



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 50765

(13) C2

(51) 6 A01N57/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ВРОЖАЙНОСТІ СТІЙКИХ ДО ГЛІФОСАТУ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР

1

2

(21) 98105672
(22) 21 03 1997
(24) 15 11 2002
(86) PCT/EP97/01443, 21 03 1997
(31) 96870036 9
(32) 29 03 1996
(33) EP
(31) 96870094 8
(32) 16 07 1996
(33) EP
(46) 15 11 2002, Бюл. №11, 2002 р
(72) Бран Іво, ВЕ, Грейхам Уїлльям, ВЕ
(73) МОНСАНТО ЕРОП С А, ВЕ
(56) US 3853530 10 12 1974
UA 3988142 26 10 1976
EP 0481407 22 04 1992

(57) 1 Способ повышения урожайности устойчивых к глифосату сельскохозяйственных культур, выбранных из сахарной и кормовой свеклы, кукурузы, масличного рапса и хлопка, путем обработки посевов указанных культур глифосатным гербицидом в летальной для растения дозе

2 Способ по п 1, отличающийся тем, что глифосатный гербицид, представляющий собой глифосат или его производное, наносят в дозе от 0,2 до 6,0 кг к э /га

3 Способ по п 1 или 2, отличающийся тем, что глифосат или его производное наносят в ходе однократной обработки или в ходе нескольких последовательных обработок

4 Способ по любому из пп 1-3, отличающийся тем, что глифосатное производное представляет собой глифосатную соль, предпочтительно моно-изопропиламмониевую соль, аммониевую соль или натриевую соль, или их смеси

5 Способ по любому из пп 1-4, отличающийся тем, что глифосатный гербицид используют в ком-

позиции с добавкой, которую выбирают из следующих веществ

- амины, такие как этоксилированные алкиламины, особенно талловые амины, кокосовые амины, поверхностно-активные вещества, выпускаемые под торговым названием "Ethomeen", оксиды аминов, такие как поверхностно-активные вещества, выпускаемые под торговым названием "Empigen OB",

- соли четвертичного аммония, такие как этоксилированные и/или пропоксилированные соли четвертичного аммония, в частности, поверхностно-активные вещества, выпускаемые под торговыми названиями "Ethoquad", "Emcol CC" и "Dodigen",
- алкилполиглицозид или алкилглицозид, сложные эфиры глюкозы и сахарозы, предпочтительно, с поверхностно-активным веществом в виде этоксилированного полипропоксилированного четвертичного аммония

6 Способ по п 5, отличающийся тем, что обрабатываемым растением является сахарная или кормовая свекла

7 Способ по любому из пп 1-6, отличающийся тем, что обрабатываемое растение содержит ген, кодирующий полипептид EPSPS

8 Способ по любому из пп 1-6, отличающийся тем, что обрабатываемое растение содержит ген, кодирующий фермент глифосатоксидоредуктазу

9 Способ по любому из пп 1-6, отличающийся тем, что растение содержит ген, кодирующий ферменты класса II EPSPS

10 Способ по любому из пп 1-6, отличающийся тем, что культуры выбраны из сахарной и кормовой свеклы, кукурузы, масличного рапса и хлопка, которым придали устойчивость к глифосатному гербициду

Настоящее изобретение относится к новому применению глифосата, или N-(фосфометил)глицина, и его производных, таких как соли и сложные эфиры, в качестве агента для повышения урожайности зерновых культур,

устойчивых к глифосату

Глифосат хорошо известен в качестве эффективного системного неселективного гербицида, воздействующего при нанесении на листья (послевсходовое применение) Глифосат, как извест-

(13) C2
(11) 50765
(19) UA

но, воздействует на различные ферментные системы, препятствуя образованию аминокислот и других эндогенных химических веществ в растениях, подвергшихся обработке. Благодаря относительно низкой водорастворимости кислотной формы, глифосат в основном продается в форме соли, такой как моноизопропиламмониевая соль, аммониевая соль, натриевая соль или др.

Хорошо известные готовые составы содержат активный ингредиент и поверхностно-активное вещество или смесь поверхностно-активных веществ и, возможно, другие добавки, такие как противопенивающие вещества, антифризы, красители и другие известные вещества. Следует также сделать ссылку на книгу "The Herbicide Glyphosate" под ред. E. Grossbard and D. Atkinson, Butterworth & Co, 1985.

В патенте США 3853530 описано использование N-фосфометилглицина и его производных для того, чтобы изменить природный рост или развитие растений, например вызывать дефолиацию и задержку вегетативного роста. У некоторых растений эта задержка, как считают, ведет к уменьшению длины основного стебля и к повышению ветвистости боковых отростков. Такое изменение природного роста или развития приводит к появлению более низких кустистых растений, которые часто обладают повышенной устойчивостью к засухе и вредителям. В случае дерновых злаков задержка вегетативного роста также может быть крайне желательной, поскольку усиливается развитие корневой системы и получается более плотный, более прочный дерн и увеличивается интервал между стрижками газонов, площадок для гольфа и аналогичных покрытых травой площадей. У многих типов растений, таких как силосные культуры, картофель, сахарный тростник, свекла, виноград, дыни и фруктовые деревья, задержка вегетативного роста, вызванная глифосатом, приводит к повышению содержания углеводов в растениях на момент сбора урожая. Очевидно, что такие виды применения требуют сублетальных доз, поскольку иначе обработанные растения погибнут.

Патент США 3988142 относится к использованию N-фосфометилглицина и его производных для увеличения накопления углеводов в растениях, таких как сахарный тростник. И в этом случае применяемые дозы являются сублетальными и вносятся перед самым сбором урожая.

В обоих случаях считается, что нелетальная доза глифосатного гербицида, т.е. доза, которая намного ниже тех доз, которые обычно применяются для борьбы с сорняками в поле, вызывает снижение или задержку вегетативного роста и активный материал проходит обычным путем, таким как обычно, когда он оказывает свое гербицидное действие на растения. Что касается патента США 3988142, то задержка вегетативного роста, как считают авторы, позволяет большую часть доступных углеводов в растениях преобразовывать в крахмал или сахарозу, а не использовать в качестве питания растения для продолжения роста.

Патент DE 3200486 относится к повышению продуктивности сельскохозяйственных культур

путем обработки их сублетальными дозами фосфинотрицина (глюфозината), который является также эффективным неселективным гербицидом. И здесь также подавление вегетативного роста сублетальными дозами гербицида вызывает повышение содержания углеводов в растениях или их плодах. В патенте DE 3200486 упоминается глифосат в сравнительном примере (Пример II), который предназначен для того, чтобы показать, что глюфозинат более эффективен, чем глифосат, при тех же дозировках.

Патент EP 0401407 раскрывает аналогичный объект. Он раскрывает использование сублетальных доз неселективных гербицидов, таких как, в числе прочего, глифосат и фосфинотрицин, в процессе перехода от стадии формирования массы к стадии созревания растения, с целью увеличения отложения углеводов в растениях, содержащих сахар или крахмал, кроме сахарного тростника, таких как сахарная свекла, картофель или кукуруза.

В патенте WO 95/05082 описан способ повышения урожайности сельскохозяйственных культур, устойчивых к ингибиторам глутаминсинтетазы, таким как фосфинотрицин, путем обработки указанных культур дозами этого гербицида, которые применялись для борьбы с сорняками в полях. Далее в этом патенте утверждается, что гербициды, обладающие другой активностью, не дают этого эффекта или часто оказывают отрицательное действие на урожайность культур.

Последние разработки в генной технологии позволили производить генетическую трансформацию растений, в частности, сельскохозяйственных культур, с целью сделать их устойчивыми к глифосату или его производным. Например, патент EP-0218571 относится к клонированию или экспрессии вектора, включающего ген, который кодирует полипептид EPSPS, который, когда он экспрессирован в клетке растения, придает устойчивость к глифосату растениям, выращенным из такой клетки. Патент EP 0293358 относится также к повышению эффективности устойчивых к глифосату растений путем получения мутантных ферментов EPSP синтазы, которые проявляют меньшее сродство к глифосату, сохраняя каталитическую активность. Патент WO 92/00377 описывает гены, кодирующие фермент глифосатоксидоредуктазы. Эти гены используют для получения трансформированных растений, которые разлагают глифосатный гербицид и которые, таким образом, устойчивы к глифосатному гербициду. Патент WO 92/04449 описывает гены, кодирующие ферменты EPSPS класса II, которые используются для получения трансформированных растений, которые устойчивы к глифосатным гербицидам. Такие сельскохозяйственные культуры можно выращивать практически без засорения сорняками, путем внесения глифосатного гербицида после появления всходов культуры. В "Chemical Abstracts, vol. 124, № 8, 1996, дается ссылка на статью в "Weeds" (1995) by B.H. Wells, под названием "Development of Glyphosate Tolerant Crops into the Market". Автор подтверждает, что два подхода использовали для того, чтобы довести устойчивость к промышленно-применяемым уровням

глифосата у некоторых сельскохозяйственных культур

Статья под названием "Roundup Ready™ Sugar Beet", I Brants et al., опубликованная в начале 1996 г в "Proceedings of the International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides" (симпозиума, который проходил 3 - 6 апреля 1995 г) показывает, что у генетически модифицированной сахарной свеклы удалось добиться устойчивости к коммерческим уровням "Roundup®".

Неожиданно обнаружено, что при обработке посевов таких культур, как свекловичные, масличный рапс или кукуруза, которым придали устойчивость к глифосатному гербициду, даже при использовании обычно летальных доз глифосатного гербицида или тех доз, которые обычно используются для борьбы с сорняками, урожайность повышалась. Этот неожиданный эффект нельзя было предполагать на основе известного уровня техники, поскольку у культур, не обладающих устойчивостью, такие дозы приведут к гибели урожая, а также поскольку фосфинотрициновые гербициды обладают совершенно другим механизмом действия, чем глифосатный гербицид.

В "Chemical Abstracts, vol 123, № 21, 1995, дана ссылка на статью (реферат № 281158c) X Delannay и др., в которой описана оценка урожайности устойчивой к глифосату линии соевых бобов после обработки глифосатом. Авторы статьи приходят к выводу, что тенденция, которую показывают полученные данные, свидетельствует об отсутствии существенных отличий, и что сравнение со стандартным гербицидом подтверждает вывод о том, что обработка глифосатом полностью безопасна для урожая, причем изменчивость данных отнесли на счет неблагоприятных погодных и/или почвенных условий.

В упомянутой статье "Weeds" (1995) B H Weiss также отмечает, что никакого значительного снижения урожайности не отмечалось после однократного или последовательного разбросного внесения глифосата на разных стадиях созревания урожая путем разбрасывания. Ведущие линии хлопка, устойчивого к глифосату, также показали снижение урожайности после нанесения глифосата. Эти оценки урожайности были сделаны до того, чтобы подтвердить эффективность генетической модификации соответствующих сельскохозяйственных культур в плане их устойчивости к соответствующему гербициду. Никакие данные, содержащиеся в указанной статье, и никакие описания и предложения не позволяют предположить увеличение урожайности культур после внесения глифосата.

Несмотря на то, что ранее упомянутая статья I Brants et al. приводит данные по средней массе (%) корнеплодов для трех различных линий сахарной свеклы, устойчивой к глифосату, которые претерпели три различные трансформации, после нескольких обработок глифосатом, в сопоставлении с контролем, специалист не может вывести из этих данных сведения об увеличении урожайности сахарной свеклы. Указанные данные были приведены непосредственно как данные испытаний на устойчивость. Эти данные не свидетельствуют ни

о каком повышении урожая сахарной свеклы, поскольку оценка устойчивости не проводится в условиях отсутствия сорняков и поэтому приходится делать допущения на конкурентную борьбу растений на стандартных делянках. Далее, как будет ясно специалистам, приведенные данные являются преждевременными, поскольку получены на маленьких делянках, без повторений, и в одном районе. Также следует отметить, что ранние ростки все же содержали сегрегированный посевной материал, что привело к неоднородности культур на корню, в сопоставлении со стандартной культурой. Как следствие, средняя масса корнеплодов рассчитана на одно растение (а не на единицу площади) и сопоставлена со стандартом, выращенным в других условиях. Единственный вывод, который специалист может сделать из указанной статьи, состоит в том, что, как было обнаружено, три линии сахарной свеклы показывают такой уровень устойчивости, который позволяет использовать их в промышленных масштабах.

Согласно настоящему изобретению испытания показали повышение урожайности (выраженное на единицу площади) культур, устойчивых к глифосату, таких как сахарная свекла, масличный рапс, кукуруза или хлопок, обработанных глифосатным гербицидом до около 50%, в сопоставлении с той же культурой, которая не подвергалась обработке глифосатным гербицидом. Повышение урожайности нельзя объяснить только ослаблением конкуренции между сорняками и сельскохозяйственными культурами в результате внесения глифосатного гербицида, поскольку эффект отмечался на культурах, которые выращивали в условиях почти полного отсутствия сорняков. Не отмечен также эффект регулирования роста, как его понимают в известных публикациях, никакой временной задержки роста не отмечалось, как и никакого временного изменения природного роста или развития культур.

Таким образом, настоящее изобретение касается использования глифосата или его производных для повышения урожайности культур, устойчивых к глифосату.

Предпочтительно, глифосат наносить в обычных летальных дозах для борьбы с популяциями сорняков, чтобы одновременно убивать сорняки. Глифосатный гербицид можно наносить однократно или в несколько последовательных приемов. Применяемые нормы внесения обычно находятся в диапазоне от 0,2 до 6,0 кг кислотного эквивалента/га, в зависимости от климатических условий, времени года, засорения сорняками, стадии развития растений и в зависимости от культуры и других параметров, известных специалистам.

Глифосатный гербицид можно наносить в его кислотной форме или ее производного, предпочтительно в виде соли, такой как моноизопропиламмониевая соль, натриевая соль, или аммониевая соль, или их смеси. Можно использовать также другие глифосатные соли, в которых катион сам по себе не имеет гербицидной активности или фитотоксичности.

Эффект повышения урожайности в результате обработки глифосатным гербицидом отмечался у культур, обладающих устойчивостью к глифосату,

и выбираемых из свеклы, такой как сахарная свекла или кормовая свекла, кукуруза, масличный рапс и хлопок, независимо от способа, использованного для того, чтобы придать устойчивость к глифосату

Этот эффект особенно ясно проявляется на устойчивой к глифосату сахарной и кормовой свекле

Глифосатный гербицид можно, например, наносить в виде кислоты или ее производных, в форме водорастворимых или диспергируемых в воде гранул, в виде водорастворимого концентрата, разведенного в воде для распыления, или в других формах, таких как эмульсии, капсулы с активным материалом, и проч

Глифосатный гербицид можно наносить за один прием или несколькими последовательными приемами на разных стадиях роста растений. Влияние обработки глифосатным гербицидом на культуры, устойчивые к глифосату, оказалось наиболее значительным, когда обработку применяли на стадии роста соответствующих растений

Обычные адъюванты (добавки) для подобных композиций можно найти в "McCUTCHEON'S Emulsifiers and Detergents", и их с успехом можно выбирать из числа следующих

- амины, такие как этоксилированные алкиламины, особенно талловые амины, кокосовые амины, поверхностно-активные вещества, продаваемые под торговой маркой "Ethomeen", оксиды аминов, такие как поверхностно-активные вещества, продаваемые под торговой маркой "Empigen OB",

- соли четвертичного аммония, такие как этоксилированные и/или пропоксилированные соли четвертичного аммония, конкретно, поверхностно-активные вещества, продаваемые под торговыми марками "Ethoquad", "Emcol CC" и "Dodigen",

- алкилполиглюкозид, алкилглюкозид, сложные эфиры глюкозы и сахарозы

Наиболее предпочитаемыми являются соли четвертичного аммония, такие как соли, описанные в патенте EP-0441764, возможно в смеси со смачивающим агентом, лучше всего алкоксилированным сложным эфиром сорбита. Этот тип поверхностно-активных веществ или смесей поверхностно-активных веществ не оказывает значительного фитотоксического эффекта на растения и является предпочтительным ввиду экологической безвредности

Наибольший интерес представляют такие соли четвертичного аммония, как триметилэтоксиполиоксипропиламмонийхлориды

Пример 1

Растения сахарной свеклы, генетически модифицированные по способу, описанному в EP-0218571, что позволило сделать их устойчивыми к глифосату, высадили в соответствии с обычной сельскохозяйственной практикой на расстоянии 4,5 см друг от друга в рядок и прореживали вручную, чтобы обеспечить нормальный урожай на корню, на блоках делянок со случайным расположением, размеры делянки 2,7 × 6 м, 6 рядков на делянку с расстоянием между рядками в 0,45 м. В каждом испытании проводили четыре повторения

Практически не допускали засорения опытных

делянок сорняками при помощи предвсходового внесения гербицидов, если требовалось, путем неоднократной послевсходовой обработки глифосатом, как указано ниже, или в соответствии со стандартными официально принятыми видами обработки свеклы (для целей сравнения)

Были проведены следующие виды обработки

№ 1 Стандартным гербицидом для сахарной свеклы

№ 2 Стандартным гербицидом для сахарной свеклы в двойной дозе

№ 3 3 × 720 г кэ /га композиции глифосата

№ 4 3 × 1080 г кэ /га композиции глифосата

№ 5 3 × 1440 г кэ /га композиции глифосата

№ 6 2 × 2160 г кэ /га композиции глифосата

Если проводили три последовательных обработки глифосатом, то первую проводили на стадии появления у сельскохозяйственной культуры 2 - 4 листьев, вторую - на стадии появления у культуры 6 - 8 листьев, а третью - на стадии 10 - 12 листьев, но до смыкания растительного покрова

Если обработку проводили двумя последовательными нанесениями, то первую обработку осуществляли на стадии 2 - 4 листьев, а вторую - на стадии появления у культуры 10 - 12 листьев

Композиция глифосатного гербицида содержала 360 г глифосата кэ /л в виде изопропиламмониевой соли, и 180 г/л поверхностно-активного вещества, состоящего из хлорида триметилэтоксиполиоксипропил (8) аммония и этоксилированного (20) сорбитанового эфира (80/20). Глифосатную композицию применяли в объеме воды в 200 л/га под давлением 2 бар

После сбора урожая измеряли массу свежих корнеплодов. Массу свежих корнеплодов после Стандартной обработки № 1 принимали за 100% урожайности, и измеренные показатели массы свежих корнеплодов сопоставляли с результатами, полученными после Стандартной обработки № 1

Таблица 1а

Обработка	% урожайности (свежих корнеплодов на гектар)
1*	100
2*	96
3	108
4	108
5	110
6	113

* Стандартная обработка включала три нанесения

Herbasan	1,0 л/га	1,0 л/га	1,0 л/га
Ethosan	0,1 л/га	0,2 л/га	0,2 л/га
Goltix	1,0 кг/га	1,0 кг/га	1,0 кг/га
Renol S	0,3 л/га	0,3 л/га	0,3 л/га

Таблица 1б

Обработка	% урожайности (свежих корнеплодов на гектар)
1*	100

Продолжение таблицы 1b

Обработка	% урожайности (свежих корнеплодов на гектар)
2*	102
3	110
4	113
5	117
6	113

* Стандартная обработка включала три внесения

Goltix	1,7кг/га	0,75кг/га	1,0кг/га
Actipron	1,7л/га		
Betanal E		2,0л/га	
Venzar		0,4л/га	
Goltix			
Betanal Prog			2,0л/га

Таблица 1с

Обработка	% урожайности (свежих корнеплодов на гектар)
1*	100
2*	-
3	129
4	156
5	136
6	132

* Стандартная обработка включала предвсходовое внесение и два послевсходовых внесения официально принятых к применению гербицидов для сахарной свеклы

Goltix	3кг/га	0,5кг/га	0,5кг/га
Pyramin DF	2кг/га		
Betanal P		1,0кг/га	1,0л /га
Stratos			1,0л/га

Пример 2

Те же испытания повторяли с кормовой свеклой, устойчивой к глифосату (генетически трансформированной по тому же способу)

Таблица 2а

Обработка	% урожайности (свежих корнеплодов на гектар)
1*	100
2*	101
3	108
4	107
5	110
6	111

* Стандартная обработка включала три нанесения

Herbasan	1,0л/га	1,0л/га	1,0л/га
Ethosan	0,1л/га	0,2л/га	0,2л/га
Goltix	1,0кг/га	1,0л/га	1,0кг/га
Renol S	0,3л/га	0,3л/га	0,3л/га

Те же испытания повторяли с этой линией культуры, как описано выше, за исключением того, что предвсходовую обработку гербицидом применяли в отношении всех делянок, (гербицид включал 1кг/га "Goltix" (торговое название) и 3л/га "Betanal E" (торговое название))

Таблица 2b

Обработка	% урожайности (свежих корнеплодов на гектар)
1*	100
2*	100
3	108
4	110
5	113
6	110

* Стандартная обработка в этом испытании включала однократное нанесение

Goltix	1,0кг/га
Betanal E	3л/га

Пример 3

При осуществлении этого эксперимента в основном следовали протоколу, описанному в Примерах 1 и 2

Сахарную свеклу, устойчивую к глифосату, высадили в начале мая 1995 г в полном соответствии с нормами сельскохозяйственной практики. Практически не допускали засорения делянок сорняками путем ручной прополки (без обработки) или путем внесения глифосатного гербицида. Глифосат вносили в виде композиции изопропиламмониевой соли глифосата, включающей 360г/л кислотного эквивалента и 180г/л поверхностно-активного вещества хлорида (триметилэтоксиполиоксипропил (8) аммония (80) с этоксилированным (20) сложным эфиром (20) сорбита

T1 = стадия появления 2 - 4 листьев (приблизительно 30 дней после посадки)

T2 = стадия появления 8 - 10 листьев (приблизительно 50 дней после посадки)

T3 = стадия появления 14 - 18 листьев (приблизительно 65 дней после посадки)

На Таблице 4 ниже указана измеренная средняя масса (в г) корнеплодов в пересчете на растение, через 180 дней после посадки для нескольких доз композиции глифосата, как указано ниже

Таблица 3

T1	T2	T3	180 дней после посадки, г
Без обработки	Без обработки	Без обработки	1420
2	2	2л	1717
3	0	3л	1538

Продолжение таблицы 3

T1	T2	T3	180 дней после посадки, г
6	0	6л	1885
4	0	4л	1904

Данный эксперимент ясно показывает увеличение массы урожая свежих корнеплодов после нескольких внесений глифосата. Имеет также тенденция повышения урожая в зависимости от доз внесенного глифосата.

Повышение урожайности также вызывает соответствующее увеличение сухой массы растений при сборе урожая.

Пример 4

Цель настоящего эксперимента состоит в том, чтобы сравнить трансгенную сахарную свеклу, которую опрыскивали композицией глифосатного гербицида, и трансгенную сахарную свеклу, которую не обрабатывали такой гербицидной композицией, с точки зрения качества свеклы (содержание сахара, инвертированного сахара, калия, натрия, аминокислот в корнях, содержания питательных веществ в образцах корнеплодов и ботвы, в % сухой массы, содержание сырой клетчатки и токсинов).

Сахарную свеклу в основном используют в сахарной промышленности для получения белого сахара, пульпы и кормовой патоки. Технологическая ценность свеклы для этой цели обычно оценивается по анализу на содержание сахара, калия, натрия и аминокислот. Что касается токсинов в свекле, то контролируют содержание сапонинов.

Подготовка образцов

После сбора урожая корнеплоды хранили при температуре от 0 до 10°C, а образцы ботвы заморозили при t° ниже -20°C.

Переработку свеклы в свекольную стружку (bri) осуществляли в полуавтоматическом режиме, свеклу нарезали в свеклорезке до получения свекольной стружки. Затем стружку гомогенизировали, 1 часть образца использовали после экстракции для анализа на поляризацию, инвертированный сахар, Na, K и аминокислоты, а вторую часть образца высушили и использовали для анализа на питательные вещества. Третью часть того же образца стружки замораживали для исследования на токсины. Экстрагирование свекольной стружки производили дистиллированной водой, в которую добавляли таблетку сульфата алюминия для придания прозрачности, и переносили стружку в автоматическую установку "Venema" для сбраживания и фильтрации. Подготовку крупной свекольной ботвы осуществляли путем разделения ее в горизонтальном направлении на равные части образцов.

Методы анализов

Сухое вещество - метод сушки в печи (см. EF 71/393/EEC, L279/7, стр. 858-6120/12-71).

Корнеплоды

После переработки корнеплодов в массу, образец массы помещали в печь при 95°C и высушивали в течение 24 часов (до постоянной массы).

Ботва

Образец помещали в печь при 95°C и сушили в течение максимум 72 часов, в зависимости от размера образца, до постоянной массы.

И для корнеплодов, и для ботвы потери массы определяли количественно и вычисляли в процентном отношении к сухому веществу.

Сырая клетчатка - метод Weende (модифицированный EF L 344/36-37 26/11-92).

Образцы последовательно обрабатывали кипящими растворами серной кислоты и гидроксида калия в указанных концентрациях. Остаток разделяли фильтрацией на тигеле Гуча со стекловатой, промывали, взвешивали и сжигали в муфельной печи при 550°C в течение 3 часов. Производили количественное определение потери массы в результате сжигания путем гравиметрического замера и вычисляли процент сырой клетчатки в образце.

Токсины сапонины - метод ВЭЖХ (Hilmer Sørensen, KVL 1991, модифицированный DC).

Данный метод основан на кислотном гидролизе сапонинов в сахарной свекле. Высвобожденную олеаноловую кислоту экстрагировали дихлорметаном. После выпаривания воды из образца остаток растворяли в метаноле. Содержание олеаноловой кислоты определяли ВЭЖХ с обращенной фазой, используя в качестве элюента ацетонитрил/воду, проявляя при 210 нм на УФ детекторе.

Содержание сахара в экстракте свеклы - поляризация (ICUMSA, Sugar Analysis 1979, Proc 1990).

Экстракт сахарной свеклы, осветленный сульфатом алюминия, подвергают анализу на поляриметре типа PROPOL, который основан на определении отношения оптического вращения. Оптическое вращение измеряют при 546 нм в пробирке длиной 70 мм, преобразуют до °Z (% пол) или г/100 г корнеплодов.

Аминный азот экстракта сахарной свеклы - анализатор SMA1IC (ICUMSA, Sugar Analysis 1979, модифицированный).

Экстракт сахарной свеклы, осветленный сульфатом алюминия, анализируют на колориметре при 570 нм после окрашивания с нингидрином.

Содержание калия и натрия в свекольном экстракте - анализатор SMA1IC (Technicon, Tech Publ TNO-0160-10).

Свекольный экстракт, осветленный сульфатом алюминия, подвергают анализу в Flame Photometer IV, в котором интенсивность энергии света, испускаемого калием и натрием в пламени, измеряется, соответственно, при 589 нм и 768 нм. Образец разбавляют сульфатом лития, в котором литий используется в качестве внутреннего стандарта для баланса сигнала, идущего из пламенного фотометра.

Инвертированный сахар свекольного экстракта

та - анализатор SMAIIIC (Technicon, Tech Publ TNO-0160-10)

Свекольный экстракт, осветленный сульфатом алюминия, исследуют на колориметре при 560нм после взаимодействия с реактивом "сульфат меди неocupроин гидрохлорид"

Растения сахарной свеклы, обладающие устойчивостью к глифосату, генетически трансформированные по технологии, описанной в EP-0218571, с целью придать им устойчивость к глифосатному гербициду, выращивали в 6 различных районах (Италия, Испания, Бельгия, Дания, Франция, Великобритания)

Выбор сортов зависел от местных требований. Материал варьировался по многим показателям, одним из важных показателей являлось содержание сахара, определенное методом поляризации. Сахарную свеклу можно разделить на подгруппы: тип E, тип N, и тип Z. Тип E имеет низкие значения поляризации, тип Z имеет высокие значения поляризации, а тип N находится между ними. Сорта, выращенные в Северной Европе, можно характеризовать как типы E-N, N или N-Z. Материал, использованный в данном примере, попадает в группу N.

Сахарную свеклу высаживали в соответствии с местными сельскохозяйственными нормами, прореживали вручную, чтобы обеспечить нормальную культуру на корню. Каждое испытание повторяли по меньшей мере дважды.

На делянках поддерживали практически полное отсутствие сорняков посредством внесения

- глифосатного гербицида на опытные делянки

- стандартной селективной гербицидной обработки свеклы (в зависимости от местности) на контрольных делянках, за исключением Дании, Италии, где не сочли нужным применять никаких других гербицидов, помимо глифосата, чтобы обеспечить отсутствие сорняков.

Композиция глифосатного гербицида была такой же, как в Примере 1. Композицию глифосата вносили следующим образом:

- в ходе предвсходовой обработки 2,5л/га
- на стадии появления 2 - 4 истинных листьев свеклы 2л/га
- на стадии появления 6 - 8 истинных листьев свеклы 2л/га
- на стадии появления 12 - 14 истинных листьев свеклы (смыкание растительного покрова) 2л/га

Дозы селективного гербицида были следующими

- Испания

3,55кг/га Goltix WG (метамитрон), предвсходовое внесение

- Бельгия

2л/га "Gramoxone" (паракват 200), предпосадочная

3л/га "Pyramin FL" (хло- через 1 неделю после

ридазон 430), посадки

0,5л/га "Betanal" (фен- через 3 недели после

медифам 150), посадки

5л/га Goltix (метамитрон через 3 недели после

70% WP) посадки

0,5л/га "Tramat" (этофу- через 3 недели после

мезат 200) посадки

0,75л/га Goltix через 5 недель после

посадки

0, 75л/га Vegelux (минеральное масло 40) через 5 недель после

посадки

0, 75л/га Tramat через 5 недель после

посадки

0,75л/га Goltix через 6 недель после

посадки

0, 75л/га Vegelux через 6 недель после

посадки

0,17л/га Fusilade через 6 недель после

посадки

0,75л/га Betanal через 6 недель после

посадки

0, 75л/га Tramat через 9 недель после

посадки

0,75л/га Betanal через 9 недель после

посадки

0,75л/га Goltix через 9 недель после

посадки

0,75л/га Vegelux через 9 недель после

посадки

- Франция

0,75л/га Goltix WP (метамитрон) через 1 день после

посадки

0,75л/га Goltix WP через 2 недели после

посадки

0, 75л/га Betanal (Фен- через 2 недели после

медифам 150) посадки

0,75л/га Tramat (этофу- через 2 недели после

мезат 200) посадки

- Великобритания

1,0л/га Laser (циклоси- через 5 недель после

дим) посадки

Результаты анализов собирали и вычисляли средние значения, представленные в таблице ниже, причем все страны имели эквивалентные значения массы в пересчете на средние показатели

Таблица 4

Часть растения	Анализируемое вещество	Обработан / необработ	Сахарная свекла
brei	сухое в-во г/100г корнеплодов	Обработан	21,309
		Необработан	20,444
корнеплод	Инвертирован сахар ммоль/100г корнеплодов	Обработан	1,011
		Необработан	1,755
	Калий ммоль/100г корнеплодов	Обработан	5,162
		Необработан	5,286

Продолжение таблицы 4

Часть растения	Анализируемое вещество	Обработан / необработ	Сахарная свекла
	NH ₂ N ммоль/100г корнеплодов	Обработан	2,470
		Необработан	2,878
	натрий ммоль/100г корнеплодов	Обработан	1,118
		Необработан	1,769
	Поляризация г/100г корнеплодов	Обработан	15,610
		Необработан	14,478
Ботва	Сухое вещество г/100г корнеплодов	Обработан	14,724
		Необработан	13,996

Обработан распылением глифосатного гербицида

Необработан не обработан распылением глифосатного гербицида

Эти данные показывают, что сахарная свекла, обработанная глифосатным гербицидом, имеет значительно более высокое содержание сахара при пониженном содержании натрия, калия, аминокислотного азота и инвертированного сахара в корнеплодах. Содержание сухого вещества в корнеплодах и ботве также повышается. Более детальные данные указывают на то, что листья сахарной свеклы, обработанной глифосатом, имеют более высокое содержание клетчатки.

Сопоставляя результаты по данному примеру с результатами по предыдущему примеру становится ясно, что повышение урожайности, отмеченное ранее по массе на гектар, также выражается в виде повышения сухого вещества, клетчатки и содержания сахара в собранном урожае.

Пример 5

Растения сахарной свеклы и кормовой свеклы, генетически модифицированные по технологии, описанной в EP-0218571, благодаря чему они приобрели устойчивость к глифосату, высаживали в различных районах в соответствии с обычной сельскохозяйственной практикой на расстоянии 4,5 см друг от друга рядами и прореживали ряды вручную, с целью обеспечить нормальный стеблестой, в соответствии с правилами рандомизированных повторений, размеры делянки 2,7 × 7 м, 6 рядков на делянку при расстоянии между рядками в 0,45 м. В каждом опыте проводили по четыре повторения.

Почти не допускали засорения опытных делянок сорняками. Сначала проводили стандартную предвсходовую обработку гербицидом всей территории, а затем пропалывали вручную и, когда нужно, проводили послевсходовую обработку глифосатом, как описано ниже. Проводили следующие этапы обработки:

Прополка только вручную

3 × 720 г к.э./га композиции глифосата

3 × 1080 г к.э./га композиции глифосата

3 × 1440 г к.э./га композиции глифосата

3 × 2160 г к.э./га композиции глифосата

Если проводили три последовательных обработки глифосатным гербицидом, то первую из них проводили на стадии появления у культуры 2 - 4 листьев, вторую - на стадии появления у культуры 6 - 8 листьев, третью - на стадии появления у культуры 10 - 12 листьев, но до смыкания расти-

тельного покрова.

Если проводили две последовательных обработки глифосатным гербицидом, то первую из них проводили на стадии появления у культуры 2 - 4 листьев, вторую - на стадии появления у культуры 10 - 12 листьев.

Композиция глифосатного гербицида содержала 360 г к.э. глифосата/л в виде соли изопропиламмония, и 180 г/л поверхностно-активного вещества, состоящего из хлорида триметилэтоксиполиоксипропил (8) аммония и этоксилированного (20) сорбитанового сложного эфира (80/20). Глифосатную композицию наносили в воде объемом 200 л/га под давлением 2 бар.

Массу свежих корнеплодов измеряли после сбора урожая. Массу свежих корнеплодов с делянок, которые пропалывали только вручную, считали 100% урожайностью, а измеренную свежую массу корнеплодов после обработки глифосатом соотносили с результатом, полученным на делянке, пропалываемой вручную.

Таблица 5

% урожайность (масса свежих корнеплодов)

Обработан	Сахарная свекла	Кормовая свекла
Ручная прополка	100%	100%
3 × 720 г к.э.	101	105
3 × 1080 г к.э.	98	106
3 × 1440 г к.э.	115	108
2 × 2160 г к.э.	107	102

Пример 6

Для данного полевого испытания в середине сентября 1995 г посадили озимый масличный рапс, имеющий известную генетическую основу, которому придали устойчивость к глифосатному гербициду (в соответствии с комбинированной методикой экспрессии EPSPS и экспрессии глифосатоксидоредуктазы), посадку производили в соответствии с принятыми агротехническими нормами по 4 кг семян/га, что соответствует приблизительно 100 растениям на м² (нормальная культура растений), в соответствии с методом рандомизированного повторения, размеры делянки 3 × 7 м, рас-

стояние между рядами - 0,14м, 4 повторения каждого опыта

Практически не допускали засорения делянок сорняками, для чего проводили стандартную предвсходовую обработку гербицидом всей площади, т.е. 1,5л "Butisan" (метазахлор) один раз в сутки после посева и 1л дополнительно на стандартных делянках, а также проводили обработку глифосатом, как указано ниже

Обработку глифосатом проводили осенью, когда растения находились на стадии роста В4 - В5, применяли такую же композицию, как в Примере 1

Урожай собирали в начале августа и урожайность оценивали и выражали в тоннах/га зерна (при 9% влажности). На Таблице 6 показаны измеренные показатели урожайности в % от урожайности на стандартной делянке

Таблица 6

Урожайность

Стандарт	100
1080г к э /га	104,5

Пример 7

Настоящий полевой опыт проводили так же, как описано в предыдущем Примере, за исключением того, что в данном Примере высевали яровой масличный рапс (в середине апреля 1996 г.) Таким растениям, имеющим известную генетическую основу, придали устойчивость к глифосатному гербициду при помощи комбинированного способа, упомянутого в Примере 6

Не допускали засорения делянок сорняками путем обработки всей площади 1,5л/га "Butisan" и ручной прополки стандартной делянки и обработки глифосатным гербицидом остальных делянок. Ту же глифосатную композицию наносили приблизительно через 1 месяц после посева, т.е. на стадии роста растений В3 - В4. Сбор урожая провели в середине августа

На Таблице 7 показаны данные по урожаю (измеренные и враженные как в Примере 6) в % от урожайности на стандартной делянке

Таблица 7

Урожайность

Стандарт	100
720г к э /га	120
1080г к э /га	112

Пример 8

Дальнейшие полевые опыты проводили в Италии с целью дать оценку повышению урожайности устойчивых к глифосату зерновых культур после одной или нескольких обработок глифосатным гербицидом. Известную кукурузу подвергли генетическим модификациям с целью придать растениям устойчивость к глифосату при помощи комбинированного метода экспрессии EPSPS и глифосатоксидоредуктазы, полученные растения

высевали и выращивали в соответствии с агротехническими нормами при плотности примерно 62000 растений/га (приблизительно 4,7 семян/м) на делянках 3 × 9м, каждая из которых содержала четыре 9м ряда, в соответствии с методом рандомизированных повторений (по четыре повторения), а затем вручную прореживали для того, чтобы обеспечить нормальную культуру на корню и одинаковое количество растений на всех делянках. Всю площадь, занятую стандартными делянками и опытными делянками, подвергли предвсходовой обработке гербицидом ("Lasso Micromix") в дозах 6л/га (т.е. 2016г алахлора и 864г тербутипазина). Не допускали засорения стандартных делянок сорняками путем прополки вручную, если требовалось, а опытные делянки обрабатывали той же глифосатной композицией, которая описана в Примере 1, обработку проводили в различных дозах и на разных стадиях роста растений. Урожай собирали только с двух центральных рядков по срединной линии длиной 7м. Урожайность измеряли в тоннах зерна на гектар при 15% влажности, и привели в Таблицах в % от урожайности на стандартных делянках

Таблица 8а

% урожайности/обработка глифосатом на стадии 3 - 4 листьев

	Трансформация	Трансформация
	1	2
Стандарт	100	100
720г к э /га глифосата	106	103
1800г к э /га глифосата	107	107

Таблица 8б

Урожайность/обработка глифосатом на стадии 5 - 6 листьев

	Трансформация	Трансформация
	1	2
Стандарт	100	100
720г к э /га глифосата	114	105
1080г к э /га глифосата	109	108
1440г к э /га глифосата	109	105
1800г к э /га глифосата	111	102

Пример 9

Далее полевые опыты осуществляли в соответствии с протоколом, описанным в Примере 1, с целью дать оценку влияния различных композиций глифосатного гербицида на повышение урожайности. Трансгенные растения кукурузы подвергали трехкратной обработке глифосатным гербицидом в дозах 720г к э /га и 1080г к э /га, соответственно

Таблица 9

% урожайности - масса свежих корнеплодов

	3 × 720г кэ /га	3 × 1080г кэ /га
Roundup®	100	100
Композиция в гранулах	101,4	100,2
Жидкая композиция	104,2	102

Roundup®

- глифосатизопропиламмониевая соль в количестве 360г кэ /л

- поверхностно-активное вещество в виде этоксилированного амина тапловой кислоты в количестве 180г/л

Твердая композиция

- глифосат натрия в количестве 430кэ /кг

- триметилэтоксиполиоксипропил (8) аммония хлорид в количестве 160г/кг

- сульфат аммония в количестве 330г/кг

Жидкая композиция как в Примере 1

Настоящий пример показывает тенденцию к улучшению рабочих характеристик композиции, включающей экологически безопасное поверхно-

стно-активное вещество

Пример 10

В данном Примере использовали процедуру, аналогичную процедуре Примера 7 (яровой масличный рапс) с целью определить эффективность различных композиций глифосатного гербицида. Опытные делянки в этом опыте имели размеры 1,5 × 10м

Таблица 10

Урожайность в т/га зерновых при влажности 9%

л/га	Урожайность %			
	1	2	3	4
Roundup®	100	100	100	100
Гранулированная композиция	101	103	109	-
Жидкая композиция	103	101	110	108

Урожайность после нескольких обработок Roundup® принимали за 100%

Настоящий Пример подтверждает превосходство композиций, использованных в Примере 7

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71