

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **029356**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.03.30

(21) Номер заявки
201390842

(22) Дата подачи заявки
2011.12.15

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)

(54) РАСТЕНИЯ С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДАМ

(31) 61/423604

(32) 2010.12.16

(33) US

(43) 2013.12.30

(86) PCT/IB2011/055701

(87) WO 2012/080975 2012.06.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАСФ АГРО Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Хутцлер Ёханнес, Апонгэ Рафаель,
Митцнер Томас, Витшель Маттиас,
Зимон Анья, Лерхль Енс, Треш
Штефан (DE), Мэнкин С. Люк (US)**

(74) Представитель:
Беляева Е.Н. (BY)

(56) WO-A1-9732011
PATZOLDT W.L. et al. A codon
deletion confers resistance to herbicides inhibiting
protoporphyrinogen oxidase. PNAS. 15 Aug.2006,
vol. 103, № 5, p. 12329-12334

WO-A1-0112815

CN-A-1036571

JUNG H.I. et al. Resistance mechanisms in
protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-
resistant transgenic rice. Journal of Plant Biology. Oct.
2007, vol. 50, № 5, p. 586-594

LI X.G. et al. Development of
protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection
marker for Agrobacterium tumefaciens-mediated
transformation of maize. Plant Physiology. Oct. 2003,
vol. 133, p. 736-747

HUANG M.Z. et al. Synthesis and
herbicidal activity of isoindoline-1,3-dione substituted
benzoxazinone derivatives containing a carboxylic
ester group. J. Agric. Food Chem. 2009, vol. 57, № 20,
p. 9585-9592

(57) Настоящее изобретение касается способа борьбы с нежелательной растительностью на месте произрастания растений, при этом способ включает этапы предоставления на указанном месте растения, которое содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую протопорфириноген оксидазу (PPO) дикого типа или мутированную, которая является стойкой или устойчивой к гербициду - производному бензоксазинона, путем нанесения на указанное место эффективного количества указанного гербицида. Изобретение далее касается растений, содержащих ферменты PPO дикого типа или мутированные, и способов получения таких растений.

B1

029356

029356 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится, в целом, к способам, позволяющим повысить устойчивость сельскохозяйственных культур к гербициду. В частности, изобретение относится к растениям с повышенной устойчивостью к гербицидам - производным бензоксазинона. В частности, настоящее изобретение относится к способам и растениям, полученным мутагенезом, кроссбридингом и трансформацией, которые имеют повышенную устойчивость к гербицидам - производным бензоксазинона.

Предпосылки к созданию изобретения

Гербициды, которые ингибируют протопорфириноген оксидазу (здесь и далее - Protox или PPO; EC: 1.3.3.4), главный фермент в биосинтезе протопорфирина IX, используют для селективной борьбы с сорняками с 1960-х годов. PPO катализирует конечную общую стадию биосинтеза гема и хлорофилла, которая представляет собой окисление протопорфириногена IX в протопорфирин IX (Matringe et al., 1989. *Biochem. J.* 260: 231). Гербициды-ингибиторы PPO включают множество различных структурных классов 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 соединения из группы дифенилэфиров {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)}, оксидазолы, (например, оксидазон, 3-{2,4-дихлорхлор-5-(1-метилэтоксифенил)-5-(1,1-диметилэтил)-1,3,4-оксидиазол-2-(3H)-он}, циклические имиды (например, S-23142, N-(4-хлор-2-фтор-5-пропаргилоксифенил)-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&B 39279), производные пиридина (например, LS 82-556), и фенопилат, а также О-фенилпирролидин- и пиперидинкарбаматные аналоги фенопилата. Многие из этих соединений конкурентно ингибируют обычную реакцию, катализируемую ферментом, выступая в качестве аналогов субстрата.

Применение гербицидов-ингибиторов PPO приводит к накоплению протопорфириногена IX в хлоропласте и митохондриях, причем считается, что он затем попадает в цитозоль, где окисляется пероксидазой. При воздействии на него светом протопорфирин IX приводит к образованию в цитозоле синглетного кислорода, а также к образованию других активных форм кислорода, что может вызвать перекисное окисление липидов и разрушение мембраны, и это может привести к быстрой гибели клеток (Lee et al., 1993. *Plant Physiol.* 102: 881).

Не все ферменты PPO являются чувствительными к гербицидам, ингибирующим растительные ферменты PPO. Ферменты PPO *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* (Sasarmen et al., 1993. *Can. J. Microbiol.* 39: 1155; Dailey et al., 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 813) являются устойчивыми к этим ингибиторам-гербицидам. Также из литературы известны мутанты одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, устойчивые к такому гербициду фенилимиду S-23142 (Kataoka et al., 1990. *J. Pesticide Sci.* 15: 449; Shibata et al. 1992. *In Research in Photosynthesis*, том III, N. Murata, ed. Kluwer: Netherlands, стр. 567-70). По-видимому, по меньшей мере один из этих мутантов обладает измененной активностью PPO, с устойчивостью не только к гербицидному ингибитору, в отношении которого производилась селекция этого мутанта, но также к другим классам ингибиторов протопорфириноген оксидазы (Oshio et al. 1993. *Z. Naturforsch.* 48c: 339; Sato et al., 1994. *In ACS Symposium on Porphyrin Pesticides*, S. Duke, ed. ACS Press: Washington, D.C.). Также из литературы известна линия клеток-мутантов табака, устойчивая к ингибитору S-21432 (Che et al., 1993. *Z. Naturforsch.* 48c: 350). Ауксотрофные мутанты *E. coli* используют для того, чтобы придать ферментам PPO клонированного растения устойчивость к гербицидам.

Существуют три основные стратегии повышения устойчивости растений к гербицидам, а именно: (1) детоксификация гербицида ферментами, которые трансформируют гербицид или его активный метаболит в нетоксичные продукты, такими как, например, ферменты для повышения устойчивости к бромксинилу или баста (EP 242236, EP 337899); (2) мутация целевого фермента в функциональный фермент, который будет менее чувствителен к гербицидам или его активному метаболиту, например, ферменты для повышения устойчивости к глифосату (EP 293356, Padgett S.R. et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 33, 1991); или (3) сверхэкспрессия чувствительного фермента для получения достаточного количества целевого фермента в растении относительно гербицида с точки зрения кинетических констант этого фермента, чтобы получить достаточное количество функционального фермента, несмотря на присутствие его ингибитора. Сообщается о положительных результатах третьей стратегии, в результате которой были получены растения с устойчивостью к ингибиторам PPO (см., например, патенты US 5767373 или US 5939602, и другие члены семейства патентов-аналогов). Кроме того, в патентах US 2010/0100988 и WO 2007/024739 описаны нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности с ферментной активностью, которая приводит к устойчивости аминокислотных последовательностей к гербицидным химикатам, ингибиторам PPO, в частности PPO-мутанты, специфические к ингибиторам группы 3-фенилурацила.

Однако в известном уровне техники не описаны растения, устойчивые к гербицидам - производным бензоксазинона, содержащие по меньшей мере одну PPO нуклеиновую кислоту дикого типа или мутиро-

вавшую РРО нуклеиновую кислоту. Также в известном уровне техники не описаны сельскохозяйственные культуры, устойчивые к гербицидам - производным бензоксазинона, содержащие мутации геномов, за исключением генома, из которого был получен РРО-ген. Таким образом, для научных целей необходимо определить гены, устойчивые к гербицидам - производным бензоксазинона, в дополнительных геномах и видах. Также для научных целей необходимы сельскохозяйственные культуры и сельскохозяйственные культуры с повышенной устойчивостью к гербицидам, таким как гербициды - производные бензоксазинона и гербициды, содержащие по меньшей мере одну РРО нуклеиновую кислоту дикого типа и/или мутировавшую РРО нуклеиновую кислоту. Также необходимы способы контроля роста сорняков среди сельскохозяйственных культур или сельскохозяйственных культур. Данные композиции и способы позволят использовать опрыскивание вместо техники при применении гербицидов на территории, где растут сельскохозяйственные культуры, или к самим сельскохозяйственным культурам.

Краткое изложение сущности изобретения

Данная проблема решается с помощью данного изобретения, которое относится к способу борьбы с нежелательной растительностью на месте произрастания растения, при этом способ включает следующие этапы:

а) предоставление на указанном месте растения, которое содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую протопорфириноген оксидазу (РРО) дикого типа или мутированную протопорфириноген оксидазу (мут-РРО), которая является стойкой или устойчивой к гербициду - производному бензоксазинона и/или

б) нанесение на указанное место эффективного количества указанного гербицида.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу определения гербицида - производного бензоксазинона с использованием РРО дикого типа или мут-РРО, кодирующей нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45 или ее вариант.

Данный способ включает следующие этапы:

а) образование трансгенной клетки или растения, содержащего мут-РРО-кодирующую нуклеиновую кислоту, где мут-РРО экспрессирована;

б) нанесение производного бензоксазинона на трансгенную клетку или растение пункта а) и на контрольную клетку или растение того же сорта;

с) определение роста или жизнеспособности трансгенной клетки или растения и контрольной клетки или растения после нанесения указанного испытуемого соединения, и

д) отбор испытуемых соединений, которые придают уменьшенный рост контрольной клетке или растению по сравнению с ростом трансгенной клетки или растения.

Другая задача настоящего изобретения относится к способу идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мут-РРО, которая является стойкой или устойчивой к гербициду - производному бензоксазинона, при этом способ включает следующие этапы:

а) создание библиотеки мут-РРО-кодирующих нуклеиновых кислот,

б) скрининг популяции полученных мут-РРО-кодирующих нуклеиновых кислот путем экспрессии каждой из указанных нуклеиновых кислот в клетке или растении и обработки указанной клетки или растения гербицидом - производным бензоксазинона,

с) сравнение уровней устойчивости к производному бензоксазинона, предоставляемых указанной популяцией мут-РРО-кодирующих нуклеиновых кислот с уровнем устойчивости к гербициду - производному бензоксазинона, предоставляемым контрольной РРО-кодирующей нуклеиновой кислотой,

д) отбор по меньшей мере одной мут-РРО-кодирующей нуклеиновой кислоты, которая предоставляет значительно повышенный уровень устойчивости к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с уровнем, предоставляемым контрольной РРО-кодирующей нуклеиновой кислотой.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мут-РРО-кодирующая нуклеиновая кислота, отобранная на этапе д), показывает устойчивость к гербициду - производному бензоксазинона выше по меньшей мере в два раза по сравнению с устойчивостью контрольной мут-РРО-кодирующей нуклеиновой кислоты.

Стойкость или устойчивость может быть определена путем получения трансгенного растения с последовательностью нуклеиновой кислоты из библиотеки на этапе а) и путем сравнения этого трансгенного растения с контрольным растением.

Другая задача настоящего изобретения относится к способу идентификации растения или водоросли, которые содержат мут-РРО-кодирующую нуклеиновую кислоту, которая является стойкой или устойчивой к гербициду - производному бензоксазинона, при этом способ включает следующие этапы:

а) определение эффективного количества гербицида - производного бензоксазинона в культуре клеток растения или зеленой водоросли.

б) обработка указанных клеток растения или зеленой водоросли мутирующим агентом,

с) воздействие на указанные мутировавшие клеточные популяции эффективным количеством гербицида - производного бензоксазинона, определенным на этапе а),

д) отбор по меньшей мере одной клетки, выжившей после этих испытаний,

е) ПЦР-амплификация и секвенирование РРО генов из клеток, отобранных на этапе d), и сравнение этих последовательностей с генными последовательностями РРО дикого типа соответственно.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мутирующим агентом является этилметансульфонат.

Другая задача изобретения относится к изолированной мут-РРО-кодирующей нуклеиновой кислоте, при этом нуклеиновая кислота может быть идентифицирована описанным выше способом.

В еще одном варианте осуществления, изобретение относится к клетке растения, трансформированной нуклеиновой кислотой РРО дикого типа или мут-РРО нуклеиновой кислотой, или растению, которое подвергли мутации для получения растения с экспрессией, предпочтительно со сверхэкспрессией нуклеиновой кислоты РРО дикого типа или мут-РРО нуклеиновой кислоты, причем экспрессия нуклеиновой кислоты в клетке растения приводит к повышению стойкости или устойчивости к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с клеткой растения дикого типа.

В еще одном варианте осуществления, изобретение относится к растению с клеткой растения в соответствии с настоящим изобретением, в котором экспрессия нуклеиновой кислоты приводит к повышению стойкости растения к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с растением дикого типа.

Растения, описанные в настоящем изобретении, могут быть трансгенными или нетрансгенными.

Предпочтительно экспрессия нуклеиновой кислоты в растении приводит к повышению стойкости растения к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с растением дикого типа.

В другом варианте осуществления, изобретение относится к семеню, полученному из трансгенного растения, содержащего клетку растения по настоящему изобретению, в котором семя является чистосортным для повышения стойкости растения к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с семенем дикого типа.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения клетки трансгенного растения с повышенной стойкостью к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с клеткой растения дикого типа, включая трансформирование клетки растения кассетой экспрессии с нуклеиновой кислотой РРО дикого типа или мут-РРО нуклеиновой кислотой.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения трансгенного растения, включающему: (а) трансформирование клетки растения кассетой экспрессии, содержащей нуклеиновую кислоту РРО дикого типа или мут-РРО нуклеиновую кислоту, (b) получение растения с повышенной стойкостью к гербициду - производному бензоксазинона из клетки растения.

Предпочтительно кассета экспрессии далее содержит регуляторный участок инициации транскрипции и регуляторный участок инициации трансляции, которые являются функциональными в растении.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к использованию мут-РРО по изобретению в качестве маркера отбора. Изобретение предоставляет способ идентификации или отбора трансформированной клетки растения, ткани растения, растения или его части, включающий а) предоставленные трансформированной клетки растения, ткани растения, растения или его части, в которых указанные клетки растения, ткани растения, растения или его части содержат изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид мут-РРО по изобретению, как описано ниже по тексту, при этом полипептид используют в качестве маркера отбора, и в которых указанные трансформированные клетки растения, ткани растения, растения или его части могут, при необходимости, содержать другую целевую изолированную нуклеиновую кислоту; б) соединение трансформированной клетки растения, ткани растения, растения или его части по меньшей мере с одним соединением, ингибирующим производное бензоксазинона; в) определение воздействия на клетку растения, ткань растения, растение или его часть ингибитора или ингибирующего соединения; d) идентификация или отбор трансформированной клетки растения, ткани растения, растения или его части.

Изобретение также реализуется в очищенных белках мут-РРО, содержащих описанные в настоящем документе мутации, которые могут использоваться в молекулярном моделировании для дальнейших улучшений, связанных с устойчивостью к гербицидам. Способы очищения белков хорошо известны и могут быть легко реализованы с использованием доступных с научной точки зрения продуктов или специальных способов, как описано, например, в Protein Biotechnology, Walsh and Headon (Wiley, 1994).

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано выравнивание аминокислотных последовательностей РРО *Amaranthus tuberculatus* (*A.tuberculatus*), *Amaranthus tuberculatus*, с устойчивостью (*A.tuberculatus_R*), *Arabidopsis thaliana*, длинная (*A.thaliana_2*), *Spinacia oleracea*, короткая (*S.oleracea_2*), *Nicotiana tabacum*, короткая (*N.tabacum_2*), *Glycine max* (*Glycine_max*), *Arabidopsis thaliana*, короткая (*A.thaliana_1*), *Nicotiana tabacum*, длинная (*N.tabacum_1*), *Chlamydomonas reinhardtii*, длинная (*C.reinhardtii_1*), *Zea mays* (*Z.mays*), *Oryza sativa* (*O.sativa_1*), *Solanum tuberosum* (*S.tuberosum*), *Cucumis sativus* (*C.sativus*), *Cichorium intybus* (*C.intybus_1*), *Spinacia oleracea*, длинная (*S.oleracea_1*), *Polytomella* sp. Pringsheim 198.80 (*Polytomella*). Консервативные области отмечены светло-серым, серым и черным цветами.

На фиг. 2 показан отбор штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*, стойких к гербициду - производному бензоксазинона 1.a.35. (A) Мутировавшие клетки, высеянные на плотную среду без селективного агента.

(В) Мутировавшие клетки, высеянные на плотную среду, содержащую 1×10^{-7} М производного бензоксазинона I.a.35. Клетки, являющиеся устойчивыми к гербициду - производному бензоксазинона, образуют колонии (обведены в кружки, под номерами 33, 34, 35 и 36), в то время как восприимчивые к гербициду клетки прекращают расти. Более высокое количество колоний в чашке А по сравнению с В указывает на то, что колонии в чашке В являются устойчивыми к производному бензоксазинона I.a.35.

На фиг. 3 показано возобновление роста выбранных штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*, показанных на фиг. 2, стойких к гербициду - производному бензоксазинона I.a.35. (А) Клетки дикого типа, высеянные на жидкую среду без селективного агента. (В) Клетки дикого типа в жидкой среде, содержащей повышенное количество производного бензоксазинона I.a.35 (в диапазоне 1×10^{-9} - 5×10^{-6} моль). (С) Мутировавшие клетки, высеянные на жидкую среду без селективного агента. (D1, D2, E1, E2) Мутировавшие и выбранные штаммы в жидкой среде, содержащей повышенное количество производного бензоксазинона I.a.35 (в диапазоне $\times 10^{-9}$ - 5×10^{-6} моль). Штаммы, устойчивые к гербициду - производному бензоксазинона I.a.35, развиваются и становятся более темного цвета, что указывает на их рост. Штаммы, подверженные воздействию гербицида, не развиваются и сохраняют светлый цвет. Более темный цвет обусловлен более высокой плотностью растущих клеток в жидкой среде. Культуры с более низкой плотностью имеют более светлый цвет или полностью прозрачны.

Перечень последовательностей

Таблица 1

SEQ ID NO:	Описание	Организм	Ген	Номер доступа
1	PPO нуклеиновая кислота	Amaranthus	PPX2L_WC	DQ386114
2	PPO аминокислота	Amaranthus		ABD52326
3	PPO нуклеиновая кислота	Amaranthus	PPX2L_AC	DQ386117
4	PPO аминокислота	Amaranthus		ABD52329
5	PPO нуклеиновая кислота	Amaranthus	PPX2L_CC_R	DQ386118
6	PPO аминокислота	Amaranthus		ABD52330
7	PPO нуклеиновая кислота	Amaranthus	PPX2L_AC_R	DQ386116
8	PPO аминокислота	Amaranthus		ABD52328
9	PPO нуклеиновая кислота	Arabidopsis	PPX	AB007650
10	PPO аминокислота	Arabidopsis		BAB08301
11	PPO нуклеиновая кислота	Nicotiana	ppxI	AF044128
12	PPO аминокислота	Nicotiana		AAD02290
13	PPO нуклеиновая кислота	Cichorium	PPX1	AF160961
14	PPO аминокислота	Cichorium		AF160961_1
15	PPO нуклеиновая кислота	Spinacia	SO-POX1	AB029492
16	PPO аминокислота	Spinacia		BAA96808
17	PPO нуклеиновая кислота	Spinacia	SO-POX2	AB046993
18	PPO аминокислота	Spinacia		BAB60710
19	PPO нуклеиновая кислота	Solanum	PPOX	AJ225107
20	PPO аминокислота	Solanum		CAA12400
21	PPO нуклеиновая кислота	Zea	ZM_BFc0091B03	BT063659
22	PPO аминокислота	Zea		ACN28356
23	PPO нуклеиновая кислота	Zea	ppo2	NM_001111534
24	PPO аминокислота	Zea		NP_001105004
25	PPO нуклеиновая кислота	Chlamydomonas	Ppx1	AF068635
26	PPO аминокислота	Chlamydomonas		AAC79685
27	PPO нуклеиновая кислота	Polytomella	PPO	AF332964
28	PPO аминокислота	Polytomella		AF332964_1
29	PPO нуклеиновая кислота	Sorghum	Hyp. Protein	XM_002446665
30	PPO аминокислота	Sorghum		XP_002446710
31	PPO нуклеиновая кислота	Chlorella		
32	PPO аминокислота	Chlorella		51538
33	PPO нуклеиновая кислота	Oryza	PPOX1	AB057771
34	PPO аминокислота	Oryza		BAB39760
35	PPO нуклеиновая кислота	Amaranthus	PPX2	DQ386113
36	PPO аминокислота	Amaranthus		ABD52325
37	PPO нуклеиновая кислота	Arabidopsis	PPOX	NM_178952
38	PPO аминокислота	Arabidopsis		NP_849283
39	PPO нуклеиновая кислота	Nicotiana	ppxII	AF044129
40	PPO аминокислота	Nicotiana		AAD02291
41	PPO нуклеиновая кислота	Glycine	hemG	AB025102
42	PPO аминокислота	Glycine		BAA76348
43	PPO нуклеиновая кислота	Cucumis	CsPPO	AB512426
44	PPO аминокислота	Cucumis		BAH84864.1
45	PPO нуклеиновая кислота	Oryza	Hyp. Protein	AL606613
46	PPO аминокислота	Oryza		CAE01661

Подробное описание изобретения

Неопределенные артикли, используемые в настоящем изобретении, относятся к одному или более (т.е. по меньшей мере одному) грамматическому объекту артикля. Например, неопределенный артикль со словом "элемент" означает один или более элементов.

Согласно использованию в настоящем изобретении слово "содержание" или его вариации, такие как "содержит" или "содержащий" подразумевает включение указанного элемента, целого числа или этапа или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение какого либо другого элемента, целого числа или этапа или группы элементов, целых чисел или этапов.

Настоящее изобретение относится к способу борьбы с нежелательной растительностью на месте произрастания растения, при этом способ включает следующие этапы:

а) предоставление на указанном месте растения, которое содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую протопорфириноген оксидазу дикого типа или мутированную протопорфириноген оксидазу (мут-РРО), которая является стойкой или устойчивой к гербициду - производному бензоксазина,она,

б) нанесение на указанное место эффективного количества указанного гербицида.

Понятие "борьба с нежелательной растительностью" подразумевает уничтожение сорняков и/или замедление или препятствование их нормальному росту. Сорняки, в широком смысле, понимают как все растения, растущие там, где это нежелательно. Сорняки настоящего изобретения включают, например, двудольные и однодольные сорняки. Двудольные сорняки включают, но не ограничиваются ими, сорняки следующих сортов:

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 следующих сортов: 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.

Кроме того, сорняки настоящего изобретения могут включать, например, сельскохозяйственные культуры, произрастающие в нежелательном месте. Например, произвольно растущая кукуруза на поле, где главным образом растет соя, может считаться сорняком, если она там нежелательна.

Понятие "растение" используется в широком смысле, так как оно подразумевает органический материал и эукариотические организмы, принадлежащие Царству растений, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, сосудистые растения, овощи, хлебные злаки, цветы, деревья, травы, кусты, дерн, виноградную лозу, папоротник, мох, грибы и водоросли и т.д., а также клоны, отростки и части растений, используемые для вегетативного размножения (например, побеги, стебли, побеги, корневище, подземные корни, комки, венчики, луковицы, клубнелуковицы, клубни, растения/ткани, полученные при культивировании ткани и т.д.). Понятие "растение" также обозначает целое растение, предков и потомство растений и их частей, включая семена, побеги, стебли, листья, корни (включая клубни), цветки, соцветия, плоды, цветоножки, плодоножки, тычинку, пыльник, рыльце, завязь, чашелистик, плодолистик, корневой кончик, корневой чехлик, корневой волосок, листовой волосок, растительное волокно, пыльцевое зерно, микроспоры, семядолю, гипокотиль, эпикотиль, ксилему, флоэму, паренхиму, эндосперму, клетку-спутник, замыкающую клетку и другие известные органы, ткани и клетки растения, и ткани и органы, где каждый из вышеперечисленного содержит интересующий ген/нуклеиновую кислоту. Понятие "растение" также включает клетки растений, суспензионные культуры, ткань каллюсов, эмбрионы, меристемные области, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры, где каждый из вышеперечисленного содержит интересующий ген/нуклеиновую кислоту.

Растения, особенно пригодные для способов данного изобретения, включают все растения, которые относятся к суперсемейству *Viridiplantae*, в частности, однодольные и двудольные растения, включая кормовые растения или кормовые бобовые культуры, декоративные растения, продовольственные культуры, деревья или кустарники, выбранные из списка, помимо прочего, включающего

Acer spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (например, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* spp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (например, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [канола, масличный рапс, репа масличная]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (например, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (например, *Glycine max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (например, *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (например, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (например, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (например, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (например, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* или *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaui*, *Triticum* spp. (например, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* или *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp.,

щирца, артишок посевной, спаржа, брокколи, брюссельская капуста, капуста, канола, морковь, цветная капуста, сельдерей, листовая капуста, лен, капуста кормовая, чечевица, масличная культура, окра, лук, картофель, рис, соя, клубника, сахарная свекла, сахарный тростник, подсолнечник, томат, тыква, чай и морская водоросль. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения растение является сельскохозяйственной культурой. Примеры сельскохозяйственных культур включают сою, подсолнечник, канолу, люцерну, семена рапса, хлопок, томат, картофель обыкновенный или табак. Более предпочтительно растение является однодольным растением, таким как сахарный тростник. Более предпочтительно растение является зерновой культурой, такой как рис, кукуруза, пшеница, ячмень, просо, рожь, сорго или овес.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения растение предварительно было получено в процессе, включающем рекомбинантную подготовку растения путем введения и сверхэкспрессии трансгена РРО дикого типа или трансгена мут-РРО, что описано более подробно далее.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, растение предварительно было получено в процессе, включающем мутагенез клеток растения *in situ* для получения клеток растения, которые экспрессируют мут-РРО.

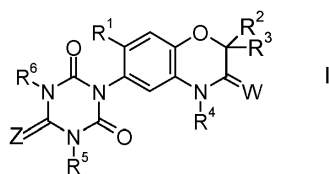
Как описано в настоящем документе, нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут использоваться для повышения устойчивости к гербицидам растений, включающих в своих геномах ген, кодирующий белок РРО дикого типа или белок мут-РРО, устойчивый к гербицидам. Согласно настоящему изобретению этот ген может быть эндогенным или трансгенным. Также в некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно сгруппировать с помощью любой комбинации интересующих полинуклеотидных последовательностей для создания растений с желаемым фенотипом. Например, нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно сгруппировать с помощью любых других полинуклеотидов, кодирующих полипептиды с пестицидной и/или инсектицидной активностью, таких как, например, токсинные белки *Bacillus thuringiensis* (описано в патентах США № 5366892; 5747450; 5737514; 5723756; 5593881; и Geiser et al. (1986) *Gene* 48: 109). Полученные комбинации могут также включать множественные копии любого из интересующих полинуклеотидов.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, растение содержит по меньшей мере одну дополнительную гетерологичную нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент устойчивости к гербициду, выбранный, например, из группы, включающей 5-энолпирувиллицимат-3-фосфат синтазу (EPSPS), глифосат ацетилтрансферазу (GAT), цитохром P450, фосфинотрицин ацетилтрансферазу (PAT), ацетогидроксиацид-синтазу (AHAS; EC 4.1.3.18, также известную как ацетолактат синтаза или ALS), гидроксифенилпируват диоксигеназу (HPPD), фитоин-десатуразу (PD) и дикамба-разрушающие ферменты, описанные в WO 02/068607, или ферменты, разрушающие производные феноксиуксусной кислоты или феноксипропионовой кислоты, как описано в WO 2008141154 или WO 2005107437.

В целом, под понятием "гербицид" в настоящем изобретении подразумевается ингредиент, который уничтожает, контролирует или каким-либо способом препятствует росту растения. 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. Также эффективное количество гербицида означает количество, которое обычно используется в системах сельскохозяйственного производства для уничтожения интересующих сорняков. Специалистам хорошо известно такое количество. Гербициды - производные бензоксазинона - проявляют свою активность при непосредственном нанесении на растение или на место прорастания растения на любом этапе роста или до его насаждения или прорастания. 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.д., а также количества используемых химических веществ. Эти и другие факторы можно регулировать способом, известным специалистам, чтобы вызвать селективную или неселективную активность гербицидов. В целом, предпочтительно для получения максимального контроля над сорняками использовать гербицид - производное бензоксазинона после того, как нежелательные растения только что взойшли.

Под растениями, "устойчивыми к гербициду" или "стойкими к гербициду", подразумевается то, что эти растения устойчивы или стойки, по меньшей мере, к одному гербициду, который в данном количестве обычно уничтожает обычные или дикие растения или препятствует их росту. Под "мут-РРО белком, устойчивым к гербициду" или "мут-РРО белком, стойким к гербициду" подразумевается такой мут-РРО белок, который проявляет большую РРО-активность по сравнению с РРО-активностью мут-РРО белка дикого типа в присутствии по меньшей мере одного гербицида, который обычно влияет на активность РРО, и при концентрации или уровне гербицида, которые обычно препятствуют активности РРО белка мут-РРО дикого типа. Более того, активность РРО такого белка мут-РРО, устойчивого или стойкого к гербициду, можно назвать активностью РРО, "устойчивой к гербициду" или "стойкой к гербициду".

"Гербициды - производные бензоксазинона" настоящего изобретения включают бензоксазины формулы I в соответствии со следующим описанием:



где

R¹ означает водород или галоген;

R² означает галоген;

R³ означает водород или галоген;

R⁴ означает водород, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галогеналкил, C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-алкенил, C₃-C₆-галоалкенил, C₃-C₆-алкинил, C₃-C₆-галоалкинил, C₁-C₆-алкокси или C₃-C₆-циклоалкил-C₁-C₆-алкил;

R⁵ означает водород, NH₂, C₁-C₆-алкил или C₃-C₆-алкинил;

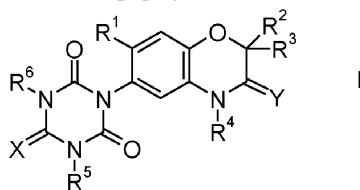
R⁶ означает водород или C₁-C₆-алкил; и

W означает O или S;

Z означает O или S;

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения "гербициды - производные бензоксазиона" настоящего изобретения включают бензоксазионы формулы I в соответствии со следующим описанием:

А) по меньшей мере один бензоксазион формулы I



где

R¹ означает водород или галоген;

R² означает галоген;

R³ означает водород или галоген;

R⁴ означает водород, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галогеналкил, C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-алкенил, C₃-C₆-галоалкенил, C₃-C₆-алкинил, C₃-C₆-галоалкинил, C₁-C₆-алкокси или C₃-C₆-циклоалкил-C₁-C₆-алкил;

R⁵ означает водород, NH₂, C₁-C₆-алкил или C₃-C₆-алкинил;

R⁶ означает водород или C₁-C₆-алкил; и

X означает O или S;

Y означает O или S;

и, по меньшей мере, другое активное соединение, выбранное из:

В) гербициды класса b1) - b15):

b1) ингибиторы биосинтеза липидов;

b2) ингибиторы ацетолактат синтазы (ингибиторы ALS);

b3) ингибиторы фотосинтеза;

b4) ингибиторы протопорфириноген-IX оксидазы,

b5) отбеливающие гербициды;

b6) ингибиторы энолпирувилшикимат 3-фосфат-синтазы (ингибиторы EPSP);

b7) ингибиторы глутаминсинтазы;

b8) ингибиторы 7,8-дигидроптероатсинтазы (ингибиторы DHP);

b9) ингибиторы митоза;

b10) ингибиторы синтеза очень длинноцепочных жирных кислот (VLCFA ингибиторы);

b11) ингибиторы биосинтеза целлюлозы;

b12) разобшающие гербициды;

b13) ауксиновые гербициды;

b14) ингибиторы транспорта ауксинов; и

b15) другие гербициды, выбранные из группы, включающей бромобутид, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, цинметилин, кумилурон, далапон, дазомет, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, диметипин, DSMA (ДНАМ, дунатриевый арсенат метила), димрон, эндотал и его соли, этобензанид, флампроп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-М-изопропил, флампроп-М-метил, флуренол, флуренол-бутил, флупримидол, фосамин, фосамин-аммоний, инданофан, индазифлам, гидразид малеиновой кислоты, мефлуидид, метам, метилазид, метилбромид, метил-димрон, метилйодид, MSMA (ММНА), олеиновую кислоту, оксацикломефон, пеларгоновую кислоту, пирибутикарб, хинокламин, триазифлам, тридифан и 6-хлор-3-(2-циклопропил-6-метилфенокси)-4-пиридазинол (CAS 499223-49-3) и его соли и эфиры; и

С) антидоты.

Гербицидами - производными бензоксазинона, которые используются в настоящем изобретении, могут также являться композиции в форме составов, обладающих гербицидной активностью, для защиты сельскохозяйственных культур, содержащих гербицидно-эффективное количество комбинации активных соединений, содержащей по меньшей мере один бензоксазинос формулы I и по меньшей мере еще одно соединение, выбранное из гербицидов В и антидотов С, в соответствии с определением выше, а также по меньшей мере один жидкий и/или твердый носитель и/или одно или несколько ПАВ и, при желании, также одно или несколько вспомогательных веществ, обычно используемых при изготовлении препаратов для защиты сельскохозяйственных культур.

Также гербицидами - производными бензоксазинона, которые используются в настоящем изобретении, могут также являться композиции в форме составов для защиты сельскохозяйственных культур в виде состава с одним компонентом, содержащего комбинацию активных соединений, содержащую по меньшей мере один бензоксазинос формулы I и по меньшей мере еще одно активное соединение, выбранное из гербицидов В и антидотов С, а также по меньшей мере один твердый или жидкий носитель и/или одно или несколько ПАВ и, при желании, также одно или несколько вспомогательных веществ, обычно используемых при изготовлении препаратов для защиты сельскохозяйственных культур.

Также гербицидами - производными бензоксазинона, которые используются в настоящем изобретении, могут также являться композиции в форме составов для защиты сельскохозяйственных культур в виде состава с двумя компонентами, содержащего первый компонент, содержащий по меньшей мере один бензоксазинос формулы I, твердый или жидкий носитель и/или одно или несколько ПАВ, и второй компонент, содержащий по меньшей мере еще одно активное соединение, выбранное из гербицидов В и антидотов С, твердый или жидкий носитель и/или одно или несколько ПАВ, причем дополнительно в состав обоих компонентов могут входить другие вспомогательные вещества, обычно используемые при изготовлении препаратов для защиты сельскохозяйственных культур.

В случае если бензоксазинос формулы I в соответствии с определением, приведенным в настоящем документе, способны образовывать геометрические изомеры, например, E/Z изомеры, в композициях по изобретению допустимо использование как чистых изомеров, так и их смесей.

В случае если бензоксазинос формулы I в соответствии с определением, приведенным в настоящем документе, имеют один или несколько хиральных центров и, как следствие, присутствуют в виде энантиомеров или диастереоизомеров, в композициях по изобретению допустимо использование как чистых энантиомеров и диастереоизомеров, так и их смесей.

Органические группы, указанные в определении переменных R^1 - R^6 , являются (как, например, термин "галоген") собирательными понятиями для перечисления отдельных членов группы. Термин "галоген" означает в каждом случае фтор, хлор, бром или йод. Все углеводородные цепочки, т.е. алкилы, могут быть неразветвленными, либо разветвленными, причем приставка C_n - C_m в каждом случае означает возможное число атомов углерода в группе.

Примерами таких значений являются

C_1 - C_4 -алкил, а также C_1 - C_4 -алкильные группы C_3 - C_6 -циклоалкил- C_1 - C_4 -алкила: например, CH_3 , C_2H_5 , н-пропил и $CH(CH_3)_2$ н-бутил, $CH(CH_3)-C_2H_5$, $CH_2-CH(CH_3)_2$ и $C(CH_3)_3$;

C_1 - C_6 -алкил, а также C_1 - C_6 -алкильные группы C_1 - C_6 -алкокси- C_1 - C_6 -алкила: C_1 - C_4 -алкил, как указано выше, а также, например, н-пентил, 1-метилбутил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, н-гексил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 1-метилпентил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 2,3-диметилбутил, 3,3-диметилбутил, 1-этилбутил, 2-этилбутил, 1,1,2-триметилпропил, 1,2,2-триметилпропил, 1-этил-1-метилпропил или 1-этил-2-метилпропил, предпочтительно метил, этил, н-пропил, 1-метилэтил, н-бутил, 1,1-диметилэтил, н-пентил или н-гексил; C_1 - C_4 -галогеналкил: C_1 - C_4 -алкильные радикалы, как указано выше, которые могут быть полностью или частично замещены фтором, хлором, бромом и/или йодом, например, хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, фторметил, дифторметил, трифторметил, хлорфторметил, дихлорфторметил, хлордифторметил, бромметил, йодметил, 2-фторэтил, 2-хлорэтил, 2-бромэтил, 2-йодэтил, 2,2-дифторэтил, 2,2,2-трифторэтил, 2-хлор-2-фторэтил, 2-хлор-2,2-дифторэтил, 2,2-дихлор-2-фторэтил, 2,2,2-трихлорэтил, пентафторэтил, 2-фторпропил, 3-фторпропил, 2,2-дифторпропил, 2,3-дифторпропил, 2-хлорпропил, 3-хлорпропил, 2,3-дихлорпропил, 2-бромпропил, 3-бромпропил, 3,3,3-трифторпропил, 3,3,3-трихлорпропил, 2,2,3,3,3-пентафторпропил, гептафторпропил, C_1 - C_3 -галогеналкильные радикалы, как указано выше, а также, например, 1-(фторметил)-2-фторэтил, 1-(хлорметил)-2-хлорэтил, 1-(бромметил)-2-бромэтил, 4-фторбутил, 4-хлорбутил, 4-бромбутил, нонафторбутил, 1,1,2,2,2-тетрафторэтил и 1-трифторметил-1,2,2,2-тетрафторэтил;

C_1 - C_6 -галогеналкил: C_1 - C_4 -галогеналкил, как указано выше, а также, например, 5-фторпентил, 5-хлорпентил, 5-бромпентил, 5-йодпентил, ундекафторпентил, 6-фторгексил, 6-хлоргексил, 6-бромгексил, 6-йодгексил и додекафторгексил;

C_3 - C_6 -циклоалкил, а также циклоалкильные группы C_3 - C_6 -циклоалкил- C_1 - C_4 -алкила: моноциклические насыщенные углеводороды с кольцом, содержащим 3-6 членов, такие как циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил;

C_3 - C_6 -алкенил: например, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-метилэтенил, 1-бутенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 1-метил-1-пропенил, 2-метил-1-пропенил, 1-метил-2-пропенил, 2-метил-2-пропенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-пентенил, 4-пентенил, 1-метил-1-бутенил, 2-метил-1-бутенил, 3-метил-1-бутенил, 1-метил-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 3-метил-2-бутенил, 1-метил-3-бутенил, 2-метил-3-бутенил, 3-метил-3-бутенил, 1,1-диметил-2-пропенил, 1,2-диметил-1-пропенил, 1,2-диметил-2-пропенил, 1-этил-1-пропенил, 1-этил-2-пропенил, 1-гексенил, 2-гексенил, 3-гексенил, 4-гексенил, 5-гексенил, 1-метил-1-пентенил, 2-метил-1-пентенил, 3-метил-1-пентенил, 4-метил-1-пентенил, 1-метил-2-пентенил, 2-метил-2-пентенил, 3-метил-2-пентенил, 4-метил-2-пентенил, 1-метил-3-пентенил, 2-метил-3-пентенил, 3-метил-3-пентенил, 4-метил-3-пентенил, 1-метил-4-пентенил, 2-метил-4-пентенил, 3-метил-4-пентенил, 4-метил-4-пентенил, 1,1-диметил-2-бутенил, 1,1-диметил-3-бутенил, 1,2-диметил-1-бутенил, 1,2-диметил-2-бутенил, 1,2-диметил-3-бутенил, 1,3-диметил-1-бутенил, 1,3-диметил-2-бутенил, 1,3-диметил-3-бутенил, 2,2-диметил-3-бутенил, 2,3-диметил-1-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил, 2,3-диметил-3-бутенил, 3,3-диметил-1-бутенил, 3,3-диметил-2-бутенил, 1-этил-1-бутенил, 1-этил-2-бутенил, 1-этил-3-бутенил, 2-этил-1-бутенил, 2-этил-2-бутенил, 2-этил-3-бутенил, 1,1,2-триметил-2-пропенил, 1-этил-1-метил-2-пропенил, 1-этил-2-метил-1-пропенил и 1-этил-2-метил-2-пропенил; C_3 - C_6 -галоалкенил: C_3 - C_6 -алкенильные радикалы, как указано выше, которые могут быть полностью или частично замещены фтором, хлором, бромом и/или йодом, например, 2-хлорпроп-2-ен-1-ил, 3-хлорпроп-2-ен-1-ил, 2,3-дихлорпроп-2-ен-1-ил, 3,3-дихлорпроп-2-ен-1-ил, 2,3,3-трихлор-2-ен-1-ил, 2,3-дихлорбут-2-ен-1-ил, 2-бромпроп-2-ен-1-ил, 3-бромпроп-2-ен-1-ил, 2,3-дибромпроп-2-ен-1-ил, 3,3-дибромпроп-2-ен-1-ил, 2,3,3-трибром-2-ен-1-ил или 2,3-дибромбут-2-ен-1-ил;

C_3 - C_6 -алкинил: например, 1-пропинил, 2-пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 3-бутинил, 1-метил-2-пропинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-пентинил, 4-пентинил, 1-метил-2-бутинил, 1-метил-3-бутинил, 2-метил-3-бутинил, 3-метил-1-бутинил, 1,1-диметил-2-пропинил, 1-этил-2-пропинил, 1-гексинил, 2-гексинил, 3-гексинил, 4-гексинил, 5-гексинил, 1-метил-2-пентинил, 1-метил-3-пентинил, 1-метил-4-пентинил, 2-метил-3-пентинил, 2-метил-4-пентинил, 3-метил-1-пентинил, 3-метил-4-пентинил, 4-метил-1-пентинил, 4-метил-2-пентинил, 1,1-диметил-2-бутинил, 1,1-диметил-3-бутинил, 1,2-диметил-3-бутинил, 2,2-диметил-3-бутинил, 3,3-диметил-1-бутинил, 1-этил-2-бутинил, 1-этил-3-бутинил, 2-этил-3-бутинил и 1-этил-1-метил-2-пропинил;

C_3 - C_6 -галоалкинил: C_3 - C_6 -алкинильные радикалы, как указано выше, которые могут быть полностью или частично замещены фтором, хлором, бромом и/или йодом, например, 1,1-дифторпроп-2-ин-1-ил, 3-хлорпроп-2-ин-1-ил, 3-бромпроп-2-ин-1-ил, 3-йодпроп-2-ин-1-ил, 4-фторбут-2-ин-1-ил, 4-хлорбут-2-ин-1-ил, 1,1-дифторбут-2-ин-1-ил, 4-йодбут-3-ин-1-ил, 5-фторпент-3-ин-1-ил, 5-йодпент-4-ин-1-ил, 6-фторгекс-4-ин-1-ил или 6-йодгекс-5-ин-1-ил;

C_1 - C_4 -алкокси, а также C_1 - C_4 -алкокси группы гидроксикарбонил- C_1 - C_4 -алкокси, C_1 - C_6 -алкоксикарбонил- C_1 - C_4 -алкокси: например, метокси, этокси, пропокси, 1-метилэтокси, бутокси, 1-метилпропокси, 2-метилпропокси и 1,1-диметилэтокси;

C_1 - C_6 -алкокси, а также C_1 - C_6 -алкоксигруппы C_1 - C_6 -алкоксикарбонил- C_1 - C_4 -алкокси: C_1 - C_4 -алкокси, как указано выше, а также, например, пентокси, 1-метилбутокси, 2-метилбутокси, 3-метоксилбутокси, 1,1-диметилпропокси, 1,2-диметил пропокси, 2,2-диметилпропокси, 1-этилпропокси, гексокси, 1-метилпентокси, 2-метилпентокси, 3-метилпентокси, 4-метилпентокси, 1,1-диметил-бутокси, 1,2-диметилбутокси, 1,3-диметилбутокси, 2,2-диметилбутокси, 2,3-диметилбутокси, 3,3-диметилбутокси, 1-этилбутокси, 2-этилбутокси, 1,1,2-триметилпропокси, 1,2,2-триметилпропокси, 1-этил-1-метилпропокси и 1-этил-2-метилпропокси.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения предпочтение отдается производным бензоксазинона формулы I, где переменные либо независимо друг от друга, либо в комбинации друг с другом имеют следующие значения:

R^1 означает водород;

также предпочтительно означает галоген, предпочтительно F или Cl, особенно предпочтительно F;

R^2 означает F;

R^3 означает водород или F, предпочтительно водород;

также предпочтительно F;

R^4 означает C_3 - C_6 -алкинил или C_3 - C_6 -галоалкинил, предпочтительно C_3 -алкинил или C_3 -галоалкинил, особенно предпочтительно $CH_2C\equiv CH$, $CH_2C\equiv CCl$ или $CH_2C\equiv CBr$;

также предпочтительно C_3 - C_6 -алкинил или C_3 - C_6 -циклоалкил- C_1 - C_6 -алкил, особенно предпочтительно пропаргил или циклопропилметил;

также предпочтительно C_3 - C_6 -алкинил, предпочтительно C_3 -алкинил;

особенно предпочтительно $CH_2C\equiv CH$;

также предпочтительно C_3 - C_6 -галоалкинил, предпочтительно C_3 -галоалкинил, особенно предпочтительно $CH_2C\equiv CCl$ или $CH_2C\equiv CBr$;

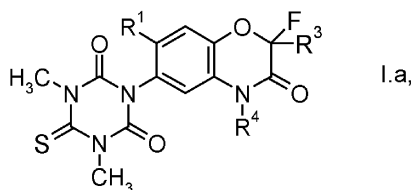
R^5 означает NH_2 , C_1 - C_6 -алкил или C_3 - C_6 -алкинил; предпочтительно C_1 - C_6 -алкил; более предпочтительно C_1 - C_4 -алкил; наиболее предпочтительно CH_3 ;

R⁶ означает C₁-C₆-алкил; предпочтительно C₁-C₄-алкил; наиболее предпочтительно CH₃;

W означает O, также предпочтительно означает S;

Z означает O, также предпочтительно означает S.

Особенное предпочтение отдается производным бензоксазинона формулы I.a (соответствует формуле I, где R² - F, R⁵ и R⁶ - CH₃, W - O и Z - S),



где переменные R¹, R³ и R⁴ имеют значения в значениях, в частности предпочтительные значения, как определено выше.

Наибольшее предпочтение отдается производным бензоксазинона формул I.a.1 - I.a.48, приведенным в табл. А ниже, где переменные R¹, R³ и R⁴ вместе имеют значения, которые даны в одном ряду в таблице (бензоксазины I.a.1 - I.a.54); и где определения переменных R¹, R², R³ и R⁴ имеют особое значение для соединений согласно данному изобретению не только в комбинации друг с другом, но также в каждом случае, по отдельности.

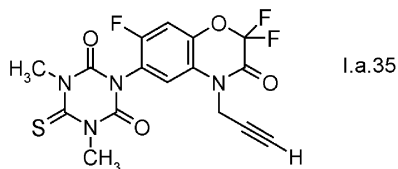
Таблица А

№	R ¹	R ³	R ⁴
I.a.1.	H	H	H
I.a.2.	H	H	CH ₃
I.a.3.	H	H	C ₂ H ₅
I.a.4.	H	H	CH ₂ -C ₂ H ₅
I.a.5.	H	H	CH(CH ₃) ₂
I.a.6.	H	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.7.	H	H	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.8.	H	H	CH ₂ C≡CH
I.a.9.	H	H	CH ₂ C≡C-Br
I.a.10.	H	F	H
I.a.11.	H	F	CH ₃
I.a.12.	H	F	C ₂ H ₅
I.a.13.	H	F	CH ₂ -C ₂ H ₅
I.a.14.	H	F	CH(CH ₃) ₂
I.a.15.	H	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.16.	H	F	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.17.	H	F	CH ₂ C≡CH
I.a.18.	H	F	CH ₂ C≡C-Br
I.a.19.	F	H	H
I.a.20.	F	H	CH ₃
I.a.21.	F	H	C ₂ H ₅
I.a.22.	F	H	CH ₂ -C ₂ H ₅
I.a.23.	F	H	CH(CH ₃) ₂
I.a.24.	F	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.25.	F	H	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.26.	F	H	CH ₂ C≡CH
I.a.27.	F	H	CH ₂ C≡C-Br
I.a.28.	F	F	H
I.a.29.	F	F	CH ₃
I.a.30.	F	F	C ₂ H ₅
I.a.31.	F	F	CH ₂ -C ₂ H ₅
I.a.32.	F	F	CH(CH ₃) ₂
I.a.33.	F	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.34.	F	F	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.35.	F	F	CH ₂ C≡CH
I.a.36.	F	F	CH ₂ C≡C-Br
I.a.37.	Cl	H	H
I.a.38.	Cl	H	CH ₃
I.a.39.	Cl	H	C ₂ H ₅
I.a.40.	Cl	H	CH ₂ -C ₂ H ₅
I.a.41.	Cl	H	CH(CH ₃) ₂
I.a.42.	Cl	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.43.	Cl	H	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.44.	Cl	H	CH ₂ C≡CH
I.a.45.	Cl	H	CH ₂ C≡C-Br
I.a.46.	Cl	F	H
I.a.47.	Cl	F	CH ₃
I.a.48.	Cl	F	C ₂ H ₅
I.a.49.	Cl	F	CH ₂ -C ₂ H ₅

I.a.50.	Cl	F	CH(CH ₃) ₂
I.a.51.	Cl	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.52.	Cl	F	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.53.	Cl	F	CH ₂ C=CH
I.a.54.	Cl	F	CH ₂ C=C-Br

Особенно предпочтительным бензоксазином формулы I, который в качестве компонента А входит в состав композиции по изобретению, является бензоксазином формулы I.a.35, как определено выше.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления изобретения, композиция, применяемая в способах настоящего изобретения, содержит в качестве компонента А бензоксазином формулы I.a.35.



Вышеуказанные производные бензоксазинона и композиции подробно описаны в заявке на европейский патент 09163242.2, в частности, описание на стр. 1-7, относящееся к производным бензоксазинона и к их возможным заместителям, включено в настоящий документ во всей полноте посредством ссылки.

Производные бензоксазинона настоящего изобретения обычно лучше всего используются в сочетании с одним или несколькими другими гербицидами для борьбы с большим количеством видов нежелательной растительности. При использовании в сочетании с другими целевыми гербицидами, заявленные в настоящем изобретении соединения могут быть использоваться в одной препаративной форме с другим гербицидом или гербицидами, смешаны в емкости с другим гербицидом или гербицидами или использованы последовательно с другим гербицидом или гербицидами.

Гербицидные соединения настоящего изобретения могут также использоваться в соединении с дополнительными гербицидами, к которым злаковая культура обычно устойчива или стойка в результате экспрессии одного или более дополнительных трансгенов, как описано выше. Некоторые гербициды, которые могут быть использованы в связывании с соединениями настоящего изобретения, включают сульфонамиды, такие как метосулам, флуметулам, хлорансулам-метил, диклосулам, пеноксиулам и флорасулам, производные сульфонилмочевины, такие как хлоримурон, трибенурон, сульфометурон, никосульфурон, хлоросульфурон, амидосульфурон, триасульфурон, просульфурон, тритосульфурон, тифенсульфурон, сульфосульфурон и метосульфурон, имидазолиноны, такие как имазакин, имазапик, имазапир, имазапир, имзаметабенз и имазамокс, феноксиалкановые кислоты, такие как 2,4-D, МХФУ (2-метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота), дихлорпроп и мекопроп, пиридинилоксиуксусные кислоты, такие как триклопир и флуороксипир, карбоновые кислоты, такие как клопиралид, пиклорам, аминопиралид и дикамба, динитроанилины, такие как трифлуралин, бенефин, бенфлуралин и пендиметалин, хлороацетанилиды, такие как алахлор, ацетохлор и метолахлор, семикарбазоны (ингибиторы-переносчики ауксина), такие как хлорфлуренол и дифлуфензопир, арилоксифеноксипропионаты, такие как флуазифоп, галоксифоп, диклофоп, клодинафоп и феноксапроп и другие распространенные гербициды, включающие глифосат, глюфосинат, ацифторфен, бентазон, кломазон, фумиклорак, флуометурон, фомесафен, лактофен, линурон, изопротурон, симазин, норфлуразон, паракват, диурон, дифлуфеникан, пиколинафен, цинидон, сетоксидим, тралкоксидим, квинмерак, изоксабен, бромоксинил, метрибузин и мезотрион.

Например, гербициды - производные бензоксазинона, используемые в способах настоящего изобретения, могут также применяться в сочетании с глифосатом и глюфосинатом к культурам, устойчивым к глифосату или глюфосинату.

Если не было упомянуто выше, гербициды - производные бензоксазинона, используемые в способах настоящего изобретения, могут также применяться в сочетании с соединениями:

b1) из группы ингибиторов биосинтеза липидов

АСС-гербициды, такие как аллоксидим, аллоксидим-натрий, бутроксидим, клетодим, клодинафоп, клодинафоп-пропаргил, циклоксидим, цигалофоп, цигалофоп-бутил, диклофоп, диклофоп-метил, феноксапроп, феноксапроп-этил, феноксапроп-Р, феноксапроп-Р-этил, флуазифоп, флуазифоп-бутил, флуазифоп-Р, флуазифоп-Р-бутил, галоксифоп, галоксифоп-метил, галоксифоп-Р, галоксифоп-Р-метил, метамифоп, пиноксаден, профоксидим, пропаквизафоп, квизалофоп, квизалофоп-этил, квизалофоп-тефурил, квизалофоп-Р, квизалофоп-Р-этил, квизалофоп-Р-тефурил, сетоксидим, тепралоксидим и тралкоксидим, и гербициды, не принадлежащие к группе АСС-гербицидов, такие как бенфуресат, бутилат, циклоат, далапон, димепиперат, ЕРТС, эспрокарб, этофумесат, флупропанат, молинат, орбенкарб, пебулат, просульфоккарб, ТСА, тиобенкарб, тиокарбазил, триаллат и вернолат;

b2) из группы ингибиторов ALS

Сульфонилмочевины, такие как амидосульфурон, азимсульфурон, бенсульфурон, бенсульфурон-метил, хлоримурон, хлоримурон-этил, хлоросульфурон, циосульфурон, циклосульфамурон, этаметсуль-

фурун, этаметсульфурун-метил, этоксисульфурон, флазасульфурон, флуцетосульфурон, флупирсульфурун, флупирсульфурун-метил-натрий, форамсульфурун, галосульфурон, галосульфурон-метил, имазосульфурон, иодосульфурон, иодосульфурон-метил-натрий, мезосульфурон, метазосульфурон, метсульфурун, метсульфурун-метил, никосульфурон, ортосульфамурон, оксасульфурон, примисульфурон, примисульфурон-метил, пропирисульфурун, просульфурон, пиразосульфурон, пиразосульфурон-этил, римсульфурун, сульфометурон, сульфометурон-метил, сульфосульфурон, тифенсульфурун, тифенсульфурун-метил, триасульфурон, трибенурон, трибенурон-метил, трифлорисульфурон, трифлусульфурон, трифлусульфурон-метил и тритосульфурон; имидазолиноны, такие как имазаметабенз, имазаметабенз-метил, имазамокс, имазапик, имазапир, имазахин и имазетапир, гербициды группы триазолопиримидина и сульфонилиды, такие как хлорансулам, хлорансулам-метил, диклосулам, флуметсулам, флорасулам, метосулам, пеносулам, пиримисульфам и пироксулам;

пиримидинилбензоаты, такие как биспирибак, биспирибак-натрий, пирибензоксим, пирифталид, пириминобак, пириминобак-метил, пиритиобак, пиритиобак-натрий, 4-[[[2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]фенил]метил]амино]бензойной кислоты-1-метилэтиловый эфир (CAS 420138-41-6), 4-[[[2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]фенил]метил]амино]бензойной кислоты пропиловый эфир (CAS 420138-40-5), N-(4-бромфенил)-2-[(4,6-диметокси-2-пиримидинил)окси]бензолметанамин (CAS 420138-01-8) и гербициды группы сульфониламинокарбонил-триазолинона, такие как флукарбазон, флукарбазон-натрий, пропоксикарбазон, пропоксикарбазон-натрий, тиенкарбазон и тиенкарбазон-метил. В том числе, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим по меньшей мере один гербицид из группы имидазолинонов;

b3) из группы ингибиторов фотосинтеза

амикарбазон, ингибиторы фотосистемы II, например, гербициды группы триазинов, включая хлор-триазин, триазины, триазиндионы, метилтриазины и пиридазины, такие как аметрин, атразин, хлоридазон, цианазин, десметрин, диметаметрин, гексазион, метрибузин, прометон, прометрин, пропазин, симазин, симетрин, тербуметон, тербутилазин, тербутрин и триэтазин, арилмочевины, такие как хлорбромурон, хлортолурун, хлорксурон, димефурун, диурон, флуометурон, изопротурон, изоурон, линурон, метамитрон, метабензтиазурон, метобензурун, метоксурон, монолинурун, небурон, сидурон, тебутиурон и тиадиазурон, фенилкарбаматы, такие как десмедифам, карбутилат, фенмедифам, фенмедифам-этил, нитриловые гербициды, такие как бромфеноксим, бромоксинил и его соли и сложные эфиры, иоксинил и его соли и сложные эфиры, урацилы, такие как бромацил, ленацил и тербацил, и бентазон и бентазон-натрий, пиридат, пиридафол, пентанохлор и пропанил и ингибиторы фотосистемы I такие как дикват, дикват-дибромид, паракват, паракват-дихлорид и паракват-диметилсульфат. В том числе, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим по меньшей мере один гербицид - производное арилмочевины. В том числе, таким же образом, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим по меньшей мере один гербицид группы триазинов. В том числе, таким же образом, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к таким композициям, содержащим по меньшей мере один гербицид группы нитрилов;

b4) из группы ингибиторов протопорфириноген-IX оксидазы: ацифторфен, ацифторфен-натрий, азафенидин, бенкарбазон, бензфендизон, бифенокс, бутафенацил, карфентразон, карфентразон-этил, хлорметоксифен, цинидон-этил, флуазолат, флуфенпир, флуфенпир-этил, флумиклорак, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, фторгликофен, фторгликофен-этил, флутиацет, флутиацет-метил, фомесафен, галосафен, лактофен, оксадиаргил, оксадиазон, оксифторфен, пентоксазон, профлуазол, пираклонил, пирафлуфен, пирафлуфен-этил, сафлуфенацил, сульфентразон, тиадизимин, 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-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452098-92-9), N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 915396-43-9), N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 452099-05-7), N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1Н-пиразол-1-карбоксамид (CAS 45100-03-7) и 3-[7-фтор-3-оксо-4-(проп-2-инил)-3,4-дигидро-2Н-бензо[1,4]оксазин-6-ил]-1,5-диметил-6-тиоксо-[1,3,5]триазинан-2,4-дион;

b5) из группы отбеливающих гербицидов

ингибиторы фитоен десатуразы (PDS): бефлубутамид, дифлуфеникан, флуридон, фторхлоридон, флуртамон, норфлуразон, пиколинафен и 4-(3-трифторметилфенокси)-2-(4-трифторметилфенил)пиримидин (CAS 180608-33-7), ингибиторы HPPD: бензобициклон, бензофенап, изоксафлутол, мезотрион, пирасульфотол, пиразолинат, пиразоксифен, сулькотрион, тефурилтрион, темботрион, топрамезони бициклопирон, гербицид-отбеливатель, целевой фермент неизвестен: аклонифен, амитрол, кломазон и флуметурон;

b6) из группы ингибиторов EPSP синтазы

глифосат, глифосат-изопропиламмоний и глифосат-тримезиум (сульфосат);

b7) из группы ингибиторов глутамин-синтазы

биланафос (биалафос), биланафос-натрий, глюофосинат, глюофосинат-Р и глюофосинат-аммоний;

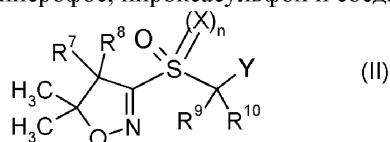
b8) из группы ингибиторов DHP синтазы асулам;

b9) из группы ингибиторов митоза

соединения группы K1: динитроанилины, такие как бенфлуралин, бутралин, динитрамин, эталфлуралин, флухлоралин, оризалин, пендиметалин, продиамин и трифлуралин, фосфорамидаты, такие как ампрофос, ампрофос-метил и бутаифос, гербициды - производные бензойной кислоты, такие как хлортал, хлортал-диметил, пиридины, такие как дитиопир и триазопир, бензамиды, такие как пропизамид и тебутам; соединения группы K2: хлорпрофам, профам и карбетамид, в том числе, соединения группы K1, в частности динитроанилины являются предпочтительными;

b10) из группы ингибиторов синтеза очень длинноцепочных жирных кислот (VLCFA ингибиторов)

хлорацетамиды, такие как ацетохлор, алахлор, бутахлор, диметахлор, диметенамид, диметенамид-Р, метазахлор, метолахлор, метолахлор-S, пентоксамид, претилахлор, пропахлор, пропизохлор и тенихлор, оксиацетанилиды, такие как флуфенацет и мефенацет, ацетанилиды, такие как дифенамид, напроанилид и напроамид, тетразолины, такие как фентразамид и другие гербициды, такие как анилофос, кафенстрол, феноксасульфен, ипфенкарбазон, пиперофос, пироксасульфен и соединения изоксалина формулы II,



где $R^7, R^8, R^9, R^{10}, W, Z$ и p имеют следующие значения:

R^7, R^8, R^9, R^{10} независимо друг от друга означают водород, галоген или

C_1-C_4 -алкил; X означает кислород или NH ;

Y означает фенил или моноциклический 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или 10-членный гетероцикл, содержащий, в дополнение к членам углеродного кольца, один, два или три одинаковых или различных гетероатома, выбранных из кислорода, азота и серы, в качестве членов кольца, где фенил и гетероцикл не замещены или несут 1, 2 или 3 заместителя R^{yy} , выбранных из галогена, C_1-C_4 -алкила, C_1-C_4 -алкокси, C_1-C_4 -галогеналкила и C_1-C_4 -галоалкокси;

предпочтительно фенил или 5- или 6-членный ароматический гетероцикл (гетарил), который содержит, в дополнение к членам углеродного кольца, один, два или три атома азота, в качестве членов кольца, где фенил и гетарил не замещены или несут 1, 2 или 3 заместителя R^{yy} ; и

p означает 0 или 1;

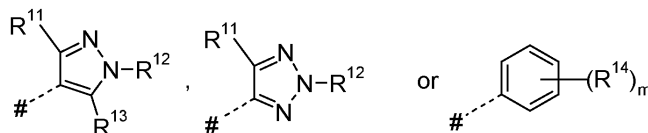
среди соединений изоксазолина формулы II, предпочтение отдается соединениям изоксазолина формулы II, где

R^7, R^8, R^9, R^{10} независимо друг от друга означают H, F, Cl или метил;

X означает кислород;

p означает 0 или 1; и

Y означает фенил, пиразолил или 1,2,3-триазолил, где три последних названных радикала являются незамещенными или несут один, два или три заместителя R^{yy} , в особенности, один из следующих радикалов



где

R^{11} означает галоген, C_1-C_4 -алкил или C_1-C_4 -галогеналкил;

R^{12} означает C_1-C_4 -алкил;

R^{13} означает галоген, C_1-C_4 -алкокси или C_1-C_4 -галоалкокси;

R^{14} означает галоген, C_1-C_4 -алкил, C_1-C_4 -галогеналкил или C_1-C_4 -галоалкокси;

m означает 0, 1, 2 или 3; а также

$\#$ указывает точку присоединения к группе $CR^{13}R^{14}$;

среди соединений изоксазолина формулы II, особенное предпочтение отдается соединениям изоксазолина формулы II, где

R^7 означает водород;

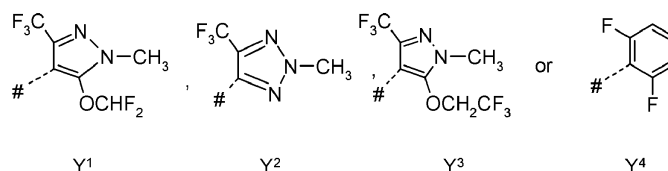
R^8 означает фтор;

R^9 означает водород или фтор;

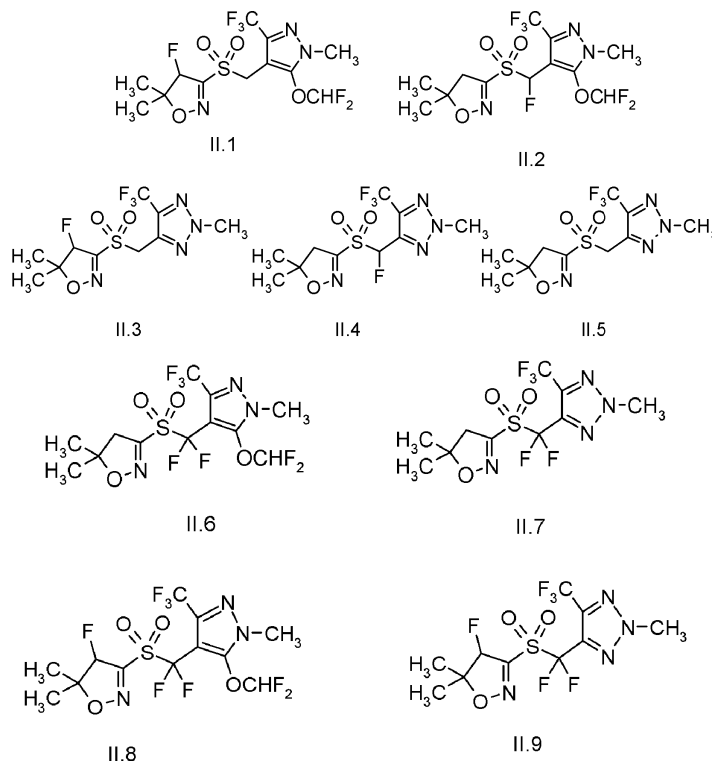
R^{10} означает водород или фтор;

X означает кислород;

Y означает один из радикалов формул Y^1, Y^2, Y^3 или Y^4



где # указывает точку присоединения к группе CR^9R^{10} ;
 n означает ноль или 1, в частности 1; и
 среди этих соединений особенно предпочтительными являются соединения изоксазолина формул II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.8 и II.9

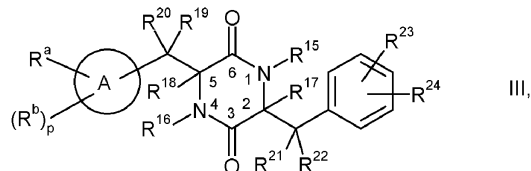


соединения изоксазолина формулы II известны специалистам, например, из WO 2006/024820, WO 2006/037945, WO 2007/071900 и WO 2007/096576;

среди VLCFA ингибиторов, особенное предпочтение отдается хлорацетамидам и оксиацетамидам, в особенности, пироксасульфону;

b1) из группы ингибиторов биосинтеза целлюлозы

хлортиамид, дихлобендил, флупоксам, изоксабен, 1-циклогексил-5-пентафторфенилокси-1-[1,2,4,6]тиатриазин-3-иламин и соединения пиперазина формулы III,



где

A означает фенил или пиридил, где R^a прикреплено в орто-положении к точке присоединения A к атому углерода;

R^a означает CN, NO_2 , C_1 - C_4 -алкил, D - C_3 - C_6 -циклоалкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_1 - C_4 -алкокси, C_1 - C_4 -галоалкокси, O - D - C_3 - C_6 -циклоалкил, $S(O)_qR^y$, C_2 - C_6 -алкенил, D - C_3 - C_6 -циклоалкенил, C_3 - C_6 -алкенилокси, C_2 - C_6 -алкинил, C_3 - C_6 -алкинилокси, $NR^A R^B$, три- C_1 - C_4 -алкилсиллил, D - $C(=O)-R^{a1}$, D - $P(=O)(R^{a1})_2$, фенил, нафтил, 3-7-членный моноциклический или 9-10-членный бициклический насыщенный, ненасыщенный или ароматический гетероцикл, который присоединен с помощью углерода или азота и который содержит 1, 2, 3 или 4 гетероатома, выбранных из группы, включающей O, N и S, и который может быть частично или полностью замещен группами R^{aa} и/или R^{a1} , и дополнительно, в случае, если R^a присоединен к атому углерода, - галоген;

R^y означает C_1 - C_6 -алкил, C_3 - C_4 -алкенил, C_3 - C_4 -алкинил, $NR^A R^B$ или C_1 - C_4 -галогеналкил, и

q означает 0, 1 или 2;

R^A , R^B независимо друг от друга означают водород, C_1 - C_6 -алкил, C_3 - C_6 -алкенил и C_3 - C_6 -алкинил; вместе с атомом азота, к которому они прикреплены, R^A , R^B могут также образовывать пяти- или шестичленное насыщенное или частично или полностью ненасыщенное кольцо, которое в дополнение к атомам углерода может содержать 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из группы, включающей O, N и S, и которое может быть замещено 1-3 группами R^{aa} ;

D означает ковалентную связь, C_1 - C_4 -алкилен, C_2 - C_6 -алкенил или C_2 - C_6 -алкинил;

R^{a1} означает водород, OH, C_1 - C_8 -алкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_3 - C_6 -циклоалкил, C_2 - C_8 -алкенил, C_5 - C_6 -циклоалкенил, C_2 - C_8 -алкинил, C_1 - C_6 -алкокси, C_1 - C_4 -галоалкокси, C_3 - C_8 -алкенилокси, C_3 - C_8 -алкинилокси, $NR^A R^B$, C_1 - C_6 -алкоксиамино, C_1 - C_6 -алкилсульфониламино, C_1 - C_6 -алкиламиносульфониламино, [ди-(C_1 - C_6)алкиламино]сульфониламино, C_3 - C_6 -алкениламино, C_3 - C_6 -алкиниламино, N-(C_2 - C_6 -алкенил)-N-(C_1 - C_6 -алкил)амино, N-(C_2 - C_6 -алкинил)-N-(C_1 - C_6 -алкил)амино, N-(C_1 - C_6 -алкокси)-N-(C_1 - C_6 -алкил)амино, N-(C_2 - C_6 -алкенил)-N-(C_1 - C_6 -алкокси)амино, N-(C_2 - C_6 -алкинил)-N-(C_1 - C_6 -алкокси)амино, C_1 - C_6 -алкилсульфонил, три- C_1 - C_4 -алкилсиллил, фенил, фенокси, фениламино или 5- или 6-членный моноциклический или 9- или 10-членный бициклический гетероцикл, который содержит 1, 2, 3 или 4 гетероатома, выбранных из группы, включающей O, N и S, где циклические группы не замещены или замещены 1, 2, 3 или 4 группами R^{aa} ;

R^{aa} означает галоген, OH, CN, NO_2 , C_1 - C_4 -алкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_1 - C_4 -алкокси, C_1 - C_4 -галоалкокси, $S(O)_q R^y$, D-C(=O)- R^{a1} и три- C_1 - C_4 -алкилсиллил; R^b независимо друг от друга означают водород, CN, NO_2 , галоген, C_1 - C_4 -алкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_2 - C_4 -алкенил, C_3 - C_6 -алкинил, C_1 - C_4 -алкокси, C_1 - C_4 -галоалкокси, бензил или $S(O)_q R^y$;

R^b вместе с группой R^a или R^b , присоединенной к прилегающему атому кольца, может образовывать пяти- или шестичленное насыщенное или частично или полностью ненасыщенное кольцо, которое в дополнение к атомам углерода может содержать 1, 2, или 3 гетероатома, выбранных из группы, включающей O, N и S, и которое может быть R^{aa} ;

r означает 0, 1, 2 или 3;

R^{15} означает водород, OH, CN, C_1 - C_4 -алкил, C_3 - C_4 -алкенил, C_3 - C_{12} -алкинил, C_1 - C_4 -алкокси, C_3 - C_6 -циклоалкил, C_5 - C_6 -циклоалкенил, $NR^A R^B$, $S(O)_n R^y$, $S(O)_n NR^A R^B$, C(=O) R^{25} , CONR $^A R^B$, фенил или 5- или 6-членный моноциклический или 9- или 10-членный бициклический ароматический гетероцикл, который содержит 1, 2, 3 или 4 гетероатома, выбранных из группы, включающей O, N и S, где циклические группы присоединены с помощью D и не замещены или замещены 1, 2, 3 или 4 группами R^{aa} , а также следующие группы, частично или полностью замещенные R^{aa} : C_1 - C_4 -алкил, C_3 - C_4 -алкенил, C_3 - C_4 -алкинил, C_1 - C_4 -алкокси, C_3 - C_6 -циклоалкил, C_5 - C_6 -циклоалкенил, $NR^A R^B$, $S(O)_n R^y$, $S(O)_n NR^A R^B$, C(=O) R^{25} , CONR $^A R^B$;

предпочтительно означает водород, OH, CN, C_1 - C_4 -алкил, C_3 - C_{12} -алкенил, C_3 - C_4 -алкинил, C_1 - C_4 -алкокси, C_3 - C_6 -циклоалкил, C_5 - C_6 -циклоалкенил, $NR^A R^B$, $S(O)_n R^y$, $S(O)_n NR^A R^B$, C(=O) R^{25} , CONR $^A R^B$, фенил или 5- или 6-членный моноциклический или 9- или 10-членный бициклический ароматический гетероцикл, который содержит 1, 2, 3 или 4 гетероатома, выбранных из группы, включающей O, N и S, где циклические группы присоединены с помощью D 1 и не замещены или замещены 1, 2, 3 или 4 группами R^{aa} , а также следующие группы, частично или полностью замещенные R^{aa} : C_1 - C_4 -алкил, C_3 - C_4 -алкенил и C_3 - C_4 -алкинил;

R^{25} означает водород, C_1 - C_4 -алкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_1 - C_4 -алкокси или C_1 - C_4 -галоалкокси;

D 1 означает карбонил или группу D;

где в группах R^{15} , R^a и их заместителях, углеродные цепочки и/или циклические группы могут нести 1, 2, 3 или 4 заместителя R^{aa} и/или R^{a1} ;

R^{16} означает C_1 - C_4 -алкил, C_3 - C_4 -алкенил или C_3 - C_4 -алкинил;

R^{17} означает OH, NH_2 , C_1 - C_4 -алкил, C_3 - C_6 -циклоалкил, C_3 - C_6 -алкенил, C_3 - C_6 -алкинил, C_1 - C_4 -гидроксиалкил, C_1 - C_4 -цианоалкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_1 - C_4 -алкокси- C_1 - C_4 -алкил или C(=O) R^{25} ;

R^{18} означает водород, галоген, C_1 - C_4 -алкил или C_1 - C_4 -галогеналкил, или R^{18} и R^{19} вместе означают ковалентную связь;

R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{21} независимо друг от друга означают водород, галоген, OH, CN, NO_2 , C_1 - C_4 -алкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил, C_1 - C_4 -алкокси, C_1 - C_4 -галоалкокси, C_3 - C_6 -циклоалкил, C_3 - C_6 -циклоалкенил и C_3 - C_6 -циклоалкинил;

R^{23} , R^{24} независимо друг от друга означают водород, галоген, OH, галогеналкил, $NR^A R^B$, $NR^A C(O)R^{26}$, CN, NO_2 , C_1 - C_4 -алкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_2 - C_4 -алкенил, C_3 - C_6 -алкинил, C_1 - C_4 -алкокси, C_1 - C_4 -галоалкокси, O-C(O) R^{26} , фенокси или бензилокси, где в группах R^{23} и R^{24} углеродные цепочки и/или циклические группы могут нести 1, 2, 3 или 4 заместителя R^{aa} ;

R^{26} означает C_1 - C_4 -алкил или $NR^A R^B$;

среди соединений изоксазолина соединений пиперазина формулы III, предпочтение отдается соединениям пиперазина формулы III, где

A означает фенил или пиридил, где R^a прикреплено в орто-положении к точке присоединения A к атому углерода;

R^a означает CN, NO_2 , C_1 - C_4 -алкил, C_1 - C_4 -галогеналкил, C_1 - C_4 -алкокси, C_1 - C_4 -галоалкокси или D-

$C(=O)-R^{al}$;

R^y означает C_1-C_6 -алкил, C_3-C_4 -алкенил, C_3-C_4 -алкинил, $NR^A R^B$ или C_1-C_4 -галогеналкил и $q - 0, 1$ или 2 ;

R^A, R^B независимо друг от друга означают водород, C_1-C_6 -алкил, C_3-C_6 -алкенил и C_3-C_6 -алкинил; вместе с атомом азота, к которому они прикреплены, R^A, R^B могут также образовывать пяти- или шестичленное насыщенное или частично или полностью ненасыщенное кольцо, которое в дополнение к атомам углерода может содержать 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из группы, включающей O, N и S, и которое может быть замещено 1-3 группами R^{aa} ;

D означает ковалентную связь или C_1-C_4 -алкилен;

R^{al} означает водород, OH, C_1-C_8 -алкил, C_1-C_4 -галогеналкил, C_3-C_6 -циклоалкил;

R^{aa} означает галоген, OH, CN, NO_2 , C_1-C_4 -алкил, C_1-C_4 -галогеналкил, C_1-C_4 -алкокси, C_1-C_4 -галоалкокси, $S(O)_q R^y$, $D-C(=O)-R^{al}$ и три- C_1-C_4 -алкилсиллил;

R^b независимо друг от друга означают водородом CN, NO_2 , галогеном,

C_1-C_4 -алкилом, C_1-C_4 -галогеналкилом, C_2-C_4 -алкенилом, C_3-C_6 -алкинилом, C_1-C_4 -алкокси, C_1-C_4 -галоалкокси, бензилом или $S(O)_q R^y$, R^b вместе с группой R^a или R^b , присоединенной к прилегающему атому кольца, может образовывать пяти- или шестичленное насыщенное или частично или полностью ненасыщенное кольцо, которое в дополнение к атомам углерода может содержать 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из группы, включающей O, N и S, и которое может быть частично или полностью замещено R^{aa} ;

p означает 0 или 1;

R^{15} означает водород, C_1-C_4 -алкил, C_3-C_{12} -алкенил, C_3-C_{12} -алкинил, C_1-C_4 -алкокси или $C(=O)R^{25}$, которые могут быть частично или полностью замещены R^{aa} -группами; означает предпочтительно водород, C_1-C_4 -алкил, C_3-C_{12} -алкенил, C_3-C_4 -алкинил, C_1-C_4 -алкокси или $C(=O)R^{25}$;

R^{25} означает водород, C_1-C_4 -алкил, C_1-C_4 -галогеналкил, C_1-C_4 -алкокси или C_1-C_4 -галоалкокси;

где в группах R^{15} , R^a и их заместителях, углеродные цепочки и/или циклические группы могут нести 1, 2, 3 или 4 заместителя R^{aa} и/или R^{al} ;

R^{16} означает C_1-C_4 -алкил, R^{17} означает OH, NH_2 , C_1-C_4 -алкил, C_3-C_6 -циклоалкил, C_1-C_4 -галогеналкил или $C(=O)R^{25}$;

R^{18} означает водород, или R^{18} и R^{19} вместе означают ковалентную связь;

$R^{19}, R^{20}, R^{21}, R^{21}$ независимо друг от друга означают водород;

R^{23}, R^{24} независимо друг от друга означают водород, галоген или OH;

b12) из группы разобщающих гербицидов

диносеб, динотерб и динитро-о-крезол (DNOC) и его соли;

b13) из группы ауксиновых гербицидов

2,4-D и его соли и сложные эфиры, 2,4-DB и его соли и сложные эфиры, аминопиралид и его соли, такие как аминопиралид-трис(2-гидроксипропил)аммоний и его сложные эфиры, беназолин, беназолин-этил, хлорамбен и его соли и сложные эфиры, кломепроп, клопиралид и его соли и сложные эфиры, дикамба и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп и его соли и сложные эфиры, дихлорпроп-P и его соли и сложные эфиры, флуроксипир, флуроксипир-бутометил, флуроксипир-метил, МСРА (2-метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота) и ее соли и сложные эфиры, МСРА-тиоэтил, МСРВ (2-метил-4-хлорфеноксиизобутановая кислота) и ее соли и сложные эфиры, мекопрок и его соли и сложные эфиры, мекопрок-P и его соли и сложные эфиры, пиклорам и его соли и сложные эфиры, квинклолак, квинмерак, трибутиламин (ТБА) (2,3,6) и его соли и сложные эфиры, триклопир и его соли и сложные эфиры, и аминоциклопиралхлор и его соли и сложные эфиры;

b14) из группы ингибиторов транспорта ауксинов: дифлуфензопир, дифлуфензопир-натрий, напталам и напталам-натрий;

b15) из группы других гербицидов: бромобутид, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, цинметилин, кумилурон, далалон, дазомет, дифензокват, дифензокват-метилсульфат, диметипин, DSMA (ДНАМ, двунариевый арсенат метила), димрон, эндотал и его соли, этобензанид, флампроп, флампроп-изопропил, флампроп-метил, флампроп-M-изопропил, флампроп-M-метил, флуренол, флуренол-бутил, флурпримидол, фосамин, фосамин-аммоний, инданофан, индазифлам, гидразид малеиновой кислоты, мефлуидид, метам, метилазид, метилбромид, метил-димрон, метилйодид, MSMA (ММНА), олеиновая кислота, оксацикломефон, пеларгоновая кислота, пирибутикарб, хинокламин, триазифлам, тридифан и 6-хлор-3-(2-циклопропил-6-метилфенокси)-4-пиридазинол (CAS 499223-49-3) и его соли и эфиры.

Более того, эффективно использовать бензоксазины формулы I в комбинации с антидотами. Антидоты представляют собой химические соединения, предотвращающие или уменьшающие повреждения эффективных растений, при этом не оказывая значительного влияния на гербицидное действие бензоксазинов формулы I на нежелательные растения. Они могут применяться либо перед посевом (например, при обработке семян, побегов или сеянцев) или в предвсходовый или послевсходовый период эффективных растений.

Кроме того, антидоты C, бензоксазины I и/или гербициды B могут использоваться одновременно или по очереди.

К подходящим антидотам относятся, например, (хинолин-8-окси)уксусные кислоты, 1-фенил-5-галогеналкил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоновые кислоты, 1-фенил-4,5-дигидро-5-алкил-1Н-пиразол-3,5-ди-карбоновые кислоты, 4,5-дигидро-5,5-диарил-3-изоксазол карбоновые кислоты, дихлорацетамиды, альфа-оксиминофенилацетонитрилы, ацетофеноноксими, 4,6-дигалоген-2-фенилпиримидины, N-[[4-(аминокарбонил)фенил]сульфонил]-2-бензойные амиды, 1,8-нафтоыйный ангидрид, 2-гало-4-(галогеналкил)-5-тиазолкарбоновые кислоты, фосфотиоаты и N-алкил-О-фенилкарбаматы, их агрономически допустимые соли, а также их агрономически допустимые производные, такие как амиды, эфиры, тиоэфиры при наличии кислотной группы.

Примерами предпочтительных антидотов С являются беноксакор, клоквинтоцет, циометринил, ципросульфамид, дихлормид, дициклонон, диэголат, фенхлоразол, фенклорим, флуразол, флуксофеним, фурилазол, изоксадифен, мефенпир, мефенат, нафтоыйный ангидрид, оксабетринил, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3) и 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4) и N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензолсульфонамид (CAS 129531-12-0).

Особенно предпочтительными антидотами С являются беноксакор, клоквинтоцет, ципросульфамид, дихлормид, фенхлоразол, фенклорим, флуразол, флуксофеним, фурилазол, изоксадифен, мефенпир, нафтоыйный ангидрид, оксабетринил, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3) и 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4) и N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензолсульфонамид (CAS 129531-12-0).

Еще более предпочтительными антидотами С являются беноксакор, клоквинтоцет, ципросульфамид, дихлормид, фенхлоразол, фенклорим, фурилазол, изоксадифен, мефенпир, 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3) и 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4) и N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензолсульфонамид (CAS 129531-12-0).

Особенно предпочтительными антидотами С, которые входят в состав композиции по изобретению, в качестве компонента С, являются антидоты С, в соответствии с определением выше; в частности, антидоты С.1 - С.13, перечень которых приведен ниже в табл. С

Таблица С

Антидот С
С.1 беноксакор
С.2 клоквинтоцет
С.3 ципросульфамид
С.4 дихлормид
С.5 фенхлоразол
С.6 фенклорим
С.7 фурилазол
С.8 изоксадифен
С.9 мефенпир
С.10 ангидрид нафтоыйной кислоты
С.11 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан (MON4660, CAS 71526-07-3)
С.12 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин (R-29148, CAS 52836-31-4)
С.13 N-(2-метоксибензоил)-4-[(метиламинокарбонил)амино]бензолсульфонамид (CAS 129531-12-0)

Активные соединения В групп b1) - b15) и активные соединения С являются известными гербицидами и антидотами, см., например, The Compendium of Pesticide Common Names (<http://www.alanwood.net/pesticides/>); Farm Chemicals Handbook 2000 том 86, Meister Publishing Company, 2000; В. Hock, С. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbicide [Herbicides], Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995; W. H. Ahrens, Herbicide Handbook, 7⁰⁰ изд., Weed Science Society of America, 1994; и К. К. Hatzios, Herbicide Handbook, дополнение к 7⁰⁰ изд., Weed Science Society of America, 1998. 2,2,5-триметил-3-(дихлорацетил)-1,3-оксазолидин [CAS No. 52836-31-4] также называют R-29148. 4-(дихлорацетил)-1-окса-4-азаспиро[4.5]декан [CAS No. 71526-07-3] также называют AD-67 и MON 4660. Другие гербицидные активные соединения известны из WO 96/26202, WO 97/41116, WO 97/41117, WO 97/41118 и WO 01/83459, а также из W. Kramer et al. (ed.) "Modern Crop Protection Compounds", том 1, Wiley VCH, 2007, кроме того из литературы, которая приведена в качестве цитируемых источников в указанных документах.

В целом, предпочтительно использовать соединения изобретения в комбинации с гербицидами, которые являются селективными для интересующих культур и которые дополняют спектр сорняков, с которыми борются эти соединения при данной норме введения. Также в целом предпочтительно применять соединения изобретения и другие дополнительные гербициды одновременно в виде комбинированного состава или баковой смеси.

Термин "нуклеиновая кислота мут-РРО" относится к нуклеиновой кислоте РРО, которая имеет последовательность, мутировавшую из нуклеиновой кислоты РРО дикого типа, и придает повышенную устойчивость растения к гербицидам - производным бензоксазониона. Кроме того, понятие "мутированная протопорфириноген оксидаза (мут-РРО)" подразумевает замещение аминокислоты первичных последовательностей дикого типа SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 или 46, или ее варианта, производной, гомолога, ортолога или паралога, другой аминокислотой. Выражение "мутированная аминокислота" будет использоваться ниже для определения аминокислоты, которая замещается другой аминокислотой, обозначая тем самым место мутации в первичной последовательности белка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность РРО включает последовательность SEQ ID NO: 1, 25, 37 или 39 или ее вариант или производную.

Кроме того, для специалистов в данной области будет понятно, что нуклеотидные последовательности РРО включают гомологи, паралоги и ортологи SEQ ID NO: 1, 25, 37 или 39 в соответствии с определением приведенным ниже.

Термин "вариант" в отношении последовательности (например, последовательность полипептидной или нуклеиновой кислоты, такая как, например, транскрипция, регулирующая нуклеотидную последовательность изобретения) подразумевает существенно схожие последовательности. Для нуклеотидных последовательностей, включающих открытую рамку считывания варианты подразумевают те последовательности, которые вследствие дегенерации генетического кода, кодируют идентичную аминокислотную последовательность нативного белка. Такие природные аллельные варианты могут быть идентифицированы при помощи молекулярных биологических методов, как, например, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метод гибридизации. Вариантные нуклеотидные последовательности также включают нуклеотидные последовательности, полученные синтетическим методом, такие как последовательности, образованные, например, путем направленного мутагенеза и для открытых рамок считывания, кодируют нативный белок, а также последовательности, кодирующие полипептид с аминокислотными замещениями относительно нативного белка. В целом, варианты нуклеотидной последовательности по изобретению будут иметь по меньшей мере 30, 40, 50, 60 и до 70%, например, предпочтительно 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% и до 79%, в целом, по меньшей мере 80%, например, 81%-84%, по меньшей мере, 85%, например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, по меньшей мере 94%, 95%, 96%, 97%, до 98% и 99% идентичности последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45. Под термином "вариант полипептида" подразумевается полипептид, полученный из белка SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 или 46 путем удаления (т.н. усечение) или добавления одной или более аминокислот к N-концевой и/или C-концевой области нативного белка; путем удаления или добавления одной или более аминокислот на одном или более участках нативного белка; или путем замены одной или более аминокислот на одном или более участках нативного белка. Такие варианты получают, например, в результате генетического полиморфизма или манипуляций, совершенных человеком. Способы таких манипуляций хорошо известны специалистам.

Установлено, что полинуклеотидные молекулы и полипептиды изобретения охватывают полинуклеотидные молекулы и полипептиды с нуклеотидной или аминокислотной последовательностью, достаточно идентичной нуклеотидным последовательностям, представленным далее в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45, или аминокислотным последовательностям, представленным далее в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 или 46. Понятие "достаточно идентичный" подразумевает в настоящем документе первую аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая содержит достаточное или минимальное число аминокислотных радикалов или нуклеотидов, идентичных или эквивалентных (например, с похожей боковой цепочкой) второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности таким образом, что первая и вторая аминокислотная или нуклеотидная последовательности имеют общий структурный домен и/или общую функциональную активность.

"Идентичность последовательности" подразумевает ту меру, в какой две оптимально выровненные последовательности ДНК или аминокислоты неизменны на участке расположения компонентов, например, нуклеотидов или аминокислот. Понятие "относительное идентичное количество" для выровненных сегментов испытуемой или стандартной последовательности означает число идентичных компонентов в двух выровненных последовательностях, разделенное на общее число компонентов в сегменте стандартной последовательности, т.е. целой стандартной последовательности или меньшей определенной части стандартной последовательности. "Идентичное процентное отношение" означает относительное идентичное количество, умноженное на 100. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравни-

вания сравнительного участка хорошо известно специалистам и может осуществляться с помощью таких инструментов, как алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана, алгоритм гомологического выравнивания Нидлмана и Вунша, метод поиска сходства Пирсона и Липмана, и предпочтительно с помощью компьютеризированного обеспечения этих алгоритмов, такого как GAP, BESTFIT, FASTA и TFAS-TA, доступного как часть программного пакета GCG. Wisconsin Package (компания "Accelrys Inc. Burlington", Массачусетс).

Понятие "полинуклеотид", "последовательность нуклеиновой кислоты", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты" взаимозаменяемы и подразумевают в настоящем документе нуклеотиды, рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды или их комбинацию, в полимерной неразветвленной форме любой длины.

"Производные" белка включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие аминокислотные замещения, делеции и/или вставки относительно интересующего немодифицированного белка и имеющие схожую биологическую и функциональную активность, как у немодифицированного белка, из которого они получены.

"Гомологи" белка включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие аминокислотные замещения, делеции и/или вставки относительно интересующего немодифицированного белка и имеющие схожую биологическую и функциональную активность, как у немодифицированного белка, из которого они получены.

Удаление относится к устранению одной или более аминокислот из белка.

Термин "вставка" относится к одному или более аминокислотному остатку, который вводят в установленное место в белке. Вставки могут включать слияния N- и/или C-конца, а также вставки единичных или множественных аминокислот внутрь последовательности. Обычно, введения внутри аминокислотной последовательности будут меньше, чем объединения N- и C-конца, порядка примерно от 1 до 10 радикалов. Примеры белков или пептидов слияний N- и C-конца включают связывающий или активационный домен транскрипционного активатора, что использовано в двухгибридной системе дрожжей, фаговых белках оболочки, гистидин-6-маркере, глутатион S-трансфераза-маркере, белке A, связывающем мальтозу белке, дигидрофолат редуктазе, Tag-100 эпитопе, с-мик эпитопе, FLAG®-эпитоп, lacZ, CMP (калмодулин-связывающий белок), HA эпитопе, белок С эпитопе и VSV эпитопе.

Замещение означает замену аминокислот белков другими аминокислотами со схожими характеристиками (такими как схожая гидрофобность, гидрофильность, антигенность, склонность к формированию или разрушению α -спиральных или β -пластинчатых структур). Замещаются обычно аминокислоты единичными радикалами, но могут группироваться в зависимости от функциональных ограничений, наложенных на полипептид, и могут варьироваться от 1 до 10 аминокислот; вставки обычно составляют от 1 до 10 радикалов аминокислот. Замещения аминокислот предпочтительно консервативные. Таблицы консервативных замещений хорошо известны специалистам (например, см. Creighton (1984) *Proteins*. W.H. Freeman and Company (Eds).

Таблица 2. Примеры консервативных аминокислотных замещений

Остаток	Консервативные замещения	Остаток	Консервативные замещения
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu; Val		

Аминокислотные замещения, делеции и/или вставки могут осуществляться с использованием технологий синтеза пептидов, хорошо известных специалистам, например, пептидный синтез на твердой фазе, либо с помощью манипуляции с рекомбинантной ДНК. Методы манипуляции с последовательностями ДНК для осуществления замещения, делеции и/или вставки вариантов белков, хорошо известны в технологии. Например, методы создания мутантов путем замещений на predetermined сайтах ДНК известны специалистам и включают M13 мутагенез, T7-Gen in vitro мутагенез (USB, Cleveland, OH), сайт-специфический мутагенез по методу QuickChange (Stratagene, San Diego, CA), ПЦП-опосредованный сайт-специфический мутагенез или другие протоколы сайт-специфического мутагенеза.

"Производные" включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, которые по сравнению с аминокислотной последовательностью природной формы белка, такого как интересующий белок, могут вклю-

чать аминокислотные замещения с неестественно образующимися аминокислотными радикалами, либо присоединения неестественно образующихся аминокислотных радикалов. "Производные" белка также включают пептиды, олигопептиды, полипептиды, которые включают природные измененные (гликозилированные, ацилированные, пренилированные, фосфорилированные, миристоилированные, сульфатированные и др.) или неестественно измененные аминокислотные радикалы по сравнению с аминокислотной последовательностью природной формы полипептида. Производное может также содержать один или более неаминокислотный заместитель или присоединение, по сравнению с аминокислотной последовательностью, из которой оно получено, например, молекулу репортер или другой лиганд, ковалентно или не ковалентно связанный с аминокислотной последовательностью, такой как молекула репортер, которая связана для облегчения ее обнаружения, и неестественно образованные аминокислотные остатки, родственные аминокислотной последовательности природного белка. Кроме того, "производные" также включают слияния природной формы белка с маркерными пептидами, такими как FLAG, HIS6 или тиоредоксин (см. *Tetre, Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 523-533, 2003).

"Ортологи" и "паралоги" включают эволюционные понятия, описывающие наследственные взаимосвязи генов. Паралоги представляют собой гены одного и того же вида, образовавшиеся в результате дупликации наследственного гена; ортологи представляют собой гены разных организмов, образовавшиеся в результате видообразования, и также происходят от общего наследственного гена. Список примеров таких ортологов, не имеющий ограничительного характера, представлен в табл. 1.

Специалистам хорошо известно, что паралоги и ортологи могут иметь общие домены, содержащие подходящие аминокислотные радикалы на данных участках, такие как связывающие карманы для определенных субстратов или связывающие мотивы для взаимодействия с другими белками.

Понятие "домен" относится к набору аминокислот, которые являются консервативными на определенных позициях в выравнивании последовательностей эволюционно родственных белков. В то время как аминокислоты на других позициях могут различаться между гомологами, аминокислоты, являющиеся крайне консервативными в конкретных позициях, указывают на аминокислоты, которые вероятно имеют необходимую структуру, стабильность или функцию белка. Они идентифицируются по высокой степени консерватизма в выравниваемых последовательностях семейства белковых гомологов и могут использоваться в качестве идентификаторов для определения, принадлежит ли данный полипептид к ранее идентифицированному семейству полипептидов.

Понятие "мотив" или "согласованная последовательность" относится к короткому консервативному участку в последовательности эволюционных белков. Часто мотивы представляют собой особо сохраненные части доменов, могут включать только часть домена или находиться вне консервативного домена (если все аминокислоты мотива оказываются вне данного домена).

Для определения доменов существует специализированные базы данных, например, SMART (Schultz et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5857-5864; Letunic et al. (2002) *Nucleic Acids Res* 30, 242-244), InterPro (Mulder et al. (2003) *Nucl. Acids. Res.* 31, 315-318), Prosite (Bucher and Bairoch (1994), *Общий синтаксис профиля для мотивов биомолекулярных последовательностей и их функционирования при автоматизированной интерпретации последовательностей.* (B) ISMB-94; *Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology.* Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Eds., стр. 53-61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., *Nucl. Acids. Res.* 32:D134-D137, (2004)), или Pfam (Bateman et al., *Nucleic Acids Research* 30(1): 276-280 (2002)). Набор средств для *in silico* анализа белковых последовательностей доступен на сервере по протеомике ExPASy (Шведский институт биоинформатики ((Gasteiger et al., ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788(2003)). Домены и мотивы могут определяться с помощью стандартных техник, таких как выравнивание последовательностей.

Методы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны специалистам в данной области, эти методы включают GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA. В методе GAP используется алгоритм Нидлмана и Вунша ((1970) *J Mol Biol* 48: 443-453) для нахождения глобального (т.е. охватывающего последовательности целиком) выравнивания двух последовательностей, что делает число совпадений максимальным, а число пробелов - минимальным. С помощью алгоритма метода BLAST (Altschul et al. (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10) производится подсчет идентичности последовательности в процентном отношении и производит статистический анализ сходства двух последовательностей. Программное обеспечение для проведения BLAST анализа находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI). Гомологи можно легко определить с помощью, например, алгоритма программы ClustalW для множественного выравнивания последовательностей (версия 1.83) с установленными по умолчанию параметрами попарного выравнивания и с помощью метода расчета процентного соотношения. Глобальное процентное соотношение схожести и идентичности можно также определить с помощью одного из методов, доступных в пакете программы MatGAT (Campanella et al., *BMC Bio informatics.* 2003 Jul 10;4:29. MatGAT: приложение, которое образует матрицы схожести/идентичности, используя последовательности белков или ДНК). Специалисту известно, что может быть осуществлено небольшое изменение настроек для оптимизации выравнивания между консервативными мотивами. Кроме того, при идентификации гомологов вместо последовательностей с полной дли-

ной могут использоваться отдельные домены. Значение идентичности последовательности может быть определено по всей нуклеотидной или аминокислотной последовательности или выбранным доменам или консервативному мотиву (мотивам) с использованием упомянутых выше программ с параметрами по умолчанию. Для локального выравнивания, в частности, применим алгоритм Смита-Ватермана (Smith TF, Waterman MS (1981) J. Mol. Biol 147(1); 195-7).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что замещая один или несколько ключевых аминокислотных радикалов можно значительно повысить устойчивость или стойкость к гербицидам по сравнению с активностью ферментов PPO дикого типа с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 или 46. Предпочтительными замещениями мут-PPO являются те, которые повышают устойчивость растения к гербицидам, но существенно не влияют на биологическую активность оксидазы.

Соответственно согласно еще одной цели настоящего изобретения ключевые аминокислотные остатки PPO фермента, его варианта, производного, ортолога, паралога или гомолога замещаются любой другой аминокислотой.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, ключевые аминокислотные остатки PPO фермента, его варианта, производного, ортолога, паралога или гомолога замещаются консервативной аминокислотой, что показано в табл. 2.

Для специалистов будет понятно, что аминокислоты, расположенные близко к позициям указанных далее аминокислот, также могут быть замещены. Таким образом, в другом варианте осуществления изобретения вариант SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 или 46, его вариант, производное, ортолог, паралог или гомолог включают мут-PPO, причем ± 3 , ± 2 или ± 1 аминокислотные позиции из ключевой аминокислоты замещаются любой другой аминокислотой.

С помощью методов, хорошо известных специалистам, можно создать очень характерный образец последовательности, с помощью которого можно осуществлять поиск других вариантов мут-PPO с желаемой активностью.

Поиск других вариантов мут-PPO с помощью соответствующего образца последовательности также охватывается настоящим изобретением. Для специалиста будет очевидно, что данный образец последовательности не ограничивается точным расстоянием между двумя смежными аминокислотными радикалами этого образца. Каждое расстояние между двумя соседними радикалами в упомянутом образце может, например, варьироваться независимо друг от друга и составлять до ± 10 , ± 5 , ± 3 , ± 2 или ± 1 аминокислотных позиций, что не влияет существенно на желаемую активность.

Наряду с упомянутым выше функциональным и пространственным анализом индивидуальных аминокислотных остатков, основанном на кристаллографических данных, полученных согласно настоящему изобретению, может определяться характеристика уникальных частичных аминокислотных последовательностей для потенциально применимых вариантов мут-PPO.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения, вариант или производное мут-PPO SEQ ID NO: 2 выбирают из следующей табл. 3а, а комбинированные аминокислотные замещения мут-PPO SEQ ID NO: 2 - из табл. 3б.

Таблица 3а. Последовательность SEQ ID NO: 2, 26, 38, 40: замещения единичных аминокислот

SEQ ID NO:	Ключевая аминокислота	Предпочтительное замещение	Общее замещение
2	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
2	Gly175	делеция, Ala, Val, Pro	делеция, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr

029356

2	Gly209	делеция, Ala, Val, Pro	делеция, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
2	Gly210	делеция, Ala, Val, Pro	делеция, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
2	Leu295	Ser, Met, Ala	Ser, Met, Ala, Val, Asp, Asn Thr
2	Ser296	Leu, Met, Gly	Leu, Met, Gly, Val, Asp, Asn Thr
2	Leu334	Val, Ile, Phe	Val, Ile, Phe, Tyr, Asn, Asp, Thr
2	Phe353	Тыр, Leu	Тыр, Leu, Val, Ile, Asn
2	Gly382	Ala, Ser,Thr	Ala, Ser,Thr, Cys, Val, Asp
2	Leu384	Ala, Val, Ile	Ala, Val, Ile, Asn, Asp, Thr
2	Leu397	Ala, Val, Ile	Ala, Val, Ile, Asn, Asp, Thr
2	Gly398	Ala, Ser,Thr	Ala, Ser,Thr, Cys, Val, Asp
2	Thr399	Ser, Cys	Ser, Cys, Met, Ala, Asn
2	Leu400	Ala, Val, Ile, Phe	Ala, Val, Ile, Phe, Asn, Asp, Thr
2	Ser402	Gly, Ala, Cys	Gly, Ala, Cys, Asp, His
2	Ser403	Gly, Ala, Cys	Gly, Ala, Cys, Asp, His
2	Met404	Ser, Cys, Thr	Ser, Cys, Thr, Gly, Ala
2	Met405	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Gly, Cys, Ser
2	Phe420	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu, Thr
2	Phe439	Тыр, Trp	Тыр, Trp, Ala, Val, Ile
26	Val389	Met, Ala, Cys	Met, Ala, Cys, His
38	Ala220	делеция, Val, Thr, Leu, Cys, Ile	делеция, Val, Thr, Leu, Cys, Ile, Met
38	S305	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val
38	Тыр426	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
40	Gly178	делеция, Ala, Val, Pro	делеция, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
40	Gly179	делеция, Ala, Val, Pro	делеция, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
40	Phe372	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Phe	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Phe, Leu, Thr
40	Phe392	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu Thr

Таблица 3b. SEQ ID NO: 2 (комбинированные аминокислотные замещения)

Комбинация №	Ключевая аминокислотная позиция	Предпочтительные	Общие
		Замещения	
1	Gly209 или Gly210	делеция, Ala, Val, Pro	делеция, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
2	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
	Leu295	Ser, Met, Ala	Ser, Met, Ala, Val, Asp, Asn Thr
3	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
	Ser296	Leu, Met, Gly	Leu, Met, Gly, Val, Asp, Asn Thr
4	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
5	Gly209 или Gly210	делеция, Ala, Val, Pro	делеция, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr

Следует понимать, что любая аминокислота, кроме указанных выше в табл. 3, может использоваться в качестве заместителя. Образцы для тестирования функциональности таких мутантов доступны в уровне техники и, соответственно, описаны в разделе Примеры настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности PPO SEQ ID NO: 2 в одном или нескольких следующих положениях: 128, 175, 209, 210, 295, 296, 334, 353, 382, 384, 397, 398, 399, 400, 402, 403, 404, 405, 420, 439.

Примеры различий в данных аминокислотных положениях включают, помимо прочего, одно или несколько из следующих различий: аминокислота в положении 128 не является аргинином; аминокислота в положении 175 не является глицином; аминокислота в положении 209 не является глицином; аминокислота в положении 210 не является глицином; аминокислота в положении 295 не является лейцином; аминокислота в положении 296 не является серином; аминокислота в положении 334 не является лейцином; аминокислота в положении 353 не является фенилаланином; аминокислота в положении 382 не является глицином; аминокислота в положении 384 не является лейцином; аминокислота в положении 397 не является лейцином, аминокислота в положении 398 не является глицином, аминокислота в положении 399 не является треонином, аминокислота в положении 400 не является лейцином, аминокислота в положении 402 не является серином, аминокислота в положении 403 не является серином, аминокислота в положении 404 не является метионином, аминокислота в положении 405 не является метионином, аминокислота в положении 420 не является фенилаланином, аминокислота в положении 439 не является фенилаланином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, PPO ферменты SEQ ID NO: 2 содержат один или несколько следующих элементов:

аминокислота в положении 128 - Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp или Asn; аминокислота в положении 175 удалена, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser или Thr; аминокислота в положении 209 удалена, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser или Thr; аминокислота в положении 210 удалена, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser или Thr; аминокислота в положении 295 - Ser, Met, Ala, Val, Asp, Asn или Thr; аминокислота в положении 296 - Leu, Met, Gly, Val, Asp, Asn или Thr; аминокислота в положении 334 - Val, Ile, Phe, Tyr, Asn, Asp или Thr; аминокислота в положении 353 - Tyr, Leu, Val, Ile или Asn; аминокислота в положении 382 - Ala, Ser, Thr, Cys, Val или Asp; аминокислота в положении 384 - Ala, Val, Ile, Asn, Asp, или Thr; аминокислота в положении 397 - Ala, Val, Ile, Asn, Asp или Thr, аминокислота в положении 398 - Ala, Ser, Thr, Cys, Val или Asp, аминокислота в положении 399 - Ser, Cys, Met, Ala или Asn, аминокислота в положении 400 - Ala, Val, Ile, Phe, Asn, Asp или Thr, аминокислота в положении 402 - Gly, Ala, Cys, Asp, или His, аминокислота в положении 403 - Gly, Ala, Cys, Asp или His, аминокислота в положении 404 - Ser, Cys, Thr, Gly или Ala, аминокислота в положении 405 - Leu, Ala, Val, Gly, Cys или Ser, аминокислота в положении 420 - Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu или Thr, аминокислота в положении 439 - Tyr, Trp, Ala, Val или Ile.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности PPO SEQ ID NO: 26 в положении 389. Предпочтительно аминокислота в положении 389 не является валином. Более предпочтительно аминокислота в положении 389 - Met, Ala, Cys или His.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности PPO SEQ ID NO: 38 в одном или нескольких следующих положениях: 220, 305, 426. Предпочтительно аминокислота в положении 220 не является аланином, аминокислота в положении 305 не является серином, аминокислота в положении 426 не является тирозином.

Более предпочтительно аминокислота в положении 220 удалена, Val, Thr, Leu, Cys, Ile или Met; аминокислота в положении 305 - Leu, Ala, Val, аминокислота в положении 426 - Met, Cys, Ile, Leu или Thr.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности PPO SEQ ID NO: 40 в одном или нескольких следующих положениях: 178, 179, 372, 392. Предпочтительно аминокислота в положении 178 не является глицином, аминокислота в положении 179 не является глицином, аминокислота в положении 372 не является фенилаланином, аминокислота в положении 392 не является фенилаланином.

Более предпочтительно аминокислота в положении 178 удалена, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser или Thr; аминокислота в положении 179 удалена, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser или Thr; аминокислота в положении 372 - Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Phe, Leu или Thr; аминокислота в положении 392 - Met, Cys, Ile, Tyr, Trp или Leu.

Специалистам в данной области известно, как определить консервативные участки и мотивы, общие для гомологов, ортологов и паралогов SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45, такие как те, что приведены в табл. 1. После определения таких консервативных участков, которые могут представлять собой подходящие связывающие мотивы, можно выбрать аминокислоты, соответствующие аминокислотам, перечисленным в табл. 3а и 3б, которые можно заменить любой другой аминокислотой, предпочтительно консервативными аминокислотами, указанными в табл. 2, и более предпочтительно аминокислотами из табл. 3а и 3б.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу определения гербицида - производного бензоксазинона с использованием мут-РРО, кодированной нуклеиновой кислотой с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45 или ее вариантом или производной.

Данный способ включает следующие этапы:

а) образование трансгенной клетки или растения, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую мут-РРО, где мут-РРО экспрессирована;

б) нанесение гербицида - производного бензоксазинона на трансгенную клетку или растение пункта а) и на контрольную клетку или растение того же сорта;

с) определение роста или жизнеспособности трансгенной клетки или растения и контрольной клетки или растения после нанесения указанного гербицида - производного бензоксазинона, и

д) отбор "гербицидов - производных бензоксазинона", придают уменьшенный рост контрольной клетке или растению по сравнению с ростом трансгенной клетки или растения.

Под "контрольной клеткой" или "похожим, дикого типа, растением, тканью растения, клеткой растения или клеткой-хозяином" подразумевается растение, ткань растения, клетка растения или клетка-хозяин, соответственно, у которых отсутствуют характеристики стойкости к гербицидам и/или особый нуклеотид, что описано в настоящем изобретении. Понятие "дикий тип", таким образом, не подразумевает, что растение, ткань растения, клетка растения или другая клетка-хозяин не имеет рекомбинантную ДНК в геноме, и/или не обладает характеристикой стойкости к гербицидам, отличной от тех, которые описаны в настоящем документе.

Другая задача настоящего изобретения относится к способу идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мут-РРО, которая является стойкой или устойчивой к гербициду - производному бензоксазинона. Способ включает следующее:

а) создание библиотеки мут-РРО-кодирующих нуклеиновых кислот,

б) скрининг популяции полученных мут-РРО-кодирующих нуклеиновых кислот путем экспрессии каждой из указанных нуклеиновых кислот в клетке или растении и обработки указанной клетки или растения производным бензоксазинона,

с) сравнение уровней устойчивости к производному бензоксазинона, предоставляемых указанной популяцией мут-РРО-кодирующих нуклеиновых кислот с уровнем устойчивости к производному бензоксазинона, предоставляемым контрольной РРО-кодирующей нуклеиновой кислотой,

д) отбор по меньшей мере одной мут-РРО-кодирующей нуклеиновой кислоты, которая предоставляет значительно повышенный уровень устойчивости к производному бензоксазинона по сравнению с уровнем, предоставляемым контрольной РРО-кодирующей нуклеиновой кислотой.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мут-РРО-кодирующая нуклеиновая кислота, выбранная на этапе d), показывает устойчивость или стойкость клетки или растения к гербициду - производному бензоксазинона выше по меньшей мере в два раза по сравнению с устойчивостью контрольной мут-РРО-кодирующей нуклеиновой кислоты.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения мут-РРО-кодирующая нуклеино-

вая кислота, выбранная на этапе d), показывает стойкость или устойчивость клетки или растения к гербициду - производному бензоксазинона, выше по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере во 100 раз, по меньшей мере в 500 раз по сравнению с устойчивостью, которая обеспечивается контрольной РРО-кодирующей нуклеиновой кислотой.

Стойкость или устойчивость может быть определена путем получения трансгенного растения или клетки-хозяина, предпочтительно клетки растения с последовательностью нуклеиновой кислоты из библиотеки на этапе a), и путем сравнения этого трансгенного растения с контрольным растением или клеткой-хозяином, предпочтительно клеткой растения.

Другая задача изобретения относится к способу идентификации растения или водоросли, которые содержат нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую РРО дикого типа или мут-РРО, которые являются стойкой или устойчивой к гербициду - производному бензоксазинона. Способ включает следующее:

- a) определение эффективного количества гербицида - производного бензоксазинона в культуре клеток растения или зеленой водоросли, которое ведет к гибели указанной клетки.
- b) обработка указанных клеток растения или зеленой водоросли мутирующим агентом,
- c) воздействие на указанные мутировавшие клеточные популяции эффективным количеством гербицида - производного бензоксазинона, определенным на этапе a),
- d) отбор по меньшей мере одной клетки, выжившей после этих испытаний,
- e) ПЦР-амплификация и секвенирование РРО генов из клеток, отобранных на этапе d), и сравнение этих последовательностей с генными последовательностями РРО дикого типа соответственно.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанным мутирующим агентом является этилметансульфонат (ЭМС).

Специалистам в данной области хорошо известны методы для получения подходящих вариантов нуклеиновых кислот для идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей мут-РРО, из множества различных потенциальных материнских организмов, включающих микробы, растения, грибы, водоросли, смешанные культуры и т.д., а также из природных источников ДНК, таких как почва. Эти методы включают, помимо прочего, подготовку библиотек кДНК или геномной ДНК, использование подходящих дегенеративных олигонуклеотидных праймеров, использование зондов, основываясь на известных последовательностях или структурном анализе комплементации (например, рост под воздействием тирозина), а также использование мутагенеза и смешения для получения рекомбинантных или смешанных последовательностей, кодирующих мут-РРО.

Нуклеиновые кислоты, содержащие варианты или контрольные последовательности, кодирующие РРО, могут экспрессироваться в дрожжах, в бактериальном штамм-хозяине, водорослях или высших растениях, таких как табак или арабидопсис, и проходят проверку на относительные уровни наследственной устойчивости последовательностей, кодирующих РРО, основанную на визуальном определении фенотипа трансформированного штамма или растения в присутствии разных концентраций выбранного гербицида - производного бензоксазинона. Данные о зависимости между дозой и эффектом или изменением в эффекте доз, связанные с такими индикаторными фенотипами (формирование коричневого цвета на листьях, подавление роста растений, воздействие гербицидов и т.д.) удобно выражать в виде значений GR50 (концентрация, при которой скорость роста растений снижается на 50%) или МИК (минимальная ингибирующая концентрация), где увеличение значений соответствует повышению врожденной устойчивости экспрессированной РРО. Например, при системе экспресс-анализа, основанной на трансформации бактерии, такой как *E. coli*, каждая последовательность, кодирующая мут-РРО, может экспрессироваться, например, как последовательность ДНК под экспрессионным контролем контролируемого промотора, такого как промотор *lacZ*, учитывая такие показатели (например, с использованием синтетической ДНК), как частота использования кодонов, для получения по возможности аналогичного для разных последовательностей РРО уровня экспрессии. Такие штаммы, экспрессирующие нуклеиновые кислоты, включающие альтернативные варианты последовательностей РРО, могут быть высеяны при различных концентрациях выбранного гербицида - производного бензоксазинона, дополнительно, в среде с тирозином, и можно определить относительные уровни наследственной устойчивости экспрессированных РРО ферментов на основе степени и минимальной ингибирующей концентрации (МИК, МПК) ингибирования образования с коричневым хронотическим пигментом.

В другом варианте осуществления изобретения возможные аминокислоты трансформируются в растительный материал для получения трансгенного растения, который регенерируется в морфологически нормальные плодоносные растения, у которых затем измеряют дифференциальную устойчивость к выбранным гербицидам - производным бензоксазинона. Специалистам хорошо известны многие подходящие методы трансформации, в которых используются маркеры отбора, такие как канамицин, бинарные векторы, такие как векторы, полученные из агробактерии и регенерации растения, например, из листовых дисков табака. Дополнительно, контрольная популяция растений таким же образом трансформируется нуклеиновой кислотой, экспрессирующей контрольную РРО. В качестве альтернативы, в качестве контрольного может использоваться нетрансформированное двудольное растение, такое как арабидопсис

или табак, так как оно, в любом случае, экспрессирует свою собственную эндогенную PPO. Среднее значение и распределение уровней устойчивости к гербициду, характеризующих результаты первичной трансформации растения или его потомства, на которое влияет производное бензоксазинона, описанное выше, рассчитывают обычным способом, учитывая повреждение растения, симптомы меристемного отбеливания и т.д., при различных концентрациях гербицидов. Эти данные могут быть выражены в виде, например, значений GR50, полученных из кривой зависимости "доза-эффект", где значение дозы отмечается на оси абсцисс, а на оси ординат отмечаются "процент погибших растений", "эффект гербицида", "количество молодых всходов" и т.д., где увеличение значений GR50 соответствует повышению уровня врожденной устойчивости экспрессированной PPO. Гербициды можно применять до всхода растений или после.

Другая задача изобретения относится к изолированной мут-PPO-кодирующей нуклеиновой кислоте, при этом нуклеиновая кислота может быть идентифицирована описанным выше методом.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к клетке растения, трансформированной нуклеиновой кислотой PPO дикого типа или мут-PPO нуклеиновой кислотой, или к клетке растения, которую подвергли мутации для получения растения с экспрессией нуклеиновой кислоты PPO дикого типа или мут-PPO нуклеиновой кислоты, причем экспрессия нуклеиновой кислоты в клетке растения приводит к повышению стойкости или устойчивости к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с клеткой растения дикого типа.

Понятие "экспрессия/экспрессирование" или "экспрессия генов" означает транскрипцию специфического гена или генов или генетической конструкции. Понятие "экспрессия" или "экспрессия генов", в частности, означает транскрипцию специфического гена или генов или генетической конструкции в структурную РНК (рРНК, тРНК) или мРНК с последующей трансляцией последней в белок или без трансляции. Этот процесс включает транскрипцию ДНК и обработку полученного продукта мРНК.

Для получения желаемого эффекта, т.е. растений, устойчивых или стойких к гербицидам - производным бензоксазинона, описанным в настоящем изобретении, по меньшей мере одна нуклеиновая кислота подвергается сверхэкспрессии методами и способами, известными специалистам в данной области.

Понятие "повышенная экспрессия" или "сверхэкспрессия", используемое в настоящем документе, означает любую форму экспрессии, которая является дополнительной к первоначальному уровню экспрессии растения дикого типа. Методы повышения экспрессии генов или генных продуктов описаны в документах данной области и включают, например, сверхэкспрессию, которой способствуют соответствующие промоторы, усилители транскрипции или трансляции. Изолированные нуклеиновые кислоты, которые служат промоторами или усилительными элементами, могут быть введены в соответствующую позицию (обычно против хода транскрипции) негетерологичной формы полинуклеотида для повышающей регуляции экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой полипептид. Например, эндогенные промоторы можно изменить в естественных условиях путем мутации, удаления и/или замещения (см. Kmiec, US 5565350; Zarling et al., WO 9322443), или изолированные промоторы можно ввести в клетку растения в надлежащем направлении и на надлежащем расстоянии от гена настоящего изобретения для контроля экспрессии гена.

Если необходима экспрессия полипептида, желательно включить полиаденильный участок 3'-конца на участке, кодирующем полинуклеотид. Полиаденильный участок можно получить из природного гена, набора других растительных генов или Т-ДНК. Добавляемую последовательность 3'-конца можно получить, например, из генов нопалин синтазы или октопин синтазы, или также из другого растительного гена, или, менее предпочтительно из любого другого эукариотического гена.

Для увеличения количества готовой информации, которая накапливается в цитозоли, к 5' нетранслируемой области (UTR) или кодирующей последовательности частично кодирующей последовательности может быть также добавлена интронная последовательность. Включение связывающего интрона в транскрипционный элемент как в растительные, так и животные экспрессионные конструкции повысило экспрессию генов на уровнях мРНК и белков до 1000-кратного уровня (Buchman and Berg (1988) Mol. Cell Biol. 8: 4395-4405; Callis et al. (1987) Genes Dev 1:1183-1200). Такое интронное увеличение генной экспрессии обычно максимально возле 5'-конца транскрипционного элемента. Использование кукурузных интронов Adh1-S интрон 1, 2 и 6, интрон Bronze-1 известны специалистам. Для получения общей информации см.: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994).

Понятия "внедрение" и "трансформация" обозначают здесь перенос экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяина, независимо от способа передачи. Ткань растения, способная к дальнейшему клоновому размножению, путем органогенеза либо эмбриогенеза, может быть трансформирована с генетическим конструктом настоящего изобретения и всем растением, регенерированным из него. Определенная выбранная ткань будет различаться в зависимости от систем клонового размножения, доступных и наиболее подходящих определенным видам, проходящим трансформацию. Образцы целевых тканей включают листовые диски, пыльцу, зародыши, семядоли, гипокотилы, мегагаметофиты, ткани каллюсов, существующую меристемную ткань (например, верхушечная меристема, пазушные почки и корневые меристемы) и индуцированную меристемную ткань (например, семядольная меристема и гипокотиловая меристема). Полинуклеотид может быть внедрен в клетку-хозяина на время или постоянно и может сохра-

няться в неизменном виде, например, в виде плаزمиды. Либо он может быть интегрирован в главный геном. Полученная трансформированная растительная клетка может использоваться для регенерации трансформированного растения, способами, которые известны специалистам в данной области.

Перенос инородных генов в геном растения называется трансформацией. В настоящее время трансформация растительных видов является широко распространенной технологией. Преимущественно, любой из способов трансформации может использоваться для внедрения интересующего гена в подходящую клетку-предка. Описанные способы трансформации и регенерации растений из тканей и клеток растения могут использоваться для переходной или устойчивой трансформации. Способы трансформации включают использование липосом, электропорацию, химикаты, увеличивающие поглощение свободной ДНК, ввод ДНК непосредственно в растение, обстрел из генной пушки, трансформацию с использованием вирусов, пыльцы или микропроекции. Также может использоваться один из способов использования кальция/полиэтилен гликоля для протопластов (Krens, F.A. et al. (1982) *Nature* 296, 72-74; Negrutiu I et al. (1987) *Plant Mol Biol* 8: 363-373); электропорация протопластов (Shillito R. D. et al. (1985) *Bio/Technol* 3, 1099-1102); микроинъекция в растительный материал (Crossway A et al., (1986) *Mol. Gen Genet* 202: 179-185); обстрел частиц, покрытых ДНК или РНК (Klein T.M. et al., (1987) *Nature* 327: 70) заражение (неинтегративными) вирусами и другие подобные способы. Трансгенные растения, включая трансгенные сельскохозяйственные культуры, предпочтительно производятся с помощью *Agrobacterium*-зависимой трансформации.

Предпочтительный способ трансформации представляет собой трансформацию *in planta*. Для этой цели можно позволить агробактериям действовать на семенах растения или произвести инокуляцию меристемы растения агробактериями. Для целей настоящего изобретения, было признано особенно целесообразным, чтобы суспензия трансформированных агробактерий воздействовала на целое растение или на зачаток цветка. Затем происходит развитие растения до появления семян (Clough and Bent, *Plant J.* (1998) 16, 735-743). Способы трансформации риса с помощью *Agrobacterium* включают известные способы трансформации риса, например, описанные в любом из следующих источников: Заявка на европейский патент EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491-506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271-282, 1994), чьи сообщения с раскрытием информации включены в отсылочном порядке, как если бы они были полностью изложены в тексте документа. В случае трансформации кукурузы, предпочтительно используется способ, описанный либо в работах Ishida et al. (*Nat.* 14(6): 745-50, 1996) либо Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002), данные документы включены в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Указанные методы также описаны, например, в B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, а также в: *Transgenic Plants*, Том 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 и в Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Нуклеиновые кислоты или конструкт, подлежащий экспрессии, предпочтительно клонируется в вектор, который подходит для трансформации *Agrobacterium tumefaciens*, например, pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). Агробактерий, трансформированные таким вектором, могут затем использоваться известным способом для трансформации растений, например, растений, используемых в качестве модели, например, *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* в рамках настоящего изобретения не считается сельскохозяйственной культурой), или сельскохозяйственных культур, таких как, к примеру, табак, путем, например, погружения дробленых или рубленых листьев в агробактериальные растворы и затем культивирования их в подходящей среде. Трансформация растений посредством *Agrobacterium tumefaciens* описана, например, Höfgen and Willmitzer в *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 или, помимо прочего, известны из F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in *Transgenic Plants*, том 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, стр. 15-38.

В дополнение к трансформации соматических клеток, которые затем регенерируются в целое растение, существует возможность трансформации клеток растительных меристем, в особенности тех клеток, которые становятся гаметами. В данном случае, развитие трансформированных гамет происходит естественным путем, образуя трансгенные растения. Так, например, семена *Arabidopsis* обрабатывают агробактериями, и из развивающихся растений получают семена, определенное количество которых являются трансформированными, т.е. трансгенными [Feldman, K.A. and Marks M.D. (1987), *Mol Gen Genet* 208:274-289; Feldmann K. (1992). В: C Koncz, N-H Chua and J Shell, eds, *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific, Singapore, стр. 274-289]. Альтернативные способы основаны на повторяющемся удалении соцветий и выращивании области вырезания в центре розетки с трансформированными агробактериями, таким образом, трансформированные семена могут быть получены на более поздних сроках (Chang (1994). *Plant J.* 5: 551-558; Katavic (1994). *Mol Gen Genet*, 245: 363-370). Однако особенно эффективным является способ вакуум-инфильтрации с такими модификациями как способ "цветочного погружения". В случае вакуум-инфильтрации *Arabidopsis*, целые растения обрабатываются под сниженным давлением суспензией агробактерий [Bechthold, N. (1993). *C. R. Acad Sci Paris Life Sci*, 316: 1194-1199], тогда как в случае протокола, называемого "floral-dip" (обмакивание цветков в раствор) развивающаяся цветочная ткань инкубируется с использованием обработанной сурфактантом агробактериальной суспензии [Clough, S.J. and Bent A.F. (1998) *The Plant J.* 16, 735-743]. В обоих случаях собирается определенное количество трансгенных семян, данные семена отличаются от нетрансгенных семян, тем, что вы-

растиваются в вышеописанных селекционных условиях. Кроме того, устойчивая трансформация пластид является предпочтительной, так как пластиды наследуются по материнской линии, следовательно, для большинства культур сокращается или исключается риск трансгенного потока через пыльцу. Трансформация хлоропластного генома обычно достигается благодаря процессу, схематически описанному в работах Klaus et al., 2004 [Nature Biotechnology 22 (2), 225-229]. Последовательности, подлежащие трансформации, клонируются вместе с геномом селективируемого маркера между фланкирующими последовательностями, которые являются гомологическими по отношению к геному хлоропласта. Данные гомологические фланкирующие последовательности попадают в пластом путем прямой специфической интеграции. Пластидная трансформация описана для многих видов растений, общий обзор которой дан в Воск (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J Mol Biol. 2001 Sep 21; 312 (3):425-38 или Maliga, P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. Trends Biotechnol. 21, 20-28. Результатом дальнейшего биотехнологического развития стали пластидные трансформанты без маркеров, которые могут быть получены переходным коинтегрированным геном-маркером (Klaus et al., 2004, Nature Biotechnology 22(2), 225-229). Генетически модифицированные клетки растений могут быть регенерированы с помощью любых способов, известных специалистам. Подходящие способы можно найти в вышеперечисленных публикациях S.D. Kung and R. Wu, Potrykus или Höfgen and Willmitzer.

Обычно после трансформации клетки растений или группы клеток выбирают по наличию одного или более маркеров, закодированных экспрессируемыми в растении генами, которые переносятся вместе с целевым геном, после чего данный трансформированный материал регенерируется в целое растение. Чтобы выбрать трансформированные растения, растительный материал, полученный в ходе трансформации, как правило, подвергается таким селективным условиям, чтобы трансформированные растения можно было отличить от нетрансформированных. Например, семена, полученные описанным способом, могут быть засеяны, а после начального этапа роста подвергнуты подходящему способу селекции путем распыления. Еще один возможный способ заключается в выращивании семян, при необходимости прошедших стерилизацию, в чаше с агаром с использованием подходящего селективного вещества, так, чтобы в растениях произрастали только трансформированные семена. В качестве альтернативы, может быть произведен скрининг трансформированных растений на наличие вышеописанного селективируемого маркера.

После переноса ДНК и регенерации, предположительно трансформированные растения могут быть также исследованы с использованием Саузерн анализа на наличие целевого гена, номера копии и/или геномной организации. В качестве альтернативы или дополнения, уровни экспрессии вновь введенной ДНК могут исследоваться с использованием Нозерн-анализа и/или Вестерн-анализа, оба способа хорошо известны специалистам.

Генерированные трансформированные растения могут размножаться различными способами, например, клональным размножением или классическим способом разведения растений. Например, первое поколение (или T1) трансформированного растения может иметь способность к самооплодотворению, могут быть выбраны трансформированные клетки гомозиготного второго поколения (или T2), а растения T2 могут затем размножаться классическими способами разведения растений. Генерированные трансформированные организмы могут принимать различные формы. Например, это могут быть гибриды трансформированных и нетрансформированных клеток; клоновые трансформированные клетки (например, все трансформированные клетки содержат экспрессию кассет); графты трансформированных и нетрансформированных тканей (например, в растениях трансформированный корневой отпрыск пересаживается в нетрансформированный побег).

Предпочтительно нуклеиновая кислота дикого типа или мут-РРО нуклеиновая кислота содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей: а) полинуклеотид, как показано в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45 или его вариант или производное; б) полинуклеотид, кодирующий полипептид, как показано в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 или 46 или его вариант или производное; в) полинуклеотид, содержащий по меньшей мере 60 последовательных нуклеотидов а) или б); и д) полинуклеотид, являющийся комплементарным по отношению к полинуклеотиду по любому из пп. а) - в).

Предпочтительно экспрессия нуклеиновой кислоты в растении приводит к повышению стойкости растения к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с растением дикого типа.

В другом варианте осуществления, изобретение относится к растению, предпочтительно трансгенному растению, включающему растительную клетку согласно настоящему изобретению, в котором экспрессия нуклеиновой кислоты в растении приводит к повышению стойкости растения к гербицидам - производным бензоксазинона по сравнению с растениями дикого типа.

Растения, описанные в настоящем документе, могут быть как трансгенными зерновыми культурами, так и нетрансгенными растениями.

Для целей настоящего изобретения, "трансгенный", "трансген" или "рекомбинантный" означает в отношении, например, последовательности нуклеиновой кислоты, экспрессионную кассету, генный кон-

структ или вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, или организм, трансформированный последовательностями нуклеиновой кислоты, экспрессионными кассетами или векторами согласно настоящему изобретению, все эти конструкции, полученные рекомбинантными методами, в которых:

(а) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие белки, использованные в методах настоящего изобретения, или

(b) генетическая контрольная последовательность(и), которая функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты по данному изобретению, например, промотор, или

(с) а) и b)

не расположены в их естественной генетической среде или были изменены рекомбинантными методами, причем модификация может иметь форму, например, замены, добавления, делеции, инверсии или вставки одного или более нуклеотидных остатков. Под естественной генетической средой подразумевают естественный геномный или хромосомный локус в исходном растении или нахождение в геномной библиотеке. В случае геномной библиотеки, естественная генетическая среда последовательности нуклеиновой кислоты предпочтительно сохраняется, по меньшей мере, частично. Среда примыкает к последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере с одной стороны и имеет последовательность длиной по меньшей мере 50 п.о., предпочтительно по меньшей мере 500 п.о., особенно предпочтительно по меньшей мере 1000 п.о. и наиболее предпочтительно по меньшей мере 5000 п.о. Природная кассета экспрессии - например, природная комбинация природного промотора последовательностей нуклеиновой кислоты с соответствующей последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, подходящий для способов настоящего изобретения, как определено выше, становится трансгенной кассетой экспрессии, когда кассета экспрессии изменяется с помощью не природных, синтетических ("искусственных") методов, таких как, например, мутагенная обработка. Подходящие методы описаны, например, в US 5565350 или WO 00/15815.

Таким образом, при использовании понятия "трансгенное растение" в целях изобретения подразумевается, как указано выше, что нуклеиновые кислоты, используемые в способе изобретения, находятся не в естественном локусе генома указанного растения, поэтому нуклеиновые кислоты могут экспрессироваться гомологически или гетерологически. Тем не менее, как было отмечено, трансгенный означает также, что, так как нуклеиновые кислоты согласно изобретению или используемому методу находятся в природной позиции в геноме растения, последовательность была изменена по отношению к природной последовательности, и/или регуляторные последовательности природных последовательностей были изменены. Под понятием "трансгенный" предпочтительно понимается экспрессия нуклеиновых кислот по изобретению в неестественном локусе генома, т.е. происходит гомологическая или предпочтительно гетерологическая экспрессия нуклеиновых кислот. Предпочтительные трансгенные растения указаны в данном документе. Также понятие "трансгенный" относится к любому растению, клетке растения, каллосу, ткани растения или части растения, которые содержат все или часть по меньшей мере одного рекомбинантного полинуклеотида. Во многих случаях, все или часть рекомбинантного полинуклеотида прочно интегрирована в хромосому или стабильный внехромосомный элемент для того, чтобы передаться следующим поколениям. Для целей настоящего изобретения, понятие "рекомбинантный полинуклеотид" относится к полинуклеотиду, который был изменен, перегруппирован или изменен с помощью генной инженерии. Примеры включают любой клонированный полинуклеотид или полинуклеотиды, соединенные или присоединенные к гетерологическим последовательностям. Понятие "рекомбинантный" не относится к изменениям полинуклеотидов, которые были получены в результате естественных процессов, таких как спонтанные мутации, или в результате неспонтанного мутагенеза, а затем селекции.

Растения, содержащие мутации в результате неспонтанного мутагенеза и селекции, являются в настоящем документе нетрансгенными растениями и включены в настоящее изобретение. В вариантах осуществления изобретения, где растение является трансгенным и включает множество мут-РРО нуклеиновых кислот, нуклеиновые кислоты можно получить из разных геномов или одного и того же генома. В качестве альтернативы, в вариантах осуществления изобретения, где растение является нетрансгенным и включает множество нуклеиновых кислот мут-РРО, нуклеиновые кислоты расположены в разных геномах или одном и том же геноме.

В определенных вариантах осуществления изобретения, настоящее изобретение включает стойкие к гербицидам растения, полученные мутационным разведением. Такие растения включают полинуклеотид, кодирующий мут-РРО, и являются устойчивыми к одному или нескольким гербицидам - производным бензоксазинона. Такие методы могут включать, например, воздействие на растения или семена мутагеном, в частности, химическим мутагеном, таким как, например, этил метансульфонат (ЭМС), и отбор растений с повышенной устойчивостью по меньшей мере к одному или нескольким гербицидам - производным бензоксазинона.

Тем не менее, настоящее изобретение не ограничивается устойчивыми к гербицидам растениями, полученными методом мутагенеза, включающим химический мутаген ЭМС. Любой метод мутагенеза, известный специалистам, может быть использован для получения стойких к гербицидам растений настоящего изобретения. Такие методы мутагенеза могут включать, например, использование любого или

нескольких из следующих мутагенов: излучение, такое как рентгеновское излучение, гамма-излучение (например, кобальт 60 или цезий 137), нейтроны (например, продукт ядерного распада урана 235 в атомном реакторе), бета-излучение (например, от радиоизотопов, таких как фосфор 32 или углерод 14) и ультрафиолетовое излучение (предпочтительно от 2500 до 2900 нм), и химические мутагены, такие как основные аналоги (например, 5-бром-урацил), сопутствующие соединения (например, 8-этокси кофеин), антибиотики (например, стрептомицин), алкилирующие агенты (например, сернистые иприты, азотные иприты, эпоксиды, этиленамины, сульфаты, сульфонаты, сульфоны, лактоны), азид, гидроксилламин, азотистая кислота. Растения, стойкие к гербицидам, можно также получить с использованием методов разведения тканей для отбора клеток растения, включающих стойкие к гербицидам мутации, а затем регенерирования из них растений, стойких к гербицидам. См., например, патенты США № 5773702 и 5859348, которые оба включены в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме. Остальные детали разведения мутацией можно найти в работе "Principals of Cultivar Development" Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В дополнение к описанному выше определению, понятие "растение" включает сельскохозяйственные культуры на любой стадии спелости или развития, а также любые ткани или органы (части растения), полученные от любого такого растения, если контекстом не подразумевается иное. Части растений включают, помимо прочего, стебли, корни, цветы, семяпочки, тычинки, листья, зародыши, меристематические участки, ткань каллюса, культуры с пыльником, гаметофиты, спорофиты, цветень, микроспоры, протопласты и т.д.

Растение настоящего изобретения включает по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту мут-РРО или сверхэкспрессированную нуклеиновую кислоту РРО дикого типа, и имеет повышенную устойчивость к гербицидам - производным бензоксазинона по сравнению с растением дикого типа. Растения настоящего изобретения могут иметь сложно структурированные РРО нуклеиновые кислоты дикого типа или мут-РРО из разных геномов, так как эти растения могут содержать более одного генома. Например, растение содержит два генома, которые обычно называют геномами А и В. Так как РРО является необходимым метаболическим ферментом, принято считать, что каждый геном содержит по меньшей мере один ген, кодирующий РРО фермент (т.е. по меньшей мере один ген РРО). В настоящем документе понятие "локус гена РРО" относится к позиции гена РРО в геноме, а понятие "ген РРО" и "нуклеиновая кислота РРО" относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей фермент РРО. Нуклеиновая кислота РРО в каждом геноме отличается своей нуклеотидной последовательностью от нуклеиновой кислоты РРО в другом геноме. Специалист может определить геном происхождения каждой нуклеиновой кислоты РРО с помощью генетического скрещивания и/или методов секвенирования или методов расщепления экзо-нуклеазы, хорошо известных специалистам.

Настоящее изобретение включает растения с одним, двумя, тремя или более мут-РРО аллелями, причем эти растения повысили устойчивость к гербициду на производному бензоксазинона по сравнению с растениями дикого типа. Эти мут-РРО аллели могут содержать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45, или его вариант или производное, полинуклеотид, кодирующий полипептид, как определено в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 или 46 или его вариант или производное, гомолог, ортолог, паралог, полинуклеотид, включающий по меньшей мере 60 последовательных нуклеотидов любого из вышеупомянутых полинуклеотидов; полинуклеотид, являющийся комплементарным к любому из вышеупомянутых полинуклеотидов.

"Аллели" или "аллельные варианты" являются альтернативными формами определенного гена, расположенные в одинаковой хромосомной позиции. Такие варианты включают Полиморфизмы единичного нуклеотида (ПЕН) и Полиморфизмы малого введения/удаления (ПВУ). Размер ПВУ обычно менее 100 п.о. ПЕН и ПВУ образуют самую большую группу вариантов последовательности в природных полиморфных цепочках большинства организмов.

Понятие "вид" относится к группе растений одной разновидности, определенной наличием общих характеристик или черт, которые специалисты считают достаточными для отделения одного сорта или разнообразия растений от другого. Ни одним понятием не подразумевается, что все растения какого либо сорта или разнообразия будут генетически идентичными по отношению к целому гену или молекулярному уровню, или что любое растение будет гомозиготным во всех локусах. Сорт или вид считаются чистой линией для определенной черты, если притом, что сорт или разнообразие чистой линии самооплодотворяется, все потомство содержит эту черту. Понятие "линия разведения" или "линия" относится к группе растений одного вида, определенной наличием общих характеристик или черт, которые специалисты считают достаточными для отделения одной линии разведения или линии от другой. Ни под одним понятием не подразумевается, что все растения любой линии разведения или линии будут генетически идентичными по отношению к целому гену или молекулярному уровню, или что любое растение будет гомозиготным во всех локусах. Линия разведения или линия считаются чистой линией для определенной черты, если притом, что сорт или разнообразие чистой линии самооплодотворяется, все потомство содержит эту черту. В настоящем изобретении черта появляется в результате мутации в гене РРО рас-

тения или семени.

Растения настоящего изобретения, стойкие к гербицидам, включающие полинуклеотиды, кодирующие полипептиды мут-РРО, также используются в способах повышения стойкости растений к гербицидам путем стандартного разведения растений, включая половое размножение. Эти способы включают скрещивание первого растения, которое является стойким к гербицидам растением изобретения, со вторым растением, которое может быть или может не быть стойким, как и первое растение, к тому же гербициду или гербицидам или может быть стойким к другому гербициду или гербицидам в отличие от первого растения. Вторым растением может быть любое растение, способное производить жизнеспособное потомство (т.е. семена) после скрещивания с первым растением. Чаще всего, но необязательно, первое и второе растения являются растениями одного вида. Эти способы при необходимости могут включать отбор растений-потомков, содержащих полипептиды мут-РРО первого растения и характеристики стойкости к гербицидам второго растения. Растения-потомки, полученные данным методом настоящего изобретения, повысили стойкость к гербицидам по сравнению с первым или вторым растением или обоими растениями. Если первое и второе растения являются стойкими к разным гербицидам, растения-потомки будут иметь комбинированные характеристики устойчивости к гербицидам, свойственные первому и второму растениям. Методы изобретения могут включать одно или несколько поколений обратного скрещивания растений-потомков первого скрещивания с растением той же линии или генотипа, как у первого или второго растения. В качестве альтернативы, потомство первого скрещивания или любого последующего скрещивания может быть скрещено с третьим растением, которое имеет другую линию или генотип по сравнению с первым или вторым растением. Настоящее изобретение также предоставляет растения, органы растения, ткани растения, клетки растения, семена и нечеловеческие клетки хозяина, которые трансформированы по меньшей мере одной полинуклеотидной молекулой, кассетой экспрессии или трансформационным вектором изобретения. Такие трансформированные растения, органы растения, ткани растения, клетки растения, семена и нечеловеческие клетки хозяина повысили устойчивость или стойкость по меньшей мере к одному гербициду при уровнях гербицида, которые убивают или препятствуют росту нетрансформированного растения, ткани растения, клетки растения, семян или нечеловеческих клеток хозяина. Предпочтительно трансформированные растения, ткани растения, клетки растения и семена изобретения представляют собой *Arabidopsis thaliana* и сельскохозяйственные культуры.

Следует понимать, что растение настоящего изобретения может включать нуклеиновую кислоту РРО дикого типа в дополнение к нуклеиновой кислоте мут-РРО. Предполагается, что линии, устойчивые к гербициду - производному бензоксазинона, могут содержать мутацию только в одном из множественных РРО изоферментов. Таким образом, настоящее изобретение включает растение с одной или несколькими нуклеиновыми кислотами мут-РРО в дополнение к одной или нескольким нуклеиновым кислотам мут-РРО дикого типа.

В другом варианте осуществления, изобретение относится к семени, полученному из трансгенного растения с клеткой растения по настоящему изобретению, в котором семя прорастает благодаря повышению стойкости растения к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с семенем дикого типа.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения клетки трансгенного растения с повышенной стойкостью к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с клеткой растения дикого типа, включая трансформирование клетки растения кассетой экспрессии с мут-РРО нуклеиновой кислотой.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения трансгенного растения, включающему: (а) трансформирование клетки растения кассетой экспрессии с мут-РРО нуклеиновой кислотой и (б) получение растения из клетки растения с повышенной стойкостью к гербициду - производному бензоксазинона.

Следовательно, мут-РРО нуклеиновые кислоты изобретения представлены в кассетах экспрессии для экспрессии в целевом растении. Кассета будет включать регуляторные последовательности, функционально связанные с мут-РРО нуклеотидной последовательностью изобретения. Понятие "регуляторный элемент" в настоящем документе относится к полинуклеотиду, способному регулировать транскрипцию функционально связанного полинуклеотида. Он включает, помимо прочего, промоторы, усилители, интроны и 3' НТО. Под "функционально связан" подразумевается функциональная связь между промотором и второй последовательностью, причем последовательность промотора инициирует и способствует транскрипции последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Обычно, "функционально связан" означает, что последовательности нуклеиновой кислоты, будучи связанными, являются смежными и, при необходимости, объединяют два участка кодирования белка, смежных и в рамке считывания. Кассета может также содержать по меньшей мере один дополнительный ген для котрансформации в организм. В альтернативном случае, дополнительный ген(ы) может быть представлен в сложно структурированных кассетах экспрессии.

Такая кассета экспрессии предусмотрена со множеством сайтов рестрикции для вставки последовательности мут-РРО нуклеиновой кислоты, которая будет подвержена транскрипционной регуляции регуляторных участков. Кассета экспрессии может также содержать селективируемый маркер ген.

Кассета экспрессии будет включать по направлению транскрипции от 5'- к 3'-концу, область инициации трансляции или транскрипции (т.е. промотор), последовательность нуклеиновой кислоты мут-РРО по настоящему изобретению и участок терминации транскрипции или трансляции (т.е. участок терминации), являющийся функциональным в растениях. Промотор может быть нативным или аналогичным, инородным или гетерологичным, по отношению к растению-хозяину и/или нуклеиновой кислоте мут-РРО изобретения. Также промотор может быть естественной последовательности или, альтернативно, синтетической последовательности. Когда промотор является "инородным" или "гетерологичным" по отношению к растению-хозяину, подразумевается, что промотор не найден в нативном растении, в которое его ввели. Когда промотор является "инородным" или "гетерологичным" по отношению к последовательности мут-РРО нуклеиновой кислоты в настоящем изобретении, подразумевается, что промотор не является нативным или природным промотором для функционально связанной последовательности мут-РРО нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Согласно использованию в настоящем документе химерный ген содержит кодирующую последовательность, функционально связанную с участком инициации транскрипции, который является гетерологичным по отношению к кодирующей последовательности.

Так как предпочтительно экспрессировать нуклеиновые кислоты мут-РРО настоящего изобретения с помощью гетерологичных промоторов, можно использовать нативные промоторные последовательности. Такие конструкторы изменяют уровни экспрессии белка мут-РРО в растении или клетке растения. Таким образом, изменяется фенотип растения или его клетки.

Участок терминации может быть нативным с участком инициации транскрипции, нативным с функционально связанной целевой последовательностью мут-РРО, нативным с растением-хозяином или может быть получен из другого источника (т.е. может быть инородным или гетерологичным к промотору, целевой последовательности нуклеиновой кислоты мут-РРО, растению-хозяину или их комбинации). Подходящие участки терминации можно получить из Ti-плазмиды бактерий *A. tumefaciens*, такие как участки терминации октопин синтаза и нопалин синтаза. См. также Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91: 151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; и Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639. При необходимости ген или гены могут быть оптимизированы для повышенной экспрессии в трансформированном растении. Другими словами, гены можно синтезировать с помощью предпочтительно растительных кодонов для улучшения экспрессии. См., например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11 обсуждение использования предпочтительно базовых кодонов. Существуют методы для синтеза предпочтительно растительных генов. См., например, патенты США № 5380831 и 5436391 и Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 5380831, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Известно, что дополнительные модификации последовательностей улучшают генную экспрессию в клетке-хозяине. Они включают удаление последовательностей, кодирующих ложные сигналы полиадезилации, сигналы участка сплайсирования экзонов и интронов, повторения, подобные транспозонам, и другие так же четко характеризующиеся последовательности, которые могут быть разрушительными по отношению к генной экспрессии. Содержание G-C последовательности может быть скорректировано до уровней, средних для указанной клетки-хозяина, что рассчитывается с помощью известных генов, экспрессированных в клетке-хозяине. Если это возможно, последовательность модифицируют таким образом, чтобы в ней не было шпилечных вторичных мРНК структур. Нуклеотидные последовательности для улучшения генной экспрессии могут также использоваться в векторах экспрессии растения. Они включают интроны кукурузы *Adh1*, интронные гены (Callis et al. *Genes and Development* 1: 1183-1200, 1987), и ведущие последовательности, (W-последовательность) из вируса табачной мозаики (VTM), вируса хлорозной пятнистости кукурузы (ВХПК) и вируса мозаики люцерны (Gallie et al., *Nucleic Acid Res.* 15:8693-8711, 1987 и Skuzeski et al., *Plant Mol. Biol.* 15:65-79, 1990). Первый интрон из "сморщенного"-1 локуса кукурузы демонстрирует повышение экспрессии генов в конструкторах химерного гена. В патентах США № 5424412 и 5593874 описывается использование специфических интронов в конструкторах генной экспрессии, и Gallie et al. (*Plant Physiol.* 106:929-939, 1994) также доказывают, что интроны могут использоваться для регулирования генной экспрессии на тканеспецифической основе. Для дальнейшего улучшения или оптимизации мут-РРО генной экспрессии, векторы экспрессии растения настоящего изобретения могут также содержать последовательности ДНК с участками MARs (участки прикрепления к матриксу). Растительные клетки, трансформированные такими модифицированными системами экспрессии, могут в дальнейшем проявить сверхэкспрессию или конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности изобретения.

Кассеты экспрессии могут также содержать 5'-концевые лидерные последовательности в конструкторе кассеты экспрессии. Такие лидерные последовательности могут улучшать трансляцию. Трансляционные лидерные последовательности хорошо известны специалистам в данной области и включают: лидерные последовательности пикорнавируса, например, EMCV лидерные последовательности (некодирующий участок 5'-конца энцефаломиокардита) (Elroy-Stein et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130); лидерные последовательности потивируса, например, лидер вируса гравировки табака

(TEV) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165(2):233-238), лидерные последовательности вируса карликовой мозаики кукурузы (MDMV) (*Virology* 154:9-20), и белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина (BiP) (Masejak et al. (1991) *Nature* 353:90-94); нетранслируемую лидерную последовательность из вирусного белка мРНК вируса мозаики люцерны (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325:622-625); лидерную последовательность вируса табачной мозаики (TMV) (Gallie et al. (1989) в *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), стр. 237-256); и лидерную последовательность вируса хлорозной пятнистости кукурузы (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81:382-385). См. также, Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968. Также могут быть использованы другие методы, улучшающие трансляцию, например, интроны и т.д.

При подготовке кассеты экспрессии, различные фрагменты ДНК можно изменить таким образом, чтобы получить последовательности ДНК с необходимой ориентацией и, при необходимости, рамкой чтения. С этой целью, могут использоваться адаптеры или линкеры для соединения фрагментов ДНК или другие манипуляции для обеспечения подходящих участков рестрикции, удаления избыточных ДНК, удаление участков рестрикции и т.д. Для этих целей, можно использовать мутагенез *in vitro*, восстановление праймеров, рестрикцию, отжиг, повторную замену, например, транзиции и трансверсии.

При практическом применении изобретения может использоваться несколько промоторов. Промоторы можно выбрать в зависимости от желаемого результата. Нуклеиновые кислоты могут комбинироваться с конститутивными, предпочтительно тканевыми или другими промоторами для экспрессии в растениях. Такие конститутивные промоторы включают, например, ядерный промотор промотора Rsyn7 и другие конститутивные промоторы, описанные в WO 99/43838 и патенте США № 6072050; ядерный CaMV 35S промотор (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812); рисовый актин (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); убиквитин (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 и Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); ALS промотор (в патенте США № 5659026), и т.д. Другие конститутивные промоторы включают, например, описанные в патентах США № 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 и 6177611.

Для нацеливания в определенной ткани растения повышенной экспрессии мут-РРО можно использовать тканеспецифичные промоторы. Такие промоторы на уровне тканей включают, помимо прочего, промоторы на уровне листьев, корней, семян и стеблей. Промоторы на уровне тканей включают Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen Genet.* 254(3):337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3): 1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Лам (Lam) (1994) *Cell Differ.* 20: 181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138; Матсуока (Matsuoka) e/[alpha]/. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; и Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Такие промоторы можно модифицировать таким образом, чтобы экспрессия была меньше. В одном из вариантов осуществления, целевые нуклеиновые кислоты направляют в хлоропласт для экспрессии. Таким образом, там, где целевая нуклеиновая кислота вставляется в хлоропласт не напрямую, кассета экспрессии будет также содержать последовательность, направленную на хлоропласт, которая кодирует хлоропластовый транзитный пептид, направляющий целевой генный продукт в хлоропласты. Такие транзитные пептиды хорошо известны специалистам. Относительно последовательностей, нацеленных на хлоропласт, "функционально связанный" означает, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая транзитный пептид (т.е. последовательность, нацеленная на хлоропласт), связана с мут-РРО нуклеиновой кислотой изобретения так, что две последовательности являются смежными и находятся в одной рамке считывания. См., например, Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; и Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481. Так как мут-РРО белки по изобретению включают нативный хлоропластный транзитный пептид, любой известный хлоропластный транзитный пептид можно соединить с аминокислотной последовательностью зрелого мут-РРО белка по изобретению путем функционального связывания последовательности, нацеленной на хлоропласт, с 5'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелый мут-РРО белок по изобретению. Последовательности, направленные на хлоропласт, хорошо известны специалистам и включают хлоропластный малый элемент рибулоза-1,5-бифосфат карбоксилазы (Rubisco) (de Castro Silva Filho et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 30:769-780; Schnell et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(5):3335-3342); 5-(энолпирувил)шикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) (Archer et al. (1990) *J. Bioenerg. Biomemb.* 22(6):789-810); триптофан синтазы (Zhao et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270(11):6081-6087); пластоцианина (Lawrence et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(33):20357-20363); хоризмат синтазы (Schmidt et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268(36):27447-27457); и флуоресцирующий белок, связывающий хлорофилл a/b (LHBP) (Lampira et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 14996-14999). См. также Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421; и Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Методы трансформации хлоропластов хорошо известны специалистам. См., например, Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606. Метод основывается на внедрении с помощью генной пушки ДНК, содержащей селективируемый маркер, и нацеливании ДНК в пластидный геном путем гомологической рекомбинации. Также пластидную трансформацию можно осуществить с помощью трансактивации нефункционирующего трансгена, несущего пластиду, путем экспрессии на уровне ткани РНК полимеразы, закодированной в зародыше и направленной на пластиду. О такой системе сообщается в McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

Целевые нуклеиновые кислоты, которые необходимо направить к хлоропласту, можно оптимизировать для экспрессии в хлоропласте, чтобы оценить разницу при использовании кодона между зародышем растения и этой органеллой. Таким образом, целевые нуклеиновые кислоты можно синтезировать с помощью предпочтительно хлоропластных кодонов. См., например, в патенте США № 5380831, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, нуклеиновая кислота мут-РРО нуклеиновая кислота содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей: а) полинуклеотид, как показано в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 или 45 или его вариант или производное; б) полинуклеотид, кодирующий полипептид, как показано в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 или 46 или его вариант или производное; в) полинуклеотид, содержащий по меньшей мере 60 последовательных нуклеотидов а) или в); и д) полинуклеотид, являющийся комплементарным к полинуклеотиду по любому из пп. а) - в).

Предпочтительно кассета экспрессии далее включает регуляторный участок инициации транскрипции и регуляторный участок инициации трансляции, которые функционируют в растении.

Так как полинуклеотиды изобретения используются в качестве селективируемых маркерных генов для трансформации растений, кассеты экспрессии изобретения могут включать селективируемый маркерный ген для селекции трансформированных клеток. Селективируемые маркерные гены, включая гены настоящего изобретения, используются для селекции трансформированных клеток или тканей. Маркерные гены включают, помимо прочего, гены, кодирующие стойкость к антибиотикам, такие как гены, кодирующие неомицин фосфотрансферазу II (НЕО) и гидромицин фосфотрансферазу (ГФТ), а также гены, имеющие стойкость к гербицидным соединениям, таким как глүофосинат аммоний, бромоксинил, имидазолиноны и 2,4-дихлорофеноксиацетат (2,4-Д). См., в основном, Yarranton (1992) Curr. Opin. Biotech. 3 :506-511; Christophers on et al. (1992) Протоколы Natl. Acad. Sci. USA 89:6314-6318; Yao et al. (1992) Cell 71:63-72; Reznikoff (1992) Mol Microbiol 6:2419-2422; Barkley et al. (1980) in The Operon, стр. 177-220; Hu et al. (1987) Cell 48:555-566; Brown et al. (1987) Cell 49:603-612; Figge et al. (1988) Cell 52:713-722; Deuschle et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5400-5404; Fuerst et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2549-2553; Deuschle et al. (1990) Science 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1917-1921; Labow et al. (1990) Mol Cell Biol 10:3343-3356; Zambretti et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3952-3956; Bairn et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5072-5076; Wyborski et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) Topics Mol Struct. Biol 10: 143- 162; Degenkolb et al. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) Biochemistry 27: 1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547- 5551; Oliva et al. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36:913-919; Hlavka et al. (1985) Handbook of Experimental Pharmacology, том 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill et al. (1988) Nature 334:721-724. На данные источники в настоящем документе есть ссылки. Перечень выше перечисленных маркерных генов не является исчерпывающим. Любой селективируемый маркерный ген может использоваться в настоящем изобретении.

Изобретение также предоставляет изолированный вектор рекомбинантной экспрессии, включающий кассету экспрессии с мут-РРО нуклеиновой кислотой, как описано выше, причем экспрессия вектора в клетке-хозяине приводит к повышению устойчивости к гербициду - производному бензоксазинона по сравнению с клеткой-хозяином дикого типа. В данном контексте, понятие "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним из видов вектора является "плазмида", которая относится к сегментам двухцепочечной петли ДНК, которые можно лигировать в вирусный геном. Еще одним видом вектора является вирусный вектор, отличающийся тем, что дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они были внесены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации, и эписомные векторы, относящиеся к млекопитающим). Другие векторы (например, не эписомные векторы, относящиеся к млекопитающим) интегрируются в геном клетки-хозяина при внесении в клетку-хозяина и реплицируются вместе с геномом-хозяином. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы, в данном контексте, называются "экспрессионными векторами". Обычно, используемые экспрессионные векторы в методах, связанных с рекомбинантной ДНК, принимают форму плазмид. В настоящем описании изобретения, поня-

тие "плазмиды" и "вектор" являются взаимозаменяемыми, так как плаزمиды чаще всего используются в форме вектора. Тем не менее, изобретение включает и другие формы экспрессионных векторов, такие как вирусные векторы (например, ретровирус с дефективной репликацией, аденовирусы и вирусы, связанные с адено), выполняющих те же функции.

Рекомбинантные экспрессионные векторы изобретения включают нуклеиновую кислоту изобретения в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные экспрессионные векторы включают одну или несколько регуляторных последовательностей, выбранных на основе клеток хозяина, которые должны использоваться в экспрессии, которая функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты для экспрессии. Регуляторные последовательности включают последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих видах клеток хозяина и последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках хозяина или при определенных условиях. Специалисты в данной области обнаружат, что вид экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого полипептида и т.д. Векторы экспрессии по изобретению могут быть введены в клетки-хозяева для производства таким способом полипептидов или пептидов, включая полипептиды или пептиды слияния, закодированных нуклеиновыми кислотами, согласно настоящему документу (например, мут-РРО полипептиды, полипептиды слияния и т.д.).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мут-РРО полипептиды экспрессируются в растениях и их клетках, таких как одноклеточные растительные клетки (например, водоросли) (см. Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251 и ссылки в указанном документе) и клетки из высших растений (например, сперматофитов, таких как сельскохозяйственные культуры). Мут-РРО полинуклеотид можно "вести" в клетку растения любым из способов, включающих трансфекцию, трансформацию или трансдукцию, электропорацию, бомбардировку частицами, агроинфекцию, баллистическую трансфекцию и т.д.

Подходящие методы для трансформации или трансфекции клеток-хозяев, включая растительные клетки, можно найти в работах Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) и других лабораторных справочниках, таких как Методы в Молекулярной биологии, 1995, том 44, *Agrobacterium* протоколы, изд.: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Так как повышенная устойчивость к гербицидам - производным бензоксазона, является общей желаемой наследственной чертой для множества растений, таких как кукуруза, пшеница, рожь, овес, тритикале, рис, ячмень, соя, арахис, хлопок, семена рапса и канола, маниока, перец, подсолнечник и бархатцы, пасленовые растения, такие как картофель обыкновенный, табак, баклажан и томат, растения рода горошек, горох, люцерна, кустарниковые растения (кофейное дерево, какао настоящее, чай), ивовые виды, деревья (масличная пальма, кокосовое дерево), многолетние травы, и кормовые растения, эти сельскохозяйственные культуры также являются предпочтительными целевыми растениями для генной инженерии в качестве еще одного варианта осуществления настоящего изобретения. В предпочтительном варианте осуществления изобретения растение является сельскохозяйственной культурой Кормовые культуры включают, помимо прочего, пырей, канареечник канарский, костер, пырейник, мятлик, ежу сборную, люцерну, *Salfoin*, лядвенец рогатый, клевер гибридный, клевер луговой и сладкий клевер.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, трансфекция мут-РРО полинуклеотида в растение осуществляется путем агробактериального переноса генов (переноса генов с помощью *Agrobacterium*). Одним из методов трансформации, известным специалистам, является погружение цветущего растения в раствор *Agrobacteria*, причем *Agrobacteria* содержат мут-РРО нуклеиновую кислоту, а затем размножение трансформированных гамет. Трансформацию растения с помощью *Agrobacterium* можно осуществить, используя, например, GV3101(pMP90) (Koncz and Schell, 1986, *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396) или LBA4404 (Clontech), штаммы *Agrobacterium tumefaciens*. Трансформацию можно осуществить с помощью стандартных методов трансформации и регенерации (Deblaere et al., 1994, *Nucl. Acids. Res.* 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. and Schilperoort, Robert A, *Plant Molecular Biology Manual*, 2nd Ed. - Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. and Thompson, John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton : CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Например, семена рапса можно трансформировать с помощью трансформации котиледона или гипокотила (Moloney et al., 1989, *Plant Cell Report* 8:238-242; De Block et al., 1989, *Plant Physiol.* 91:694-701). Использование антибиотиков для *Agrobacterium* и отбор растений зависит от бинарного вектора и штамма *Agrobacterium*, использованного для трансформации. При отборе семян рапса обычно используют канамицин в качестве селективируемого растительного маркера. Генный трансфер с помощью *Agrobacterium* в лен можно осуществить с помощью, например, метода, описанного Мунарова et al., 1994, *Plant Cell Report* 13:282-285. Дополнительно, трансформацию сои можно осуществить с помощью, например, метода, описанного в Европейском патенте № 0424047, патенте США № 5322783, Европейском патенте № 0397687, патенте США № 5376543 или патенте США № 5169770. Трансформацию кукурузы можно осуществить с помощью бомбардировки час-

тицами, поглощения ДНК посредством полиэтилен гликоля или метода, использующего карбидно-кремниевое волокно. (См., например, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7.) Конкретный пример трансформации кукурузы приведен в патенте США № 5990387, а конкретный пример трансформации пшеницы - в международной заявке № WO 93/07256.

Согласно настоящему изобретению, введенный полинуклеотид мут-РРО может оставаться в клетке растения неизменным, если он включен в нехромосомный автономный репликон или интегрирован в растительные хромосомы. В качестве альтернативы, введенный полинуклеотид мут-РРО может присутствовать на внехромосомном нерепликационном векторе и может временно экспрессироваться или быть временно активным. В одном из вариантов осуществления изобретения, может быть создан гомологический рекомбинантный микроорганизм, в котором полинуклеотид мут-РРО интегрирован в хромосому, создается вектор, содержащий по меньшей мере часть гена РРО, в отношении которого были осуществлены делеция, добавление или замена для изменения, например, функционального нарушения, эндогенного гена РРО и создания мут-гена РРО. Для создания точечной мутации посредством гомологической рекомбинации гибриды ДНК-РНК могут использоваться в методе, известном как химерапластика (Cole-Strauss et al., 1999, Nucleic Acids Research 27(5): 1323-1330 and Kmiec, 1999, Gene therapy American Scientist 87(3):240-247). Другие процедуры гомологической рекомбинации в виде *Triticum* (пшеница) также известны специалистам и рассматриваются в настоящем документе с точки зрения использования.

В гомологическом векторе рекомбинации ген мут-РРО может примыкать к 5' и 3'-концу дополнительной молекулой нуклеиновой кислоты гена РРО, что делает возможным гомологическую рекомбинацию между экзогенным геном мут-РРО, который несет вектор, и эндогенным геном РРО, в микроорганизме или растении. Дополнительная примыкающая молекула нуклеиновой кислоты РРО имеет достаточную длину для успешной гомологической рекомбинации с эндогенным геном. Как правило, от нескольких сотен пар оснований до 1000 гетероциклических оснований примыкающей ДНК (на 5'- и 3'-концах) включены в вектор (см., например, Thomas, K.R., and Capecchi, M. R., 1987, Cell 51:503 для описания векторов гомологической рекомбинации или Strepp et al., 1998, PNAS, 95(8):4368-4373 для рекомбинации на основе к ДНК в *Physcomitrella patens*). Тем не менее, так как ген мут-РРО обычно отличается от гена РРО малым количеством нуклеиновых кислот, примыкающая последовательность не всегда является необходимой. Вектор гомологической рекомбинации вводится в микроорганизм или клетку растения (например, проникновение ДНК с использованием полиэтиленгликоля), и клетки, в которых введенный мут-РРО ген гомологически рекомбинирован с эндогенным геном РРО, отбирают с помощью известных методов.

В другом варианте осуществления изобретения, могут быть получены рекомбинантные микроорганизмы, которые содержат выбранные системы, позволяющие регулировать экспрессию введенного гена. Например, включение гена мут-РРО на векторе, с помещением его под контроль *lac*-оперона, делает возможным экспрессию гена мут-РРО только в присутствии изопропилтиогаляктозида (IPTG). Такие регулирующие системы хорошо известны специалистам.

Другой аспект изобретения относится к клеткам-хозяевам, в которые был введен вектор рекомбинантной экспрессии. Понятия "клетка-хозяин" и "рекомбинантная клетка-хозяин" в настоящем документе являются взаимозаменяемыми. Подразумевается, что эти понятия относятся не только к определенной клетке субъекта, но и к ее потомству или потенциальному потомству. Так как возможны определенные модификации в последующих поколениях вследствие мутации или влияния окружающей среды, такое потомство может, фактически, не быть идентичным материнской клетке, но оно все равно входит в понятие, используемое в настоящем документе. Клеткой-хозяином может являться любая прокариотическая или эукариотическая клетка. Например, полинуклеотид мут-РРО может быть экспрессирован в клетках бактерий, таких как *S. glutamicum*, клетках насекомых, грибов, или клетках млекопитающих (таких как овариальные клетки китайского хомячка (ОКХ) или COS клетки), клетках водорослей, инфузорий, клетках растений, грибах или других микроорганизмах, подобных *S. glutamicum*). Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

Клетка-хозяин изобретения по изобретению, такая как прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин в культуре, может быть использована для получения (т.е. экспрессии) полипептида мут-РРО. Соответственно, изобретение также предоставляет способы получения полипептидов мут-РРО с помощью клеток-хозяев по изобретению. В одном из случаев осуществления изобретения, метод включает культивирование клетки-хозяина по изобретению (в которую был введен вектор рекомбинантной экспрессии, кодирующий полипептид мут-РРО, или в геном которой был введен ген, кодирующий полипептид РРО дикого типа или полипептид мут-РРО) в подходящей среде, пока не будет получен полипептид мут-РРО. В еще одном варианте осуществления изобретения, способ также включает выделение полипептидов мут-РРО из среды или клетки-хозяина. Другой аспект изобретения относится к изолированным полипептидам мут-РРО и их биологически активным частям. "Изолированный" или "очищенный" полипептид или его биологически активная часть свободна от клеточного материала, когда получена методом, связанным с рекомбинантной ДНК, или химическими предшественников или других химических веществ, когда химически синтезируется. Формулировка "в основном свободный от клеточного материала" включает приготовление композиции полипептида мут-РРО, в которой полипептид отделяют от не-

которых клеточных компонентов клеток, в которых он получен естественным или рекомбинантным путем. В одном из вариантов осуществления изобретения формулировка "в основном свободный от клеточного материала" включает препараты полипептида мут-РРО с менее чем 30% (сухого веса) не мут-РРО материала (также называемый в настоящем документе как "загрязняющий полипептид"), более предпочтительно менее чем 20% не мут-РРО материала, также более предпочтительно менее чем 10% не мут-РРО материала и наиболее предпочтительно менее чем 5% не мут-РРО материала.

Когда полипептид мут-РРО или его биологически активную часть получают с помощью рекомбинантного метода, он также является предпочтительно в основном свободным от культурной среды, т.е. она составляет приблизительно менее 20%, более предпочтительно приблизительно менее 10% и наиболее предпочтительно приблизительно менее 5% объема композиции полипептида. Формулировка "в основном свободный от химических предшественников или других химических веществ" включает приготовление композиции полипептида мут-РРО, в которой полипептид отделен от химических предшественников или других химических веществ, участвующих в синтезе полипептида. В одном из вариантов осуществления изобретения, формулировка "в основном свободный от химических предшественников или других химических веществ" включает препараты полипептида мут-РРО с менее чем 30% (сухого веса) химических предшественников или не мут-РРО химических веществ, более предпочтительно менее чем 20% химических предшественников или не мут-РРО химических веществ, также более предпочтительно менее чем 10% химических предшественников или не мут-РРО химических веществ и наиболее предпочтительно менее чем 5% химических предшественников или не мут-РРО химических веществ. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, изолированные полипептиды или их биологически активные части не имеют загрязняющих полипептидов из того же организма, из которого был получен полипептид мут-РРО. Обычно такие полипептиды получают рекомбинантной экспрессией, например, полипептида мут-РРО в растениях кроме, или в микроорганизмах, таких как *S. glutamicum*, инфузории, водоросли или грибы.

Как описано выше, настоящее изобретение предоставляет информацию о композициях и способах повышения устойчивости сельскохозяйственного растения или семени к производным бензоксазинона по сравнению с растением или семенем дикого типа. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, устойчивость сельскохозяйственного растения или семени к производным бензоксазинона повысилась так, что растение или семя может противостоять применению гербицида - производного бензоксазинона в количестве предпочтительно 1-1000 г активного вещества/га⁻¹, более предпочтительно 20-160 г активного вещества/га⁻¹ и наиболее предпочтительно 40-80 г активного вещества/га⁻¹. При использовании по тексту настоящего документа, "противостоять" применению гербицида - производного бензоксазинона означает, что растение либо не уничтожается, либо не повреждается после такого применения.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет способы, которые включают использование по меньшей мере одного гербицида - производного бензоксазинона, как подробно описано выше.

В этих способах гербицид - производное бензоксазинона может применяться любым методом, известным специалистам, включая, помимо прочего, обработку семян, почвы и листьев. До применения гербицид - производное бензоксазинона можно преобразовать в стандартные препаративные формы, например, растворы, эмульсии, суспензии, пылевидные составы, порошки, пасты и гранулы. Выбор формы состава зависит от конкретной цели; в любом случае, она должна обеспечивать качественное и ровное распределение соединения в соответствии с изобретением.

Получив растения с повышенной устойчивостью к гербициду - производному бензоксазинона, можно использовать большое разнообразие соединений для защиты растений от сорняков, чтобы таким образом улучшить рост растений и уменьшить борьбу за питательные вещества. Гербицид - производное бензоксазинона может использоваться для контроля над сорняками до всхода, после всхода, до посева и во время выращивания сельскохозяйственных культур, описанных в настоящем документе, в районах их произрастания, или могут использоваться препараты, содержащие гербицид - производное бензоксазинона и другие добавки. Гербициды - производные бензоксазинона могут также использоваться для обработки семян. Добавки в гербицидных препаратах на основе производных бензоксазинона включают другие гербициды, детергенты, адъюванты, лиофилизирующие агенты, склеивающие агенты, стабилизирующие агенты и другие, подобные вещества. Препаративные формы гербицидов - производных бензоксазинона могут представлять собой влажные или сухие препараты и включать, помимо прочего, сыпучие порошки, концентраты эмульсии и жидкие концентраты. Гербицид производное бензоксазинона и гербицидные препараты можно применять в соответствии со стандартными методами, например, путем обрызгивания, орошения, опыления или другими подобными методами.

Подходящие соединения подробно описаны в РСТ/ЕР 2009/063387 и РСТ/ЕР 2009/063386, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Следует обратить внимание на то, что следующая информация относится к вариантам осуществления настоящего изобретения и многочисленные изменения могут быть внесены без отклонения от цели изобретения. Далее изобретение поясняется примерами, которые не должны подразумеваться как ограничивающие цель изобретения. В противном случае, следует понимать, что возможно прибегнуть к дру-

гим различным вариантам осуществления изобретения, модификациям и их эквивалентам, которые после прочтения могут пожелать использовать специалисты без отклонения от общего смысла настоящего изобретения и/или цели прилагаемых формул.

Примеры

Пример 1. Сайт-направленный мутагенез PPO *Amaranthus*

Клонирование PPQ *Amaranthus*

Кодирующие последовательности *Amaranthus tuberculatus* изоформ PPO, подверженных воздействию гербицида и устойчивых к гербициду и мутантных комбинаций, (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7) были синтезированы и клонированы компанией Geneart (Geneart AG, Регенсбург, Германия).

Плазмиды выделяли из *E. coli* TOP10 путем минивыделения плазмиды и подтверждали правильность структуры путем секвенирования ДНК.

Экспрессия и очистка рекомбинантных PPO дикого типа и мутантных PPO

(Взято из: Franck E. Dayan, Pankaj R. Daga, Stephen O. Duke, Ryan M. Lee, Patrick J. Tranel, Robert J. Doerksen. Biochemical and structural consequences of a glycine deletion in the α -8 helix of protoporphyrinogen oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (2010), 1548-56.)

Клоны в векторе pRSET были трансформированы в штамм BL21(DE3)-pLysS *E. coli*. Клетки выращивали в 250 мл LB с 100 мкг мл⁻¹ карбенициллина, при встряхивании в течение ночи при температуре 37°C. Культуры разбавили в 1 л LB с антибиотиком и выращивали при температуре 37°C при встряхивании в течение 2 ч, индуцировали 1 ммоль IPTG и выращивали при температуре 25°C при встряхивании в течение еще 5 ч. Сбор клеток производился с помощью центрифугирования при 1600×g, их промыли 0,09% NaCl, и выдерживали при температуре -80°C.

Лизис клеток осуществлялся с использованием френч-пресса при 140 МПа в 50 ммоль фосфата натрия pH 7.5, 1 моль NaCl, 5 ммоль имидазола, 5% глицерина и 1 мкг·мл⁻¹ лейпептина. После лизиса, добавили 0,5 ед. бензоназы (Novagen, EMD Chemicals, Inc., Гиббстаун, Нью-Джерси) и PMSF (конечная концентрация 1 ммоль). Клеточный дебрис удалили центрифугированием при 3000×g. His-меченые белки PPO очистили на активированной никелем колонке Nitrap Chelating HP (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Пискатауэй, Нью-Джерси), уравновешенной 20 ммоль фосфата натрия pH 8.0, 50 ммоль NaCl, 5 ммоль имидазола, 5 ммоль MgCl₂, 0,1 ммоль EDTA и 17% глицерина.

PO элюировали 250 ммоль имидазола. Активный белок обессолили на колонке PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Пискатауэй, Нью-Джерси), уравновешенной 20 ммоль натрий-фосфатного буфера, pH 7.5, 5 ммоль MgCl₂, 1 ммоль EDTA и 17% глицерина. Из каждого литра культуры было получено приблизительно 10 мг чистой PPO, которую хранили при температуре -20°C до использования в анализах.

Анализ активности PPO

Ферментный анализ PPO (не рекомбинантный) Белок PPO (ЕС 1.3.3.4) экстрагировали из колеоптилей или ростков (150 г сырого веса) выращенной в темноте кукурузы, паслена черного, утреннего сияния и сеянцев канатника Теофраста в соответствии с описанием приведенным ранее (Grossmann et al., 2010). Перед сбором сеянцы оставили для позеленения в течение 2 ч на свету для того, чтобы достичь наиболее высокого уровня специфической ферментативной активности в тилакоидных фракциях при низких концентрациях хлорофилла. При высоких концентрациях хлорофилла происходит значительное тушение флуоресценции, которое ограничивает количество зеленых тилакоидов, которые могут использоваться в тестировании. Растительные материалы гомогенизировали в холоде с помощью блендера Braun с использованием отношения свежего веса к объему 1:4. В состав буфера для гомогенизации входил трис(гидроксиметил)аминометан (трис)-HCl (50 ммоль; pH 7.3), сахароза (0,5 моль), хлорид магния (1 мМ), этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) (1 ммоль) и бычий сывороточный альбумин (2 г·л⁻¹). После фильтрации через четыре слоя Miracloth, были получены неочищенные пластидные препараты после центрифугирования при 10000×g в течение 5 мин и ресуспендирования в буфере для гомогенизации перед центрифугированием при 150×g в течение 2 мин для удаления неочищенного клеточного дебриса. Супернатант центрифугировали при 4000×g в течение 15 мин, осадочную фракцию ресуспендировали в 1 мл буфера, содержащего трис-HCl (50 ммоль; pH 7.3), EDTA (2 ммоль), лейпептин (2 мкмоль), пепстатин (2 мкмоль) и глицерин (200 мл·л⁻¹), и хранили при температуре -80°C до использования. Содержание белка в ферментных экстрактах определяли, используя бычий сывороточный альбумин как стандарт. Активность PPO анализировалась способом флуориметрии путем мониторинга скорости формирования протопорфирина из химически восстановленного протопорфириногена IX при условиях начальной скорости. В состав смеси для анализа входил Трис-HCl (100 ммоль; pH 7.3), EDTA (1 ммоль), дитиотреитол (5 ммоль), Tween 80 (0,085%), протопорфириноген IX (2 мкмоль) и 40 мкг экстрагированного белка в общем объеме 200 мкл. Реакцию инициировали путем добавления субстрата протопорфириногена IX при температуре 22°C. Сафлуфенацил, флумиоксазин и бутафенацил приготовили в растворе диметилсульфоксида (DMSO) (концентрация DMSO в смеси для анализа - 0,1 ммоль), затем добавили в смесь для анализа в концентрациях 0,005 ммоль - 5 мкмоль перед инкубированием. Мониторинг флуоресценции осуществлялся непосредственно из смеси для анализа с использованием POLARstar Optima/Galaxy

(BMG) при возбуждении на длине волны 405 нм и мониторингом излучения на длине волны 630 нм. Неферментативная активность в присутствии экстракта, инактивированного нагреванием, была пренебрежимо мала. Степень ингибирования ферментативной активности, индуцированного гербицидом, выражалась в виде процентного отношения степени ингибирования по сравнению с необработанной контрольной группой. Молярные концентрации соединения, при которых активность фермента составляет 50% от исходной (значения IC_{50}), рассчитывали путем подставления значений в уравнение "доза - эффект" с использованием нелинейного регрессионного анализа.

Ферментный анализ PPO (рекомбинантный)

Использовали протопорфирин (Proto) приобретенный у Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Протопорфириноген (Protogen) приготовили в соответствии со способом, описанным в работах Jacobs and Jacobs (N.J. Jacobs, J.M. Jacobs, Assay for enzymatic protoporphyrinogen oxidation, a late step in heme synthesis, Enzyme 28 (1982) 206-219). Анализы проводились в 100 ммоль фосфата натрия pH 7.4 с 0,1 ммоль EDTA, 0,1% Tween 20, 5 мкмоль FAD и 500 ммоль имидазола. Кривые доза-эффект при применении ингибиторов PPO, ацифлуорфена, лактофена, бензоксазинона 1.а.35, или предпочтительных производных бензоксазинона (где X означает O или S, R⁴ означает водород, C₁-C₆-алкил, C₁-C₆-галогеналкил, C₃-C₆-циклоалкил, C₃-C₆-алкенил, C₃-C₆-галоалкенил, C₃-C₆-алкинил, C₃-C₆-галоалкинил, C₁-C₆-алкокси или C₃-C₆-циклоалкил-C₁-C₆-алкил, R⁵ означает водород, NH₂, C₁-C₆-алкил или C₃-C₆-алкинил, R⁶ означает водород или C₁-C₆-алкил, или их комбинацию), строят в присутствии 150 мкмоль Protogen. Ширина спектра возбуждения и ширина спектра излучения были установлены на 1,5 и 30 нм соответственно. Все анализы производились в двух или трех параллельных испытаниях, измерения производились с использованием POLARstar Optima/Galaxy (BMG) при возбуждении на длине волны 405 нм и мониторингом излучения на длине волны 630 нм.

Значения доза-эффект (IC_{50}) для ферментов PPO с замещением выше, чем значение IC_{50} для фермента PPO дикого типа (без замещения) PPO (табл. 4а и 4б). Это указывает на то, что эти ферменты PPO с замещением обладают внутренней устойчивостью к бензоксазину и к некоторым тестируемым производным бензоксазинона. Ферменты PPO с замещением dG210 и R128L являются известными ферментами PPO с замещением, которые могут быть обнаружены в *Amaranthus tuberculatus*, и которые ответственны за *in planta* устойчивость PPO к множеству гербицидов-ингибиторов PPO (Dayan et al., 2010, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:1548). Это указывает на то, что остальные приведенные в перечне ферменты PPO с замещением с большим значением IC_{50} , чем dG210 или R128L, являются также ферментами PPO с замещением, которые ответственны за *in planta* устойчивость к множеству гербицидов-ингибиторов, включая бензоксазинон 1.а.35 (табл. 4а) и перечисленные производные бензоксазинона (табл. 4б). Все ферменты PPO с замещением демонстрируют сопоставимую ферментативную активность (измеряемую изменением количества единиц флуоресценции в минуту (ЕФ/мин)) по сравнению с ферментами PPO дикого типа (табл. 4а). Дополнительно, все значения активности для ферментов PPO с замещением являются более высокими, чем для фермента PPO с замещением dG210. Фермент PPO dG210 с замещением является в значительной степени активным для функционирования *in planta*. Это указывает на то, что все другие указанные ферменты PPO с замещением являются в значительной степени активными для функционирования *in planta*.

Таблица 4а. Значения IC_{50} (М) для PPO ферментов дикого типа и с замещением аминокислот для ингибитора, бензоксазинона 1.а.35.

Замещение	IC_{50} (М) бензоксазинон	Активность (ЕФ/мин.)
Дикий тип	1,20E-10	800
R128A	1,40E-10	731
R128L	7,73E-10	750
dG210	2,12E-09	80
L397D	2,72E-10	250
L397N	2,35E-10	165
F420M	2,75E-10	353
F420I	4,95E-10	179
F420L	9,93E-10	203
F420V	2,45E-09	200
R128A, F420M	6,24E-09	378
R128A, F420I	1,98E-08	330
R128A, F420L	2,38E-08	281

Таблица 4b. Значения IC₅₀ (M) для PPO ферментов дикого типа и с замещением аминокислот для перечисленных производных бензоксазинона

Замещение	IC ₅₀ (M) аналоги бензоксазинона							Активность (ЕФ/мин.)
	X означает O	R ⁴ означает водород;	X означает O, R ⁴ означает водород;	R ⁵ означает водород;	R ⁶ означает водород;	X означает O, R ⁵ означает водород;	X означает O, R ⁶ означает водород;	
Дикий тип	2,20E-10	2,99E-10	2,04E-08	1,78E-09	1,78E-09	2,27E-08	2,27E-08	800
R128L	3,82E-08	2,02E-07	3,57E-06					750
dG210	3,33E-08	1,10E-07	1,64E-06					80
L397D				4,41E-07	4,41E-07	2,43E-06	2,43E-06	250
F420I				6,17E-07	6,17E-07	1,00E-05	1,00E-05	179
R128A, F420I				1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	330

Пример 2. Скрининг мутагенизированных клеток водорослей для идентификации клонов с устойчивостью к гербицидам и каузативных мутаций в генах PPO.

Чтобы получить мутации, придающие стойкость к гербицидам - производным бензоксазинона в PPO генах, может использоваться химический или УФ-мутагенез. Для идентификации доминантных мутаций, стойких к гербицидам, особенно применимы одноклеточные организмы, такие как *Chlamydomonas reinhardtii* или *Scenedesmus obliquus*.

Клетки водоросли штаммов *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 и CC-1691 (Университет Дьюка, Дарем, США) размножают в среде ТАФ (трисацетатфосфат) (Gorman and Levine (1965) PNAS 54: 1665-1669) путем постоянного встряхивания при 100 об/мин, 22°C и 30 ммоль Pho \times m⁻²xs⁻² световом облучении. *Scenedesmus obliquus* (Университет Геттингена, Германия) размножают в среде водорослей, как описано в Boger and Sandmann, (1993): Target assays for modern herbicides and 15 related phytotoxic compounds, Lewis Publishers при тех же условиях культивации, как отмечено для *Chlamydomonas*. Скрининг соединения осуществляют при 450 ммоль Pho \times m⁻²xs⁻² световом облучении.

Чувствительные штаммы *Chlamydomonas reinhardtii* или *Scenedesmus obliquus* мутируют при добавлении 0,14 моль этилметансульфоната (ЭМС) в течение 1 ч, как описано Loppes (1969, 20 Mol Gen Genet 104: 172-177) Устойчивые штаммы идентифицируют с помощью скрининга мутировавших клеток на чашках с твердым питательным раствором, содержащим целевые гербициды - производные бензоксазинона, при концентрациях, от низких до смертельных, в зависимости от активности воздействия соединения на определенный штамм водоросли.

Аmplification генов PPO из дикого типа и стойкой *Chlamydomonas reinhardtii* из геномной ДНК или кДНК в качестве образца была получена стандартными техниками ПЦР с использованием ДНК олигонуклеотидов. Мутации идентифицируют путем сравнения последовательностей PPO дикого типа и мутировавших последовательностей PPO с помощью программы выравнивания последовательностей Align X (Vector NTI Advance Software Version 10.3, Invitrogene, Карлсбад, Калифорния, США).

На фиг. 2 показан отбор штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*, стойких к гербициду - производному бензоксазинона I.a.35. (A) Мутировавшие клетки, высеянные на плотную среду без селективного агента. (B) Мутировавшие клетки, высеянные на плотную среду, содержащую 1 \times 10⁻⁷ M производного бензоксазинона I.a.35. Клетки, являющиеся устойчивыми к гербициду - производному бензоксазинона, образуют колонии (обведены в кружки, под номерами 33, 34, 35 и 36), в то время как восприимчивые к гербициду клетки прекращают расти. Более высокое количество колоний в чашке А по сравнению с В указывает на то, что колонии в чашке В являются устойчивыми к производному бензоксазинона I.a.35.

На фиг. 3 показано возобновление роста выбранных штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*, стойких к гербициду - производному бензоксазинона I.a.35. (A) Клетки дикого типа, высеянные на жидкую среду без селективного агента. (B) Клетки дикого типа в жидкой среде, содержащей повышенное количество производного бензоксазинона I.a.35 (в диапазоне 1 \times 10⁻⁹ - 5 \times 10⁻⁶ моль). (C) Мутировавшие клетки, высеянные на жидкую среду без селективного агента. (D1, D2, E1, E2) Мутировавшие и выбранные штаммы в жидкой среде, содержащей повышенное количество производного бензоксазинона I.a.35 (в диапазоне 1 \times 10⁻⁹ - 5 \times 10⁻⁶ моль). Штаммы, устойчивые к гербициду - производному бензоксазинона I.a.35, развиваются и становятся более темного цвета, что указывает на их рост. Штаммы, подверженные воздействию гербицида, не развиваются и сохраняют светлый цвет. Более темный цвет обусловлен более высокой

плотностью растущих клеток в жидкой среде. Культуры с более низкой плотностью имеют более светлый цвет или полностью прозрачны.

Пример 3. Скрининг мутагенизированной с помощью ЭМС популяции *Arabidopsis thaliana* для идентификации растений, устойчивых к гербицидам, и идентификация каузативных мутаций в генах PPO

M2 популяция растений *Arabidopsis thaliana*, обработанных ЭМС, получена из Lehle Seeds (Паунд-Рок, Техас, США). Скрининг проводят путем помещения в чашу семян *Arabidopsis* в полуконцентрированный питательный раствор Мурасиге-Скуга, содержащий 0,5% желирующего агента Gelrite® и от 0,1 до 500 мкмоль гербицида - производного бензоксазинона, в зависимости от активности соединения. Содержимое чаш инкубируют в камере для роста в условиях 16 ч на свету и 8 ч в темноте при 22°C сроком до трех недель. Устойчивые растения с менее интенсивными отбеливающими фенотипами сажают в почву и выращивают до спелости в тепличных условиях. На стадии появления розеток, у устойчивых к гербицидам - производным бензоксазинона растений собирают листовые диски для выделения геномной ДНК с помощью комплекта DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия) или общей мРНК с помощью RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия).

Последовательности PPO амплифицируют с использованием стандартных техник ПЦР из геномной ДНК с соответствующими олигонуклеотидами. Для амплификации PPO из мРНК, кДНК синтезируют *in vitro* с помощью Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogene, Карлсбад, Калифорния, США). После клонирования ПЦР продуктов с использованием стандартной плазмиды для секвенирования, ДНК последовательность мутировавших генов PPO идентифицируется с помощью стандартных техник секвенирования. Мутации идентифицируют путем сравнения последовательностей PPO дикого типа и мутировавших последовательностей PPO с помощью программы выравнивания последовательностей Align X (Vector NTI Advance Software Version 10.3, Invitrogene, Карлсбад, Калифорния, США).

Пример 4. Создание растений с устойчивостью к гербицидам - производным бензоксазинона с последовательностями PPO дикого типа или мутировавшими последовательностями PPO

Соя (*Glycine max*), устойчивая к гербицидам - производным бензоксазинона, может быть получена способом, описанным Olhofs et al. (патент США 2009/0049567). Мутировавшие последовательности PPO клонируют с использованием стандартных техник клонирования, как описано у Sambrook et al. (Molecular cloning (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press) в бинарный вектор, содержащий кассету маркерного гена устойчивости (AHAS) и мутировавшую последовательность PPO (маркированную как GOI) между убиквитинным промотором (PcUbi) и терминаторной последовательностью нопалин синтазы (NOS). Для трансформации растения бинарные плазмиды интродуцируют в *Agrobacterium tumefaciens*. Плазмидные конструкторы интродуцируют в пазушные меристемные клетки сои в первичном узле ростковых эксплантатов с использованием агробактериальной трансформации (трансформация посредством *Agrobacterium*). После инокуляции и совместной культивации с *Agrobacterium* эксплантаты переносят в среду интродукции ростков без селекции на одну неделю. Эксплантаты впоследствии переносят в среду для индукции ростков с 1-3 мкмоль имазапира (Arsenal) на 3 недели для селекции трансформированных клеток. Эксплантаты со здоровыми каллюсными/ростковыми подушками в первичном узле затем переносят в среду для элонгации побегов, содержащую 1-3 мкмоль имазапира до тех пор, пока корни не удлинятся или эксплантат не погибнет. Трансгенные ростки укореняют, подвергают анализу TaqMan на присутствие трансгена, переносят в почву и выращивают в теплице до зрелости. Трансформация растений кукурузы осуществляется с помощью метода, описанного McElver and Singh (WO 2008/124495). Векторные конструкторы трансформации растения, содержащие мутировавшие последовательности PPO, интродуцируют в незрелые зародыши кукурузы с помощью трансформации посредством *Agrobacterium*.

Трансформированные клетки выбирают в среде селекции, в которую добавляют 0,5-1,5 мкмоль имазетапира, на 3-4 недели. Трансгенные ростки регенерируют в среде регенерации растений и впоследствии пускают корни.

Трансгенные ростки подвергают анализу TaqMan на присутствие трансгена до трансплантации в герметизирующую смесь и выращивают до спелости в теплице. *Arabidopsis thaliana* трансформируют последовательностями PPO способом "цветочного погружения", как описано McElver and Singh (WO 2008/124495). Трансформацию *Oryza sativa* (риса) осуществляют путем трансформации протопластов, как описано в работах Peng et al. (US 6653529) T0 или T1 трансгенное растение сои, кукурузы, риса и *Arabidopsis thaliana*, содержащее мутировавшие последовательности PPO, тестируют на улучшение устойчивости к гербицидам на основе PPO в вегетационных испытаниях.

Пример 5. Анализ функциональной комплементации и скрининговое исследование

(см. также: William L. Patzoldt, Aaron G. Hager, Joel S. McCormick, and Patrick J. Tranel. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. PNAS 103 (33), 12329-34)

Создание библиотеки PPO

Генные библиотеки PPO создают с помощью случайного мутагенеза (ПЦР с внесением ошибок) или насыщающего мутагенеза гена PPO (Genecart AG, Регенсбург, ФРГ) и клонируют в векторы экспрессии (pBAD-ТОРО) для скрининга *in vivo*. В дополнение, в вектор экспрессии pBAD-ТОРО (Invitrogen) клонируют укороченные версии генов PPO дикого типа и мутантных генов PPO, так, что трансляция началась у второго стартового кодона ATG. PPO кДНК амплифицируют методом ПЦР с использованием

прямого праймера 5- CAGGAATAAGTAATGGGCAACATTTCTGAG- 3, который содержит как сайт связывания рибосомы (AGGA) и стартовый кодон ATG, так и обратный праймер 5-GAAGAATTACGCGGTCTTCTCATC-3, содержащий стоп-кодон. Для трансформации мутантного штамма hemG *E. coli* используются восприимчивые и предположительно устойчивые плазмиды PPO, SASX38, любезно предоставлены Harry Dailey (Университет штата Джорджия, Афины, Джорджия, США). Штамм SASX38 *E. coli* выдерживают в среде LB с добавлением 20 мкг·мл⁻¹ гематина. Трансформированные колонии SASX38, и нетрансформированные контрольные группы, тестируют на способность роста в среде LB по отдельности или с добавлением 20 мкг·мл⁻¹ гематина или ингибитора PPO, лактофена и гербицидов - производных бензоксазина при концентрациях в диапазоне 0,01-500 мкмоль и инкубируют при температуре 37°C в течение 14 ч.

При анализе комплементации и скрининговом исследовании использовался мутантный штамм hemG (PPO) *Escherichia coli*, SASX38, (Sasaman, A., Chartrand, P., Lavoie, M., Tardif, D., Proschek, R. & Lapointe, C. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 113, 297-303) для оценки влияния мутаций PPO mutations в отношении реакции PPO на гербицид. Рост штамма SASX38 происходит крайне медленно, если на него не влияют с помощью экзогенного гема, или его не "спасают" с помощью альтернативного источника PPO. Кроме того, так как *E. coli* дикого типа проявляют природную устойчивость к ингибиторам PPO, применение штамма SASX38 позволило осуществить относительно прямой анализ чувствительности к гербициду PPO дикого типа и мутантных PPO из *A. tuberculatus*. Штамм SASX38 *E. coli* трансформируют с использованием плазмидных конструктов, кодирующих PPO дикого типа и мутантную PPO. Конструкты способны помогать росту штамма SASX38 *E. coli*, что указывает на то, что гены PPO кодируют функциональные белки. Тем не менее, при добавлении в среду для роста гербицидов - производных бензоксазина рост *E. coli*, трансформированной с использованием PPO дикого типа, значительно замедлился, однако этого не произошло с *E. coli*, трансформированной с использованием мутантных PPO.

Пример 6. Условия культуры ткани

Разработан анализ мутагенеза в культуре ткани *in vitro* для выделения и определения характеристик ткани растения (например, ткани кукурузы или риса), обладающей устойчивостью к гербицидам-ингибиторам протопорфириноген оксидазы (например, к сафлуфенацилу, бифеноксу, диурону, лактофену, бутафенацилу). В этом анализе используется соматоклональный вариант, который находится в культуре ткани *in vitro*. Спонтанные мутации, полученные из соматоклонального варианта, могут быть усилены с помощью химического мутагенеза и последующей селекции, поэтапно, или путем повышения концентраций гербицида.

Настоящее изобретение предоставляет условия культуры ткани для стимулирования роста мягкого эмбрионного каллуса кукурузы или риса, имеющего способность регенерации. Каллюсы получают из 4 различных сортов кукурузы или риса, включая *Zea mays*, сорта Japonica (Taipei 309, Nipponbare, Koshihikari) и Indica (Indica 1) соответственно. Семена подвергают поверхностной стерилизации в 70% растворе этанола в течение приблизительно 1 мин, а затем в течение 20 мин - в 20% коммерчески доступном отбеливающем растворе Clorox. Семена промывают стерилизованной водой и высеивают в среду для индукции каллюсов. Производилось тестирование различных сред для индукции каллюсов. Перечни ингредиентов тестируемых сред представлены в табл. 5.

Таблица 5

Ингредиент	Поставщик	R001M	R025M	R026M	R327M	R008M	MS711R
витамины B5	Sigma					1.0 X	
MS соли	Sigma			1.0 X	1.0 X	1.0 X	1.0 X
витамины MS	Sigma			1.0 X	1.0 X		
соли N6	Phytotech	4,0 г/л	4,0 г/л				
витамины N6	Phytotech	1.0 X	1.0 X				
L-пролин	Sigma	2,9 г/л	0,5 г/л				1,2 г/л
Казаминовые кислоты	BD	0,3 г/л	0,3 г/л	2 г/л			
Казеиновый гидролизат	Sigma						1,0 г/л
L-Аспарагина моногидрат	Phytotech						150 мг/л
Никотиновая кислота	Sigma						0,5 мг/л
Пиридоксин HCl	Sigma						0,5 мг/л
Тиамин HCl	Sigma						1,0 мг/л
Мио-инозитол	Sigma						100 мг/л
MES	Sigma	500 мг/л	500 мг/л	500 мг/л	500 мг/л	500 мг/л	500 мг/л
Мальтоза	VWR	30 г/л	30 г/л	30 г/л	30 г/л		
Сорбит	Duchefa			30 г/л			
Сахароза	VWR					10 г/л	30 г/л
NAA	Duchefa					50 мкг/л	
2,4-D	Sigma	2,0 мг/л					1,0 мг/л
MgCl ₂ ·6H ₂ O	VWR					750 мг/л	
→pH		5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,7
Гельрит (Gelrite)	Duchefa	4,0 г/л				2,5 г/л	
Агароза, тип 1	Sigma		7,0 г/л	10 г/л	10 г/л		
→Автоклав		15 мин.	15 мин.	15 мин.	15 мин.	15 мин.	20 мин.
Кинетин	Sigma		2,0 мг/л	2,0 мг/л			
NAA	Duchefa		1,0 мг/л	1,0 мг/л			
ABA	Sigma		5,0 мг/л				
Цефотаксим	Duchefa		0,1 г/л	0,1 г/л	0,1 г/л		
Ванкомицин	Duchefa		0,1 г/л	0,1 г/л	0,1 г/л		
Дисульфат G418	Sigma		20 мг/л	20 мг/л	20 мг/л		

После тестирования нескольких вариантов выбрана R001M среда для индукции каллюсов. Культуры выдерживают в темноте при температуре 30°C. Через 10-14 дней эмбриогенные каллюсы инокулируют в свежую среду.

Пример 7. Селекция каллюсов, устойчивых к гербициду

После того как условия культуры ткани определены, производится дальнейшее определение селекционных условий путем анализа выживаемости ткани в соответствии с кривыми поражения при использовании сафлуфенацила, бифенокса, диурона, лактофена, бутафенацила, ацифлуорфена, гербицидов - производных бензоксазинона. Осуществляется тщательное изучение накопления гербицида в ткани, а также сохранения его эффекта и стойкости в клетках и культуральной среде. Путем этих опытов была определена сублетальная доза для предварительной селекции мутировавшего материала.

После определения начальной дозы сафлуфенацила, бифенокса, диурона, лактофена, бутафенацила, ацифлуорфена и гербицидов - производных бензоксазинона в селекционной среде, осуществляется поэтапная селекция тканей путем повышения концентрации ингибитора РРО с каждым переносом до тех пор, пока не будут получены клетки, активный рост которых происходит в присутствии токсичных доз. Полученные каллюсы затем инокулируют каждые 3-4 недели в R001M с селективным агентом. Селекции подвергаются свыше 26000 каллюсов с 4-5 пересевами до тех пор, пока селективное давление не превысит токсических уровней в соответствии с кривыми поражения и наблюдениями за продолжаемой культурой.

В качестве альтернативы, жидкие культуры инициировали из каллюсов в MS711R при медленном встряхивании и при еженедельных пересевах. После того как жидкие культуры созданы, селекционный агент добавляют непосредственно в колбу при каждом пересеве. Через 2-4 цикла селекции жидких куль-

тур, культуры переносят на фильтры на твердой R001M среде для дальнейшего роста.

Пример 8. Регенерация растений

Устойчивая ткань регенерирует, и ее характеризуют молекулярно для поиска мутаций генных последовательностей РРО и/или биохимически для поиска измененной активности РРО в присутствии селекционного агента. В дополнение, гены, участвующие прямо и/или косвенно в тетрапиррольном биосинтезе и/или в метаболических путях также подвергают секвенированию для характеристики мутаций. В заключение, ферменты, влияющие на основные процессы (такие, например, как метаболизм, транслокация, транспорт), также подвергают секвенированию для характеристики мутаций.

После гербицидной селекции, каллюсы регенерируют с использованием режима среды R025M в течение 10-14 дней, R026M в течение около 2 недель, R327M до тех пор, пока не разовьются хорошо сформированные побеги, и R008S до тех пор, пока побеги не укоренятся для переноса в теплицу. Регенерация производится на свету. При регенерации селекционный агент не используется.

После того, как образуются сильные корни, M0 регенераты переносят в теплицу в квадратных или круглых вегетационных сосудах. Пока пересаженные растения не адаптируются к условиям в теплице, их сохраняют под прозрачным пластиковым стаканом. В теплице устанавливают цикл дня и ночи при температуре 27°C/21°C (80°F/70°F) с натриевыми лампами высокого давления, мощностью 600 Вт, для освещения, чтобы поддерживать долготу дня 14 ч. Полив растений осуществляют по мере необходимости, в зависимости от погоды. Растения удобряют ежедневно.

Пример 9. Анализ последовательностей

Ткань листьев собирают из клонированных растений, разделяют для трансплантирования и анализируют по отдельности. Геномную ДНК экстрагируют с использованием набора Wizard® 96 Magnetic DNA Plant System (Promega, патенты США № 6027945 и 6368800) в соответствии с инструкциями производителя. Выделенную ДНК амплифицируют путем ПЦР с использованием соответствующего прямого и обратного праймера.

ПЦР амплификацию осуществляют с использованием Hotstar Taq DNA Polymerase (Qiagen) с использованием тачдаун программы для термоциклирования в следующем порядке: 96°C в течение 15 мин, после чего следует 35 циклов (96°C, 30 с; 58°C-0,2°C на один цикл, 30 с; 72°C, 3 мин и 30 с), в течение 10 мин при 72°C.

ПЦР продукты верифицируют в отношении концентрации и размера фрагментов путем электрофореза в агарозном геле. Дефосфорилированные ПЦР продукты анализируют прямым секвенированием с использованием ПЦР праймеров (DNA Landmarks или Entelechon). Файлы хроматографии (.scf) анализируют на мутацию, относительно гена дикого типа с использованием Vector NTI Advance 10™ (Invitrogen). На основании данных секвенирования в нескольких отдельных растениях идентифицируют мутации. Анализ последовательностей осуществляется с использованием репрезентативных хроматограмм и с использованием соответствующего программного обеспечения для выравнивания последовательностей AlignX с установками параметров по умолчанию, результаты корректируют для того, чтобы определить вторичные пики.

Пример 10. Демонстрация устойчивости к гербицидам

Выбранные мутанты и устойчивые растения переносят в маленькие вегетационные сосуды. Сорта дикого типа выращивают из семян для того, чтобы они служили в качестве контрольных групп.

По прошествии после переноса приблизительно трех недель, с помощью машины для разбрызгивания химикатов M0 регенераты опрыскивают сафлуфенацилом (BAS 800H) или производным бензоксазинона I.a.35 с добавлением 0,1% метилированного масла из семян. После того как растения адаптируются к условиям в теплице, субпопуляцию дополнительно опрыскивают сафлуфенацилом (BAS 800H) или производным бензоксазинона I.a.35. После опрыскивания растения выдерживают в условиях недостатка влаги в течение 24 ч, перед тем как их снова поливают и удобряют. Опрысканные растения фотографируют и оценивают степень поражения гербицидом через 1 и 2 недели после обработки.

Пример 11. Гербицидная селекция с использованием культуры ткани

Выбор используемой среды, а также построение кривых поражения осуществляют в соответствии с определением, приведенным выше. Для селекции используются различные техники. Применяется либо поэтапная селекция, либо сразу же применяется летальный уровень гербицида. В любом случае все каллюсы переносят для каждого нового цикла селекции. Селекция осуществляется в ходе 4-5 циклов культивирования, при этом каждый цикл длится 3-5 недель. Каллюсы помещают на нейлоновые мембраны для того, чтобы упростить перенос (листья с порами 200 мкм, Bidesign, Сако, Мэн). Мембраны вырезают таким образом, чтобы они соответствовали чашкам Петри 100×20 мм, и подвергают паровой стерилизации перед использованием с 25-35 каллюсами (средний вес/каллюс - 22 мг) на каждой чашке. В дополнение, один набор каллюсов подвергают селекции в жидкой культуральной среде с еженедельным пересевом, после чего следует дальнейшая селекция на полутвердой среде.

Селекция мутантных линий осуществляется с использованием сафлуфенацила (BAS 800H) или производного бензоксазинона I.a.35. Эффективность получения мутантов - высокая, на основании процентного отношения каллюсов, давших регенерируемую мутантную линию, или количества линий в со-

ответствии с определением по грамму использованной ткани. В целом, частота мутаций выше в пять раз по сравнению с *Raspalum vaginatum* и в два раз по сравнению с кукурузой.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> БАСФ СЕ

<120> РАСТЕНИЯ С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДАМ

<130> PF71580

<150> US 61/423604

<151> 2010-12-16

<150> EP 10195296.8

<151> 2010-12-16

<160> 46

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1605

<212> ДНК

<213> *Amaranthus tuberculatus*

<400> 1

atggtaattc aatccattac ccacctttca ccaaaccttg cattgccatc gccattgtca 60

gtttcaacca agaactaccc agtagctgta atgggcaaca tttctgagcg ggaagaaccc 120

acttctgcta aaagggttgc tgttgttggt gctggagtta gtggacttgc tgctgcatat 180

aagctaaaat cccatggttt gagtgtgaca ttgtttgaag ctgattctag agctggaggc 240

aaacttaaaa ctgttaaaaa agatggtttt atttgggatg agggggcaaa tactatgaca 300

gaaagtgagg cagaggtctc gagtttgatc gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag 360

ttgccaattt cacaaaataa aagatacata gctagagacg gtcttcctgt gctactacct 420

tcaaatcccg ctgcactact cacgagcaat atcctttcag caaaatcaaa gctgcaaatt 480

atgttggaac catttctctg gagaaaacac aatgctactg aactttctga tgagcatggt 540

caggaaagcg ttggtgaatt ttttgagcga cattttggga aagagtttgt tgattatggt 600

atcgaccctt ttgttgcggg tacatgtggt ggagatcctc aatcgctttc catgcaccat 660

acatttccag aagtatggaa tattgaaaaa aggtttggct ctgtgtttgc tggactaatt 720

caatcaacat tgttatctaa gaaggaaaag ggtggagaaa atgcttctat taagaagcct 780

cgtgtacgtg gttcattttc atttcaaggt ggaatgcaga cacttggtga cacaatgtgc 840

aaacagcttg gtgaagatga actcaaactc cagtgtgagg tgctgtcctt gcatataac 900

cagaagggga tcccctcatt aggggaattgg tcagtctctt ctatgtcaaa taataccagt 960

gaagatcaat cttatgatgc tgtggttgtc actgctccaa ttcgcaatgt caaagaaatg 1020

aagattatga aatttggaaa tccattttca cttgacttta ttccagaggt gacgtacgta 1080

029356

cccccttccg ttatgattac tgcattcaaa aaggataaag tgaagagacc tcttgagggc 1140
 ttcggagttc ttatcccctc taaagagcaa cataatggac tgaagactct tggacttcta 1200
 ttttctcca tgatgtttcc tgatcgtgct ccatctgaca tgtgtctctt tactacattt 1260
 gtcggaggaa gcagaaatag aaaacttgca aacgcttcaa cgatgaatt gaagcaaata 1320
 gtttcttctg accttcagca gctgttgggc actgaggacg aaccttcatt tgtcaatcat 1380
 ctcttttggg gcaacgcatt cccattgtat ggacacaatt acgattctgt tttgagagcc 1440
 atagacaaga tggaaaagga tcttctggga tttttttatg caggtaacca taagggtgga 1500
 ctttcagtgg gaaaagcgat ggctccgga tgcaaggctg cggaacttgt aatatcctat 1560
 ctggactctc atatatacgt gaagatggat gagaagaccg cgtaa 1605

<210> 2
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> *Amaranthus tuberculatum*

<400> 2

Met Val Ile Gln Ser Ile Thr His Leu Ser Pro Asn Leu Ala Leu Pro
 1 5 10 15

Ser Pro Leu Ser Val Ser Thr Lys Asn Tyr Pro Val Ala Val Met Gly
 20 25 30

Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val Ala Val
 35 40 45

Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser
 50 55 60

His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala Gly Gly
 65 70 75 80

Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala
 85 90 95

Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile Asp Asp
 100 105 110

Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn Lys Arg
 115 120 125

Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn Pro Ala
 130 135 140

Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu Gln Ile

029356

Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Met Cys Leu
 405 410 415

Phe Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu Ala Asn Ala
 420 425 430

Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu
 435 440 445

Leu Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe Trp Ser
 450 455 460

Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val Leu Arg Ala
 465 470 475 480

Ile Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn
 485 490 495

His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly Cys Lys
 500 505 510

Ala Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr Val Lys
 515 520 525

Met Asp Glu Lys Thr Ala
 530

<210> 3
 <211> 1605
 <212> ДНК
 <213> *Amaranthus tuberculatus*

<400> 3
 atggtaattc aatccattac ccacctttca ccaaaccttg cattgccatc gccattgtca 60
 gtttcaacca agaactaccc agtagctgta atgggcaaca tttctgagcg ggaagaacct 120
 acttctgcta aaagggttgc tgttgttggg gctggagtta gtggacttgc tgctgcatat 180
 aagctaaaat cccatggttt gagtgtgaca ttgtttgaag ctgattctag agctggaggg 240
 aaacttaaaa ctgttaaaaa agatggtttt atttgggatg agggggcaaa tactatgaca 300
 gaaagtgagg cagaggtctc gagtttgatc gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag 360
 ttgccaatth cacaaaataa aagatacata gctagagccg gtcttctctg gctactacct 420
 tcaaateccg ctgcactact cagagcaat atcctttcag caaaatcaaa gctgcaaatt 480
 atgttggaac catttctctg gagaaaacac aatgctactg aactttctga tgagcatggt 540
 caggaaagcg ttggtgaatt ttttgagcga cattttggga aagagtttgt tgattatggt 600
 attgaccctt ttgttgcggg tacatgtggg ggagatcctc aatcgctttc catgcacat 660

acatttccag aagtatggaa tattgaaaaa aggtttggct ctgtgtttgc cggactaatt 720
 caatcaacat tgttatctaa gaaggaaaag ggtggagaaa atgcttctat taagaagcct 780
 cgtgtacgtg gttcattttc atttcaaggt ggaatgcaga cacttgttga cacaatgtgc 840
 aaacagcttg gtgaagatga actcaaactc cagtgtgagg tgctgtcctt gtcataaac 900
 cagaagggga tcccctcact aggggaattgg tcagtctctt ctatgtcaaa taataccagt 960
 gaagatcaat cttatgatgc tgtggttgtc actgctccaa ttcgcaatgt caaagaaatg 1020
 aagattatga aatttgaaaa tccattttca cttgacttta ttccagaggt gacgtacgta 1080
 cccctttccg ttatgattac tgcattcaaa aaggataaag tgaagagacc tcttgagggc 1140
 ttcggagttc ttatcccctc taaagagcaa cataatggac tgaagactct tggtaactta 1200
 ttttctcca tgatgtttcc tgatcgtgct ccatctgaca tgtgtctctt tactacattt 1260
 gtcggaggaa gcagaaatag aaaacttgca aacgcttcaa cggatgaatt gaagcaaata 1320
 gtttcttctg accttcagca gctgttgggc actgaggacg aaccttcatt tgtcaatcat 1380
 ctcttttgga gcaacgcatt cccattgtat ggacacaatt acgattctgt tttgagagcc 1440
 atagacaaga tggaaaagga tcttcttgga ttttttatg caggtaacca taagggtgga 1500
 ctttcagtgg gaaaagcgat ggcctccgga tgcaaggctg cggaaacttg aatatactat 1560
 ctggactctc atatatacgt gaagatggat gagaagaccg cgtaa 1605

<210> 4
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> *Amaranthus tuberculatum*

<400> 4

Met Val Ile Gln Ser Ile Thr His Leu Ser Pro Asn Leu Ala Leu Pro
 1 5 10 15

Ser Pro Leu Ser Val Ser Thr Lys Asn Tyr Pro Val Ala Val Met Gly
 20 25 30

Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val Ala Val
 35 40 45

Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser
 50 55 60

His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala Gly Gly
 65 70 75 80

Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala
 85 90 95

Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile Asp Asp
 100 105 110

Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn Lys Arg
 115 120 125

Tyr Ile Ala Arg Ala Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn Pro Ala
 130 135 140

Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu Gln Ile
 145 150 155 160

Met Leu Glu Pro Phe Leu Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu Leu Ser
 165 170 175

Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg His Phe
 180 185 190

Gly Lys Glu Phe Val Asp Tyr Val Ile Asp Pro Phe Val Ala Gly Thr
 195 200 205

Cys Gly Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met His His Thr Phe Pro Glu
 210 215 220

Val Trp Asn Ile Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Phe Ala Gly Leu Ile
 225 230 235 240

Gln Ser Thr Leu Leu Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Glu Asn Ala Ser
 245 250 255

Ile Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe Gln Gly Gly Met
 260 265 270

Gln Thr Leu Val Asp Thr Met Cys Lys Gln Leu Gly Glu Asp Glu Leu
 275 280 285

Lys Leu Gln Cys Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Lys Gly Ile
 290 295 300

Pro Ser Leu Gly Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn Asn Thr Ser
 305 310 315 320

Glu Asp Gln Ser Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro Ile Arg Asn
 325 330 335

Val Lys Glu Met Lys Ile Met Lys Phe Gly Asn Pro Phe Ser Leu Asp

029356

340 345 350
 Phe Ile Pro Glu Val Thr Tyr Val Pro Leu Ser Val Met Ile Thr Ala
 355 360 365
 Phe Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu
 370 375 380
 Ile Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu
 385 390 395 400
 Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Met Cys Leu
 405 410 415
 Phe Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu Ala Asn Ala
 420 425 430
 Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu
 435 440 445
 Leu Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe Trp Ser
 450 455 460
 Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val Leu Arg Ala
 465 470 475 480
 Ile Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn
 485 490 495
 His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly Cys Lys
 500 505 510
 Ala Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr Val Lys
 515 520 525
 Met Asp Glu Lys Thr Ala
 530

<210> 5

<211> 1602

<212> ДНК

<213> *Amaranthus tuberculatus*

<400> 5

atggtaatc aatccattac ccacotttca ccaaaccttg cattgccatc gccattgtca 60

gtttccacca agaactaccc agtagctgta atgggcaaca tttctgagcg agaagaacct 120

acttctgcta aaagggttgc tgttggttgg gctggagtta gtggacttgc tgctgcatat 180

029356

aagctaaaat cccatggttt gagtgtgaca ttgtttgaag ctgattctag agctggaggc 240
 aaacttaaaa ctgttaaaaa agatggtttt atttgggatg agggggcaaa tactatgaca 300
 gaaagtgagg cagaggtctc gagtttgatc gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag 360
 ttgccaatTTT cacaaaataa aagatacata gctagagacg gtcttctctg gctactacct 420
 tcaaatcccg ctgcactact cacgagcaat atcctttcag caaatcaaa gctgcaaatt 480
 atgttgaac catttctctg gagaaaacac aatgctactg aactttctga tgagcatggt 540
 caggaaagcg ttggtgaatt ttttgagcga cattttggga aagagtttgt tgattatggt 600
 attgaccctt ttgttgccggg tacatgtgga gatcctcaat cgctttccat gcaccataca 660
 tttccagaag tatggaatat tgaaaaaagg tttggctctg tgtttgctgg actaattcaa 720
 tcaacattgt tatctaagaa ggaaaagggt ggagaaaatg cttctattaa gaagcctcgt 780
 gtacgtgggt cattttcatt tcaaggtgga atgcagacac ttgttgacac aatgtgcaaa 840
 cagcttggtg aagatgaact caaactccag tgtgaggtgc tgtccttctc atataaccag 900
 aaggggatcc cctcattagg gaattggtca gtctcttcta tgtcaaataa taccagtgaa 960
 gatcaatctt atgatgctgt ggttgtcact gctccaattc gcaatgtcaa agaaatgaag 1020
 attatgaaat ttggaaatcc attttcaact gactttattc cagaggtgac gtacgtaccc 1080
 ctttccgtta tgattactgc attcaaaaag gataaagtga agagacctct tgagggcttc 1140
 ggagttctta tcccctctaa agagcaacat aatggactga agactcttgg tactttatTTT 1200
 tcctccatga tgtttctctga tcgtgctcca tetgacatgt gtctctttac tacatttctc 1260
 ggaggaagca gaaatagaaa acttgcaaac gcttcaacgg atgaattgaa gcaaatagtt 1320
 tcttctgacc ttcagcagct gttgggcact gaggacgaac cttcatttgt caatcatctc 1380
 ttttgagca acgcattccc attgtatgga cacaattacg attgtgtttt gagagccata 1440
 gacaagatgg aaaaggatct tcctggattt ttttatgcag gtaaccataa ggggtggactt 1500
 tcagtgggaa aagcgatggc ctccgatgc aaggetgcgg aacttgtaat atcctatctg 1560
 gacttcata tatacgtgaa gatggatgag aagaccgct aa 1602

<210> 6
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> *Amaranthus tuberculatum*

<400> 6

Met Val Ile Gln Ser Ile Thr His Leu Ser Pro Asn Leu Ala Leu Pro
 1 5 10 15

Ser Pro Leu Ser Val Ser Thr Lys Asn Tyr Pro Val Ala Val Met Gly
 20 25 30

029356

Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val Ala Val
 35 40 45
 Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser
 50 55 60
 His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala Gly Gly
 65 70 75 80
 Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala
 85 90 95
 Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile Asp Asp
 100 105 110
 Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn Lys Arg
 115 120 125
 Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn Pro Ala
 130 135 140
 Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Met Leu Glu Pro Phe Leu Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu Leu Ser
 165 170 175
 Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg His Phe
 180 185 190
 Gly Lys Glu Phe Val Asp Tyr Val Ile Asp Pro Phe Val Ala Gly Thr
 195 200 205
 Cys Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met His His Thr Phe Pro Glu Val
 210 215 220
 Trp Asn Ile Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Phe Ala Gly Leu Ile Gln
 225 230 235 240
 Ser Thr Leu Leu Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Glu Asn Ala Ser Ile
 245 250 255
 Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe Gln Gly Gly Met Gln
 260 265 270
 Thr Leu Val Asp Thr Met Cys Lys Gln Leu Gly Glu Asp Glu Leu Lys
 275 280 285

029356

Leu Gln Cys Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Lys Gly Ile Pro
 290 295 300

Ser Leu Gly Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn Asn Thr Ser Glu
 305 310 315 320

Asp Gln Ser Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro Ile Arg Asn Val
 325 330 335

Lys Glu Met Lys Ile Met Lys Phe Gly Asn Pro Phe Ser Leu Asp Phe
 340 345 350

Ile Pro Glu Val Thr Tyr Val Pro Leu Ser Val Met Ile Thr Ala Phe
 355 360 365

Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile
 370 375 380

Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe
 385 390 395 400

Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Met Cys Leu Phe
 405 410 415

Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu Ala Asn Ala Ser
 420 425 430

Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu Leu
 435 440 445

Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe Trp Ser Asn
 450 455 460

Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Cys Val Leu Arg Ala Ile
 465 470 475 480

Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His
 485 490 495

Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly Cys Lys Ala
 500 505 510

Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr Val Lys Met
 515 520 525

Asp Glu Lys Thr Ala

<210> 7
 <211> 1602
 <212> ДНК
 <213> *Amaranthus tuberculatus*

<400> 7

atggtaattc aatccattac ccacctttca ccaaaccttg cattgccatc gccattgtca	60
gtttccacca agaactaccc agtagctgta atgggcaaca tttctgagcg ggaagaaccc	120
acttctgcta aaagggttgc tgttgttggt gctggagtta gtggacttgc tgctgcatat	180
aagctaaaat cccatggttt gagtgtgaca ttgtttgaag ctaattctag agctggaggc	240
aaacttaaaa ctgttaaaaa agatggtttt atttgggatg agggggcaaa tactatgaca	300
gaaagtgagg cagaggtctc gagtttgatc gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag	360
ttgccaattt cacaaaataa aagatacata gctagagacg gtcttcctgt gctactacct	420
tcaaatcccg ctgcactact cacgagcaat atcctttcag caaaatcaa gctgcaaatt	480
atgttggaac ctttctctg gagaaaacac aatgctactg aactttctga tgagcatggt	540
caggaaagcg ttggtgaatt ttttgagcga cttttggga aagagtttgt tgattatggt	600
attgaccctt ttgttgcggg tacatgtgga gatcctcaat cgctttccat gtaccataca	660
tttcagaag tatggaatat tgaaaaagg tttggctctg tgtttgctgg actaattcaa	720
tcaacattgt tatctaagaa ggaaaagggt ggagaaaatg cttctattaa gaagcctcgt	780
gtacgtgggt cattttcatt tcaaggtgga atgcagacac ttggtgacac aatgtgcaaa	840
cagcttggtg aagatgaact caaactccag tgtgaggtgc tgtccttgtc atataaccag	900
aaggggatcc cctcattagg gaattggtca gtctcttcta tgtcaaataa taccagtgaa	960
gatcaatctt atgatgctgt ggttgctcact gctccaattc gcaatgtcaa agaaatgaag	1020
attatgaaat ttggaaatcc attttcactt gactttattc cagaggtgac gtacgtaccc	1080
ctttccgtta tgattactgc attcaaaaag gataaagtga agagacctct tgagggcttc	1140
ggagttctta tcccctctaa agagcaacat aatggactga agactcttgg tactttattt	1200
tcctccatga tgtttcctga tcgtgctcca tctgacatgt gtctctttac tacatttgtc	1260
ggaggaagca gaaatagaaa acttgcaaac gcttcaacgg atgaattgaa gcaaatagtt	1320
tcttctgacc ttcagcagct gttgggcact gaggacgaac cttcatttgt caatcatctc	1380
ttttggagca acgcattccc attgtatgga cacaattaacg attctgtttt gagagccata	1440
gacaagatgg aaaaggatct tcctggatth ttttatgcag gtaaccataa ggggtggactt	1500
tcagtgggaa aagcgatggc ctccggatgc aaggctgctg aacttgtaat atcctatctg	1560
gactctcata tatacgtgaa gatggatgag aagaccgctg aa	1602

029356

<210> 8
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> *Amaranthus tuberculatum*

 <400> 8
 Met Val Ile Gln Ser Ile Thr His Leu Ser Pro Asn Leu Ala Leu Pro
 1 5 10 15

 Ser Pro Leu Ser Val Ser Thr Lys Asn Tyr Pro Val Ala Val Met Gly
 20 25 30

 Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val Ala Val
 35 40 45

 Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser
 50 55 60

 His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asn Ser Arg Ala Gly Gly
 65 70 75 80

 Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala
 85 90 95

 Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile Asp Asp
 100 105 110

 Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn Lys Arg
 115 120 125

 Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn Pro Ala
 130 135 140

 Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu Gln Ile
 145 150 155 160

 Met Leu Glu Pro Phe Leu Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu Leu Ser
 165 170 175

 Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg His Phe
 180 185 190

 Gly Lys Glu Phe Val Asp Tyr Val Ile Asp Pro Phe Val Ala Gly Thr
 195 200 205

 Cys Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met Tyr His Thr Phe Pro Glu Val
 210 215 220

029356

Trp Asn Ile Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Phe Ala Gly Leu Ile Gln
 225 230 235 240

Ser Thr Leu Leu Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Glu Asn Ala Ser Ile
 245 250 255

Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe Gln Gly Gly Met Gln
 260 265 270

Thr Leu Val Asp Thr Met Cys Lys Gln Leu Gly Glu Asp Glu Leu Lys
 275 280 285

Leu Gln Cys Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Lys Gly Ile Pro
 290 295 300

Ser Leu Gly Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn Asn Thr Ser Glu
 305 310 315 320

Asp Gln Ser Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro Ile Arg Asn Val
 325 330 335

Lys Glu Met Lys Ile Met Lys Phe Gly Asn Pro Phe Ser Leu Asp Phe
 340 345 350

Ile Pro Glu Val Thr Tyr Val Pro Leu Ser Val Met Ile Thr Ala Phe
 355 360 365

Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile
 370 375 380

Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe
 385 390 395 400

Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Met Cys Leu Phe
 405 410 415

Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu Ala Asn Ala Ser
 420 425 430

Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu Leu
 435 440 445

Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe Trp Ser Asn
 450 455 460

Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val Leu Arg Ala Ile
 465 470 475 480

Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His
 485 490 495

Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly Cys Lys Ala
 500 505 510

Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr Val Lys Met
 515 520 525

Asp Glu Lys Thr Ala
 530

<210> 9
 <211> 1644
 <212> ДНК
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 9
 atgggcctga ttaaaaacgg taccctttat tgtcgttttg ggataagctg gaattttgcc 60
 gctgtgtttt tttctactta tttccgtcac tgctttcgac tggtcagaga ttttgactct 120
 gaattgttgc agatagcaat ggcgtctgga gcagtagcag atcatcaa at tgaagcggtt 180
 tcaggaaaaa gagtcgcagt cgtagggtgca ggtgtaagtg gacttgccggc ggcttacaag 240
 ttgaaatcga ggggtttgaa tgtgactgtg tttgaagctg atggaagagt aggtgggaag 300
 ttgagaagtg ttatgcaaaa tggtttgatt tgggatgaag gagcaaacac catgactgag 360
 gctgagccag aagttgggag tttacttgat gatcttgggc ttcgtgagaa acaacaattt 420
 ccaatttcac agaaaaagcg gtatattgtg cggaatgggtg tacctgtgat gctacctacc 480
 aatcccatag agctggtcac aagtagtgtg ctctctacce aatctaagtt tcaaatcttg 540
 ttggaacat ttttatggaa gaaaaagtc tcaaaagtct cagatgcac tgctgaagaa 600
 agtgtaagcg agttctttca acgccatttt ggacaagagg ttgttgacta tctcatcgac 660
 ccttttgttg gtggaacaag tgctgcccgc octgattccc tttcaatgaa gcattctttc 720
 ccagatctct ggaatagttt tggctctatt atagtcgggtg caatcagaac aaagtttget 780
 gctaaagggtg gtaaaagtag agacacaaaag agttctctctg gcacaaaaaa gggttcgcgt 840
 gggtcattct cttttaaggg gggaatgcag attcttctctg atacgttgtg caaaagtctc 900
 tcacatgatg agatcaattt agactccaag gtactctctt tgtcttacia ttctggatca 960
 agacaggaga actgggtcatt atcttgtggt tcgcataatg aaacgcagag acaaaaacccc 1020
 cattatgatg ctgctctctt gtgcaatgtg aaggagatga aggttatgaa aggaggacaa 1080
 ccctttcagc taaactttct ccccagatt aattacatgc cctctcgggt tttaatcacc 1140
 acattcacia aggagaaagt aaagagacct cttgaaggct ttgggggtact cattccatct 1200

029356

aaggagcaaa agcatggttt caaaactcta ggtacacttt tttcatcaat gatgtttcca 1260
gatcgttccc ctagtgcagt tcatctatat acaactttta ttgggtgggag taggaaccag 1320
gaactagcca aagcttccac tgacgaatta aaacaagttg tgacttctga ccttcagcga 1380
ctggtggggg ttgaaggtga acccgtgtct gtcaaccatt actattggag gaaagcattc 1440
ccgttgatg acagcagcta tgactcagtc atggaagcaa ttgacaagat ggagaatgat 1500
ctacctgggt tcttctatgc aggtaatcat cgaggggggc tctctgttgg gaaatcaata 1560
gcatcagggt gcaaagcagc tgacctgtg atctcatacc tggagtcttg ctcaaagatgac 1620
aagaaaccaa atgacagctt ataa 1644

<210> 10
<211> 547
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Gly Leu Ile Lys Asn Gly Thr Leu Tyr Cys Arg Phe Gly Ile Ser
1 5 10 15

Trp Asn Phe Ala Ala Val Phe Phe Ser Thr Tyr Phe Arg His Cys Phe
20 25 30

Arg Leu Val Arg Asp Phe Asp Ser Glu Leu Leu Gln Ile Ala Met Ala
35 40 45

Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala Val Ser Gly Lys Arg
50 55 60

Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys
65 70 75 80

Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Asp Gly Arg
85 90 95

Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn Gly Leu Ile Trp Asp
100 105 110

Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val Gly Ser Leu
115 120 125

Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Phe Pro Ile Ser Gln
130 135 140

Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro Val Met Leu Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu Ser Thr Gln Ser Lys
 165 170 175

Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys Lys Lys Ser Ser Lys
 180 185 190

Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser Glu Phe Phe Gln Arg
 195 200 205

His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe Val Gly
 210 215 220

Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser Met Lys His Ser Phe
 225 230 235 240

Pro Asp Leu Trp Asn Ser Phe Gly Ser Ile Ile Val Gly Ala Ile Arg
 245 250 255

Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly Lys Ser Arg Asp Thr Lys Ser Ser
 260 265 270

Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg Gly Ser Phe Ser Phe Lys Gly Gly
 275 280 285

Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu Cys Lys Ser Leu Ser His Asp Glu
 290 295 300

Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Gly Ser
 305 310 315 320

Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser Cys Val Ser His Asn Glu Thr Gln
 325 330 335

Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu
 340 345 350

Met Lys Val Met Lys Gly Gly Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro
 355 360 365

Glu Ile Asn Tyr Met Pro Leu Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys
 370 375 380

Glu Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser
 385 390 395 400

Lys Glu Gln Lys His Gly Phe Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser

029356

	405		410		415														
Met	Met	Phe	Pro	Asp	Arg	Ser	Pro	Ser	Asp	Val	His	Leu	Tyr	Thr	Thr				
			420					425					430						
Phe	Ile	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Gln	Glu	Leu	Ala	Lys	Ala	Ser	Thr	Asp				
		435					440					445							
Glu	Leu	Lys	Gln	Val	Val	Thr	Ser	Asp	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Gly	Val				
	450					455					460								
Glu	Gly	Glu	Pro	Val	Ser	Val	Asn	His	Tyr	Tyr	Trp	Arg	Lys	Ala	Phe				
465					470				475						480				
Pro	Leu	Tyr	Asp	Ser	Ser	Tyr	Asp	Ser	Val	Met	Glu	Ala	Ile	Asp	Lys				
				485					490					495					
Met	Glu	Asn	Asp	Leu	Pro	Gly	Phe	Phe	Tyr	Ala	Gly	Asn	His	Arg	Gly				
			500					505					510						
Gly	Leu	Ser	Val	Gly	Lys	Ser	Ile	Ala	Ser	Gly	Cys	Lys	Ala	Ala	Asp				
		515					520					525							
Leu	Val	Ile	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Cys	Ser	Asn	Asp	Lys	Lys	Pro	Asn				
	530					535					540								
Asp	Ser	Leu																	
545																			

<210> 11
 <211> 1647
 <212> ДHK
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 11
 atgacaacaa ctcccatcgc caatcaccct aatattttca ctcaccagtc gtcgtcatcg 60
 ccattggcat tcttaaaccg tacgagtttc atccctttct cttcaatctc caagcgcaat 120
 agtgtcaatt gcaatggctg gagaacacga tgctccgttg ccaaagatta cacagttcct 180
 tcctcagcgg tcgacggcgg acccgccgcg gagctggact gtgttatagt tggagcagga 240
 attagtggcc tctgcattgc gcaggtgatg tccgctaatt accccaattt gatggtaacc 300
 gaggcgagag atcgtgccgg tggcaacata acgactgtgg aaagagacgg ctatttgtgg 360
 gaagaaggtc ccaacagttt ccagccgtcc gatcctatgt tgactatggc agtagattgt 420
 ggattgaagg atgatttggg gttgggagat cctaatacgc cccgtttcgt tttgtggaag 480
 ggtaaattaa ggcccgtccc ctcaaaactc actgatcttc ccttttttga tttgatgagc 540

attcctggca agttgagagc tggttttggt gccattggcc tccgcccttc acctccaggt 600
 catgaggaat cagttgagca gttcgtgcgt cgtaatcttg gtggcgaagt ctttgaacgc 660
 ttgatagaac cattttgttc tgggtgtttat gctggtgatc cctcaaaaact gagtatgaaa 720
 gcagcatttg ggaaagtttg gaagttggaa gaaactgggtg gtagcattat tggaggaacc 780
 tttaaagcaa taaaggagag atccagtaca cctaaagcgc cccgcgatcc gcgtttacct 840
 aaacccaaaag gacagacagt tggatcattc aggaagggtc tcagaatgct gccggatgca 900
 atcagtgcaa gattgggaag caaattaaaa ctatcatgga agctttctag cattaactaag 960
 tcagaaaaag gaggatatca cttgacatac gagacaccag aaggagtagt ttctcttcaa 1020
 agtcgaagca ttgtcatgac tgtgccatcc tatgtagcaa gcaacatatt acgtcctctt 1080
 tcggttgccg cagcagatgc actttcaaat ttctactatc ccccagttgg agcagtcaca 1140
 atttcatatc ctcaagaagc tttcgtgat gagcgtctgg ttgatggtga actaaagggga 1200
 tttgggcagt tgcattccacg tacacagggga gtggaaacac taggaacgat atatagttca 1260
 tcactcttcc ctaaccgtgc cccaaaaggt cgggtgctac tcttgaacta cattggagga 1320
 gcaaaaaatc ctgaaatddd gtctaagacg gagagccaac ttgtggaagt agttgatcgt 1380
 gacctcagaa aaatgcttat aaaacccaaa gctcaagatc ctcttgttgt ggggtgtgcga 1440
 gtatggccac aagctatccc acagtttttg gttggtcate tggatacgtt aagtaactgca 1500
 aaagctgcta tgaatgataa tgggcttgaa gggctgtttc ttgggggtaa ttatgtgtca 1560
 ggtgtagcat tggggaggtg tgttgaaggt gcttatgaag ttgcatccga ggtaacagga 1620
 tttctgtctc ggtatgcata caaatga 1647

<210> 12

<211> 548

<212> PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 12

Met Thr Thr Thr Pro Ile Ala Asn His Pro Asn Ile Phe Thr His Gln
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Pro Leu Ala Phe Leu Asn Arg Thr Ser Phe Ile Pro
 20 25 30

Phe Ser Ser Ile Ser Lys Arg Asn Ser Val Asn Cys Asn Gly Trp Arg
 35 40 45

Thr Arg Cys Ser Val Ala Lys Asp Tyr Thr Val Pro Ser Ser Ala Val
 50 55 60

Asp Gly Gly Pro Ala Ala Glu Leu Asp Cys Val Ile Val Gly Ala Gly

029356

Ser Glu Lys Gly Gly Tyr His Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val
325 330 335

Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Ile Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val
340 345 350

Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu
355 360 365

Ser Asn Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro
370 375 380

Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu Arg Leu Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly
385 390 395 400

Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr
405 410 415

Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Lys Gly Arg Val
420 425 430

Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Asn Pro Glu Ile Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val Glu Val Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys
450 455 460

Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala Gln Asp Pro Leu Val Val Gly Val Arg
465 470 475 480

Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Thr
485 490 495

Leu Ser Thr Ala Lys Ala Ala Met Asn Asp Asn Gly Leu Glu Gly Leu
500 505 510

Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val
515 520 525

Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ser Glu Val Thr Gly Phe Leu Ser Arg
530 535 540

Tyr Ala Tyr Lys
545

<210> 13
<211> 1668
<212> ДНК

<213> *Cichorium intybus*

<400> 13

atgacatctc tcacagacgt ttgttccctc aactggtgcc gtagctggtc ttcccttccg 60
ccaccggttt ctggtggggtc gttgacgtca aagaatccta ggtacctaat cacgtatagt 120
ccggcgcctc gcaaatgcaa taggtggagg ttccgctgct ctatagccaa ggattcccca 180
attactcctc ccatttcaaa tgagttcaac tctcagccat tgttggactg tgtcattgtg 240
ggcgccggca ttagcggcct ttgcattgcg caggccctag cgactaaaca cgcctccgtc 300
tctccggatg tgatcgtcac cgaggcacga gacagagtcg ggggtaatat atcaacggtt 360
gaaagggatg gctatctctg ggaagaaggt cctaacagct tccagccatc tgatgccatg 420
ctcaccatgg tgggtggatag tgggttgaag gatgatttgg tgttaggtga cccaacagca 480
ccccgctttg tattatgggg aggtgatttg aaaccggttc cttccaaacc ggctgacctc 540
cctttctttg acctcatgag ctttctgga aaactcagag ccggttttgg tgctcttgga 600
ttcgcctctt cacctccaga tcgcgaagaa tcggttgagg agtttgttag acgtaatctt 660
ggagatgaag ttttcgaacg cttgatagaa cctttttgct cagggtgtta tgctggtgat 720
ccatcaaac ttagtatgaa agcagcattt ggaaggtct ggaatctgga gcaaaatggt 780
ggtagcattg ttggtggagc cttcaaggct attcaggaca gaaagaatag tcaaaagcct 840
ccacgggacc cgaggttacc gaaaccaaag ggccaaactg ttggatcttt taggaaagga 900
caagcgatgt tgcctaatgc aatctcaacg aggttaggta gcagagtga atgtgtttgg 960
aagctcacga gtatttcaaa attggagaat agaggttata atttgacata tgaaacacca 1020
caaggatttg aaagtctgca gactaaaact atcgtgatga ctgttccatc ctacgtggcg 1080
agtgacttgt tgcgtccgct ttcgttgggt gcagcagatg cattgtcaaa attttattat 1140
cctccggttg cagctgtatc aatttcatat ccaaagacg caattcgtgc tgaccggctg 1200
attgatggtc aactcaaagg ttttgggcaa ttgcatccac gaagtcaagg ggtggaaact 1260
ttaggtacga tctacagttc atctcttttc cctaaccgag cgccacctgg aagggttctg 1320
ctcttgaact acatcggagg ggctacaaat cctgaaatc tatcaaagac ggaggggcgaa 1380
attgtggatg cgggtggaccg ggacctacgg acgatgctga taaggcgtga tgcggaagat 1440
ccattgacgt tgggggtgcg ggtgtggcct cgagcaatcc cgcagtttct gatcggtcat 1500
tatgacattc tagattctgc aaaagctgct ctgagtagcg gtggattcca aggtatgttt 1560
cttgggtggca actatgtgtc tgggtgtggct ttaggtaa atgtgtcagaggc tgcttatgat 1620
gttgccgctg aggtaatgaa ctttttctg caaggggtgt acaagtga 1668

<210> 14

<211> 555

<212> PRT

029356

<213> Cichorium

<400> 14

Met Thr Ser Leu Thr Asp Val Cys Ser Leu Asn Cys Cys Arg Ser Trp
1 5 10 15

Ser Ser Leu Pro Pro Pro Val Ser Gly Gly Ser Leu Thr Ser Lys Asn
20 25 30

Pro Arg Tyr Leu Ile Thr Tyr Ser Pro Ala His Arg Lys Cys Asn Arg
35 40 45

Trp Arg Phe Arg Cys Ser Ile Ala Lys Asp Ser Pro Ile Thr Pro Pro
50 55 60

Ile Ser Asn Glu Phe Asn Ser Gln Pro Leu Leu Asp Cys Val Ile Val
65 70 75 80

Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys
85 90 95

His Ala Ser Val Ser Pro Asp Val Ile Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg
100 105 110

Val Gly Gly Asn Ile Ser Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu
115 120 125

Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Ala Met Leu Thr Met Val
130 135 140

Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala
145 150 155 160

Pro Arg Phe Val Leu Trp Gly Gly Asp Leu Lys Pro Val Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Phe Pro Gly Lys Leu
180 185 190

Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Phe Arg Pro Ser Pro Pro Asp Arg
195 200 205

Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val
210 215 220

Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp
225 230 235 240

029356

Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Asn Leu
 245 250 255

Glu Gln Asn Gly Gly Ser Ile Val Gly Gly Ala Phe Lys Ala Ile Gln
 260 265 270

Asp Arg Lys Asn Ser Gln Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys
 275 280 285

Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Gln Ala Met Leu
 290 295 300

Pro Asn Ala Ile Ser Thr Arg Leu Gly Ser Arg Val Lys Leu Cys Trp
 305 310 315 320

Lys Leu Thr Ser Ile Ser Lys Leu Glu Asn Arg Gly Tyr Asn Leu Thr
 325 330 335

Tyr Glu Thr Pro Gln Gly Phe Glu Ser Leu Gln Thr Lys Thr Ile Val
 340 345 350

Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Leu Leu Arg Pro Leu Ser
 355 360 365

Leu Gly Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala
 370 375 380

Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Asp Ala Ile Arg Ala Asp Arg Leu
 385 390 395 400

Ile Asp Gly Gln Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln
 405 410 415

Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn
 420 425 430

Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala
 435 440 445

Thr Asn Pro Glu Ile Leu Ser Lys Thr Glu Gly Glu Ile Val Asp Ala
 450 455 460

Val Asp Arg Asp Leu Arg Thr Met Leu Ile Arg Arg Asp Ala Glu Asp
 465 470 475 480

Pro Leu Thr Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Arg Ala Ile Pro Gln Phe
 485 490 495

Leu Ile Gly His Tyr Asp Ile Leu Asp Ser Ala Lys Ala Ala Leu Ser
 500 505 510

Ser Gly Gly Phe Gln Gly Met Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly
 515 520 525

Val Ala Leu Gly Lys Cys Val Glu Ala Ala Tyr Asp Val Ala Ala Glu
 530 535 540

Val Met Asn Phe Leu Ser Gln Gly Val Tyr Lys
 545 550 555

<210> 15

<211> 1689

<212> ДНК

<213> Spinacia oleracea

<400> 15

atgagcgccta tggcgttatac gactacaatg gccctttcgt tgcgcgaatc ttctatgtca 60
 ttatcccatt gtaggcacaa ccgtatcacc attttgattc catcttcgtc gcttcgaaga 120
 cgaggaggaa gctctatccg ctgctctaca atctcaacct ctaattccgc ggctgcagcc 180
 aattaccaga acaaaaacat aggcacaaac ggagttgacg gcggcggagg cggaggagggt 240
 gtggttagact gtgtgattgt aggaggtgga atcagtggac tttgcattgc acaggctcta 300
 tctactaaat actccaacct ctccacgaat ttcattgtca ccgaggctaa ggatcgagtt 360
 ggcgggaaca tcaactacat ggaagctgat gggatattat ggaagaggg tcctaatagc 420
 tttcagccat ctgatgcagt gctcaccatg gctggtgaca gtggtttgaa agaggaattg 480
 gtgctgggag atcccaatc gccctgcctt gtgctgtgga atggcaaatt aaggcctgta 540
 ccttccaagc tcaactgacct ccctttcttt gatctcatga gcttccttg aaagattagg 600
 gctggctctt gtgctcttgg cttacgacca tctcctccgg ctcatgagga atccgttgaa 660
 caatttgtcc gtcgtaatct tggatgatgag gtctttgaaac gcttgatcga acctttttgt 720
 tcaggtgtgt atgctggtga tccttccaag ttgagtatga aagctgcctt tggcagggtt 780
 tgggtcttgg agcaaaaggg tggtagtatac attggtggca ccctcaaac aatccaggaa 840
 agaaaggata atcctaagcc acctcgagac ccgcgcctcc ccaaaccaaa gggccagaca 900
 gttggatcct tcaggaaagg actgagtatg ttgccaaccg ccatttctga aaggcttggc 960
 aacaaagtga aagtatcatg gaccctttct ggtattgcta agtcgctcga cggagagtat 1020
 aatctgactt atgaaacacc agatggactg gtttccgtta ggaccaaag tgttgtgatg 1080
 actgtcccgt catatggtgc aagtagcctc ctctgtccac tttcagatgt cgcgcagaa 1140
 tctctttcaa aatttcatta tccaccagtt gcagctgtgt cactttccta tcctaaagaa 1200

029356

gcaattagat cagagtgctt gattgacggt gaacttaaag gattcgggca attacattcc 1260
cgcagtcaag gtgtggaaac cttgggaaca atttatagtt catctctttt ccctgggcga 1320
gcaccacctg gtaggacctt gattttgaac tacattggag gtgatactaa ccctggcata 1380
ttagacaaga cgaaagatga actagctgaa gcagttgaca gggatttgag aagaattctc 1440
ataaaccta atgcaaaagc tccccggggt ttgggtgtga gagtatggcc acaagcaatt 1500
cccccaatttt taattggcca ctttgatctg ctogatgcag caaaagctgc tttgactgat 1560
ggtggacaca aaggattggt tcttgggtgga aactatgtat cagggtgttgcc tttgggccga 1620
tgtatagagg gtgcttatga atctgcagcc gaggtttag attttctgtc acagtactcg 1680
gataaatag 1689

<210> 16
<211> 562
<212> PRT
<213> Spinacia

<400> 16

Met Ser Ala Met Ala Leu Ser Ser Thr Met Ala Leu Ser Leu Pro Gln
1 5 10 15

Ser Ser Met Ser Leu Ser His Cys Arg His Asn Arg Ile Thr Ile Leu
20 25 30

Ile Pro Ser Ser Ser Leu Arg Arg Arg Gly Gly Ser Ser Ile Arg Cys
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Thr Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ala Asn Tyr Gln Asn
50 55 60

Lys Asn Ile Gly Thr Asn Gly Val Asp Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Val Leu Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile
85 90 95

Ala Gln Ala Leu Ser Thr Lys Tyr Ser Asn Leu Ser Thr Asn Phe Ile
100 105 110

Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu
115 120 125

Ala Asp Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser
130 135 140

029356

Asp Ala Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Glu Glu Leu
 145 150 155 160

Val Leu Gly Asp Pro Asn Ser Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys
 165 170 175

Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu
 180 185 190

Met Ser Phe Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Leu
 195 200 205

Arg Pro Ser Pro Pro Ala His Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Val Arg
 210 215 220

Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys
 225 230 235 240

Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala
 245 250 255

Phe Gly Arg Val Trp Val Leu Glu Gln Lys Gly Gly Ser Ile Ile Gly
 260 265 270

Gly Thr Leu Lys Thr Ile Gln Glu Arg Lys Asp Asn Pro Lys Pro Pro
 275 280 285

Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe
 290 295 300

Arg Lys Gly Leu Ser Met Leu Pro Thr Ala Ile Ser Glu Arg Leu Gly
 305 310 315 320

Asn Lys Val Lys Val Ser Trp Thr Leu Ser Gly Ile Ala Lys Ser Ser
 325 330 335

Asn Gly Glu Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser
 340 345 350

Val Arg Thr Lys Ser Val Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser
 355 360 365

Ser Leu Leu Arg Pro Leu Ser Asp Val Ala Ala Glu Ser Leu Ser Lys
 370 375 380

Phe His Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Leu Ser Tyr Pro Lys Glu
 385 390 395 400

029356

Ala Ile Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly
 405 410 415

Gln Leu His Ser Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr
 420 425 430

Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Pro Gly Arg Thr Leu Ile
 435 440 445

Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Asp Thr Asn Pro Gly Ile Leu Asp Lys Thr
 450 455 460

Lys Asp Glu Leu Ala Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Arg Ile Leu
 465 470 475 480

Ile Asn Pro Asn Ala Lys Ala Pro Arg Val Leu Gly Val Arg Val Trp
 485 490 495

Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His Phe Asp Leu Leu Asp
 500 505 510

Ala Ala Lys Ala Ala Leu Thr Asp Gly Gly His Lys Gly Leu Phe Leu
 515 520 525

Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly
 530 535 540

Ala Tyr Glu Ser Ala Ala Glu Val Val Asp Phe Leu Ser Gln Tyr Ser
 545 550 555 560

Asp Lys

<210> 17

<211> 1596

<212> ДНК

<213> Spinacia oleracea

<400> 17

atggtaatac taccggtttc ccagctatca actaatctgg gtttatcgct ggtttcaccc 60
 accaagaaca acccagttat gggcaacggt tctgagcgaa atcaagtcaa tcaaccatt 120
 tctgctaaaa gggttgctgt tgttggtgct ggtgtagtg gacttgctgc ggcgtataag 180
 ctaaaatcga atggcttgaa tgtgacattg tttgaagctg atagtagagc tgggtgggaaa 240
 ctcaaaactg ttgtaaagga tggtttgatt tgggatgaag gggcaaatac catgacagag 300
 agcgatgagg aggtcacgag tttgtttgat gatctcggga ttcgtgagaa gctacagcta 360

029356

ccaatttcac aaaacaaaag atacattgcc agagatggtc ttctctgtgct gttacottca 420
 aatccagttg cgctcctgaa gagcaatata ctttcagcaa aatctaagct acaaattatg 480
 ttggaacctt ttctttggaa aaaacacaaat ggtgctaagg tttctgacga gaatgcccaa 540
 gaaagtgtgg ctgagttttt tgagcggcat tttgggaaag agtttgttga ttatttaatt 600
 gatccttttg tcgcggttac aagtgggtga gatcctcaat ctctttctat gcgtcatgca 660
 tttccagaat tatggaatat tgagaacagg tttggttcag tgatttctgg attcattcag 720
 tctaaactgt catccaagaa ggaaaagggt ggagaaaagc aatcttctaa taagaagcca 780
 cgtgtacgtg gttcgttttc ttttcagggt ggaatgcaga cactagttga cactatatgc 840
 aaagagtttg gtgaagatga actcaaactc cagtctgagg ttctttcatt gtcatacagc 900
 cataatggaa gccttacatc agagaattgg tcagtgtctt ctatgtcaaa cagcaccatc 960
 caagatcaac catatgatgc tgtcgtttgtg accgocccaa tcaataatgt caaagaactg 1020
 aagattatga aagtggaaaa cccattttct cttgacttca ttccagaggt gagctgtcta 1080
 cccctctctg ttattattac tacattcaag aagaccaatg tgaagagacc tcttgagggt 1140
 tttggtgttc ttgtaccctc taatgagcaa cataatgggc tgaagactct tggtaactttg 1200
 ttttctcaa tgatgtttcc tgatcgtgct cctctgatg tgtatctata cactaccttt 1260
 gttggaggta gcagaaatag agaacttgca aaagcttcaa cggatgaact gaagcaaata 1320
 gtttctctg acctccagca gctgttgggc accgagggcg aacctacttt tgtgaatcat 1380
 ttttactgga gcaaagcatt cctctttat ggacgcaatt acgactcagt tcttagagca 1440
 atagagaaga tggaaagga ccttctgga cttttttacg caggtaacca taagggtgga 1500
 ctgtctgtgg gaaagtcaat agcctctgga tacaagctg ccgagcttgc gatatacctat 1560
 ctcgagtcta acaagatgac cgaggagact atataa 1596

<210> 18
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> Spinacia

<400> 18

Met Val Ile Leu Pro Val Ser Gln Leu Ser Thr Asn Leu Gly Leu Ser
1 5 10 15

Leu Val Ser Pro Thr Lys Asn Asn Pro Val Met Gly Asn Val Ser Glu
20 25 30

Arg Asn Gln Val Asn Gln Pro Ile Ser Ala Lys Arg Val Ala Val Val
35 40 45

Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser Asn

029356

Leu Thr Ser Glu Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn Ser Thr Ile
305 310 315 320

Gln Asp Gln Pro Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro Ile Asn Asn
325 330 335

Val Lys Glu Leu Lys Ile Met Lys Val Glu Asn Pro Phe Ser Leu Asp
340 345 350

Phe Ile Pro Glu Val Ser Cys Leu Pro Leu Ser Val Ile Ile Thr Thr
355 360 365

Phe Lys Lys Thr Asn Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu
370 375 380

Val Pro Ser Asn Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu
385 390 395 400

Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Val Tyr Leu
405 410 415

Tyr Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Glu Leu Ala Lys Ala
420 425 430

Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu
435 440 445

Leu Gly Thr Glu Gly Glu Pro Thr Phe Val Asn His Phe Tyr Trp Ser
450 455 460

Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Gly Arg Asn Tyr Asp Ser Val Leu Arg Ala
465 470 475 480

Ile Glu Lys Met Glu Arg Asp Leu Pro Gly Leu Phe Tyr Ala Gly Asn
485 490 495

His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gly Tyr Lys
500 505 510

Ala Ala Glu Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser Asn Lys Met Thr Glu
515 520 525

Glu Thr Ile
530

<210> 19

<211> 1674

<212> ДНК

<213> Solanum tuberosum

<400> 19

```

atgacaacaa cggccgctgc caaccatcct agcattttca ctcaccgggc gccgctgccg      60
tcgccgctgt cctcctcctc atcgccgtca tttttatfff taaaccgtac gaatttcatt     120
ccttactfff ccacctccaa gcgcaatagt gtcaattgca atggctggag aacacgatgt     180
tccgttgcca aggattatac agttcctccc tcggaagtcg acggtaatca gttcccggag     240
ctggattgtg tggtagttgg agcaggaatt agtggactct gcattgctaa ggtgatttcg     300
gctaattatc ccaatttgat ggtgacggag gcgagggatc gtgccgggtg aaacataacg     360
acgggtggaaa gagatggata cttatgggaa gaaggctcta acagtttcca gccttcggat     420
cctatggtga caatggctgt agattgtgga ttgaaggatg atttggtgtt gggagatcct     480
gatgcgcctc gctttgtcct gtggaaggat aaactaaggc ctgttcccgg caagctcact     540
gatcttccct tctttgattt gatgagtatc cctggcaagc tcagagctgg ttttgggtgcc     600
attggccttc gcccttcacc tccaggttat gaggaatcag ttgagcagtt cgtgcgctcg     660
aatcttggtg cagaagtctt tgaacgtttg attgaacat tttgttctgg tgtttacgcc     720
ggtgaccctc caaattgat tatgaaagca gcatttggga aagtgtggaa gctagaacaa     780
actggtggta gcattattgg gggaaccttt aaagcaatta aggagagatc cagtaaccct     840
aaaccgcctc gtgatccgcy tttaccaaca ccaaaaggac aaactggtgg atcatttagg     900
aagggtctga gaatgctgcc ggatgcaatt tgtgaaagac tgggaagcaa agtaaaaacta     960
tcatggaagc tttctagcat taaaaagtca gaaaaaggag gatatctctt gacatacgag    1020
acaccagaag gagtagtttc tctgcgaagt cgaagcattg tcatgactgt tccatcctat    1080
gtagcaagca acatattacg cctcttttcg gtcgctgcag cagatgcact ttcaagtttc    1140
tactatcccc cagtagcagc agtgacaatt tcatatcctc aagaggctat tcgtgatgag    1200
cgtctgggtg atggtgaact aaagggattt gggcagttgc atccacgttc acagggagtg    1260
gaaacactag gaacaatata tagttcatca ctctttccta accgtgctcc aaatggccgg    1320
gtgctactct tgaactacat tggaggagca acaaaactg aaattgtgtc taagacggag    1380
agccaacttg tggaaagcagt tgaccgtgac ctcagaaaaa tgcttataaa acccaaaagca    1440
caagatccct ttgttacggg tgtgcgagta tggccacaag ctatcccaca gtttttggtc    1500
ggacatctgg atacactagg tactgcaaaa actgctctaa gtgataatgg gcttgacggg    1560
ctattccttg ggggtaatta tgtgtctggt gtagcattgg gaagggtgtg tgaagggtgct    1620
tatgaaatag catctgaggt aactggattt ctgtctcagt atgcatacaa atga          1674

```

<210> 20

<211> 557

<212> PRT

029356

<213> Solanum tuberosum

<400> 20

Met Thr Thr Thr Ala Val Ala Asn His Pro Ser Ile Phe Thr His Arg
 1 5 10 15

Ser Pro Leu Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser Phe Leu
 20 25 30

Phe Leu Asn Arg Thr Asn Phe Ile Pro Tyr Phe Ser Thr Ser Lys Arg
 35 40 45

Asn Ser Val Asn Cys Asn Gly Trp Arg Thr Arg Cys Ser Val Ala Lys
 50 55 60

Asp Tyr Thr Val Pro Pro Ser Glu Val Asp Gly Asn Gln Phe Pro Glu
 65 70 75 80

Leu Asp Cys Val Val Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala
 85 90 95

Lys Val Ile Ser Ala Asn Tyr Pro Asn Leu Met Val Thr Glu Ala Arg
 100 105 110

Asp Arg Ala Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu
 115 120 125

Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr
 130 135 140

Met Ala Val Asp Cys Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro
 145 150 155 160

Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Lys Asp Lys Leu Arg Pro Val Pro
 165 170 175

Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly
 180 185 190

Lys Leu Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Leu Arg Pro Ser Pro Pro
 195 200 205

Gly Tyr Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala
 210 215 220

Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala
 225 230 235 240

029356

Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ile Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp
 245 250 255

 Lys Leu Glu Gln Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala
 260 265 270

 Ile Lys Glu Arg Ser Ser Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu
 275 280 285

 Pro Thr Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg
 290 295 300

 Met Leu Pro Asp Ala Ile Cys Glu Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu
 305 310 315 320

 Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Ser Glu Lys Gly Gly Tyr Leu
 325 330 335

 Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Arg Ser Arg Ser
 340 345 350

 Ile Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro
 355 360 365

 Leu Ser Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Ser Phe Tyr Tyr Pro Pro
 370 375 380

 Val Ala Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu
 385 390 395 400

 Arg Leu Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg
 405 410 415

 Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe
 420 425 430

 Pro Asn Arg Ala Pro Asn Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly
 435 440 445

 Gly Ala Thr Asn Thr Glu Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val
 450 455 460

 Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala
 465 470 475 480

 Gln Asp Pro Phe Val Thr Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro
 485 490 495

029356

Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Thr Leu Gly Thr Ala Lys Thr Ala
 500 505 510

Leu Ser Asp Asn Gly Leu Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val
 515 520 525

Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ile Ala
 530 535 540

Ser Glu Val Thr Gly Phe Leu Ser Gln Tyr Ala Tyr Lys
 545 550 555

<210> 21
 <211> 1608
 <212> ДНК
 <213> Zea mays

<400> 21
 atggtcgcgcg ccacagccac cgccatggcc accgctgcat cgccgctact caacgggacc 60
 cgaataacctg cgcggtccg ccatcgagga ctcagcgtgc gctgcgctgc tgtggcgggc 120
 ggcgcggccg aggcaccggc atccaccggc gcgcggctgt ccgcggactg cgctcgtggtg 180
 ggcggaggca tcagtggcct ctgcaccgcg caggcgtgg ccacgcggca cggcgtcggg 240
 gacgtgcttg tcacggaggc ccgcgcccgc cccggcggca acattaccac cgctcgagcgc 300
 cccgaggaag ggtacctctg ggaggagggt cccaacagct tccagcctc cgaccccgtt 360
 ctcaccatgg ccgtggacag cggactgaag gatgacttgg tttttgggga cccaaacgcg 420
 ccgcgtttcg tgctgtggga ggggaagctg aggcccgtgc catccaagcc cgccgacctc 480
 ccgttcttcg atctcatgag catcccaggg aagctcaggg ccggtctagg cgcgcttggc 540
 atccgcccgc ctctccagg ccgcgaagag tcagtggagg agttcgtgcg ccgcaacctc 600
 ggtgctgagg tctttgagcg cctcattgag cctttctgct cagggtgcta tgctggtgat 660
 ctttctaagc tcagcatgaa ggctgcattt ggggaaggttt ggcggttggga agaaactgga 720
 ggtagtatta ttggtggaac catcaagaca attcaggaga ggagcaagaa tccaaaacca 780
 ccgagggatg cccgccttcc gaagccaaaa gggcagacag ttgcatcttt caggaagggt 840
 cttgccatgc ttccaaatgc cattacatcc agcttgggta gtaaagtcaa actatcatgg 900
 aaactcacga gcattacaaa atcagatgac aagggatatg ttttggagta tgaaacgcca 960
 gaaggggttg tttcgggtgca ggctaaaagt gttatcatga ctattccatc atatgttgct 1020
 agcaacattt tgcgtccact ttcaagcgat gctgcagatg ctctatcaag attctattat 1080
 ccaccggttg ctgctgtaac tgtttcgtat ccaaaggaag caattagaaa agaatgctta 1140
 attgatgggg aactccaggg ctttggccag ttgcatccac gtagtcaagg agttgagaca 1200

029356

ttaggaacaa tatacagttc ctcaactcttt ccaaatcgtg ctccctgacgg taggggtgta 1260
 cttctaaact acataggagg tgctacaaac acaggaattg tttccaagac tgaaagtgag 1320
 ctggtcgaag cagttgaccg tgacctccga aaaatgctta taaattctac agcagtgagg 1380
 cctttagtc cctttagtc ttgggtgttc agttttggcca caagccatac ctcaagttcct ggtaggacat 1440
 cttgatcttc tggaagccgc aaaagctgcc ctggaccgag gtggctacga tgggctgttc 1500
 ctaggagggg actatgttgc aggagttgcc ctgggcagat gcggttgaggg cgcgtatgaa 1560
 agtgccctgc aaatatctga cttcttgacc aagtatgcct acaagtga 1608

<210> 22
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 22

Met Val Ala Ala Thr Ala Thr Ala Met Ala Thr Ala Ala Ser Pro Leu
1 5 10 15

Leu Asn Gly Thr Arg Ile Pro Ala Arg Leu Arg His Arg Gly Leu Ser
20 25 30

Val Arg Cys Ala Ala Val Ala Gly Gly Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ser
35 40 45

Thr Gly Ala Arg Leu Ser Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile
50 55 60

Ser Gly Leu Cys Thr Ala Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly
65 70 75 80

Asp Val Leu Val Thr Glu Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr
85 90 95

Thr Val Glu Arg Pro Glu Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn
100 105 110

Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly
115 120 125

Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val
130 135 140

Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu
145 150 155 160

029356

Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu
 165 170 175

Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val
 180 185 190

Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu
 195 200 205

Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu
 210 215 220

Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly
 225 230 235 240

Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys
 245 250 255

Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln
 260 265 270

Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile
 275 280 285

Thr Ser Ser Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser
 290 295 300

Ile Thr Lys Ser Asp Asp Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro
 305 310 315 320

Glu Gly Val Val Ser Val Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro
 325 330 335

Ser Tyr Val Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala
 340 345 350

Asp Ala Leu Ser Arg Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val
 355 360 365

Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu
 370 375 380

Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr
 385 390 395 400

Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp
 405 410 415

029356

Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly
 420 425 430

Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp
 435 440 445

Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu
 450 455 460

Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Glu Ala Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr
 485 490 495

Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly
 500 505 510

Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe
 515 520 525

Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

<210> 23
 <211> 1635
 <212> ДНК
 <213> Zea mays

<400> 23
 atgctcgctt tgactgcctc agcctcatcc gcttcgctcc atccttatcg ccacgcctcc 60
 gcgcacactc gtcgcccccg cctacgtgog gtctctcgga tggcgggctc cgacgacccc 120
 cgtgcagcgc ccgccagatc ggctgcctgc gtcggcgccg gggtcagcgg gctcgcggcg 180
 gcgtacaggc tcagacagag cggcgtgaac gtaacggtgt tcgaagcggc cgacagggcg 240
 ggaggaaaga tacggaccaa ttccgagggc gggtttgtct gggatgaagg agctaacc 300
 atgacagaag gtgaatggga ggccagtaga ctgattgatg atcttggctc acaagacaaa 360
 cagcagtatc ctaactccca acacaagcgt tacattgtca aagatggagc accagcactg 420
 attccttcgg atcccatttc gctaataaaa agcagtgttc tttcgacaaa atcaaagatt 480
 gcgttatttt ttgaaccatt tctctacaag aaagctaaca caagaaactc tggaaaagtg 540
 tctgaggagc acttgagtga gagtgttggg agcttctgtg aacgccactt tggaaagagaa 600
 gttgttgact attttgttga tccatttgta gctggaacaa gtgcaggaga tccagagtca 660
 ctatctattc gtcatgcatt cccagcattg tggaatttgg aaagaaagta tggttcagtt 720

029356

attgttggtg ccatcttgtc taagctagca gctaaagggtg atccagtaaa gacaagacat 780
 gattcatcag ggaaaagaag gaatagacga gtgtcgtttt catttcatgg tggaaatgcag 840
 tcactaataa atgcacttca caatgaagtt ggagatgata atgtgaagct tggtagacagaa 900
 gtgttgtcat tggcatgtac atttgatgga gttcctgcac taggcagggtg gtcaatttct 960
 gttgattcga aggatagcgg tgacaaggac cttgctagta accaaacctt tgatgctggt 1020
 ataatgacag ctccattgtc aatgtccgg aggatgaagt tcaccaaagg tggagctccg 1080
 gttgttcttg actttcttcc taagatggat tatctaccac tatctctcat ggtgactgct 1140
 ttaagaagg atgatgtcaa gaaacctctg gaaggatttg gggctttaat accttacaag 1200
 gaacagcaaa aacatggtct gaaaacctt gggactctct tttcctcaat gatgttccca 1260
 gatcgagctc ctgatgacca atatttatat acaacatttg ttgggggtag ccacaataga 1320
 gatcttgctg gagctccaac gtctattctg aaacaacttg tgacctctga ccttaaaaaa 1380
 ctcttgggcy tagaggggca accaactttt gtcaagcatg tatactgggg aaatgctttt 1440
 cctttgtatg gccatgatta tagttctgta ttggaagcta tagaaaagat ggagaaaaac 1500
 cttccagggt tcttctacgc aggaaatagc aaggatgggc ttgctggttg aagtgttata 1560
 gcttcaggaa gcaaggctgc tgaccttgca atctcatatc ttgaatctca caccaagcat 1620
 aataattcac attga 1635

<210> 24
 <211> 544
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 24

Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro Tyr
1 5 10 15

Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val Leu
20 25 30

Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser Val
35 40 45

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Leu
50 55 60

Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala
65 70 75 80

Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp Glu
85 90 95

029356

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu Ile
 100 105 110

Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His
 115 120 125

Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser Asp
 130 135 140

Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Ile
 145 150 155 160

Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg Asn
 165 170 175

Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe
 180 185 190

Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp Pro
 195 200 205

Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Arg
 210 215 220

His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Val
 225 230 235 240

Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro Val
 245 250 255

Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser
 260 265 270

Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn
 275 280 285

Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu
 290 295 300

Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile Ser
 305 310 315 320

Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln Thr
 325 330 335

Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg Met
 340 345 350

Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys
 355 360 365

Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Asp
 370 375 380

Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys
 385 390 395 400

Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser
 405 410 415

Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Thr
 420 425 430

Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ser
 435 440 445

Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly Val
 450 455 460

Glu Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Val Tyr Trp Gly Asn Ala Phe
 465 470 475 480

Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Ser Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu Lys
 485 490 495

Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys Asp
 500 505 510

Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp
 515 520 525

Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser His
 530 535 540

<210> 25

<211> 1692

<212> ДНК

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 25

atgatgttga cccagactcc tgggaccgcc acggcttcta gccggcggtc gcagatccgc 60

tgggtgcgc acgtctccgc caaggctcgc cctcggccca cgccattctc ggctcgcgagc 120

cccgcgaccg ctgcgagccc cgcgaccgcg ggggcccgcc gcacactcca ccgcaactgct 180

gctcgcgcca ctggtgctcc cacggcgtcc ggagccggcg tcgccaagac gctcgcacaat 240

gtgtatgacg tgatcgtggt cgggtggaggt ctctcgggcc tggtgaccgg ccaggccctg 300
 gcggtctcagc acaaaattca gaacttcctt gttacggagg ctccgcgagcg cgtcggcggc 360
 aacattacgt ccatgtcggg cgatggctac gtgtgggagg agggcccga cagcttccag 420
 cccaacgata gcatgctgca gattgcgggtg gactctggct gcgagaagga ccttgtgttc 480
 ggtgacccca cggctccccg cttcgtgtgg tgggagggca agctgcgcc cgtgccctcg 540
 ggctgggacg ccttcacctt cgacctcatg tocatccccg gcaagatccg cgccgggctg 600
 ggcgccatcg gcctcatcaa cggagccatg cctccttcg aggagagtgt ggagcagttc 660
 atccgccgca acctggggca tgaggtgttc ttccgcctga tcgagccctt ctgctccggc 720
 gtgtacgcgg gcgaccctc caagctgtcc atgaaggcgg ccttcaacag gatctggatt 780
 ctggagaaga acggcggcag cctggtggga ggtgccatca agctgttcca ggaacgccag 840
 tccaaccggg ccccgccgcg ggaccgcgc ctgccgccca agcccaaggg ccagacgggtg 900
 ggctcgttcc gcaagggcct gaagatgctg ccggacgcca ttgagcgcaa catccccgac 960
 aagatccgcg tgaactggaa gctggtgtct ctgggcccgc aggcggacgg gcggtacggg 1020
 ctggtgtacg acacgcccga gggccgtgtc aagggtgttg cccgcgccgt ggctctgacc 1080
 gcgcccagct acgtggtggc ggacctggtc aaggagcagg cgcccgcgc cgccgaggcc 1140
 ctgggctcct tcgactacce gccgggtgggc gccgtgacgc tgtcgtacce gctgagcgcc 1200
 gtgcgggagg agcgcgaaggc ctccgacggg tccgtgccgg gcttcgggtca gctgcacccg 1260
 cgcacgcagg gcatcaccac tctgggcacc atctacagct ccagcctgtt ccccgccgc 1320
 gcgcccagagg gccacatgct gctgctcaac tacatcggcg gcaccaccaa ccgcggcacc 1380
 gtcaaccaga ccaccgagca gctggtggag cagggtggaca aggacctgcg caacatggtc 1440
 atcaagcccc acgcgcccga gccccgtgtg gtgggcgtgc gcgtgtggcc gcgcgccatc 1500
 ccgcagttca acctgggcca cctggagcag ctggacaagg cgcgcaaggc gctggacgcg 1560
 gcggggctgc agggcgtgca cctggggggc aactacgtca gcggtgtggc cctgggcaag 1620
 gtggtggagc acggctacga gtccgcagcc aacctggcca agagcgtgtc caaggccgca 1680
 gtcaaggcct aa 1692

<210> 26
 <211> 563
 <212> PRT
 <213> Chlamydomonas

<400> 26

Met Met Leu Thr Gln Thr Pro Gly Thr Ala Thr Ala Ser Ser Arg Arg
 1 5 10 15

029356

Ser Gln Ile Arg Ser Ala Ala His Val Ser Ala Lys Val Ala Pro Arg
 20 25 30

Pro Thr Pro Phe Ser Val Ala Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ser Pro Ala
 35 40 45

Thr Ala Ala Ala Arg Arg Thr Leu His Arg Thr Ala Ala Ala Ala Thr
 50 55 60

Gly Ala Pro Thr Ala Ser Gly Ala Gly Val Ala Lys Thr Leu Asp Asn
 65 70 75 80

Val Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Gly Gly Leu Ser Gly Leu Val Thr
 85 90 95

Gly Gln Ala Leu Ala Ala Gln His Lys Ile Gln Asn Phe Leu Val Thr
 100 105 110

Glu Ala Arg Glu Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Ser Met Ser Gly Asp
 115 120 125

Gly Tyr Val Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Asn Asp Ser
 130 135 140

Met Leu Gln Ile Ala Val Asp Ser Gly Cys Glu Lys Asp Leu Val Phe
 145 150 155 160

Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Trp Trp Glu Gly Lys Leu Arg
 165 170 175

Pro Val Pro Ser Gly Leu Asp Ala Phe Thr Phe Asp Leu Met Ser Ile
 180 185 190

Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Ile Gly Leu Ile Asn Gly
 195 200 205

Ala Met Pro Ser Phe Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Ile Arg Arg Asn
 210 215 220

Leu Gly Asp Glu Val Phe Phe Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly
 225 230 235 240

Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Asn
 245 250 255

Arg Ile Trp Ile Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Leu Val Gly Gly Ala
 260 265 270

029356

Ile Lys Leu Phe Gln Glu Arg Gln Ser Asn Pro Ala Pro Pro Arg Asp
 275 280 285

Pro Arg Leu Pro Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg
 290 295 300

Lys Gly Leu Lys Met Leu Pro Asp Ala Ile Glu Arg Asn Ile Pro Asp
 305 310 315 320

Lys Ile Arg Val Asn Trp Lys Leu Val Ser Leu Gly Arg Glu Ala Asp
 325 330 335

Gly Arg Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Thr Pro Glu Gly Arg Val Lys Val
 340 345 350

Phe Ala Arg Ala Val Ala Leu Thr Ala Pro Ser Tyr Val Val Ala Asp
 355 360 365

Leu Val Lys Glu Gln Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ser Phe
 370 375 380

Asp Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Ser Ala
 385 390 395 400

Val Arg Glu Glu Arg Lys Ala Ser Asp Gly Ser Val Pro Gly Phe Gly
 405 410 415

Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Ile Thr Thr Leu Gly Thr Ile Tyr
 420 425 430

Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Glu Gly His Met Leu Leu
 435 440 445

Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Asn Arg Gly Ile Val Asn Gln Thr
 450 455 460

Thr Glu Gln Leu Val Glu Gln Val Asp Lys Asp Leu Arg Asn Met Val
 465 470 475 480

Ile Lys Pro Asp Ala Pro Lys Pro Arg Val Val Gly Val Arg Val Trp
 485 490 495

Pro Arg Ala Ile Pro Gln Phe Asn Leu Gly His Leu Glu Gln Leu Asp
 500 505 510

Lys Ala Arg Lys Ala Leu Asp Ala Ala Gly Leu Gln Gly Val His Leu
 515 520 525

029356

Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Lys Val Val Glu His
 530 535 540

Gly Tyr Glu Ser Ala Ala Asn Leu Ala Lys Ser Val Ser Lys Ala Ala
 545 550 555 560

Val Lys Ala

- <210> 27
- <211> 1734
- <212> ДНК
- <213> *Polytomella* sp

<400> 27
 atgtcagagtt ccgcactaag gctattatgc gggcgaacaa gtttctttaa tttatgccaa 60
 aaatatactc cttcctttct gtcacaattg tcgacctaa atttctcaac ccattcgcct 120
 ttcgatagca cttatgatgt cgtcgtcgtt ggtgcocgaa tctctgggtt gtctactgcc 180
 caagcactta gcattcaaca taagatcgat aatgttctgg ttactgaagc tgatcatcgt 240
 gtaggcggta aaattacgac gaaaaggaat aaagatttcc tgtgggagga gggccaaaat 300
 agttgcctaa tgaacgacgc tttatatcgc gctgcccagag atgccggcgt ggaatccaaa 360
 attctatcgg cggatccaaa attaccacgt tggattctgt ggggtcgtcg tttgcgtgtg 420
 gccccattg gaagctacgc tttaaaatcc gaccttttat ctaccaagg cctactccgt 480
 gccatccgag gagtcacagg ttttggtgtg tcaccggctc cacctaaggg tcaggaggag 540
 agcgtggagg gctttgttcg acggacctta ggagacgaga tttttgagcg actcgttgag 600
 cccttttgct ccggggttta tgcgggggat cctagcaaat tgtccatgcg tgetgctttc 660
 ggaaaacttg tggaattcga agagacgggt gatggtagct tacttcgagg cgtctttcgt 720
 tacgtaatga acaaacgacg cgaaagaagg acgggcgggg cgaaagacgg ggacacggtc 780
 cctttgaacg agacggccaa ggcacccaaa tcatoctctg gcccacacgt atcgtctttc 840
 gaggggggaa tcgagatcct gcccaggcc attgcgcaaa agctgggtga tcgagttcgt 900
 cttggcctac gactcgtgcg catcgatccc acgcagctcg cggatggtac gacagcgtac 960
 cgtctgtcgt accgtcggat gagtcatcaa ggcgatgacg actcagatcg tacggcagg 1020
 gctgtaccgc gtacggcgga gggggatgtc gcggcggggg acgaggacgc cgtggtggag 1080
 gtggtggcga agaaggctcg gctgacgacg ccggcattcg acgcccgga catcttgctg 1140
 cgttcgggct tgggtggcggc ggcgaaccog ttgaaggagg tggattacc gccagtagcg 1200
 ttggtcgttc tttcgtacga cgtcgactcg atttcgcca tacaccgct gagtcacgtg 1260
 gctcatggcc tcagcggctt tggccaactc caccctcgcc cagagggtct ccgtacatta 1320

029356

ggaaccattt acggcagtac attatttccc aaccgttccc ccgtagctcg tacgacgctt 1380
 ttaaatttcg ttggtggatc caccgaccgt gcagtggggg cgcgggatcc aatggctttg 1440
 gcgatggagg tggatctgga tctgaaaaag agcggggtga tccgagaggg agctgcgaag 1500
 ccagaagtcc tcggggtgaa agtatatcca aaggctattc ctcagtttga tattggtcat 1560
 ttggatcgag tggaaaaggc caaatgatg ttaaagaacg aaaggggggg tgcagattgg 1620
 agtgggggtca aattggcggg aaattatgtg tgcggcgctc cagtgggcag atgcatagaa 1680
 tttggattcg aaattgcgga gaacttggcg caggaattgg cgagaaaaaa atag 1734

<210> 28
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Polytomella

<400> 28

Met Ser Ser Ser Ala Leu Arg Leu Leu Cys Gly Arg Thr Ser Phe Phe
 1 5 10 15

Asn Leu Cys Gln Lys Tyr Pro Pro Ser Phe Leu Ser Gln Leu Ser Thr
 20 25 30

Leu Asn Phe Ser Thr His Ser Pro Phe Asp Ser Thr Tyr Asp Val Val
 35 40 45

Val Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Ser Thr Ala Gln Ala Leu Ser
 50 55 60

Ile Gln His Lys Ile Asp Asn Val Leu Val Thr Glu Ala Asp His Arg
 65 70 75 80

Val Gly Gly Lys Ile Thr Thr Lys Arg Asn Lys Asp Phe Leu Trp Glu
 85 90 95

Glu Gly Pro Asn Ser Cys Leu Met Asn Asp Ala Leu Tyr Arg Ala Ala
 100 105 110

Arg Asp Ala Gly Val Glu Ser Lys Ile Leu Ser Ala Asp Pro Lys Leu
 115 120 125

Pro Arg Trp Ile Leu Trp Gly Arg Arg Leu Arg Val Ala Pro Ile Gly
 130 135 140

Ser Tyr Ala Leu Lys Ser Asp Leu Leu Ser Thr Gln Gly Leu Leu Arg
 145 150 155 160

029356

Ala Ile Arg Gly Val Thr Gly Phe Gly Val Ser Pro Ala Pro Pro Lys
165 170 175

Gly Gln Glu Glu Ser Val Glu Gly Phe Val Arg Arg Thr Leu Gly Asp
180 185 190

Glu Ile Phe Glu Arg Leu Val Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala
195 200 205

Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Arg Ala Ala Phe Gly Lys Leu Val
210 215 220

Glu Phe Glu Glu Thr Gly Asp Gly Ser Leu Leu Arg Gly Val Phe Arg
225 230 235 240

Tyr Val Met Asn Lys Arg Arg Glu Arg Arg Thr Gly Gly Ala Lys Asp
245 250 255

Gly Asp Thr Val Pro Leu Asn Glu Thr Ala Lys Ala Pro Lys Ser Ser
260 265 270

Ser Gly Pro Thr Val Ser Ser Phe Glu Gly Gly Ile Glu Ile Leu Pro
275 280 285

Lys Ala Ile Ala Gln Lys Leu Gly Asp Arg Val Arg Leu Gly Leu Arg
290 295 300

Leu Val Arg Ile Asp Pro Thr Gln Leu Ala Asp Gly Thr Thr Ala Tyr
305 310 315 320

Arg Leu Ser Tyr Arg Arg Met Ser His Gln Gly Asp Asp Asp Ser Ser
325 330 335

Arg Thr Ala Gly Ala Val Pro Arg Thr Ala Glu Gly Asp Val Ala Ala
340 345 350

Gly Asp Glu Asp Ala Val Val Glu Val Val Ala Lys Lys Val Val Leu
355 360 365

Thr Thr Pro Ala Phe Asp Ala Ala Asp Ile Leu Ser Arg Ser Gly Leu
370 375 380

Val Ala Ala Ala Asn Pro Leu Lys Glu Val Asp Tyr Pro Pro Val Ala
385 390 395 400

Leu Val Val Leu Ser Tyr Asp Val Asp Ser Ile Ser Ala Ile His Arg
405 410 415

029356

Val Ser His Val Ala His Gly Leu Ser Gly Phe Gly Gln Leu His Pro
 420 425 430

Arg Pro Glu Gly Leu Arg Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Gly Ser Thr Leu
 435 440 445

Phe Pro Asn Arg Ser Pro Val Ala Arg Thr Thr Leu Leu Asn Phe Val
 450 455 460

Gly Gly Ser Thr Asp Arg Ala Val Gly Ser Ala Asp Pro Met Ala Leu
 465 470 475 480

Ala Met Glu Val Asp Leu Asp Leu Lys Lys Ser Gly Leu Ile Arg Glu
 485 490 495

Gly Ala Ala Lys Pro Glu Val Leu Gly Val Lys Val Tyr Pro Lys Ala
 500 505 510

Ile Pro Gln Phe Asp Ile Gly His Leu Asp Arg Val Glu Lys Ala Lys
 515 520 525

Met Met Leu Lys Asn Glu Arg Gly Gly Ala Asp Trp Ser Gly Val Lys
 530 535 540

Leu Ala Gly Asn Tyr Val Cys Gly Val Ala Val Gly Arg Cys Ile Glu
 545 550 555 560

Phe Gly Phe Glu Ile Ala Glu Asn Leu Ala Gln Glu Leu Ala Arg Lys
 565 570 575

Lys

<210> 29

<211> 1635

<212> ДНК

<213> Sorghum bicolor

<400> 29

atgctcgcgc ggaactgccac ggtctctctcc acttcgtccc actcccatcc ttatcgcccc 60

acctccgctc gcagtctccg cctacgtccg gtctctcgca tggcgggctc cgacgactcc 120

cgcgacgctc ccgccaggtc ggctcgccgctc gtggcgcccg gggtcagcgg gctcgtggcg 180

gcgtacaggc tcaggaagag cggcgtgaat gtgacgggtg tcgagggcggc cgacagggcg 240

ggaggaaaga tacggaccaa ttccgagggc gggtttctct gggatgaagg agcgaacacc 300

atgacagaag gtgaattgga ggccagtaga ctgatagatg atctcggctc acaagacaaa 360

029356

cagcagtatc ctaactccca acacaagcgt tacattgtca aagatggagc accagcactg 420
attccttcgg atcccatttc gctgatgaaa agcagtggtc tttctacaaa atcaaagatt 480
gcgttatfff ttgaaccatt tctctacaag aaagctaaca caagaaaccc tggaaaagta 540
tctgatgagc atttgagtga gagtggtggg agcttctttg aacgccactt cggaagagaa 600
gttggtgact atcttattga tccatttgta gctggaacaa gtgcaggaga tccagagtca 660
ctatctatff gtcattgcatt cccagcactg tggaaatttg aaagaaaata tggttcagtt 720
gttggtggg ccatcttgtc taagctaaca gctaaagggtg atccagtaaa gacaagacgt 780
gattcatcag cgaaaagaag gaatagacgc gtgtcgtfff catttcatgg tggaaatgcag 840
tcactaataa atgcacttca caatgaagtt ggagatgata atgtgaagct tggtaacagaa 900
gtgttgatc tggcgtgtac attagatgga gcccctgcac caggcgggtg gtcaattttct 960
gatgattcga aggatgctag tggcaaggac cttgctaaaa accaaacctt tgatgctggt 1020
ataatgacag ctccattgtc aaatgtccag aggatgaagt tcacaaaagg tggagctcct 1080
tttgttctag actttcttcc taaggtggat tatctaccac tatctctcat ggtgactgct 1140
ttaaagaagg aagatgtcaa gaaacctctg gaaggatttg gcgtcttaat accctacaag 1200
gaacagcaaa aacatgggtc aaaaacctt gggactctct tctcctcaat gatgttccca 1260
gatcgagctc ctgacgacca atatttatat acaacatttg ttgggggtag ccacaataga 1320
gatcttgctg gagctccaac gtctattctg aaacaacttg tgacctctga ccttaaaaaa 1380
ctcttaggcg tacaggggca accaactfff gtcaagcata tatactgggg aaatgctfff 1440
cctttgtatg gtcattgatta caattctgta ttggaagcta tagaaaagat ggagaaaaat 1500
cttcagggt tcttctacgc aggaaataac aaggatgggc ttgctggttg gagtggtata 1560
gcttcaggaa gcaaggctgc tgaccttgca atctcgtatc ttgaatctca caccaagcat 1620
aataatttac attga 1635

<210> 30
<211> 544
<212> PRT
<213> Sorghum

<400> 30

Met Leu Ala Arg Thr Ala Thr Val Ser Ser Thr Ser Ser His Ser His
1 5 10 15

Pro Tyr Arg Pro Thr Ser Ala Arg Ser Leu Arg Leu Arg Pro Val Leu
20 25 30

Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Ser Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser Val
35 40 45

029356

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Val Ala Ala Tyr Arg Leu
50 55 60

Arg Lys Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala
65 70 75 80

Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Leu Trp Asp Glu
85 90 95

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Leu Glu Ala Ser Arg Leu Ile
100 105 110

Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His
115 120 125

Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser Asp
130 135 140

Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Ile
145 150 155 160

Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg Asn
165 170 175

Pro Gly Lys Val Ser Asp Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe
180 185 190

Phe Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro
195 200 205

Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Cys
210 215 220

His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Val
225 230 235 240

Val Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Thr Ala Lys Gly Asp Pro Val
245 250 255

Lys Thr Arg Arg Asp Ser Ser Ala Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser
260 265 270

Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn
275 280 285

Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu
290 295 300

Ala Cys Thr Leu Asp Gly Ala Pro Ala Pro Gly Gly Trp Ser Ile Ser
305 310 315 320

Asp Asp Ser Lys Asp Ala Ser Gly Lys Asp Leu Ala Lys Asn Gln Thr
325 330 335

Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Gln Arg Met
340 345 350

Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Phe Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys
355 360 365

Val Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Glu
370 375 380

Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys
385 390 395 400

Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser
405 410 415

Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Thr
420 425 430

Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ser
435 440 445

Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly Val
450 455 460

Gln Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Ile Tyr Trp Gly Asn Ala Phe
465 470 475 480

Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Asn Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu Lys
485 490 495

Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Asn Lys Asp
500 505 510

Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp
515 520 525

Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Leu His
530 535 540

<210> 31

<211> 1017

<212> ДНК

<213> Chlorella sp

<400> 31

```

atggcctcca cagcaacct gcacggcgcg cctgtgtgt cggcgcgggc cgtggggcgc      60
cggcatattg cagcaccgag catccagcac aatggggcgc gcttggcggc caggggtgcag    120
cagcgggaagg gggcagggga gggcgctcg gcactgctgt tgcaggccgt ccaggcccct    180
cccgagaagg cgggggagag cacagggagc gcagcagacg acagcgcggt ttacgacggt    240
gtggtcgtgg gcgcccgcac ctccggcctc accaccgccc aggcgctgac cacgcagcac    300
agcggcgtgg cgcggcggtt gctggtgacc gagggcgcgc acccgctggg cggcaacatc    360
acctccgtgt ccaacaagga ggaggggctg ctgtgggagg aggggcccac ctccctccag    420
ccaaacgact ccatcctgca ggccgcggtg gacgcggcg tggcggacca gctggtactg    480
ggcgacccca cggcgccgcg ttttgtgtac tgggacaaga agctgcgccc cacgccctcc    540
ggccccgacg cgctcacggt cgacctgatg agcatcgtgg gcaagatccg ggcggggctg    600
ggcgcgctgg gcttcaaggc gcccatgcca gactatgagg agagcgtgga gcagtatgtg    660
cggcgcaacc tgggggcccga ggtgtttgag cgctgatcg agcccttctg cagcggcggtg    720
tacgccggcg accccaagaa gctgtccatg aaggcggcct ttggcaaggt gtacgacctg    780
gagaagaagg gcggcagcat cgtggggcgc gtgatcaagc tgattcagga gcggcgcgcc    840
aaccgcgcgc cgccgcgcag cccagcgcgt cgcaccaagc ccgcgggcca gacggtgggc    900
tccttccgct ccggcctgcg cacgctgccc gatgccatgg cggcgcggtt gggagacgcg    960
gtgcgcacca gctggcagct caaggagctc agcaaggaag gggaggccta caagtga     1017

```

<210> 32

<211> 338

<212> PRT

<213> Chlorella

<400> 32

```

Met Ala Ser Thr Ala Thr Leu His Gly Ala Pro Cys Cys Ser Ala Arg
1           5           10           15

```

```

Pro Val Gly Arg Arg His Ile Ala Ala Pro Ser Ile Gln His Asn Gly
          20           25           30

```

```

Pro Arg Leu Ala Ala Arg Val Gln Gln Arg Lys Gly Ala Gly Glu Arg
          35           40           45

```

```

Arg Ser Ala Leu Arg Val Gln Ala Val Gln Ala Pro Pro Glu Lys Ala
          50           55           60

```

029356

Gly Ala Ser Thr Gly Ser Ala Ala Asp Asp Ser Gly Val Tyr Asp Val
 65 70 75 80
 Val Val Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Thr Thr Ala Gln Ala Leu
 85 90 95
 Thr Thr Gln His Ser Gly Val Ala Arg Arg Val Leu Val Thr Glu Gly
 100 105 110
 Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Ser Val Ser Asn Lys Glu Glu
 115 120 125
 Gly Leu Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Asn Asp Ser
 130 135 140
 Ile Leu Gln Ala Ala Val Asp Ala Gly Val Ala Asp Gln Leu Val Leu
 145 150 155 160
 Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Tyr Trp Asp Lys Lys Leu Arg
 165 170 175
 Pro Thr Pro Ser Gly Pro Asp Ala Leu Thr Phe Asp Leu Met Ser Ile
 180 185 190
 Val Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Phe Lys Ala Pro
 195 200 205
 Met Pro Asp Tyr Glu Glu Ser Val Glu Gln Tyr Val Arg Arg Asn Leu
 210 215 220
 Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val
 225 230 235 240
 Tyr Ala Gly Asp Pro Lys Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys
 245 250 255
 Val Tyr Asp Leu Glu Lys Lys Gly Gly Ser Ile Val Gly Gly Val Ile
 260 265 270
 Lys Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ala Asn Pro Pro Pro Pro Arg Ser Pro
 275 280 285
 Ala Leu Pro Pro Lys Pro Ala Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Ser
 290 295 300
 Gly Leu Arg Thr Leu Pro Asp Ala Met Ala Ala Arg Leu Gly Asp Ala
 305 310 315 320

Val Arg Thr Ser Trp Gln Leu Lys Glu Leu Ser Lys Glu Gly Glu Ala
 325 330 335

Tyr Lys

<210> 33

<211> 1611

<212> ДНК

<213> *Oryza sativa*

<400> 33

```

atggccgccc cgcgccgagc catggccacc gccacctccg ccacggcagc gccgccgctc      60
cgcattcgcg acgccgcgag gaggaccgcg cgacgcggcc acgttcgctg cgccgtcgcc      120
agcggcgcgg ccgaggcgcc cgcggcgccc ggggcgcggg tgtcggcgga ctgcgtcgctg      180
gtgggcggcg gcatcagcgg gctctgcacc gcgcaggcgc tggccacaaa gcacggcgctc      240
ggcgacgtgc tcgtcacgga ggccccgccc cgccccggcg gcaacatcac caccgccgag      300
cgcgccggcg agggctacct ctgggaggag gggcccaaca gttccagcc ttccgacccc      360
gtcctcacca tggccgtgga cagcgggctc aaggacgata tcgtgttcgg ggaccccaac      420
gcgccgcggt tcgtgctgtg ggaggggaag ctaaggccgg tgccgtccaa gcccggcgac      480
ctgccgttct tcgacctcat gagcatcccc ggcaagetca gggccggcct tggcgcgctc      540
ggcgttcgag cgccacctcc agggcgtag gagtcggtgg aggacttcgt gcggcgcaac      600
ctcggcgcgg aggtctttga gcgcctcatt gagcctttct gctcaggtgt gtatgctggt      660
gatccttcaa agctcagtat gaaggctgca tttgggaagg tgtggaggct ggaggatact      720
ggaggtagca ttattggtgg aaccatcaaa acaatccagg agagggggaa aaaccccaaa      780
ccgccgaggg atccccgctt tccaacgcca aaggggcaga cagttgcata tttcaggaag      840
ggtctgacta tgctcccgga tgctattaca tctaggttgg gtagcaaagt caaactttca      900
tggaagttag caagcattac aaagtcagac aacaaaggat atgcattagt gtatgaaaca      960
ccagaagggg tggctctcgg gcaagctaaa actgttgtca tgaccatccc atcatatggt      1020
gctagtgata tcttgccggc actttcaagt gatgcagcag atgctctgtc aatattctat      1080
tatccaccag ttgctgctgt aactgtttca tatccaaaag aagcaattag aaaagaatgc      1140
ttaattgacg gagagctcca gggtttcggc cagctgcata cgcgtagtca gggagttgag      1200
actttaggaa caatatatag ctcatcactc tttocaaatc gtgctccagc tggaaaggtg      1260
ttacttctga actacatagg aggtttotaca aatacagggg ttgtttccaa gactgaaagt      1320
gagctggttag aagcagttga ccgtgacctc aggaagatgc tgataaatcc taaagcagtg      1380
gaccctttgg tccttggcgt ccgggtatgg ccacaagcca taccacagtt cctcattggc      1440

```

029356

catcttgatc atcttgaggc tgcaaaatct gccctgggca aaggtgggta tgatggattg 1500
 ttctctggag ggaactatgt tgcaggagtt gccctgggcc gatgcggtga aggtgcatat 1560
 gagagtgcct cacaaatata tgactacttg accaagtacg cctacaagtg a 1611

<210> 34
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 34

Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Met Ala Thr Ala Thr Ser Ala Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Leu Arg Ile Arg Asp Ala Ala Arg Arg Thr Arg Arg Arg
 20 25 30

Gly His Val Arg Cys Ala Val Ala Ser Gly Ala Ala Glu Ala Pro Ala
 35 40 45

Ala Pro Gly Ala Arg Val Ser Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly
 50 55 60

Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Gly Val
 65 70 75 80

Gly Asp Val Leu Val Thr Glu Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile
 85 90 95

Thr Thr Ala Glu Arg Ala Gly Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro
 100 105 110

Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser
 115 120 125

Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe
 130 135 140

Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Gly Asp
 145 150 155 160

Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly
 165 170 175

Leu Gly Ala Leu Gly Val Arg Ala Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser
 180 185 190

Val Glu Asp Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg

029356

Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Lys Ala Val Asp Pro Leu Val
 450 455 460

Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly
 465 470 475 480

His Leu Asp His Leu Glu Ala Ala Lys Ser Ala Leu Gly Lys Gly Gly
 485 490 495

Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu
 500 505 510

Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp
 515 520 525

Tyr Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

- <210> 35
- <211> 1518
- <212> ДНК
- <213> *Amaranthus tuberculatus*

<400> 35
 atgggcaaca tttctgagcg ggatgaacce acttctgcta aaagggttgc tgttgttggt 60
 gctggagtta gtggacttgc tgctgcatat aagctaaaat cccatggttt gaatgtgaca 120
 ttgtttgaag ctgattctag agctggaggc aaacttaaaa ctgttaaaaa agatggtttt 180
 atttgggatg agggggcaaa tactatgaca gaaagtgagg cagaagtctc gagtttgatc 240
 gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag ttgccaatth caaaaataa aagatacata 300
 gctagagatg gtcttctgt gctactacct tcaaatcccg ctgcactgct cacgagcaat 360
 atcctttcag caaaatcaaa gctgcaaatt atgttggaac catttttctg gagaaaacac 420
 aatgctactg agcttttctga tgagcatggt caggaaagcg ttggtgaatt ttttgagcga 480
 cattttggga aagagtttgt tgattatggt attgaccctt ttgttgcggg tacatgtggt 540
 ggagatcctc aatcgcttcc tatgcacat acatttccag aagtatggaa tattgaaaaa 600
 aggtttggct ctgtgtttgc tggactaatt caatcaacat tgttatctaa gaaggaaaag 660
 ggtggaggag gaaatgcttc tatcaagaag cctcgtgtac gtggttcatt ttcattccat 720
 ggtggaatgc agacacttgt tgacacaata tgcaaacagc ttggtgaaga tgaactcaaa 780
 ctccagtgtg aggtgctgtc cttgtcatac aaccagaagg ggatcccttc attagggaaat 840
 tggtcagtct cttctatgtc aaataatacc agtgaagatc aatcttatga tgctgtggtt 900
 gtcactgctc caattcgcaa tgtcaaagaa atgaagatta tgaaattcgg aatccattt 960
 tcacttgact ttattccaga ggtgagttac gtaccocctc ctgttatgat tactgcattc 1020

029356

aagaaggata aagtgaagag accactcgag ggctttggag ttcttatccc ctctaaagag 1080
 caacataatg gactgaagac tcttggtact ttatcttccct ccatgatggt tcccgatcgt 1140
 gctccatctg acatgtgtct ctttactaca tttgtcggag gaagcagaaa tagaaaactt 1200
 gcaaacgctt caacggatga attgaagcaa atagtttctt ctgaccttca gcagctggtg 1260
 ggcaactgagg acgaaccttc atttgtcaat catctctttt ggagcaacgc attcccgttg 1320
 tatggacaca attacgattc tgttttgaga gccatagaca agatggaaaa ggatcttccct 1380
 ggattttttt atgcaggtaa ccataagggt ggactttcag tgggaaaagc gatggcctcc 1440
 ggatgcaagg ctgcggaact tgtaatatcc tatctggact ctcatatata tgtgaagatg 1500
 gatgagaaga ccgcgtaa 1518

<210> 36
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> Amaranthus

<400> 36

Met Gly Asn Ile Ser Glu Arg Asp Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val
 1 5 10 15

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu
 20 25 30

Lys Ser His Gly Leu Asn Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala
 35 40 45

Gly Gly Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu
 50 55 60

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile
 65 70 75 80

Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn
 85 90 95

Lys Arg Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn
 100 105 110

Pro Ala Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu
 115 120 125

Gln Ile Met Leu Glu Pro Phe Phe Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu
 130 135 140

029356

Leu Ser Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg
 145 150 155 160

His Phe Gly Lys Glu Phe Val Asp Tyr Val Ile Asp Pro Phe Val Ala
 165 170 175

Gly Thr Cys Gly Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met His His Thr Phe
 180 185 190

Pro Glu Val Trp Asn Ile Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Phe Ala Gly
 195 200 205

Leu Ile Gln Ser Thr Leu Leu Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

Asn Ala Ser Ile Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe His
 225 230 235 240

Gly Gly Met Gln Thr Leu Val Asp Thr Ile Cys Lys Gln Leu Gly Glu
 245 250 255

Asp Glu Leu Lys Leu Gln Cys Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Gln
 260 265 270

Lys Gly Ile Pro Ser Leu Gly Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn
 275 280 285

Asn Thr Ser Glu Asp Gln Ser Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro
 290 295 300

Ile Arg Asn Val Lys Glu Met Lys Ile Met Lys Phe Gly Asn Pro Phe
 305 310 315 320

Ser Leu Asp Phe Ile Pro Glu Val Ser Tyr Val Pro Leu Ser Val Met
 325 330 335

Ile Thr Ala Phe Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe
 340 345 350

Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu
 355 360 365

Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp
 370 375 380

Met Cys Leu Phe Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu
 385 390 395 400

029356

Ala Asn Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu
 405 410 415

Gln Gln Leu Leu Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu
 420 425 430

Phe Trp Ser Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val
 435 440 445

Leu Arg Ala Ile Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr
 450 455 460

Ala Gly Asn His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser
 465 470 475 480

Gly Cys Lys Ala Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile
 485 490 495

Tyr Val Lys Met Asp Glu Lys Thr Ala
 500 505

- <210> 37
- <211> 1521
- <212> ДНК
- <213> Arabidopsis thaliana

<400> 37
 atggagttat ctcttctccg tccgacgact caatcgcttc ttccgctggt ttcgaagccc 60
 aatctccgat taaatgttta taagcctctt agactccggt gttcagtggc cgggtggacca 120
 accgtcggat cttcaaaaat cgaaggcgga ggaggcacca ccatcacgac ggattgtgtg 180
 attgtcggcg gaggtattag tggctcttgc atcgctcagg cgcttgctac taagcatcct 240
 gatgctgctc cgaatttaat tgtgaccgag gctaaggatc gtggttgagg caacattatc 300
 actcgtgaag agaatggttt tctctgggaa gaaggtocca atagttttca accgtctgat 360
 cctatgctca ctatggtggt agatagtggt ttgaaggatg atttggtggt gggagatcct 420
 actgcgcca ggtttgtggt gtggaatggg aaattgagc cggttccatc gaagctaaca 480
 gacttacggt tctttgattt gatgagtatt ggtgggaaga ttagagctgg ttttggtgca 540
 cttggcattc gaccgtcacc tccaggctgt gaagaatctg tggaggagtt tgtacggcgt 600
 aacctcggtg atgaggtttt tgagcgcctg attgaaccgt tttgttcagg tgtttatgct 660
 ggtgatcctt caaaactgag catgaaagca gcgtttggga aggtttggaa actagagcaa 720
 aatggtggaa gcataatagg tggctactttt aaggcaattc aggagaggaa aaacgctccc 780
 aaggcagaac gagaccgcg cctgccaaaa ccacagggcc aaacagttgg ttctttcagg 840

029356

aagggacttc gaatgttgcc agaagcaata tctgcaagat taggtagcaa agttaagttg 900
tcttgaagc tctcaggtat cactaagctg gagageggag gatacaactt aacatatgag 960
actccagatg gtttagtttc cgtgcagagc aaaagtgttg taatgacggg gccatctcat 1020
gttgcaagtg gtctcttgcg cctcttttct gaatctgctg caaatgcact ctcaaaaacta 1080
tattaccac cagttgcagc agtatctatc tcgtaccoga aagaagcaat ccgaacagaa 1140
tgtttgatag atgggtgaact aaagggtttt gggcaattgc atccacgcac gcaaggagtt 1200
gaaacattag gaactatcta cagctcctca ctctttccaa atcgcgacc gcccggaaga 1260
atthtgctgt tgaactacat tggcgggtct acaaacaccg gaattctgtc caagtctgaa 1320
ggtgagttag tggaagcatt tctagttggt cactttgata tccttgacac ggctaaatca 1380
tctctaacgt cttcgggcta cgaagggcta tttttgggtg gcaattacgt cgctgggtgta 1440
gccttaggcc ggtgtgtaga aggcgcatat gaaaccogca ttgaggtcaa caacttcatg 1500
tcacggtacg cttacaagta a 1521

<210> 38

<211> 506

<212> PRT

<213> Arabidopsis

<400> 38

Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser
1 5 10 15

Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu
20 25 30

Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly
50 55 60

Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro
65 70 75 80

Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly
85 90 95

Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly
100 105 110

Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp
115 120 125

029356

Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg
 130 135 140

Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr
 145 150 155 160

Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala
 165 170 175

Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu
 180 185 190

Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu
 195 200 205

Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser
 210 215 220

Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln
 225 230 235 240

Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg
 245 250 255

Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln
 260 265 270

Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu
 275 280 285

Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu
 290 295 300

Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu
 305 310 315 320

Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr
 325 330 335

Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser
 340 345 350

Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val
 355 360 365

Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
 370 375 380

029356

Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
385 390 395 400

Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
405 410 415

Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn
420 425 430

Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Phe Leu
435 440 445

Val Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser
450 455 460

Ser Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val
465 470 475 480

Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val
485 490 495

Asn Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
500 505

<210> 39

<211> 1515

<212> ДНК

<213> Nicotiana tabacum

<400> 39

atggctcctt ctgccggaga agataaacac agttctgcga agagagtcgc agtcattggt 60
gcaggcgtca gtgggcttgc tgcagcatac aagttgaaaa tccatggctt gaatgtgaca 120
gtatttgaag cagaagggaa agctggaggg aagttacgta gcgtgagcca agatggcctg 180
atatgggatg aaggggcaaa tactatgact gaaagtgaag gtgatgttac atttttgatt 240
gattctcttg gactccgaga aaagcaacaa tttccacttt cacaaaacaa gcgctacatt 300
gccagaaatg gtactcctgt actgttacct tcaaatccaa ttgatctgat caaaagcaat 360
tttctttcca ctggatcaaa gcttcagatg cttctggaac caatattatg gaagaataaa 420
aagctctccc aggtgtctga ctcacatgaa agtgtcagtg gattcttcca gcgctatfff 480
ggaaaggagg ttgttgacta tctaattgac ctttttgttg ctggaacgtg tgggtggtgat 540
cctgactcgc tttcaatgca ccattcattt ccagagttgt ggaatttaga gaaaaggttt 600
ggctcagtca tacttggagc tattcgatct aagttatccc ctaaaaatga aaagaagcaa 660
ggccacca aaacttcagc aaataagaag cgccagcggg gatctttttc ctttttgggc 720

ggaatgcaaa cacttactga tgcaatatgc aaagatctca gagaagatga acttagacta 780
 aactctagag ttctggaatt atcttgtagc tgtactgagg actctgcgat agatagctgg 840
 tcaattatth ctgcctctcc acacaaaagg caatcagaag aagaatcatt tgatgctgta 900
 attatgacgg cccactctg tgatgttaag agtatgaaga ttgctaagag aggaaatcca 960
 tttctactca actttattcc tgaggttgat tatgtaccgc tatctgttgt tataaccaca 1020
 ttttaagaggg aaaacgtaaa gtatcccctt gagggttttg gggttcttgt accttccaag 1080
 gagcaacaac atgggtctcaa gacactaggc accctcttct cttctatgat gtttccagat 1140
 cgggcaccaa acaatgttta tctctatact acttttgttg gtggaagccg aaatagagaa 1200
 cttgcaaaaag cctcaaggac tgagctgaaa gagatagtaa cttctgacct taagcagctg 1260
 ttgggtgctg agggagagcc aacatatgtg aatcatctat actggagtaa agcatttcca 1320
 ttgtacgggc ataactatga ttcagtccta gatgcaattg acaaaatgga gaaaaatctt 1380
 cctggattat tctatgcagg taaccacagg gggggattgt cagttggcaa agcattatct 1440
 tctggatgca atgcagctga tcttgttata tcatatcttg aatccgtctc aactgactcc 1500
 aaaagacatt gctga 1515

<210> 40
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Nicotiana

<400> 40

Met Ala Pro Ser Ala Gly Glu Asp Lys His Ser Ser Ala Lys Arg Val
1 5 10 15

Ala Val Ile Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu
20 25 30

Lys Ile His Gly Leu Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Glu Gly Lys Ala
35 40 45

Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Ser Gln Asp Gly Leu Ile Trp Asp Glu
50 55 60

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Gly Asp Val Thr Phe Leu Ile
65 70 75 80

Asp Ser Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Phe Pro Leu Ser Gln Asn
85 90 95

Lys Arg Tyr Ile Ala Arg Asn Gly Thr Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn
100 105 110

029356

Pro Ile Asp Leu Ile Lys Ser Asn Phe Leu Ser Thr Gly Ser Lys Leu
 115 120 125

Gln Met Leu Leu Glu Pro Ile Leu Trp Lys Asn Lys Lys Leu Ser Gln
 130 135 140

Val Ser Asp Ser His Glu Ser Val Ser Gly Phe Phe Gln Arg His Phe
 145 150 155 160

Gly Lys Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe Val Ala Gly Thr
 165 170 175

Cys Gly Gly Asp Pro Asp Ser Leu Ser Met His His Ser Phe Pro Glu
 180 185 190

Leu Trp Asn Leu Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Ile Leu Gly Ala Ile
 195 200 205

Arg Ser Lys Leu Ser Pro Lys Asn Glu Lys Lys Gln Gly Pro Pro Lys
 210 215 220

Thr Ser Ala Asn Lys Lys Arg Gln Arg Gly Ser Phe Ser Phe Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Met Gln Thr Leu Thr Asp Ala Ile Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asp
 245 250 255

Glu Leu Arg Leu Asn Ser Arg Val Leu Glu Leu Ser Cys Ser Cys Thr
 260 265 270

Glu Asp Ser Ala Ile Asp Ser Trp Ser Ile Ile Ser Ala Ser Pro His
 275 280 285

Lys Arg Gln Ser Glu Glu Glu Ser Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala
 290 295 300

Pro Leu Cys Asp Val Lys Ser Met Lys Ile Ala Lys Arg Gly Asn Pro
 305 310 315 320

Phe Leu Leu Asn Phe Ile Pro Glu Val Asp Tyr Val Pro Leu Ser Val
 325 330 335

Val Ile Thr Thr Phe Lys Arg Glu Asn Val Lys Tyr Pro Leu Glu Gly
 340 345 350

Phe Gly Val Leu Val Pro Ser Lys Glu Gln Gln His Gly Leu Lys Thr

029356

gcagatcctg aatctctctc tatgcgccat tctttcccag agctatggaa tttggagaaa 600
 aggtttggct ccattatagc cggggcattg caatctaagt tattcgccaa aagggaaaaa 660
 actggagaaa ataggactgc actaagaaaa aacaaacaca agcgtgggtc gttttctttc 720
 caggggtggga tgcagacact gacagataca ttgtgcaaag agcttggcaa agacgacctt 780
 aaattaaatg aaaagggtttt gacattagct tatggtcatg atggaagttc ctcttcacaa 840
 aactggtcta ttactagtgc ttctaaccaa agtacacaag atggtgatgc agtaatcatg 900
 acggctcctc tatataatgt caaggacatc aagatcacaa aaaggggaac tccctttcca 960
 cttaatcttc tccccagggt aagctacgtg ccaatctcag tcatgattac taccttcaaa 1020
 aaggagaatg taaagagacc tttggagggga tttggagttc ttgttccttc taaagagcaa 1080
 aaaaatgggt taaaaaccct tggtagactt ttttctctc tgatgttccc agatcgtgca 1140
 cctagtgatt tatatctcta taccaccttc attggcggaa ctcaaaacag ggaacttgct 1200
 caagcttcaa ctgacgagct taggaaaatt gttacttctg acctgagaaa gttggtggga 1260
 gcagaggggg aaccaacatt tgtaaacat ttctattgga gtaaaggctt tcctttgtat 1320
 ggacgtaact atgggtcagt tcttcaagca attgataaga tagaaaaaga tcttcccgga 1380
 tttttctttg caggtaacta caaagggtgga ctctcagttg gcaaagcaat agcctcaggc 1440
 tgcaaagcag ctgatcttgt gatatactac ctcaactctg cttcagacaa cacagtgcct 1500
 gataaatga 1509

<210> 42
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> Glycine

<400> 42

Met Ala Ser Ser Ala Thr Asp Asp Asn Pro Arg Ser Val Lys Arg Val
 1 5 10 15

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu
 20 25 30

Lys Ser His Gly Leu Asp Val Thr Val Phe Glu Ala Glu Gly Arg Ala
 35 40 45

Gly Gly Arg Leu Arg Ser Val Ser Gln Asp Gly Leu Ile Trp Asp Glu
 50 55 60

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ile Glu Val Lys Gly Leu Ile
 65 70 75 80

Asp Ala Leu Gly Leu Gln Glu Lys Gln Gln Phe Pro Ile Ser Gln His

029356

85 90 95
 Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asn Gly Ala Pro Leu Leu Val Pro Thr Asn
 100 105 110
 Pro Ala Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu Leu Ser Ala Gln Ser Lys Ile
 115 120 125
 His Leu Ile Phe Glu Pro Phe Met Trp Lys Arg Ser Asp Pro Ser Asn
 130 135 140
 Val Cys Asp Glu Asn Ser Val Glu Ser Val Gly Arg Phe Phe Glu Arg
 145 150 155 160
 His Phe Gly Lys Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe Val Gly
 165 170 175
 Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Glu Ser Leu Ser Met Arg His Ser Phe
 180 185 190
 Pro Glu Leu Trp Asn Leu Glu Lys Arg Phe Gly Ser Ile Ile Ala Gly
 195 200 205
 Ala Leu Gln Ser Lys Leu Phe Ala Lys Arg Glu Lys Thr Gly Glu Asn
 210 215 220
 Arg Thr Ala Leu Arg Lys Asn Lys His Lys Arg Gly Ser Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 Gln Gly Gly Met Gln Thr Leu Thr Asp Thr Leu Cys Lys Glu Leu Gly
 245 250 255
 Lys Asp Asp Leu Lys Leu Asn Glu Lys Val Leu Thr Leu Ala Tyr Gly
 260 265 270
 His Asp Gly Ser Ser Ser Ser Gln Asn Trp Ser Ile Thr Ser Ala Ser
 275 280 285
 Asn Gln Ser Thr Gln Asp Val Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu
 290 295 300
 Tyr Asn Val Lys Asp Ile Lys Ile Thr Lys Arg Gly Thr Pro Phe Pro
 305 310 315 320
 Leu Asn Phe Leu Pro Glu Val Ser Tyr Val Pro Ile Ser Val Met Ile
 325 330 335

029356

Thr Thr Phe Lys Lys Glu Asn Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly
 340 345 350

Val Leu Val Pro Ser Lys Glu Gln Lys Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly
 355 360 365

Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Leu
 370 375 380

Tyr Leu Tyr Thr Thr Phe Ile Gly Gly Thr Gln Asn Arg Glu Leu Ala
 385 390 395 400

Gln Ala Ser Thr Asp Glu Leu Arg Lys Ile Val Thr Ser Asp Leu Arg
 405 410 415

Lys Leu Leu Gly Ala Glu Gly Glu Pro Thr Phe Val Asn His Phe Tyr
 420 425 430

Trp Ser Lys Gly Phe Pro Leu Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Ser Val Leu
 435 440 445

Gln Ala Ile Asp Lys Ile Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Phe Ala
 450 455 460

Gly Asn Tyr Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Ile Ala Ser Gly
 465 470 475 480

Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asn Ser Ala Ser Asp
 485 490 495

Asn Thr Val Pro Asp Lys
 500

- <210> 43
- <211> 1205
- <212> ДНК
- <213> Cucumis sativus

<400> 43
 agcttccaac cttccgatcc tattctcacc atgggtggtgg atagtggcctt aaaagatgat 60
 ttagttctgg gagaccaga tgcacctcga tttgtattgt ggaatggaaa gctcagacca 120
 gtgcctgcga aacctaata tctaccttcc tttgacctga tgagcattgg tggaaaaatc 180
 agagcaggct ttggtgccct gggcattcgc cctcctcctc caggtcgaga ggaatcagtt 240
 gaagaatttg tccgtcggaa ccttggcaat gaagtttttg aacgtttgat agagccattt 300
 tgttctggtg tatacgtgg tgaccttca aagctaagca tgaaagcagc ttttggtgaa 360
 gtttgaggc tagagcaaaa tgggtgtagt attattggtg ggactttcaa agcacttcaa 420

gaaaggaata aaactaccaa accaccaaga gatccgcgctc taccaaagcc taagggccaa 480
 actgttggat cttttcggaa aggacttacc atgttgccaa atgctatttc tacttgtttg 540
 gggagtaaag taaaagtatc ttggaagcta tctagtatca gtaaagtgga tgacggaggt 600
 tatagtttga catacgaaac accagaagga ctagtctcca tactaagcag aagtgtcatc 660
 atgacggttc cttcttatat tgctggcact ctgttgcgctc caatctcggg gaaagctgca 720
 gatgcacttt caaaatttta ttatccacca gttgcatcag tgaccatatc atatccaaaa 780
 ggagcaatta ggaaagaatg cttgattgat ggtgaactaa agggggttgg tcaattgcatc 840
 cctcgtagcc aggggggtgac tactttggga actatataca gctcatcact ttttcctaat 900
 cgagcgcag atggaagggt attgctcttg aactacattg gaggggctac taatactgga 960
 attctttctc agacagagag cgagctcata gaagtagttg atcgggattt aagaaaaatc 1020
 ctcataaacc caaacgcaga ggatcctcta ccattgagcg tgagggtgtg gccacaagcc 1080
 attccacagt tcttgattgg ccatctcgat gttctagaca ccgccaagc cggactgaga 1140
 gaggctggaa tggaggggct attttaggt ggaaactatg tatgcggtgt ggccttgggg 1200
 agatg 1205

<210> 44
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Cucumis

<400> 44

Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Ile Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly
 1 5 10 15

Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val
 20 25 30

Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ala Lys Pro Asn Asp Leu
 35 40 45

Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe
 50 55 60

Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val
 65 70 75 80

Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asn Glu Val Phe Glu Arg Leu
 85 90 95

Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu
 100 105 110

Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Gln Asn Gly
 115 120 125

Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Leu Gln Glu Arg Asn Lys
 130 135 140

Thr Thr Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln
 145 150 155 160

Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Asn Ala Ile
 165 170 175

Ser Thr Cys Leu Gly Ser Lys Val Lys Val Ser Trp Lys Leu Ser Ser
 180 185 190

Ile Ser Lys Val Asp Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro
 195 200 205

Glu Gly Leu Val Ser Ile Leu Ser Arg Ser Val Ile Met Thr Val Pro
 210 215 220

Ser Tyr Ile Ala Gly Thr Leu Leu Arg Pro Ile Ser Gly Lys Ala Ala
 225 230 235 240

Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ser Val Thr Ile
 245 250 255

Ser Tyr Pro Lys Gly Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu
 260 265 270

Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Thr Thr
 275 280 285

Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp
 290 295 300

Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly
 305 310 315 320

Ile Leu Ser Gln Thr Glu Ser Glu Leu Ile Glu Val Val Asp Arg Asp
 325 330 335

Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro Asn Ala Glu Asp Pro Leu Pro Leu
 340 345 350

Ser Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His

029356

355 360 365
 Leu Asp Val Leu Asp Thr Ala Lys Ala Gly Leu Arg Glu Ala Gly Met
 370 375 380
 Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Cys Gly Val Ala Leu Gly
 385 390 395 400

Arg

<210> 45
 <211> 1521
 <212> ДНК
 <213> Oryza sativa

<400> 45
 atggcgcct cgcacgacce ccgcgggcggg aggtccgtcg ccgtcgtcgg cgccggcgtc 60
 agtgggctcg cggcggcgta caggctgagg aagcgcggcg tgcaggtgac ggtgttcgag 120
 gcggccgaca gggcgggtgg gaagatacgg accaactccg agggcggggtt catctgggac 180
 gaaggggcca acacatgac agagagtga tggaggcaa gcaggcttat tgacgatcct 240
 ggcctacaag gcaaacagca gtatcctaac tcacaacaca agcgttacat tgtcaaagat 300
 ggagcaccaa cactgattcc ctcatatccc attgcgctca tgaaaagcac tgtttctttct 360
 acaaaatcaa agctcaagct atttctggaa ccatttctct atgagaaatc tagcagaagg 420
 acctcgggaa aagtgtctga tgaacattta agtgagagtg tgatttttct gtgtatatgt 480
 agagataatc aggttggtga ttatcttatt gatccatttg tggctggaac aagcggagga 540
 gatcctgagt cattatcaat tcgtcatgca tttccagcat tatggaattt ggagaataag 600
 tatggctctg tcattgctgg tgccatcttg tccaaactat ccactaaggg tgattcagtg 660
 aagacaggag gtgcttcgcc agggaaagga aggaataaac gtgtgtcatt ttcatttcat 720
 ggtggaatgc agtcactaat agatgcactt cacaatgaag ttggagatgg taacgtgaag 780
 cttggtacag aagtgttgtc attggcatgt tgctgtgatg gagtctcttc ttctgggtgg 840
 tgggtcaattt ctgttgatcc aaaagatgct aaagggaaag atctcagaaa gaaccaatct 900
 ttcgatgctg ttataatgac tgctccattg tctaagtcc agaggatgaa gtttacaaaa 960
 ggtggagtcc ctttgtgct agactttctt cctaaggctg attatctacc actatctctc 1020
 atggtaacag cttttaagaa ggaagatgtc aaaaaaccat tggaaggatt tgggtgccttg 1080
 atacctata aggaacagca aaagcatggt ctcaaaacce ttgggaccct cttctcctcg 1140
 atgatgtttc cagatcgagc tcctaatgat caatatctat atacatcttt cattgggggg 1200
 agccataata gagacctcgc tggggctcca acggctattc tgaacaact tgtgacctct 1260

029356

gacctaaagaa agctcttggg tgttgagggga caacctactt ttgtgaagca tgtacattgg 1320
 agaaatgctt ttcctttata tggccagaat tatgatctgg tactggaagc tatagcaaaa 1380
 atggagaaca atcttccagg gttcttttac gcaggaaata acaaggatgg gttggctggt 1440
 ggaaatgtta tagcttcagg aagcaaggct gctgacctg tgatctotta tcttgaatct 1500
 tgcacagatc aggacaatta g 1521

<210> 46
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> *Oryza sativa*

<400> 46

Met Ala Ala Ser Asp Asp Pro Arg Gly Gly Arg Ser Val Ala Val Val
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Leu Arg Lys Arg
 20 25 30

Gly Val Gln Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala Gly Gly Lys
 35 40 45

Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala Asn
 50 55 60

Thr Met Thr Glu Ser Glu Leu Glu Ala Ser Arg Leu Ile Asp Asp Leu
 65 70 75 80

Gly Leu Gln Gly Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His Lys Arg Tyr
 85 90 95

Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Thr Leu Ile Pro Ser Asp Pro Ile Ala
 100 105 110

Leu Met Lys Ser Thr Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Leu Lys Leu Phe
 115 120 125

Leu Glu Pro Phe Leu Tyr Glu Lys Ser Ser Arg Arg Thr Ser Gly Lys
 130 135 140

Val Ser Asp Glu His Leu Ser Glu Ser Val Ile Phe Leu Cys Ile Cys
 145 150 155 160

Arg Asp Asn Gln Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe Val Ala Gly
 165 170 175

Thr Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Arg His Ala Phe Pro

029356

180 185 190
 Ala Leu Trp Asn Leu Glu Asn Lys Tyr Gly Ser Val Ile Ala Gly Ala
 195 200 205
 Ile Leu Ser Lys Leu Ser Thr Lys Gly Asp Ser Val Lys Thr Gly Gly
 210 215 220
 Ala Ser Pro Gly Lys Gly Arg Asn Lys Arg Val Ser Phe Ser Phe His
 225 230 235 240
 Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asp Ala Leu His Asn Glu Val Gly Asp
 245 250 255
 Gly Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu Ala Cys Cys Cys
 260 265 270
 Asp Gly Val Ser Ser Ser Gly Gly Trp Ser Ile Ser Val Asp Ser Lys
 275 280 285
 Asp Ala Lys Gly Lys Asp Leu Arg Lys Asn Gln Ser Phe Asp Ala Val
 290 295 300
 Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Gln Arg Met Lys Phe Thr Lys
 305 310 315 320
 Gly Gly Val Pro Phe Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys Val Asp Tyr Leu
 325 330 335
 Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Glu Asp Val Lys Lys
 340 345 350
 Pro Leu Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ile Pro Tyr Lys Glu Gln Gln Lys
 355 360 365
 His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro
 370 375 380
 Asp Arg Ala Pro Asn Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Ser Phe Ile Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ala Ile Leu Lys Gln
 405 410 415
 Leu Val Thr Ser Asp Leu Arg Lys Leu Leu Gly Val Glu Gly Gln Pro
 420 425 430

Thr Phe Val Lys His Val His Trp Arg Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly
435 440 445

Gln Asn Tyr Asp Leu Val Leu Glu Ala Ile Ala Lys Met Glu Asn Asn
450 455 460

Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Asn Lys Asp Gly Leu Ala Val
465 470 475 480

Gly Asn Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser
485 490 495

Tyr Leu Glu Ser Cys Thr Asp Gln Asp Asn
500 505

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ борьбы с сорняками в месте произрастания растения, содержащего по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую мутированную протопорфириноген оксидазу (мут-РРО), устойчивую к гербициду, который является РРО-ингибирующим производным бензоксазониона, включающий нанесение на указанное место эффективного количества указанного гербицида, причем указанная нуклеотидная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант, последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, а мут-РРО представляет собой вариант SEQ ID NO: 2, в которой аминокислота в положении 128 представляет собой Ala, а аминокислота в положении 420 представляет собой Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu или Thr.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что гербицид - производное бензоксазониона наносят в сочетании с одним или более РРО-ингибирующими гербицидами, выбранными из группы, состоящей из ацифторфена, ацифторфеннатрия, азафенидина, бенкарбазона, бензфендизона, бифенокса, бутафенацила, карфентразона, карфентразонэтила, хлметоксифена, цинидонэтила, флуазолата, флуфенпира, флуфенпирэтила, флумиклорака, флумиклоракпентила, флумиоксазина, фторгликофена, фторгликофенэтила, флутиацета, флутиацетметила, фомесафена, галосафена, лактофена, оксадиаргила, оксадиазона, оксифторфена, пентоксазона, профлуазола, пираклонила, пирафлуфена, пирафлуфенэтила, сафлуфенацила, сульфентразона, тидиазимины, этил [3-[2-хлор-4-фтор-5-(1-метил-6-трифторметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-3-ил)фенокси]-2-пиридилокси]ацетата, N-этил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид, N-тетрагидрофурфурил-3-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид, N-этил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид, N-тетрагидрофурфурил-3-(2-хлор-6-фтор-4-трифторметилфенокси)-5-метил-1H-пиразол-1-карбоксамид и 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]триазинан-2,4-диона.

3. Изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая мут-РРО, содержащую вариант SEQ ID NO: 2, в котором аминокислота в положении 128 представляет собой Ala; а аминокислота в положении 420 представляет собой Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu или Thr.

4. Клетка трансгенного растения, трансформированная мут-РРО, по п.3, экспрессия которой в клетке растения приводит к повышенной устойчивости растения к гербициду, который является производным бензоксазониона, по сравнению с клеткой растения дикого типа.

5. Трансгенное растение, содержащее клетку растения по п.4, обладающее повышенной устойчивостью к гербициду, который является производным бензоксазониона, по сравнению с растением дикого типа.

6. Растение, которое экспрессирует мут-РРО, содержащую вариант SEQ ID NO: 2, в котором аминокислота в положении 128 представляет собой Ala; а аминокислота в положении 420 представляет собой Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu или Thr.

7. Семя трансгенного растения по п.6, включающее нуклеиновую кислоту, кодирующую мут-РРО, представляющую собой вариант SEQ ID NO: 2, в котором аминокислота в положении 128 представляет собой Ala; а аминокислота в положении 420 представляет собой Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu или Thr.

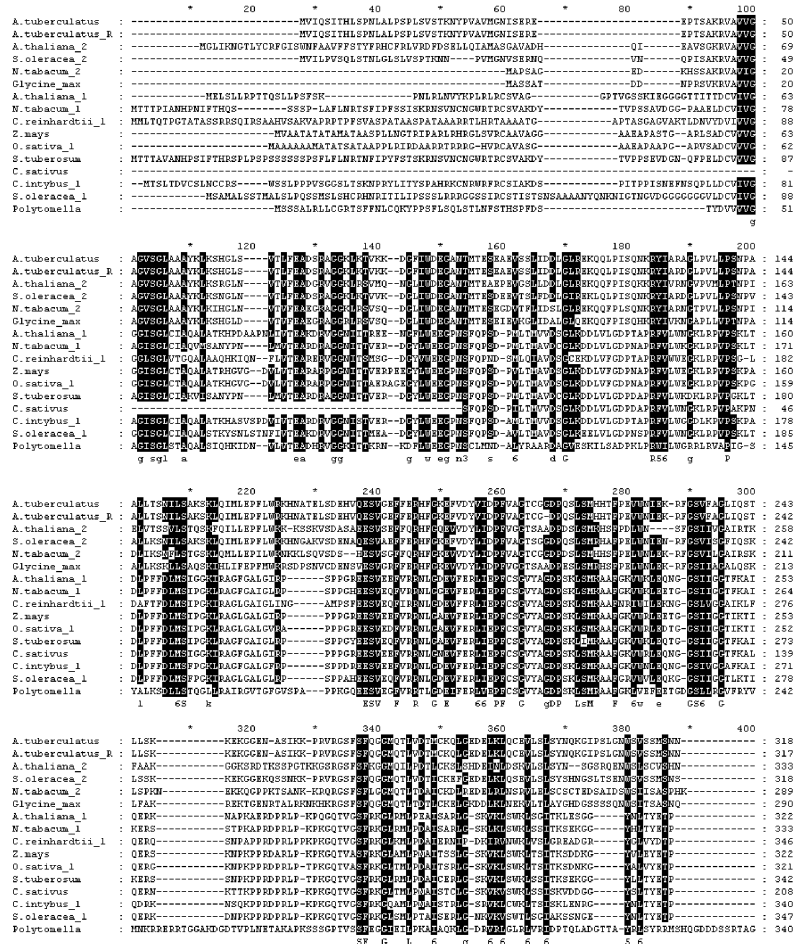
8. Способ получения клетки трансгенного растения с повышенной устойчивостью к гербициду, который является производным бензоксазониона, по сравнению с клеткой растения дикого типа, включаю-

ший трансформацию клетки растения кассетой экспрессии, содержащей нуклеиновую кислоту по п.3.

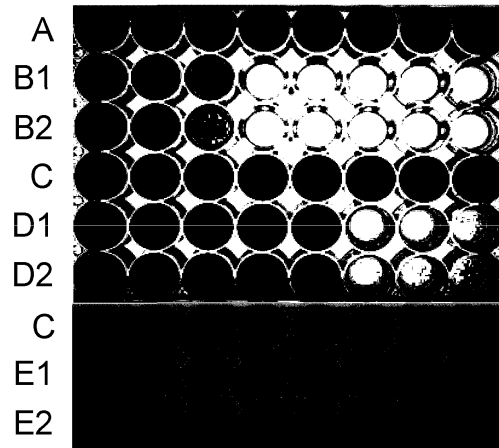
9. Способ получения трансгенного растения с повышенной устойчивостью к гербициду, который является производным бензоксазимола, включающий трансформацию клетки растения кассетой экспрессии, содержащей нуклеиновую кислоту по п.3, и регенерацию растения из трансформированной клетки растения.

10. Способ по п.8 или 9, где нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее вариант, последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

11. Способ по любому из пп.8-10, где кассета экспрессии также содержит регуляторный участок инициации транскрипции и регуляторный участок инициации трансляции, которые являются функционально активными в растении.



Фиг. 1



Фиг. 3

