

(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 Ракеш, Терпстра Каролин,
Сигарева Марина, Дефрамон Анник,
Брейтингер Бекки, Крамер Ванс, Гу
Вэйнин (US)

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

Предпосылки изобретения

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

Было бы полезно иметь возможность обнаруживать присутствие специфического события для того, чтобы определить, содержит ли потомство, полученное в результате генеративного скрещивания, целевой трансген. Кроме того, способ обнаружения специфического события будет полезен для соблюдения правил процедуры предрыночного одобрения и маркировки пищевых продуктов, полученных из рекомбинантных сельскохозяйственных растений, для использования в экологическом мониторинге, контролирующем признаки культурных растений в поле, для контроля продукции, полученной из собранного урожая, и/или для обеспечения соблюдения сторонами нормативных или договорных условий. 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 нуклеиновые 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 нуклеиновой 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 (a) 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 самосево в месте, содержащем SYHT0H2 сельскохозяйственных растений, где события самосево 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

Предоставляются 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-пируват-диоксигеназу. 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 № PTA-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, Манассас, Вирджиния 20110-2209 США, 21 июля 2010 г., и депозитам присвоили № PTA-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 *Glucine max* и включает в себя все сорта растений, которые могут быть выведены из сои. В контексте данного документа термин "растение" включает растительные клетки, органы растений, растительные протопласты, клеточные тканевые культуры растения, из которых растения могут быть восстановлены, каллус на растении, купы растений и растительные клетки, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как зародыши, пыльца, семечки, семена, листья, цветы, ветви, плоды, стебли, корни, корневые кончики, пыльники и тому подобное. Зерно означает зрелые семена, полученные фермерами-коммерсантами для отличных от выращивания или воспроизведения видов целей. 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, гидролизированный растительный белок, текстурированный соевый белок и волокна соевого белка.

Трансгенное "событие" получают путем трансформации растительных клеток конструкцией(ями) гетерологичной ДНК, включая экспрессионную кассету нуклеиновой кислоты, которая содержит целевой трансген, регенерацию популяции растений, полученную в результате введения трансгена в геном растения, а также выбор определенного растения, 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 ауткроссинга между трансформантом и другим сортом, который включает гетерологичную ДНК. Даже после повторного обратного скрещивания с рекуррентным родителем вставленная ДНК и фланкирующая ДНК из трансформированного родителя 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 уровни устойчивости ряда основных трансформационных событий растения оценивают стандартным способом, основанным на повреждении растений, меристематических симптомах обесцвечивания и т.д. в диапазоне различных концентраций того или иного гербицида. Эти данные могут быть выражены в терминах, например, GR50 значений, полученных из кривых дозовой зависимости, имеющих "дозу", нанесенную на ось X, и "процент уничтожения", "гербицидное действие", "количество новых зеленых растений" и т.д., нанесенные на

ось Y, где повышенные GR50 значения соответствуют повышенным уровням наследственной толерантности к ингибитору (например, повышенное $K_i/K_{m_{HPP}}$ 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, раскрытые 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.), Американское агрономическое общество, Мадисон, Висконсин.

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

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

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

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

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

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

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 стеклинг с любой комбинацией целевых полинуклеотидных последовательностей для создания растений с требуемой комбинацией признаков. Признак в контексте данного документа относится к фенотипу, полученному из конкретной последовательности или группы последовательностей. Например, толерантные к гербициду полинуклеотиды могут быть состыкованы с любыми другими полинуклеотидами, кодирующими полипептиды, обладающие пестицидной и/или инсектицидной активностью, как например, токсичные белки *Bacillus thuringiensis* (описанные в патентах США №№ 5366892; 5747450; 5737514; 5723756 и 5593881; Geiser et al., Gene, 1986 48:109; Lee et al., Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69:4648-4657 (Vip3A); Galitzky et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallog., 2001, 57:1101-1109 (Cry3Bb1) и Herman et al., J. Agric. Food Chem., 2004, 52:2726-2734 (Cry1F)), лектины (Van Damme et al., Plant Mol. Biol., 1994, 24:825, 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 грибки 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 и Geiser et al., Gene, 1986, 48:109), лектины (Van Damme et al., Plant Mol. Biol., 1994, 24:825), пентин (описанные в патенте США № 5981722) и тому подобные; признаки, желательные для устойчивости к болезням или к гербицидам (например, гены нейтрализации фумонизина (патент США № 5792931); гены неvirulentности 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 ацетоллактатсинтазы (ALS), которые приводят к устойчивости к гербицидам, такие как S4 и/или Hra мутации (устойчивость к гербицидам, включая сульфонилмочевины, имидазолиноны, триазолопиримидины, пиримидинил тиобензоаты); ген устойчивости к глифосату (например, ген 5-энол-пировил-шикимат-3-фосфат-синтазы (EPSPS), включая, но не ограничиваясь описанными в патентах США №№ 4940935, 5188642, 5633435, 6566587, 7674598, а также во всех связанных заявках, или ген глифосат N-ацетилтрансферазы (GAT), описанный в Castle et al., Science, 2004, 304:1151-1154, а также в опубликованных патентных заявках США №№ 20070004912, 20050246798 и 20050060767); устойчивость к глюфоцинату (например, BAR, см., например, патент США № 5561236); устойчивость к 2,4-Д (например, арилоксиалканол 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 P450 или его вариант, который придает устойчивость к гербицидам или устойчивость, в частности, к HPPD-ингибирующим гербицидам, PPO-ингибирующим гербицидам и ALS-ингибирующим гербицидам (опубликованная патентная заявка США № 20090011936; патенты США №№ 6380465; 6121512; 5349127; 6649814 и 6300544; а также международная публикация согласно РСТ № WO 2007/000077); устойчивость к дикамбе (например, дикамба монооксигеназой) и признаки, желательные для обработки или переработки продуктов, таких как продукты с высоким содержанием масла (например, патент США № 6232529); модифицированные масла (например, гены десатуразы жирной кислоты (патент США № 5952544, международная публикация согласно РСТ № WO 94/11516), модифицированные крахмалы (например, ADPG-пиروفосфорилазы (AGPase), крахмал-синтазы (SS), ветвящийся фермент крахмала (SBE) и девятицис ферменты крахмала (SDBE)), а также полимеры или биопластик (например, патент США № 5602321; бета-кетотиолаза, полигидроксibuтират синтазы и ацетоацетил-CoA-редуктаза (Schubert et al., J. Bacteriol., 1988, 170:5837-5847) облегчают экспрессию полиоксикаллонов (PHAs)), раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения событие SYNT0H2 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 SYNT0H2, включают признаки, полученные от полинуклеотидов, которые наделяют растение возможностью продуцировать более высокий уровень 5-энолпирувилшкимат-3-фосфат-синтазы (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 SYNT0H2, 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 SYNT0H2 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 SYNT0H2, включают полинуклеотиды арилоксиалканеат диоксигеназы (которые могут придавать толерантность к 2,4-Д и к другим феноксиауксин гербицидам, а также к арилоксифеноксипропионатным гербицидам, как описано, например, в международных публикациях 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 Herman et al., J. Biol. Chem., 2005, 280: 24759-24767 и в патенте США № 7812224, а также связанных с ними заявках и патентах.

Другие примеры признаков устойчивости к гербициду, которые могут быть объединены с событием SYNT0H2, включают признаки, сообщаемые полинуклеотидами, кодирующими экзогенную фосфинотрицинацетилтрансферазу, как описано в патентах США №№ 5969213; 5489520, 5550318, 5874265, 5919675, 5561236, 5648477, 5646024, 6177616 и 5879903. Растения, содержащие экзогенную фосфинотрицинацетилтрансферазу, могут демонстрировать повышенную толерантность к гербицидам с глюфосинатом, которые ингибируют фермент глутаминсинтетазу. Другие примеры признаков устойчивости к гербициду, которые могут быть объединены с событием SYNT0H2, включают признаки, придаваемые полинуклеотидами, сообщающими измененную активность протопорфириногенаоксидазы (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 SYNT0H2, 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-дихлорфеноксиуксусной кислоте и арилоксифеноксипропионату (международная публикация согласно PCT № WO 2011/022469, WO 2011/022470, WO 2011/022471 и связанные заявки и патенты), толерантность к 127-ALS (международная публикация согласно PCT № WO 2010/080829 и связанные заявки и патенты), толерантность к GTS 40-3-2-глифосату, толерантность к DAS-68416-4 - 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте и глюфосинату, толерантность к 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, гордотианинов (патенты США №№ 5990389; 5885801, 5885802 и 5703409, патент США № 5850016), высоколизиновый ячмень (Williamson и др., *Eur. J. Biochem.* 1987, 165:99-106 и международная публикация согласно PCT № WO 98/20122) и белки с высоким содержанием метионина (Pedersen et al., *J. Biol. Chem.* 1986, 261:6279; Kiriha 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 дезактивации фумонизина (патент США № 5792931), гены устойчивости к невирулентности и болезни (Jones et al., *Science*, 1994, 266:789; Martin et al., *Science*, 1993, 262:1432; Mindrinos et al., *Cell*, 1994, 78:1089), а также признаками, желательными для обработки или переработки продуктов, таких как модифицированные масла (например, жирные кислоты десатуразы (патент США № 5952544; международная публикация согласно PCT № WO 94/11516)), модифицированные крахмалы (например, ADPG пироглифосфорилаза (AGPase), синтазы крахмала (SS), ветвящийся фермент крахмала (SBE) и деветвящийся фермент крахмала (SDBE)), а также полимеры или биопластик (например, патент США № 5602321; бета-кетотиазолаза, полигидроксibuтират синтазы и ацетоацетил- CoA -редуктазы (Schubert et al., *J. Bacteriol.*, 1988, 170:5837-5847) облегчают экспрессию полиоксипалканоатов (PHAs)), раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки. Можно также объединять толерантные к гербицидам полинуклеотиды с полинуклеотидами, придающими агрономические признаки, такие как мужская стерильность (см., например, патент США № 5583210), прочность стебля, время цветения или признаки технологии трансформации, такие как регуляция клеточного цикла или направленное воздействие на гены (например, международные публикации согласно PCT №№ WO 99/61619, WO 00/17364 и WO 99/25821), раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

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 PCT №№ WO 99/25821, WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855 и WO 99/25853, все из которых включены в данный документ посредством ссылки).

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

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

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

Экспрессионные кассеты могут содержать 5' лидерные последовательности. Такие лидерные последовательности могут служить для усиления трансляции. Регулирующие области (например, промоторы, регулирующие области транскрипции, области процессинга РНК или области устойчивости, интроны, сигналы полиаденилирования и области терминирования 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 события SYHT0H2. "Изолированный" или "очищенный" полинуклеотид или его биологически активная часть является в значительной степени или практически свободной от компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с полинуклеотидом в его природной среде. Таким образом, изолированный или очищенный полинуклеотид практически свободен от другого клеточного материала или среды для культивирования при продуцировании рекомбинантными способами или практически свободен от химических предшественников или других химических веществ в случае, если он химически синтезирован. Оптимально "изолированный" полинуклеотид является свободным от последовательностей (оптимально кодирующих белок последовательностей), которые естественным образом фланкируют полинуклеотид (например, последовательностей, расположенных на 5' и 3' концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которой полинуклеотид происходит. Например, в различных аспектах изобретения выделенный полинуклеотид может содержать менее чем приблизительно 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 или 0.1 kb нуклеотидной последовательности, которая естественным образом фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой происходит этот полинуклеотид. Во избежание неясности "изолированная" последовательность все еще может быть в окружении другой ДНК либо *in vitro*, либо *in vivo* и может, например, встречаться в трансгенной клетке или организме.

В определенных аспектах настоящего изобретения полинуклеотиды содержат соединение ДНК последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-6. 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, содержащие последовательность или состоящие из (а) 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 делеции (т.е. усечения) на 5'- и/или 3'-конце; делецию и/или добавление одного или нескольких нуклеотидов к одному или нескольким внутренним сайтам в природном полинуклеотиде и/или замену одного или нескольких нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в природном полинуклеотиде.

В контексте данного документа "зонд" представляет собой изолированный полинуклеотид, к которому прикреплена обычная детектируемая метка или репортерная группа, например радиоактивный изотоп, 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 SYNT0H2 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 SYNT0H2 (например, праймеры, содержащие SEQ ID NO: 11-12, 14-15 и 17-21, а также их варианты или фрагменты SEQ ID NO: 10 или ее комплемент). Неограничивающие примеры пар праймеров, используемых в раскрытых способах, включают в себя: (a) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, которая может быть использована для амплификации последовательности, охватывающей LB1 (левый край 1) соединения геномной ДНК сои и вставленную гетерологичную последовательность, содержащую Avena HPPD последовательность, (b) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, который может быть использован для амплификации последовательности, охватывающей LB2 (левый край 2) соединения геномной ДНК сои, и вставленной гетерологичной последовательности, содержащей Avena HPPD последовательность, (c) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, которая может быть использована для амплификации последовательности, охватывающей LB1 соединения геномной ДНК сои, и вставленной гетерологичной последовательности, содержащей Avena HPPD последовательность, и (d) первый праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй праймер, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, которая может быть использована для амплификации LB1 соединения геномной ДНК сои и вставленной гетерологичной последовательности, содержащей Avena HPPD 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 SYNT0H2. 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 SYNT0H2 в биологических пробах. В качестве альтернативы зонд может быть использован в ходе реакции PCR с целью создания возможности для обнаружения амплификационного события (то есть TAQMAN® зонд или MGB™ зонд) (так называемая PCR в режиме реального времени). Когда зонд гибридизуют с полинуклеотидами биологического образца при условиях, которые создают возможность для связывания зонда с образцом, это связывание может быть обнаружено, и таким образом обеспечивают указание на наличие события SYNT0H2 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 гибридизуется 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 SYNT0H2.

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 SYNT0H2, 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 SYNT0H2 ДНК. Под "диагностическим" в отношении события SYNT0H2 подразумевают использование любого способа или анализа, который распознает наличие или отсутствие события SYNT0H2 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 SYNT0H2). 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*, 2nd ed, vol. 1-3, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, 1992, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, NY и в Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, San Diego, CA. Пары PCR-праймера могут быть получены из известной последовательности, например, с помощью компьютерной программы, предназначенной для этой цели, такой как способ анализа праймера для PCR в Vector NTI версия 6 (Informax Inc., Бетесда, Мэриленд); PrimerSelect (DNASTAR Inc., Мадисон, Висконсин) и в Primer (версия 0.5.COPYRGТ., 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 полиаденилирования.

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*, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York; Innis et al. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, New York; Innis & Gelfand (eds.), *PCR Strategies*, 1995, Academic Press, New York; и Innis & Gelfand (eds.), *PCR Methods Manual*, 1999, Academic Press, New York. Способы амплификации также описаны в патентах США №№ 4683195 и 4683202 и в Chen et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci. 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, 1000, 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 (b) 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, (b) 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, (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, которые могут быть использованы для амплификации последовательности, охватывающей LB1 соединение геномной ДНК сои и вставленную гетерологичную последовательность, содержащую последовательность Avena HPPD, а также (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, 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, (b) 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 двухцепочечную 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, подразумевают такие условия, при которых зонд гибридизуется со своей целевой последовательностью в заметно большей степени, чем другие последовательности (например, по меньшей мере в 2 раза больше окружения). Относительно амплификации целевого полинуклеотида (например, посредством PCR) с использованием определенной пары амплификационных праймеров "жесткие условия" являются условиями, которые позволяют паре праймеров гибридизоваться с целевым полинуклеотидом, с которым праймер имеет аналогичный дикий тип. Строгие условия зависят от последовательности и будут различными в разных случаях. Путем регулирования жесткости гибридизации и/или условий отмывки могут быть идентифицированы (гомологичное зондирование) целевые последовательности, которые на 100% комплементарны зонду. Кроме того, жесткость условий можно регулировать для обеспечения некоторого несовпадения в последовательностях с тем, чтобы обнаружить более низкие степени идентичности (гетерологичное зондирование). Обычно зонд составляет меньше чем приблизительно 1000 нуклеотидов в длину или меньше чем 500 нуклеотидов в длину.

В контексте данного документа в значительной степени идентичная или комплементарная последовательность представляет собой полинуклеотид, который будет специфически гибридизоваться с компонентом молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она сравнивается в условиях высокой жесткости. Подходящие жесткие условия, которые способствуют ДНК-гибридизации, например 6X хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующей отмывкой в 2XSSC при 50°C, известны специалистам в данной области техники или могут быть найдены в Ausubel 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⁺ ион, обычно приблизительно от 0,01 до 1,0M Na⁺ концентрация ионов (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°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 отмывку 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 отмывку 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 отмывку в 0,1 X SSC при 60-65°C. Дополнительные, отмывочные буферы могут содержать от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% SDS. Продолжительность гибридизации обычно составляет менее приблизительно 24 ч, обычно от приблизительно 4 до приблизительно 12 ч. Продолжительность отмывки будет равна, по меньшей мере, периоду времени, достаточному для достижения равновесия.

В реакциях гибридизации специфичность является, как правило, функцией послед-гибридизационных отмывок, причем критическими факторами являются ионная сила и температура конечного отмывочного раствора. Для ДНК-ДНК гибридов T_m может быть приближена из уравнения Meinkoth & Wahl, *Anal. Biochem.*, 1984, 138:267-284: T_m=81,5°C+16,6 (log M)+0,41 (%GC)-0,61 (%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. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной целевой последовательности гибридизуется с идеально подходящим зондом. T_m уменьшается приблизительно на 1°C на каждый 1% несоответствия, таким образом, T_m, гибридизацию и/или условия отмывки можно регулировать для гибридизации до последовательностей нужной идентичности. Например, если добавляются последовательности с >90% идентичностью, T_m может быть уменьшена на 10°C. Обычно выбирают жесткие условия, которые примерно на 5°C ниже, чем температура точки плавления (T_m) для конкретной последовательности и ее комплемента при определенной ионной силе и pH.

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

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

Говорят, что полинуклеотид является "комплементом" другого полинуклеотида, если они проявляют взаимодополняемость. В контексте данного документа говорят, что молекулы обладают "полной комплементарностью", в случае, когда каждый нуклеотид одной из полинуклеотидных молекул является комплементарным к нуклеотиду другой. Говорят, что две молекулы являются "минимально комплементарными", если они могут 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 "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".

Настоящее изобретение далее относится к способам обнаружения присутствия ДНК, соответствующей событию SYNT0H2 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 SYNT0H2 и специфично обнаруживает событие SYNT0H2, (b) подвергание образца и зонда жестким условиям гибридизации, а также (с) определение гибридизации зонда с ДНК, где определение гибридизации указывает на наличие события SYNT0H2. В одном аспекте настоящего изобретения ДНК предварительно обрабатывают соответствующими ферментами до гибридизации события.

Для обнаружения специфического участка SYNT0H2 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 предоставления специфического ампликона SYNT0H2. 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 основанным 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 SYNT0H2. Олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечным продуктом PCR целевого участка (один праймер во вставленной последовательности и один во фланкирующей последовательности) и инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы, АТФ, сульфурилазы, люциферазы, апиразы, аденозина 5' фосфосульфата и люциферина. Отдельно добавляют dNTPs, и инкорпорация дает в результате световой сигнал, который измеряют. Световой сигнал указывает на присутствие трансгена вставленной/фланкирующей последовательности, возникшей в результате успешной амплификации, гибридизации и удлинения цепи на одно или несколько оснований.

Поляризация флуоресценции, описанная Chen и др., *Genome Res*, 1999, 9: 492-498, представляет собой способ, который может быть использован для обнаружения ампликона настоящего изобретения. В случае этого способа используют олигонуклеотид, предназначенный перекрывать фланкирующее и вставленное ДНК-соединение или пару олигонуклеотидов, которые могут амплифицировать специфический участок SYNT0H2. 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 (а) последовательности, охватывающей LB1 соединение геномной ДНК сои и гетерологичную вставку, содержащую последовательность Avena HPPD (SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 17 и 18; SEQ ID NO: 17 и 19), или (б) последовательности, охватывающей LB2 соединение геномной ДНК сои и гетерологичную вставку, содержащую последовательность Avena HPPD (SEQ ID NO: 14 и 15, SEQ ID NO: 17 и 20, SEQ ID NO: 17 и 21).

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

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

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

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

Компьютерная реализация данных математических алгоритмов может применяться для сравнения последовательностей с целью определения идентичности последовательностей. Такие реализации включают, но не ограничиваются ими: CLUSTAL в PC/генная программа (доступна у Intelligentics, Маунтин Вью, Калифорния); ALIGN программа (версия 2.0) и GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA в GCG Wisconsin Genetics Software Package, версия 10 (доступны у Accelrys Inc., 9685 Скрэнтон-Роуд, Сан-Диего, Калифорния). Выравнивание с использованием этих программ 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 введения в действие штрафа за возникновение пробелов и штрафа за

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

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

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

В контексте данного документа "процент идентичности последовательности" означает значение, определенное путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит 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 SYHT0H2, при этом способ включает применение к месторасположению сорняков контролируемого количества гербицидной композиции, содержащей один или несколько НРРД 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

SYNTH0H2, а в определенных аспектах настоящего изобретения применение к сельскохозяйственной культуре, семенам, сорнякам или их обрабатываемым землям борющегося 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 приравнивается 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 бензобикаклопирона, бензотриона, сулкотриона, тефурилтриона, темботриона, кетоспирадокса или его свободной кислоты, бензофенапа, пирасульфатола, пиразолина, пиразоксифена, топрамезона, [2-хлор-3-(2-метоксиэтокси)-4-(метилсульфонил)фенил](1-этил-5-гидрокси-1H-пиразол-4-ил)метанола, (2,3-дигидро-3,3,4-триметил-1,1-диоксидобензо[*b*]тиен-5-ил)(5-гидрокси-1-метил-1H-пиразол-4-ил)метанола, изоксафлуртола, изоксафлутола, α -(циклопропилкарбонил)-2-(метилсульфонил)- β -оксо-4-хлорбензенипропаненилтрила и α -(циклопропилкарбонил)-2-(метилсульфонил)- β -оксо-4-(трифторметил)-бензенипропаненилтрила 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 бикаклопирон. 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 SYNTH0H2 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-пирувиллицимат-3-фосфат-синтазу (EPSPS) (например, раскрытую в патентах США №№ 5804425 и 6566587), глифосат N-ацетил трансферазу (GAT) (например, раскрытую в WO 02/036782), толерантную к гербицидам 4-гидроксипирувилдиоксигеназу (HPPD) (например, раскрытую в WO 02/46387), фосфинотрицин-ацетилтрансферазу (PAT) (например, раскрытую в патенте США 5273894), цитохром P450 (например, раскрытый в международной публикации согласно PCT № WO 07/103567), глутатион S-трансферазу (GST) (например, раскрытую в международной публикации согласно PCT № WO 01/21770), толерантную к гербицидам ацетил-КоА-карбоксилазу (ACCase), устойчивую к гербицидам ацетолактатсинтазу (ALS) (например, раскрытую в патенте США № 5013659), толерантную к гербицидам протопорфириноген-оксидазу (PPGO) (например, раскрытую в международной публикации согласно PCT № WO 95/34659) бромксинилнитрилазу (например, раскрытую в международной публикации согласно PCT № WO 89/00193), толерантную к гербицидам фитоендесатуразу (например, раскрытую в опубликованной европейской заявке № 0393690), арилоксиалканодидоксигеназу (например, раскрытую в международных публикациях согласно PCT № WO 2005/107437 и WO 2007/053482) и дикамбаразрушающие ферменты (например, раскрытые в международной публикации согласно PCT № WO 98/45424), в том числе известные мутировавшие или иначе модифицированные варианты этих полипептидов.

Соответственно гербицидные композиции, применяемые к месторасположению, могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных пестицидов, к которым соевое растение, содержащее событие SYNTH0H2, является толерантным, например нематоцид, инсектицид, фунгицид и/или гербицид. Примеры подходящих пестицидов приведены в Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, 14th ed., 2006. Например, пестицид может быть одним или несколькими пестицидами, выбранными из следующих классов инсектицидно, акарицидно, нематоцидно или моллюскицидно активных ингредиентов: аланикарб, алдикарб, бендиокарб, бенфуракарб, бутоксикарб, бутоксикарбоксим, карбарил, карбофуран, карбосульфат, этиофенкарб, фенобукарб, форметанат, фуратиокарб, изопрокарб, метиокарб, метомил, метолкарб, оксамил, пиримикарб, пропоксур, тиодикарб, тиофанокс, триазамат, триметаккарб, ХМС, ксилкарб, ацефат, азаметифос, азинфос-этил, азинфос-метил, кадусафос, хлорэтоксифос, хлорфенвинфос, хлормефос, хлорпирифос, хлорпирифос-метил, кумафос, цианофос, деметон-S-метил, диазинон, дихлорвос/DDVP, дикротофос, диметоат, диметилвинфос, дисульфотон, EPN, этион, этопрофос, фамфур, фенамифос, фенитротрион, фентион, фостиазат, гепетнофос, имисуафос, изофенфос, изопропил-О-(митоксинаминотио-фосфорил)салицилат, изоксатион, малатион, мекарбам, метамидофос, метидатион, мевинфос, монокротофос, налед, ометоат, оксидеметон-метил, паратион, паратион-метил, фентоат, фо-

рат, фозалон, фосмет, фосфамидон, фоксим, пиримифос-метил, профенофос, пропетамфос, протиофос, пираклофос, пиридафентин, квиналфос, сульфотеп, тебупиримфос, темефос, тербуфос, тетраклорвинфос, тиометон, триазофос, триклорфон, вимидотион, циклодиен хлорорганических соединений, хлордан, эндосульфат; этипрол, фипронил, акринатрин, аллетрин, D-цис-транс-аллетрин, D-транс-аллетрин, бифентрин, биоаллетрин, биоаллетрин S-изомер циклопентенил, биоресметрин, циклопротрин, цифлутрин, бета-цифлутрин, цигалотрин, лямбда-цигалотрин, гамма-цигалотрин, циперметрин, альфа-циперметрин, бета-циперметрин, тета-циперметрин, зета-циперметрин, цифенотрин [(1R)-транс-изомеры], дельтаметрин, эмпертрин [(EZ)-(1R)-изомеры], эсфенвалерат, этофенпрокс, фенпропатрин, фенвалерат, флуцитринат, флуметрин, тауфлувалинат, халфенпрокс, имипротрин, кадетрин, перметрин, фенотрин [(1R)-транс-изомер], праллетрин, пиретрин (пиретрум), ресметрин, силафлуофен, тефлутрин, тетраметрин, тетраметрин [(1R)-изомеры], тралометрин, трансфлутрин; ДЦТ; метоксихлор, ацетамиприд, клотианидин, динотефуран, имидаклоприд, нитенпирам, тиаклоприд, тиаметоксам; никотин, спинеторам, спиносат, абамектин, эмаектин бензоат, лепимектин, милбемектин, гидропрен, кинопрен, метопрен; феноксикарб; пирпроксифен, хлорпикрин; сульфурилфторид; бура; антимионил-тарtrat калия, пиметрозин; флониамид, клофентезин, гекситиазокс, дифлоvidaзин, этоксазол. Бактерии *Bacillus thuringiensis* подвида *israelensis*, бактерии *Bacillus sphaericus*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *aizawai*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *kurstaki*, бактерии *Bacillus Thuringiensis* подвида *tenebrionis*, ВТ-белки сельскохозяйственных культур: Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry2Ab, mCry3A, Cry3Ab, Cry3Bb, Cry34/35Ab1, диафентиурон, азоциклотин, 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, пиримидифен, пиридабен, тебуфенпирад, толфенпирад, ротенон (Derris), индоксикарб; метафлумизон, спироциклофен, спиромезифен, спиротетрамат, фосфида алюминий, кальция фосфид, фосфин, фосфид цинка, циенопирафен, хлорантранилипрол, флубендиамид, амидофлумет, азирахтин, бенклотиаз, бензоксимат, бифеназат, бромпропилат, хинометионат, криолит, циантранилипрол (циазипир), цифлуметофен, дикофол, дифлоvidaзин, 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-циклопропилэтил)карбамоил]фенил}-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-карбоксамид (известный из WO 2005/077934), 4-{[(6-бромпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), 4-{[(6-фтор-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), 4-{[(2-хлор-1,3-тиазол-5-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115644), флупирадиурон, 4-{[(6-хлор-5-фтор-3-ил)метил](метил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115643), 4-{[(5,6-дихлорпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115646), 4-{[(6-хлор-5-фтор-3-ил)метил]-(циклопропил)-амино}фуран-2(5H)-он (известный из WO 2007/115643), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-(циклопропил)-амино}фуран-2(5H)-он (известный из EP-A-0539588), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)-метил](метил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из EP-A-0539588), {[1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (известный из WO 2007/149134) и его диастереомеры {[1(R)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (A) и {[1(S)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (B) (также известный из WO 2007/149134), а также сульфоксафлор и его диастереомеры [(R)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (A1) и [(S)-метил-(оксидо){(1S)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (A2), называют группой диастереомеров A (известный из WO 2010/074747, WO 2010/074751), [(R)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (B1) и [(S)-метил-(оксидо){(1R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}-λ⁴-сульфанилиден}цианамид (B2), именуемый группой диастереомеров B (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-трифлуорэтил)сульфинил]фенил}-3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-амин (известный из WO 2006/043635), [(3S,4aR,12R,12aS,12bS)-3-[(циклопропилкарбонил)окси]-6,12-дигидрокси-4,12b-диметил-11-оксо-9-(пиридин-3-ил)-1,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-декагидро-2H,11H-бензо-[f]-пирано[4,3-b]хромен-4-ил]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-фторпиримидин (известный из WO 2004/099160), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентил)(3,3,3-трифторпропил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентил)(3,3,4,4-пентафтор-бутил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), 8-[2-(циклопропошетокси)-4-(трифторметил)феноксил]-3-[6-(трифторметил)-пиридазин-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-дихлорфенил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 5-[5-(2-хлорпиридин-4-ил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 4-[5-(3,5-дихлорпропенил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-метил-N-{2-оксо-2-[(2,2,2-трифторэтил)амино]этил}бензамид (известный из WO 2005/085216), 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}-(циклопропил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}-(2,2-дифторэтил)-амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}-(этил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{{(6-хлорпиридин-3-ил)метил}-(метил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он (все известны из WO 2010/005692), NNI-0711 (известный из WO 2002/096882), 1-ацетил-N-[4-(1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-метоксипропан-2-ил)-3-изобутилфенил]-N-изобутирил-3,5-диметил-1H-пиразол-4-карбоксамид (известный из WO 2002/096882), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-хлор-3-метилбензоил]-2-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-этилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-метилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-1,2-диэтилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-2-этилгидразинкарбоксилат (известный из WO 2005/085216), (5RS,7RS;5RS,7RS)-1-(6-хлор-3-пиримидил)-1,2,3,5,6,7-гексагидро-7-метил-8-нитро-5-пропоксимидазо[1,2-а]пиридин (известный из WO 2007/101369), N-[2-(5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-хлор-6-метилфенил]-3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-карбоксамид (известный из CN 102057925) и метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)бензоил]-2-этил-1-метилгидразин карбоксилат (известный из WO 2011/049233).

В качестве дополнительного примера фунгицид включает, но не ограничивается ими, один или несколько фунгицидов, выбранных из следующих: алдиморф, азаконазол, битертанол, бромуконазол, цикпроконазол, диклобутразол, дифеноконазол, диниконазол, диниконазол-М, додеморф, додеморф ацетат, эпоксиконазол, этаконазол, фенаримол, фенбуконазол, фенгексамид, фенпропидин, фенпропиморф, флу-квинконазол, флурпиримидол, флусилазол, флутриазол, фуконазол, фуконазол-цис, гексаконазол, има-залил, имазалил сульфат, имибенконазол, ипконазол, метконазол, миклобутанил, нафтифин, нуаримол, окспокконазол, паклобутразол, пефуразоат, пенконазол, пипералин, прохлораз, пропиконазол, протиоко-назол, пирибутикарб, пирифенокс, квинконазол, симеконазола, спирокамин, тебуконазол, тербинафин, тетраконазол триадимефон, триадименол, тридеморф, трифлумизол, трифорин, тритиконазол, уникана-зол, униканазол-р, виниконазол, вориконазол, 1-(4-хлорфенил)-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)циклогептанол, метил-1-(2,2-диметил-2,3-дигидро-1H-инден-1-ил)-1H-имидазол-5-карбоксилат, N'-{5-(дифторметил)-2-метил-4-[3-(триметилсилил)пропокси]фенил}-N-этил-N-метилимидоформамид, N-этил-N-метил-N-{2-метил-5-(трифтор-метил)-4-[3-(триметилсилил)пропокси]фенил}имидоформамид, O-[1-(4-метоксифен-окси)-3,3-диметилбутан-2-ил]-1H-имидазол-1-карботиоат, биксафен, боскалид, карбоксин, дифлумето-рим, фенфурам, флуопирам, флутоланил, флукаспироксад, фураметпир, фурумциклокс, 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), изопира-зам (антиэпимерный энантиомер 1S, 4R, 9R), изопиразам (синэпимерный рацемат 1RS, 4SR, 9RS), изопи-разам (синэпимерный энантиомер 1R, 4S, 9R), изопиразам (синэпимерный энантиомер 1S, 4R, 9S), ме-пронил, оксикарбоксин, пенфлуфен, пентиопирад, седаксан, тифлузамид, 1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафтортокси)фенил]-3-(трифторметил)-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафтортокси)фенил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-[4-фтор-2-(1,1,2,3,3,3-гексафторпропокси)фенил]-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[1-(2,4-дихлорфенил)-1-метоксипропан-2-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, 5,8-дифтор-N-[2-(2-фтор-4-{[4-(трифторметил)пиридин-2-ил]окси}фенил)этил]квинозолин-4-амин, N-[9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтаден-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[(1S,4R)-9-(дифторметил)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтаден-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[(1R,4S)-9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтаден-5-ил]-3-

(дифторметил)-1-метил-1Н-пиразол-4-карбоксамид, амектоктрадин, амисульбром, азоксистробин, циазо-
 фамид, куметоксистробин, кумоксистробин, димоксистробин, энестробурин, фамоксадон, фенамидон,
 феноксистробин, флуоксастробин, крезоксим-метил, метоминостробин, орисастробин, пикоксистробин,
 пираклостробин, пираметостробин, пираоксистробин, пирибенкарб, триклопирикарб, трифлуксистробин,
 (2E)-2-(2-{[6-(3-хлор-2-метилфенокси)-5-фторпиримидин-4-ил]окси}фенил)-2-(метоксиимино)-N-метил-
 этанамид, (2E)-2-(метоксиимино)-N-метил-2-(2-{[(1E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден}амино)-
 окси]метил}фенил)этанамид, (2E)-2-(метоксиимино)-N-метил-2-{2-[(E)-{1-[3-(трифторметил)фенил]-
 этокси}имино]метил}фенил}этанамид, (2E)-2-{2-[(1E)-1-(3-{[(E)-1-фтор-2-фенилэтинил]окси}фенил)-
 этилиден}амино]окси]метил}фенил}-2-(метоксиимино)-N-метилэтанамид, (2E)-2-{2-[(2E,3E)-4-(2,6-
 дихлорфенил)бут-3-ен-2-илиден]амино}окси]метил}фенил}-2-(метоксиимино)-N-метилэтанамид, 2-хлор-
 N-(1,1,3-триметил-2,3-дигидро-1Н-инден-4-ил)пиримидин-3-карбоксамид, 5-метокси-2-метил-4-(2-{[(1E)-
 1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден}амино]окси]метил}фенил)-2,4-дигидро-3Н-1,2,4-триазол-3-он, ме-
 тил-(2E)-2-{2-[(1E)-1-(3-{[(E)-1-фтор-2-фенилэтинил]окси}фенил)-этилиден}амино]окси]метил}фенил}-3-метоксипроп-
 2-еноат, N-(3-этил-3,5,5-триметилциклогексил)-3-(формиламино)-2-гидроксibenзамид, 2-{2-[(2,5-
 диметилфенокси)метил]фенил}-2-метокси-N-метилацетамид, (2R)-2-{2-[(2,5-диметилфенокси)метил]-
 фенил}-2-метокси-N-метилацетамид, беномил, карбендазим, хлорфеназол, дизетофенкарб, этабоксам,
 флуопиколид, фуберидазол, пенцикурон, тиабендазол, тиофанат-метил, тиофанат, зоксамид, 5-хлор-7-(4-
 метилпиперидин-1-ил)-6-(2,4,6-трифторфенил)[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин, 3-хлор-5-(6-хлорпи-
 ридин-3-ил)-6-метил-4-(2,4,6-трифторфенил) пиридазин, бордосская жидкость, каптафол, каптан, хлоро-
 талонил, гидроксид меди, нафтенат меди, оксид меди, оксихлорид меди, сульфат меди (2+), дихлофлуа-
 нид, дитианон, додин, свободное основание додина, фербам, фторфолпет, фолпет, гуазатин, гуазатин
 ацетат, иминоктадин, иминоктадин албесилат, иминоктадин триацетат, манкоппер, манкозеп, манеб, ме-
 тирам, 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, мепанипирим,
 пириметанил, 3-(5-фтор-3,3,4,4-тетраметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)хинолин, фентин ацетат, хлорид
 фентин, фентин гидроксид, силтиофам, бентиаваликарб, диметоморф, флуморф, ипроваликарб, манди-
 пропамид, полиоксинны, полиоксорим, валидамицин А, валифеналат, бифенил, хлоронеб, диклоран, эди-
 фенфос, этридиазол, иодокарб, ипробенфос, изопротиолан, пропамокарб, пропамокарб гидрохлорид,
 протиокарб, пиразофос, квинтозен, текназен толклофос-метил, карпропамид, диклоцимет, феноксанил,
 фталид, пироквилон, трициклазол, 2,2,2-трифторэтил{3-метил-1-[(4-метилбензоил)амино]бутан-2-
 ил}карбамат, беналаксил, беналаксил-М (киралаксил), бупиримат, клозилакон, диметиримол, этиримол,
 фуралаксил, гимексазол, металаксил, металаксил-М (мефеноксам), офурас, оксадиксил, оксолиновая ки-
 слота, хлостолинат, фенпиклонил, флудиоксонил, ипродион, процимидон, квиноксифен, винклозолил,
 бинапакрил, динокап, феримзон, флуазилам, мептилдинокап, бентиазол, бетоксазин, капсимицин, кар-
 вон, хинометионат, пириофенон (хлазафенон), куфранеб, цифлуфенамид, цимоксанил, ципросульфамид,
 дазомет, дебакарб, дихлорофен, дикломезин, дифензокват, дифензокват метилсульфат, дифениламин,
 экомат, фенпиразамин, флуметовер, фторимид, флусульфамид, флутуанил, фосетил-алюминий, фосетил-
 кальций, фосетил-натрий, гексахлорбензол, иримамицин, метасульфоккарб, метил изотиоцианата, метра-
 фенон, милдиомицин, нагамицин, никель диметилдитиокарбамат, нитротал-изопропил, октилинон, окса-
 мокарб, оксифентин, пентахлорфенол и соли, фенотрин, фосфористая кислота и ее соли, пропамокарб-
 фосетилат, пропанозин-натрий, проквиназид, пириморф, (2E)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-
 4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, (2Z)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-
 (морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, пирролнитрин, тебуфлоквин, теклофалам, толнифанид, триазоксид,
 трихламид, зариламид, (3S,6S,7R,8R)-8-бензил-3-[(3-{[(изобутирилокси)метокси]-4-метокси-
 пиримидин-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-
 (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-метоксифенокси)-3,3-диметилбутан-2-ил-1Н-имидазол-1-
 карбоксилат, 2,3,5,6-тетрахлор-4-(метилсульфонил)пиримидин, 2,3-дибутил-6-хлортиено[2,3-d]пиримидин-
 4(3Н)-он, 2,6-диметил-1Н,5Н-[1,4]дитиино[2,3-с:5,6-с']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)этанон, 2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]-1-(4-{4-[(5S)-5-фенил-4,5-
 дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)этанон, 2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-
 пиразол-1-ил]-1-(4-{4-[(5-фенил-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил)-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)этанон,
 2-бутоксид-6-иод-3-пропил-4Н-хромен-4-он, 2-хлор-5-[2-хлор-1-(2,6-дифтор-4-метоксифенил)-4-метил-
 1Н-имидазол-5-ил]пиримидин, 2-фенилфенол и соли, 3-(4,4,5-трифтор-3,3-диметил-3,4-дигидроизохинолин-
 1-ил)хинолин, 3,4,5-трихлорпиримидин-2,6-дикарбонитрил, 3-[5-(4-хлорфенил)-2,3-диметил-1,2-
 оксазолидин-3-ил]пиримидин, 3-хлор-5-(4-хлорфенил)-4-(2,6-дифторфенил)-6-метилпиридазин, 4-(4-
 хлорфенил)-5-(2,6-дифторфенил)-3,6-диметилпиридазин, 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-тиол, 5-хлор-N'-

фенил-N'-(проп-2-ин-1-ил)тиофен-2-сульфоногидразид, 5-фтор-2-[(4-фторбензил)окси]пиримидин-4-амин, 5-фтор-2-[(4-метилбензил)окси]пиримидин-4-амин, 5-метил-6-октил[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-7-амин, этил(2Z)-3-амино-2-циано-3-фенилпроп-2-еноат, N'-(4-{[3-(4-хлорбензил)-1,2,4-тиадиазол-5-ил]окси}-2,5-диметилфенил)-N-этил-N-метилимидоформаид, N-(4-хлорбензил)-3-[3-метокси-4-(проп-2-ин-1-илокси)фенил]пропанамид, N-[(4-хлорфенил)(циано)метил]-3-[3-метокси-4-(проп-2-ин-1-илокси)фенил]пропанамид, N-[(5-бром-3-хлорпиридин-2-ил)метил]-2,4-дихлорпиридин-3-карбоксамид, N-[1-(5-бром-3-хлорпиридин-2-ил)этил]-2,4-дихлорпиридин-3-карбоксамид, N-[1-(5-бром-3-хлорпиридин-2-ил)этил]-2-фтор-4-иодопиридин-3-карбоксамид, N-{(E)-[(циклопропилметокси)имино][6-(диформетокси)-2,3-дифторфенил]метил}-2-фенилацетамид, N-{(Z)-[(циклопропилметокси)имино][6-(диформетокси)-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-метилимидоформаид, N-метил-2-(1-{[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-(1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-ил)-1,3-тиазол-4-карбоксамид, N-метил-2-(1-{[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-[(1R)-1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-ил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид, N-метил-2-(1-{[5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил]ацетил}пиперидин-4-ил)-N-[(1S)-1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-ил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид, пентил{6-[(1-метил-1H-тетразол-5-ил)(фенил)метилден]-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-тетразол-5-ил)(фенил)метилден]-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]пиридин-3-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-[4'-(3,3-диметилбут-1-ин-1-ил)бифенил-2-ил]-1-метил-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]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-1H-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-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-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-[(1-метил-1H-тетразол-5-ил)(фенил)метилден]-амино}окси)метил]пиридин-2-ил}карбамат.

Также примером добавочного пестицида может быть один или несколько гербицидов, выбранных из группы, состоящей из ацетохлора, ацифлуорфена, ацифлуорфен-натрия, аклонифена, алахлора, аллидохлора, аллоксидима, аллоксидим натрия, аметрина, амикарбазона, амидохлора, амидосульфурона, аминокциклопирахлора, аминокциклопирахлор-калия, аминокциклопирахлор-метила, аминокпиралида, амитрола, аммонийсульфата, анилофоса, азулама, атразина, азафенидина, азимсульфурина, бифлутурамида, беназолина, беназолин-этила, бенфлуралина, бенфуресата, бенсульфурина, бенсульфурон-метила, бензулида, бентазона, бензобициклона, бензофенапа, бициклопирона, бифенокса, биланафоса, биланафос-натрия, биспирибака, биспирибак-натрия, бромацила, бромобутида, бромфеноксима, бромоксинила, бромоксинил-бутирата, -калия, -гептаноата и -октаноата, бузоксина, бутаклора, бутафенацила, бутамифоса, бутенахлора, бутралина, бутроксида, бутилата, кафенстрола, карбетамида, карфентразона, карфентразон-этила, хлорамбена, хлорбромурона, хлорфенака, хлорфенак-натрия, хлорфенпропа, хлорфлуренола, хлорфлуренол-метила, хлоридазона, хлоримурона, хлоримурон-этила, хлорфталима, хлоротолурина, хлортал-диметила, хлорсульфурина, цинидона, цинидон-этила, цинметилина, циносульфурина, клетодима, клодинафоп, клодинафоп-пропаргила, кломазона, клеомпропа, клопиралида, клорансулама, клорансулам-метила, кумилурина, цианамида, цианазина, циклоата, циклосульфамурина, циклоксидима, цигалофоп, 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-, даимурона (димрона), далапона, N-деканола, десмедифама, детосилпиразолата (ДТР), дикамбы, дихлобенила, дихлорпропа, дихлорпроп-Р, диклофоп, диклофоп-метила, диклофоп-Р-метила, диклосулама, дифензоквата, дифлуфеникана, дифлуфензопира, дифлуфензопир-натрия, димефурина, димепиперата, диметахлора, диметаметрина, диметенамида, диметенамида-Р, диметрасульфурона, динитрамина, динотерба, дифенамида, диквата, дикват-дибромида, дитиопира, диу-

рона, DNOC, эндотала, EPTC, эспрокарба, эталфлуралина, этаметсульфурана, этаметсульфуран-метила, этиозина, этофумесата, этоксифена, этоксифен-этила, этокисульфурона, 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)пиримидин-2,4(1Н, 3Н)-диона, феноксапропа, феноксапропа-Р, феноксапроп-этила, феноксапроп-Р-этила, феноксасульфона, фентразида, флампропа, флампроп-N-изопропила, флампроп-N-метила, флазасульфурона, флорасулама, флуазифопа, флуазифопа-Р, флуазифоп-бутила, флуазифоп-Р-бутила, флукарбазона, флукарбазон-натрия, флуцетосульфурона, флухлоралина, флуфенацета (тиафлуамида), флуфенпура, флуфенпур-этила, флуметсулама, флумиклорака, флумиклорак-пентила, флумиоксазина, флуометурона, флуренола, флуренол-бутила, -диметиламмоний и -метила, флуорогликофена, флуорогликофен-этила, флупропаната, флупирсульфурана, флупирсульфуран-метил-натрия, флуридола, флуорохлоридона, флуороксикура, флуороксикур-метила, флуртамон флутиацета, флутиацет-метила, флутиамида, фомезафена, фомезафен-натрия, форамсульфурана, фозамина, глюфосината, глюфосинат аммония, глюфосинат-Р-натрия, глюфосинат-Р-аммония, глюфосинат-Р-натрия, глифосата, глифосата аммония, -изопропиламмония, -диаммония-, -диметиламмония, -калия, -натрия и -тримесима, H-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, гексазинона, HW-02, т.е. 1-(диметоксифосфорил)этил-(2,4-дихлорфенокси)ацетата, имазаметабенза, имазаметабенз-метила, имазамокса, имазамокс-аммония, имазапика, имазапик-аммония, имазапира, имазапир-изопропиламмония, имазахина, имазахина-аммоний, имазетапира, имазетапир-иммония, имазосульфурона, инданофана, индазифлама, иодосульфурона, иодосульфурон-метил-натрия, иоксинила, иоксинил-октаноата, -калия и -натрия, ипфенкарбазона, изопротурона, изоурана, изоксабена, изоксафлутола, карбутилата, KUH-043, т.е. 3-([5-(дифторметил)-1-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-4-ил]метил)сульфонил)-5,5-диметил-4,5-дигидро-1,2-оксазола, кетоспиродокса, лактофена, кенацила, кинурона, МСРА, МСРА-бутотила, -диметиламмония, -2-этилгексила, -изопропиламмония, -калия и -натрия, МСРВ, МСРВ-метила, -этила и -натрия, мекопропа, мекопроп-натрия и -бутотила, мекопроп-Р, мекопроп-Р-бутотила, диметиламмония, -2-этилгексила и -калия, мефенацета, мефлуидида, мезосульфурона, мезосульфурон-метила, мезотриона, метабензтиазурана, метамата, метамифопа, метамитрона, метазахлора, метазосульфурона, метабензтиазурана, метиопирсульфурана, метиозолина, метил изотиоцианата, метобромурана, метолахлора, S-метолахлора, метосулама, метоксурана, метрибузина, метсульфурана, метсульфуран-метила, молината, монолинурана, моноссульфурана, моноссульфуран-эфира, MT-128, т.е. 6-хлор-N-[(2E)-3-хлорпроп-2-ен-1-ил]-5-метил-N-фенилпиридазин-3-амина, MT-5950, т.е. N-(3-хлор-4-изопропилфенил)-2-метилпентан амида, NGGC-011, напропамида, NC-310, т.е. [5-(бензилокси)-1-метил-1Н-пиразол-4-ил](2,4-дихлорфенил)метанона, небурана, никосульфурона, нонановой кислоты (пеларгоновой кислоты), норфлуразона, олеиновой кислоты (жирной кислоты), орбенкарба, ортосульфамурон, оризалина, оксадиаргила, оксадиазона, оксафульфурона, оксацикломефена, оксифлуорфена, параквата, дихлорида параквата, пебулата, пендиметалина, пеноксулама, пентахлорфенола, пентоксазона, петоксамида, нефтяных масел, фенмедифама, пиклорама, пиколинафена, пиноксадена, пипероксидона, претилахлора, примисульфурона, примисульфурон-метила, продиамина, прифлуралина, профоксидима, прометон прометрина, пропахлора, пропанила, пропаквизафола, пропазина, профама, прописохлора, пропоксикарбазона, пропоксикарбазон-натрия, пропирисульфурана, пропирамида, просульфокарба, просульфурона, пираклонила, пирафлуфена, пирафлуфен-этила, пирасульфотолла, пиразолината (пиразолата), пиразосульфурона, пиразосульфурон-этила, пиразоксифена, пирибамбенза, пирибамбенз изопропила, пропирил-пирибамбенза, пирибензоксима, пирибутикарба, пиридафола, пиридата, пирифталида, пириминобака, пириминобак-метила, пиримисульфана, пиритиобака, пиритиобак-натрия, пироксасульфона, пироксулама, квинклорака, квинмерака, квинокламина, хизалофопа, квизалофоп-этила, квизалофопа-Р, квизалофоп-Р-этила, квизалофоп-Р-тефурила, римсульфурана, сафлуфенацила, сетоксидима, сидурана, 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, тебутиурана, тефурилтриона, темботриона, тепралоксидима, тербацила, тербукарба, тербуметона, тербутилазина, тербутрина, тенилхлора, тиазопира, тиенкарбазона, тиенкарбазон-метила, тифенсульфурана, тифенсульфуран-метила, тиобенкарба, топрамезона, тралкоксидима, триафамона, три-аллата, триасульфурона, триазифлама, трибенурана, трибенуран-метила, триклопира, тристазина, трифлорисульфурона, трифлорисульфурон-натрия, трифлуралина, трифлусульфурона, трифлусульфурон-метил тритосульфурона, сульфат мочевины, вернолата, ZJ-0862, т.е. 3,4-дихлор-N-{2-[(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)окси]бензил}анилина или регуляторов роста растений, выбранных из группы, содержащей ацибензолар, ацибензолар-S-метил, 5-аминолевулиновую кислоту, анцимидол, 6-бензиламинопуридин, брассинолид, катехин, хлормекват хлорид, клопроп, цикланилид, 3-(циклопроп-1-енил)пропионовую кислоту, даминозид, дазомет, п-деканол, дикегулак, дикегулак-натрий, эндотал, эндотал-дикалий, -динатрий-и моно-(N,N-диметилалкиламмоний), этефон, флуметралин, флуренол, флуре-

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

В 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" подразумевают, что гербицидную композицию применяют до посадки сельскохозяйственной культуры в месторасположении, под "до всходов" подразумевают, что гербицидную композицию наносят до того, как прорастающие семена сельскохозяйственной культуры выступят над поверхностью месторасположения и "после всходов" означает, что гербицидную композицию применяют, как только сельскохозяйственная культура покажется над поверхностью месторасположения. Эти индивидуальные схемы применения могут быть применены к месторасположению отдельно или в любой комбинации. Например, схема применения может содержать применение до посадки с последующим применением после всходов.

Со многими видами сорняков можно бороться (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 faberi*), ползучий сорняк (*Digitaria sanguinalis*), суринам трава (*Brachiaria decumbens*), овсюг (*Avena fatua*), дурнишник обыкновенный (*Xanthium pensylvanicum*), марь белая (*Chenopodium album*), вьюнок пурпурный (*Ipomoea* spp. и многие другие виды ипомеи, включая *hederacea*, *grandifolia*), амарант (*Amaranthus* spp.), канатник Теофраста (*Abutilon 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*), шерстяник мохнатый (*Erichloa villosa*), чужа (*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 паучник (*Commelina benghalensis*), полевой вьюнок (*Convolvulus arvensis*), циперус пурпурный (*Cyperus rotundus*), бруннихия (*Brunnichia ovata*), сесбания конопляная (*Sesbania exaltata*), резуха канадская (*Senna obtusifolia*), тexasский снык обыкновенный (*Helianthus ciliaris*), просо раздвоенноцветковое (*Panicum dichotomiflorum*), тexasское просо (*Panicum texanum*), широколистная брахиария (*Brachiaria*) и лютик полевой (*Proboscidea louisianica*). В других аспектах настоящего изобретения сорняки содержат устойчивый к гербицидам 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 самосево 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 2X нанесение мезотриона на довсходовой 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-синтазы, таким как глюфосинат (иначе именуемый фосфинотрицином). Фосфинотрицин (PTC, 2-амино-4-метилфосфинотрицин) 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-синтазы, например глюфосинатом. Образцы гербицидов глюфосината представлены на рынке как BASTA®, LIBERTY®, RELY®, CHALLENGE®, IGNITE® и FINALE®.

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

Например, в одном аспекте настоящего изобретения SYHT0H2 соевые растения высаживают для уменьшения риска повреждения от последствий 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 неионные поверхностно-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, устраняет или снижает фитотоксическое действие гербицида у определенных культур. Специалисту в данной области должно быть понятно, что выбор антидота зависит, в частности, от целевой сельскохозяйственной культуры, а также от конкретного гербицида или сочетания гербицидов, включенных в синергическую гербицидную композицию. Примеры антидотов, подходящих для использования с раскрытыми в настоящий момент композициями гербицидов, включают, но не ограничиваются ими, описанные в патентах США №№ 4808208; 5502025; 6124240 и опубликованных патентных заявках США №№. 2006/0148647; 2006/0030485; 2005/0233904; 2005/0049145; 2004/0224849; 2004/0224848; 2004/0224844; 2004/0157737; 2004/0018940; 2003/0171220; 2003/0130120; 2003/0078167, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Эти способы могут включать использование гербицидов в сочетании с антидотами гербицидов, такими как беноксакор, BCS (1-бром-4-[(хлорметил) сульфонилбензин], клоквиносет-мексил, циометринил, дихлормид, 2-(дихлорметил)-2-метил-3-диоксолана (MG 191), фенхлоразол-этил, фенкло-рим, флуразол, флуксофенил, фуриазол, изоксадифенэтил, мефенпир-диэтил, метоксифенон ((4-метокси-3-метилфенил)-(3-метилфенил)метанон), нафтойный ангидрид (1,8-нафтойный ангидрид), ципросульфамид, N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензолсульфонамид и оксабетринил, для повышения безопасности посева. Эффективные в качестве противоядия количества антидотов гербицида можно применять при этом в виде соединений или применять для обработки семян или почвы. Таким образом, один из аспектов настоящего изобретения относится к применению смеси, содержащей гербицид-ингибитор HPPD, по меньшей мере еще один гербицид и эффективное в качестве противоядия количество антидота гербицида.

Обработка семян антидотами гербицида, в частности, применяют для селективной борьбы с 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 SYNT0H2 событие. Следующие химикаты приведены в качестве примера, а не в качестве ограничения способов обработки семян: аланикарб, алдикарб, бендиокарб, бенфуракарб, бутокарбоксим, бутоксикарбоксим, карбарил, карбофуран, карбосульфат, этиофенкарб, фенобукарб, форметанат, фуратиокарб, изопрокарб, метиокарб, метомил, метолкарб, оксамил, пиримикарб, пропоксур, тиодикарб, тиофанокс, триазамат, триметакарб, ХМС, ксилкарб; ацефат, азаметифос, азинфос-этил, азинфос-метил, кадусафос, хлорэтоксифос, хлорфенвинфос, хлормефос, хлорпирифос, хлорпирифос-метил, кумафос, цианофос, деметон-S-метил, диазинон, дихлорвос/DDVP, дикротофос, диметоат, диметилвинфос, дисульфотон, EPN, этион, этопрофос, фамфур, фенамифос, фенитрофос, 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, фонат, фозалон, фосмет, фосфамидон, фоксим, пиримифос-метил, профенофос, пропетафос, протиофос, пираклофос, пиридафентион, квиналфос, сульфотеп, тебупиримфос, темефос, тербуфос, тетрахлорвинфос, тиометон, триазофос, трихлорфон, вимидотион, циклодиен хлорорганических соединений, хлордан, эндосульфат, этипрол, фипронил, акринатрин, аллетрин, D-цис-транс-аллетрин, D-транс-аллетрин, бифентрин, биоаллетрин, биоаллетрин S-изомер циклопентенил, биоресметрин, циклопроптрин, цифлутрин, бета-цифлутрин, цигалотрин, лямбда-цигалотрин, гамма-цигалотрин, циперметрин, альфа-циперметрин, бета-циперметрин, тета-циперметрин, зета-циперметрин, цифенотрин [(1R)-транс-изомеры], дельтаметрин, эмперин [(EZ)-(1R)-изомеры], эсфенвалерат, этофенпрокс, фенпропатрин, фенвалерат, флуцитринат, флюметрин, тауфлувалинат, халфенпрокс, имипротрин, кадетрин, перметрин, фенотрин [(1R)-транс-изомер], праллетрин, пиретрин (пиретрум), ресметрин, силафлуофен, тефлутрин, тетраметрин, тетраметрин [(1R)-изомеры], тралометрин, трансфлутрин; ДЦТ; метоксихлор, ацетамиприд, клотианидин, динотефуран, имидаклоприд, нитенпирам, тиаклоприд, тиаметоксам; никотин, спинеторам, спиносад, абамектин, эмаектинбензоат, лепимектин, милбементин, гидропрен, кинопрен, метопрен; феноксикарб; пирипроксифен, хлорпикрин; сульфурилфторид; бура; антимоноил-тарат калия, пиметрозин; флониамид, клофентезин, хекситазокс, дифлоvidaзин, этоксазол, *Bacillus thuringiensis* подвида *israelensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus Thuringiensis* подвида *aizawai*, *Bacillus Thuringiensis* под-

вида *kurstaki*, *Bacillus Thuringiensis* подвида *tenebrionis*, BT-белки сельскохозяйственных культур: Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Cry2Ab, mCry3A, Cry3Ab, Cry3Bb, Cry34/35Ab1, диафентиурон, азоциклотин, цигексатин, фенбутатиноксид, пропаргит, тетрадифон, хлорфенапир, DNOC, сульфуранид, 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, асеквиноцил, флакрипирим, феназаквин, фенпироксимат, пиримидифен, пиридабен, тебуфенпирад, толфенпирад, ротенон (Derris), индосакарб, метафлумизон, спироциклофен, спиромезифен, спиротетрамат, фосфида алюминия, кальция фосфид, фосфин, фосфид цинка, циенопирафен, хлорантранилипрол, флубендиамид, амидофлумет, азадирахтин, бенклотиаз, бензоксимат, бифеназат, бромпропилат, хинометионат, криолит, циантранилипрол (циазибир), цифлуметофен, дикофол, дифловидазин, флуенсульфон, флуфенерим, флуфипрол, флуопирам, фуфенозид, имидаклотиз, ипродин, 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-циклопропилэтил)карбамоил]фенил}-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-карбоксамид (известный из WO 2005/077934), 4-{[(6-бромпиридин-3-ил)метил](2-фторэтил)амино}фуран-2(5H)-он (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), флупирадиурон, 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]-(циклопропил)амино}фуран-2(5H)-она (известный из WO 2007/115643), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-(циклопропил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из EP-A-0539588), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](метил)амино}фуран-2(5H)-он (известный из EP-A-0539588), {[1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо- λ^4 -сульфанилиден}цианамид (известный из WO 2007/149134) и его диастереомеры {[1(R)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо- λ^4 -сульфанилиден}цианамид (A) и {[1(S)-1-(6-хлорпиридин-3-ил)этил](метил)оксидо- λ^4 -сульфанилиден}цианамид (B) (также известный из WO 2007/149134), а также сульфоксафлор и его диастереомеры [(R)-метил(оксидо){1(R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}- λ^4 -сульфанилиден]-цианамид (A1) и [(S)-метил(оксидо){1(S)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}- λ^4 -сульфанилиден]-цианамид (A2), называют группой диастереомеров A (известный из WO 2010/074747, WO 2010/074751), [(R)-метил(оксидо){1(S)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}- λ^4 -сульфанилиден]цианамид (B1) и [(S)-метил(оксидо){1(R)-1-[6-(трифторметил)пиридин-3-ил]этил}- λ^4 -сульфанилиден]цианамид (B2), именуемый группой диастереомера B (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-трифторэтил)сульфинил]фенил}-3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-амин (известный из WO 2006/043635), [(3S,4aR,12aS,12bS)-3-[(циклопропилкарбонил)окси]-6,12-дигидрокси-4,12b-диметил-11-оксо-9-(пиридин-3-ил)-1,3,4,4a,5,6,6a, 12,12a,12b-декагидро-2H, 11H-бензо-[f]-пирано[4,3-b]хромен-4-ил]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-фторпиримидина (известный из WO 2004/099160), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентил)(3,3,3-трифторпропил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), (2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентил)(3,3,4,4-пентафтор-бутил)малононитрил (известный из WO 2005/063094), 8-[2-(циклопропилметокси)-4-(трифторметил)фенокси]-3-[6-(трифторметил)-пиридазин-3-ил]-3-азабицикло[3.2.1]октан (известный из WO 2007/040280), флоретоквин, PF1364 (CAS-рег. № 1204776-60-2) (известный из JP 2010/018586), 5-[5-(3,5-дифторфенил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 5-[5-(2-хлорпиридин-4-ил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)бензонитрил (известный из WO 2007/075459), 4-[5-(3,5-дихлорфенил)-5-(трифторметил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-2-метил-N-{2-оксо-2-[(2,2,2-трифторэтил)амино]-этил}бензамид (известный из WO 2005/085216), 4-{[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-(циклопропил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-{[(6-

хлорпиридин-3-ил)метил]-2,2-дифторэтил)амино}-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)-метил](этил)амино]-1,3-оксазол-2(5H)-он, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](метил)амино]-1,3-оксазол-2(5H)-он (все известны из WO 2010/005692), NNI-0711 (известный из WO 2002/096882), 1-ацетил-N-[4-(1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-метоксипропан-2-ил)-3-изобутилфенил]-N-изобутирил-3,5-диметил-1H-пиразол-4-карбоксамид (известный из WO 2002/096882), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-хлор-3-метилбензоил]-2-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-этилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-5-циано-3-метилбензоил]-2-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-1,2-диэтилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2005/085216), метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-2-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-пропоксимидазо[1,2-а]пиридин (известный из WO 2007/101369), N-[2-(5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-хлор-6-метилфенил]-3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-карбоксамид (известный из CN 102057925) и метил-2-[3,5-дибром-2-({[3-бром-1-(3-хлорпиридин-2-ил)-1H-пиразол-5-ил]карбонил}амино)-бензоил]-2-этил-1-метилгидразин-карбоксилат (известный из WO 2011/049233); 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, имазаил, имазаил сульфат, имибенконазол, ипконазол, метконазол, миклобутанил, нафтифин, нуаримол, окспоконазол, паклобутразол, пефуразоат, пенконазолом, пипералин, прохлораз, пропиконазоло, протиоконазол, пирибутикарб, пирифенокс, квинконазол, симеконазол, спироksamин, тебуконазол, тербинафин, тетраконазол, триадимефон, триадименол, тридеморф, трифлумизол, трифорин, тритиконазол, униконазол, униконазол-р, виниконазол, вориконазол, 1-(4-хлорфенил)-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)циклогептанол, метил-1-(2,2-диметил-2,3-дигидро-1H-инден-1-ил)-1H-имидазол-5-карбоксилат, N'-{5-(диформетил)-2-метил-4-[3-(триметилсилил)-пропокси]фенил}-N-этил-N-метилимидоформамид, N-этил-N-метил-N'-{2-метил-5-(трифтор-метил)-4-[3-(триметилсилил)пропокси]фенил}имидоформамид, O-[1-(4-метоксифен-окси)-3,3-диметилбутан-2-ил]-1H-имидазол-1-карботиоат, биксафен, боскалид, карбоксин, дифлуметорим, фенфурам, флуопирам, флутоланил, флуксапироксад, фураметпир, фурмециклокс, 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, тифлузамид, 1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафторетокси)фенил]-3-(трифторметил)-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-1-метил-N-[2-(1,1,2,2-тетрафторетокси)фенил]-1H-пиразол-4-карбоксамид, 3-(дифторметил)-N-[4-фтор-2-(1,1,2,3,3,3-гексафторпропокси)фенил]-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[1-(2,4-дихлорфенил)-1-метоксипропан-2-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-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-метанонафтаден-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[(1S,4R)-9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтаден-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, N-[(1R,4S)-9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафтаден-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид, аметоктрадин, амисульбром, азоксистробин, циазофамид, куметоксистробин, кумоксистробин, димоксистробин, энестробурин, фамоксадон, фенамидон, феноксистробин, флуоксастробин, крезоксим-метил, метоминостробин, орисастробин, пикоксистробин, пиракlostробин, пираметостробин, пираоксистробин, пирибенкарб, триклопирикарб, трифлуксистробин, (2E)-2-(2-{[6-(3-хлор-2-метилфенокси)-5-фторпиридин-4-ил]окси}фенил)-2-(метоксимино)-N-метилэтанамид, (2E)-2-(метоксимино)-N-метил-2-(2-{[1-(1E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден}амино]окси}метил)фенилэтанамид, (2E)-2-(метоксимино)-N-метил-2-{2-[(E)-{1-[3-(трифторметил)фенил]этокси}имино]метил}фенилэтанамид, (2E)-2-{2-[(1E)-1-(3-{[1-(E)-1-фтор-2-фенилэтилен]окси}фенил)этилиден]амино}окси]метил}фенил}-2-(метоксимино)-N-метилэтанамид, (2E)-2-{2-[(1E)-1-(3-{[1-(E)-1-фтор-2-фенилэтилен]окси}фенил)этилиден]амино}окси]метил}фенил}-2-(метоксимино)-N-метилэтанамид, 2-хлор-N-(1,1,3-триметил-2,3-дигидро-1H-инден-4-ил)пиридин-3-карбоксамид, 5-метокси-2-метил-4-(2-{[1-(1E)-1-[3-(трифторметил)фенил]этилиден}амино]окси}метил)фенил)-2,4-дигидро-3H-1,2,4-триазол-3-он, метил-(2E)-2-{2-[(1E)-1-(3-{[1-(E)-1-фтор-2-фенилэтилен]окси}фенил)этилиден]амино]окси}метил}фенил)-2-метокси-N-метилацетид, (2R)-2-{2-[(2,5-диметилфенокси)метил]фенил}-2-метокси-N-метилацетид, беномил, карбендазим, хлорфеназол, диэтофенкарб, этабоксам, флуопиколд, фуберидазол, пенцикурон, тиабендазол, тиофанат-метил, тиофанат, зоксамид, 5-хлор-7-(4-метилпиперидин-1-ил)-6-(2,4,6-трифторфенил)-1,2,4-триазоло [1,5-а]пиримидин, 3-хлор-5-(6-хлорпиридин-3-ил)-6-метил-4-

(2,4,6-трифторфенил) пиридазин, бордоская 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, манкозеп, манеб, метирам, метирам цинк, оксин меди, пропамидин, пропинеб, сера, соединения серы, включая полисульфид кальция, тирам, толлфлуанид, цинеб, зирам, ацибензолар-8-метил, изотианил, пробеназол, тиадинил, андоприм, бластицидин-S, ципродинил, касугамицин, касугамицин гидрохлоридгидрат, мепанипирим, пириметанил, 3-(5-фтор-3,3,4,4-тетраметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)хинолин, фентин ацетат, хлорид фентин, фентин гидроксид, силтиофам, бентиаваликарб, диметоморф, флуморф, ипроваликарб, мандипропамид, полиоксисины, полиоксорим, валидамицин А, валифеналат, бифенил, хлоронеб, диклоран, эдифенфос, этридиазол, иодокарб, ипробенфос, изопропиолан, пропамокарб, пропамокарб гидрохлорид, протиокарб, пиразофос, квинтоцен, текназен толклофос-метил, карпропамид, диклоцимет, феноксанил, фталид, пироквилон, трициклазол, 2,2,2-трифторэтил{3-метил-1-[(4-метилбензоил)амино]бутан-2-ил}карбамат, беналаксил, беналаксил-М (киралаксил), бупиримат, клозилак, диметиримол, этиримол, фуралаксил, гимексазол, металаксил, металаксил-М (мефеноксам), офурас, оксациквил, оксолиновая кислота, хлоролинол, фенпикло-нил, флудиооксонил, ипродион, процимидон, хиноксифен, винклозолил, бинапакрил, динокап, феримзон, флуазинам, метилдинокап, бентиазол, бетоксазин, капсимицин, карвон, хинометионат, пириофенон (хлазафенон), куфранеб, цифлуфенамид, цимоксанил, ципросульфамид, дазомет, дебакарб, дихлорофен, дикломезин, дифензокват, дифензокват метилсульфат, дифениламин, экомат, фенпиразамин, флуметовер, флуороимид, флусульфамид, флутанил, фосетил-алюминий, фосетил-кальций, фосетил-натрий, гексахлорбензол, иримамицин, метасульфоккарб, метил изотиоцианат, метрафенон, милдиомицин, натамицин, никель диметилдитиокарбамат, нитротал-изопропил, октилинон, оксамокарб, оксифентиин, пентахлорфенол и соли, фенотрин, фосфористая кислота и ее соли, пропамокарб-фосетилат, пропанозин-натрий, проквиазид, пириморф, (2E)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, (2Z)-3-(4-трет-бутилфенил)-3-(2-хлорпиридин-4-ил)-1-(морфолин-4-ил)проп-2-ен-1-он, пирролнитрин, тебуфлоквин, теклофталам, толнифанид, триазоксид, трихламид, зариламид, (3S,6S,7R,8R)-8-бензил-3-[(3-[(изобутирилокси)метокси]-4-метоксипиридин-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-[(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-[(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-[(5S)-5-фенил-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)этанон, 2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]-1-(4-{4-[(5S)-5-фенил-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил]-1,3-тиазол-2-ил}пиперидин-1-ил)этанон, 2-[5-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]-1-{4-[(5-фенил-4,5-дигидро-1,2-оксазол-3-ил)-1,3-тиазол-2-ил]пиперидин-1-ил}этанон, 2-бутоксид-6-иод-3-пропил-4Н-хромен-4-он, 2-хлор-5-[2-хлор-1-(2,6-дифтор-4-метоксифенил)-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-дифтор-фенил)-3,6-диметилпиридазин, 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-тиол, 5-хлор-N'-фенил-N'-(проп-2-ин-1-ил)тиофен-2-сульфонигидразид, 5-фтор-2-[(4-фторбензил)окси]пиримидин-4-амин, 5-фтор-2-[(4-метилбензил)окси]пиримидин-4-амин, 5-метил-6-октил[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-амин, этил(2Z)-3-амино-2-циано-3-фенилпроп-2-еноат, N'-(4-{3-(4-хлорбензил)-1,2,4-тиадиазол-5-ил}окси)-2,5-диметилфенил-N-этил-N-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-[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-иод-пиридин-3-карбоксамид, N-{(E)-[(циклопропилметокси)имино]]6-(дифторметокси)-2,3-дифторфенил}метил}-2-фенилацетамид, N-{(Z)-[(циклопропилметокси)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-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-тетрагидронафтаден-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-тетрагидронафтаден-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-тетрагидронафтаден-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)метилден]-амино}окси}-метил]пиридин-2-ил}карбамат, 1-метил-3-(трифторметил)-N-[2'-

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

В других аспектах настоящего изобретения гербицид или соединение гербицидов, примененные к SYNT0H2 растению, действуют как антидот. Например, первый гербицид или соединение гербицидов применяют в эффективном в качестве противоядия количестве к растению. Например, способ может содержать засадку посевной площади семенами сельскохозяйственных культур или растениями, которые содержат первый полинуклеотид, кодирующий полипептид, который может придать толерантность к ингибитору гербицида HPPD, функционально связанный с промотором, активным в растении, и второй полинуклеотид, кодирующий полипептид, который придает толерантность к гербициду, функционально связанный с промотором, активным в растении. Соединение гербицидов, содержащее по меньшей мере эффективное количество первого и второго гербицидов, применяют к сельскохозяйственной культуре, частям сельскохозяйственной культуры, сорнякам или области их возделывания. Эффективное количество соединения гербицидов борется с сорняками, причем эффективное количество первого гербицида не переносится сельскохозяйственной культурой при применении отдельно по сравнению с контрольной сельскохозяйственной культурой, которую не подвергли воздействию первого гербицида, при этом эффективное количество второго гербицида является достаточным для получения эффекта противоядия, где эффект противоядия обеспечивает повышение толерантности сельскохозяйственной культуры при применении первого и второго 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 SYNT0H2 (см. примеры 5 и 6).

В еще одном аспекте настоящего изобретения семена соевого растения, содержащего событие SYNT0H2, 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, моновенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот. Оно имеет в составе типичную смесь 11% пальмитиновой, 4% стеариновой, 25% олеиновой, 50% линолевой и 9% линоленовой жирных кислот ("Economic Implications of Modified Soybean Traits Summary Report", Iowa Soybean Promotion Board and American Soybean Association Special Report 92S, May 1990). Изменения в составе жирных кислот для повышения устойчивости к окислению и питательной ценности пользуются постоянным спросом. Промышленное использование соевого масла, которое подвергают дальнейшей переработке, включает ингредиенты для красок, пластмасс, волокон, моющих средств, косметических средств, смазочных материалов и биодизельного топлива. Соевое масло может быть расщепленным, интерэтери-

фицированным, сульфированным, эпоксицированным, полимеризованным, этоксицированным или расщепляемым. Разработка и получение производных соевого масла с улучшенной функциональностью и улучшенным химическим составом является быстро развивающейся областью. Типичная смесь триглицеридов, как правило, является расщепленной и разделенной на чистые жирные кислоты, которые затем смешивают со спиртами, полученными из нефти, или кислотами, азотом, сульфонатами, хлоридом, 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 "сухарики" с помощью механического давления и пара; (viii) отмывание гексаном с целью разбавления жиров; (ix) нагревание при 100°C в течение 20 мин для испарения жиров (восстановленные жиры создают соевое масло), (x) дополнительный нагрев для удаления гексана, (xi) прессование сухариков частями от 2 до 4 мм с получением соевой муки или прессование в соевый кормовой жмых.

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

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 бициклопирона, от 25 до 250 г/га изоксафлютола, 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.

- 33 -

	трифлорисульфурона, трибенурон-метила, тиазопира, диклосулама, клорансулам-метила, флукарбазона, флуметулама, тиенкарбазона, хлоримурон-этила g. 5-250г/га пирасульфатол + (необязательно) 5-500 г/га любого гербицида или смеси гербицидов, выбранных из группы, состоящей из просульфурина, примисульфурона, триасульфурона, бенсульфурона, никосульфурона, римсульфурона, примисульфурона, тифенсульфурона, форамсульфурона, хлорсульфурона, галосульфурона, имазаксина, имазапика, имазапипира, имазетапипира, имазамокса, нодосульфурона, метсульфурона, мезосульфурона, сульфосульфурона, трифлорисульфурона, трибенурон-метила, тиазопира, диклосулама, клорансулам-метила, флукарбазона, флуметулама, тиенкарбазона, хлоримурон-этила
Устойчивость к глифосату например, EPSPS (например, GTS 40-3-2, MON89788, FG72, DP-356043-5) и устойчивость к глюфонату например, pat/bar (например, A2704-12, DAS-68416-4, A5547-127, GU262)	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата b. 25-250г/га мезотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата c. 25-250г/га бициклопирона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата d. 25-250г/га изоксафлотила + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата e. 25-250г/га темботриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата f. 5-250г/га топрамезона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата g. 5-250г/га пирасульфатол + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата
Устойчивость к глифосату например, EPSPS (например, GTS 40-3-2, MON89788, FG72, DP-356043-5) и устойчивость к глюфонату например, pat/bar (например, A2704-12, DAS-68416-4, A5547-127, GU262) и толерантность к дикамбе (например, MON87708)	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 50-2000 г/га дикамба b. 25-250г/га мезотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 50-2000 г/га дикамба c. 25-250г/га бициклопирона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 50-2000 г/га дикамба d. 25-250г/га изоксафлотила + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 50-2000 г/га дикамба e. 25-250г/га темботриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 50-2000 г/га дикамба f. 5-250г/га топрамезона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 50-2000 г/га дикамба g. 5-250г/га пирасульфатол + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 50-2000 г/га дикамба
Устойчивость к глифосату например, EPSPS (например, GTS 40-3-2, MON89788, FG72, DP-356043-5)	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D b. 25-250г/га мезотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D
и устойчивость к глюфонату например, pat/bar (например, A2704-12, DAS-68416-4, A5547-127, GU262) и толерантность к 2,4-D (например, DAS-68416-4, DAS-40278-9))	c. 25-250г/га бициклопирона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D d. 25-250г/га изоксафлотила + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D e. 25-250г/га темботриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D f. 5-250г/га топрамезона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D g. 5-250г/га пирасульфатол + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 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 бициклопирона + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата d. 25-250г/га изоксафлотила + (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 пирасульфатол + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата
Устойчивость к глюфонату например, PAT, BAR	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната b. 25-250г/га мезотриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната c. 25-250г/га бициклопирона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната d. 25-250г/га изоксафлотила + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната e. 25-250г/га темботриона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната f. 5-250г/га топрамезона + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната g. 5-250г/га пирасульфатол + (необязательно) 200-1500 г/га глюфоната
Толерантность к 2,4-D, например, ttdA, 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 бициклопирона + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D d. 25-250г/га изоксафлотила + (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 пирасульфатол + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D
Толерантность к	a. 25-500г/га сулькотриона + (необязательно) 50-2000 г/га дикамба

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

	примисульфурона, триаисульфурона, бенсульфурона, никосульфурона, римсульфурона, примисульфурона, тифенсульфурона, форамсульфурона, хлорсульфурона, галосульфурона, имазакхина, имазапика, имазапипера, имазетатипера, имазамокса, иодосульфурона, метсульфурона, мезосульфурона, сульфосульфурона, трифлюксисульфурона, трибенунон-метила, тизапипера, диклосулама, клорансулам-метила, флукарбазона, флуметсулама, тленкарбазона, хлоримурон-этила + (необязательно) 100-2000 г/га 2,4-D
г.	5-250 г/га пирасульфатола + (необязательно) 200-1500 г/га глифосината + (необязательно) 350-2000 г/га глифосата + (необязательно) 5-500 г/га любого гербицида или смеси гербицидов, выбранных из группы, состоящей из просульфурона, примисульфурона, триаисульфурона, бенсульфурона, никосульфурона, римсульфурона, примисульфурона, тифенсульфурона, форамсульфурона, хлорсульфурона, галосульфурона, имазакхина, имазапика, имазапипера, имазетатипера, имазамокса, иодосульфурона, метсульфурона, мезосульфурона, сульфосульфурона, трифлюксисульфурона, трибенунон-метила, тизапипера, диклосулама, клорансулам-метила, флукарбазона, флуметсулама, тленкарбазона, 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 SYNT0H2, включают, но не ограничиваются ими, признаки, кодирующие устойчивость к глифосату (например, устойчивые растения или бактериальные EPSPS, GOX, GAT), устойчивость к глюфосинату (например, PAT, BAR), ацетолактатсинтазе (ALS), ингибирующей устойчивости к гербицидам (например, имидазолинам [таким, как имазетапир], сульфонилмочевинам, триазолопиримидин сульфонанилиду, пиримидинилтиобензоатам и другим химикатам), устойчивость к бромксинилу (например, Bxn), устойчивость к ингибиторам HPPD (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 протопорфириноген оксидазе IX (PPO)-ингибирующей гербициды (например, фомезафену, ацифлуорфен -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 алканеат 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, амидосульфурона, аминоклопирахлора, аминоклопирахлор-калия, аминоклопирахлор-метила, аминоклопирахлор-метила, аминопираллида, амитрола, аммонийсульфата, анилофоса, азулама, атразина, азафенидина, азимсульфурона, бифлутурамида, беназолина, беназолин-этила, бенфлуралина, бенфуресата, бенсульфурона, бенсульфурон-метила, бензулид, бентазона, бензобиклорона, бензофенапа, бициклопирона, бифенокс, биланафоса, биланафос-натрия, биспирибака, биспирибак-натрия, бромацила, бромобутида, бромфеноксима, бромоксинила, бромоксинил-бутирата, калий-, -гептаноат октаноат бисоксина, бутаклора, бутафенацила, бутафифоса, бутенахлора, бутралина, бутроксидима, бутилатома, кафенстрола, карбетамида, карфентразона, карфентразон-этила, хлорамбена, хлорбромурона, хлорфенака, хлорфенак-натрия, хлорфенпропа, хлорфлуоренола, хлорфлуоренол-метила, хлоридазона, хлоримурона, хлоримурон-этила, хлорфталима, хлоротолуруна, хлортал-диметил, хлорсульфурона, цинидона, цинидон-этила, цинметилина, циносульфурона, клетодима, клодинафоп, клодинафоп-пропаргила, кломазона, клонепропа, клопиралида, клорансулама, клорансулам-метила, кумилуруна, цианамид, цианазина, циклоата, циклосульфамурона, циклоксидима, цигалофоп, цигалофоп-бутила, ципразина, 2,4-D, 2,4-D-бутилата, -бутила, -диметиламмония, -диоламина, -этила, 2-этилгексила, дазомета, -изобутила, -изооктила, -изопропиламмония, -калия и -триисопропанолламмония троломина, 2,4-DB, 2,4-DB-бутил, -диметиламмония, -изооктила, -калия и натрия, даимурона (димрона), далапона, N-деканола, десмедифама, детосил-пиразолат (DTP), дикамбы, дихлобензила, дихлорпропа, дихлорпроп-Р, диклофоп, диклофоп-метил, диклофоп-Р-метил, диклосулама, дифензоквата, дифлуфеникана, дифлуфензопира, дифлуфензопир-натрия, димефурона, диметиперата, диметаклора, диметаметрина, диметенамида, диметенамида-Р, диметрасульфурона, динитрамина, динотерба, дифенамида, дикватом, дикватом-дихлорида, дитиопира, диурона, DNOC, эндотала, ЕРТС, эспрокарба, эталфлуралина, этаметсульфурона, этаметсульфурон-метил, этиозина, этофумесата, этоксифена, этоксифен-этила, этоксисульфурона, этобензона, F-5231, например, N-{2-хлор-4-фтор-5-[4-(3-фторпропил)-5-оксо-4,5-дигидро-1Н-тетразол-1-ил]фенил}этансульфонамид, F-7967, например, 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1Н-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)пиримидин-2,4(1Н,3Н)-диона, феноксапропа, феноксапропа-Р, феноксапроп-этила, феноксапроп-Р-этила, феноксасульфона, фентразамида, флампропа, флампроп-М-изопропила, флампроп-М-метил, флзасульфурона, флорасулама, флуазифоп, флуазифоп-Р, флуазифоп-бутила, флуазифоп-Р-бутила, флукарбазона, флукарбазон-натрия, флуцетосульфурона, флухлорали-

на, флуфенацета (тиафлуамида), флуфенпура, флуфенпур-этила, флуметсулама, флумиклорака, флумиклорак-пентила, флумиоксазина, флуометурона, флуренола, флуренол-бутила, диметиламмоний-и-метила, флуорогликофена, флуорогликофен-этила, флупропаната, флупирсульфура, флупирсульфурон-метил-натрия, флуридона, флуорохлорида, флуороксипира, флуороксипир-метила, флуртамон флутиацета, флутиацет-метила, флутиамида, фомезафена, фомезафен-натрия, форамсульфура, фозамина, глюфосината, глюфосинат-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-метила, галоксифопа, галоксифопа-Р, галоксифоп-этоксизтила, галоксифоп-Р-этоксизтила, галоксифоп-метила, галоксифоп-Р-метила, гексазинона, НW-02, т.е. 1-(диметоксифосфорил)этил-(2,4-дихлорфенокси)ацетата, имазаметабенза, имазаметабенз-метила, имазамокса, имазамокс-аммония, имазапика, имазапик-аммония, имазапира, имазапир-изопропиламмония, имазахина, имазахина-аммоний, имазетапира, имазетапир-иммония, имазосульфурона, инданофана, индацифрама, иодосульфурона, иодосульфурон-метил-натрия, иоксинила, иоксинил-октаноат-калия и натрия, ипфенкарбазона, изопротурона, изоуруна, изоксабена, изоксафлутола, карбутилата, КУН-043, т.е. 3-({[5-(дифторметил)-1-метил-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-4-ил]метил}сульфонил)-5,5-диметил-4,5-дигидро-1,2-оксазола, кетоспирадокса, лактофена, кенацила, кинуруна, МСРА, МСРА-бутотила, -диметиламмония, -2-этилгексила, -изопропиламмония, -калия и -натрия, МСРВ, МСРВ-метила, -этила и -натрия, мекопропа, мекопроп-натрия и -бутотила, мекопропа-Р, мекопроп-Р-бутотила, диметиламмония, -2-этилгексила и -калия, мефенацета, мефлуидида, мезосульфурона, мезосульфурон-метила, мезотрион, метабензтиазуруна, метама, метамифора, метамитрона, метазаклора, метазосульфурона, метабензтиазуруна, метиопирсульфура, метиозолина, метил изотиоцианата, метобромурона, метолахлора, S-метолахлор, метосулама, метоксурона, метрибузина, метсульфура, метсульфурон -метила, молината, монолинуруна, моноссульфура, моноссульфурон-эфира, МТ-128, например 6-хлор-N-(2E)-3-хлорпроп-2-ен-1-ил]-5-метил-N-фенилпиридазин-3-амин, МТ-5950, т.е. N-(3-хлор-4-изопропилфенил)-2-метилпентан амида, NGGC-011, напропамида, NC-310, т.е. [5-(бензилокси)-1-метил-1Н-пиразол-4-ил](2,4-дихлорфенил)метанона, небуруна, никосульфурона, нонановой кислоты (пеларгоновой кислоты), норфлуразона, олеиновой кислоты (жирной кислоты), орбенкарба, ортосульфамурон, оризалин, оксациаргил, оксациазон, оксафульфурон, оксацикломефон, оксифлуорфена, параквата, дихлорида параквата, пебулата, пендиметалина, пеноксилама, пентахлорфенола, пентоксазона, петоксамида, нефтяных масел, фенмедифама, пиклорам пиколинафена, пиноксадена, пиперофоса, претилахлора, примисульфурона, примисульфурон-метила, продиамина, прифлуралина, профоксидима, прометон прометрина, пропахло-ра, пропанила, пропаквизафора, пропазина, профама, прописохлора, пропоксикарбазона, пропоксикарба-зон-натрия, пропирисульфура, пропизамида, просульфокарба, просульфурона, пираклонила, пирафлу-фена, пирафлуфен-этила, пирасульфотол, пиразолината (пиразолата), пиразосульфурона, пиразосульфу-рон-этила, пиразоксифена, пирибамбенза, пирибамбенз- изопропила, пропила-пирибамбенза, пирибензок-сима, пирибутикарба, пиридафола, пиридата, пирифталида, пириминобака, пириминобак-метила, пиримисульфана, пиритиобака, пиритиобак-натрия, пироксасульфона, пироксилама, пироклорака, квинмера-ка, квинокламина, хизалофопа, хизалофоп-этиал, хизалофоп-Р, хизалофоп-Р-этила, хизалофоп-Р-тефурила, римсульфура, сафлуфенацила, сетоксидимом, сидуруна, симазина, симетрина, сульфотрион-на, сульфентразона, сульфометурона, сульфометурон-метила, сульфосульфурона, SW-065, SYN-523, SYP-249, т.е. 1-этокси-3-метил-1-оксобоут-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-диола, 2,3,6-ТВА, ТГА (трихлоруксусной кислоты), ТСА-натрия, тебутиурон, тефурилтриона, темботриона, тепралоксидима, тербацила, тербукарба, тербуметона, тербу-тилазина, тербутрин, тенилхлора, тиазопира, тиенкарбазона, тиенкарбазон-метила, тифенсульфура, тифенсульфурон-метила, тиобенкарба, топрамезона, тралоксидим триафамона, три-аллата, триасульфу-рона, триазифлама, трибенуруна, трибенурун-метила, триклопира, триетазина, трифлуксисульфурона, трифлуксисульфурон-натрия, трифлуралина, трифлусульфурона, трифлусульфурон-метил тритосульфу-рона, мочевины, сульфат вернолата, ZJ-0862, т.е. 3,4-дихлор-N-{2-[(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)окси]бензил}анилина или регуляторов роста растений, выбранных из группы, состоящей из ацибен-золара, ацибензолар-S-метила, 5-аминолевулиновой кислоты, анцимидола, 6-бензиламинопурина, брас-синолида, катехина, хлормекватхлорида, клопропа, цикланилида, 3-(циклопроп-1-енил)пропионовой ки-слоты, даминозида, дазомета, п-деканола, дикегулака, дикегулак-натрия, эндотала, эндотал-дикалия, -динатрия и моно-(N,N-диметилалкиламмония), этефона, флуметралина, флуренола, флуренол-бутила, флурпримидола, форхлорфенуруна, гибберелловой 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, паклобутразо-ла, N-(2-фенилэтил)-бета-аланина, N-полуамид фенилфталевой кислоты, прогексадиона, прогексадион-кальция, прогидрожасмона, салициловой кислоты, стриголактона, текназена, тидиазуруна, триаконтано-ла, тринексапака, тринексапак-этила, тситодефа, униказола, униказола-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 SYT0H2 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+топрамезон, мезотрион+бициклопирон+изоксафлютол, мезотрион+бициклопирон+пирасульфатол, мезотрион+топрамезон+изоксафлютол, мезотрион+топрамезон+пирасульфатол, мезотрион+изоксафлютол+пирасульфатол, сулькотрион+темботрион+бициклопирон, сулькотрион+темботрион+топрамезон, сулькотрион+темботрион+изоксафлютол, сулькотрион+темботрион+пирасульфатол, сулькотрион+топрамезон+бициклопирон, сулькотрион+топрамезон+изоксафлютол, сулькотрион+топрамезон+пирасульфатол, сулькотрион+бициклопирон+изоксафлютол, сулькотрион+бициклопирон+пирасульфатол, сулькотрион+изоксафлютол+пирасульфатол, темботрион+бициклопирон+топрамезон, темботрион+бициклопирон+изоксафлютол, темботрион+бициклопирон+пирасульфатол, темботрион+топрамезон+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:

сAvHPPD-03
Начало: 1036 Конец: 2355
Соевый кодон-оптимизированный HPPD ген овса, кодирующий SEQ ID NO 14

сPAT-03-01
Начало: 3178 Конец: 3729
PAT Hoescht AO2774 синтетические S. виридохромогены, кодоны растения идентичные Q57146 фосфотрицину
Белок ацетилтрансферазы

сPAT-03-02
Начало: 4761 Конец: 5312
PAT Q57146 S. белок фосфинотрицинацетилтрансферазы виридохромогенов, сPAT-03-01 ДНК, но мутирует BamH1, Bgl2 сайты

сSpec-03
Начало: 6045 Конец: 6833
стрептомицин аденилилтрансфераза; из Tn7 (aadA)

сVirG-01
Начало: 7133 Конец: 7858
G ген вирулентности из Agrobacterium tumefaciens (virGN54D, содержащий TTG кодон начала) virGN54D, полученный из pAD1289, описанного в Hansen et al. 1994, PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A 91:7603-7607

сRepA-01

Начало: 788 Конец: 8961
 RepA, pVS1 белок репликации от A до G при nt735
 eTMV-02
 Начало: 965 Конец: 1032 (комплементарный)
 Вирус табачной мозаики (TMV_ Omega 5'UTR лидер последовательности, предназначенный для усиления экспрессии.
 EMBL: TOTMV6
 e35S-05
 Начало: 608 Конец: 900 (Комплементарный)
 Вирус мозаики цветной капусты 35S участок энхансера с от С до Т & С в т.н.п. изменениями.
 eFMV-03
 Начало: 408 Конец: 601 (Комплементарный)
 Энхансер вируса мозаики норичника.
 bNRB-05
 Начало: 4 Конец: 259 (Комплементарный)
 Правая границная область Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* нопалин ти-плазмиды.
 bNRB-01-01
 Начало: 101 Конец: 125 (Комплементарный)
 Повтор правой границы Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* нопалин ти-плазмиды.
 bNLB-03
 Начало: 5636 Конец: 5765 (Комплементарный)
 Левая границная область Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* нопалин ти-плазмиды.
 (Zambryski *et al.* 1980, Science, 209:1385-1391) EMBL no: J01825.
 bNLB-01-01
 Начало: 5671 Конец: 5695 (Комплементарный)
 25 т.п.н. левой границной области Т-ДНК нопалин ти-плазмиды опухолесобразующей агробактерии.
 pr35S-04-01
 Начало: 2633 Конец: 3153
 35S промотор; изначально определенный на карте длиной 64 т.п.н., точного соответствия в литературе не найдено (LF июль 2004 года)
 prCMP-06
 Начало: 4024 Конец: 4677
 Промотор вируса скручивания желтого листа *Cestrum* с лидерной последовательностью. Промотор транскрипта не полной длины. 528 пар оснований изменили с G на C для удаления внутреннего сайта RsrII.
 oVS1-02
 Начало: 9004 Конец: 9408
 Исходная точка репликации и разбегания участка из плазмиды pVS1 *Pseudomonas* (Itoh *et al.* 1984, Plasmid 11: 206-220); аналогичной номеру доступа GenBank U10487; служит в качестве источника репликации в хозяине опухолесобразующей агробактерии
 oCOLE-06
 Начало: 10086 Конец: 10892 (Комплементарный)
 ColE1 исходная точка функциональной репликации в *E. coli*
 tNOS-05-01
 Начало: 2372 Конец: 2624 (Комплементарный)
 NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы
 tNOS-05-01
 Начало: 3763 Конец: 4015
 NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы
 tNOS-05-01
 Начало: 5341 Конец: 5593
 NOS терминатор: 3'UTR гена нопалин синтетазы

Материал соевого растения можно соответствующим образом трансформировать, а плодоносящие растения регенерировать множеством способов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, плодоносящие морфологически нормальные трансгенные соевые растения могут быть получены путем 1) производства соматической эмбриогенетической ткани из, например, незрелой семядоли, гипокотили или другой подходящей ткани; 2) трансформации путем бомбардировки частицами или инфицирования агробактериями и 3) регенерации растений. В одном примере, описанном в патенте США № 5024944, ткань семядоли вырезали из незрелых зародышей сои, необязательно с удаленной зародышевой осью и культивировали на гормонсодержащей среде с образованием соматического эмбрионного растительного материала. Данный материал трансформируют в плодоносящие трансгенные соевые растения с использованием, например, прямых способов ДНК, баллистической трансфекции, открытой 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, гиромоцин, 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, соматическую эмбриогенетическую ткань и цветочную или создающую цветок ткань. Другие примеры трансформации сои включают физические способы доставки ДНК, такие как бомбардировка частицами (см. например, *Finer & McMullen, In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1991, 27P:175-182; *McCabe et al., Bio/technology*, 1998, 6:923-926), усов (*Khalafalla et al., African J. of Biotechnology*, 2006, 5:1594-1599), аэрозольное введение бобам (патент США № 7001754) или опосредованные агробактериями способы доставки (*Hinchee et al., BioTechnology*, 1988, 6:915-922; патент США № 7002058; опубликованные патентные заявки США №№ 20040034889 и 20080229447, *Paz et al., Plant Cell Report*, 2006, 25:206-213).

Соевые трансгенные растения могут быть получены с использованием описанного выше бинарного вектора 15954, содержащего мутантный ген HPPD, используя любой доступный способ трансформации. Необязательно HPPD ген может обеспечить средство отбора и идентификации трансгенной ткани. Например, вектор использовали для трансформации незрелых целевых семян согласно описанию для создания трансгенных HPPD соевых растений, ограничиваясь использованием ингибиторов HPPD, таких как мезотрион, в качестве селективного агента (см. опубликованную патентную заявку США № 20080229447). Необязательно HPPD ген может присутствовать в полинуклеотиде наряду с другими последовательностями, которые обеспечивают дополнительными средствами селекции/идентификации трансформированных тканей, включая, например, известные гены, которые придают устойчивость к каминацину, гидромицину, 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 GUS., также могут быть использованы для идентификации трансформированной ткани.

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

После того как растения укоренились в почве и появился подрост (~1-2 недели), отбирали образцы растений и проверяли на наличие требуемого трансгена с помощью TAQMAN® анализа с использованием соответствующих зондов для HPPD генов или промоторов (например, *prCMT*). Позитивные растения пересаживали в 4" квадратные горшки, содержащие почву Fafard #3. Удобрение с медленным высвобождением Sierra 17-6-12 вводили в почву в рекомендованной дозе. Затем растения перемещали в стандартную теплицу для акклиматизации (~1 неделя). Условиями окружающей среды были: 27°C днем; 21°C ночью; 14-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 SEQUENCHER® (Gene Codes Corporation). Геномную ДНК из соевого события SYHT0H2 изолировали для получения библиотеки лямбда путем изолирования геномной ДНК и ограничения расщепления рестрикционными ферментами *Bam*HI, *Eco*RI и *Kpn*I до завершения, описанного поставщиком рестриктазы (NEB). Неполное расщепление геномной ДНК завершали, применяя *Bfu*CI 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, *Bfu*CI; 2-4 т.п.н., *Bam*HI; 0,7-3,5 т.п.н. и *Eco*RI-*Kpn*I, 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 *Bam*HI, либо *Eco*RI-*Kpn*I. Организовали дотирование, 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 ресуспендировали в SM буфере (Stratagene). Фаг разводили 1/100 в буфере SM и 10 мкл смешивали с 100 мкл клеток, инкубированных при 37°C в течение 15 мин, добавляли 3,5 мл NZY линейной агарозы (50°C), смешанной путем инверсии и распределенной по всем планшетам с L-агаром, которые затем инкубировали в течение ночи при 37°C.

Библиотеку подвергали проверке на отдельные клоны, которые содержали вставленные гетерологичные последовательности. Бактериальные клетки, используемые для посева библиотеки XL-1MRA, приобретали у Stratagene. XL-1MRA клетки выращивали в бульоне NZY с добавлением 0,2% мальтозы в течение 6 ч перед использованием. Зараженные бактериальные клетки сеяли на планшетах с L-агаром, подготовленных путем заливки L-агара на 25×150 мм планшеты, нагретые при 37°C перед использованием. Бактериальные клетки собирали с помощью центрифугирования при 4К и ресуспендирования клеток в SM буфере (Stratagene). 300 мкл бактериальных клеток и 50000 фага смешивали в 15 мл пробирке (Fisher Scientific) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. 9 мл NZY линейной агарозы добавляли и смешивали посредством инверсии, а полученную смесь распределяли по всей поверхности больших планшетов для сохранения гладкой поверхности. Изготавливали 10 планшетов на библиотеку. Для в общей сложности проверенных 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, перемещали на Hybond NX (GE Amersham) мембраны путем размещения мембраны на поверхности планшета. После того как мембрана стала равномерно влажной, ей дали возможность инкубироваться в течение 2 мин. Ориентацию планшета помечали иглой и индийскими чернилами путем проделывания отверстий иглой с чернилами на ней в мембране и агаре в трех разных местах. Меченую мембрану снимали с планшета и помещали мембрану фага сверху на ватман, пропитанный 0,5М NaOH на 5 мин (Bio-Rad способ), с последующим перемещением на ватман, пропитанный 2X SSC, затем сушили на воздухе, при этом ДНК и мембрану перекрестно сшивали с использованием ДНК-кросслинкера фирмы Stratalinker (Stratagene) при 160 мДж.

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

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

P_MTSOY_F2

TTTGTGGTCGTCACCTGCGTT

(SEQ ID NO: 25)

P_MTSOY_R3

CAGGATATATTGTGGTGTAACAAATTGACGCTTAGACAA

(SEQ ID NO: 26)

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

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

Аmplифицированный фрагмент изолировали в 1%-ном агарозном TAE геле. ДНК очищали от агарозы, используя набор для удаления геля QIAQUICK (Qiagen). Зонд помечали случайными штрихами, используя REDIPRIME™ II набор (GE Amersham) с радиоактивным dCT³²P. Зонд отделяли от единичной метки с помощью спин-колонки GE Amersham G-50. Зонд нагревали в течение 5 мин при 95°C перед добавлением к буферу для гибридизации. Гибридизация происходила в течение ночи при 62°C. Фильтры отмывали сначала 2X SSC, 0,5% SDS в течение 30 мин при 62°C, а затем с 0,2 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 SEQUENCHER® (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/FkSeq 0027	GAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAA SEQ ID NO: 27
GSP2/FkSeq 0005	GGCCAGCATGGCCGTATCCGCAATGTGTT SEQ ID NO: 28

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

Параметры последовательности, созданной с помощью и последовательности библиотеки лямбда, и секвенирования GENOMEWALKER™, объединяли для создания последовательности сайта встраивания соевого события SYHT0H2. 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™ READYMIX™, 300 нм праймера 1, 300 нм праймера 2, 100 нм зонда и приблизительно 30 нг ДНК-матрицы в общем объеме 10 мкл. В случае анализа A1720 праймер P10325 находится во вставке и используется для амплификации LB1 T-ДНК-вставки, в то время как праймер P12721 находится в геноме на сайте встраивания. Анализ A1720 генерирует PCR продукт, длина которого составляет 66 пар оснований:

CGGGCGGCCAGCATGGCCGTATCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCT

AAACCCTAAACCAATGGCAC (SEQ ID NO: 24).

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

GGATGAAGAGATGAGAGAACCATCACAGAATTGACGCTTAGACAA

CTTAATAACACATTGCGGATACGGC (SEQ ID NO: 25)

Таблица 5

Идентификатор	Праймер/Зонд	Последовательность (5' → 3')
A1720	P10325 (праймер)	CGGGCGGCCAGCAT (SEQ ID NO: 11)
	P12721 (праймер)	GTGCCATTGGTTTAGGGTTTAGAC (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-TAAGTTGTCTAAGCGTCAATT-MGB* (SEQ ID NO: 16)

FAM - карбоксифлуоресцин;

MGB - дигидроциклопиролоиндола трипептид, связывающийся с малой бороздой;

*MGB - меченый зонд также может быть использован.

Таблица 6

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

В качестве альтернативы геномную ДНК из трансформантов *Glucine max* использовали в качестве матрицы для анализов на основе геля с использованием пары праймеров, показанных в табл. 7 и условиях 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 (Т-ДНК)	Праймер 2 (геном)
SYNTH0H2_LBFS_1	FE0845 (SEQ ID NO: 17)	FE3427 (SEQ ID NO: 18)
SYNTH0H2_LBFS_1	FE0845 (SEQ ID NO: 17)	FE3443 (SEQ ID NO: 19)
SYNTH0H2_LBFS_2	FE0845 (SEQ ID NO: 17)	FE3429 (SEQ ID NO: 20)
SYNTH0H2_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 SYNTH0H2 в полевых условиях.

Событие SYNTH0H2 соевых растений протестировали на эффективность действия в отношении мезотриона в 5 местах на территории Соединенных Штатов. Нетрансгенную линию сои Jack использовали в качестве контроля. Соевые растения, как SYNTH0H2, так и Jack, обрабатывали 210 г а. и./га мезотриона на V2/V3 этапе, а затем оценивали на процентную долю листьев с повреждениями на 4-7 дней после обработки (DAT), 13-17 DAT и 25-33 DAT. Результаты в табл. 9 показывают эффективность 0H2 в отношении мезотриона по сравнению с контрольной линией.

Таблица 9

Генотип	% Повреждение		
	4-7 DAT	13-17 DAT	25-33 DAT
Jack	46,5	81	62,4
SYNTH0H2	13,2	4,7	0

SYNTH0H2 соевых растений протестировали на эффективность действия в отношении глюофосината в 8 местах на территории Соединенных Штатов. Нетрансгенную линию сои Jack использовали в качестве контроля. Соевые растения, как SYNTH0H2, так и Jack, обрабатывали 900 г а. и./га глюофосинатом 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 SYNTH0H2 в отношении глюофосината по сравнению с контрольной линией.

Таблица 10

Генотип	% Повреждения		
	4-8 DAT	13-20 DAT	26-35 DAT
Jack	100	100	100
SYNTH0H2	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 SYNTH0H2 привели в соответствие с 8X базой данных генома сои (т.е. базой данных "Phytozome" в ведении объединенного института генома (Joint Genome Institute) и центра интегративной геномики (Center for Integrative Genomics), доступной во всемирной сети Интернет, см. также Schmutz et al., (2010) Nature 463:178-183) с помощью средства поиска основного локального выравнивания (BLAST; Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215:403-410; Altschul et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402), также доступного в сети Интернет. LB2 привели в соответствие с хромосомой номер 8 (группа сцепления A2) из нуклеотида 9905212-9905310. LB1 привели в соответствие с хромосомой 8 (группа сцепления A2) из нуклеотида 9905326-9905788. Физические позиции затем сравнивали с физическими позициями маркеров, перечисленных в консенсусной карте сои 4.0 (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 SYT0H2 происходила на соевой хромосоме 8 в месте между парами оснований 9905310 и 9905326, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 24 между нуклеотидами 99 и 116. После вставки гетерологичной последовательности, содержащей последовательность HPPD, удаляют 16 пар оснований геномной последовательности, которые соответствуют нуклеотидам 100-115 SEQ ID NO: 24.

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

Таблица 11

Общепринятое название маркера	LG	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 SYNT0H2 сайт встраивания для направленной интеграции в сое.

Фланкирующие последовательности события SYNT0H2, раскрытые в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, используют для поиска в базах данных генома сои. Идентичные совпадения с обеими фланкирующими последовательностями идентифицируют на ВАС-клоне и идентифицируют молекулярные маркеры по месту нахождения. Дополнительные маркеры разрабатывают и используют для тонкого картирования сайта встраивания.

Однородные агрономические свойства трансгена события SYHT0H2 в нескольких поколениях в полевых условиях, сайт интеграции события SYHT0H2 обеспечивают используемый геномный локус для интеграции целевых трансгенов, кроме мутантного фермента HPPD события SYHT0H2. Такая целевая интеграция преодолевает проблемы с так называемыми "эффектами положения" и риском возникновения мутации в геноме в случае интеграции трансгена в хозяина. Дополнительные преимущества такой направленной интеграции включают, но не ограничиваются ими, сокращение ряда трансформационных событий, которые должны быть проверены и испытаны до получения трансгенного растения, которое проявляет желаемый уровень экспрессии трансгена, не обнаруживая в то же время нарушений в результате случайной вставки трансгена в важный локус в геноме хозяина. Кроме того, такая направленная интеграция 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 предназначены 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 распознающих 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 предназначены 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 независимого расщепленного генетического единицы, таких как искусственные хромосомы или мини-хромосомы. ДНК-векторы, содержащие целевой ген (ы) с геномной последовательностью

стью, фланкирующей сайт встраивания SYNT0H2, могут быть доставлены в клетки растений. Таким образом, окружая целевой ген или гены геномной последовательностью, фланкирующей сайт встраивания SYNT0H2, экспрессию таких генов стабилизируют в трансгенном растении-хозяине, включая как однодольные, так и двудольные растения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110>	Сингента Партисипейшнс АГ	
<120>	СОЕВОЕ СОБЫТИЕ SYNT0H2, А ТАКЖЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ	
<130>	72722WOPST	
<150>	US61/423131	
<150>	US61/467621	
<160>	28	
<170>	PatentIn версия 3.5	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Получена из Glycine max и Avena sativa	
<400>	1	
	accatcacag aattgacgct	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Получена из Glycine max и Avena sativa	
<400>	2	
	taaaccstaa ассаатггса	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 agtgtatgta accgacaaca aaaaactaat 60
 aggaatatat aggatgaaga gatgagagaa ccatcacag 99

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

 <400> 8
 accaatggca cacaaaaatt cccatcctag tttttggagt aattaatgaa ctagcaatta 60
 tataataagc tctgtatctg ttatattctg cattaatttt gttgaataaa aaacactgta 120
 aattaattgg tcatgtgtta tattttgcac actaattttt tttttaaaaa aggtgggaga 180
 gcgtgatatt tttagttgtc cagaaaataa agattgaaaa atttgaatgt atttggcacg 240
 tgggatactt taaaaattag aaggcacctt attgtttact tcgatcggag aaaaaataa 300
 aaatccttta tatgttaatt tatttcaatt tgtatgtctg tagtaggaat attaaagtag 360
 acatttatca ttaatctcat tattagtctt tccttttgta gaatctcgtt 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 tgcggatacg gccatgctgg ccgccccgggc	60
atggtaccca attcccgatc tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag	120
tttgcgcgct atattttgtt ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg gactctaate	180
ataaaaaacc atctcataaa taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg	240
taattcaaca gaaattatat gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag	300
aaactttatt gccaaatgtt tgaacgatcg gggaaattcg gggatctaga gctcgactca	360
tatctgggta actggcctaa ctggccttgg aggagctggc aactcaaaat ccctttgcca	420
aaaaccaaca tcatgccatc caccatgctt gtatccagct gcgcgcaatg tccccgggc	480
tgtgtatccc aaagcctcat gcaacctaac agatggatcg tttggaaggc ctataacagc	540
aaccacagac ttaaaacctt gcgcctccat agacttaagc aaatgtgtgt acaatgtaga	600
tcctaggccc aacctttgat gcctatgtga cactgaaaca gtactctcaa ctgtccaatc	660
gtaagcgctt ctagccttcc agggcccagc gtaagcaata ccagccacaa caccctcaac	720
ctcagcaacc aaccaagggc atctatcttg caacctctct agatcatcaa tccactcttg	780
tgggtgttgt ggctctgtcc taaagttcac tgtagacgtc tcaatgtaat gggttaacgat	840
atcaciaaac gcggccatat cagctgctgt agctggccta atctcaactg gtctcctctc	900
cggagacatg gtgggacccg gtaattgtaa atagtaattg taatgttgtt tggtgttgtt	960
tggtgttgtt aattgttgtt aaaatactcg aggggttatg tttttacaaa cgactccaac	1020
aaagtatcaa gttttattca aacagaatga tacagattta aatatcgggc tttatacaaa	1080
ccatatgata tttatcaatt cagtgatect atacggacgg tggagacaaa aatcatcaag	1140
aatcatcttt gagatgagaa agcttagctc ttacctgttt tcgtcgtctt ggcttttctt	1200
cttctgggcc acctgcctga atacttcgcc gccttgacta cttctaggct acttgcctct	1260
tttctctctc taggactatc tctctgagat tttgctccct taacaatgag ggagggggcta	1320
agtatttata gactgacggg tgagtggaca tttcccaaac tacccttact tatttcgtaa	1380
gcccttacgt cattgctcca ttattggagt ctgaagatgc cttcacatgg tggaccccca	1440
cctgtcggcc acgaatctta tttgttcgtc agaaaaagcc aaaccgactg cacagttttt	1500

ccatcgtaggt agggaccact ttggtattga ttaaaggcag cgcacctaac ctttgtcaga	1560
cgcattatatt cagcggtttt cttttacaga ttccatcttc atttgtggga cagtatgtct	1620
gccactttgt ctgccagtaa ttaaacgcgg tccggatcta gtaacataga tgacaccgcg	1680
cgcgataatt tatectagtt tgcgcgctat attttgtttt ctatcgcgta ttaaagtgtat	1740
aattgcggga ctctaatac aaaaacccat ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta	1800
attattacat gcttaacgta attcaacaga aattatatga taatcatcgc aagaccggca	1860
acaggattca atcttaagaa actttattgc caaatgtttg aacgatctgc aggtcgaccc	1920
atggcgccga tatcactagt tcagatctgg gtaactggcc taactggcct tggaggagct	1980
ggcaactcaa aatccctttg ccaaaaacca acatcatgcc atccaccatg cttgtatcca	2040
gctgcgcgca atgtaccccg ggctgtgtat cccaaagcct catgcaacct aacagatgga	2100
tcgtttggaa ggcctataac agcaaccaca gacttaaaac cttgcgcctc catagactta	2160
agcaaagtgt tgtacaatgt ggatccctagg cccaaccttt gatgcctatg tgacacgtaa	2220
acagtactct caactgtcca atcgtaagcg ttccctagcct tccagggccc agcgtaagca	2280
ataccagcca caacaccctc aacctcagca accaaccaag ggtatctatc ttgcaacctc	2340
tctagatcat caatccactc ttgtggtggt tgtggctctg tcctaaagtt cactgtagac	2400
gtctcaatgt aatgggttaac gatatacaca accgcggcca tatcagctgc tgtagctggc	2460
ctaatactcaa ctgggtctct ctcgggagac atgggtggact agtgatttca gcgtgtcctc	2520
tccaaatgaa atgaacttcc ttatatagag gaaggggtctt gcgaaggata gtgggattgt	2580
gcgtcatccc ttacgtcagt ggagatatca catcaatcca cttgctttga agacgtgggt	2640
ggaacgtctt ctttttccac gatgtctctc gtgggtgggg gtccatcttt gggaccactg	2700
tcggcagagg catcttcaac gatggccttt cctttatcgc aatgatggca tttgtaggag	2760
ccaccttctt tttccactat cttcacaata aagtgcagca tagctgggca atggaacctt	2820
tgctgctgca catggacttg ctgtcagatc tgttggagct taatatccgg aaacctctc	2880
ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc	2940
tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggetatcg ttgaagatgc ctctgccgac	3000
agtgggtcca aagatggacc cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca	3060
accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatataccca ctgacgtaag ggatgacgaa	3120
caatcccact atccttctgc aggtcgactc tagaggatcc tataaatagg aagttcattt	3180
catttgagga ggaaacctcg agtatTTTTT caacaattac caacaacaac aaacaacaaa	3240
caacattaca attactatTTT acaattacac atatgcctcc aacaccagct actgctactg	3300
gagctgctgc tgctgccgtt acaccagaac atgctgcaag gtcattccct agagttgttc	3360
gcgttaaccc taggtctgac agattccctg ttctgtcctt ccatcatgtg gagctttgggt	3420

gtgctgatgc agctagtgct gctggctggt tcagctttgc acttggagca ccacttgctg	3480
caagatctga tctgtctaca gggaactcag cacatgcttc tctcctactt cgatctggag	3540
cattagcctt cctttttacc gctccttatg ctccacctcc acaagaagct gcaactgctg	3600
caactgcttc cattccctcc ttttcagcag atgctgcaag aacctttgct gctgcacatg	3660
gacttgctgt cagatctggt ggagttaggg ttgctgatgc agctgaagca tttcgcgtta	3720
gtgttgctgg aggagcaaga cctgcttttg ctccagcaga tcttggtcac ggatttgagc	3780
ttgctgaagt ggagctgtat ggagatgtgg ttctgagatt cgtgagctat cctgacgaaa	3840
ctgacctacc atttctccca ggattcgaga gggtttcaag tccaggtgca gttgactacg	3900
gtttgactcg ctttgaccac gttgttggaa acgttccaga aatggctcct gtcactgact	3960
acatgaaggg attccttggg ttccacgagt tcgctgaatt cacagcagag gatgttggaa	4020
ccacagaatc tggactgaac agtgtggttc tagccaacaa cagtgaagct gttctttctgc	4080
cattgaacga gcctgttcat ggaaccaaga gacgatctca gatccaaacc tacctcgaat	4140
accatggtgg accaggagtt caacacatcg cattggcttc taacgatgtg cttcgaactc	4200
tcagggaaat gagagccaga actccaatgg gagggttcga atttatggct cctccacaag	4260
ccaagtacta tgaaggagtc cgtagaatcg ctggagatgt cttgtcagag gaacagatca	4320
aggagtgtca agaactgggt gttctcggtt atcgagacga tcaaggtgtg ctactccaga	4380
tcttcaccaa accagttggt gatcgctcca cttttttcct cgaaatgatt cagcgaatag	4440
gatgcatgga gaaggatgaa gttgggcaag agtaccagaa aggtggatgt ggtggggttg	4500
gaaaggggaa cttttccgag ttgttcaagt ccatagagga ctacgagaag tcaactggaag	4560
tcaagcagtc tgtcgttgct cagaagagct aagagctctt catatgacga tcgttcaaac	4620
atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat gattatcata	4680
taattttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttat	4740
atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca ttttaatacgc gatagaaaac	4800
aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgcg tgtcatctat gttactagat	4860
cgcggaacca gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgccgta aagactggcg	4920
aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc gtcaacatgg	4980
tggagcacga cacgcttgct tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca gaagacccaa	5040
gggcaattga gacttttcaa caaagatgac ttttcaacaa agggtaatat ccggaaacct	5100
cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg	5160
tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc	5220
cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaag aagaagacgt	5280

tccaaccacg	tcttcaaagc	aagtggattg	atgtgatatc	tccactgacg	taagggatga	5340
cgcacaatcc	cactatcctt	cgcaagaccc	ttcctctata	taaggaagtt	catttcattt	5400
ggagaggaca	cgctgaaatc	actagtccac	catgtctccg	gagaggagac	cagttgagat	5460
taggccagct	acagcagctg	atatggccgc	ggtttgtgat	atcgttaacc	attacattga	5520
gacgtctaca	gtgaacttta	ggacagagcc	acaaacacca	caagagtgga	ttgatgatct	5580
agagagggtg	caagatagat	acccttggtt	ggttgctgag	gttgaggggtg	ttgtggctgg	5640
tattgcttac	gctggggcct	ggaaggctag	gaacgcttac	gattggacag	ttgagagtac	5700
tgtttacgtg	tcacataggc	atcaaagggt	gggcctagga	tccacattgt	acacacattt	5760
gcttaagtct	atggaggcgc	aagggtttta	gtctgtgggt	gctgttatag	gccttcctaaa	5820
cgatccatct	gttaggttgc	atgaggcttt	gggatacaca	gcccggggta	cattgcgcgc	5880
agctggatac	aagcatggtg	gatggcatga	tgttggtttt	tggcaaaggg	attttgagtt	5940
gccagctcct	ccaaggccag	ttaggccagt	taccagatc	tgaactagt	atatcggcgc	6000
catgggtcga	cctgcagatc	gttcaaacat	ttggcaataa	agtttcttaa	gattgaatcc	6060
tgttgccggt	cttgcgatga	ttatcatata	atctctgttg	aattacgtta	agcatgtaat	6120
aattaacatg	taatgcatga	cgttatttat	gagatgggtt	tttatgatta	gagtccccga	6180
attatacatt	taatacgcca	tagaaaacaa	aatatagcgc	gcaaactagg	ataaattatc	6240
gcgcgcgggtg	tcattctatgt	tactagatcc	ggaccgcgtt	taattactgg	cagacaaaagt	6300
ggcagacata	ctgtcccaca	aatgaagatg	gaatctgtaa	aagaaaacgc	gtgaaataat	6360
gcgtctgaca	aaggttaggt	cggctgcctt	taatcaatac	caaagtggtc	cctaccacga	6420
tggaaaaaact	gtgcagtcgg	tttggctttt	tctgaogaac	aaataagatt	cgtggccgac	6480
aggtgggggt	ccaccatgtg	aaggcatctt	cagactccaa	taatggagca	atgacgtaag	6540
ggcttacgaa	ataagtaagg	gtagtgtggg	aaatgtccac	tcaccctgca	gtctataaat	6600
acttagcccc	tccctcattg	ttaagggagc	aaaatctcag	agagatagtc	ctagagagag	6660
aaagagagca	agtagcctag	aagtagtcaa	ggcggcgaag	tattcaggca	ggtggccagg	6720
aagaagaaaa	gccaaagcga	cgaaaacagg	taagagctaa	gctttctcat	ctcaaagatg	6780
attcttgatg	atctttgtct	ccaccgtccg	tataggatca	ctgaattgat	aaatatcata	6840
tggtttgtat	aaaacccgat	atctaaatct	gtatcattct	gtttgaataa	aacttgatac	6900
tttggttgag	tcgtttgtaa	aaacataaac	cctcgagtat	ttttacaaca	attaccaaca	6960
acaacaaaca	acaaacaaca	ttacaattac	tattttacaat	tacaggatcc	caccatgtct	7020
ccggagagga	gaccagttga	gattaggcca	gtacagcag	ctgatatggc	cgcggtttgt	7080
gatatcgtaa	accattacat	tgagacgtct	acagtgaact	ttaggacaga	gccacaaaca	7140
ccacaagagt	ggattgatga	tctagagagg	ttgcaagata	gatacccttg	gttggttgct	7200

gaggttgagg gtgttggtggc tggatttgct tacgctgggc cctggaaggc taggaacgct 7260
 tacgattgga cagttgagag tactgtttac gtgtcacata ggcatcaaag gttgggccta 7320
 ggatctacat tgtacacaca tttgcttaag tctatggagg cgcaagggtt taagtctgtg 7380
 gttgctgtta taggccttcc aaacgatcca tctgttaggt tgcattgaggc tttgggatac 7440
 acagcccggg gtacattgcg cgcagctgga tacaagcatg gtggatggca tgatgttggt 7500
 ttttggcaaa gggattttga gttgccagct cctccaaggc cagttaggcc agttaccag 7560
 atatgagtcg agctctagat cccgaattt cccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag 7620
 tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa 7680
 ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt 7740
 tatgattaga gtcccgaat tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc 7800
 aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc atctatgtta ctagatcggg aattgggtac 7860
 catgcccggg cggccagcat ggccgtatcc gcaatgtgtt attaagttgt ctaa 7914

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

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

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

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

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

<400> 10
 tgatcttaaa aattcaaagt ccacctaatt tgacaaggaa agcaccaggt agcgtttcat 60
 ctaatgtttt ctccatatag ttgactatth acccaagttc atgacgatgt caacaatgca 120
 agttgtacga ctaaacttct tccttggtgca ataaaatgcc atctattact gtcacaaagg 180
 aagtgtttta ctgtcttata agttagtttg attacataag ttttatttag taaacgagct 240
 tattaattta ttgcatatta ttaggtgggc caaaatagaa tagaggatcc agagttatct 300
 aataatttct tatatgaatg ggtctagatt taacaaaaat gaatcaaat catttatgta 360

tgattattct actttatata tatgaggaaa cttaaaaggt ttttttttta ttattatgat	420
attgatatag aatattttatc aatttttttg aaaattattt ttgatataa aatctgattg	480
accattttta ataaattttt tccttacaat gacgtttttt tatatacaag atgaatttaa	540
aattttaatt atgggggatcg aatttaaata tcgattaatg acttaatgat actctaagct	600
aatttagttt tacataattg agaatgaggc accaacattc ttgtggtaat attaaatttt	660
ctgttgactt ttttttacgt aaatgatact tgattagaag atgactaata aatgaaggct	720
ttacatatat tacataagaa ggaggtggag aaagtgtatg taaccgacaa caaaaaacta	780
ataggaatat ataggatgaa gagatgagag aaccatcaca gaattgacgc ttagacaact	840
taataacaca ttgcggatag ggccatgctg gccgcccggg catggtaccc aattcccgat	900
ctagtaacat agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gtttgccgcgc tatattttgt	960
tttctatcgc gtattaaatg tataattgcg ggactcctaata cataaaaaacc catctcataa	1020
ataacgtcat gcattacatg ttaattatta catgcttaac gtaattcaac agaaattata	1080
tgataatcat cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt	1140
ttgaacgatc ggggaaattc ggggatctag agctcgactc atatctgggt aactggccta	1200
actggccttg gaggagctgg caactcaaaa tccctttgcc aaaaaccaac atcatgccat	1260
ccaccatgct tgtatccagc tgcgcgcaat gtaccccggg ctgtgtatcc caaagcctca	1320
tgcaacctaa cagatggatc gtttggaagg cctataacag caaccacaga cttaaaacct	1380
tgcgcctcca tagacttaag caaatgtgtg tacaatgtag atcctaggcc caacctttga	1440
tgcctatgtg acacgtaaac agtactctca actgtccaat cgtaagcggt cctagccttc	1500
cagggcccag cgtaagcaat accagccaca acacccctcaa cctcagcaac caaccaaggg	1560
tatctatctt gcaacctctc tagatcatca atccactctt gtggtgtttg tggtctctgc	1620
ctaaagttca ctgtagacgt ctcaatgtaa tggttaacga tatcacaaac cgcggccata	1680
tcagctgctg tagctggcct aatctcaact ggtctcctct ccggagacat ggtgggatcc	1740
tgtaattgta aatagtaatt gtaatgttgt ttgttggttg ttgttggttg taattgttgt	1800
aaaaatactc gagggtttat gtttttacia acgactccaa caaagtatca agttttattc	1860
aaacagaatg atacagattt aaatatcggt ttttatacaa accatatgat atttatcaat	1920
tcagtgatcc tatacggacg gtggagacaa aaatcatcaa gaatcatctt tgagatgaga	1980
aagcttagct cttacctgtt ttcgtcgtct tggtttttct tcttcctggc cacctgcctg	2040
aatacttcgc cgccttgact acttctagge tacttgcctc ctttctctct ctaggactat	2100
ctctctgaga ttttgctccc ttaacaatga gggaggggct aagtatttat agactgacgg	2160
gtgagtggac atttcccaaa ctacccttac ttatttcgta agcccttacg tcattgctcc	2220
attattggag tctgaagatg ccttcacatg gtggaccccc acctgtcggc cacgaatctt	2280

atttggttcgt	cagaaaaagc	caaaccgact	gcacagtttt	tccatcgtgg	tagggaccac	2340
tttgggtattg	attaaaggca	gccgacctaa	cctttgtcag	acgcattatt	tcacgcgttt	2400
tcttttacag	attccatctt	catttgtggg	acagtatgtc	tgccactttg	tctgccagta	2460
attaaacgcg	gtccggatct	agtaacatag	atgacaccgc	gcgcgataat	ttatcctagt	2520
ttgcgcgcta	tattttgttt	tctatcgcgt	attaaatgta	taattgcggg	actcctaatca	2580
taaaaaccca	tctcataaat	aacgtcatgc	attacatggt	aattattaca	tgcttaacgt	2640
aattcaacag	aaattatatg	ataatcatcg	caagaccggc	aacaggattc	aatcttaaga	2700
aactttattg	ccaaatgttt	gaacgatctg	caggtegacc	catggcgccg	atatcactag	2760
ttcagatctg	ggtaactggc	ctaactggcc	ttggaggagc	tggcaactca	aaatcccttt	2820
gccaaaaacc	aacatcatgc	catccaccat	gcttgtatcc	agctgcgcgc	aatgtacccc	2880
gggctgtgta	tcccaaagcc	tcatgcaacc	taacagatgg	atcgtttgga	aggcctataa	2940
cagcaaccac	agacttaaaa	ccttgcgcct	ccatagactt	aagcaaagt	gtgtacaatg	3000
tggatcctag	gccaacctt	tgatgcctat	gtgacacgta	aacagtactc	tcaactgtcc	3060
aatcgtaagc	gttcctagcc	ttccagggcc	cagcgtaagc	aataccagcc	acaacaccct	3120
caacctcagc	aaccaaccaa	gggtatctat	cttgcaacct	ctctagatca	tcaatccact	3180
cttgtggtgt	ttgtggctct	gtcctaaagt	tcaactgtaga	cgtctcaatg	taatgggttaa	3240
cgatatcaca	aaccgcggcc	atatcagctg	ctgtagctgg	cctaattctca	actggtctcc	3300
tctccggaga	catggtggac	tagtgatttc	agcgtgtcct	ctccaaatga	aatgaacttc	3360
cttatataga	ggaagggctct	tgccaaggat	agtgggattg	tgcgtcatcc	cttacgtcag	3420
tggagatata	acatcaatcc	acttgctttg	aagacgtggg	tggaaacgtct	tctttttcca	3480
cgatgctcct	cgtgggtggg	ggccatctt	tgggaccact	gtcggcagag	gcattctcaa	3540
cgatggcctt	tcctttatcg	caatgatggc	atttgtagga	gccaccttcc	ttttccacta	3600
tcttcacaat	aaagtgacag	atagctgggc	aatggaacct	ttgctgctgc	acatggactt	3660
gctgtcagat	ctgttggagc	ttaatatccg	gaaacctcct	cggattccat	tgcccagcta	3720
tctgtcactt	tattgtgaag	atagtggaaa	aggaagggtgg	ctcctacaaa	tgccatcatt	3780
gcgataaagg	aaaggctatc	gttgaagatg	cctctgccga	cagtgggtccc	aaagatggac	3840
ccccaccac	gaggagcatc	gtggaaaaag	aagacgttcc	aaccacgtct	tcaaagcaag	3900
tggattgatg	tgatatctcc	actgacgtaa	gggatgacga	acaatcccac	tatccttctg	3960
caggtcgact	ctagaggatc	ctataaatag	gaagttcatt	tcatttggag	aggaaacctc	4020
gagtattttt	acaacaatta	ccaacaacaa	caaacaacaa	acaacattac	aattactatt	4080
tacaattaca	catatgcctc	caacaccagc	tactgtctact	ggagctgctg	ctgctgccgt	4140

tacaccagaa catgctgcaa ggtcattccc tagagttggt cgcgttaacc ctaggtctga	4200
cagattccct gttctgtcct tccatcatgt ggagctttgg tgtgctgatg cagctagtgc	4260
tgctggtcgt ttcagctttg cacttggagc accacttgct gcaagatctg atctgtctac	4320
agggaaactca gcacatgctt ctctctact tcgatctgga gcattagcct tcctttttac	4380
cgctccttat gctccacctc cacaagaagc tgcaactgct gcaactgctt ccattccctc	4440
cttttcagca gatgctgcaa gaacctttgc tgctgcacat ggacttgctg tcagatctgt	4500
tggagttagg gttgctgatg cagctgaagc atttcgcgtt agtggttgctg gaggagcaag	4560
acctgctttt gctccagcag atcttgggtca cggatttggga cttgctgaag tggagctgta	4620
tggagatgtg gttctgagat tcgtgagcta tctgacgaa actgacctac catttctccc	4680
aggattcgag agggtttcaa gtccaggtgc agttgactac ggtttgactc gctttgacca	4740
cgttgttgga aacgttccag aaatggctcc tgctcatcgac tacatgaagg gattccttgg	4800
tttccacgag ttctgtgaat tcacagcaga ggatgttgga accacagaat ctggactgaa	4860
cagtgtgggt ctagccaaca acagtgaagc tgttcttctg ccattgaacg agcctgttca	4920
tggaaccaag agacgatctc agatccaaac ctacctgaa taccatgggtg gaccaggagt	4980
tcaacacatc gcattggctt ctaacgatgt gcttcgaact ctcagggaaa tgagagccag	5040
aactccaatg ggaggggttcg aatttatggc tctccacaa gccaaagtact atgaaggagt	5100
ccgtagaatc gctggagatg tcttgtcaga ggaacagatc aaggagtgtc aagaactggg	5160
tgttctcggt gatcgagacg atcaaggtgt gctactccag atcttcacca aaccagttgg	5220
tgatcgctcc acttttttcc tcgaaatgat tcagcgaata ggatgcatgg agaaggatga	5280
agttgggcaa gagtaccaga aaggtggatg tgggtgggttt ggaaagggga acttttccga	5340
gttgttcaag tccatagagg actacgagaa gtcaactggaa gtcaagcagt ctgtcgttgc	5400
tcagaagagc taagagctct tcatatgacg atcgttcaaa catttggtcaa taaagtttct	5460
taagattgaa tctgtttgcc ggtcttgcca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg	5520
ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga	5580
ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact	5640
aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgcggaccc agtcaaagat	5700
tcaaatagag gacctaacag aactcgcctg aaagactggc gaacagttca tacagagtct	5760
cttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acacgcttgt	5820
ctactccaaa aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca	5880
acaaagatga cttttcaaca aagggttaata tccggaaacc tctcggatt ccattgcccc	5940
gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgccat	6000
cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat	6060

ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag 6120
 caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccactatcct 6180
 tcgcaagacc ctctctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac acgctgaaat 6240
 cactagtcca ccatgtctcc ggagaggaga ccagttgaga ttaggccagc tacagcagct 6300
 gatatggccg cggtttgtga tatcgttaac cattacattg agacgtctac agtgaacttt 6360
 aggacagagc cacaaacacc acaagagtgg attgatgac tagagagggt gcaagataga 6420
 tacccttggg tggttgctga ggttgagggt gttgtggctg gtattgctta cgctgggccc 6480
 tggaaggcta ggaacgctta cgattggaca gttgagagta ctgtttacgt gtcacatagg 6540
 catcaaaggt tgggcctagg atccacattg tacacacatt tgcttaagtc tatggaggcg 6600
 caaggtttta agtctgtggg tgctgttata ggccttccaa acgatccatc tgttaggttg 6660
 catgaggctt tgggatacac agcccggggt acattgcgcg cagctggata caagcatggg 6720
 ggatggcatg atgttggttt ttggcaaagg gatthtgagt tgccagctcc tccaaggcca 6780
 gttaggccag ttaccagat ctgaactagt gatatcggcg ccatgggtcg acctgcagat 6840
 cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg 6900
 attatcatat aatttctggt gaattacggt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg 6960
 acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtccgc aattatacat ttaatacgcg 7020
 atagaaaaca aaatatagcg cgcaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcactatg 7080
 ttactagatc cggaccgcgt ttaattactg gcagacaaag tggcagacat actgtccac 7140
 aaatgaagat ggaatctgta aaagaaaacg cgtgaaataa tgcgtctgac aaaggttagg 7200
 tcggctgcct ttaatcaata ccaaagtggg ccctaccacg atggaaaaac tgtgcagtcg 7260
 gtttggcttt ttctgacgaa caaataagat tcgtggccga caggtggggg tccaccatgt 7320
 gaaggcatct tcagactcca ataattggagc aatgacgtaa gggcttacga aataagtaag 7380
 ggtagtttgg gaaatgtcca ctacccgctc agtctataaa tacttagccc ctccctcatt 7440
 gttaaggag caaaatctca gagagatagt cctagagaga gaaagagagc aagtagccta 7500
 gaagtagtca aggcggcgaa gtattcaggc aggtggccag gaagaagaaa agccaagacg 7560
 acgaaaacag gtaagagcta agctttctca tctcaaagat gattcttgat gatttttgtc 7620
 tccaccgtcc gtataggatc actgaattga taaatatcat atggtttgta taaaaccoga 7680
 tatttaaatc tgtatcatc tgtttgaata aaacttgata ctttggttga gtcgtttgta 7740
 aaaacataaa cctcagagta tttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac 7800
 attacaatta ctatttacia ttacaggatc ccaccatgtc tccggagagg agaccagttg 7860
 agattaggcc agctacagca gctgatatgg ccgcggtttg tgatatcggt aaccattaca 7920

ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 7980
 atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc tgagggttgag ggtgttgtgg 8040
 ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaacgc ttacgattgg acagttgaga 8100
 gtactgttta cgtgtcacat aggcatacaa ggttgggcct aggatctaca ttgtacacac 8160
 atttgcttaa gtctatggag gcgcaagggt ttaagtctgt ggttgctgtt ataggccttc 8220
 caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttgggata cacagcccgg ggtacattgc 8280
 ggcgagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttgg tttttggcaa agggattttg 8340
 agttgccagc tcctccaagg ccagttaggc cagttacca gatatgagtc gagctctaga 8400
 tccccgaatt tccccgatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct 8460
 gttgccggtc ttgcgatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata 8520
 attaacatgt aatgcatgac gttatttatg agatggggtt ttatgattag agtccccgaa 8580
 ttatacattt aatacgcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga taaattatcg 8640
 cgcgcggtgt catctatgtt actagatcgg gaattgggta ccatgcccgg gcggccagca 8700
 tggccgtatc cgcaatgtgt tattaagttg tctaaacct aaaccaatgg cacacaaaaa 8760
 ttcccatcct agtttttggg gtaattaatg aactagcaat tatataataa gctctgtatc 8820
 tgttatatte tgcattaatt ttgttgaata aaaaacactg taaattaatt ggtcatgtgt 8880
 tatattttgc acactaattt tttttttaa aaagggtggga gagcgtgata tttttagttg 8940
 tccagaaaat aaagattgaa aaatttgaat gtatttggca cgtgggatac tttaaaaatt 9000
 agaaggcacc ttattgttta cttcgatcgg agaaaaataa taaaatcctt tatatgttaa 9060
 tttattttcaa tttgtatgtc tgtagtagga atattaaagt agacatttat cattaatctc 9120
 attattagtc tttccttttg tagaatctcg ttaattttat taactaactt ttaaataact 9180
 ctctagagga atggaacaaa ataata 9206

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

<220>
 <223> PCR-праймер

<400> 11
 cgggcggcca gcat

14

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

<220>

<223> PCR-праймер
 <400> 12
 gtgccattgg tttagggttt agac 24
 <210> 13
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Зонд для анализа TAQMAN
 <400> 13
 atccgcaatg tggtattaa 19
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> PCR-праймер
 <400> 14
 gccgtatccg caatgtgtta 20
 <210> 15
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> PCR-праймер
 <400> 15
 ggatgaagag atgagagaac catca 25
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Зонд для анализа TAQMAN
 <400> 16
 taagttgtct aagcgtcaat t 21
 <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	
attaacgaga ttctacaaaa ggaag	26
<210> 19	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 19	
ggacaactaa aaatatcacg ctctccca	28
<210> 20	
<211> 26	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 20	
actacataag aaggaggtgg agaaag	26
<210> 21	
<211> 29	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> PCR-праймер	
<400> 21	
gaggtggaga aagtgtatgt aaccgaca	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 tggtattaag ttgtctaaac cctaaacca	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
 ggatgaagag atgagagaac catcacagaa ttgacgctta gacaacttaa taacacattg 60
 cggatacggc 70

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

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

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

 <220>
 <223> PCR-праймер

 <400> 25
 ttttgtggtc 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
gagtcgccga attatacatt taatacgcga 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 д) 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.

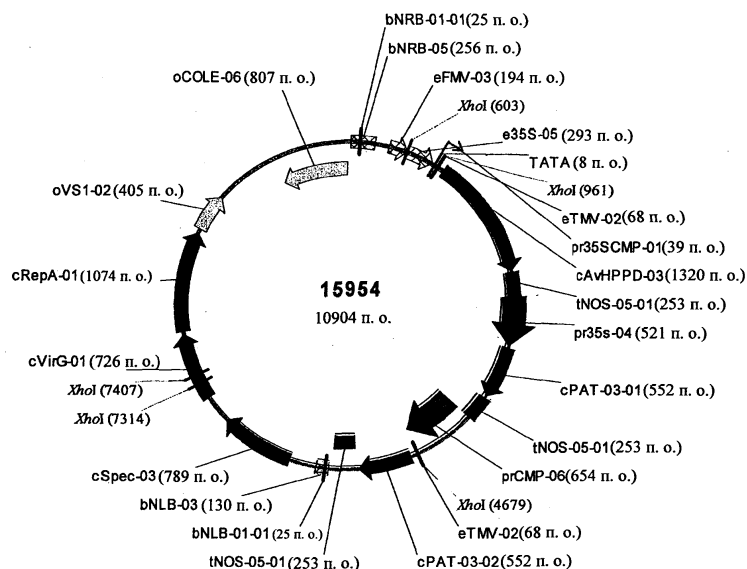
9. Способ получения трансгенного растения сои, устойчивого к ингибитору HPPD и/или глюфосинату, включающий встраивание в геном соевого растения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 10.

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
 - (d) 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
 - (b) 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
 - (b) 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
 - (d) 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.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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