

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490802** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.07.05**

(51) Int. Cl. *A01H 6/14* (2018.01)  
*C12N 9/02* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.09.26**

**(54) НЕТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА, ОБЛАДАЮЩИЕ  
ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДАМ**

(31) **21199213.6; 22183513.5**

(72) Изобретатель:  
**Мартинс Бьянка Ассис Барбоса (DE),  
Янсенс Стефан (BE)**

(32) **2021.09.27; 2022.07.07**

(33) **EP**

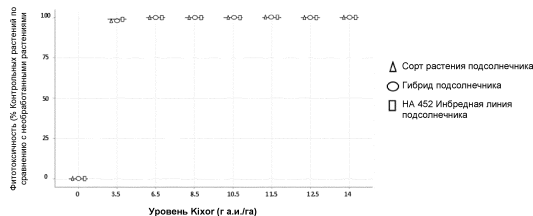
(86) **PCT/US2022/077037**

(74) Представитель:  
**Беляева Е.Н. (BY)**

(87) **WO 2023/049906 2023.03.30**

(71) Заявитель:  
**БАСФ АГРИКУЛЬЧУРАЛ  
СОЛЮШНС СИД УС ЛЛСИ (US)**

(57) Настоящее изобретение касается нетрансгенного растения подсолнечника, содержащего мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО), кодирующий мутированную протопорфириногенаоксидазу IX подсолнечника. Кроме того, настоящее изобретение касается способа борьбы с сорняками на участке выращивания растений, включающего предоставление растения согласно настоящему изобретению и нанесение на указанный участок эффективного количества гербицида, ингибирующего ППО. Кроме того, настоящее изобретение охватывает способ производства подсолнечного масла.



202490802

A1

A1

202490802

## **НЕТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА, ОБЛАДАЮЩИЕ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДАМ**

### **Перекрестные ссылки на родственные заявки**

[0001] В рамках настоящей заявки испрашивается преимущество Европейской заявки № 22183513.5, поданной 7 июля 2022 г., и Европейской заявки № 21199213.6, поданной 27 сентября 2021 г., содержание которых включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

### **Область изобретения**

[0002] Настоящее изобретение касается нетрансгенного растения подсолнечника, содержащего мутированный ген протопорфириногенаксидазы IX (ППО), кодирующий мутировавшую протопорфириноген IX оксидазу подсолнечника. Кроме того, настоящее изобретение касается способа борьбы с сорняками на участке выращивания растений, предусматривающего получение растений по настоящему изобретению и нанесение на указанный участок эффективного количества гербицида, ингибирующего ППО. Предметом настоящего изобретения также является способ получения подсолнечного масла.

### **Уровень техники**

[0003] Гербициды, ингибирующие протопорфириногенаксидазу (далее по тексту – Протокс или ППО; ЕС 1.3.3.4), ключевой фермент в рамках биосинтеза протопорфирина IX, используются для избирательного подавления сорняков с 60-х годов 20-го в. ППО выступает в качестве катализатора на последней общей стадии биосинтеза хлорофилла и гема, которая представляет собой окисление протопорфириногена IX до протопорфирина IX.

[0004] К гербицидам, ингибирующим ППО, относятся многочисленные различные структурные классы молекул (Duke et al.1991. Weed Sci.39: 465; Nandihalli et al.1992. Pesticide Biochem. Physiol.43: 193; Matringe et al.1989. FEBS Lett.245: 35; Yanase and Andoh.1989. Pesticide Biochem. Physiol.35: 70). Эти гербицидные соединения включают дифенилэфиры {например, лактофен, (+-)-2-этокси-1-метил-2-оксоэтил 5-{2-хлор-4-(трифторметил)фенокси}-2-нитробензоат; ацифлуорфен, 5-{2-хлор-4-(трифторметил)фенокси}-2-нитробензойная кислота; ее метиловый эфир; или оксифлуорфен, 2-хлор-1-(3-этокси-4-нитрофенокси)-4-

(трифторбензол)}, оксидиазолы, (например, оксидиазон, 3-{2,4-дихлор-5-(1-метилэтоксифенил)-5-(1,1-диметилэтил)-1,3,4-оксадиазол-2-(3H)-он), циклические имиды (например, S-23142, N-(4-хлор-2-фтор-5-пропаргиллоксифенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид; хлорфталим, N-(4-хлорфенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид), фенилпиразолы (например, TNPP-этил, этил 2-{1-(2,3,4-трихлорфенил)-4-нитропиразолил-5-окси}пропионат; M&V 39279), производные пиридина (например, LS 82-556), и фенопилат и его O-фенилпирролидино- и пиперидинокарбамат аналоги. Многие из указанных соединений конкурентно ингибируют нормальную реакцию, катализируемую ферментом, по видимости выступая в качестве аналогов субстрата. Применение гербицидов, ингибирующих ППО, приводит к накоплению в хлоропластах и митохондриях протопорфириногена IX, который, как полагают специалисты, попадает в цитозоль, где окисляется пероксидазой. Под воздействием света протопорфирин IX вызывает образование синглетного кислорода в цитозоле, а также образование других активных форм кислорода, что может вызвать перекисное окисление липидов и разрушение мембран, приводящее к быстрой гибели клеток (Lee et al.1993. Plant Physiol.102: 881). Не все ферменты ППО чувствительны к гербицидам, которые ингибируют ферменты ППО растений. Ферменты ППО и бактерий *Escherichia coli*, так и бактерий *Bacillus subtilis* (Sasarmen et al.1993. Can. J. Microbiol. 39: 1155; Dailey et al.1994. J. Biol. Chem.269: 813) демонстрируют резистентность к указанным ингибиторам гербицидов. Специалистами обнаружены мутанты одноклеточной водоросли *Chlamydomonas Reinhardtii*, устойчивые к фенилимиднему гербициду S-23142 (Kataoka et al.1990. J. Pesticide Sci.15: 449; Shibata et al.1992. In Research in Photosynthesis, том III, N. Murata, изд. Kluwer: Netherlands. стр. 567-70). По меньшей мере, один из указанных мутантов, по видимости, демонстрирует измененную активность ППО, и обладает устойчивостью не только к ингибитору гербицидов, по которому был селекционирован мутант, но и к другим классам ингибиторов протокса (Oshio et al.1993. Z. Naturforsch.48c: 339; Sato et al.1994. In ACS Symposium on Porphyrin Pesticides, S. Duke, изд. ACS Press: Washington, D.C.).

**[0005]** Специалистам известны случаи мутантной линии клеток табака, которая обладает устойчивостью к ингибитору S-21432 (Che et al. 1993. Z. Naturforsch.48c: 350). Ауксотрофные мутанты *E. coli* использовали для подтверждения резистентности к гербицидам клонированных гербицидов растений,

ингибирующих ППО. Существуют три основные стратегии для придания растениям устойчивости к гербицидам, а именно (1) детоксикация гербицида с помощью фермента, который превращает гербицид или его активный метаболит в нетоксичные продукты, такие как, например, ферменты, придающие устойчивость к бромксинилу или глюфосинировать (Basta<sup>®</sup>); (2) мутация целевого фермента в функциональный фермент, который менее чувствителен к гербициду или к его активному метаболиту, такой как, например, ферменты устойчивости к глифосату (Padgett S. R. et al., J.Biol. Chem., 266, 33, 1991); или (3) сверхэкспрессия чувствительного фермента для получения количества целевого фермента в растении, достаточного для гербицида, с учетом кинетических констант данного фермента, чтобы получить достаточное количество функционального фермента, несмотря на наличие его ингибитора. В литературе описана третья стратегия успешного получения растений, устойчивых к ингибиторам ППО (см., например, US5,767,373 или US5,939,602). Кроме того, в заявках US 2010/0100988 и WO 2007/024739 раскрыты нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности, обладающие ферментативной активностью, в результате чего аминокислотные последовательности обладают резистентностью к гербицидным химическим веществам, выступающим в качестве ингибиторов ППО.

**[0006]** В заявке WO 2012/080975 раскрыты растения, устойчивость которых к гербициду, ингибирующему ППО, именуемому гербицид-производное бензоксазинона (1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазинан-2,4-дион), была повышена за счет трансформации указанных растений нуклеиновыми кислотами, кодирующими мутированные ферменты ППО. В частности, заявкой WO 2012/080975 предусмотрено, что введение нуклеиновых кислот, которые кодируют мутированную ППО Амаранта II типа, в которой аргинин в положении 128 заменен лейцином, аланином или валином, а фенилаланин в положении 420 заменен метионином, цистеином, изолейцином, лейцином или треонином, обеспечивает повышенную устойчивость/резистентность к гербицидам, которые являются производными бензоксазинона. Из числа других культур в качестве целевой культуры указывается подсолнечник.

**[0007]** Кроме того, в WO 2013/189984 раскрыто, что введение нуклеиновых кислот, которые кодируют мутированную ППО, имеющую замещение,

соответствующую лейцину в положении 397, и замещение, соответствующую фенилаланину в положении 420 в ППО амаранта типа II, обеспечивает повышенную устойчивость/резистентность к различным гербицидам, ингибирующим ППО. Из числа других культур в качестве целевой культуры указывается подсолнечник.

**[0008]** Кроме того, в WO2015/022636 раскрыты замены для R<sup>128</sup> и F420, соответствующие ППО амаранта типа II. Из числа других культур в качестве целевой культуры указывается подсолнечник.

**[0009]** WO 2016/203377 A1 раскрывает замены R<sup>128</sup>, L397 и F420, соответствующие ППО амаранта типа II.

**[0010]** Как правило, растения содержат два ядерно-кодируемых гена (ППО типа I и ППО типа II), продуцирующих изоформы данного фермента. ППО1 разделена на части в хлоропластах, а ППО2 – соответственно в митохондриях, что означает, что ингибиторы ППО имеют два сайта-мишени для гербицидов в растениях (т.е. пластиды и митохондрии; Jacobs, J. M. & Jacobs, N. J. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 229, 312–319). Следовательно, для возникновения резистентности целевого сайта необходимо выполнить селекцию генов, измененных за счет ППО1 и ППО2. Тем не менее, растения *A. tuberculatus* преодолели данное препятствие за счет мутации в одном гене (ППО типа II), который, по прогнозам специалистов, кодирует как пластидные, так и митохондриальные изоформы ППО (Patzoldt WL, Hager AG, McCormick JS and Tranel PJ, A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. Proc Natl Acad Sci USA 103:12329–12334 (2006).

**[0011]** Предполагается, что двойное нацеливание ППО типа II в *A. tuberculatus* обусловлена использованием двух стартовых кодонов в рамке считывания, которые создают два белка разной длины, аналогично механизму, обнаруженному в шпинате (*Spinacia oleracea*) (WatanabeN, Che F-S, IwanoM, TakayamaS и Yoshida S). Двойное нацеливание протопорфириногенаоксидазы II шпината на митохондрии и хлоропласты путем альтернативного использования двух иницирующих кодонов в рамке считывания. J Biol Chem 276:20474–20481 (2001). Расширение примерно на 30 аминокислот, возникающее в результате инициации трансляции на первом стартовом кодоне, кодирует последовательность, нацеленную на хлоропласт, в результате чего на хлоропласт направляется более крупный белок, чем белок, нацеленный на митохондрии. У *Amaranthus tuberculatus* был аналогичный вышестоящий стартовый кодон, а следующая за ним

последовательность была идентифицирована как пептид, нацеленный на хлоропласт (Patzoldt WL, Hager AG, McCormick JS and Tranel PJ, A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. Proc Natl Acad Sci USA 103:12329–12334 (2006).

**[0012]** Следовательно, предыдущие трансгенные подходы к созданию растений, обладающих резистентностью по ППО, на основе гена ППО типа II амаранта, который, по прогнозам специалистов, кодирует как пластидные, так и митохондриальные изоформы путем двойного нацеливания (см. выше), должны были привести к экспрессии устойчивых ферментов ППО в обоих компартментах.

**[0013]** Li et al. (Plant Physiol 133:736–747 (2003)) занимались разработкой мутированной ППО в качестве маркера селекции кукурузы и пришли к выводу, что данная мутация часто дает различный эффект при вставке в другой растительный фермент. Выраженная корреляция устойчивых мутаций с нарушенной активностью ферментов делает многие комбинации мутаций/генов плохими кандидатами для придания резистентности сельскохозяйственным культурам.

**[0014]** Гербициды, нацеленные на ППО, обладают очень быстрым контактным действием, вызывая ожоги, высыхание и задержку роста листьев (Li and Nicholl, Development of PPO inhibitor-resistant cultures and crops. PestManag Sci 61:277–285 (2005)). Несмотря на то, что гербициды, нацеленные на ППО, были созданы более 50 лет назад, естественная устойчивость сорняков к ингибиторам ППО зарегистрирована лишь у небольшого количества растений, например, для *Amaranthus palmeri* (Salas et al Manag Sci. 2016 May;72(5):864-9. doi: 10.1002/ps.4241. Epub 2016 Mar 4. PMID: 26817647; PMCID: PMC5069602.

**[0015]** В работе Li and Nicholl (*выше*) указано, что для мутаций резистентности к гербицидам ППО характерна тенденция к снижению ферментативной функции. Это позволяет объяснить, почему лишь немногие растения до сих пор выработали ферменты резистентности.

**[0016]** В работе Li et al. (2003, *выше*) отмечена невозможность получения резистентной в полевых условиях трансгенной кукурузы без увеличения активности промотора, управляющего мутантным геном ППО.

**[0017]** В WO 2012/080975, WO2015/022636 и WO 2016/203377 (приведено выше) получены трансгенные растения, экспрессирующие мутированные гены ППО под управлением промотора убиквитина, который является сильным конститутивным промотором.

**[0018]** Подсолнух (*Helianthus annuus*) представляет собой важную культуру, которую выращивают по всему миру в умеренном и субтропическом климате. Подсолнечник используется в основном для получения растительного масла. Семена подсолнечника также используются в качестве корма для животных (например, птиц) и производства продуктов питания.

**[0019]** Изменение генома подсолнечника предусматривает определенные недостатки. Способы редактирования генов могут быть трудно применимы при селекции подсолнечника, главным образом ввиду сложностей, возникающих при регенерации растений, и низкого количества полученных трансгенных регенерантов в рамках одного анализа. Таким образом, применение современных способов редактирования генов предполагает необходимость создания улучшенной базы для трансформации, которая может способствовать формированию резистентности подсолнечника к заразице (Genetic and Genomic Tools in Sunflower Breeding for Broomrape Resistance Genes 2020, 11, 152; doi:10.3390/genes11020152).

**[0020]** Для подсолнечника выполнено геномное секвенирование. Известно, что подсолнечник содержит два гена ППО – ППО1 и ППО2. Например, последовательность гена ППО2 подсолнечника представлена идентификатором белка NCBI XP\_021982414.1. Однако, гены ППО до сих пор не анализировались, например, в контексте резистентности ППО.

**[0021]** Растения подсолнечника являются двудольными. Специалистами описано, что гербициды ППО обычно более активны в случае с двудольными растениями, чем однодольными (Witkowski DA and Halling BP, Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorophen-methyl. Plant Physiol 90:1239–1242 (1989). Таким образом, двудольные растения очень чувствительны к гербицидам ППО. Это подтверждено исследованиями, которые легли в основу настоящего изобретения и продемонстрировали, что обычные подсолнечники высокочувствительны к гербициду сафлуфенацил (Kixor™), даже в очень низких концентрациях. Контроль всего материала подсолнечника составлял порядка 80% при самой низкой дозе сафлуфенацила (Kixor™, 0,91 г а.и./га) и 100% при 1,75 г а.и./га и более (см. Пример 1). Высокая восприимчивость подсолнечника к гербицидам ППО затрудняет идентификацию подсолнечника, который обладает достаточным уровнем устойчивости к гербицидам, ингибирующим ППО в целом.

**[0022]** В настоящее время в случае с подсолнечником гербициды ППО применяются при предпосевной обработке и предвсходовой обработке для борьбы с сорняками, то есть до появления всходов подсолнечника. Таким образом, существует острая потребность в растениях подсолнечника, которые демонстрируют устойчивости к гербицидам ППО, применяемым в послевсходовый период. Такие растения позволяют выполнять обработку гербицидами ППО на более позднем этапе вегетации.

**[0023]** Насколько нам известно, в рамках предыдущего уровня техники не описаны нетрансгенные растения подсолнечника, которые являются резистентными/устойчивыми к широкому спектру ингибиторов ППО. Таким образом, в рамках данного уровня техники необходимы нетрансгенные растения подсолнечника, обладающие повышенной устойчивостью к гербицидам, ингибирующим ППО. Также существует необходимость в способах контроля роста сорняков вблизи указанных культур или сельскохозяйственных растений, особенно в послевсходовый период. Указанные способы позволят использовать распыление при нанесении гербицидов ППО на участки, содержащие нетрансгенные растения подсолнечника.

**Условные обозначения к фигурам:**

**Фигура 1:** Фитотоксичность (%) через 14 дней после обработки при увеличении уровня сафлуфенацила (Kixor™) – испытание в полевых условиях 1.

**Фигура 2:** Фитотоксичность (%) через 14 дней после обработки при повышении уровня сафлуфенацила (Kixor™) – испытание в полевых условиях 2.

**Фигура 3:** Эффективность устойчивости (%) трех мутантных записей PPO2\_F383I через 2, 5, 12, 19 и 26 дней после обработки сафлуфенацилом в полевых условиях. Восстановление растений наблюдается уже через 19 дней после обработки (ДПО). Утрера, Испания, 2021 год.

**Фигура 4:** Фенотипический ответ необработанных и обработанных растений дикого типа, восприимчивых эталонных и мутантных записей, мутантная линия PPO2\_F383I 1, мутантная линия PPO2\_F383I 2 и мутантная линия 3 PPO2\_F383I через 19 дней



после обработки сафлуфенацилом. Очевидное восстановление растений наблюдается через 19 дней.

- Фигура 5:** Аминокислотная последовательность мутированного ППО2 подсолнечника (SEQ ID NO: 2). Мутация (замещение F383I) в положении 383 заштрихована черным.
- Фигура 6:** Белок, кодирующий нуклеотидную последовательность (CDS) мутированного ППО2 подсолнечника (SEQ ID NO: 1). Кодон, кодирующий аминокислотный остаток 383 в белке ППО2, заштрихован черным и обозначен прописными буквами. Мутированный ППО2 подсолнечника демонстрирует переход Т в А (ТТТ в АТТ) в первом основании данного кодона по сравнению с диким типом, что приводит к замене F383I в мутированном белке ППО2.
- Фигура 7:** Первые N-концевые 50 аминокислот (SEQ ID NO: 6) *Amaranthus tuberculatus* ППО2 по сравнению с первыми N-концевыми 20 аминокислотами (SEQ ID NO: NO: 7) *Helianthus annuus* ППО2.
- Фигура 8:** Внешний вид обработанных растений PPO2\_F420I и WT при обработке гербицидами через 10 ДПО: А) сафлуфенацилом, В) флумиоксазином, С) сафлуфенацилом и трифлудимоксазином, D) метил-2-[2-[2-бром-4-фтор-5-[3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)пиримидин-1-ил]фенокси]фенокси]-2-метоксиацетатом.
- Фигура 9:** Доля растений одиннадцати категорий фитотоксичности (0–100%) при обработке гербицидами для мутантов PPO2\_F420I («МУТАНТ») и линии дикого типа («ДТ»). Фитотоксичность обработанных растений для каждой обработки гербицидом представлена отдельно в каждой строке таблицы. Растения обрабатывали сафлуфенацилом (800), флумиоксазином (9155), С) сафлуфенацилом и трифлудимоксазином (851), а также метил-2-[2-[2-бром-4-фтор-5-[3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-пиримидин-1-ил]фенокси]фенокси]-2-метоксиацетатом (201).

**Краткое изложение сущности изобретения**

**[0024]** Настоящее изобретение касается нетрансгенного растения подсолнечника, содержащего мутированный ген протопорфириногеназы IX (ППО), кодирующий мутированную протопорфириноген IX оксидазу подсолнечника, причем мутированная протопорфириноген IX оксидаза подсолнечника содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в положении, соответствующем остатку 383 (замещение F383I).

**[0025]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, нетрансгенное растение не было получено исключительно с помощью преимущественно биологического процесса. Таким образом, растение должно быть получено иным способом, отличным от лишь преимущественно биологического процесса.

**[0026]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутированная протопорфириноген IX оксидаза включает в себя аминокислотную последовательность, как видно в SEQ ID NO: 2, или представляет собой ее вариант, по меньшей мере, на 98%, например, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 99,5% идентичный SEQ ID NO: 2, с оговоркой, что вариант содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в положении, соответствующем остатку 383.

**[0027]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутированный ген протопорфириногеназы IX оксидазы (PPO) включает в себя

- a) последовательность нуклеиновой кислоты, как видно в SEQ ID NO: 1, или
- b) последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 98%, например, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 99,5% идентична SEQ ID NO: 1.

**[0028]** В одном варианте осуществления, мутированный ген протопорфириногеназы IX оксидазы (ППО) представляет собой мутированный ген протопорфириногеназы IX оксидазы (ППО) растения подсолнечника, полученного в результате выращивания семян мутантной линии 21LHNA000892, при этом образец таких семян депонирован под идентификационным номером NCIMB 43974.

**[0029]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение устойчиво к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО.

**[0030]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутированный ген ППО присутствует в растении в гомозиготной форме.

**[0031]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ген ППО мутировал в результате мутагенеза ЭМС (этилметансульфоната).

**[0032]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ген ППО мутировал в результате радиационно-индуцированного мутагенеза.

**[0033]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ген ППО мутировал в результате редактирования генома.

**[0034]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, нетрансгенное растение подсолнечника содержит на своих листьях эффективное количество одного или более гербицидов, ингибирующих ППО.

**[0035]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ген ППО функционально связан с нативным промотором гена протопорфириноген IX оксидазы (ППО).

**[0036]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ген ППО функционально связан с нативным промотором гена протопорфириноген IX оксидазы (ППО) типа II.

**[0037]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ген ППО содержит триплет нуклеотидов АТТ, кодирующий изолейцин, в положении, соответствующем аминокислотному остатку 383.

**[0038]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, один или более гербицидов, ингибирующих ППО, выбраны из группы гербицидов, ингибирующих ППО, представленных в таблице А (а также их комбинаций).

**[0039]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, одним или более гербицидами, ингибирующими ППО, являются карфентразон-этил, флумиоксазин, сафлуфенацил и/или трифлудимоксазин и их комбинации.

**[0040]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения гербицид ППО означает сафлуфенацил.

**[0041]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения нетрансгенное растение подсолнечника включает в себя фенотип устойчивости к сафлуфенацилу, который превышает 80% устойчивости к 5 г а.и./га сафлуфенацила при применении на стадии 2 - 4 листьев.

**[0042]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение обладает фенотипом устойчивости к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО (например, к сафлуфенацилу), причем устойчивость выше, чем у соответствующего растения подсолнечника дикого типа.

**[0043]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, нетрансгенное растение подсолнечника получено в результате выращивания семян мутантной линии 21ЛННА000892, при этом образец указанных семян депонирован под идентификационным номером NCIMB 43974. Кроме того, нетрансгенное растение подсолнечника может быть потомством указанного нетрансгенного растения подсолнечника, причем указанное потомство содержит мутированный ген протопорфириноген IX оксидазы (ППО).

**[0044]** Предпочтительно, нетрансгенное растение подсолнечника или его потомство содержит мутированный ген протопорфириноген IX оксидазы (ППО), содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, как видно в SEQ ID NO: 1.

**[0045]** Настоящее изобретение также относится к семенам нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению, причем семена содержат мутированный ген протопорфириноген IX оксидазы (ППО). В одном варианте осуществления семена имеют на своей поверхности эффективное количество одного или более ППО-ингибирующих гербицидов.

**[0046]** В одном варианте осуществления, семя представляет собой семя линии подсолнечника «21ЛННА000892», при этом образец указанного семени депонирован под идентификационным номером NCIMB 43974.

**[0047]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа борьбы с сорняками на участке выращивания растений, включающего в себя следующие этапы:

- a) получение нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению на указанном участке выращивания растений, и
- b) нанесение эффективного количества одного или более гербицидов, ингибирующих ППО, на указанном участке.

**[0048]** Настоящее изобретение также относится к способу обработки растения, включающему в себя следующие этапы:

- a) получение нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению, и
- b) нанесение эффективного количества одного или более гербицидов, ингибирующих ППО, на указанное растение.

**[0049]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа производства подсолнечного масла, предусматривающего

- a) выращивание нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению на участке выращивания растений,

- b) сбор семян с растения, и
- c) получение подсолнечного масла из семян, собранных на этапе b.

**[0050]** В одном варианте осуществления способов по настоящему изобретению, способы включают в себя нанесение эффективного количества одного или более гербицидов, ингибирующих ППО, на участок выращивания или указанное растение.

**[0051]** В одном варианте осуществления способов по настоящему изобретению, эффективное количество одного или более гербицидов, ингибирующих ППО, представляет собой количество, которое способно подавлять сорняки, например, сорняки рода *Helianthus*, *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, и *Taraxacum*. К однодольным сорнякам, помимо прочего, относятся сорняки рода: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus*, и/или *Apera*.

**[0052]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа получения подсолнечного масла, который включает в себя:

- a) получение семян по настоящему изобретению, и
- b) получение подсолнечного масла из семян.

**[0053]** Кроме того, настоящим изобретением предусмотрен способ идентификации растения подсолнечника, обладающего повышенной устойчивостью к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО, который включает в себя:

- a) получение семян по настоящему изобретению или клеток нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению,
- b) мутагенез или трансгенез указанного семени или клетки,
- c) выращивание растения из указанного семени или регенерация растения из указанной клетки, и
- d) обеспечение взаимодействия растения или его потомства с одним или более гербицидами, ингибирующими ППО, и

е) идентификацию растения, обладающего повышенной устойчивостью к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО.

**[0054]** В одном варианте осуществления указанного выше способа этап мутагенеза представляет собой этап неспецифического мутагенеза, который может реализован за счет культуры ткани, химического или физического мутагенеза. В одном варианте осуществления мутагенез обеспечивается за счет химического или физического мутагенеза, например, семян. Этапы химического и физического мутагенеза могут предусматривать использование химических и физических мутагенов, таких как ЭМС и, соответственно, ионизирующее излучение.

**[0055]** В одном варианте осуществления описанного выше способа в основу этапа мутагенеза легло редактирование генома.

**[0056]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа идентификации и/или селекции растения или семян подсолнечника, обладающих устойчивостью к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО, включая

а) получение биологического образца из нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению или семени по настоящему изобретению,

б) идентификацию или выявление в указанном образце присутствия мутированного гена протопорфириноген IX оксидазы (ППО) и/или мутированной протопорфириноген IX оксидазы подсолнечника, как указано выше применительно к растению по настоящему изобретению, и

с) селекцию или идентификацию растения или семени, содержащего указанный ген и/или протопорфириноген IX оксидазу.

**[0057]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа определения всхожести семян, предусматривающего

а) проращивание множества семян по настоящему изобретению в присутствии эффективного количества одного или более гербицидов ППО, и

б) определение количества проросших семян и количества непроросших семян, за счет чего определяется скорость прорастания семян.

#### **Подробное описание изобретения**

**[0058]** Авторы изобретения выполнили скрининг растений подсолнечника, выращенных приблизительно из более чем 500 000 мутагенизированных ЭМС семян, на устойчивость к гербициду ППО (пример 2). Из 500000 растений, которые были подвергнуты скринингу, лишь одно растение продемонстрировало

приемлемую толерантность к гербициду ППО сафлуфенацилу (торговое наименование: Kixor<sup>®</sup>). В частности, было установлено, что замена остатка фенилаланина в положении 383 протопорфириноген IX оксидазы 2 подсолнечника (ППО2) на изолейциновый остаток (F383I) придает растению подсолнечника повышенную устойчивость к сафлуфенацилу (примеры 2 и 3). Кроме того, было продемонстрировано, что мутация придает устойчивость и к другим гербицидам ППО (см., например, примеры 7 и 8).

**[0059]** Семена нетрансгенного растения подсолнечника, содержащие мутированную протопорфириноген IX оксидазу, как указано по тексту настоящей заявки (*Helianthus annuus L.*, инбредная линия HA452, обозначение 21LNHA000892), были депонированы 22 апреля 2022 г. в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (NCIMB), Абердин, Великобритания, в соответствии с положениями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Депонированным семенам присвоен инвентарный номер NCIMB 43974. Депонирование семян было выполнено исключительно для удобства специалиста в данной области и не представляет собой и не обозначает признания, допущения, заявления или утверждения того, что депонированные семена необходимы для полного описания изобретения, полной осуществления изобретения, осуществления изобретения или его части или аспекта. Кроме того, депонирование семян не представляет собой и не предполагает рекомендаций по ограничению применения способа по настоящему изобретению применением указанных семян или любого материала, содержащегося в таких семенах, например нуклеиновых кислот, белков или фрагментов указанной нуклеиновой кислоты или белка.

**[0060]** Последовательность белков мутированного белка подсолнечника также представлена на Фигуре 5. Выделена замена в положении 383. Замена является следствием перехода Т на А в кодоне остатка 383 PPO2 дикого типа (замещение ТТТ(F) на АТТ(I), см. также фигуру 6). По результатам исследований *in vitro* с очищенной мутированной протопорфириноген IX оксидазой 2 было установлено, что фермент также обеспечивает устойчивость к гербицидам ППО, за исключением сафлуфенацила.

**[0061]** Таким образом, настоящее изобретение предоставляет первое нетрансгенное растение подсолнечника, которое демонстрирует устойчивость к

множеству ингибиторов ППО. Результаты исследований настоящего изобретения являются неожиданными, поскольку мутированная протопорфириногенаоксидаза IX подсолнечника 2 экспрессируется под контролем нативного промотора ППО2, который является слабым промотором. Напротив, известный уровень техники предполагает использование сильных конститутивных промоторов, таких как промотор убиквитина. Анализ компьютерное моделирование показало, что гены ППО подсолнечника экспрессируются гораздо слабее, чем гены убиквитина подсолнечника (см. Пример 9).

**[0062]** Кроме того, в источниках известного уровня техники описаны мутации ППО в контексте белков двойной нацеленности, таких как ППО типа II из амаранта, которые обеспечивают устойчивые белки для пластид и митохондрий, тогда как показано, что ППО типа II из подсолнечника не имеет N-концевого удлинения, которое, как показано, опосредует двойное нацеливание, например, в амаранте и шпинате. Кроме того, результаты являются неожиданными, поскольку растения подсолнечника, как правило, очень чувствительны к ингибитору ППО сафлуфенацилу. Таким образом, невозможно было предсказать, что с помощью мутагенеза ЭМС можно будет получить устойчивое к гербицидам ППО растение подсолнечника. Кроме того, устойчивость всего растения невозможно было предсказать из-за множества факторов, действующих на уровне всего растения. Кроме того, растения подвержены биотическим (вредители, сорняки и т.д.) и абиотическим (погода, почва и т.д.) стрессам. Эти факторы затрудняют экстраполяцию с биомолекулы на фенотипический уровень, особенно когда речь идет об устойчивости к гербицидам.

**[0063]** Трансгенные растения могут подходить не для всех целей. Изобретатели использовали особый способ для получения устойчивого к гербицидам ППО растения.

**[0064]** Соответственно, настоящее изобретение касается нетрансгенного растения подсолнечника, содержащего мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО), кодирующий мутированную протопорфириногенаоксидазу IX подсолнечника, причем мутированная протопорфириногенаоксидаза IX подсолнечника содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 (замещение F383I) полипептида ППО2 дикого типа. Таким образом, мутантный полипептид ППО2 должен содержать остаток изолейцина в позиции, соответствующей остатку 383 (замещение F383I)



полипептида ППО2 дикого типа. Предпочтительно, полипептид ППО2 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4.

**[0065]** Неопределенные артикли при использовании в настоящем документе относятся к одному или более (т.е., по меньшей мере, одному) грамматическим объектам артикля. Например, слово «элемент» при использовании с неопределенным артиклем означает один или более элементов.

**[0066]** Используемое по тексту настоящей заявки слово «содержащий» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», подразумевает включение указанного элемента, целого числа или этапа, группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение любого другого элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов.

**[0067]** Протопорфириногенаоксидаза IX (также в настоящем документе называемая «ППО» или «протопорфириногенаоксидаза IX») катализирует седьмой этап биосинтеза протопорфирина IX. В растениях протопорфирин IX является предшественником хлорофилла. В частности, протопорфириногенаоксидаза IX (ЕС 1.3.3.4) катализирует дегидрирование протопорфириногена IX с образованием протопорфирина IX. Предпочтительно, полипептид ППО представляет собой полипептид ППО2. Для целей настоящего изобретения отмечается, что ППО типа II используется взаимозаменяемо с термином ППО2.

**[0068]** Термин «мутированный ген ППО» относится к молекуле нуклеиновой кислоты ППО, имеющей последовательность, которая мутирована из гена ППО дикого типа, т.е. гена ППО2 дикого типа. Последовательность нуклеиновой кислоты последовательности, кодирующей ППО2 дикого типа подсолнечника, показана в SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность полипептида ППО2 дикого типа показана в SEQ ID NO: 4. По сравнению с полипептидом дикого типа мутированный полипептид подсолнечника должен содержать, по меньшей мере, одну мутацию. Предпочтительно, мутированная протопорфириногенаоксидаза IX подсолнечника содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 SEQ ID NO. Таким образом, мутированная ППО-оксидаза должна содержать такую замещение в остатке 383 относительно SEQ ID NO: 4 (при выравнивании с использованием блада).

**[0069]** Позиция 383 в полипептиде ППО2 подсолнечника соответствует позиции 420 в ППО типа II *Amaranthus Tuberculatus*.

**[0070]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения мутированная протопорфириногенаксидаза IX содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2. Тем не менее, настоящее изобретение не ограничивается SEQ ID NO: 2. Скорее, настоящее изобретение относится также к вариантам мутированной протопорфириногенаксидазы IX, включающим аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, при условии, что вариант содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 SEQ ID NO: 2 или 4.

**[0071]** Выражение «мутированная аминокислота» будет использоваться далее по тексту документа для обозначения аминокислоты, которая заменена другой аминокислотой, обозначая тем самым сайт мутации в первичной последовательности белка.

**[0072]** Термин «вариант» по отношению к последовательности (например, последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты по изобретению) означает, по существу, сходные последовательности. Вариантный полипептид должен обладать активностью протопорфириногенаксидазы IX.

**[0073]** Варианты фермента можно определить по идентичности их последовательностей по сравнению с исходным ферментом. Идентичность последовательности обычно указывается как «% идентичности последовательности» или «% идентичности». Для определения процентной идентичности между двумя аминокислотными последовательностями на первом этапе между этими двумя последовательностями производится попарное выравнивание последовательностей, при этом две последовательности выравниваются по всей своей длине (т.е. попарное глобальное выравнивание). Выравнивание создается с помощью программы, реализующей алгоритм Нидлмана и Вунша (J. Mol. Biol. (1979) 48, стр. 443-453), предпочтительно с использованием программы «NEEDLE» (The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)) с параметрами программы по умолчанию (штраф за открытие гэпа =10,0, штраф за продолжение гэпа =0,5 и матрица=EBLOSUM62). Предпочтительным для целей настоящего изобретения является такое выравнивание, при котором можно определить наибольшую идентичность последовательности.

**[0074]** Следующий пример предназначен для иллюстрации двух нуклеотидных последовательностей, но те же расчеты применимы и к белковым

последовательностям:

Последовательность А: длина ААGАТАСТG: 9 оснований

Последовательность В: длина GATCTGA: 7 оснований

Следовательно, более короткой является последовательность В.

**[0075]** Создание попарного глобального выравнивания, которое показывает обе последовательности по их полной длине, приводит к следующему

Seq A:    А А G А Т А С Т G –

          | | |    | | |

Seq B:    – – G А Т – С Т G А

**[0076]** Символ «|» в выравнивании указывает на идентичные остатки (что означает основания для ДНК или аминокислоты для белков). Число одинаковых остатков равно 6.

**[0077]** Символ «-» в выравнивании указывает на пробелы. Количество пробелов, возникших в результате выравнивания внутри последовательности В, равно 1. Число пробелов, возникших в результате выравнивания на границах последовательности В, равно 2, а на границах последовательности А равно 1.

**[0078]** Длина выравнивания, показывающая выровненные последовательности по всей их длине, равна 10.

**[0079]** Следовательно, при создании попарного выравнивания, демонстрирующего более короткую последовательность по всей ее длине, согласно изобретению, получаем следующее:

Seq A:    G А Т А С Т G –

          | | |    | | |

Seq B:    G А Т – С Т G А

**[0080]** Соответственно, при создании попарного выравнивания с последовательностью В по всей длине, согласно изобретению, получаем следующее:

Seq A:    А А G А Т А С Т G

          | | |    | | |

Seq B:    – – G А Т – С Т G

**[0081]** Соответственно, при создании попарного выравнивания с последовательностью В по всей длине, согласно изобретению, получаем следующее:

Seq A: G A T A C T G –

   | | | | |

Seq B: G A T – C T G A

**[0082]** Длина выравнивания, демонстрирующая более короткую последовательность по ее полной длине, равна 8 (присутствует один пробел, который учитывается в длине выравнивания более короткой последовательности).

**[0083]** Соответственно, длина выравнивания, демонстрирующая Последовательность А по всей ее длине, будет равна 9 (это означает, что Последовательность А представляет собой последовательность по изобретению).

**[0084]** Соответственно, длина выравнивания, демонстрирующая Последовательность В по всей ее длине, будет равна 8 (это означает, что Последовательность В представляет собой последовательность по изобретению).

**[0085]** После выравнивания двух последовательностей на втором этапе на основе полученного выравнивания определяют значение идентичности. Для целей данного описания процент идентичности рассчитывают по формуле %-идентичность = (идентичные остатки / длина области выравнивания, которая демонстрирует две выровненные последовательности по их полной длине) \*100. Таким образом, идентичность последовательностей при сравнении двух аминокислотных последовательностей согласно этому варианту осуществления рассчитывается путем деления количества идентичных остатков на длину области выравнивания, которая демонстрирует две выровненные последовательности по их полной длине. Это значение умножается на 100, чтобы получить «%-идентичность». Согласно приведенному выше примеру, %-идентичность равна:  $(6 / 10) * 100 = 60 \%$ .

**[0086]** Как правило, варианты аминокислотной последовательности по изобретению будут иметь, по меньшей мере, 70%, например, предпочтительно, по меньшей мере, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, до 79%, как правило, по меньшей мере, 80%, например, 81%-84%, по меньшей мере, 85%, например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или, по меньшей мере, 99,5% «идентичности последовательности» полипептида с полипептидом SEQ ID NO: 2, при условии, что кодируемый полипептид содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 SEQ ID NO: 2. Таким образом, вариантный

полипептид должен содержать остаток изолейцина в позиции, соответствующей позиции 383 SEQ ID NO: 2 (или SEQ ID NO: 4).

**[0087]** Как правило, варианты аминокислотной последовательности по изобретению будут иметь, по меньшей мере, 30, 40, 50, 60, до 70%, например, предпочтительно 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, до 79%, как правило, по меньшей мере, 80%, например, 81%-84%, по меньшей мере, 85%, например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или, по меньшей мере, 99,5% «идентичности последовательности» полипептида с полипептидом SEQ ID NO: 2, при условии, что кодируемый полипептид содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 SEQ ID NO: 2 или 4.

**[0088]** Как правило, варианты аминокислотной последовательности по изобретению будут иметь, по меньшей мере, 30, 40, 50, 60, до 70%, например, предпочтительно 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, до 79%, как правило, по меньшей мере, 80%, например, 81%-84%, по меньшей мере, 85%, например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или, по меньшей мере, 99,5% «идентичности последовательности» полипептида с полипептидом SEQ ID NO: 1, при условии, что кодируемый полипептид содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 SEQ ID NO: 2 или 4.

**[0089]** В предпочтительном варианте осуществления мутированная протопорфириногенаоксидаза IX содержит: аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, или представляет собой ее вариант, который, по меньшей мере, на 98%, например, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 99,5% идентичен SEQ ID NO: 2, с оговоркой о том, что вариант содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383.

**[0090]** Кроме того, предполагается, что мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО) содержит

- a) последовательность нуклеиновой кислоты, как показано в SEQ ID NO: 1, или
- b) последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 98%, например, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 99,5% идентична SEQ ID NO: 1.

**[0091]** Более того, предполагается, что мутантный полипептид ППО содержит не более трех, например, не более двух, например, не более 1 мутации, в дополнение к замене F383I.

**[0092]** SEQ ID NO: 1 и 3 представляют собой кодирующие последовательности, т.е. последовательности, которые транслируются. Ген ППО2 подсолнечника содержит множество интронов. Следует понимать, что последовательности этих интронов не включают SEQ ID NO: 1 и 3, соответственно. Таким образом, выражение о том, что «мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО) содержит последовательность нуклеиновой кислоты», должно означать, что растение экспрессирует транскрипт, содержащий указанную последовательность.

**[0093]** Стекинг генов, также называемый пирамидированием генов, представляет собой процесс объединения двух или более интересующих генов в одно растение. Комбинированные черты, возникающие в результате этого процесса, называются чертами с пакетированием генов. Когда стек сконструирован или выведен в культуру, эта культура имеет более высокие общие характеристики, поскольку теоретически можно объединить множество генов, контролирующих различные проблемы. Более того, стекинг генов позволяет повысить их характеристики, поскольку, если резистентность или устойчивость, обеспечиваемая одним геном, разрушается, то по-прежнему имеется оставшийся ген, который обеспечивает некоторые преимущества. Стекинг может быть достигаться за счет трансгенных подходов, а также с использованием традиционных методов селекции.

**[0094]** Что касается борьбы с сорняками, гены, обеспечивающие устойчивость к промышленным гербицидам, можно пакетировать, чтобы расширить режим гербицидного действия. Например, ген резистентности к глифосату пакетирован с генами, придающими резистентность к промышленным гербицидам.

**[0095]** Растения подсолнечника, имеющие ген мутированного полипептида ППО, также в некоторых случаях могут быть скрещены для «пакетирования» признака устойчивости к ППО по настоящему изобретению с другими признаками, включая другие признаки устойчивости к гербицидам. Например, свойства Clearfield (т.е. у культур Clearfield признак устойчивости к гербицидам обеспечивается единственной точечной мутацией в гене ацетогидроксиацетилсинтазы (AHAS) (ген R) с заменой аланина на валин в позиции 205 (выравнивание Arabidopsis), в результате чего гербициды имеют пониженную эффективность связывания и ингибирования модифицированного фермента AHAS) и Clearfield Plus (т.е.

производственная система Clearfield Plus основана на одном гене с более высоким уровнем устойчивости к имидазолинонам) у подсолнечника обеспечивают более высокую устойчивость культуры независимо от стрессов окружающей среды, улучшенный уровень борьбы с сорняками, повышенное содержание масла и выход зерна. Элитные культивируемые линии подсолнечника, обладающие этими признаками, могут быть объединены с мутировавшим признаком ППО по настоящему изобретению с использованием методов селекции, известных специалистам в данной области. Более того, признак устойчивости к ингибитору ППО настоящего изобретения может сочетаться с любым другим признаком, обеспечивающим устойчивость к гербицидам, или с любым другим признаком, обеспечивающим агрономические улучшения.

**[0096]** При появлении любой ссылки на «растение» или «растения» согласно изобретению также предполагается, что, если не указано иное, то части растения (клетки, ткани или органы, семенные коробочки, семена, отрезанные части, такие как корни, листья, цветы, пыльца и т.д.), потомство растений, которые сохраняют отличительные характеристики родителей, такие как семена, полученные путем самоопыления или скрещивания, гибридные растения и полученные от них части растений, также включены в настоящий документ. Термин «растение» также охватывает растительные клетки, суспензионные культуры, каллусную ткань, эмбрионы, меристематические области, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры, причем каждый из вышеупомянутых элементов содержит мутированный ген ППО по настоящему изобретению.

**[0097]** Термин «подсолнечник» при использовании по тексту настоящего документа относится к любому растению, принадлежащему к роду *Helianthus*. В одном варианте осуществления этот термин относится к растению вида *Helianthus annuus*. L.

**[0098]** В одном варианте осуществления подсолнечник представляет собой окультуренный подсолнечник (*Helianthus annuus* ssp. *macrocarpus*), включая его масличные и кондитерские сорта.

**[0099]** Как указано в настоящем документе, растение подсолнечника может представлять собой растение подсолнечника, которое является резистентным, по меньшей мере, к одному гербициду, ингибирующему АНАС (ацетогидроксиацидсинтазу), например, к гербициду, ингибирующему АНАС, выбранному из группы, состоящей из имидазолиновых гербицидов, гербицидов

сульфонилмочевины, триазолпиримидиновых гербицидов, пиримидинилоксибензоатных гербицидов и сульфониламинокарбонилтриазолиноновых гербицидов. Таким образом, мутант подсолнечника может также содержать мутантный ген ацетогидроксиацетатсинтазы, который придает резистентность к указанному гербициду. Такие мутированные гены описаны, например, в WO 2008/124431 A1 (включена в настоящий документ посредством ссылки).

**[0100]** В некоторых вариантах осуществления мутированный ген ППО присутствует в растении (или его части) в гомозиготной форме.

**[0101]** В настоящем документе термин «гомозиготный» означает генетическое состояние, которое имеет место, когда два идентичных аллеля находятся в определенном локусе, но расположены индивидуально на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке. Термин «гетерозиготный», напротив, означает генетическое состояние, существующее, когда два разных аллеля находятся в определенном локусе, но расположены индивидуально на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке.

**[0102]** В настоящем документе термин «нетрансгенный» относится к растению или растительной клетке, в геном которой не включена ДНК, полученная из другого организма. Таким образом, нетрансгенное растение не может быть получено рекомбинантным способом. Например, мутированный ППО не может вводиться путем трансформации, такой как трансформация, опосредованная *Agrobacterium*. Тем не менее, нетрансгенное растение или клетку можно получить путем введения целевой мутации в ген ППО2, например, путем редактирования гена.

**[0103]** Поскольку растение по настоящему изобретению является нетрансгенным, следует понимать, что мутированный ген ППО2 должен находиться в той же позиции в геноме подсолнечника, что и ген ППО2 дикого типа. Таким образом, мутантный ген ППО2 может быть функционально связан с нативным (т.е. дикого типа) промотором гена протопорфириногенаоксидазы IX (ППО2), который известен специалистам данной области и содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 5.

**[0104]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, нативный промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, как показано в SEQ ID NO: 5, или последовательность, составляющую по меньшей мере, на 90%, 91%,



92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 99,5% идентичной SEQ ID NO: 5, или ее фрагмент, такой как фрагмент, имеющий длину, по меньшей мере, 200, 300 или 500 п.о.

**[0105]** Как правило, нетрансгенное растение не было получено исключительно посредством по существу биологического процесса.

**[0106]** Растение по настоящему изобретению должно быть устойчивым к гербицидам, ингибирующим ППО. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, признак устойчивости к гербицидам, ингибирующим ППО, является эндогенным нетрансформируемым признаком. Таким образом, мутантный ген ППО не должен был быть введен путем трансформации трансгена. В одном варианте осуществления настоящего изобретения признак устойчивости к гербицидам, ингибирующим ППО, является эндогенным нетрансфицированным признаком. Таким образом, ген ППО не должен был быть мутирован в результате редактирования гена.

**[0107]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение было получено посредством этилметансульфонатного мутагенеза. Таким образом, мутация в гене ППО2, упомянутая в настоящем документе, была введена с помощью мутагенеза ЭМС (этилметансульфоната). Этилметансульфонат (ЭМС) представляет собой мутагенное соединение, вызывающее случайные мутации в генетическом материале путем замены нуклеотидов; в частности, за счет переходов G:C в A:T, вызванных алкилированием гуанина.

**[0108]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение было получено путем радиационно-индуцированного мутагенеза. Таким образом, мутация в гене ППО2, упомянутая в настоящем документе, была введена посредством радиационно-индуцированного мутагенеза.

**[0109]** Методы редактирования генов в настоящее время не могут быть обоснованно использоваться для подсолнечника, однако там, где они доступны, такие методы могут использоваться для получения растений по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение можно таким образом получить путем редактирования генома. Таким образом, мутация гена ППО2, упомянутая в настоящем документе, может быть введена путем редактирования генома. Редактирование генома при использовании по тексту настоящего документа относится к целенаправленной модификации геномной ДНК с использованием специфичных для последовательности

ферментов (таких как эндонуклеаза, нуклеаза, ферменты преобразования оснований) и/или донорских нуклеиновых кислот (например, дцДНК, олигонуклеотидов) для внесения желаемых изменений в ДНК. Специфичные для последовательностей нуклеазы, которые можно запрограммировать на распознавание определенных последовательностей ДНК, включают мегануклеазы (МГН), цинкпальцевые нуклеазы (ЦПН), TAL-эффекторные нуклеазы (TALEN) и РНК- или ДНК-ориентированные нуклеазы, такие как Cas9, Cpf1, CasX, CasY, C2c1, C2c3, некоторые аргонутковые системы (см., например, Osakabe and Osakabe, *Plant Cell Physiol.* 2015 Mar; 56(3):389-400; Ma et al., *Mol Plant.* 2016 Jul 6;9(7):961-74; Bortesi et al., *Plant Biotech J.* 2016, 14; Murovec et al., *Plant Biotechnol J.* 2017 Apr 1; Nakade et al., *Bioengineered* 8-3, 2017; Burstein et al., *Nature* 542, 37–241; Komor et al., *Nature* 533, 420–424, 2016; все они включены в настоящий документ посредством отсылки). Донорские нуклеиновые кислоты можно использовать в качестве матрицы для восстановления разрыва ДНК, индуцированного специфичной для последовательности нуклеазой, но также можно использовать как таковые для нацеливания на гены (без индукции разрыва ДНК) для введения желаемого изменения в геномную ДНК.

**[0110]** С помощью вышеуказанных технологий содержащие ППО2 растения подсолнечника дикого типа можно превратить в растения, содержащие мутированный ген ППО2, как указано в настоящем документе, за счет чего повышается устойчивость к ингибирующим ППО гербицидам.

**[0111]** Таким образом, нетрансгенное растение подсолнечника настоящего изобретения должно быть резистентным или устойчивыми к одному или более ингибирующим ППО гербицидам.

**[0112]** По тексту настоящей заявки термин «гербицид» обозначает активный ингредиент, который подавляет, контролирует или иным образом негативно влияет на рост растений. Предпочтительным количеством или концентрацией гербицида является «эффективное количество» или «эффективная концентрация». Под «эффективным количеством» или «эффективной концентрацией» подразумевается количество или концентрация, соответственно, достаточные для уничтожения или препятствования росту подобного, дикого типа, растения, ткани растения, клетки растения или клетки-хозяина, но это количество не уничтожает или не препятствует таким же образом росту растений, тканей растения, клеток растения и клетки-хозяина, стойких к гербицидам, которые описаны в настоящем

изобретении. Как правило, эффективное количество гербицида представляет собой количество, которое обычно используется в системах сельскохозяйственного производства для уничтожения соответствующих сорняков. Такое количество известно специалистам в данной области. Гербицидную активность проявляют полезные для целей настоящего изобретения гербициды, которые наносят непосредственно на растение или участок растения на любой стадии роста, либо перед посадкой или всходом. Эффект зависит от вида растения, этапа роста, применяемые параметры раствора и размер капель при опрыскивании, размера частиц твердых компонентов, внешних условий во время использования, использованного специфического состава, вспомогательных средств и носителей, типа почвы и т.п., а также количества используемых химических веществ. Эти и другие факторы можно регулировать способом, известным специалистам, чтобы вызвать селективную или неселективную активность гербицидов. В целом, для максимального контроля сорняков в отношении относительно незрелой нежелательной растительности предпочтительно применять послевсходовый гербицид.

**[0113]** В одном варианте осуществления эффективным является количество, которое эффективно ингибирует рост растения подсолнечника дикого типа.

**[0114]** В одном варианте осуществления, гербицид представляет собой сафлуфенацил, и эффективное количество равно 1 - 50 а.и. г/га.

**[0115]** В другом варианте осуществления, гербицид представляет собой сафлуфенацил, и эффективное количество равно 2 - 25 а.и. г/га.

**[0116]** В другом варианте осуществления, гербицид представляет собой сафлуфенацил, и эффективное количество равно 5 - 15 а.и. г/га.

**[0117]** «Устойчивое к гербицидам» или «резистентное к гербицидам» растение обозначает растение, которое демонстрирует устойчивость или резистентность, по меньшей мере, к одному гербициду на уровне, который обычно приводит к гибели или ингибирует рост нормального растения или растения дикого типа. «Устойчивый к гербицидам мутантный белок ППО» или «резистентный к гербицидам мутантный белок ППО» обозначает, что указанный белок ППО демонстрирует более высокую активность ППО по сравнению с активностью немутированного белка ППО дикого типа, когда он оказывается в присутствии, по меньшей мере, одного гербицида, который, как известно, препятствует активности ППО, при концентрации или уровне гербицида, который, как известно, ингибирует

активность ППО белка ППО дикого типа. Кроме того, активность ППО такого мутированного белка ППО, устойчивого к гербицидам или гербицидам, по тексту настоящей заявки также называется «устойчивой к гербицидам» или «резистентной к гербицидам» активностью ППО. Эти термины в настоящем документе используются взаимозаменяемо.

**[0118]** В одном варианте осуществления устойчивость к ингибирующему ППО гербициду нетрансгенного растения подсолнечника настоящего изобретения выше таковой устойчивости у соответствующего растения подсолнечника дикого типа (т.е. растения, которое не содержит замены F383I).

**[0119]** Как правило, если ингибирующие ППО гербициды, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, способны образовывать геометрические изомеры, например, E/Z-изомеры, то можно использовать как чистые изомеры, так и их смеси, в пригодных для настоящего изобретения композициях. Если ингибирующие ППО гербициды А, согласно описанию в настоящем документе, имеют один или более центров хиральности и, как следствие, присутствуют в виде энантиомеров или диастереомеров, то можно использовать как чистые энантиомеры, так и диастереомеры, а также их смеси, в композициях по изобретению. Если ингибирующие ППО гербициды А, согласно описанию в настоящем документе, имеют ионизируемые функциональные группы, то их также можно применять в форме их приемлемых для сельского хозяйства солей. Подходящими, как правило, являются соли тех катионов и кислотно-аддитивные соли тех кислот, катионы и анионы которых соответственно не оказывают вредного воздействия на активность активных соединений. Предпочтительными катионами являются ионы щелочных металлов, предпочтительно лития, натрия и калия, щелочноземельных металлов, предпочтительно кальция и магния, и переходных металлов, предпочтительно марганца, меди, цинка и железа, а также аммония и замещенного аммония, в которых от одного до четырех атомов водорода заменены на C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил, гидрокси-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил, гидрокси-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил, фенил или бензил, предпочтительно аммоний, метиламмоний, изопропиламмоний, диметиламмоний, диизопропиламмоний, триметиламмоний, гептиламмоний, додециламмоний, тетрадециламмоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, тетрабутиламмоний, 2-гидроксиэтиламмоний (оламиновая соль), 2-(2-гидроксиэт-1-окси)эт-1-иламмоний (дигликольаминовая соль), ди(2-

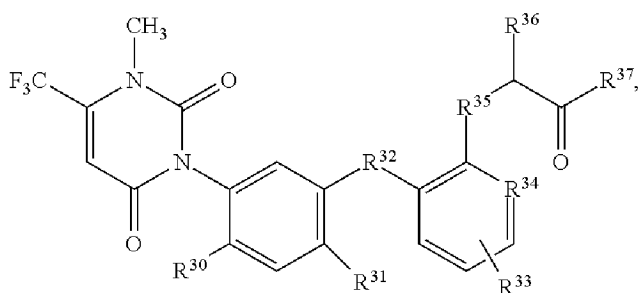
гидроксиэт-1-ил)аммоний (диоламиновая соль), трис(2-гидроксиэтил)аммоний (троламинавая соль), трис(2-гидроксипропил)аммоний, бензилтриметиламмоний, бензилтриэтиламмоний, N,N,N-тримилэтаноламмоний (холиновая соль), а также ионы фосфония, ионы сульфония, предпочтительно три((C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил)сульфония, такие как триметилсульфоний, и ионы сульфоксония, предпочтительно три((C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил) сульфоксония, и, наконец, соли многоосновных аминов, такие как N,N-бис-(3-аминопропил)метиламин и диэтилентриамин. Анионами полезных кислотно-аддитивных солей являются в первую очередь хлорид, бромид, фторид, йодид, водородсульфат, метилсульфат, сульфат, диводородфосфат, водородфосфат, нитрат, бикарбонат, карбонатная кислота, гексафторсиликат, гексафторфосфат, бензоат, а также анионы C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкановых кислот, предпочтительно формиат, ацетат, пропионат и бутират.

**[0120]** Описанные в настоящем документе гербициды, ингибирующие ППО, которые имеют карбоксильную группу, могут использоваться в форме кислоты, пригодной для сельскохозяйственного применения соли, как упомянуто выше, или также в форме пригодного для сельскохозяйственного применения производного вещества, например, в качестве амидов, таких как моно- и ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкиламида или ариламида, в качестве эфиров, например, в качестве аллиловых эфиров, пропаргиловые эфиры, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкиловые эфиры, алкоксиалкиловые эфиры, тефуриловые ((тетрагидрофуран-2-ил)метил) эфир, а также в качестве тиоэфиров, например, в качестве C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилтио эфиров. Предпочтительными моно- и ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкиламидами являются метил и диметиламида. Предпочтительными ариламидами являются, например, анилиды и 2-хлоранилиды. Предпочтительными алкиловыми эфирами являются, например, метиловый, этиловый, пропиловый, изопропиловый, бутиловый, изобутиловый, пентиловый, мексиловый (1-метилгексиловый), мептиловый (1-метилгептиловый), гептиловый, октиловый или изооктиловый (2-этиловыйгексиловый) эфиры. Предпочтительными C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкиловыми эфирами являются прямолинейные или разветвленные C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси этиловые эфиры, например, 2-метоксиэтиловый, 2-этоксиэтиловый, 2-бутоксиэтиловый (бутотиловый), 2-бутоксипропиловый или 3-бутоксипропиловый эфир. Примером прямолинейного или разветвленного C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилтио эфира является этилтио эфир.

**[0121]** Примерами гербицидов, ингибирующих ППО, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, являются ацифлуорфен,

ацифлуорфен-натрий, аклонифен, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бифенокс, бутафенацил, картентразон, карфентразон-этил, хлорметоксифен, цинидон-этил, флуазолат, флуфенпир, флуфенпир-этил, флумиклорак, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, фторгликофен, фторгликофен-этил, флутиацет, флутиацет-метил, фомесафен, галосафен, лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифлуорфен, пентоксазон, профлуазол, пираклонил, пирафлуфен, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон, тидиазимин, тиафенацил, хлорнитрофен, флумипропин, фторнитрофен, флупропацил, фурилоксифен, нитрофлуорфен, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), N-этил-3-2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9), N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9), N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7), N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7), 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион (CAS 451484-50-7), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4), 2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-изоиндол-1,3-дион (CAS 1300118-96-0), 1-M этил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1H-пиримидин-2,4-дион, метил (E)-4-[2-хлор-5-[4-хлор-5-(дифторметокси)-1H-метил-пиразол-3-ил]-4-фторфенокси]-3-метокси-бут-2-еноат [CAS 948893-00-3], и 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1H-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1H-пиримидин-2,4-дион (CAS 212754-02-4), и

**[0122]** урацилы формулы III



III

[0123] причем

- $R^{30}$  и  $R^{31}$  независимо друг от друга означают F, Cl, Br или CN; например,  $R^{30}$  и  $R^{31}$  независимо друг от друга означают F, Cl или CN
- $R^{32}$  означает O или S;
- $R^{33}$  означает H, F, Cl,  $CH_3$  или  $OCH_3$ ;
- $R^{34}$  означает CH или N;
- $R^{35}$  означает O или S;
- $R^{36}$  означает H, CN,  $CH_3$ ,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $SCH_3$ ,  $SC_2H_5$ ,  $(CO)OC_2H_5$  или  $CH_2R^{38}$ , причем  $R^{38}$  означает F, Cl,  $OCH_3$ ,  $SCH_3$ ,  $SC_2H_5$ ,  $CH_2F$ ,  $CH_2Br$  или  $CH_2OH$ ; и
- $R^{37}$  означает ( $C_1$ - $C_6$ -алкил)амино, ( $C_1$ - $C_6$ -диалкил)амино,  $(NH)OR^{39}$ , OH,  $OR^{40}$  или  $SR^{40}$ , причем  $R^{39}$  означает  $CH_3$ ,  $C_2H_5$  или фенил; и
- $R^{40}$  означает независимо друг от друга  $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_2$ - $C_6$ -алкенил,  $C_3$ - $C_6$ -алкинил,  $C_1$ - $C_6$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_6$ -алкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_1$ - $C_6$ -алкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_2$ - $C_6$ -цианоалкил,  $C_1$ - $C_4$ -алкокси-карбонил- $C_1$ - $C_4$ -алкил,  $C_1$ - $C_4$ -алкил-карбонил-амино,  $C_1$ - $C_6$ -алкилсульфинил- $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_1$ - $C_6$ -алкил-сульфонил- $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_1$ - $C_6$ -диалкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_1$ - $C_6$ -алкил-карбонил- $C_1$ - $C_6$ -алкил, фенил-карбонил- $C_1$ - $C_6$ -алкил, три( $C_1$ - $C_3$ -алкил)-сил- $C_1$ - $C_6$ -алкил, три( $C_1$ - $C_3$ -алкил)сил- $C_1$ - $C_6$ -алкенил, три( $C_1$ - $C_3$ -алкил)-сил- $C_1$ - $C_6$ -алкинил, три( $C_1$ - $C_3$ -алкил)сил- $C_1$ - $C_6$ -алкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкил, диметиламино, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил- $C_1$ - $C_3$ -алкил, фенил- $C_1$ - $C_6$ -алкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкил, фенил- $C_1$ - $C_3$ -алкил, пиридил- $C_1$ - $C_3$ -алкил, пиридил, фенил,
- при этом указанные пиридилы и фенилы независимо друг от друга замещены одним - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена,  $C_1$ - $C_3$ -алкил или  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил;
- $C_3$ - $C_6$ -циклоалкил или  $C_3$ - $C_6$ -циклоалкил- $C_1$ - $C_4$ -алкил,
- при этом указанные циклоалкилы независимо друг от друга являются незамещенными или замещены одним - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена,  $C_1$ - $C_3$ -алкила и  $C_1$ - $C_2$ -галоалкила;
- включая их приемлемые в сельском хозяйстве соли щелочных металлов или соли аммония.

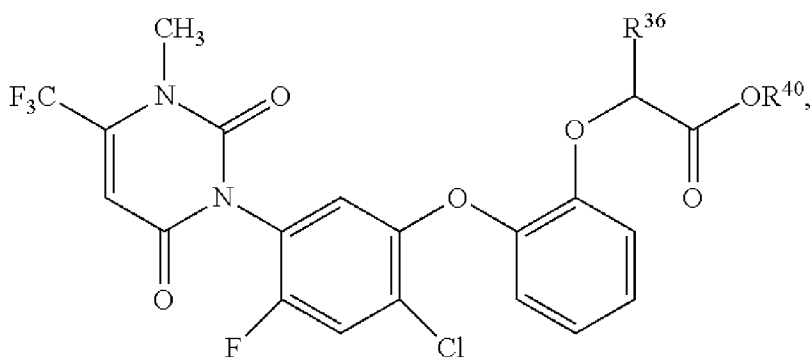
**[0124]** Также гербицидами, ингибирующими ППО, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, являются: 2-[2-хлор-5-[3-хлор-5-(трифторметил)-2-пиридинил]-4-фторфенокси]-2-метокси-метиловый эфир уксусной кислоты (CAS 1970221-16-9), 2-[2-[[3-хлор-6-[3,6-дигидро-3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-1(2H)-пиримидинил]-5-фтор-2-пиридинил]окси]фенокси]-метиловый эфир уксусной кислоты (CAS 2158274-96-3), 2-[2-[[3-хлор-6-[3,6-дигидро-3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-1(2H)-пиримидинил]-5-фтор-2-пиридинил]окси]фенокси] этиловый эфир уксусной кислоты (CAS 2158274-50-9), метил 2-[[3-[2-хлор-5-[4-(дифторметил)-3-метил-5-оксо-1,2,4-триазол-1-ил]-4-фтор-фенокси]-2-пиридинил]окси]ацетат (CAS 2271389-22-9), этил 2-[[3-[2-хлор-5-[4-(дифторметил)-3-метил-5-оксо-1,2,4-триазол-1-ил]-4-фтор-фенокси]-2-пиридинил]окси]ацетат (CAS 2230679-62-4), 2-[[3-[[3-хлор-6-[3,6-дигидро-3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-1(2H)-пиримидинил]-5-фтор-2-пиридинил]окси]-2-пиридинил]окси]-метиловый эфир уксусной кислоты (CAS 2158275-73-9), 2-[[3-[[3-хлор-6-[3,6-дигидро-3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-1(2H)-пиримидинил]-5-фтор-2-пиридинил]окси]-2-пиридинил]окси] этиловый эфир уксусной кислоты (CAS 2158274-56-5), 2-[2-[[3-хлор-6-[3,6-дигидро-3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-1(2H)-пиримидинил]-5-фтор-2-пиридинил]окси]фенокси]-N-(метилсульфонил)-ацетамид (CAS 2158274-53-2), 2-[[3-[[3-хлор-6-[3,6-дигидро-3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-1(2H)-пиримидинил]-5-фтор-2-пиридинил]окси]-2-пиридинил]окси]-N-(метилсульфонил)-ацетамид (CAS 2158276-22-1), метил 2-[2-[2-бром-4-фтор-5-[3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)пиримидин-1-ил]фенокси]фенокси]-2-метокси-ацетат (CAS 2703795-90-6), 3-[2-хлор-5-[3,6-дигидро-3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-1(2H)-пиримидинил]-4-фторфенил]-4,5-дигидро-5-метил-5-этиловый эфир изоксазолкарбоновой кислоты (CAS 1949837-17-5), метил (2R)-2-[[[E]-([2-хлор-4-фтор-5-[3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-ил]фенил]метилен)амино]окси]пропаноат (CAS 2759011-88-4).

**[0125]** Предпочтительными ингибирующими ППО гербицидами, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, являются: ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бутафенацил, карфентразон-этил, цинидон-этил, флуфенпир-этил, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, фторгликофен-этил, флутиацет-метил, фомесафен,



лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифлуорфен, пентоксазон, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9), N-тетрагидрофурурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9), N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7), N-тетрагидрофурурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452100-03-7), 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион (CAS 451484-50-7), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4, трифлудимоксазин), 2-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-изоиндол-1,3-дион (CAS 1300118-96-0); 1-M этил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1H-пиримидин-2,4-дион (CAS 1304113-05-0), 3-[7-хлор-5-фтор-2-(трифторметил)-1H-бензимидазол-4-ил]-1-метил-6-(трифторметил)-1H-пиримидин-2,4-дион урацилы формулы III.1 (соответствующие урацилам формулы III, причем R<sup>30</sup> означает F, R<sup>31</sup> означает Cl, R<sup>32</sup> означает O; R<sup>33</sup> означает H; R<sup>34</sup> означает CH; R<sup>35</sup> означает O, и R<sup>37</sup> означает OR<sup>40</sup>)

III.1



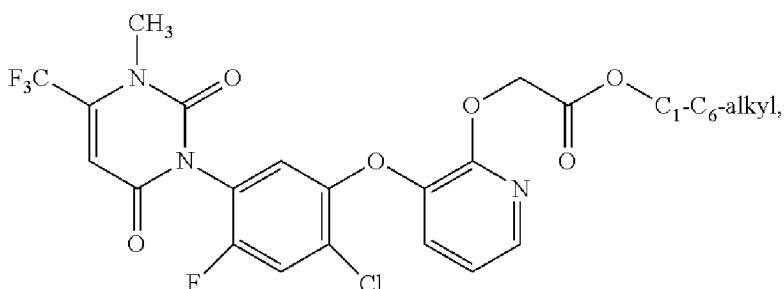
причем

- R<sup>36</sup> означает OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, SCH<sub>3</sub> или SC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; и
- R<sup>40</sup> означает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-галоалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкокси-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкокси-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкокси-

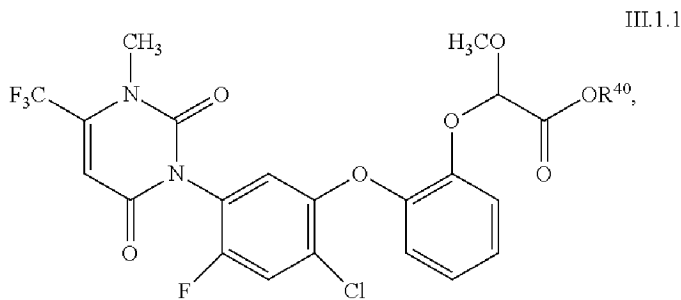
C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-цианоалкил, фенил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил, пиридил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-циклоалкил или C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-циклоалкил-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил,

- при этом указанные циклоалкилы являются незамещенными или замещены одним - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил и C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-галоалкил; и
- урацилы формулы III.2 (соответствующие урацилам формулы III, причем R<sup>30</sup> означает F; R<sup>31</sup> означает Cl; R<sup>32</sup> означает O; R<sup>33</sup> означает H; R<sup>34</sup> означает N; R<sup>35</sup> означает O и R<sup>37</sup> означает OR<sup>40</sup>, где R<sup>40</sup> означает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил)

## III.2



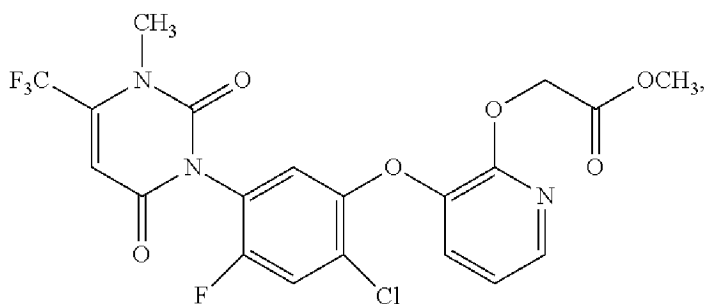
**[0126]** Особенно предпочтительными ингибирующими ППО гербицидами, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, являются: ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрий, бутафенацил, карфентразон-этил, цинидон-этил, флумиоксазин, флутиацет-метил, Фомесафен, лактофен, оксадиаргил, оксифлуорфен, сафлуфенацил, Сульфентразон, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)-фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6; S-3100), 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазиан-2,4-дион (CAS 451484-50-7), 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2H-бензо[b][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион (CAS 1258836-72-4, трифлудимоксазин), и 2-(2,2,7-Трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-изоиндол-1,3-дион (CAS 1300118-96-0), 1-Метил-6-трифторметил-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-проп-2-инил-3,4-дигидро-2H-бензо[1,4]оксазин-6-ил)-1H-пиримидин-2,4-дион (CAS 1304113-05-0), урацилы формулы III.1.1 (соответствующие урацилам формулы III, причем R<sup>30</sup> означает F, R<sup>31</sup> означает Cl, R<sup>32</sup> означает O; R<sup>33</sup> означает H; R<sup>34</sup> означает CH; R<sup>35</sup> означает O, R<sup>36</sup> означает OCH<sub>3</sub> и R<sup>37</sup> означает OR<sup>40</sup>)



причем

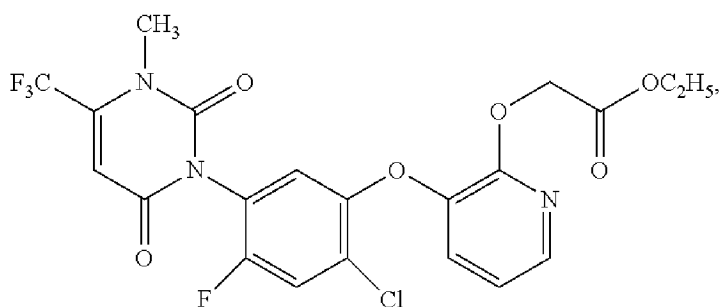
- $R^{40}$  означает  $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_2$ - $C_6$ -алкенил,  $C_3$ - $C_6$ -алкинил,  $C_1$ - $C_6$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_6$ -алкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_1$ - $C_6$ -алкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкокси- $C_1$ - $C_6$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -цианоалкил, фенил- $C_1$ - $C_3$ -алкил, пиридил- $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_3$ - $C_6$ -циклоалкил или  $C_3$ - $C_6$ -циклоалкил- $C_1$ - $C_4$ -алкил,
- при этом указанные циклоалкилы являются незамещенными или замещены одним - пятью заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил;
- предпочтительно означает  $CH_3$ ,  $CH_2CH_2OC_2H_5$ ,  $CH_2CHF_2$ , циклогексил, (1-метилциклопропил)метил или  $CH_2$ (пиридин-4-ил);
- урацилы формулы III.2.1 (соответствующие урацилам формулы III, причем  $R^{30}$  означает F;  $R^{31}$  означает Cl;  $R^{32}$  означает O;  $R^{33}$  означает H;  $R^{34}$  означает N;  $R^{35}$  означает O и  $R^{37}$  означает  $OR^{40}$ , где  $R^{40}$  означает  $CH_3$ )

III.2.1



и

- урацилы формулы III.2.2 (соответствующие урацилам формулы III, причем  $R^{30}$  означает F;  $R^{31}$  означает Cl;  $R^{32}$  означает O;  $R^{33}$  означает H;  $R^{34}$  означает N;  $R^{35}$  означает O и  $R^{37}$  означает  $OR^{40}$ , где  $R^{40}$  означает  $C_2H_5$ )



**[0127]** Особенно предпочтительными ингибирующими ППО гербицидами являются гербициды, ингибирующие ППО, которые указаны в пунктах А.1–А.14 в таблице А ниже.

**ТАБЛИЦА А**

|      |   |
|------|---|
| А.1  | Ацифлуорфен   |
| А.2  | Бутафенацил   |
| А.3  | карфентразон-этил   |
| А.4  | цинидон-этил  |
| А.5  | Флумиоксазин  |
| А.6  | флутиацет-метил   |
| А.7  | Фомесафен   |
| А.8  | Лактофен  |
| А.9  | Оксадиаргил   |
| А.10 | Оксифлуорфен  |
| А.11 | Сафлуфенацил  |
| А.12 | Сульфентразон   |
| А.13 | этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетра-гидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетат (CAS 353292-31-6) |
| А.14 | 1,5-диметил-6-тиоксо-3-(2,2,7-трифтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[ <i>b</i> ][1,4]оксазин-6-ил)-1,3,5-триазиан-2,4-дион       |
|      | CAS 1258836-72-4) – трифлудимоксазин  |

**[0128]** В одном варианте осуществления, гербицид ППО означает карфентразон-этил.

**[0129]** В другом варианте осуществления, гербицид ППО означает флумиоксазин.

**[0130]** В другом варианте осуществления, гербицид ППО означает сафлуфенацил.

**[0131]** В другом варианте осуществления, гербицид ППО означает трифлудимоксазин.

**[0132]** В другом варианте осуществления, гербицид ППО означает тиафенацил.

**[0133]** В другом варианте осуществления, гербицид ППО означает метил 2-[2-[2-бром-4-фтор-5-[3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)пиримидин-1-ил]фенокси]фенокси]-2-метокси-ацетат (см., например, Пример 7).

**[0134]** В другом варианте осуществления, гербицид ППО означает композицию, включающую сафлуфенацил и трифлудимоксазин. Композиции, содержащие сафлуфенацил и трифлудимоксазин, были протестированы в разделе «Примеры» (см., например, Примеры 7 и 8).

**[0135]** Нетрансгенное растение настоящего изобретения должно включать фенотип устойчивости к одному или более ингибирующим ППО гербицидам, таким как сафлуфенацил. Например, растение может иметь фенотип устойчивости к сафлуфенацилу, который превышает 80% устойчивости (т.е. менее 20% фитотоксичности) к 5 г а.и./га сафлуфенацила, например, при его применении на стадии V2-V8 или на стадии 2-4 листьев (т.е. на стадии 12-14 по шкале BVCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie) – предпочтительно, при выращивании в поле (см. ниже). В некоторых вариантах осуществления применяемая композиция содержит 1 об.% ММС - метилированного масла семян (в дополнение к сафлуфенацилу).

**[0136]** В некоторых вариантах осуществления растение может иметь фенотип устойчивости к 2 г а.и./га сафлуфенацила при его применении в поле на стадии 2-4 листьев.

**[0137]** Фитотоксичность гербицида может оцениваться по шкале от 0% фитотоксичности (полная устойчивость) до 100% фитотоксичности (полная чувствительность или отсутствие устойчивости). Фитотоксичность гербицида обычно оценивают в популяции (мутантных) растений при контакте растения с гербицидом, например, с определенным количеством гербицида, такого как сафлуфенацил, на стадии 2-4 листьев. Фитотоксичность можно оценить способом, который описан в разделе «Примеры» (см., например, Пример 4). В некоторых вариантах осуществления фитотоксичность визуально регистрируют для популяции растений после применения гербицида на каждом участке высадки на основе таблицы оценочной шкалы, такой как таблица оценочной шкалы,

показанная в Таблице 2. Определенную фитотоксичность гербицида можно использовать для расчета устойчивости к гербицидам. Например, индекс устойчивости к гербицидам можно рассчитать в соответствии с Примером 4, где 0% означает отсутствие устойчивости, а 100% – полную устойчивость. Фенотип устойчивости выше 80% означает, что фитотоксичность гербицида составляет менее 20%. Таким образом, растение (т.е. популяция растений) демонстрирует менее 20% фитотоксичности.

**[0138]** Интересно, что мутированные растения настоящего изобретения выживают и дают семена после внесения в поле сафлуфенацила в количестве 50 г а.и./га. Таким образом, растение настоящего изобретения предпочтительно выживает и дает семена при концентрации сафлуфенацила в поле менее 50 г а.и./га.

**[0139]** Кроме того, настоящее изобретение предлагает способы, которые включают использование, по меньшей мере, одного гербицида, ингибирующего ППО.

**[0140]** Таким образом, настоящее изобретение относится к способу борьбы с сорняками на участке выращивания растений, включающему следующие этапы:

- а) предоставление нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению на указанном участке выращивания растений, и
- б) применение на указанном участке эффективного количества одного или более ингибирующих ППО гербицидов.

**[0141]** Под термином «борьба с сорняками» следует понимать уничтожение сорняков и/или иное замедление или ингибирование их нормального роста. Сорняки, в широком смысле слова, обозначают любые растения, растущие там, где это нежелательно, например, в местах выращивания полезных растений (культур). К сорнякам настоящего изобретения относятся, например, двудольные и однодольные сорняки. Двудольные сорняки, помимо прочего, включают в себя сорняки следующих видов: *Helianthus*, *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, и *Taraxacum*. Однодольные сорняки, помимо прочего, включают в себя сорняки следующих видов: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*,

Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus и Apera.

**[0142]** В качестве участка выращивания может выступать любой участок, на котором выращивается подсолнечник. В одном варианте осуществления это теплица. В альтернативном варианте это поле. Предпочтительно растение, выращенное на участке выращивания, включая растение настоящего изобретения и сорные растения, вводится в контакт с эффективным количеством одного или более ингибирующих ППО гербицидов, например, путем опрыскивания.

**[0143]** Настоящее изобретение также относится к способу обработки растения, включающему в себя следующие этапы:

- a) предоставление нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению, и
- b) нанесение эффективного количества одного или более гербицидов, ингибирующих ППО, на указанное растение.

**[0144]** В вышеуказанных способах борьбы с сорняками и обработки растений, по меньшей мере, один ингибирующий ППО гербицид можно применять любым способом, известным специалистам в данной области, включая, помимо прочего, обработку почвы и внескорневую обработку. Перед применением ингибирующий ППО гербицид можно преобразовать в обычные препаративные формы, например, растворы, эмульсии, суспензии, дусты, порошки, пасты и гранулы. Форма использования зависит от конкретного назначения. В каждом конкретном случае оно должно обеспечивать тонкое и равномерное распределение гербицида, ингибирующего ППО.

**[0145]** При предоставлении растения, обладающего повышенной устойчивостью к ингибирующим ППО гербицидам, можно использовать широкий спектр составов для защиты растений от сорняков, чтобы улучшить рост растений и уменьшить конкуренцию за питательные вещества. Ингибирующий ППО гербицид можно использовать сам по себе для предвсходовой, послевсходовой, предпосевной и припосадочной борьбы с сорняками на участках, окружающих сельскохозяйственные растения, описанные в настоящем документе, или же можно использовать препаративную форму гербицида, ингибирующего ППО, которая содержит другие добавки. Ингибирующий ППО гербицид также можно использовать для обработки семян. Добавки в препаративных формах гербицида, ингибирующего ППО включают другие гербициды, детергенты, адьюванты,

лиофилизующие добавки, склеивающие агенты, стабилизирующие агенты и другие или подобные вещества. Препаративные формы ингибирующих ППО гербицидов могут быть представлены влажными или сухими препаратами и включать, помимо прочего, сыпучие порошки, концентраты эмульсии и жидкие концентраты. Ингибирующий ППО гербицид и гербицидные препаративные формы можно применять в соответствии со стандартными методами, например, путем обрызгивания, орошения, опыления или другими подобными методами.

**[0146]** В одном варианте осуществления, по меньшей мере, один ингибирующий ППО гербицид наносится путем опрыскивания.

**[0147]** Кроме того, предусматривается применение, по меньшей мере, одного гербицида, ингибирующего ППО на послевсходовом этапе. Например, ингибирующий ППО гербицид можно применять примерно через 10–14 дней после появления всходов подсолнечника. Более того, предусматривается, что ингибирующий ППО гербицид применяется более одного раза.

**[0148]** Кроме того, предусматривается применение, по меньшей мере, одного гербицида, ингибирующего ППО на стадии 2-4 листьев роста растения подсолнечника. Эта стадия соответствует 12-14 стадиям по шкале ВВСН (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie). Шкала ВВСН используется для определения фенологических стадий развития растений. Эта шкала описана, например, в работе Мейера У. (2001). «Этапы роста одно- и двудольных растений». Монография ВВСН. doi:10.5073/bbch0515, которая включена в настоящий документ посредством отсылки. Также шкала описана в работе LANCASHIRE et al. (Анналы прикладной биологии. Том 119, выпуск 3. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1991.tb04895.x>).

**[0149]** Согласно изобретению, эти способы включают нанесение эффективного количества одного или более ингибирующих ППО гербицидов на участке выращивания или на указанное растение. Обычно эффективное количество одного или более ингибирующих ППО гербицидов представляет собой количество, которое способно контролировать сорняки рода *Helianthus*, *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, и *Taraxacum*. Однодольные сорняки, помимо прочего, включают



сорняки следующих видов: Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, и/или Apera.

**[0150]** Приведенные выше определения и пояснения предпочтительно применяются в дальнейшем с соответствующими изменениями.

**[0151]** Настоящее изобретение также относится к семенам нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению, причем эти семена содержат мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО). Семена также должны быть нетрансгенными. В одном варианте осуществления мутантный ген ППО присутствует в семенах в гомозиготной форме. Кроме того, предполагается, что семена имеют на своей поверхности эффективное количество одного или более ингибирующих ППО гербицидов.

**[0152]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа получения продукта из семян подсолнечника, включающего следующее:

- a) выращивание нетрансгенного растения подсолнечника настоящего изобретения на участке выращивания растений,
- b) сбор семян с указанного растения, и
- c) получение продукта из семян, собранных на этапе b.

**[0153]** Этап a) вышеуказанного способа может включать этап нанесения эффективного количества одного или более ингибирующих ППО гербицидов на указанный участок выращивания, как указано в других разделах настоящего документа.

**[0154]** Предпочтительно растение, выращенное на участке выращивания, включая растение настоящего изобретения и сорные растения, вводится в контакт с эффективным количеством одного или более ингибирующих ППО гербицидов, например, путем опрыскивания.

**[0155]** В качестве альтернативы способ может включать следующие этапы:

- a) получение семян по настоящему изобретению, и
- b) получение продукта из семян, полученных на этапе a).

**[0156]** В одном варианте осуществления продукт представляет собой корм для птиц.

**[0157]** В другом варианте осуществления продукт представляет собой муку из семян.

**[0158]** В другом варианте осуществления продукт представляет собой подсолнечное масло. Соответственно, вышеуказанные способы могут включать экстракцию подсолнечного масла из собранных или предоставленных семян.

**[0159]** Таким образом, настоящее изобретение относится к способу производства подсолнечного масла, включающему следующее:

- a) выращивание нетрансгенного растения подсолнечника настоящего изобретения на участке выращивания растений,
- b) сбор семян с указанного растения, и
- c) экстракция подсолнечного масла из семян, собранных на этапе b.

**[0160]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа производства подсолнечного масла, включающего следующее:

- a) получение семян по настоящему изобретению, и
- b) экстракция подсолнечного масла из семян.

**[0161]** Настоящее изобретение также охватывает способ идентификации растения подсолнечника, обладающего повышенной резистентностью к одному или более ингибирующим ППО гербицидам, включающий следующее:

- a) получение семян по настоящему изобретению или клеток нетрансгенного растения подсолнечника по настоящему изобретению,
- b) мутагенез или трансгенез указанного семени или клетки,
- c) выращивание растения из указанного семени или регенерация растения из указанной клетки, и
- d) приведение растения или его потомства в контакт с эффективным количеством одного или более гербицидов, ингибирующих ППО, и
- e) идентификацию растения, обладающего повышенной устойчивостью к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО.

**[0162]** Семена настоящего изобретения могут быть подвергнуты дальнейшему мутагенезу. Таким образом, могут быть идентифицированы растения, которые имеют улучшенную, т.е. повышенную устойчивость к ингибирующим ППО гербицидам (таким как сафлуфенацил). Выражения «повышенная резистентность» или «повышенная устойчивость» означают, что устойчивость к ингибирующим ППО гербицидам (например, к сафлуфенацилу) должна быть увеличена по сравнению с устойчивостью к ингибирующим ППО гербицидам (например, к сафлуфенацилу) у нетрансгенного растения подсолнечника настоящего изобретения.

**[0163]** В одном варианте осуществления вышеуказанного способа этап мутагенеза представляет собой этап случайного мутагенеза, на котором используется тканевая культура, химический мутаген, такой как ЭМС, ионизирующее излучение или бомбардировка быстрыми нейтронами. Например, семя или клетка могут быть подвергнуты мутагенезу ЭМС.

**[0164]** В одном варианте осуществления вышеуказанного способа этап мутагенеза основан на редактировании генома.

**[0165]** Поскольку идентифицируемые вышеуказанным методом растения должны иметь повышенную устойчивость к гербицидам ППО, растение или его потомство предпочтительно подвергают контакту на этапе d) с количеством гербицида ППО, которое превышает количество, переносимое растением настоящего изобретения. Например, эффективное количество сафлуфенацила в контексте способа идентификации растения подсолнечника с повышенной резистентностью может составлять от 25 до 50 а.и. кг/га.

**[0166]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа идентификации и/или селекции растения или семян подсолнечника, обладающих резистентностью к одному или более ингибирующим ППО гербицидам, включая следующее:

- a) предоставление биологического образца из нетрансгенного растения или семени подсолнечника настоящего изобретения,
- b) идентификация или обнаружение в указанном образце присутствия мутированного гена протопорфириногенаоксидазы IX (ППО) и/или мутированной протопорфириногенаоксидазы IX подсолнечника согласно описанию выше в связи с растением настоящего изобретения, и
- c) отбор или идентификация растения или семени, содержащего указанный ген и/или оксидазу.

**[0167]** Кроме того, настоящее изобретение касается способа определения всхожести семян, предусматривающего следующее:

- a) проращивание множества семян, например, по меньшей мере, 100 семян по настоящему изобретению, в присутствии эффективного количества одного или более гербицидов ППО, и
- b) определение количества проросших и непроросших семян, что позволяет определить показатель всхожести семян.

Настоящее изобретение также относится к способу получения растения подсолнечника, резистентного к одному или более ингибиторам ППО,

включающий следующее:

- a) скрещивание первого растения подсолнечника со вторым растением подсолнечника, при этом первое растение подсолнечника содержит в своем геноме, по меньшей мере, одну копию первого аллеля мутированного гена ППО2, кодирующего мутированную протопорфириногенаксидазу IX подсолнечника, причем мутированная протопорфириногенаксидаза IX подсолнечника содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 относительно SEQ ID NO: 2 (замещение F383I); и
- b) отбор полученных в результате такого скрещивания растений, устойчивых к уровню гербицида, ингибирующего ППО, который предотвращает или ингибирует рост растения подсолнечника дикого типа.

Определение гербицида ППО приводилось выше. Это определение применяется соответственно. В одном варианте осуществления гербицид представляет собой сафлуфенацил.

**[0168]** Предпочтительно, чтобы устойчивость первого растения подсолнечника к гербицидам не развивалась трансгенными средствами. Например, первое растение подсолнечника получено путем мутагенеза, например мутагенеза ЭМС.

Наконец, настоящее изобретение относится к растению подсолнечника, которое является устойчивым к уровню гербицида ППО, который предотвращает или ингибирует рост растения подсолнечника дикого типа, толерантное к гербициду ППО растение подсолнечника, полученное путем скрещивания толерантного к гербициду растения подсолнечника, имеющего мутацию в позиции F383I, с растением дикого типа.

**[0169]** Далее описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Приведенные выше определения и пояснения применяются с соответствующими изменениями.

1. Нетрансгенное растение подсолнечника, содержащее мутированный ген протопорфириногенаксидазы IX (ППО), кодирующий мутированную протопорфириногенаксидазу IX подсолнечника, причем мутированная протопорфириногенаксидаза IX подсолнечника содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 относительно SEQ ID NO: 2 (замещение F383I).

2. Нетрансгенное растение подсолнечника по варианту осуществления 1, причем это нетрансгенное растение получено иным способом, чем исключительно по существу биологический процесс.
3. Нетрансгенное растение подсолнечника по вариантам осуществления 1 или 2, причем мутированная протопорфириногенаксидаза IX содержит: аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2, или ее вариант, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99%, или, по меньшей мере, на 99,5% идентичный SEQ ID NO: 2, при условии, что вариант содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383.
4. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 3, причем мутированный ген протопорфириногенаксидазы IX (ППО) содержит
  - a) последовательность нуклеиновой кислоты, как показано в SEQ ID NO: 1, или
  - b) последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99%, или, по меньшей мере, на 99,5% идентична SEQ ID NO: 1.
5. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 4, причем указанное растение обладает фенотипом устойчивости к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО, причем такая устойчивость выше, чем у соответствующего растения подсолнечника дикого типа.
6. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 5, причем мутированный ген ППО присутствует в гомозиготной форме.
7. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 6, причем ген ППО мутирован посредством мутагенеза ЭМС (этилметансульфоната).
8. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 6, причем ген ППО мутирован посредством радиационно-индуцированного мутагенеза.
9. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 6, причем ген ППО мутирован посредством редактирования генома.

10. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 9, содержащее на своих листьях эффективное количество одного или более гербицидов, ингибирующих ППО.
11. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 5 - 10, причем один или более гербицидов, ингибирующих ППО, выбраны из группы, состоящей из гербицидов карфентразон-этила, флумиоксазина, сафлуфенацила и/или трифлудимоксазина и их комбинаций.
12. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 11, причем растение имеет фенотип устойчивости к уровню сафлуфенацила, который обеспечивает предотвращение или ингибирование роста растения дикого типа.
13. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 12, причем это растение имеет фенотип устойчивости к сафлуфенацилу, которая превышает 80% устойчивости к 5 г а.и./га сафлуфенацила, если его применять на стадии V2-V8.
14. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 13, причем ген функционально связан с нативным промотором гена протопорфириногенаоксидазы IX (ППО).
15. Семя из нетрансгенного растения подсолнечника по любому из вариантов осуществления 1 - 14, причем указанное семя содержит мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО).
16. Семя по варианту осуществления 15, имеющее на своей поверхности эффективное количество одного или более гербицидов, ингибирующих ППО.
17. Способ борьбы с сорняками на участке выращивания растений, включающий следующие этапы:
  - a) предоставление нетрансгенного растения подсолнечника согласно любому из вариантов осуществления 1-14 на указанном участке выращивания растений, и
  - b) применение на указанном участке эффективного количества одного или более ингибирующих ППО гербицидов.
18. Способ по варианту осуществления 17, причем указанное эффективное количество эффективно ингибирует рост растения подсолнечника дикого типа.
19. Способ обработки растения, включающий следующие этапы:
  - a) предоставления нетрансгенного растения подсолнечника согласно любому из вариантов осуществления 1 - 14, и

б) применение эффективного количества агрономически приемлемой композиции к указанному растению.

20. Способ по варианту осуществления 19, причем агрономически приемлемая композиция содержит один или более гербицидов, ингибирующих ППО.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 17-20, причем эффективное количество представляет собой количество, которое способно бороться с сорняками рода *Helianthus*, *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, и *Taraxacum*. Однодольные сорняки включают, но не ограничиваются ими, сорняки из родов: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus*, и/или *Apera*.

22. Способ по любому из вариантов осуществления 17-21, причем один или более гербицидов, ингибирующих ППО, содержат сафлуфенацил, и причем эффективное количество составляет 1 - 50 а.и. г/га, например, 2 - 25, например, 5 - 15 а.и. г/га.

23. Способ производства подсолнечного масла, включающий следующее:

а) выращивание нетрансгенного растения подсолнечника согласно любому из вариантов осуществления 1 - 4 на участке выращивания растений,

б) сбор семян с растения, и

с) экстракция подсолнечного масла из семян, собранных на этапе б).

24. Способ по варианту осуществления 23, причем этот способ включает применение эффективного количества одного или более гербицидов, ингибирующих ППО, таких как количество, определенное в вариантах осуществления 17, 19 или 21, на участке выращивания.

25. Способ производства подсолнечного масла, включающий следующее:

а) предоставление семян согласно варианту осуществления 15 и

б) получение подсолнечного масла из семян.

26. Способ идентификации растения подсолнечника, обладающего повышенной резистентности к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО, включающий следующее:

- a) предоставление семени согласно варианту осуществления 15 или клетки из нетрансгенного растения подсолнечника согласно любому из вариантов осуществления 1 - 14,
- b) мутагенез или трансгенез указанного семени или клетки,
- c) выращивание растения из указанного семени или регенерация растения из указанной клетки, и
- d) приведение растения или его потомства в контакт с эффективным количеством одного или более гербицидов, ингибирующих ППО, и
- e) идентификацию растения, обладающего повышенной устойчивостью к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО.

27. Способ по варианту осуществления 24, причем этап мутагенеза представляет собой этап случайного мутагенеза, который может быть достигнут посредством культуры ткани, химического или физического мутагенеза. Этапы химического и физического мутагенеза семян могут включать использование химических и физических мутагенов, таких как, соответственно, ЭМС и ионизирующее излучение.

28. Способ по варианту осуществления 24, причем этап мутагенеза основан на редактировании генома.

29. Способ идентификации и/или отбора растения или семян подсолнечника, обладающих резистентностью к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО, включающий следующее:

- a) предоставление биологического образца из нетрансгенного растения подсолнечника согласно любому из вариантов осуществления 1 - 14 или из семян согласно любому из вариантов осуществления 15-16,
- b) идентификация или обнаружение в указанном образце присутствия мутированного гена протопорфириногенаксидазы IX (ППО) и/или мутированной протопорфириногенаксидазы IX подсолнечника согласно описанию в предыдущих вариантах осуществления, и
- c) отбор или идентификация растения или семени, содержащего указанный ген и/или оксидазу.

30. Способ определения скорости прорастания семян, включающий следующее:

- a) проращивание множества семян согласно варианту осуществления 15 в присутствии эффективного количества одного или более гербицидов ППО, и



b) определение количества проросших и непроросших семян, что позволяет определить показатель всхожести семян.

31. Способ получения растения подсолнечника, резистентного к одному или более ингибиторам ППО, включающий следующее:

a) скрещивание первого растения подсолнечника со вторым растением подсолнечника, при этом первое растение подсолнечника содержит в своем геноме, по меньшей мере, одну копию первого аллеля мутированного гена ППО2, кодирующего мутированную протопорфириногенаксидазу IX подсолнечника, причем мутированная протопорфириногенаксидаза IX подсолнечника содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 относительно SEQ ID NO: 2 (замещение F383I); и

b) отбор полученных в результате такого скрещивания растений, устойчивых к уровню гербицида, ингибирующего ППО, который предотвращает или ингибирует рост растения подсолнечника дикого типа.

32. Способ по варианту осуществления 29, причем гербицид представляет собой сафлуфенацил.

33. Способ по варианту осуществления 29 или 30, причем устойчивость к гербицидам у первого растения подсолнечника не развивается трансгенными способами.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 29 - 31, причем первое растение подсолнечника было получено путем мутагенеза.

35. Растение подсолнечника, толерантное к уровню гербицида ППО, который предотвращает или ингибирует рост растения подсолнечника дикого типа, толерантное к гербициду ППО растение подсолнечника, полученное путем скрещивания толерантного к гербициду растения подсолнечника, имеющего мутацию в позиции F383I, с растением дикого типа.

**[0170]** Если в Примерах не указано иное, все методы применения рекомбинантного ДНК выполняются согласно стандартным протоколам согласно описанию в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Второе Издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY и в томах 1 и 2 Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, США. Стандартные материалы и методы для молекулярной обработки растений описаны в *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) под ред. R.D.D. Croy, совместно опубликованной BIOS Scientific Publications Ltd (UK) и Blackwell Scientific Publications, UK. Среди

других источников по стандартным методам молекулярной биологии отмечаются следующие: Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Третье Издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, тома I и II Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Второе Издание, Academic Press (UK). Стандартные материалы и методы для проведения полимеразных цепных реакций описаны в работе Dieffenbach and Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, и в McPherson et al. (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, Первое Издание, Springer Verlag, Германия.

**[0171]** Все патенты, патентные заявки, публикации или публично раскрытые документы (включая публикации в сети Интернет), упомянутые или цитируемые в настоящем документе, полностью включены в него посредством отсылки.

#### **Последовательности**

SEQ ID NO: 1: последовательность нуклеиновой кислоты мутированного гена ППО2 подсолнечника (с мутацией F383I, кодирующая последовательность)

SEQ ID NO: 2: аминокислотная последовательность мутированного белка ППО2 подсолнечника (с мутацией F383I).

SEQ ID NO: 3: последовательность нуклеиновой кислоты гена ППО2 подсолнечника дикого типа (кодирующая последовательность)

SEQ ID NO: 4: аминокислотная последовательность белка ППО2 подсолнечника дикого типа

SEQ ID NO: 5 нативный промотор гена ППО2 подсолнечника

**[0172]** Изобретение будет далее описываться со ссылкой на описанные в настоящем документе примеры; однако при этом следует понимать, что такими примерами действие изобретения не ограничивается.

**[0173] Пример 1:** Подсолнечник дикого типа чрезвычайно чувствителен к гербицидам, ингибирующим ППО, таким как сафлуфенацил (Kixog™).

**[0174]** Были проведены исследования для оценки чувствительности подсолнечника к гербициду, содержащему активный ингредиент (АИ) сафлуфенацил (торговое наименование: Kixog™). Данный гербицид применялся при 2 полевых испытаниях с разными нормами от 0,91 г до 14 г а.и./га (с 0,5-1% адьюванта ММС - метилированного масла семян) на 2 промышленных сортах подсолнечника [а] обычный (не устойчивый к гербицидам) подсолнечник

(«Эдисон»), который представляет собой подсолнечник линолевого типа, и b) устойчивый к гербицидам подсолнечник («ES Coloris Clearfield»), который представляет собой подсолнечник линолевого типа] и общедоступную инбредную линию HA452 из Министерства сельского хозяйства США (USDA), Национальной системы зародышевой плазмы растений (NPGS), депонированный под номером доступа PI 642771. Обработанные растения находились на стадии от 2 до 4 листьев (VCSH12-14). Испытания проводились по рандомизированному полноблочному плану с 3 повторениями и оценивали фитотоксичность гербицида (процент повреждения) через 3, 7, 10 и 14 дней после обработки (более подробную информацию см. также в Примере 4). Фитотоксичность гербицида варьируется от 0% фитотоксичности (полная устойчивость) до 100% фитотоксичности (полная чувствительность или отсутствие устойчивости).

**[0175]** При первом полевом испытании (испытание 1) все три материала подсолнечника были полностью контролируемыми (т.е. уничтожены) при самой низкой дозе сафлуфенацила через 14 дней (Фигура 1). Полный контроль всех материалов подсолнечника наблюдался даже в первый момент оценки фитотоксичности, через 3 дня после обработки (ДПО) сафлуфенацилом (результаты не показаны).

**[0176]** При втором полевом испытании (испытание 2) адъювант ММС сравнивался в двух концентрациях: 1 об.% (концентрация, используемая фермером) и 0,5% (половина концентрации) (Фигура 2). При концентрации ММС 0,5 об.%, которая снижает общую гербицидную эффективность сафлуфенацила в отношении сорняков, контроль всего материала подсолнечника составил около 80% при самой низкой норме сафлуфенацила (0,91 г а.и./га) и 100% при 1,75 г а.и./га и выше (Фигура 2). При концентрации ММС 1 об.% снова наблюдался полный контроль при всех применяемых нормах.

**[0177]** Ожидаемая норма использования сафлуфенацила (Kixog™) для устойчивого к гербицидам продукта из подсолнечника в настоящее время считается равной примерно 25 г а.и./га, что в 25 раз превышает дозу 0,91 г а.и./га, при которой в ходе испытаний была получена 100% фитотоксичность при 1 об.% ММС и наблюдался высокий контроль (80%) при половине концентрации адъюванта (ММС 0,5 об.%).

**[0178]** Полевые испытания подтвердили то, что уже было известно ранее: обычные подсолнечники очень чувствительны к гербициду сафлуфенацил, даже

при очень низких дозах. Это приводит к проблемам с выявлением и подтверждением мутации в целевом гене ППО2 подсолнечника, которая обеспечивает высокий уровень устойчивости к гербицидам сафлуфенацилу и в целом к другим гербицидам, ингибирующим ППО.

**[0179] Пример 2:** Полевой скрининг мутантов на устойчивость к гербицидам

**[0180]** Семена генотипа НА452 замачивали 0,08% раствором N-этил-N-нитрозомочевины (ЭНМ). Известно, что этот химический мутаген вызывает изменения пар оснований А:Т → Т:А, А:Т → G:C и G:C → А:Т. Семена собирались на выживших обработанных растениях, затем увеличивались и объединялись в одну партию семян.

**[0181]** В городе Лимбургерхофе в Германии был организован предварительный полевой скрининг на наличие мутантов, устойчивых к гербицидам сафлуфенацилу.

**[0182]** 5 июня 2019 г. было высажено около 75 кг семян подсолнечника (что, по нашим оценкам, составляет более полумиллиона семян). Площадь отбора полей составила около 2 га. Всходы растений появились 13 июня 2019 г. Целевой гербицид сафлуфенацил (Kixog™) распылялся после появления всходов растений подсолнечника. В полевых условиях было проведено два внесения сафлуфенацила; первое внесение из расчета 12,5 г а.и./га, второе (через неделю) из расчета 20 г а.и./га. Первое и второе внесение сафлуфенацила проводились, соответственно, 24 июня и 1 июля 2019 г.

**[0183]** В течение 21 дня после второй обработки гербицидом поле отбора проверяли на наличие мутантов, которые толерантны к двум обработкам сафлуфенацилом. Мутанты отбирались в течение 2 дней, 16 и 23 июля. Всего было отобрано 47 мутантов. Отобранные мутантные растения пересаживались в горшки в тот же день, когда они были отобраны, после чего горшки хранились в теплице для производства семян.

**[0184] Пример 3:**

**[0185]** Поскольку нередко при полевом скрининге мутантов на устойчивость к гербицидам отбираются «ложно» устойчивые растения, полевые кандидаты подвергались повторной оценке в теплице. Собранные в полевых условиях семена мутантной линии ЛН16358 были высажены в теплице 26 ноября 2019 года в г. Лимбургерхофе в Германии. Целью тепличного испытания было проверить, выживет ли потомство мутантной линии ЛН16358 при обработке сафлуфенацилом. Семена восприимчивой линии дикого типа (НА452) высевались

в той же теплице, что и восприимчивый эталонный образец. Сафлуфенацилом опрыскивали в дозе 2,5 г а.и./га 10 декабря 2019 г. При этом 2,5 г а.и./га сафлуфенацила соответствует 12,5 г а.и./га в полевых условиях. Окончательная оценка фитотоксичности обработанных растений была выполнена 24 декабря 2019 г.

**[0186]** Первое поколение мутантной линии ЛН16358, хотя и продемонстрировало некоторое повреждение гербицидами, выжило при обработке сафлуфенацилом, в то время как соответствующие обработанные эталонные растения дикого типа были полностью подвержены воздействию и погибли. Выжившие мутанты все чаще выздоравливали после обработки сафлуфенацилом и давали семена.

**[0187]** Устойчивое потомство особей мутантной линии ЛН16358 дало семена, которые были высажены в ходе последующего тепличного испытания 19 мая 2020 года. 3 июня 2020 года растения были опрысканы 2,0 г а.и./га сафлуфенацила. Фитотоксичность оценивалась для отдельных растений с использованием системы оценки, показанной в Таблице 2 в Примере 4. Потомство второго поколения пережило обработку сафлуфенацилом, причем у особей наблюдалась фитотоксичности на уровне всего лишь 25% через 14 дней после обработки (ДПО). Соответствующие обработанные растения дикого типа были полностью подвержены воздействию через 14 дней при фитотоксичности в 100% и были полностью мертвыми.

**[0188]** У девяти растений с наименьшим процентом фитотоксичности были отобраны образцы листьев и секвенированы полные гены ППО1 и ППО2, чтобы оценить, присутствует ли однонуклеотидный полиморфизм(ы) в какой-либо из последовательностей гена ППО по сравнению с соответствующими эталонными последовательностями ППО дикого типа. Результаты показали, что все секвенированные мутанты имели однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) в гене ППО2, а именно переход с Т на А в кодоне для остатка 383 ППО2 дикого типа, что приводило к преобразованию ТТТ(Ф) в АТТ(И). ОНП вызвал замещение фенилаланина на изолейцин в позиции 383 белка ППО2, называемую мутацией PPO2\_F383I.

**Таблица 1: Список результатов секвенирования:**

| Образец # | Идентификатор растения | Расположение скважины | результаты секвенирования |                    |
|-----------|------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------|
|           |                        |                       | ППО1                      | ППО2               |
| 1         | 6-1                    | A2                    | дикий тип                 | F383I гомозиготный |

|   |            |    |           |                      |
|---|------------|----|-----------|----------------------|
| 2 | 6-5        | B2 | дикий тип | F383I гомозиготный   |
| 3 | 8-2        | C2 | дикий тип | F383I гетерозиготный |
| 4 | 8-4        | D2 | дикий тип | F383I гетерозиготный |
| 5 | 2-1        | E2 | дикий тип | F383I гомозиготный   |
| 6 | 1-1        | F2 | дикий тип | F383I гомозиготный   |
| 7 | 1-3        | G2 | дикий тип | F383I гомозиготный   |
| 8 | LH17781-7  | H2 | дикий тип | F383I гомозиготный   |
| 9 | LH17781-13 | A3 | дикий тип | F383I гомозиготный   |

**[0189] Пример 4:** Работы в поле в 2021 году.

**[0190]** Семена одиннадцати линий, происходящих от девяти растений, содержащих мутацию PPO2\_F383I, но с разной родословной, оценивались в рамках углубленного полевого испытания. Углубленное полевое испытание проводилось с высадкой семян вручную в г. Утрере в Испании 3 мая 2021 года. Рассматривался один ряд на каждый мутантный образец на участке, и тридцать два семени были посеяны на каждый мутантный образец на каждый ряд на участок. Сафлуфенацил применялся в четырех возрастающих дозах (0X: 0 а.и./га, 0,5X = 12,5 а.и./га; 1X = 25 а.и./га и 2X = 50 а.и./га), когда растения находились на стадии роста 12-14 по шкале ВВСН. Сафлуфенацил был применен 26 июля 2021 г. Схема полевых испытаний представляла собой схему стрип-блоков с четырьмя повторами.

**[0191]** Оценки фитотоксичности проводились через 2, 5, 12, 19 и 26 дней после обработки (ДПО) сафлуфенацилом. Как уже говорилось ранее, фитотоксичность мутантных образцов и контрольных растений дикого типа оценивали в каждый из дней оценки после обработки сафлуфенацилом. Было протестировано одиннадцать мутантных линий. В полевых условиях тестировалась одна мутантная линия в каждом ряду, по 32 семени в ряду, для каждого значения дозы обработки сафлуфенацилом и репликации. Это означает, что каждый отдельный участок состоял из одного ряда, поэтому участок представлял собой ряд для каждой отдельной мутантной линии. Процент фитотоксичности брался для каждого ряда по сравнению с необработанным рядом той же мутантной линии (контрольные растения). Это означает, что все 11 мутантных линий оценивались на % фитотоксичности при всех обработках и повторениях. Фитотоксичность фиксировали визуально в каждый отдельный момент оценки после применения сафлуфенацила по каждому участку на основе таблицы рейтинговой шкалы (ниже).

**Таблица 2: Процентная оценка фитотоксичности:**

| <b>Фитотоксичность (%)</b> | <b>Шкала оценки</b>   |
|----------------------------|---|
| 0%                         | Поражения у растений отсутствуют. Отличить обработанные и необработанные растения невозможно.   |
| 1-5%                       | Некоторое поражение растений, аналогичный эффект у необработанных растений не наблюдается.  |
| 6-10%                      | Слегка заметное поражение растения  |
| 11-20%                     | Поражение растений, признанное поражением гербицидами, колебания по высоте  |
| 21-30%                     | Поражения растений включают задержку роста, некроз, хлороз. Поражения растений легко заметны даже с расстояния  |
| 31-40%                     | Поражение растений легко распознается как поражение гербицидами даже с расстояния Множественные симптомы включают задержку роста, значительный хлороз, обесцвечивание, хлороз   |
| 41-50%                     | Задержка роста, снижение высоты на 40-50%, задержка роста в точке роста, умеренное неправильное разворачивание листьев, некроз листьев.   |
| 51-60%                     | Выраженный хлороз, некроз точки роста, неправильное разворачивание листьев и задержка роста, деформированные, сморщенные листья и стебли. Замедленное, но непрерывное появление точек роста, потеря апикального доминирования |
| 61-70%                     | Неравномерное развитие, плотные комки, неравномерное раскрытие всех листьев, появляющихся после применения  |
| 81-90%                     | Все точки роста мертвы или подвергнуты сильному хлорозу, некрозу, нет роста, хлороз, некроз старых листьев, растение, скорее всего, погибнет  |
| 91-100%                    | Мертвые ткани или более 90% растительной ткани подвержено некрозу   |

**[0192]** Чтобы лучше отразить устойчивость выживших растений, данные были выражены в процентах эффективности устойчивости к гербицидам с использованием приведенной ниже формулы:

$$\text{Эффективность Устойчивости к Гербицидам (\%)} = \frac{[\text{Фитотоксичность (\%)}_{\text{дикая тип}}] - \text{Фитотоксичность (\%)}_{\text{мутант}}}{[\text{Фитотоксичность (\%)}_{\text{дикая тип}}]} * 100$$

где:

- 0% означает отсутствие устойчивости
- 100% означает полную устойчивость

**[0193]** Разница в фитотоксичности между эталонными особями дикого типа (восприимчивыми) и особями мутантного потомства после обработки лучше отражает устойчивость мутантных особей, чем исходные показатели

фитотоксичности. Фитотоксичность сафлуфенацила одиннадцати мутантных образцов PPO2\_F383I превышает 15% на пике по сравнению с их необработанными контрольными образцами.

**[0194]** Все одиннадцать мутантных линий PPO2\_F383I продемонстрировали высокую эффективность переносимости (%) при всех дозах сафлуфенацила. Результаты по трем линиям показаны на Фигурах 3 и 4. По состоянию на 12 ДПО эффективность устойчивости снижается для всех мутантных образцов, которые начинают значительно восстанавливаться по состоянию на 19 ДПО для всех значений дозы, включая самую высокую 2X.

**[0195]** Кроме того, подсчитывались дни до 50% цветения. Мутанты, обработанные гербицидами, достигали 50% цветения максимум за несколько дней до соответствующих необработанных контрольных образцов. Для мутантной линии 1 PPO2\_F383I количество дней до 50% цветения не менялось среди необработанных образцов и разных доз внесения сафлуфенацила (данные не показаны). Устойчивость мутантных образцов проявляется через выживаемость, восстановление и цветение растений, на которое воздействие не оказывалось на протяжении более 5 дней между регистрацией образцов и изменением скоростей внесения сафлуфенацила.

**[0196]** Высоту растений оценивали после завершения цветения. Оценка была выполнена 16 июля 2021 г., на 73 ДПО. В целом, необработанные растения продемонстрировали более значительную высоту по сравнению с обработанными. Тем не менее, в мутантной линии 4 PPO2\_F383I разница между необработанными образцами и 0,5X и 1X была незначительной.

**[0197] Пример 5: Анализ *in vitro***

**[0198]** Чтобы проверить, является ли PPO2\_F383I основной причиной отмечаемой устойчивости к сафлуфенацилу, нами использовался подход *in vitro* для сравнения эффективности ингибирования (IC50) различных ингибирующих ППО гербицидов между ферментом дикого типа и мутантным ферментом ППО2. Анализ *in vitro* помогает оценить окисление протопорфириногена IX до протопорфирина IX, катализируемое ферментом ППО. Как белки дикого типа, так и мутантные белки ППО2 гетерологично экспрессировали в *E. coli* и очищали. Очищенный белок смешивали с различными концентрациями гербицида в диапазоне от  $10^{-5}$  М до  $10^{-11}$  М и измеряли активность белка. По определению, активность белка представляет собой генерируемую реакцией флуоресценцию в



минуту времени. В реакции очищенный фермент ППО смешивается с субстратом протопорфириногеном IX и гербицидом. Продукт реакции возбуждается при длине волны 405 нм и вызывает флуоресценцию при длине волны 630 нм, которая обнаруживается нами. Рассчитывались IC50 (в молях) и коэффициент устойчивости.

**Таблица 3: Эксперимент по ингибированию *in vitro***

| Гербицид                      | Дикий тип IC50 (моль) | PPO2_F383I IC50 (моль) | Коэффициент устойчивости |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Тиафенацил                    | 9,30E-10              | 1,30E-06               | 1398                     |
| Сафлуфенацил (Kixor™)         | 1,46E-09              | 4,23E-06               | 2897                     |
| Трифлудимоксазин (Tirexor™)   | 1,40E-09              | 4,56E-06               | 3257                     |
| Сафлуфенацил+Трифлудимоксазин | 7,97E-10              | 1,28E-07               | 161                      |

[0199] Значения IC50 для PPO2\_F383I выше  $10^{-6}$  М или коэффициент устойчивости около 1000 или выше считаются крайне устойчивыми. Результаты подтверждают, что мутация PPO2\_F383I является причиной устойчивости к сафлуфенацилу: IC50 составляет  $4,36 \times 10^{-6}$  М, а коэффициент устойчивости - 2897. Мутанты F383I также демонстрируют устойчивость к другим гербицидам.

[0200] **Пример 6:** Анализ *in silico* ППО2 подсолнечника

[0201] Сравнение предсказанной последовательности ППО типа II подсолнечника с последовательностью ППО амаранта показывает, что в ППО типа II подсолнечника отсутствует приблизительно 30-аминокислотное N-концевое расширение ППО типа II амаранта, участвующее в дополнительном нацеливании на хлоропласты. Выравнивание показано на Фигуре 7.

[0202] Таким образом, ожидается, что белок ППО типа II подсолнечника будет нацелен только на митохондрии, что, следовательно, означает, что мутации в любом из двух генов ППО подсолнечника не приведет к появлению белков резистентности в обоих компартментах.

[0203] **Пример 7:** Тепличное испытание перекрестной устойчивости ППО

[0204] В августе 2021 г. в г. Звейнаарде в Бельгии были проведены тепличные испытания гербицида. В тепличном исследовании использовали гомозиготную партию семян подсолнечника PPO2\_F420I (HA452-M) и линию подсолнечника дикого типа (ДТ) (RNA473). Когда у растений было 2-4 листа (стадия роста

ВВСН12-14), их опрыскивали гербицидами, указанными в Таблице 4. Шестнадцать гомозиготных мутантных растений PPO2\_F420I и шесть растений дикого типа высевали и обрабатывали каждым из гербицидов. Фитотоксичность мутантных и диких растений фиксировали в один момент времени, через 4 дня после обработки гербицидами (ДПО), при этом 100% фитотоксичность указывает на полную гибель растений, а 0% фитотоксичность указывает на растения без каких-либо поражений гербицидами.

**[0205]** Целью тепличного испытания было оценить устойчивость мутанта к гербицидам и выживаемость мутантных особей PPO2-F420I при определенных нормах опрыскивания.

**Таблица 4: Обработка гербицидами, использованная при тепличных испытаниях в Бельгии. Август 2021 г. Адьювант метилированное масло семян (ММС) добавлялся во всех случаях при обработке гербицидами в концентрации 1 об.%.**

| <b>Обработка гербицидами</b>   | <b>Доза (г а.и./га)</b>                 |
|--|---|
| Сафлуфенацил (800)   | 0,3<br>0,625<br>1,25<br>2,5<br>5        |
| Флумиоксазин (9155)  | 1<br>2<br>4<br>8                        |
| Сафлуфенацил+Трифлудимоксазин (851)  | 0,625+1,25<br>1,25+2,5<br>2,5+5<br>5+10 |
| метил 2-[2-[2-бром-4-фтор-5-[3-метил-2,6-диоксо-4-(трифторметил)пиримидин-1-ил]фенокси]фенокси]-2-метокси-ацетат (201) | 0,625<br>1,25<br>2,5<br>5               |

**[0206]** Результаты показаны на Фигурах 8 и 9.

**[0207]** Для всех распыляемых гербицидов и при всех тестируемых дозах нами отмечалась устойчивость мутанта к гербицидам, поскольку существовала большая разница между фитотоксичностью гербицидов между растениями дикого типа и мутантом PPO2\_F420I (Фигура 9 и фигура 8). Некоторые примеры описаны ниже:

- Все растения дикого типа были уничтожены при дозе сафлуфенацила всего 1,25 г/га, в то время как все растения PPO2\_F420I выживали при всех дозах внесения, демонстрируя некоторую раннюю фитотоксичность на 4 ДПО (Фиг. 9), за которой следовали последовательное выживание и восстановление на 10 ДПО (Фигура 8).
- Растения дикого типа набрали 90-100% при дозе флумиоксазина всего 4 г/га, при этом выжило только одно растение дикого типа по состоянию на 10 ДПО (Фигура 8), в то время как все растения PPO2\_F420I выжили при всех дозах, демонстрируя немного раннюю фитотоксичность по состоянию на 4 ДПО (Фигура 9), с последующим последовательным выживанием и восстановлением на 10 ДПО (Фигура 8).

**[0208]** Как видно с Фигуры 8, мутанты PPO2\_F420I в значительной степени восстанавливаются после фитотоксичности, наблюдаемой на 4 ДПО, в то время как растения дикого типа полностью погибают, начиная с самой низкой дозы почти для всех гербицидов. Таким образом, мутация PPO2\_F420I действительно придает устойчивость растениям подсолнечника, несущим эту мутацию, в отличие от того же генетического фона подсолнечника (дикого типа) без мутации PPO2\_F420I.

**[0209] Пример 8:** Полевые испытания перекрестной толерантности ППО

**[0210]** Полевое испытание проводилось для оценки перекрестной устойчивости к ППО у неинтрогрессированных, самоопыляющихся, гомозиготных мутантов PPO2\_F420I, а также для оценки различий в устойчивости при увеличении доз гербицидов, перечисленных в Таблице 5. Полевые испытания были проведены в г. Утрере в Испании в сентябре 2021 года.

**[0211]** Обработка гербицидами (таблица 5) проводилась в полевых условиях, когда растения находились на стадии роста 12-14 по ВВСН (2-4 листа). Схема полевых испытаний представляла собой рандомизированный полноблочный план, при этом рассматривался вопрос об 1 повторение из-за ограничения по доступности семян. В полевых испытаниях использовали две линии: линию дикого типа и мутантную линию PPO2\_F420I. Экспериментальный участок состоял из 1 образца на участок и 1 ряда на образец.

**[0212]** Фитотоксичность мутантных и диких образцов фиксировалась с течением времени, на 6, 11 и 14 ДПО, при этом 100% фитотоксичность указывает на полный контроль (мертвые растения), а 0% фитотоксичность указывает на отсутствие контроля или живые растения без какого-либо поражения гербицидами.

[0213]

**Таблица 5: Операции обработки гербицидами, которые использовали при тепличных испытаниях**

| Обработка гербицидами   | Доза (г а.и./га) |
|---|------------------|
| Сафлуфенацил  | 3,125            |
| Сафлуфенацил  | 6,25             |
| Флумиоксазин  | 45               |
| Флумиоксазин  | 55               |
| Флумиоксазин  | 65               |
| * при всех операциях по обработке производили опрыскивание метилированным маслом семян (ММС) в концентрации 1 об.%. |                  |

[0214] Контроль образцов дикого типа был на уровне 100% по всем дозам сафлуфенацила, тогда как для флумиоксазина контроль образцов дикого типа находился на уровне 75-80% по всем дозам (таблица 6).

[0215] По всем гербицидам мутант PPO2\_F420I явно демонстрировал устойчивость по сравнению с соответствующим фоновым показателем для дикого типа.

[0216] Максимальная фитотоксичность сафлуфенацила у мутантов PPO2\_F420I составила 40% на 11 и 14 ДПО, тогда как фитотоксичность сафлуфенацила при фоновом показателе для образца дикого типа составила 100%. Для мутанта PPO2\_F420I не наблюдалось ответа на дозу между двумя дозами сафлуфенацила. При этом фитотоксичность фиксируется примерно на таком же уровне, как и для более высоких доз, о чем свидетельствуют результаты предыдущих полевых испытаний.

[0217] Для флумиоксазина фитотоксичность у мутантов PPO2\_F420I составляла только 20% при самой высокой испытательной дозе 65 а.и./га на 14 ДПО, в то время как фоновый показатель для дикого типа отражал фитотоксичность 80% в тот же момент времени оценки.

**Таблица 6: Фитотоксичность (%) после применения гербицидов на растениях дикого типа и PPO2\_F420I с течением времени в полевых условиях. Испания, 2021.**

| Обработка гербицидами | Доза (г а.и./га) | Фитотоксичность (%) |        |        |                   |        |        |
|-----------------------|------------------|---------------------|--------|--------|-------------------|--------|--------|
|                       |                  | Дикий тип (ДТ)      |        |        | Мутант PPO2_F420I |        |        |
|                       |                  | 6 ДПО               | 11 ДПО | 14 ДПО | 6 ДПО             | 11 ДПО | 14 ДПО |
| Необработанные        | /                | 1                   | 1      | 0      | 5                 | 6      | 6      |
| Сафлуфенацил          | 3,125            | 100                 | 100    | 100    | 40                | 35     | 35     |
| Сафлуфенацил          | 6,25             | 100                 | 100    | 100    | 45                | 40     | 40     |

|              |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Флумиоксазин | 45 | 80 | 75 | 75 | 20 | 20 | 10 |
| Флумиоксазин | 55 | 80 | 70 | 70 | 30 | 25 | 15 |
| Флумиоксазин | 65 | 85 | 80 | 80 | 30 | 30 | 20 |

[0218] Полевой анализ показал, что образец дикого типа полностью погибает после обработки всеми дозами сафлуфенацила, в то время как мутант PPO2\_F420I выживает. Гибель образцов дикого типа находится на уровне 75-80% по всем дозам флумиоксазина. Стоит отметить, что дикий тип значительно поражается на уровне 75-80%, хотя процент гибели и не составляет 100%, в то время как превосходные характеристики образца мутанта PPO2\_F420I очевидны по сравнению с образцом дикого типа.

[0219] **Пример 9:** Анализ промотора

[0220] Анализ промотора подсолнечника

[0221] Были проведены исследования по анализу экспрессии транскриптов на основе компьютерной модели, чтобы оценить, какое влияние промотор будет оказывать на экспрессию гена ППО и одновременную устойчивость к гербицидам. Промоторы убиквитина, такие как промотор убиквитина3 (UBQ3) и убиквитина10 (UBQ10), широко используются для обеспечения конститутивно высокой экспрессии трансгенов (см. WO 2012/080975, WO2015/022636 и WO 2016/203377). Для целей контроля нативную экспрессию UBQ3 и UBQ10 Arabidopsis сначала сравнивали с нативной экспрессией UBQ3 и UBQ10 подсолнечника с использованием программы Genevestigator ((Genevestigator v3: база данных эталонных выражений для метаанализа транскриптомов. Tomas Hruz, Oliver Laule, Gabor Szabo, Frans Wessendorp, Stefan Bleuler, Lukas Oertle, Peter Widmayer, Wilhelm Gruissem, Philip Zimmermann, Adv Bioinformatics. 2008; 2008:420747. doi: 10.1155/2008/420747. Epub 2008 Jul 8. PMID: 19956698; PMCID: PMC2777001). И у подсолнечника, и у Arabidopsis промотор UBQ10 в большинстве тканей примерно в два раза сильнее, чем промотор UBQ3 (не показано), а уровень экспрессии, обеспечиваемый обоими промоторами, сопоставим между этими двумя видами.

[0222] Экспрессию генов ППО1 и ППО2 подсолнечника, управляемую их нативными промоторами, сравнивали с экспрессией UBQ3 и UBQ10 подсолнечника. Анализ по компьютерной модели показал, что экспрессия ППО1 и ППО2 в подсолнечнике примерно в 15 раз ниже, чем экспрессия UBQ3, и примерно в 30-50 раз ниже, чем экспрессия UBQ10 (не показано).

**[0223]** На основании этого анализа нами был сделан вывод о том, что промоторы UBQ3 и UBQ10 из *Arabidopsis*, используемые во многих трансгенных ППО, ингибирующих устойчивость к гербицидам, обеспечивают высокую экспрессию, необходимую для устойчивости к гербицидам в этих случаях. Однако экспрессия ППО1 и ППО2 у подсолнечника явно ниже, чем UBQ3 и UBQ10. Следовательно, ожидается, что нативная экспрессия ППО2 и любых его мутантов будет намного ниже, чем трансгенная сверхэкспрессия ППО2, управляемая промотором убиквитина. Эти исследования подтверждают наше мнение о том, что идентифицированный мутант ППО2 неожиданно демонстрирует фенотип толерантности к ППОi.

## Формула изобретения

1. Нетрансгенное растение подсолнечника, содержащее мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО), кодирующий мутированную протопорфириногенаоксидазу IX подсолнечника, **отличающееся тем**, что мутированная протопорфириногенаоксидаза IX подсолнечника содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383 относительно SEQ ID NO: 2 (замещение F383I).

2. Нетрансгенное растение подсолнечника по п. 1, **отличающееся тем**, что нетрансгенное растение получено иным способом, чем исключительно по существу биологический процесс.

3. Нетрансгенное растение подсолнечника по пп. 1 или 2, **отличающееся тем**, что мутированная протопорфириногенаоксидаза IX содержит: аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2, или ее вариант, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99%, или, по меньшей мере, на 99,5% идентичный SEQ ID NO: 2, при условии, что вариант содержит замещение фенилаланина (F) на изолейцин (I) в позиции, соответствующей остатку 383.

4. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 3, **отличающееся тем**, что мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО) содержит

- (a) последовательность нуклеиновой кислоты, как показано в SEQ ID NO: 1, или
- (b) последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99%, или, по меньшей мере, на 99,5% идентична SEQ ID NO: 1.

5. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 4, **отличающееся тем**, что указанное растение обладает фенотипом устойчивости к одному или более гербицидам, ингибирующим ППО, причем такая устойчивость выше, чем у соответствующего растения подсолнечника дикого типа.

6. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 5, **отличающееся тем**, что мутированный ген ППО присутствует в гомозиготной форме.

7. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 6, **отличающееся тем**, что ген ППО мутирован посредством мутагена ЭМС (этилметансульфоната).

8. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 6, **отличающееся тем**, что мутирован посредством радиационно-индуцированного мутагена.

9. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 6, **отличающееся тем**, что ген ППО мутирован посредством редактирования генома.

10. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 9, содержащее на своих листьях эффективное количество одного или более гербицидов, ингибирующих ППО.

11. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 5 - 10, **отличающееся тем**, что один или более гербицидов, ингибирующих ППО, выбраны из группы, состоящей из гербицидов карфентразон-этила, флумиоксазина, сафлуфенацила и/или трифлудимоксазина и их комбинаций

12. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 11, **отличающееся тем**, что растение имеет фенотип устойчивости к уровню сафлуфенацила, который обеспечивает предотвращение или ингибирование роста растения дикого типа.

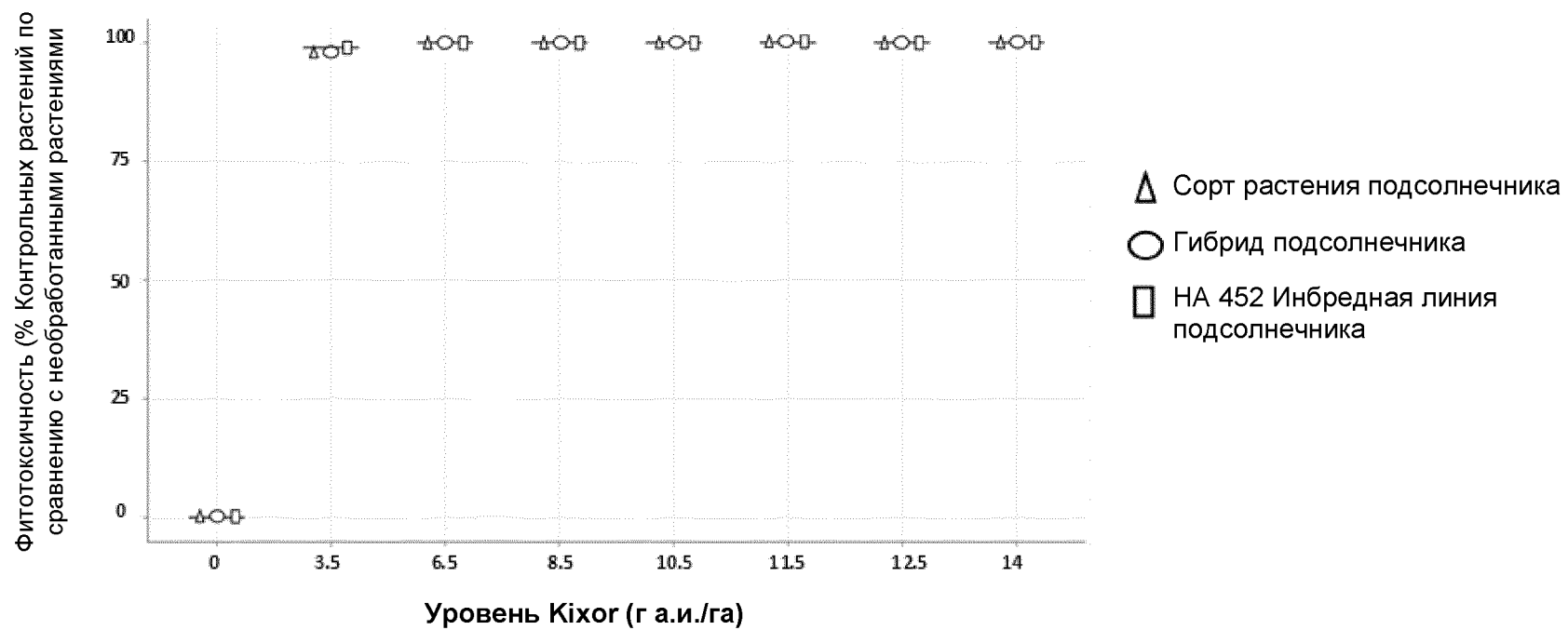
13. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 12, **отличающееся тем**, что растение имеет фенотип устойчивости к сафлуфенацилу, которая превышает 80% устойчивости к 5 г а.и./га сафлуфенацила, если его применять на стадии V2-V8.

14. Нетрансгенное растение подсолнечника по любому из пп. 1 - 13, **отличающееся тем**, что ген функционально связан с нативным промотором гена протопорфириногенаксидазы IX (ППО).

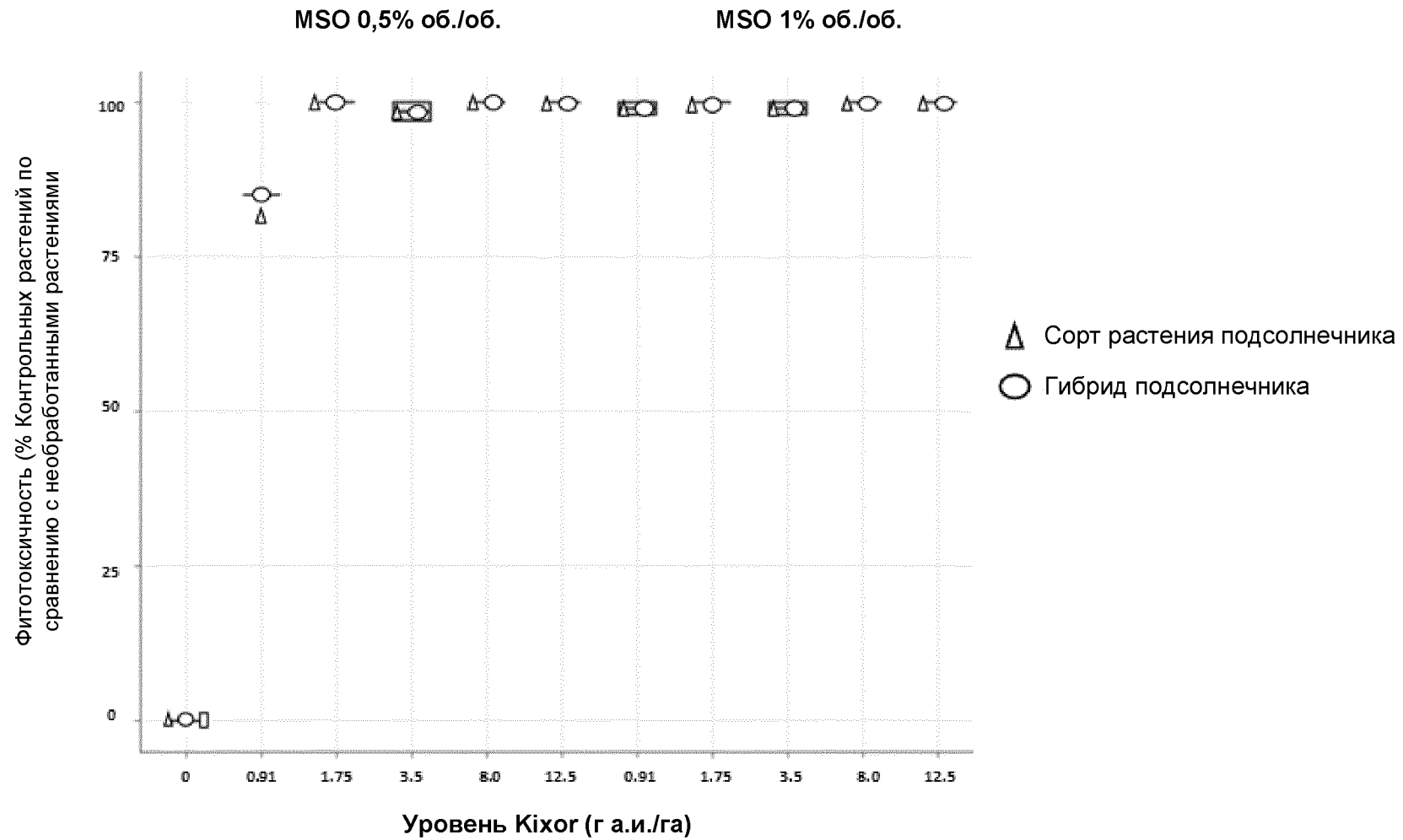


15. Семя из нетрансгенного растения подсолнечника по любому из пп. 1 - 14, **отличающееся тем, что** указанное семя содержит мутированный ген протопорфириногенаоксидазы IX (ППО).

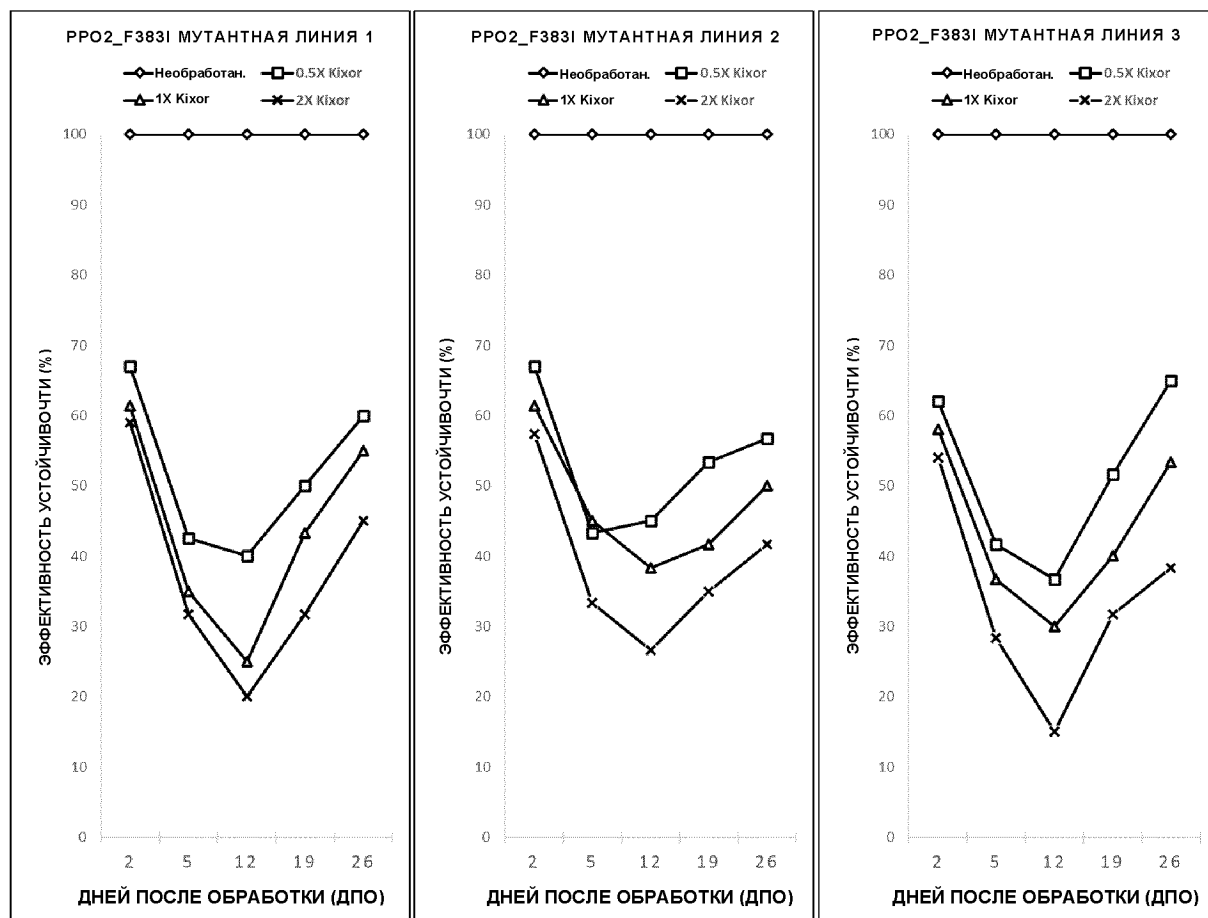
Фигура 1



Фигура 2

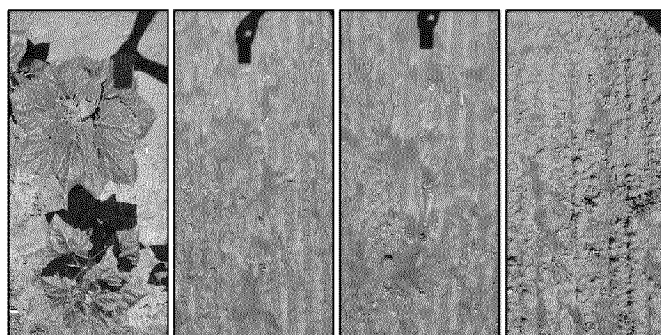


Фигура 3



## Фигура 4

Подсолнечник дикого типа (Контроль восприимчивости) – 19 ДПО



Необработанный

Кixор 0,5X

Кixор 1X

Кixор 2X

21LNNA000459 Мутантный – 19 ДПО



Необработанный

Кixор 0,5X

Кixор 1X

Кixор 2X

21LNNA000449 Мутантный – 19 ДПО



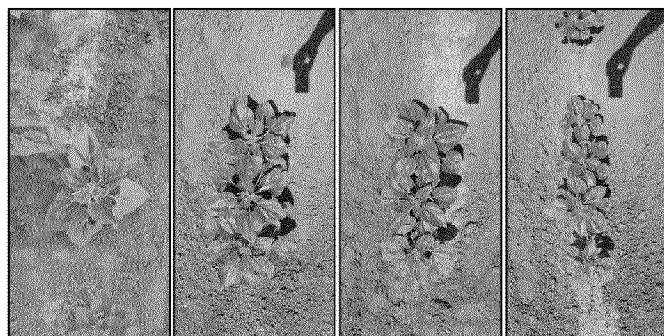
Необработанный

Кixор 0,5X

Кixор 1X

Кixор 2X

21LNNA000453 Мутантный – 19 ДПО



Необработанный

Кixор 0,5X

Кixор 1X

Кixор 2X

**Фигура 5**

MASPTTPDNQ KPAKRVAVVG AGVSGCAAAY KLKLGHLNVT VFEADGRVGG 50  
KLRSVSQDGL IWDEGANTMT ESEAEVSSLI DDLGLRDKQQ FPISQHKRYI 100  
VRNGKPVLP SNPIALIRSS FLSTQSKVQI LLEPFLWKKN KSSDAPESVG 150  
EFFQRHFGKE VVEYLIDPVV AGTSGGDPEL LSMRHAFPEL WDLERRFGSI 200  
VSGAFQSMVS SRNGKRKPSG NSKRRRGSFS FFGGMQTLTD ALCKEIGPHE 250  
LNLQSKVLEM SYNCDGNAV G NWSICCAPDQ NKQFQQSFDA VIMTAPLGNV 300  
KEMKITKIGS PFPLNFIPEV SYMPISVIIS TFKKENVKQP LEGFGVLVPA 350  
KEQKNGLRTL GTLFSSMMFP DRASEDVYLY TTIVGGSRNK ELAKASRDEL 400  
KHIVTSDLRL LLGTEGEPKF LTHYYWSKAF PLYGRGYGSV IEAIEKMERE 450  
LPGYFYAGNH KGGLSVGKAI SSGCKAAESV IAYLDSYSDE K 491

### Фигура 6

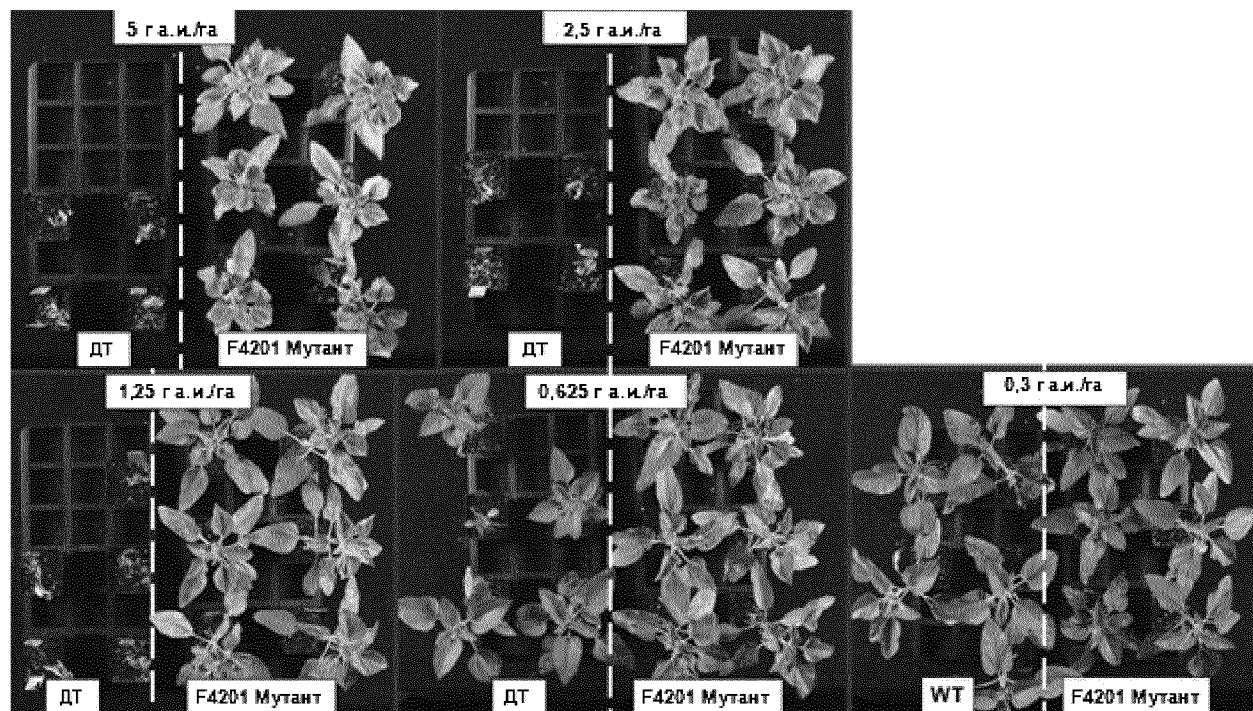
atggcttcac caactacacc tgacaacca aaacctgcta agcgagttgc 50  
 cgttgttggg gccggtgtca gtgggtgtgc tgctgcttat aagtaaagt 100  
 tacatggatt aaatgtcact gtcttgaag ctgatggag agtaggcggg 150  
 aaactacgga gcgtttcgca agatggttta atatgggatg aggggtgcca 200  
 tactatgact gagagtgagg cagaggtcag cagtttgatt gatgatctg 250  
 ggcttcgaga taaacaacag tttccgatt cacagcaca gcggtacatt 300  
 gtaagaaatg gaaaacctgt actgatacct tctaaccaaa ttgactgat 350  
 cagaagcagt tttcttcca ctcagtcgaa ggtcaaatt ctttggagc 400  
 cgttttatg gaagaagaat aagtcactg acgcaccaga gagtgttga 450  
 gaattcttc aacgtcatt tgggaaggag gttgtgagt atctattga 500  
 tccagttgt gcggaacaa gcggcggaga tcccgaatca cttctatgc 550  
 gtcatgcatt tcctgagta tgggattag aaagaagggt tggttcaat 600  
 gttccgggg catttcagtc tatggatct tccagaaatg ggaaaaggaa 650  
 acctctgga aacagcaaac gtaggcgtgg ttttttcg ttttcggg 700  
 gaatgcagac actcactgat gcactatgca aagagatcgg accccatgaa 750  
 ctaatcttc aatcaaagg gcttgaatg tctacaact gcgatgtaa 800  
 cgcggttgg aattgtcaa tatgttgc tccagatcaa aacaacaat 850  
 ttcagcaatc ttcgatgct gtgatcatga ctgccccact tggcaatga 900  
 aaagaaatga agattacaaa gatcggaagt ccgttccgc ttaattcat 950  
 accagaggtg agttatatgc caatatcagt aataatctc acttcaaga 1000  
 aagaaaact gaagcagccc ctgaggggt tggagttct tgtccagcc 1050  
 aaggagcaga aaaatggtt gaggacacta ggcactctct tctcctgat 1100  
 gatgtttcca gatcgcgct cggaagacgt gtaccttac accacc**ATTg** 1150  
 ttggggtag tcgaaacaaa gaactggcca aagcttcgag ggacgagttg 1200  
 aagcatatag taacttctga ctcagactg ttgcttgaa cagaagggga 1250  
 gccaaaattt ctaactcact attattggag caaagcattt ccattgtatg 1300  
 ggcgcggcta tggttcagtc attgaagcaa ttgagaaaat ggaaaggag 1350  
 ctaccggat actttatgc aggtaaccac aaaggagggc tctctgtcgg 1400  
 gaaagcaata tcctcggat gcaaagcagc cgaatctgtg atgcatact 1450  
 tggattctta ttcggacgag aagtag 1476

### Фигура 7

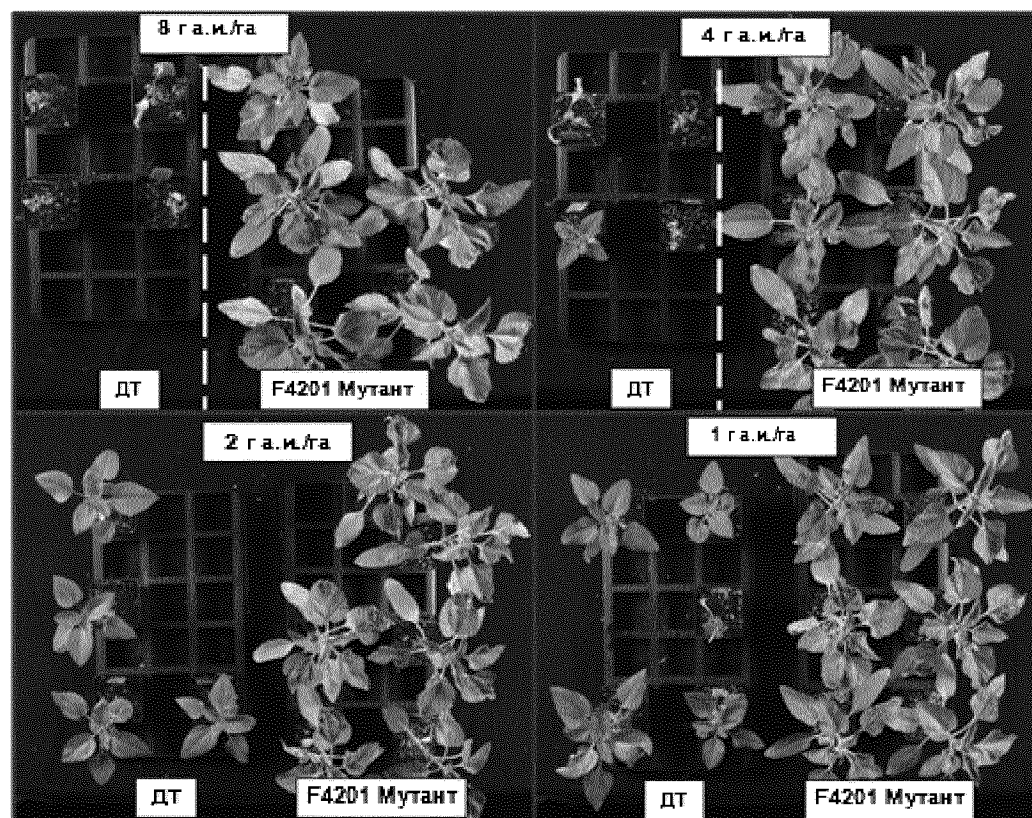
A: MVIQSITHLSPNLALPSPLSVSTKNYPVAVMGNISEREEPTSAKRVAVVG  
    |          |||||||  
 B: MASPTTPDNQKPAKRVAVVG

Фигура 8

А)



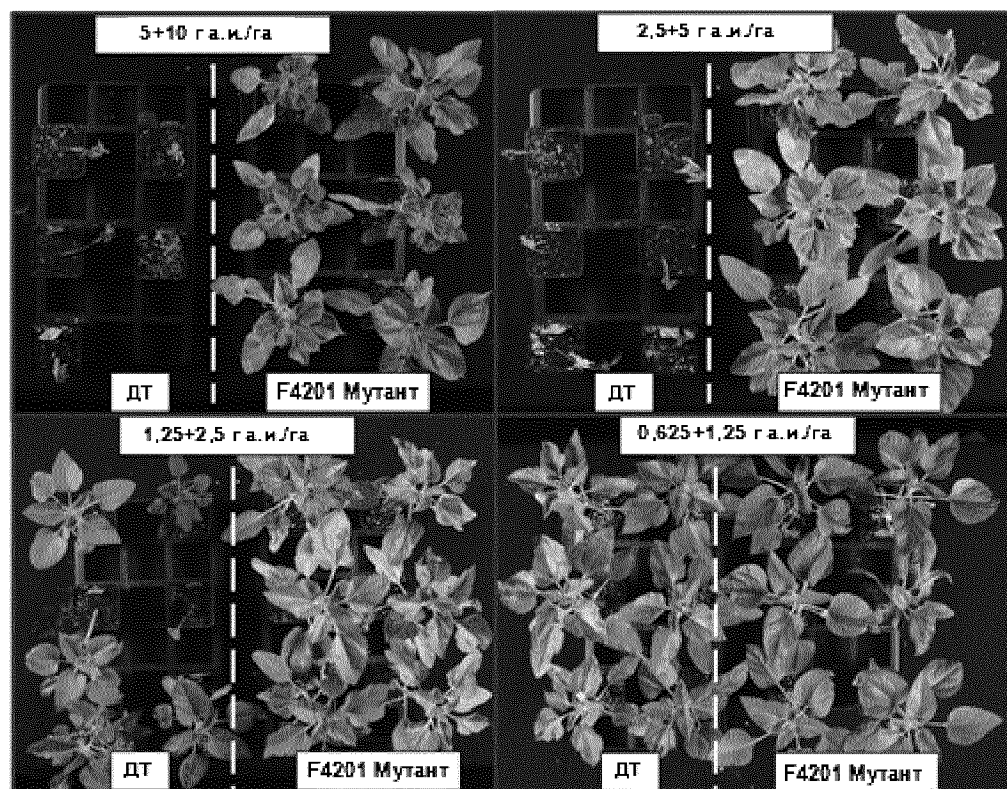
В)



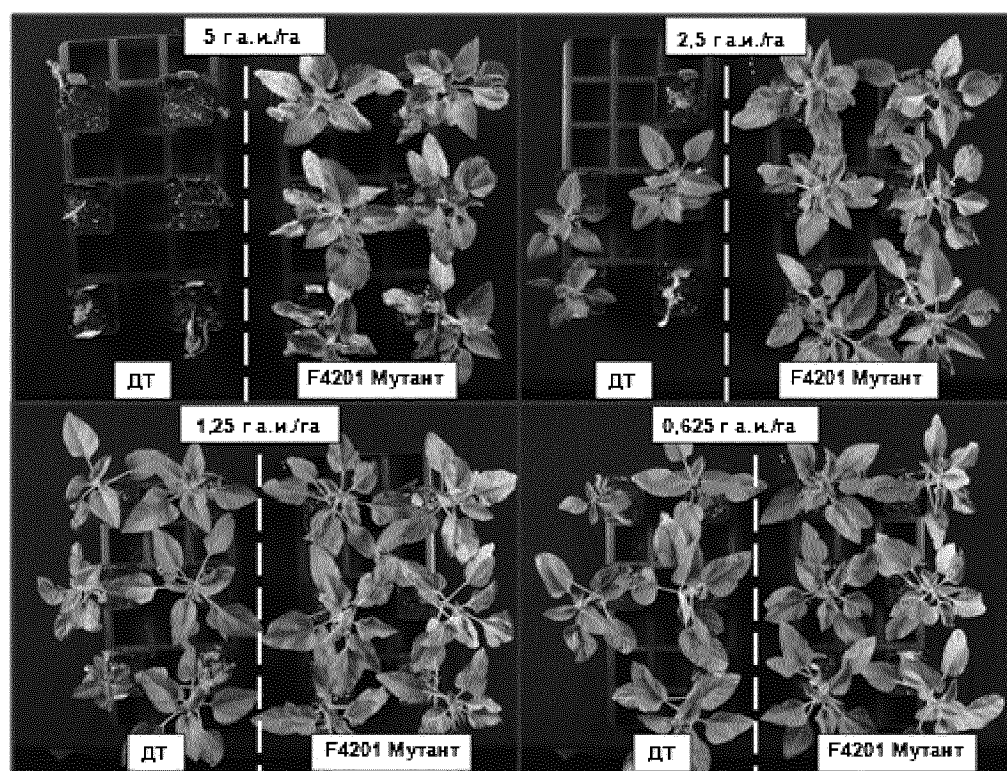


Фиг. 8 (продолжение)

С)



D)



Фиг. 9

|      |              |        | 100 | 90 | 80 | 70 | 60 | 50 | 40 | 30 | 20 | 10 | 0 |
|------|--------------|--------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| 201  | 5g ai/ha     | WT     | 5   | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 201  | 5g ai/ha     | MUTANT | 1   | 0  | 4  | 10 | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 201  | 2.5g ai/ha   | WT     | 2   | 3  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 201  | 2.5g ai/ha   | MUTANT | 0   | 4  | 3  | 10 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 201  | 1.25g ai/ha  | WT     | 0   | 0  | 0  | 6  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 201  | 1.25g ai/ha  | MUTANT | 0   | 0  | 0  | 2  | 3  | 12 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 201  | 0.625g ai/ha | WT     | 0   | 0  | 0  | 1  | 0  | 4  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 201  | 0.625g ai/ha | MUTANT | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 8  | 5  | 0  | 0 |
| 800  | 5g ai/ha     | WT     | 4   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 800  | 5g ai/ha     | MUTANT | 6   | 6  | 5  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 800  | 2.5g ai/ha   | WT     | 4   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 800  | 2.5g ai/ha   | MUTANT | 5   | 1  | 10 | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 800  | 1.25g ai/ha  | WT     | 5   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 800  | 1.25g ai/ha  | MUTANT | 0   | 5  | 6  | 0  | 2  | 2  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0 |
| 800  | 0.625g ai/ha | WT     | 1   | 0  | 3  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 800  | 0.625g ai/ha | MUTANT | 0   | 0  | 0  | 1  | 5  | 5  | 4  | 1  | 2  | 0  | 0 |
| 800  | 0.3g ai/ha   | WT     | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 3  | 0  | 0  | 0 |
| 800  | 0.3g ai/ha   | MUTANT | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 4  | 5  | 4  | 0 |
| 851  | 5g ai/ha     | WT     | 5   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 851  | 5g ai/ha     | MUTANT | 5   | 3  | 2  | 4  | 2  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 851  | 2.5g ai/ha   | WT     | 6   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 851  | 2.5g ai/ha   | MUTANT | 1   | 3  | 2  | 7  | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 851  | 1.25g ai/ha  | WT     | 0   | 2  | 4  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 851  | 1.25g ai/ha  | MUTANT | 0   | 0  | 0  | 7  | 2  | 5  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0 |
| 851  | 0.625g ai/ha | WT     | 0   | 0  | 0  | 0  | 1  | 5  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 851  | 0.625g ai/ha | MUTANT | 0   | 0  | 0  | 1  | 6  | 5  | 5  | 0  | 1  | 0  | 0 |
| 9155 | 8g ai/ha     | WT     | 4   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 9155 | 8g ai/ha     | MUTANT | 0   | 2  | 1  | 4  | 6  | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 9155 | 4g ai/ha     | WT     | 3   | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 9155 | 4g ai/ha     | MUTANT | 0   | 2  | 3  | 5  | 1  | 3  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 9155 | 2g ai/ha     | WT     | 0   | 4  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 9155 | 2g ai/ha     | MUTANT | 0   | 0  | 2  | 5  | 6  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 9155 | 1g ai/ha     | WT     | 0   | 5  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
| 9155 | 1g ai/ha     | MUTANT | 0   | 2  | 0  | 6  | 2  | 4  | 3  | 0  | 0  | 0  | 0 |