



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2020123081, 13.12.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.12.2017 US 62/599,386

(43) Дата публикации заявки: 17.01.2022 Бюл. № 2

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.07.2020(86) Заявка РСТ:
US 2018/065449 (13.12.2018)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2019/118726 (20.06.2019)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС (US)

(72) Автор(ы):

ЛАРЬЮ, Клэйтон Т. (US),**МОШИРИ, Фархад (US),****РИМ, Джоел И. (US),****ЧЖОУ, Сюэфын (US)**

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРО-ГЕРБИЦИДНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

(57) Формула изобретения

1. Рекомбинантная молекула ДНК, содержащая гетерологичный промотор, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующая белок с активностью гербицид-толерантной протопорфириноген-оксидазы, причем указанный белок имеет по меньшей мере около 50% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-23, и содержит по меньшей мере первую аминокислотную замену в позиции, соответствующей остаткам 125-146 SEQ ID NO: 1, при этом указанную замену выбирают из группы, состоящей из: L125I, L125V, R126A, Y127W, P128A, P128D, P128E, P128K, P128L, P128Q, P128R, P128S, P128T, R129A, R129E, R129G, R129H, R129I, R129K, R129L, R129N, R129Q, R129S, Y130L, R131A, W132A, W132F, W132I, W132K, W132L, W132P, W132R, W132S, W132T, W132V, W132Y, I133A, D134A, D134N, D134Q, D134T, K135A, K135Q, K135R, K135S, K135T, K135V, V136A, M137A, M137C, M137I, M137L, M137S, M137V, I138L, I138M, I138V, Q139A, Q139C, Q139E, Q139G, Q139H, Q139K, Q139L, Q139M, Q139R, Q139S, L140A, L140C, L140F, L140G, L140H, L140I, L140M, L140N, L140Q, L140S, L140T, L140V, L140W, L140Y, I141V, M142L, M142S, M142V, R143A, M144A, T145A, G146A, G146D, G146H, G146K, и G146N.

2. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что указанный белок содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или

по меньшей мере 10 указанных аминокислотных замен.

3. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что указанный белок имеет по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24-124 и 249-263.

4. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что указанный белок включает в себя фермент протопорфириноген-оксидазу класса HemG.

5. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 4, отличающаяся тем, что указанную аминокислотную замену размещают в петле-вставке длинной цепи указанного фермента.

6. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что гетерологичный промотор является функциональным в растительной клетке.

7. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 6, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с молекулой ДНК, кодирующей транзитную последовательность, выполняющую функцию локализации указанного белка в клетке.

8. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что рекомбинантная молекула ДНК содержится в геноме клетки растения.

9. ДНК-конструкция, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК по п. 1.

10. Сконструированный белок, кодируемый рекомбинантной молекулой ДНК по п. 1.

11. Трансгенное растение, семя, клетка или часть растения, содержащие рекомбинантную молекулу ДНК по п. 1.

12. Трансгенное растение, семя, клетка или часть растения по п. 11, отличающиеся тем, что трансгенное растение, семя, клетка или часть растения толерантны по меньшей мере к одному РРО-гербициду.

13. Трансгенное растение, семя, клетка или часть растения по п. 12, отличающиеся тем, что РРО-гербицид выбирают из группы, состоящей из: ацифторфена, фомесафена, лактофена, фторгликофен-этила, оксифторфена, флумиоксазина, азафенидина, карфентразон-этила, сульфентразона, флутиацет-метила, оксадиаргила, оксадиазона, пирафлуфен-этила, сафлуфенацила и S-3100.

14. Трансгенное растение, семя, клетка или часть растения по п. 13, отличающиеся тем, что трансгенное растение, семя, клетка или часть растения толерантны по меньшей мере к второму гербициду.

15. Способ для придания растению, семени, клетке или части растения РРО-гербицидной толерантности, включающий в себя: гетерологичную экспрессию сконструированного белка по п. 10 в указанном растении, семени, клетке или части растения.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что гербицидная толерантность есть к по меньшей мере одному РРО-гербициду, выбранному из группы, состоящей из: ацифторфена, фомесафена, лактофена, фторгликофен-этила, оксифторфена, флумиоксазина, азафенидина, карфентразон-этила, сульфентразона, флутиацет-метила, оксадиаргила, оксадиазона, пирафлуфен-этила, сафлуфенацила и S-3100.

17. Способ получения гербицид-толерантного растения, включающий в себя стадии: а) трансформации растительной клетки рекомбинантной молекулой ДНК по п. 1; и б) регенерации растения из растительной клетки, содержащей рекомбинантную молекулу ДНК.

18. Способ по п. 17, дополнительно включающий в себя стадию отбора указанного растения или его потомства на РРО-гербицидную толерантность.

19. Способ по п. 17, дополнительно включающий в себя стадию скрещивания восстановленного растения с самим собой или с вторым растением для получения

потомства.

20. Способ контроля или предотвращения роста сорняков на территории выращивания растения, включающий в себя применение эффективного количества по меньшей мере одного РРО-гербицида на территории выращивания растения, которая содержит трансгенное растение или семя по п. 11, при этом трансгенное растение или семя является толерантным к РРО-гербициду.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что РРО-гербицид выбирают из группы, состоящей из: ацифторфена, фомесафена, лактофена, фторгликофен-этила, оксифторфена, флумиоксазина, азафенидина, карфентразон-этила, сульфентразона, флутиацет-метила, оксадиаргила, оксадиазона, пирафлуфен-этила, сафлуфенацила и S-3100.

22. Способ идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, обладающий активностью гербицид-толерантной протопорфириноген-оксидазы, включающий в себя:

а) трансформацию штамма *E. coli*, не обладающего РРО-гербицид-толерантной ферментной активностью, бактериальным вектором экспрессии, содержащим рекомбинантную молекулу ДНК по п. 1; и

б) выращивание указанной трансформированной *E. coli* для идентификации белка, обладающего активностью гербицид-толерантной протопорфириноген-оксидазы.

23. Способ скрининга на гербицид-толерантный ген, включающий в себя:

а) экспрессию рекомбинантной молекулы ДНК по п. 1 в растительной клетке; и

б) идентификацию растительной клетки, которая демонстрирует толерантность к РРО-гербициду.

24. Способ получения растения, толерантного к РРО-гербициду и к по меньшей мере одному другому гербициду, включающий в себя:

а) получение растения по п. 11;

б) скрещивание растения со вторым растением, содержащим толерантность к по меньшей мере одному другому гербициду, и

с) отбор растения-потомка, являющегося результатом указанного скрещивания, которое содержит толерантность к РРО-гербициду и к по меньшей мере одному другому гербициду.

25. Способ уменьшения возникновения гербицид-толерантных сорняков, включающий в себя:

а) культивирование растения по п. 11 в среде произрастания культуры; и

б) применение РРО-гербицида и по меньшей мере одного другого гербицида к среде произрастания культуры, при этом культурное растение является толерантным к РРО-гербициду и к по меньшей мере одному другому гербициду.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что РРО-гербицид выбирают из группы, состоящей из: ацифторфена, фомесафена, лактофена, фторгликофен-этила, оксифторфена, флумиоксазина, азафенидина, карфентразон-этила, сульфентразона, флутиацет-метила, оксадиаргила, оксадиазона, пирафлуфен-этила, сафлуфенацила и S-3100.

27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что по меньшей мере один другой гербицид выбирают из группы, состоящей из: ингибитора АСС, ингибитора ALS, ингибитора EPSPS, синтетического ауксина, ингибитора фотосинтеза, ингибитора синтеза глутамина, ингибитора HPPD, ингибитора РРО и ингибитора длинноцепочечной жирной кислоты.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что ингибитор АСС представляет собой арилоксифенокси-пропионат или циклогександион; ингибитор ALS представляет собой сульфонилмочевину, имидазолинон, триазолопиримидин или триазолинон; ингибитор EPSPS представляет собой глифосат; синтетический ауксин представляет собой фенокси

гербицид, бензойную кислоту, карбоновую кислоту, или семикарбазон; ингибитор фотосинтеза представляет собой триазин, триазинон, нитрил, бензотиадиазол, или мочевино; ингибитор синтеза глутамина представляет собой глюфосинат; ингибитор HPPD представляет собой изоксазол, пиразолон, или трикетон; ингибитор PPO представляет собой дифениловый эфир, N-фенилфталамид, арил-триазинон, или пиримидиндион; или ингибитор длинноцепочечной жирной кислоты представляет собой хлорацетамид, оксиацетамид, или пиразол.

RU 2020123081 A

RU 2020123081 A