

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491385 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.19

(51) Int. Cl. A01N 3/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.12.01

(54) СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ МАИСА ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

(31) 21212038.0

(32) 2021.12.02

(33) EP

(86) PCT/EP2022/084016

(87) WO 2023/099652 2023.06.08

(71) Заявитель:  
СИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН АГ  
(CH)

(72) Изобретатель:

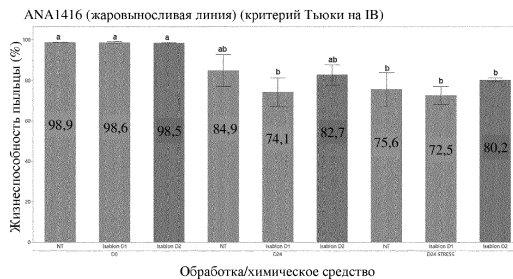
Лайпнер Йёрг, Рута Натхини (CH),  
Николи Анжелика, Фонтан Антуан  
(FR)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Способ сохранения жизнеспособности пыльцы маиса, в частности при тепловом стрессе, включающий обработку растений маиса гидролизатом белка.

ANA1416 (жаровыносливая линия), критерий Тьюки на IB



202491385

A1

A1

202491385

## СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ МАИСА ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

5

Настоящее изобретение относится к способу увеличения жизнеспособности пыльцы растений маиса, в частности при тепловом стрессе, с применением гидролизата белка.

10        Маис (*Zea mays*), также известный как кукуруза, является одной из наиболее широко культивируемых сельскохозяйственных культур в мировом сельском хозяйстве. Его выращивают для потребления человеком, в качестве корма для животных, для получения кукурузного этанола и других продуктов из кукурузы, таких как кукурузный крахмал и кукурузный сироп.

15        Гидролизаты белка представляют собой новый класс продуктов для содействия возделыванию сельскохозяйственных культур, используемых в сельском хозяйстве для улучшения усвоения питательных веществ и смягчения стресса у сельскохозяйственных культур. Гидролизаты белка получают путем кислотного или основного гидролиза растительных или животных белков. Гидролизат обычно представляет собой смесь свободных аминокислот, коротких пептидов и длинных пептидов в зависимости от условий гидролиза. Известно, что они оказывают определенные биостимулирующие эффекты при применении в отношении растений. Обзор некоторых из них приведен в *Front. Plant Sci.*, 22 декабря 2017 г., доступно на сайте <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>.

20        Жизнеспособность пыльцы – это способность пыльцы переносить продуцируемые ею мужские гаметы в зародышевый мешок для опыления, и она может быть измерена по целостности мембраны с использованием импедансного проточного цитометра (анализатор пыльцы торговой марки Amphasys Z32). Для успешного опыления необходима жизнеспособная пыльца; однако на жизнеспособность пыльцы могут негативно повлиять внешние факторы, такие как тепловой стресс или стресс, вызванный засухой.

30        Авторы настоящего изобретения обнаружили, что гидролизаты белка при применении в отношении маиса обладают удивительным эффектом увеличения жизнеспособности пыльцы при тепловом стрессе, при этом о данном эффекте ранее не сообщалось.

Согласно настоящему изобретению представлен способ увеличения жизнеспособности пыльцы растения маиса, включающий обработку растения маиса или его места произрастания гидролизатом белка. Предпочтительно способ осуществляют на растении маиса, которое впоследствии подвергается тепловому стрессу.

Согласно настоящему изобретению представлен процесс применения гидролизата белка в отношении растение маиса или его места произрастания с целью увеличения жизнеспособности пыльцы. Предпочтительно процесс осуществляют с целью увеличения жизнеспособности пыльцы при тепловом стрессе. Также представлено применение гидролизата белка для сохранения жизнеспособности пыльцы растения маиса.

Предпочтительно, чтобы гидролизат белка был получен из животного источника, например из коллагена. Многие гидролизаты белка коммерчески доступны, и особенно предпочтительным лизатом белка является ISABION (номер CAS 9015-54-7; номер ЕС 310-296-6), доступный от Syngenta Crop Protection AG. Он находится в форме концентрата суспензии, содержащего 100 г/л общих аминокислот в воде. ISABION содержит свободные аминокислоты (11%) и пептиды (52%), которые вместе составляют 62,5% общих аминокислот.

Гидролизат белка может использоваться в немодифицированной форме или вместе со вспомогательными средствами, традиционно используемыми в области составления. Обычно они поставляются в форме концентратов суспензии, которые перед применением разбавляются водой. Как правило, концентраты содержат от 50 до 250 г/л гидролизата белка, исходя из общего содержания аминокислот. Предпочтительно эти концентраты разбавляют водой перед применением в 10-50 раз, чтобы конечный раствор для опрыскивания содержал от приблизительно 0,1 до 1 г/л гидролизата белка, предпочтительно от 0,2 до 0,5 г/л, исходя из общего содержания аминокислот.

Тепловой стресс означает условия, при которых средние температуры окружающей среды в месте выращивания маиса значительно превышают температуры, ожидаемые в норме, например, превышают температуры, ожидаемые в норме, на более чем 5°C, в частности на более чем 8°C. Примерами условий теплового стресса являются дневные температуры выше 30°C, особенно выше 35°C и ночные температуры выше 20°C, в частности выше 23°C.

Применение гидролизата белка можно осуществлять путем традиционного в сельском хозяйстве опрыскивания. Типичные нормы применения гидролизата белка составляют от 0,5 до 5 литров/га, чаще всего от 1 до 2 литров/га конечного раствора для опрыскивания.

- 5 Гидролизат белка можно применять одновременно вместе с другими агрохимическими средствами или удобрениями, например гербицидами, фунгицидами или инсектицидами, селективными в отношении маиса.

Существует две основные стадии роста кукурузы: вегетативные стадии (V) и репродуктивные стадии (R).

10 **Таблица 1. Вегетативные стадии кукурузы**

<b>Вегетативная стадия</b>	<b>Описание и время после посева*</b>
VE (прорастание)	В идеальных условиях может происходить через четыре-пять дней после посева, но в прохладных или сухих условиях – даже через две недели или дольше.
V1-V5	При V1 появляется первый лист с "воротничком"; развиваются узловые корни. Количество листьев с "воротничком" увеличивается к V2, растение достигает высоты от 2 до 4 дюймов и зависит от энергии в семени. Определяется количество рядов зерен. Узловые корни заменяют зародышевую корневую систему.
V6-V8	Рост на поверхности почвы или чуть выше нее. Могут быть видны початковые побеги и отростки. Появление нового листа с "воротничком" каждые 4-5 дней. Нижние листья могут быть уже не видны.
V9-V11	Через приблизительно шесть-восемь недель после VE быстрое удлинение междоузлий стебля. Метелка вот-вот начнет развиваться. Быстрое развитие корней.
V12-Vn-я	Количество зерен в ряду определяется между V12 и V17. Продолжается быстрое удлинение стебля. Постоянное увеличение накопления питательных веществ и сухой массы (начиная с V10). Стадия нового листа каждые 2-3 дня.
VT	Появление метелки. Метелка развивается над последним листом. Видно последнее ответвление метелки. Достигается полная высота растения. Выбрасывание пыльцы (цветение) начинается вскоре после того, как метелка кукурузы полностью выйдет из мутовки. Первыми раскрываются колоски, расположенные вблизи главной оси метелки, обнажая пыльники, которые несут пыльцевые зерна. Через приблизительно 2-3 дня после появления рылец (R1)

\*Представлен нормальный рост кукурузы при благоприятной температуре и влажности. Более низкие температуры могут замедлить рост, в то время как более

высокие температуры могут увеличить скорость роста и сократить время между стадиями развития листьев.

В одном варианте осуществления представлен способ сохранения жизнеспособности пыльцы растения маиса, включающий обработку растения маиса или его места произрастания гидролизатом белка. Дополнительно представлен способ, при котором растение маиса подвергается тепловому стрессу. В одном варианте осуществления тепловой стресс представляет собой дневную температуру выше 30°C и предпочтительно выше 35°C. В одном варианте осуществления тепловой стресс представляет собой дневную температуру выше 40°C.

В другом варианте осуществления тепловой стресс представляет собой ночную температуру выше 20°C и предпочтительно выше 23°C. В одном варианте осуществления тепловой стресс представляет собой ночную температуру выше 26°C.

В одном варианте осуществления гидролизат белка применяют в отношении растения маиса или его места произрастания во время вегетативной стадии роста. Предпочтительно гидролизат белка применяют в отношении растения маиса или его места произрастания во время стадий V9-V11 вегетативного роста.

Маис включает сорта, в том числе традиционные сорта, а также сорта, которым была придана выносливость к гербицидам, таким как бромоксинил, или классам гербицидов (таким как, например, ингибиторы HPPD, ингибиторы ALS, например примисульфурон, просульфурон и трифлорисульфурон, ингибиторы EPSPS (5-енолпировилшикимат-3-фосфатсинтазы), ингибиторы GS (глутаминсинтетазы) или ингибиторы PPO (протопорфириногенаксидазы)), в результате традиционных способов селекции или генной инженерии. Примеры маиса, которому была придана выносливость к гербицидам или классам гербицидов посредством способов генной инженерии, включают устойчивые к глифосату и глюфосинату сорта маиса, коммерчески доступные под торговыми названиями RoundupReady®, Herculex I® и LibertyLink®.

Маис также включает сорта, которые были трансформированы путем применения технологий рекомбинантных ДНК таким образом, что они стали способными синтезировать один или несколько токсинов избирательного действия, таких как известные, например, у токсинообразующих бактерий, в частности бактерий из рода *Bacillus*.

Примерами таких растений являются следующие: YieldGard® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин CryIA(b)); YieldGard Rootworm® (сорт кукурузы,

экспрессирующий токсин CryIIIВ(b1)); YieldGard Plus® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин CryIA(b) и CryIIIВ(b1)); Starlink® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин Cry9(c)); Herculex I® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин CryIF(a2) и фермент фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT) для достижения выносливости к гербициду глюфосинату аммония); Agrisure® CB Advantage (Bt11 с признаком устойчивости к мотыльку кукурузному (CB)), Agrisure® RW (с признаком устойчивости к кукурузному корневному жуку) и Protecta®.

10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
70  
75  
80  
85  
90  
95  
100  
105  
110  
115  
120  
125  
130  
135  
140  
145  
150  
155  
160  
165  
170  
175  
180  
185  
190  
195  
200  
205  
210  
215  
220  
225  
230  
235  
240  
245  
250  
255  
260  
265  
270  
275  
280  
285  
290  
295  
300  
305  
310  
315  
320  
325  
330  
335  
340  
345  
350  
355  
360  
365  
370  
375  
380  
385  
390  
395  
400  
405  
410  
415  
420  
425  
430  
435  
440  
445  
450  
455  
460  
465  
470  
475  
480  
485  
490  
495  
500  
505  
510  
515  
520  
525  
530  
535  
540  
545  
550  
555  
560  
565  
570  
575  
580  
585  
590  
595  
600  
605  
610  
615  
620  
625  
630  
635  
640  
645  
650  
655  
660  
665  
670  
675  
680  
685  
690  
695  
700  
705  
710  
715  
720  
725  
730  
735  
740  
745  
750  
755  
760  
765  
770  
775  
780  
785  
790  
795  
800  
805  
810  
815  
820  
825  
830  
835  
840  
845  
850  
855  
860  
865  
870  
875  
880  
885  
890  
895  
900  
905  
910  
915  
920  
925  
930  
935  
940  
945  
950  
955  
960  
965  
970  
975  
980  
985  
990  
995

Маис также включает сорта, которые были трансформированы путем применения технологий рекомбинантных ДНК таким образом, что они стали способными синтезировать один или несколько токсинов избирательного действия, таких как известные, например, у токсинообразующих бактерий, в частности бактерий из рода *Bacillus*.

Токсины, которые могут экспрессироваться такими трансгенными растениями, включают, например, инсектицидные белки из *Bacillus cereus* или *Bacillus popilliae*; или инсектицидные белки из *Bacillus thuringiensis*, такие как  $\delta$ -эндотоксины, например Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry1Fa2, Cry2Ab, Cry3A, Cry3Bb1 или Cry9C, или вегетативные инсектицидные белки (Vip), например Vip1, Vip2, Vip3 или Vip3A; или инсектицидные белки бактерий, колонизирующих нематод, например *Photorhabdus* spp. или *Xenorhabdus* spp., таких как *Photorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus nematophilus*; токсины, продуцируемые животными, такие как токсины скорпионов, токсины паукообразных, токсины ос и другие специфические для насекомых нейротоксины; токсины, продуцируемые грибами, такие как растительные лектины, такие как лектины гороха, лектины ячменя или лектины подснежника; агглютинины; ингибиторы протеиназы, такие как ингибиторы трипсина, ингибиторы сериновой протеазы, ингибиторы пататина, цистатина, папаина; белки, инактивирующие рибосомы (RIP), такие как рицин, RIP маиса, абрин, люффин, сапорин или бриодин; ферменты метаболизма стероидов, такие как 3-гидроксистероидоксидаза, экистероид-UDP-гликозилтрансфераза, холестериноксидазы, ингибиторы экдизона, HMG-CoA-редуктаза, блокаторы ионных каналов, такие как блокаторы натриевых или кальциевых каналов, эстераза ювенильного гормона, рецепторы диуретических гормонов, стильбенсинтаза, дибензилсинтаза, хитиназы и глюканазы.

Дополнительно, в контексте настоящего изобретения под  $\delta$ -эндотоксинами, например Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry1Fa2, Cry2Ab, Cry3A, Cry3Bb1 или Cry9C, или вегетативными инсектицидными белками (Vip), например Vip1, Vip2, Vip3 или Vip3A,

определенно следует понимать также гибридные токсины, усеченные токсины и модифицированные токсины. Гибридные токсины получают рекомбинантным способом с помощью новой комбинации различных доменов этих белков (см., например, WO 02/15701). Известны усеченные токсины, например усеченный Cry1Ab.

5 В случае модифицированных токсинов заменены одна или несколько аминокислот встречающегося в природе токсина. При таких аминокислотных заменах в токсин предпочтительно вводят не присутствующие в природном токсине последовательности, распознаваемые протеазами, как, например, в случае Cry3A055 в токсин Cry3A вводят последовательность, распознаваемую катепсином G (см. WO 03/018810).

10 Примеры таких токсинов или трансгенного маиса, способного синтезировать такие токсины, раскрыты, например, в EP-A-0374753, WO93/07278, WO95/34656, EP-A-0427529, EP-A-451878 и WO 03/052073.

Токсин, содержащийся в трансгенных растениях, придает растениям выносливость к вредным насекомым. Такие насекомые могут принадлежать к любой таксономической группе насекомых, но особенно часто встречаются среди жуков (Coleoptera), двукрылых насекомых (Diptera) и бабочек (Lepidoptera).

15 Известны трансгенные растения, содержащие один или несколько генов, которые кодируют устойчивость к насекомым и обеспечивают экспрессию одного или нескольких токсинов, и некоторые из них коммерчески доступны. Примерами таких растений являются следующие: YieldGard® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин Cry1Ab); YieldGard Rootworm® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин Cry3Bb1); YieldGard Plus® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин Cry1Ab и Cry3Bb1); Starlink® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин Cry9C); Herculex I® (сорт кукурузы, экспрессирующий токсин Cry1Fa2 и фермент фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT) для достижения выносливости к гербициду глюфосинату аммония); NatureGard® , Agrisure® GT Advantage (GA21 с признаком выносливости к глифосату), Agrisure® CB Advantage (Bt11 с признаком устойчивости к мотыльку кукурузному (CB)) и Protecta®.

20 Дополнительные примеры таких трансгенных сельскохозяйственных культур представляют собой маис Bt11 от Syngenta, маис Bt176 от Syngenta, маис MIR604 от Syngenta, маис MON 863 от Monsanto, маис 1507 от Pioneer, маис NK603 × MON 810 от Monsanto.

## **ПРИМЕРЫ**

Следующие примеры служат для иллюстрации настоящего изобретения. В примерах применяется коммерческий гидролизат белка ISABION, доступный от Syngenta Crop Protection AG. ISABION имеет технические характеристики, представленные на фигуре 1 (общий состав ISABION), 2 (аминокислотный состав ISABION) и 3 (гидролиз ISABION).

### **1. Способ**

ISABION применяли в отношении пяти разных сортов растений маиса, – ANA1416, CNA1124, AA2359, DAX3360 и ITPJ8713. ISABION применяли путем опрыскивания при 2 нормах, соответствующих 1 литру ISABION на гектар и 2 литрам ISABION на гектар с объемом опрыскивания 200 л/га, и в качестве стандарта для сравнения использовали в остальном идентичные необработанные растения маиса. Срок применения находится между стадиями V9-11 вегетативного роста. Каждое применение выполняли в трех повторностях. При цветении (выбрасывание пыльцы – стадия VT) случайным образом отбирали 5 метелок на повторность и измеряли жизнеспособность пыльцы с использованием анализатора пыльцы Amphasis Z32 с регистрацией данных как D0 (после отбора образцов в поле). Затем метелки делили на 2 модели: одну, обозначенную как "D24" – без стресса в условиях 28°C/18°C (дневная/ночная температура), 60% RH (относительная влажность) с длиной светового дня 14 часов; другую, обозначенную как "D24 STRESS" – для обработки тепловым стрессом в ростовой камере. Заданные условия теплового стресса предусматривали 40°C/26°C (дневная/ночная температура), 60% RH (относительная влажность) с длиной светового дня 14 часов. Затем измеряли жизнеспособность пыльцы кукурузы, подвергнутой воздействию при этих двух моделях.

### **2. Результаты**

Результаты четко показывают, что ISABION обеспечивает увеличение жизнеспособности пыльцы в этих тестах. Для жаровыносливой линии кукурузы ANA1416 не было отмечено существенной разницы между любыми вариантами обработки в условиях D24 и D24 STRESS (см. фигуру 4). При этом для раннего сорта – жаровыносливых линий AA2359 (фигура 5), CNA1124 (фигура 6) и DAX3360 (фигура 7) – при вариантах обработки с помощью ISABION при 1 л/га (D1) и 2 л/га (D2) был показан значительно более высокий процент жизнеспособности пыльцы по сравнению



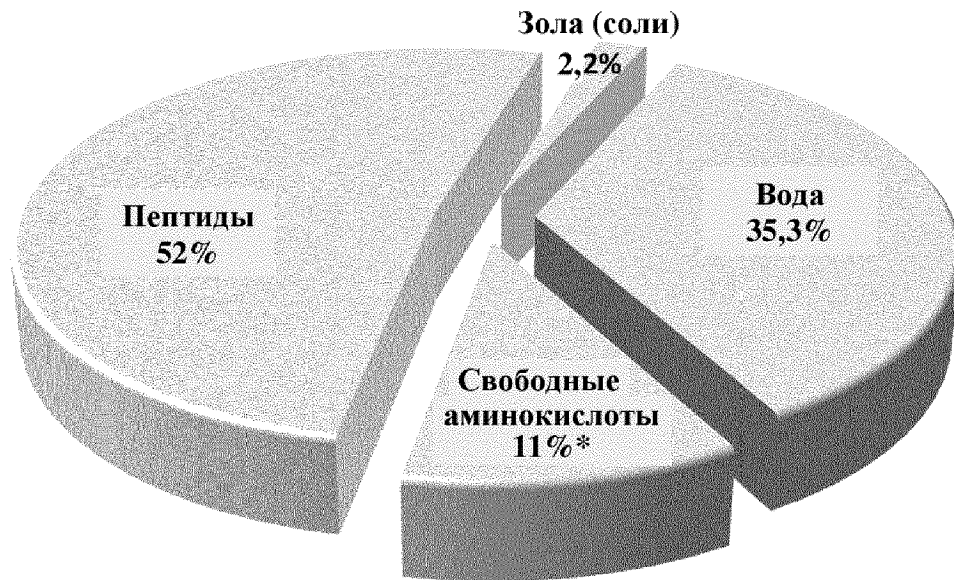
с необработанными (NT) при D24 STRESS, более низкие эффекты теплового стресса наблюдали для позднего сорта – жаровыносливой линии ITPJ8713 (фигура 8), у которой при D24 STRESS наблюдали более высокую жизнеспособность пыльцы, чем при D24 (без теплового стресса). Это может быть связано с влиянием погодных условий на поздний сорт. Тем не менее, наблюдалась тенденция к увеличению жизнеспособности пыльцы при двух вариантах обработки с помощью ISABION по сравнению с отсутствием обработки (NT).

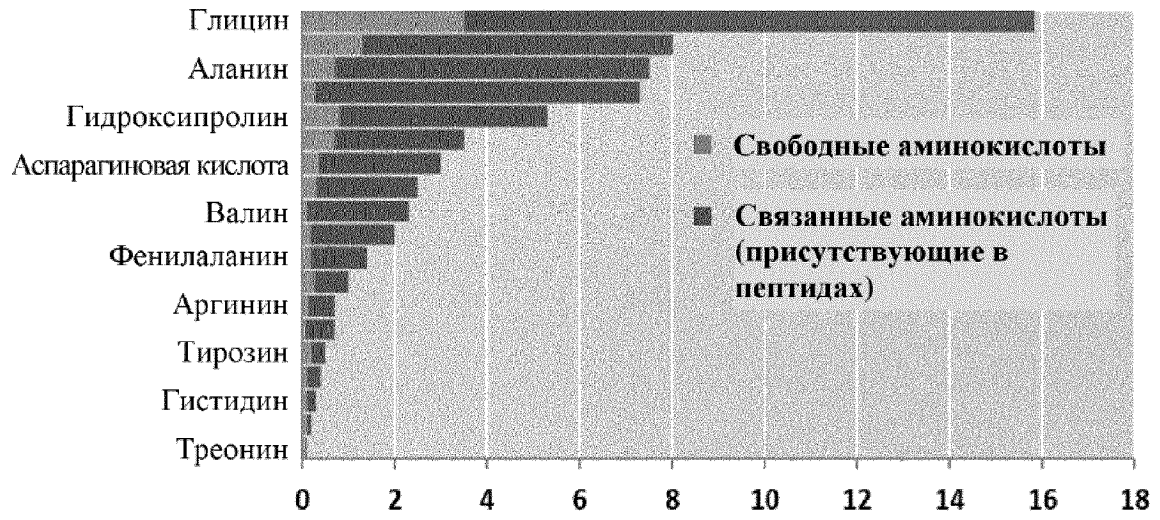
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ сохранения жизнеспособности пыльцы маиса, включающий обработку растений маиса или места произрастания, в котором растут растения маиса, гидролизатом белка.  
5
2. Способ по п. 1, который выполняют на маисе, который впоследствии подвергается тепловому стрессу.
- 10 3. Способ по п. 2, где тепловой стресс представляет собой дневную температуру выше 30°C.
4. Способ по п. 2, где тепловой стресс представляет собой ночную температуру выше 20°C.
- 15 5. Способ применения гидролизата белка в отношении растения маиса или его места произрастания с целью увеличения жизнеспособности пыльцы.
6. Способ по п. 5, который выполняют с целью увеличения жизнеспособности пыльцы при тепловом стрессе.  
20
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где гидролизат белка применяют в отношении растений маиса или места произрастания, в котором растут растения маиса, во время вегетативной стадии роста.
- 25 8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где гидролизат белка получен из животного источника.
9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где гидролизат белка представляет собой ISABION.  
30
10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где гидролизат белка применяют при норме от 0,5 до 5 литров на гектар.

11. Применение гидролизата белка для сохранения жизнеспособности пыльцы маиса.

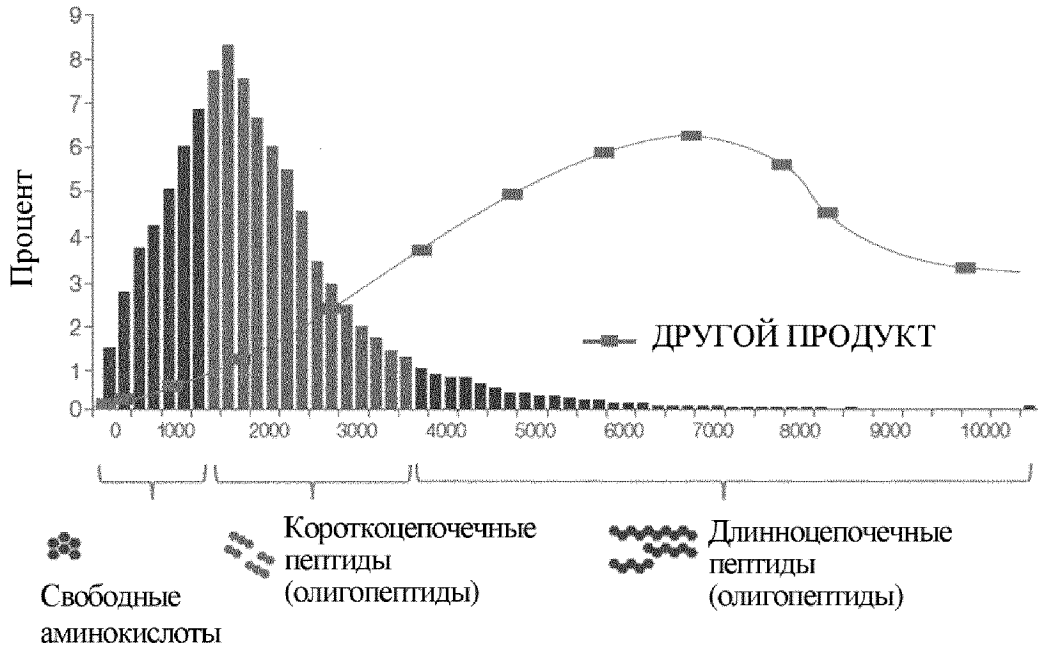
**Фигура 1. Общий состав ISABION**

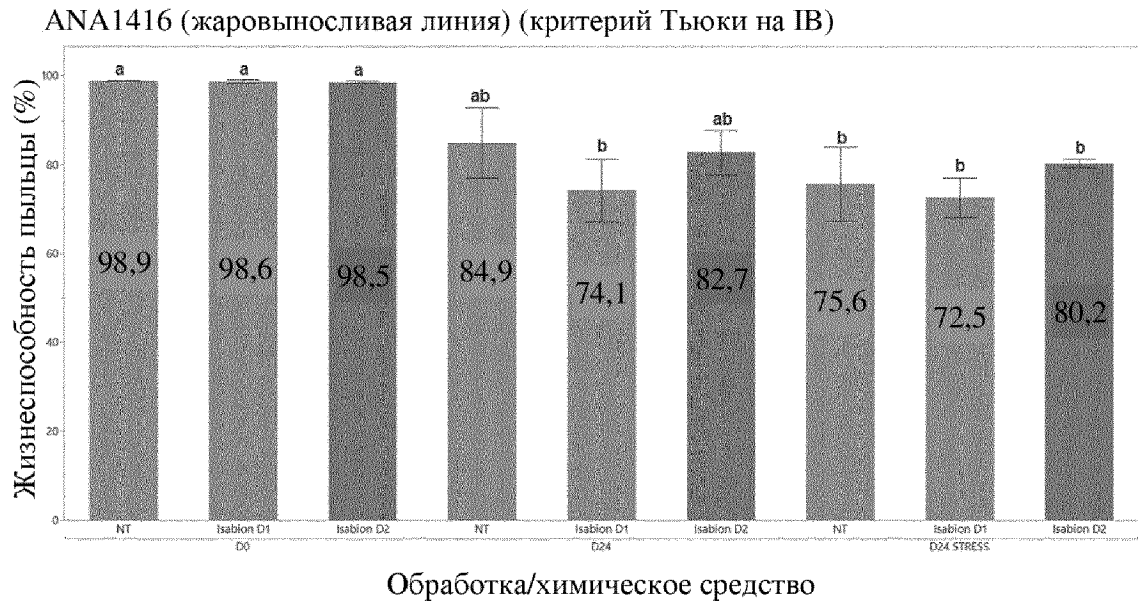


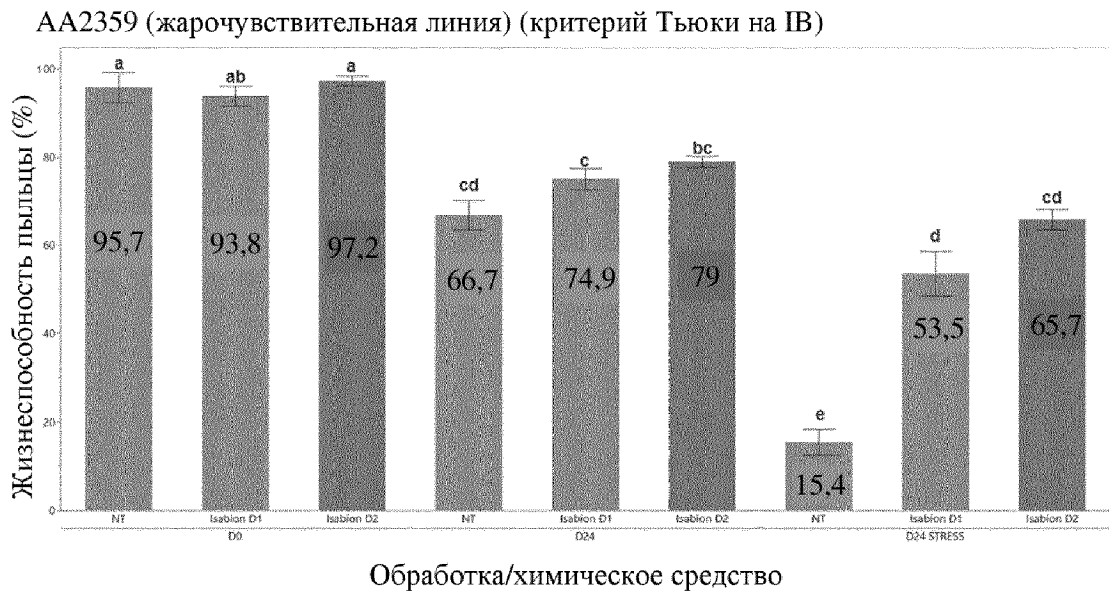
**Фигура 2. Аминокислотный состав ISABION**

### Фигура 3. Гидролиз ISABION

Степень гидролиза



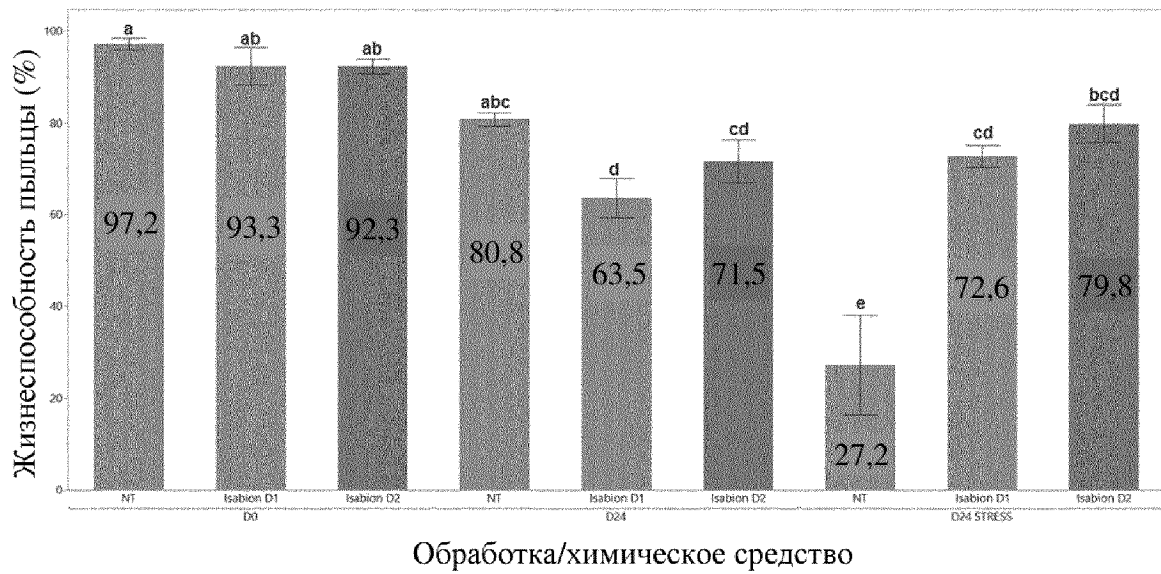
**Фигура 4. ANA1416 (жаровыносливая линия), критерий Тьюки на IV**

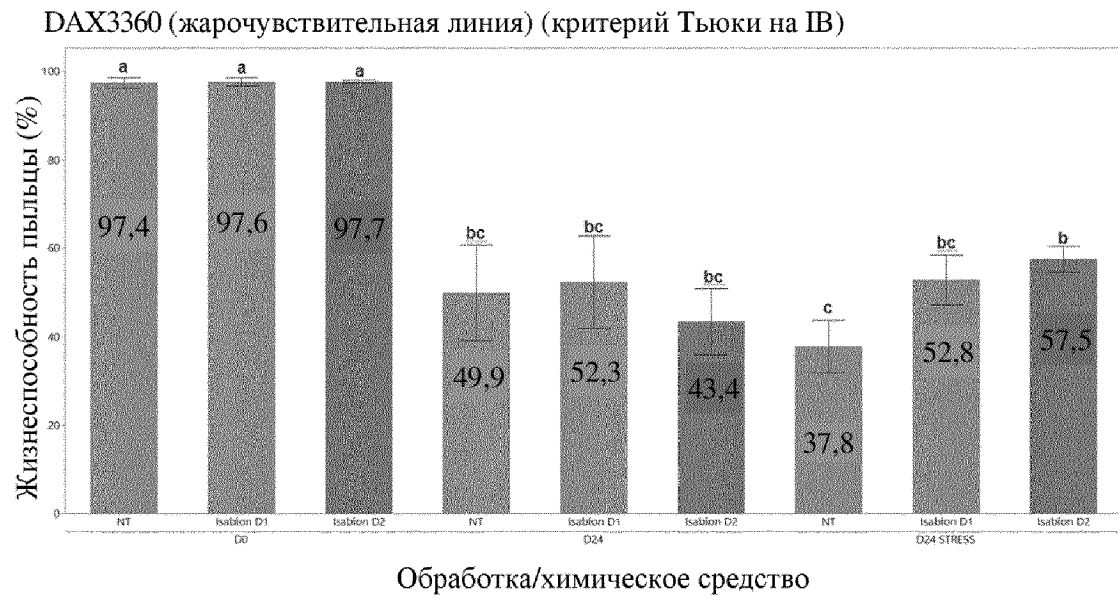
**Фигура 5. AA2359 (жарочувствительная линия), критерий Тьюки на IV**



**Фигура 6. CNA1124 (жарочувствительная линия), критерий Тьюки на IV**

CNA1124 (жарочувствительная линия) (критерий Тьюки на IV)



**Фигура 7. DAX3360 (жарочувствительная линия), критерий Тьюки на IV**

**Фигура 8. ГТРJ8713 (жарочувствительная линия), критерий Тьюки на IV**