caagcatggt 6720  
 ggtatggcatg atgttggttt ttggcaaagg gatttgagt tgccagctcc tccaaggcca 6780  
 gttaggccag ttaccagat ctgaactagt gatatcgccg ccatggctg acctgcagat 6840  
 cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctgttgcgg tcttgcgtt 6900  
 attatcatat aatttctgtt gaattacgtt aagcatgtt taattaacat gtaatgcatt 6960  
 acgttattta tgagatgggt tttatgatt agagtccgc aattatacat ttaatacgct 7020  
 atagaaaaca aaatatacg cgcaaactag gataaattat cgcgccggt gtcatctat 7080  
 ttactagatc cggaccgcgt ttaattactg gcagacaaag tggcagacat actgtcccac 7140  
 aaatgaagat ggaatctgtt aaagaaaacg cgtgaaataa tgcgtctgac aaaggtagg 7200  
 tcggctgcct ttaatcaata ccaaagtggt ccctaccacg atggaaaaac tgtgcagtcg 7260  
 gtttggcttt ttctgacgaa caaataagat tcgtggccga caggtggggg tccaccatgt 7320  
 gaaggcatct tcagactcca ataatggagc aatgacgtt gggcttacga aataagtaag 7380  
 ggtagttgg gaaatgtcca ctcacccgtc agtctataaa tacttagccc ctccctcatt 7440  
 gttaaggag caaaatctca gagagatgt cctagagaga gaaagagagc aagtagccta 7500  
 gaagtagtca aggcggcgaa gtattcaggc aggtggccag gaagaagaaa agccaagacg 7560  
 acgaaaacag gtaagagcta agcttctca tctcaaagat gattcttgcatt gatTTTGTc 7620  
 tccaccgtcc gtataggatc actgaattttttaaaatcat atggttgtttaaaaacccga 7680  
 tatttaaatc tgtatcattc tgtttgaata aaacttgcata ctttgcgttgcgttgcatt 7740  
 aaaacataaa ccctcgagta ttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac 7800  
 attacaattttaatttacaa ttacaggatc ccaccatgtc tccggagagg agaccagttg 7860  
 agattaggcc agctacagca gctgatatgg ccgcggtttgcgttgcatttgcatttgcatt 7920

**031999**

ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg	7980
atctagagag gttgcaagat agataccctt gggtggttgc tgagggttag ggtgttgtgg	8040
ctggatttgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaacgc ttacgattgg acagttgaga	8100
gtactgtta cgtgtcacat aggcatcaa gggtgggcct aggtatcaca ttgtacacac	8160
atttgcttaa gtctatggag gcgcaagggtt ttaagtctgt gggtgctgtt ataggccttc	8220
caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctggggata cacagcccg ggtacattgc	8280
gcgcagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttg ttttggcaa agggatttg	8340
agttgccagg tcctccaagg ccagtttaggc cagttaccca gatatgagtc gagctctaga	8400
tccccgaatt tccccgatcg ttcaaaccatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct	8460
gttgccggtc ttgcgtat tatcatataa tttctgtga attacgttaa gcatgtaata	8520
attaacatgt aatgcgtatgt gttatttatg agatgggtt ttatgattag agtcccgc当地	8580
ttatacattt aatacgcgtat agaaaacaaa atatacgccg caaactagga taaattatcg	8640
cgcgcgggtgt catctatgtt actagatcgg gaattggta ccatgcccgg gcggccagca	8700
tggccgtatc cgcaatgtgt tattaagttg tctaaaccct aaaccaatgg cacacaaaaa	8760
ttccccatcct agttttgga gtaattaatg aactagcaat tatataataa gctctgtatc	8820
tgttatattc tgcattaatt ttgttgaata aaaaacactg taaattaatt ggtcatgtgt	8880
tatattttgc acactaattt ttttttaaa aaaggtggga gagcgtgata ttttagttg	8940
tcagaaaaat aaagattgaa aaatttgaat gtattggca cgtggatac tttaaaaatt	9000
agaaggcacc ttattgtta ctgcgtatcg agaaaaataa taaaatcctt tatagttaa	9060
tttatttcaa ttgtatgtc ttagtagga atattaaagt agacatttat cattaatctc	9120
attatttagtc ttccctttt tagaatctcg ttaattttat taactaactt taaataact	9180
ctctagagga atggaacaaa ataata	9206

<210> 11

<211> 14

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PCR-праймер

<400> 11

cgggcggccca gcat

14

<210> 12

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PCR-праймер	
<400> 12	24
tgccattgg ttagggttt agac	
<210> 13	
<211> 19	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Зонд для анализа ТАQMAM	
<400> 13	19
atccgcaatg tgatttaa	
<210> 14	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 14	20
gccgttatccg caatgtgtta	
<210> 15	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 15	25
ggatgaagag atgagagaac catca	
<210> 16	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Зонд для анализа ТАQMAM	
<400> 16	21
taagttgtct aagcgtcaat t	
<210> 17	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 17	

caaggccagt taggccagtt a	21
<210> 18	
<211> 26	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 18	
atataacgaga ttctacaaaa ggaaag	26
<210> 19	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 19	
ggacaactaa aaatatcacg ctctccca	28
<210> 20	
<211> 26	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 20	
actacataag aaggaggtgg agaaag	26
<210> 21	
<211> 29	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 21	
gaggtggaga aagtgtatgt aaccgacaa	29
<210> 22	
<211> 66	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-продукт, полученный из Glycine max и Avena sativa	
<400> 22	
cgggcggcca gcatggccgt atccgcaatg tgttattaag ttgtctaaac cctaaaccaa	60
tggcac	66

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

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

<400> 23  
gcatggatggat atgagagaac catcacagaa ttgacgctta gacaacttaa taacacattg 60  
cgatatacgcc 70

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

<400> 24  
ttacatatac tacataagaa ggaggtggag aaagtgtatg taaccgacaa caaaaaacta 60  
ataggaatat ataggatgaa gagatgagag aaccatcaca gattggacgg tgggggacca 120  
atggcacaca aaaattccca tcctagttt tggagtaatt aatgaactag caattatata 180  
ataagctctg tatctgttat attctgcatt aattttg 217

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

<220>  
<223> PCR-праймер

<400> 25  
tttgtggtc gtcactgcgt t 21

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

<220>  
<223> PCR-праймер

<400> 26  
caggatatat tgtggtgtaa acaaattgac gcttagacaa 40

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

<220>  
<223> PCR-праймер

<400> 27	gagtcccgca attatacatt taatacgca tagaa	35
<210> 28		
<211> 29		
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	PCR-праймер	
<400> 28		
ggccagcatg gccgtatccg caatgtgtt		29

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, состоящей из а) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид SEQ ID NO: 1, или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид SEQ ID NO: 2; б) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид SEQ ID NO: 3, или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид SEQ ID NO: 4; в) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид SEQ ID NO: 5, или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид SEQ ID NO: 6; и г) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид SEQ ID NO: 10, где указанный полинуклеотид кодирует полипептид, обладающий активностью фермента гидроксифенил-пируват-диоксигеназы (HPPD).

2. Трансгенное растение сои, обладающее толерантностью к гербицидам, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

3. Клетка растения сои, включающая нуклеиновую кислоту по п.1.

4. Клетка по п.3, включающая молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую полинуклеотид SEQ ID NO: 10, стабильно интегрированный в ее геном.

5. Семя трансгенного растения сои, обладающее толерантностью к гербицидам, включающее молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

6. Семя по п.5, включающее молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую полинуклеотид SEQ ID NO: 10, стабильно интегрированный в его геном.

7. Способ идентификации в образце растения сои полинуклеотида SEQ ID NO: 1-6 или 10, включающий этапы:

(а) приведение образца в контакт с первым и вторым праймерами, где первый праймер содержит любую полинуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21, и второй праймер содержит любую полинуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21, способными обеспечивать амплификацию нуклеиновой кислоты, включающей специфический участок с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или комплементарной им последовательностью,

(б) осуществление амплификации указанной нуклеиновой кислоты и

(с) выявление нуклеиновой кислоты, амплифицированной на этапе (б).

8. Способ идентификации в образце растения сои полинуклеотида SEQ ID NO: 1-6 или 10, включающий этапы:

(а) приведение образца в контакт по меньшей мере с одним зондом, который гибридизуется в жестких условиях со специфическим участком, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1, 2 или комплементарную им последовательность; и

(с) обнаружение гибридизации по меньшей мере одного зонда с указанным специфическим участком.

9. Способ получения трансгенного растения сои, устойчивого к ингибитору HPPD и/или глюфосинату, включающий встраивание в геном соевого растения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 10.

10. Способ по п.9, включающий этапы:

(а) скрещивание первого растения сои, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п.1, со вторым растением и

(б) отбор растения-потомка, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.1 и является устойчивым к ингибитору HPPD и глюфосинату.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий этапы:

- (с) самоопыление растения-потомка с получением второго поколения растения-потомка и
- (д) отбор растения потомка, гомозиготного в отношении молекулы нуклеиновой кислоты по п.1.

12. Способ получения соевой товарной продукции, включающий этапы:

- (а) выращивание растения сои из семени по любому из пп.5 и 6 и

(б) производство соевой товарной продукции из соевого растения или его части, где товарная продукция представляет собой шрот, муку, хлопья, белковый изолят или масло.

13. Способ получения трансгенного соевого растения, устойчивого к ингибитору глутамин-синтетазы, включающий встраивание в геном растения сои молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид SEQ ID NO: 10.

14. Способ по п.13, включающий этапы:

(а) скрещивание первого растения сои, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п.1, со вторым растением и

(б) отбор растения-потомка, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.1 и является устойчивым к ингибитору глутамин-синтетазы.

15. Способ по п.14, дополнительно включающий этапы:

- (с) самоопыление растения-потомка с получением второго поколения растения-потомка и

- (д) отбор первого растения, гомозиготного в отношении молекулы нуклеиновой кислоты по п.1.

16. Способ получения соевого шрота и соевого масла, включающий этапы:

- а) выращивание растения сои из семени по любому из пп.5 и 6,

- б) сбор урожая соевых бобов указанного растения и

- с) экстракция соевого масла с получением таким образом соевого масла и соевого шрота.

17. Способ по п.16, где перед экстракцией соевого масла выполняют по меньшей мере один из следующих этапов:

- (i) нагревание собранных соевых бобов для снижения содержания в них влаги,

- (ii) дробление собранных соевых бобов для удаления их оболочки и

- (iii) прессование соевых бобов в мелкие хлопья.

18. Способ по любому из пп.16 или 17, где этап экстракции соевого масла выполняют с применением растворителя.

19. Способ повышения урожайности растений сои, включающий нанесение на указанные растения, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по п.1, стимулирующего рост количества ингибитора HPPD для повышения таким образом урожайности независимо от давления сорняков, где ингибитор HPPD выбран из группы, которая включает изоксафлютол, бициклопирон, мезотрион, сулькотрион, темботрион, топрамезон пирасульфатол.

20. Способ по п.19, где ингибитор HPPD представляет собой мезотрион.

21. Способ по п.19 или 20, где нанесение на растение стимулирующего рост количества ингибитора HPPD выполняют во время стадии вегетативного развития растения.

