

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036006**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.11

(21) Номер заявки
201692296

(22) Дата подачи заявки
2011.10.13

(51) Int. Cl. *A01H 5/00* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) МУТАНТЫ BETA VULGARIS, ТОЛЕРАНТНЫЕ К ALS-ИНГИБИТОРНЫМ ГЕРБИЦИДАМ

(31) 10187751.2; 61/394,463

(32) 2010.10.15; 2010.10.19

(33) EP; US

(43) 2017.04.28

(62) 201390454; 2011.10.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БАЙЕР ИНТЕЛЛЕКТУЭЛЬ
ПРОПЕРТИ ГМБХ; КВС Заат СЕ
(DE)**

(72) Изобретатель:
**Хайн Рюдигер, Бендинг Юрген,
Донн Гюнтер, Книттель-Оттлебен
Натали, Хольцшulte Бернд, Лоок
Андреас, Шпрингманн Клеменс,
Янсен Рудольф (DE)**

(74) Представитель:
Юрчак Л.С. (KZ)

(56) CHARLES AMTZEN ET AL.:
"MOLECULAR STRATEGIES FOR CROP
IMPROVEMENT", JOURNAL OF CELLULAR
BIOCHEMISTRY, WILEY-LISS INC, US, vol. 44,
no. Supplement, 16 April 1990 (1990-04-16), pages
257-360, XP007916848, ISSN: 0730-2312 [retrieved
on 2004-02-19] cited in the application R249; page 310
DE-A1-19821613

TAN S. ET AL.: "Herbicide inhibitors of
amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops",
AMINO ACIDS; THE FORUM FOR AMINO
ACID AND PROTEIN RESEARCH, SPRINGER-
VERLAG, VI, vol. 30, no. 2, 1 March 2006
(2006-03-01), pages 195-204, XP019379389, ISSN:
1438-2199, DOI: DOI:10.1007/S00726-005-0254-1
page 198, column 2, line 7 - page 199, column 1, line
17

WO-A1-9802526
WO-A1-9802527
WO-A2-2007005581
WO-A2-2006094084
WO-A2-2004062351
WO-A1-9633270

(57) Изобретение относится к толерантным к ALS-ингибиторным гербицидам растениям Beta vulgaris и их частям, которые включают мутацию эндогенного гена ацетолактатсинтазы (ALS), причем этот ALS ген кодирует ALS полипептид, содержащий аминокислоту, отличную от триптофана, в позиции 569 ALS полипептида.

B1

036006

**036006
B1**

Данное изобретение относится к *Beta vulgaris* растениям и их частям, которые толерантны к ALS-ингибиторным гербицидам, а также к способам их получения.

Культивируемые формы *Beta vulgaris* (как определено в Ford-Lloyd (2005) Sources of genetic variation, Genus Beta; в книге Biancardi E., Campbell L.G., Skaracis G.N., De Biaggi M. (eds), Genetics and Breeding of Sugar Beet, Science Publishers, Enfield (NH), США, pp. 25-33) являются важными сельскохозяйственными культурами в умеренных и субтропических областях. Например, около 20% производимого в мире сахара получают из сахарной свеклы. В связи с тем, что рассада и молодые растения свеклы во время первых 6-8 недель их жизни очень чувствительны к сильной конкуренции быстро растущих сорняков, которые выигрывают конкуренцию у молодых культурных растений, необходимы реальные меры контроля сорняков на этих посадках культурных растений.

В последние 40 лет гербициды являются предпочтительным средством для контроля сорняков в культуре свеклы. Продукты, используемые для этих целей, такие как феномедифам, десмедифам и метамитрон, позволяют подавлять рост сорняков на свекловичных полях, не представляя опасности для культурных растений. Однако при неблагоприятных окружающих условиях эффективность этих продуктов не всегда удовлетворительна, особенно если вредные сорняки, такие как *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus* и/или *Tripleurospermum inodorata* прорастают в течение продолжительного периода времени.

Инновационные гербицидно активные ингредиенты очень желательны для того, чтобы улучшить контроль сорных растений в посадках свеклы. Такие соединения должны действовать против широкого спектра сорняков предпочтительно от прорастания сорняков вплоть до полного развития сорных растений, не оказывая влияния на культуру свеклы независимо от стадии развития. С помощью классического гербицидного скрининга не удалось обнаружить селективного гербицидно активного ингредиента для свеклы в течение последних десяти лет, который бы удовлетворял всем этим строгим требованиям агрономически предпочтительным образом.

Некоторые химикаты ингибируют энзим "ацетогидроксикислоты синтазы" (AHAS), также известной как "ацетолактатсинтаза" (ALS [EC 4.1.3.18]). На ALS могут воздействовать пять структурно различных семейств гербицидов, относящихся к классу ALS-ингибиторных гербицидов, таких как (a) сульфониломочевинные гербициды (Beyer E.M. и др. (1988), Sulfonylureas in Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action; Marcel Dekker, New York, 1988, 117-189), (b) сульфониламинокарбонилтриазолиновые гербициды (Pontzen, R., Pflanz.-Nachrichten Bayer, 2002, 55, 37-52), (c) имидазолиновые гербициды (Shaner, D.L. и др., Plant Physiol., 1984, 76, 545-546; Shaner, D.L. и O'Connor, S.L. (Eds.), The Imidazolinone Herbicides, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991), (d) триазолопиримидиновые гербициды (Kleschick W.A. и др., Agric. Food Chem., 1992, 40, 1083-1085) и (e) пиримидинил(тио)бензоатные гербициды (Shimizu T.J., Pestic. Sci., 1997, 22, 245-256; Shimizu T. и др., Acetolactate Synthase Inhibitors in Herbicide Classes in Development, Boger P., Wakabayashi K., Hirai K., (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 2002, 1-41).

ALS участвует в превращении двух пируват молекул в ацетолактат молекулу и двуокись углерода. В реакции используется тиаминпирофосфат для того, чтобы связать между собой две пируват молекулы. Получаемый в результате продукт реакции, ацетолактат, в конечном счете становится валином, лейцином или изолейцином (Singh (1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine", в Plant Amino Acids, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. New York, New York, pp. 227-247).

Ингибиторы ALS прерывают биосинтез валина, лейцина и изолейцина в растениях. Последствием является непосредственное истощение соответствующего аминокислотного инструмента, вызывающее остановку биосинтеза белка, приводящее к прекращению роста растения и в конечном случае к гибели растения, и, как минимум, к его повреждению.

ALS-ингибиторные гербициды широко применяются в современном сельском хозяйстве в связи с эффективностью при умеренных расходных количествах и с их относительной не токсичностью по отношению к животным, эти семейства гербицидов предотвращают дальнейший рост и развитие чувствительных растений, включая многие виды сорняков. Для того чтобы создать растения с повышенной толерантностью даже по отношению к высоким концентрациям ALS-ингибиторных гербицидов, которые могут потребоваться для достаточного контроля сорняков, необходимо дополнительно выводить улучшенные линии или сорта культурных растений, которые устойчивы к ALS-ингибиторным гербицидам, а также создать способы и композиции для производства и применения улучшенных линий или сортов культурных растений, которые устойчивы к ALS-ингибиторным гербицидам.

Широкое разнообразие ALS-ингибиторных гербицидов позволяет фермерам контролировать широкий ряд видов сорняков независимо от их стадии роста, однако эти высокоэффективные гербициды не могут быть применены в свекле в связи с тем, что обычные растения свеклы /коммерческие сорта свеклы очень чувствительны к этим ALS-ингибиторным гербицидам. Однако эти ALS-ингибиторные гербициды обладают очень хорошей гербицидной активностью по отношению к широколиственным и злаковым видам сорняков. Первые гербициды, имеющие моду действия по ингибированию ALS, были созданы для применения в сельском хозяйстве уже 30 лет тому назад. В настоящее время активные вещества этого класса гербицидов проявляют строгий контроль сорняков и широко применяются в кукурузе и зерновых культурах, а также в двудольных культурах, за исключением сахарной свеклы.

Единственный ALS-ингибиторный гербицид, о котором известно, что он применяется в настоящее

время по послеуборочной схеме применения в свекле, является дебут®. Этот гербицид (содержащий трифлусульфурон-метил в качестве активного ингредиента плюс специфические соединения для приготовления препарата) разрушается сахарной свеклой до того, как он может ингибировать эндогенный ALS энзим свеклы, но он имеет несколько пробелов при контроле сорняков на площадях, где выращивают свеклу.

С тех пор как ALS-ингибиторные гербициды были применены в сельском хозяйстве, было замечено, что чувствительные виды растений, включая естественно встречающиеся сорняки, время от времени спонтанно развивают толерантность к этому классу гербицидов. Единичные замещения пары оснований в специфических местах ALS гена обычно приводят к более или менее устойчивым вариантам ALS энзима, который показывает различные уровни ингибирования под воздействием ALS-ингибиторных гербицидов.

Растения, обладающие мутантными ALS аллелями, поэтому показывают различные уровни толерантности к ALS-ингибиторным гербицидам в зависимости от химической структуры ALS-ингибиторных гербицидов и местоположения точки мутации в ALS гене. Например, Hattori и др., (1995), *Mol. Gen. Genet.* 246: 419-425, описывают единичную мутацию в Trp 557 кодоне в *Brassica napus* клеточной линии (согласно нумерации *Arabidopsis thaliana* последовательности, которую используют в литературе для того, чтобы сравнивать все ALS/AHAS мутанты, это относится к позиции "574"), которая соответствует позиции 569 ALS последовательности в свекле. Эти авторы наблюдали устойчивость по отношению к нескольким членам подклассов ALS-ингибиторных гербицидов, подобных сульфонилмочевинам, имидазолинонам и триазолопиримидинам.

Мутанты свеклы описаны в связи с точкой мутации в Ala 122 кодоне, которая приводит к определенной толерантности по отношению к ALS-ингибиторным гербицидам подкласса имидазолинонов (WO 98/02526), но которая недостаточна для контроля сорняков по схеме сельскохозяйственного применения. Никакой перекрестной толерантности к другим ALS-ингибиторным гербицидным классам не было описано при использовании этого мутанта. Более того, растения свеклы, имеющие вторую точку мутации в Pro 197 кодоне, показывают умеренную толерантность к ALS-ингибиторным гербицидам, относящимся к членам подкласса сульфонилмочевинных гербицидов. Также описаны двойные мутанты этих двух (WO 98/02527). Однако ни один из этого многообразия мутантов не был использован для выхода на рынок многообразия свеклы в связи с тем, что уровень гербицидной толерантности к ALS-ингибиторным гербицидам был недостаточно высок в этих мутантах для агрономического применения. Stougaard и др., (1990), *J. Cell Biochem., Suppl.* 14E, 310 описывают выделение ALS мутантов из клеточной культуры тетраплоидной сахарной свеклы. Были выделены два различных ALS гена (ALS I и ALS II), которые отличаются только в аминокислотной позиции 37. Мутант 1 содержит в своем ALS I гене 2 мутации, тогда как мутант 2 содержит 3 мутации в его ALS II гене. После того как эти мутации были разделены, при решении вопроса о том, какая мутация придает устойчивость по отношению к ALS ингибитору, выяснилось, что ALS, синтезированный из рекомбинантного *E. coli*, был устойчивым к гербицидам в том случае, когда содержал точечную мутацию в Trp 574 кодоне (согласно нумерации *Arabidopsis thaliana* последовательности, которую используют в литературе, для того чтобы сравнивать всех ALS мутантов), которая соответствует позиции 569 ALS последовательности в свекле, ведущей к замещению аминокислоты "Trp" аминокислотой "Leu". Stougaard и др. не было показано для сахарной свеклы, что мутации в позиции 569 любого из ALS генов сахарной свеклы достаточно для того, чтобы получить приемлемый уровень толерантности к ALS-ингибиторным гербицидам. Кроме того, Stougaard и др. не регенировали или не обращались с растениями сахарной свеклы, содержащими одну мутацию, включая Trp → Leu мутацию в позиции 569 ALS сахарной свеклы.

Зная об этом, Stougaard и др. сконструировали трансформационный вектор растения, содержащего различные ALS гены для применения при трансформации растений. Однако до настоящего времени нет дополнительных данных, в частности, отсутствуют данные относительно влияния ALS-ингибиторных гербицидов на растения и/или на сельскохозяйственные области, включающие такие мутации в растениях *Beta vulgaris*, не были открыты этими или другими авторами как в генной инженерии, так и в мутантных растениях в течение более чем 20 лет после этого.

В WO 99/57965 вообще описаны растения сахарной свеклы, устойчивые к сульфонилмочевинам, и способы их получения путем EMS (этилметансульфонатного) мутагенеза. Однако отдельно от исследований, которые требуются для получения таких мутантов, в данной публикации не предоставляются такие растения и не описывается никаких локализаций в ALS генах, которые могут быть уместны, для получения мутантов, толерантных к ALS-ингибиторным гербицидам, не открыто никакой корреляции для агрономического применения для этого. Кроме того, существует большая вероятность того, что путем применения такого сильно мутагенного соединения как EMS могут быть вызваны дополнительные мутации в другом месте в геноме, которые могут привести к недостаткам вплоть до отсутствия фертильности и/или остановки роста полученных таким образом растений. Более того, в связи с их химическим взаимодействием с ДНК, применение EMS может иметь лакуны при индуцировании специфических мутаций, подобные превращению триплета TGG в TTG, поскольку EMS всегда превращает гуанозин в аденозин.

В некоторых видах сорняков, таких как амарантус (*Amaranthus*), мутация Trp 574 Leu может быть

обнаружена у популяций растений, которые были подвергнуты повторной экспозиции ALS-ингибиторным гербицидом. Мутанты Trp 574 Leu показывают высокий уровень толерантности по отношению к нескольким химическим классам ALS-ингибиторных гербицидов, таких как выбираемые из группы, включающей сульфонилмочевину и сульфониламинокарбонилтриазолиноны.

В WO 2008/124495 открыты ALS двойные и тройные мутанты. Согласно WO 2009/046334 были созданы специфические мутации в ALS гене. Однако агрономически используемые толерантные к гербицидам мутанты *Beta vulgaris*, содержащие такие мутации согласно WO 2009/046334, до сих не были получены.

Более того, с учетом того факта, например, что из сахарной свеклы получают около 20% производимого в мире сахара, также является в высокой степени желательным, чтобы имелись доступные растения сахарной свеклы, которые имеют преимущества в росте по сравнению с высокоэффективными сорняками. Таким образом, в высокой степени желательно иметь доступные, по отношению к ALS генам не трансгенные растения *Beta vulgaris*, включая растения сахарной свеклы, которые толерантны к ALS-ингибиторным гербицидам. Следовательно, имеется необходимость в таких не трансгенных растениях *Beta vulgaris*, в частности растений сахарной свеклы, которые толерантны к ALS-ингибиторным гербицидам, на агрономически эксплуатируемом уровне ALS-ингибиторных гербицидов.

Таким образом, техническая проблема должна быть подчинена этой потребности.

Данное изобретение направлено на удовлетворение этой потребности и обеспечивает решение этой технической проблемы с помощью ALS-ингибиторного гербицида, толерантного к растениям *Beta vulgaris* и их частям, содержащим мутацию эндогенного ацетолактатсинтазы (ALS) гена, в котором ALS ген кодирует ALS полипептид, содержащий аминокислоту, отличную от триптофана в позиции 569 ALS полипептида.

Семена согласно данному изобретению были депонированы в NCIMB, Aberdeen, Великобритания под номером NCIMB 41705 12 марта 2010 г.

Применяя различные способы разведения, могут быть впоследствии развиты высокоурожайные коммерческие сорта высококонкурентных на всех специфических рынках, обладающих добавленной сильной толерантностью к ALS-ингибиторным гербицидам, при использовании первоначально полученных мутантных растений.

Следует заметить, что используемое в тексте единственное число также охватывает и множественное число, если только в тексте четко не оговорено другое. Так, например, ссылка на реагент ("a reagent") охватывает один или более различных реагентов и ссылка на способ ("the method") охватывает ссылку на эквивалентные стадии и способы, которые известны специалистам и которые могут быть модифицированы или замещены способами описанными здесь.

Все публикации и патенты, цитированные в этом изобретении, включены в виде ссылки в это описание. В том случае, когда материалы, содержащиеся в ссылках, противоречат или не согласуются с этим описанием, описание исключает любой такой материал.

Если по-другому не оговорено, термин "как минимум", предшествующий серии элементов, следует понимать, как относящийся к каждому элементу серии. Специалисты могут опознать или способны установить, используя только рутинные эксперименты, много эквивалентов специфических воплощений изобретения, описанных здесь. Имеется в виду, что такие эквиваленты также включены в данное изобретение.

Во всем описании и в формуле изобретения за исключением случаев, когда контекст говорит о другом, слово "включает" и его вариации, такие как "включают" и "включая", следует понимать как включение указанного целого или стадии или группы целых или стадий, но не означает исключение любого другого целого или стадии или группы целых или стадий. Слово "включает" и его вариации, с одной стороны, и "содержит" и его аналоговые вариации, с другой стороны, могут использоваться взаимозаменяемо, не отдавая предпочтение любому из них.

В данном изобретении были получены растения свеклы, которые включают измененный эндогенный ALS ген (также отнесенный как "AHAS" ген), имеющий точку мутации в Trp 569 кодоне (по отношению к *Beta vulgaris* ALS аминокислотной последовательности для сравнения, показанной в SEQ ID NO: 2; это равняется позиции 574 *Arabidopsis thaliana* последовательности для сравнения, как показано в SEQ ID NO: 6), и точка мутации которой была получена в результате нескольких циклов селекции на специально выбранных ALS-ингибиторных гербицидах.

Принимая во внимание тот факт, что *B. vulgaris* растения данного изобретения были получены путем выделения спонтанных мутантных клеток растения, которые напрямую регенерируют до полностью фертильных растений свеклы, как описано здесь более детально, эти растения являются не трансгенными в той мере, как это касается ALS гена.

Кроме того, растения данного изобретения сами по себе, а также их потомство являются фертильными и поэтому могут оказаться полезными для целей размножения без любых дополнительных манипуляций, которые могут вызвать стресс, индуцированный дальнейшим изменением генетической основы. Такие растения, полученные согласно процедуре селекции, примененной здесь, могут напрямую применяться для того, чтобы создавать разнообразия свеклы и/или гибриды, предоставляющие агроно-

мически полезные уровни толерантности к ALS ингибиторным гербицидам, таким образом, давая возможность для мер инновативного контроля сорняков в местах произрастания свеклы.

Применяемый здесь термин "трансгенный" означает, что ген, который может быть на той же самой или на отличной частице был введен в растение с помощью подходящего биологического носителя, такого как *Agrobacterium tumefaciens*, или с помощью другого физического средства, такого как трансформация протопласта или бомбардировка частицами, и который ген может быть экспрессирован в окружении нового хозяина, в частности генетически модифицированного организма (ГМО).

В согласии с приведенным выше определением термин "не трансгенный" означает точно противоположное, т.е. что не было введения соответствующего гена с помощью подходящего биологического носителя или с помощью другого физического средства. Однако мутированный ген может быть перенесен с помощью опыления, или естественно, или с помощью процесса размножения с получением другого не трансгенного растения относительно этого специфического гена.

"Эндогенный" ген означает ген растения, который не был введен в растение с помощью техники генной инженерии.

Термин "последовательность", который применяется здесь, относится к нуклеотидной(ым) последовательности(ям), полинуклеотиду(ам), последовательности(ям) нуклеиновых кислот, нуклеиновой(ым) кислоте(ам), молекуле нуклеиновой кислоты, пептидам, полипептидам и белкам в зависимости от контекста, в котором использован термин "последовательность".

Термин "нуклеотидная(ые) последовательность(и)", "полинуклеотид(ы)", "последовательность(и) нуклеиновых кислот", "нуклеиновая(ые) кислота(ы)", "молекула нуклеиновой кислоты" применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к нуклеотидам как к рибонуклеотидам, так и дезоксирибонуклеотидам или к комбинациям обоих, в полимерной неразветвленной форме любой длины. Последовательности нуклеиновых кислот включают ДНК, цДНК, геномные ДНК, РНК, синтетические формы и смешанные полимеры, обе сенс и антисенс ветви спирали, или могут содержать неприродные или производные нуклеотидные основания, что может быть без затруднений определено специалистами.

В том случае, когда здесь применяют термин "полипептид" или "белок" (оба термина применяются здесь взаимозаменяемо), он означает пептид, белок или полипептид, который включает аминокислотную цепь заданной длины, в которой аминокислотные остатки соединены ковалентными пептидными связями. Однако пептидомиметики таких белков/полипептидов, в которых аминокислота(ы) и/или пептидная(ые) связь(и) были замещены функциональными аналогами, также охватываются изобретением, как и аминокислоты, отличные от тех 20, которые кодируют ген, такие как селеноцистеин. Пептиды, олигопептиды и белки могут быть объединены термином полипептиды. Термин полипептид также относится к и не исключает модификации полипептида, т.е. гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Такие модификации хорошо описаны в основополагающих текстах и в более детальных монографиях, а также в научно-исследовательской литературе. Полипептид (или белок) который предпочтительно имеется в виду, здесь представляет собой *B. vulgaris* ALS полипептид (или ALS белок) [последовательность SEQ ID NO: 2].

Аминокислотные замещения охватывают аминокислотные изменения, при которых один аминокислотный остаток замещается на отличающийся, встречающийся в природе аминокислотный остаток. Такие замещения можно классифицировать как "консервативные", при которых аминокислотный остаток, содержащийся в диком виде ALS белка, замещают на другой встречающийся в природе аминокислотный остаток похожего типа, например Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln или Phe↔Trp↔Tyr. Замещения, охватываемые данным изобретением, также могут быть "не консервативными", при которых аминокислотный остаток, содержащийся в диком виде ALS белка, замещают на аминокислотный остаток с отличающимися свойствами, такой как встречающийся в природе аминокислотный остаток из отличающейся группы (например, замещение заряженной или гидрофобной аминокислоты на аланин). Термин "похожие аминокислоты", применяемый здесь, относится к аминокислотам, которые имеют похожие аминокислотные боковые цепи, т.е. аминокислоты, которые имеют полярные не полярные или практически нейтральные боковые цепи. "Не похожие аминокислоты", применяемый здесь, относится к аминокислотам, которые имеют отличающиеся аминокислотные боковые цепи, например аминокислота с полярной боковой цепью является не похожей по отношению к аминокислоте с не полярной боковой цепью. Полярные боковые цепи обычно имеют тенденцию присутствия на поверхности белка, где они могут взаимодействовать с водным окружением, имеющимся в клетках ("гидрофильные" аминокислоты). С другой стороны, "не полярные" аминокислоты имеют тенденцию оставаться внутри центра белка, где они могут взаимодействовать с похожими не полярными соседями ("гидрофобные" аминокислоты"). К примерам аминокислот, которые содержат полярные боковые цепи, относятся аргинин, аспарагин, аспарат, цистеин, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин (все являются гидрофильными, за исключением цистеина, который гидрофобен). К примерам аминокислот, которые содержат не полярные боковые цепи относятся аланин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин и триптофан (все являются гидрофобными, за исключением глицина, который нейтрален).

Как правило, специалистам известно, исходя из их общих знаний и из контекста, что термины ALS,

ALSL, ANAS или ANASL применяют, когда имеются в виду как нуклеотидные последовательности или нуклеиновые кислоты, так и аминокислотные последовательности или полипептиды соответственно.

Термин "ген", который применяется здесь, охватывает полимерную форму нуклеотидов любой длины как рибонуклеотиды, так и дезоксирибонуклеотиды. Термин охватывает ДНК и РНК с двойной или одинарной прядью спирали. Он также охватывает известные типы модификации, например метилирование, "введение защитных групп", замещение одного или более естественно встречающихся нуклеотидов на его аналог. Предпочтительно ген охватывает кодирующую последовательность, которая кодирует приведенные здесь полипептиды. "Кодирующая последовательность" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая транскрибирована в мРНК и/или транслирована в полипептид, когда ее помещают и когда находится под контролем подходящей регулирующей последовательности. Границы кодирующей последовательности определяются трансляционным стартовым кодоном у 5'-концевой точки и трансляционным останавливающим кодоном у 3'-концевой точки. Кодирующая последовательность может включать, но не ограничивается им, мРНК, цДНК, рекомбинантную нуклеиново-кислотную последовательность или геномный ДНК, в то же время могут присутствовать интроны при определенных обстоятельствах.

В том случае, когда здесь применяют термин "Beta vulgaris", в сокращенном виде он имеет вид "B. vulgaris". Кроме того, здесь применяют термин "свекла". Эти три термина применяют взаимозаменяемо и под ними следует понимать все культивируемые виды Beta vulgaris, как определено в каталоге Ford-Lloyd (2005) Sources of genetic variation, Genus Beta; в книге Biancardi E., Campbell L.G., Skaracis G.N., De Biaggi M. (eds), Genetics and Breeding of Sugar Beet. Science Publishers, Enfield (NH), США, pp. 25-33. Аналогично, например, термин "Arabidopsis thaliana" имеет сокращенный вид "A. thaliana". Оба термина взаимозаменяемо применяются здесь.

Термин "позиция", применяемый согласно данному изобретению, означает или позицию аминокислоты в аминокислотной последовательности, приведенной здесь, или позицию нуклеотида внутри нуклеотидной последовательности, приведенной здесь. Термин "соответствующая", применяемый здесь, также означает, что позиция определяется не только номером предшествующих нуклеотидов/аминокислот.

Позиция данного нуклеотида в согласии с данным изобретением, которая может быть замещена, может варьироваться в зависимости от стираний или дополнительных нуклеотидов в другом месте ALS 5'-нетрансляционной области (UTR), включая промотор и/или любую другую регулирующую последовательность или ген (включая экзоны и интроны). Подобным образом, позиция данной аминокислоты в согласии с данным изобретением, которая может быть замещена, может варьироваться в зависимости от стираний или добавлений аминокислот где-нибудь в ALS полипептиде.

Под термином "соответствующая позиция" в согласии с данным изобретением понимают, что нуклеотиды/аминокислоты могут отличаться по указанному номеру, однако могут еще иметь похожие соседние нуклеотиды/аминокислоты. Упомянутые нуклеотиды/аминокислоты, которые могут быть замещены, стерты или добавлены, также охвачены термином "соответствующая позиция".

Для того чтобы определить соответствует ли нуклеотидный остаток или аминокислотный остаток в данной ALS-нуклеотидной/аминокислотной последовательности определенной позиции в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, специалисты могут использовать хорошо известные средства и способы, например выравнивание вручную или с применением компьютерных программ, таких как BLAST (Altschul и др., (1990), Journal of Molecular Biology, 215, 403-410), которые являются исследовательскими инструментами для базового локального отнесения Basic Local Alignment Search Tool or ClustalW (Thompson и др., (1994), Nucleic Acid Res., 22, 4673-4680), или любые другие подходящие программы, которые пригодны для генерирования выравнивания последовательностей.

Последовательность SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую Beta vulgaris дикого типа ALS. Последовательность SEQ ID NO: 2 представляет собой Beta vulgaris аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 1. Соответственно, кодон в позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 кодирует аминокислоту в позиции 569 (т.е. аминокислоту "Trp" согласно трехбуквенному коду или "W" согласно однобуквенному коду) последовательности SEQ ID NO: 2.

Другая возможность состоит в применении для определения того, находится ли нуклеотидный остаток или аминокислотный остаток в данной ALS-нуклеотидной/аминокислотной последовательности в определенной позиции в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, нуклеотидной последовательности, кодирующей A. thaliana дикого типа ALS, показанной в последовательности SEQ ID NO: 5. Последовательность SEQ ID NO: 6 представляет собой A. thaliana аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 5.

Соответственно кодон в позиции 1720-1722 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 кодирует аминокислоту в позиции 574 (т.е. аминокислоту "Trp" согласно трехбуквенному коду или "W" согласно однобуквенному коду) последовательности SEQ ID NO: 6.

В A. thaliana дикого типа ALS нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5, ис-

пользуется в качестве последовательности для сравнения (как это делают в большей части литературы по этому вопросу, и поэтому используется для создания возможности более легкого сравнения с такими известными последовательностями), кодон, кодирующий аминокислоту, которая отлична от триптофана, находящийся в позиции, соответствующей позиции 1720-1722 нуклеотидной последовательности *A. thaliana* ALS гена, показанной в последовательности SEQ ID NO: 5.

Однако последовательность SEQ ID NO: 1 является более предпочтительной в качестве нуклеотидной последовательности для сравнения, и последовательность SEQ ID NO: 2 является более предпочтительной аминокислотной последовательностью для сравнения во всех последующих открытиях.

Следующая таблица представляет обзор последовательностей для сравнения, использованных здесь, когда определяют позицию точки мутации в нуклеотидной последовательности или замещения в аминокислотной последовательности.

Последовательность SEQ ID NO:	Тип последовательности	Вид
1	Нуклеотидная последовательность	<i>B. vulgaris</i>
2	Аминокислотная последовательность	<i>B. vulgaris</i>
3	Нуклеотидная последовательность (мутированная)	<i>B. vulgaris</i>
4	Аминокислотная последовательность (мутированная)	<i>B. vulgaris</i>
5	Нуклеотидная последовательность	<i>A. thaliana</i>
6	Аминокислотная последовательность	<i>A. thaliana</i>

Так, при любом событии эквивалентную позицию определяют только путем выравнивания с последовательностью для сравнения, такой как SEQ ID NO: 1 или 5 (нуклеотидная последовательность) или SEQ ID NO: 2 или 6 (аминокислотная последовательность).

В связи с различиями между *B. vulgaris* дикого типа ALS геном и ALS геном, охватываемым *B. vulgaris* растением данного изобретения, ALS гены (или полинуклеотидные или нуклеотидные последовательности), охватываемые *B. vulgaris* растениями данного изобретения, могут также рассматриваться как "мутантные ALS гены", "мутантные ALS аллели", "мутантные ALS полинуклеотиды" или подобные. Так, по всему описанию термины "мутантный аллель", "мутантный ALS аллель", "мутантный ALS ген" или "мутантный ALS полинуклеотид" используются взаимозаменяемо.

Если по-другому здесь не оговорено, эти термины относятся к нуклеотидной последовательности, которая содержит кодон, кодирующий аминокислоту, отличную от триптофана, в позиции, которая соответствует позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности *B. vulgaris* ALS гена, показанной в последовательности SEQ ID NO: 1. Если сравнить по отношению к *A. thaliana* последовательности для сравнения, показанной в SEQ ID NO: 5, позиция кодона является 1720-1722.

Таким же образом, эти термины относятся к нуклеотидной последовательности, которая кодирует ALS белок, который имеет в позиции, соответствующей позиции 569 аминокислотной последовательности *Beta vulgaris* ALS белка, показанной в последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислоту, отличную от триптофана. Если сравнить по отношению к *A. thaliana* последовательности для сравнения, показанной в SEQ ID NO: 6, позиция является 574.

Одна "аминокислота, отличная от триптофана" (обозначенного как "Trp" согласно трехбуквенному коду или "W" эквивалентно согласно однобуквенному коду) охватывает любую встречающуюся в природе аминокислоту, отличную от триптофана. Эти встречающиеся в природе аминокислоты охватывают аланин (A), аргинин (R), аспарагин (N), аспартат (D), цистеин (C), глутамин (Q), глутамат (E), глицин (G), гистидин (H), изолейцин (I), лейцин (L), лизин (K), метионин (M), фенилаланин (F), пролин (P), серин (S), треонин (T), тирозин (Y) или валин (V).

Однако предпочтительно, когда аминокислота, отличная от триптофана (относящегося к группе нейтрально-полярных аминокислот), является аминокислотой с физико-химическими свойствами, отличными от свойств триптофана, т.е. относящейся к любой аминокислоте, проявляющей нейтрально-

неполярные, кислотные или основные свойства. Предпочтительно аминокислоту, отличную от триптофана, выбирают из группы, включающей аланин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, валин и аргинин. Более предпочтительно указанная аминокислота представляет собой нейтральную не полярную аминокислоту, такую как аланин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин или валин. Еще более предпочтительно указанная аминокислота представляет собой аланин, глицин, изолейцин, лейцин, валин. Наиболее предпочтительным является глицин и лейцин. Самым предпочтительным является лейцин.

В контрасте, если по особому не оговорено, термины "дикого типа аллель", "дикого типа ALS аллель", "дикого типа ALS ген" или "дикого типа ALS полинуклеотид" относятся к нуклеотидной последовательности, которая кодирует ALS белок, в котором отсутствует W569 замещение по отношению к последовательности SEQ ID NO: 2 (или W574 замещение по отношению к последовательности SEQ ID NO: 6). Эти термины также относятся к нуклеотидным последовательностям, включающим в позиции, соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности *B. vulgaris* ALS гена, показанного в последовательности SEQ ID NO: 1, кодону, кодирующему аминокислоту, отличную от триптофана.

Такой "дикого типа аллель", "дикого типа ALS аллель", "дикого типа ALS ген" или "дикого типа ALS полинуклеотид" может включать или не включать мутации, которые отличны от мутаций, которые вызывает W569 замещение.

По существу, что касается ALS гена, единственное различие между диким типом *B. vulgaris* растения и *B. vulgaris* растением данного изобретения состоит предпочтительно в том (и особенно), что в нем специфицирована позиция (в частности, позиция, соответствующая позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности *B. vulgaris* ALS гена, показанной в последовательности SEQ ID NO: 1), *B. vulgaris* растение данного изобретения содержит кодон, кодирующий аминокислоту, которая отлична от триптофана, предпочтительно кодон кодирует аминокислоту, как специфицировано в другом месте. Однако, как указано выше, могут существовать другие различия, такие как присутствие дополнительных мутаций между диким типом и мутантным ALS аллелем, как указано здесь. Пока эти другие различия неуместны, поскольку присутствуют различия, объясненные перед этим.

Следовательно, W569 замещение (или W574 замещение, в том случае, когда используют *A. thaliana* ALS аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 для сравнения) является результатом изменения кодона в позиции, соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1 (или в позиции, соответствующей позиции 1720-1722 нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5, соответственно). Предпочтительно замещение в позиции 569 является W→L замещением, в котором "L" кодируется любым из кодонов "CTT", "CTC", "CTA", "CTG", "TTA" или "TTG".

Более предпочтительно замещение в позиции 569 является W→L замещением, поскольку происходит превращение "G" нуклеотида в позиции, соответствующей позиции 1706 нуклеотидной последовательности в SEQ ID NO: 1 (или в позиции, соответствующей позиции 1721 нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5, соответственно), в "T" нуклеотид.

Соответственно, кодон в позиции, соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1 (или в позиции, соответствующей позиции 1720-1722 нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5, соответственно), меняется из "TGG" в "TTG". В то время как кодон "TGG" кодирует триптофан, кодон "TTG" кодирует лейцин.

В результате, в наиболее предпочтительном варианте данного изобретения обеспечивается *Beta vulgaris* растение, включающее нуклеотидную последовательность эндогенного ALS гена, кодон TTG (кодирующий лейцин) в позиции, соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности *B. vulgaris* ALS мутантного гена, показанную в последовательности SEQ ID NO: 1, эта нуклеотидная последовательность включает (или менее предпочтительно состоит из) последовательности SEQ ID NO: 3.

B. vulgaris растения, кодируемые ALS полипептидом, имеющим в позиции 569 аминокислотной последовательности *Beta vulgaris* ALS белка, показанного в последовательности SEQ ID NO: 2, отличную от триптофана аминокислоту, предпочтительно включают в нуклеотидной последовательности эндогенного ALS гена один кодон, кодирующий отличную от триптофана аминокислоту в позиции, соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности *B. vulgaris* ALS гена, показанного в последовательности SEQ ID NO: 1.

Термин *B. vulgaris* "ALS" или "AHAS" ген также включает *B. vulgaris* нуклеотидную последовательность, которая как минимум на 90, 95, 97, 98 или 99% идентична с *B. vulgaris* ALS нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 3, в которой эти на 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичные нуклеотидные последовательности включают в позиции, соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, один кодон, кодирующий отличную от триптофана аминокислоту.

Таким же образом, эти как минимум на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичные нуклеотидные последовательности кодируют ALS полипептид, включающий в позиции, соответствующей позиции 569 в последовательности SEQ ID NO: 2, отличную от триптофана аминокислоту. Упомянутые идентичные нук-

леотидные последовательности кодируют ALS белок, который сохраняет активность, как описано здесь, более предпочтительно таким образом закодированный ALS полипептид является толерантным к одному или нескольким ALS ингибиторным гербицидам, как описано здесь. Этот термин также включает аллельные варианты и гомологи кодированного ALS полипептида, который предпочтительно толерантен к одному или более ALS ингибиторных гербицидов, как описано здесь.

Для того чтобы определить имеет ли последовательность нуклеиновых кислот определенную степень идентичности с последовательностями нуклеиновых кислот данного изобретения, специалисты могут использовать хорошо известные средства и способы, например, выравнивание (выверка), или ручную или с использованием компьютерных программ, которые упомянуты далее ниже в связи с определением термина "гибридизация" и степени гомологии.

Например, BLAST, который означает основной инструмент поиска локального выравнивания (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410), может быть использован для поиска локальных выравниваний последовательностей. BLAST производит выравнивания как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей, для того чтобы определить схожесть последовательностей. В связи с локальной природой выравнивания BLAST является особенно полезным при определении точных пар или при идентификации похожих последовательностей. Фундаментальной единицей для выработки BLAST алгоритма является высокоапробированная сегментная пара (HSP). Одна HSP состоит из двух фрагментов последовательности произвольной, но одинаковой длины, чье выравнивание является локально максимальным и для которой степень выравнивания совпадает или превышает порог или отсечку, установленную пользователем. BLAST приближение состоит в том, чтобы посмотреть HSPs между стоящей под вопросом последовательностью и последовательностью из базы данных, для того чтобы определить статистическую важность любой найденной пары, и сделать доклад только для таких пар, которые удовлетворяют выбранным пользователем порогам важности. Параметр E устанавливает статистическую важность порога для рассматриваемых пар последовательностей из базы данных. E интерпретируется как верхний предел ожидаемой частоты возможности появления одной HSP (или ряда HSP) в контексте общего поиска в базе данных. О любой последовательности базы данных, чья пара удовлетворяет E, сообщается в программном выходе.

Аналогичная компьютерная техника, использующая BLAST (Altschul (1997), цит. выше; Altschul (1993), цит. выше; Altschul (1990), цит. выше) была применена для поиска идентичных или родственных молекул в нуклеотидной базе данных, такой как GenBank или EMBL. Этот анализ является более быстрым, чем основанная на мультиплетной мембране гибридизация. Кроме того, чувствительность компьютерного поиска можно модифицировать для того, чтобы определить, относится ли определенная пара к категории точно соответствующих или похожих. Основой для поиска является результат расчета, который определяется как

$$\frac{\% \text{ идентичности последовательности}}{\% \text{ максимума BLAST расчета}}$$

100

и он принимает во внимание как степень похожести двух последовательностей, так и длину пары последовательности. Например, при результате расчета 40 пара является точно соответствующей с ошибкой в пределах 1-2%; и при результате расчета 70 пара является точно соответствующей. Похожесть молекул обычно идентифицируется путем выбора таких, которые показывают результат расчета между 15 и 40, хотя более низкие результаты могут идентифицировать родственные молекулы.

Термин *V. vulgaris* "ALS" или "AHAS" полипептиды также охватывает аминокислотные последовательности, которые как минимум на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичны с ALS аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или 4, в которой эти как минимум на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичные с аминокислотной последовательностью содержат в позиции, соответствующей позиции 569 последовательности SEQ ID NO: 2, одну аминокислоту, отличную от триптофана. Указанная идентичная аминокислотная последовательность сохраняет активность ALS, как описано здесь, более предпочтительно ALS полипептид является толерантным к ALS ингибиторным гербицидам, как описано здесь.

Активность ALS, если потребуется, может быть измерена в соответствии с опытами, описанными в статье Singh, (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4572-4576.

Тем не менее, ALS нуклеотидные последовательности, имеющиеся в виду здесь и кодирующие ALS полипептиды, придают толерантность к одному или более ALS-ингибиторным гербицидам (или, наоборот, меньшую чувствительность к ALS-ингибиторному гербициду), как описано здесь. Это связано с точкой мутации, приводящей к аминокислотному замещению, как описано выше.

Соответственно, толерантность к одному ALS-ингибиторному гербициду (или, наоборот, меньшая чувствительность к ALS-ингибиторному гербициду) может быть измерена путем сравнения ALS активности, определенной для экстрактов клеток растений, которые содержат мутированные ALS последовательности, и растений, у которых отсутствуют мутированные ALS последовательности, в присутствии ALS ингибиторных гербицидов, подобно тому, как описано в статье Singh и др., (1988), [J. Chromatogr., 444, 251-261].

Однако более предпочтительные опыты по определению активности для ALS полипептидов, кодированных нуклеотидной последовательностью, которая включает кодон, кодирующий аминокислоту, отличную от триптофана в позиции, соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности *B. vulgaris* ALS гена, показанных в SEQ ID NO: 1, могут быть представлены, как показано ниже.

Кодирующую последовательность *Beta vulgaris* дикого типа и мутанта *B. vulgaris* растения клонируют, например, в Novagen pET-32a(+) векторах и векторы трансформируют, например, в *Escherichia coli* AD494 согласно инструкциям изготовителя. Бактерии, предпочтительно выращиваемые при температуре 37°C в среде при выбранном давлении, такой как LB-среда, содержащая 100 мг/л карбенциллина и 25 мг/л канамицина, индуцируют, например, 1 mM изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом при OD₆₀₀ предпочтительно около 0,6, культивированные около 16 ч предпочтительно при температуре 18°C и выделенные центрифугированием. Бактериальные пиллюли ресуспендируют в 100 mM буфера из фосфата натрия pH 7,0, содержащего 0,1 mM тиамин-пирофосфата, 1 mM MgCl₂ и 1 мкM FAD с концентрацией 1 г влажного веса на 25 мл буфера и разрушают, обрабатывая звуком. Необработанный экстракт белка, полученный после центрифугирования, используют для измерения ALS активности.

После этого проводят опыты с ALS, например, в микротитровальных пластинках с 96-выемками, применяя модификацию процедуры, описанной в статье Ray, (1984), *Plant Physiol.*, 75, 827-831. Реакционная смесь содержит предпочтительно 20 mM буфера из фосфата калия с pH 7,0, 20 mM пирувата натрия, 0,45 mM тиамин-пирофосфата, 0,45 mM MgCl₂, 9 мкM FAD, ALS энзим и различные концентрации ALS ингибиторов в конечном объеме около 90 мкл.

Опыты инициируют добавлением энзима и заканчивают предпочтительно через 75 мин инкубирования при температуре 30°C путем добавления 40 мкл 0,5M H₂SO₄. После выдерживания около 60 мин при комнатной температуре добавляют около 80 мкл раствора 1,4% α-нафтола и 0,14% креатина в 0,7M NaOH и дополнительно инкубируют около 45 мин при комнатной температуре, определяют поглощение при длине волны 540 нм. pI₅₀-значения для ингибирования ALS определяют, как описано в статье Ray, (1984), *Plant Physiol.*, 75, 827-831, используя программу для совпадения кривой XLFit Excel add-in version 4.3.1 фирмы ID Business Solutions Limited, Guildford, Великобритания.

В том случае, когда используют растения, ALS активность предпочтительно определяют в экстрактах клеток или экстрактах листьев дикого типа и в экстрактах клеток или экстрактах листьев полученного мутанта *B. vulgaris* в присутствии различных концентраций ALS ингибиторных гербицидов, предпочтительно сульфонилмочевинных гербицидов или сульфониламинокарбонил-триазолиноновых гербицидов, более предпочтительно в присутствии различных концентраций ALS ингибиторного гербицида "форамсульфуруна". ALS предпочтительно экстрагируют из листьев сахарной свеклы или из культур тканей сахарной свеклы, как описано в статье Ray, (1984), *Plant Physiol.*, 75, 827-831.

Предпочтительно, чтобы растения *B. vulgaris* данного изобретения были менее чувствительными к ALS ингибиторам, предпочтительно как минимум в 100 раз менее чувствительны, более предпочтительно в 500 раз, еще более предпочтительно в 1000 раз и наиболее предпочтительно в 2000 раз. Менее чувствительно, как используется здесь, наоборот может рассматриваться как "более толерантно" или "более устойчиво". Аналогично, "более толерантное" или "более устойчивое" можно наоборот рассматривать как "менее чувствительное".

Например, растения *B. vulgaris* данного изобретения и, в частности, растения *B. Vulgaris*, описанные в примерах приложения, являются/является как минимум в 2000 раз менее чувствительным к ALS-ингибиторному гербициду формасульфурону (представитель ALS-ингибиторного подкласса "сульфонилмочевинные гербициды") по сравнению с энзимами дикого типа.

Предпочтительно растения *B. vulgaris* данного изобретения менее чувствительны к различным представителям ALS-ингибиторных гербицидов, подобным сульфонилмочевинным гербицидам, сульфониламинокарбонилтриазолиноновым гербицидам и имидазолиноновым гербицидам. Сульфонилмочевинные гербициды и сульфониламинокарбонилтриазолиноновые гербициды, по отношению к которым указанные растения менее чувствительны, предпочтительно выбирают. В более предпочтительном варианте изобретения растения *B. vulgaris* данного изобретения менее чувствительны к ALS ингибиторному гербициду формасульфурону (сульфонилмочевинный гербицид) или к одному или к комбинации с одним или более ALS-ингибиторных гербицидов или из подкласса сульфонилмочевинных гербицидов или любого другого подкласса ALS-ингибиторных гербицидов.

Следовательно, растения *B. vulgaris* данного изобретения, которые предпочтительно менее чувствительны к ALS-ингибиторному гербициду, можно таким же образом охарактеризовать, как "более толерантные к ALS ингибитору" (т.е. растения, толерантные к ALS ингибитору).

Таким образом, растение "толерантное к ALS ингибитору" представляет собой растение, в частности растение *B. vulgaris*, которое более толерантно как минимум к одному ALS-ингибиторному гербициду на уровне, при котором он нормально ингибирует рост нормального растения дикого типа, предпочтительно ALS-ингибиторный гербицид контролирует растения нормального или дикого типа. Указанные растения нормального или дикого типа не включают в нуклеотидной последовательности никаких аллелей эндогенного ALS гена, кодона, кодирующего аминокислоту, отличную от триптофана в позиции,

соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности *B. vulgaris* ALS гена, показанной в последовательности SEQ ID NO: 1.

Указанная нуклеотидная последовательность может быть вообще также охарактеризована как нуклеотидная последовательность "толерантная к ALS-ингибиторному гербициду". Под "нуклеотидной последовательностью толерантной к ALS-ингибиторному гербициду" подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, которая включает нуклеотидную последовательность, содержащую как минимум одну мутацию, которая проявляется кодоном, кодирующим аминокислоту, отличную от триптофана, относительно ALS белка, который не содержит в позиции, соответствующей позиции 569 аминокислотной последовательности *B. vulgaris* ALS белка, показанной в SEQ ID NO: 2 аминокислоту, отличную от триптофана, в которой указанная как минимум одна мутация выражается в экспрессии как минимум одного ALS белка, чувствительного к ALS-ингибиторному гербициду. Под "толерантным к гербициду ALS белком" подразумевается, что ALS белок проявляет более высокую ALS активность по сравнению с ALS активностью дикого типа ALS белка в присутствии как минимум одного ALS-ингибиторного гербицида, для которого известно, что он вредит ALS активности, и при концентрации или уровне указанного гербицида, для которых известно, что они ингибируют ALS активность ALS белка дикого типа.

Аналогично, термины "ALS-ингибиторный(ые) гербицид(ы)" или просто "ALS-ингибитор(ы)" используются взаимозаменяемо. Как используется здесь, "ALS-ингибиторный гербицид" или "ALS-ингибитор" не означает ограничения одним гербицидом, который воздействует на активность ALS энзима. Так, если особо не оговорено или не следует из контекста, "ALS-ингибиторный гербицид" или "ALS-ингибитор" может быть одним гербицидом или смесью двух, трех, четырех или более гербицидов, известных специалистам, предпочтительно, как специализировано здесь, каждый из них воздействует на активность ALS энзима.

Неожиданно было обнаружено, что даже единственная точка мутации согласно данному изобретению предоставляет агрономически полезные и стабильные уровни толерантности к ALS-ингибиторным гербицидам растений *B. vulgaris*, а также их ростков, в частности, если установлена гомозиготность. По сравнению с толерантными к гербицидам растениями *Beta vulgaris* той же самой генетической основы, у которых присутствует только гетерозиготная такая мутация, толерантные к гербицидам растения *Beta vulgaris*, которые являются гомозиготными для мутации, показывают лучший агрономический уровень толерантности к ALS-ингибиторному гербициду.

Поэтому данное изобретение относится к толерантному к ALS-ингибиторному гербициду *Beta vulgaris* растению, имеющему мутацию эндогенного ацетолактатсинтазы (ALS) гена, в котором ALS ген кодирует ALS полипептид, содержащий аминокислоту, которая отлична от триптофана в позиции 569 ALS полипептида. Соответствующая мутация может быть представлена гетерозиготной и предпочтительно может быть единственной мутацией ALS гена. Более предпочтительно соответствующая мутация может быть гомозиготной, и еще более предпочтительно соответствующая мутация является гомозиготной, представленной в виде единственной мутации эндогенного ALS гена.

Оказалось совсем неожиданным, что достаточно только одной единичной мутации ALS гена в *Beta vulgaris*, поскольку, например, в WO 2010/037061 указано, что необходимы двойные или тройные мутанты в ALS гене для того, чтобы создать агрономически полезную толерантность к ALS-ингибиторным гербицидам.

Следовательно, растения *B. vulgaris* и их части, которые являются гетерозиготными, менее предпочтительны для мутации, но также охватываются данным изобретением и могут быть достаточными для некоторых схем применения и/или некоторых условий окружающей среды. Также данным изобретением охватываются растения, содержащие как минимум в одном аллеле эндогенного ALS гена один кодон, кодирующий аминокислоту, отличную от триптофана, предпочтительно лейцин в позиции, соответствующей позиции 1705-1707 нуклеотидной последовательности *B. vulgaris* ALS гена, показанной в SEQ ID NO: 1, и содержащую один (в случае диплоидии) или более других аллелей (в случае полиплоидии), имеющих одну или более других мутаций в эндогенном ALS гене.

Соответственно, в том случае, когда здесь используют термин "гетерозиготно" или "гетерозиготный", это означает, что растение данного изобретения имеет различные аллели в определенных местах, в частности в определенных местах ALS гена.

"Гомозиготно" или "гомозиготный" указывает на то, что растение данного изобретения имеет две копии одного и того же аллеля в разных прядях ДНК спирали, в частности в месте (локусе) ALS гена.

Как использовано здесь, если четко по-другому не оговорено, термин "растение" имеет в виду растение на любой стадии развития.

Предпочтительно, когда растение *Beta vulgaris* данного изобретения является ортоплоидным или аортоплоидным.

Ортоплоидное растение может предпочтительно быть гаплоидным, диплоидным, тетраплоидным, гексаплоидным, октаплоидным, декаплоидным или додекаплоидным, в то время как аортоплоидное растение может быть предпочтительно триплоидным или пентаплоидным.

Части растения могут быть присоединены к или отделены от всего не поврежденного растения. Такие части растения включают, но не ограничиваются ими, органы, ткани и клетки растения и предпочти-

тельно семена.

Соответственно, растение *B. vulgaris* данного изобретения является не трансгенным по отношению к эндогенному ALS гену. Действительно, чужие гены могут быть перенесены в растение путем генетической инженерии или обычными способами, такими как скрещивание. Указанные гены могут быть генами, придающими толерантность к гербицидам, предпочтительно придающие толерантность к гербицидам, отличную от толерантности к ALS-ингибиторным гербицидам, гены, улучшающие урожайность, гены, улучшающие устойчивость к биологическим организмам, и/или гены, относящиеся к модификации содержания.

Другой аспект данного изобретения относится к способу получения растения *Beta vulgaris* и его частей, который включает следующие стадии:

(a) экспонирование каллюсов предпочтительно из сахарной свеклы в присутствии около 10^{-7} - 10^{-9} М ALS-ингибиторного гербицида, предпочтительно форамсульфурана;

(b) отбор колоний клеток, которые могут расти в присутствии примерно до 3×10^{-6} М одного ALS-ингибиторного гербицида, предпочтительно форамсульфурана [CAS RN 173159-57-4];

(c) регенерирование ростков в присутствии ALS-ингибиторного гербицида, предпочтительно форамсульфурана;

(d) отбор регенерированных растеньиц с помощью ALS-ингибиторного гербицида, предпочтительно форамсульфурана, йодсульфурон-метил-натрия [CAS RN 144550-36-7] и/или смеси обоих, в которой доза форамсульфурана предпочтительна эквивалентна 7-70 г а.в./га и доза йодсульфурон-метил-натрия предпочтительно эквивалентна 1-10 г а.в./га (а.в. = активное вещество).

В другом аспекте регенерированные растеньица, полученные согласно приведенным выше стадиям (a)-(d), могут применяться для дальнейшего получения растений *Beta vulgaris* при использовании следующих стадий (e)-(m):

(e) вегетативное микроразмножение отдельных растеньиц со стадии

(d) для освобождения различных положительных вариантов путем установления клеточной линии (клонов) для каждого растеньица, толерантного к ALS-ингибиторному гербициду;

(f) длительное хранение каждого установленного клона в вегетативном состоянии;

(g) перенос клонированных растений каждого клона из места длительного хранения в теплицу;

(h) яровизация и адаптация в яровизационных камерах для индуцирования цветения;

(i) перенос яровизированных растений в помещения, где происходит рост (контролируется температура и освещение);

(j) отбор лучших по выделению пыльцы растений среди лучших цветущих клонов для скрещивания с выхолощенными растениями элитной, но чувствительной к ALS-ингибиторным гербицидам линии для того, чтобы избежать отрицательного воздействия соматоклональной вариации на генеративную фертильность (плодовитость) (мужскую и женскую) растеньиц со стадии (d);

(k) обратное скрещивание с элитной линией, как только фертильность будет восстановлена, и, наконец, доведение самих гетерозиготных растений до достижения гомозиготного состояния;

(l) производство тестовых скрещиваний с партнером, чувствительным к ALS-ингибиторным гербицидам, и собственным семям каждой линии с обратным скрещиванием для полевых оценок;

(m) применение агрохимически приемлемой дозы различных ALS-ингибиторных гербицидов для того, чтобы выбрать лучшую преобразованную линию, предпочтительно в ее гомозиготном состоянии.

Линии, полученные согласно приведенным выше стадиям (a)-(m), образуют основу для развития коммерческих многообразий, следуя процедурам, которые известны в сообществе, занимающемся размножением, и поддерживаны молекулярной техникой размножения (такой как поддерживаемое маркером размножение или поддерживаемая маркером селекция) для ускорения процесса и обеспечения правильной селекции растений для того, чтобы или получить мутацию в ее гомозиготной форме, или в случае, когда содержится одна или более мутаций в различных местах ALS-кодирующего эндогенного гена, провести правильную селекцию гетерозиготных растений, которые содержат как минимум в одном из аллелей W569 мутацию согласно данному изобретению (для обзора см. Bertrand C.Y. и др., (2008), *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 363, 557-572).

Каллюсы получают средствами и способами, которые общеизвестны специалистам, например, как описано в прилагаемых примерах.

Семена, которые были получены на приведенной выше стадии (m), находятся на хранении в NCIMB, Aberdeen, Великобритания, под номером NCIMB 41705.

Другой аспект данного изобретения относится к способу получения толерантных к гербициду *Beta vulgaris* растения и его частей, который включает (i) мутацию эндогенного гена ацетолактатсинтазы (ALS), при которой ALS ген кодирует ALS полипептид, содержащий аминокислоту, которая отлична от триптофана, в позиции 569 ALS полипептида, и (ii) дополнительную мутацию в эндогенном ALS гене, включающую следующие стадии:

(a) получение толерантного к ALS-ингибиторному гербициду растения *Beta vulgaris*, которое включает одну мутацию эндогенного гена ацетолактатсинтазы (ALS), в котором ALS ген кодирует ALS полипептид, который содержит аминокислоту, отличную от триптофана, в позиции 569 ALS полипептида

(родитель А);

(b) скрещивание родителя А с растением *Beta vulgaris* (родитель В), которое включает одну или более других мутаций в эндогенном ALS гене в позиции, отличной от аминокислотной позиции 569;

(c) получение потомства *Beta vulgaris*, которое является гетерозиготным для мутации ALS гена в аминокислотной позиции 569 и для одной или более других мутаций ALS гена, кодируемых родителем В;

(d) в которых процесс размножения контролируется

(i) применением маркера, поддерживающего размножение, и/или техники микропоследовательностей, и/или

(ii) применение агрономически приемлемых доз одного или более ALS-ингибиторных гербицидов, к которым потомство, созданное согласно стадии (c), является толерантным.

Соответственно, предусмотрено, что данное изобретение также относится к растениям *B. Vulgaris*, которые получают приведенными выше способами получения.

В одном не ограничивающем примере растения сахарной свеклы данного изобретения получают, осуществляя следующий не ограничивающий протокол. Не связанный с теорией тот же протокол можно применять для получения растений *B. Vulgaris*, отличных от сахарной свеклы.

Клеточные культуры сахарной свеклы были иницированы из ростков диплоидной сахарной свеклы генотипа 7T9044 (как описано, например, в реферате Alexander Dovzhenko, PhD Thesis, Title: "Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.)", Ludwig-Maximilians-Universitat Munchen, Германия, 2001).

Семена сахарной свеклы погружают на 60 с в 70%-й этанол, затем дважды промывают стерильной водой с 0,01% детергента и после этого инкубируют в течение 1-4 ч в 1%-м NaOCl отбеливателе. Затем семена промывают 3 раза стерильной H₂O и семена сохраняют в стерильной воде в течение ночи при температуре 4°C. Эмбрионы выделяют, используя пинцет и скальпель.

Свежеприготовленные эмбрионы помещают в 0,5%-й NaOCl на 30 мин и затем промывают 3 раза стерильной водой. После последней стадии промывания их помещают в свободную от гормонов MS агаровую среду (Murashige и Skoog (1962), *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497). Такие эмбрионы, которые развиваются в стерильные ростки, были использованы для иницирования регенерируемых культур сахарной свеклы.

Семядоли, а также гипокотили были разрезаны на сегменты длиной 2-5 мм и затем были культивированы на агаровой (0,8%) отвержденной MS среде, содержащей или 1 мг/л бензиламинопурина (BAP), или 0,25 мг/л тидиазулона (TDZ). Спустя 4 недели развившиеся ростковые культуры были перенесены на свежую агаровую среду того же состава и затем меняли культуру с месячным интервалом. Культуры выдерживали при температуре 25°C при сумеречном свете с циклом 12 ч/12 ч светло/темно.

После проведения 7-10 смен среды ростковые культуры, которые выращивались на среде, содержащей тидиазурон, сформировался явный тип каллюса, который быстро рос, был мягким и рыхлым. Цвет этого типа каллюса был желтоватый до слегка зеленого. Некоторые из этих рыхлых каллюсов разнообразно производили хлорофилл, содержащий исходные ростковые подобные эмбриону структуры. Эти быстрорастущие регенерируемые каллюсы были использованы для селекции мутантов сахарной свеклы, толерантных к ALS-ингибиторным гербицидам.

Когда этот тип каллюса подвергали экспозиции с 10⁻⁹ М сульфонилмочевины форамсульфурана (CAS RN 173159-57-4), клетки выжили, однако произвели менее чем 50% от той биомассы, которую дали их близнецы в среде, которая не содержала ингибитора. В среде, которая содержала 3×10⁻⁸ М форамсульфурана, не было обнаружено никакого роста. Для широкой шкалы экспериментов по селекции мутантов была выбрана концентрация 10⁻⁷ М форамсульфурана. Колонии выживших и растущих клеток пронумеровывают и переносят по прохождении 4-6 недель на свежую среду, содержащую 3×10⁻⁷ М ингибитора. Одна из этих клеточных колоний была способна расти не только при этой концентрации ингибитора, но даже в присутствии 3×10⁻⁶ М форамсульфурана. Из этого клона (SB574TL) ростки были регенерированы в присутствии ALS-ингибиторных гербицидов и затем ростки были перенесены в MS среду, содержащую 0,05 мг/л нафталинуксусной кислоты (NAA).

В течение 4-12 недель ростки формируют стебли, и после этого их переносят в стерильные контейнеры для растений, заполненные влажным, стерилизованным перлитом, поливают в половину силы MS неорганическими ингредиентами. Альтернативно, ростки переносят напрямую из агаровой твердой среды в почвенную смесь, содержащую перлит, в теплицу. В течение первых 10-15 дней после переноса в почву, содержащую субстрат, растения выдерживают в окружении с высокой влажностью воздуха. Во время этого и после этого, когда их выдерживают при нормальных условиях влажности в теплице, растения выдерживают в парнике при искусственном освещении (12 ч) при температуре 20±3°C/15±2°C день/ночь.

Спустя 3-5 недель регенерированные растения от полученных выше толерантных к форамсульфурану клеточных культур (SB574TL), а также от дикого типа клеточных культур обрабатывают форамсульфураном, йодсульфуран-метил-натрием (CAS RN 144550-3-7) и смесью обоих этих активных веществ. Тестируемые гербицидные дозы были эквивалентны 7-70 г а.в./га для форамсульфурана и 1-10 г

а.в./га для йодсульфурон-метил-натрия. Регенерированные растения и этой линии клеток были толерантны даже при самой высокой дозе гербицида (форамсульфурон, йодсульфурон-метил-натрий и их смеси в соотношении 7:1), тогда как самые низкие дозы уже убивали растения дикого типа.

Ростки тестируют следующим образом (не ограничивающим путем). Основываясь на линии SB574TL F2 и F3 семена экспериментальных гибридов, включающих устойчивые аллели в гетерозиготном состоянии, а также F4-F6 семена, содержащие мутантные аллели в гомозиготном состоянии, были посеяны в поле и обработаны форамсульфураном, йодсульфурон-метил-натрием, а также смесью обоих ALS-ингибиторных гербицидов, когда в растениях развились 3-5 розеточных листочков. Гомозиготные сеянцы оказались толерантными к смеси 35 г форамсульфурана/га + 7 г йодсульфурон-метил-натрия/га без остановки роста или любых видимых признаков повреждения. В некоторых случаях гетерозиготные линии обнаружили признаки остановки роста и некоторый хлороз листьев при этих расходных количествах, но они восстановились в течение 3-5 недель, тогда как обычные ростки сахарной свеклы были убиты ALS-ингибиторными гербицидами.

ALS мутанты были охарактеризованы следующим образом. Экстракция и анализ последовательности нуклеиновых кислот полученного мутанта был проведен фирмой LGC Genomics GmbH, Berlin, Германия согласно исправленным стандартным протоколам. Последовательность нуклеиновых кислот, полученная для мутанта сахарной свеклы SB574TL, показана в последовательности SEQ ID NO: 3. Последовательность SEQ ID NO: 4 представляет соответствующую аминокислотную последовательность, тогда как последовательность SEQ ID NO: 1 была получена после установления последовательности для дикого типа растения сахарной свеклы, которая была взята в качестве исходного материала. Последовательность SEQ ID NO: 2 представляет соответствующую аминокислотную последовательность дикого типа сахарной свеклы.

Сравнение всех этих последовательностей показывает, что существует только одна мутация в позиции 574, но не существует никаких других изменений в любой другой части этого эндогенного ALS гена.

Последовательность SEQ ID No1

(1)

ATGGCGGCTACCTTCACAAACCCCAACATTTCCCTTCCCTCAACTCCATTAACCAAAACC

Последовательность SEQ ID No 3

(1)

ATGGCGGCTACCTTCACAAACCCCAACATTTCCCTTCCCTCAACTCCATTAACCAAAACC

Последовательность SEQ ID No1

(61)

CTAAATCCCAATCTTCCATCTCTTCAACCCCTCCCTTTTCCACCCCTCCCAAAACCCCA

Последовательность SEQ ID No 3

(61)

CTAAATCCCAATCTTCCATCTCTTCAACCCCTCCCTTTTCCACCCCTCCCAAAACCCCA

Последовательность SEQ ID No 1

(121)

ACTCCACTCTTTCACCGTCCCTCCAAATCTCATCCTCCCAATCCCAAAATCATCCGCC

Последовательность SEQ ID No 3

(121)

ACTCCACTCTTTCACCGTCCCTCCAAATCTCATCCTCCCAATCCCAAAATCATCCGCC

Последовательность SEQ ID No 1

(181)

ATTAAACACAAACTCAAGCACCTTCTCTCCAGCTATTGAAGATTCATCTTTGTTTCT

Последовательность SEQ ID No 3

(181)

ATTAAACACAAACTCAAGCACCTTCTCTCCAGCTATTGAAGATTCATCTTTGTTTCT

Последовательность SEQ ID No1

(241)

CGATTTGGCCCTGATGAACCCAGAAAAGGGTCCGATGTCCCTCGTTGAAGCTCTTGAGCGT

Последовательность SEQ ID No 3

(241)

CGATTTGGCCCTGATGAACCCAGAAAAGGGTCCGATGTCCCTCGTTGAAGCTCTTGAGCGT

Последовательность SEQ ID No1

(301)

GAAGGTGTTACCAATGTGTTTGTCTACCCCTGGTGGTGCATCTATGGAAATCCACCAAGCT

Последовательность SEQ ID No 3
(301)
GAAGGTGTTACCAATGTGTTTGCTTACCTGGTGGTGCATCTATGGAATCCACCAAGCT

Последовательность SEQ ID No1
(361)
CTCACACGCTCTAAAACCATCCGCAATGTCTCCCTCGCCATGAACAAGGCGGGGTTTTTC
Последовательность SEQ ID No 3
(361)
CTCACACGCTCTAAAACCATCCGCAATGTCTCCCTCGCCATGAACAAGGCGGGGTTTTTC

Последовательность SEQ ID No1
(421)
GCCGCCGAGGGATATGCTAGAGCTACTGGAAAGGTTGGTGTCTGCATTGCGACTTCTGGT
Последовательность SEQ ID No 3
(421)
GCCGCCGAGGGATATGCTAGAGCTACTGGAAAGGTTGGTGTCTGCATTGCGACTTCTGGT

Последовательность SEQ ID No1
(481)
CCTGGTGCTACCAACCTCGTATCAGGTCTTGCTGACGCTCTCCTTGATTCTGTCCCTCTT
Последовательность SEQ ID No 3
(481)
CCTGGTGCTACCAACCTCGTATCAGGTCTTGCTGACGCTCTCCTTGATTCTGTCCCTCTT

Последовательность SEQ ID No1
(541)
GTTGCCATCACTGGCCAAGTTCACGCCGTATGATTGGCACTGATGCTTTTCAGGAGACT
Последовательность SEQ ID No 3
(541)
GTTGCCATCACTGGCCAAGTTCACGCCGTATGATTGGCACTGATGCTTTTCAGGAGACT

Последовательность SEQ ID No1
(601)
CCAAATTGTTGAGGTGACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATTTAGTTTTGGATGTAGAG
Последовательность SEQ ID No 3
(601)
CCAAATTGTTGAGGTGACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATTTAGTTTTGGATGTAGAG

Последовательность SEQ ID No1
(661)
GATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCCTTTTTTTAGCTAATTCTGGTAGGCCTGGACCT
Последовательность SEQ ID No 3
(661)
GATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCCTTTTTTTAGCTAATTCTGGTAGGCCTGGACCT

Последовательность SEQ ID No1
(721)
GTTTTGATTGATCTTCCTAAAGATATTACGAGCAATTGGTTGTTCTGATTGGGATAGG
Последовательность SEQ ID No 3
(721)
GTTTTGATTGATCTTCCTAAAGATATTACGAGCAATTGGTTGTTCTGATTGGGATAGG

Последовательность SEQ ID No1
(781)
CCTTTTAAGTTGGTGGGTATATGTCTAGGCTGCCAAAGTCCAAGTTTTTCGACGAATGAG
Последовательность SEQ ID No 3
(781)
CCTTTTAAGTTGGTGGGTATATGTCTAGGCTGCCAAAGTCCAAGTTTTTCGACGAATGAG

Последовательность SEQ ID No1
(841)
GTTGGACTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTTGATGAGTGAGTCGAAGAAGCCTGTCTTGAT
Последовательность SEQ ID No 3
(841)
GTTGGACTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTTGATGAGTGAGTCGAAGAAGCCTGTCTTGAT

Последовательность SEQ ID No1
(901)
GTGGGAGGTGGGTGTTGAATTCTAGTGAGGAGTTGAGGAGATTTGTTGAGTTGACAGGG
Последовательность SEQ ID No 3
(901)
GTGGGAGGTGGGTGTTGAATTCTAGTGAGGAGTTGAGGAGATTTGTTGAGTTGACAGGG

Последовательность SEQ ID No1
(961)
ATTCCGGTGGCTAGTACTTTGATGGGGTTGGGTCTTACCCTTGTAATGATGAACTGTCT

036006

Последовательность SEQ ID No 3
(961)
ATTCCGGTGGCTAGTACTTTGATGGGGTTGGGTCTTACCCTTGAATGATGAACTGTCT

Последовательность SEQ ID No1
(1021)
CTTCATATGTTGGGGATGCACGGGACTGTTTATGCCAATTATGCGGTGGATAAGGCGGAT
Последовательность SEQ ID No 3
(1021)
CTTCATATGTTGGGGATGCACGGGACTGTTTATGCCAATTATGCGGTGGATAAGGCGGAT

Последовательность SEQ ID No1
(1081)
TTGTTGCTGCTTTCGGGGTTAGGTTTGGATGATCGTGTGACCGGGAAGCTCGAGGCGTTT
Последовательность SEQ ID No 3
(1081)
TTGTTGCTGCTTTCGGGGTTAGGTTTGGATGATCGTGTGACCGGGAAGCTCGAGGCGTTT

Последовательность SEQ ID No1
(1141)
GCTAGCCGTGCTAAGATTGTCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAACAAG
Последовательность SEQ ID No 3
(1141)
GCTAGCCGTGCTAAGATTGTCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAACAAG

Последовательность SEQ ID No1
(1201)
CAGCCCCATGTGCCATTTGTGCTGATGTTAAATTGGCATTGCGGGGTATGAATAAGATT
Последовательность SEQ ID No 3
(1201)
CAGCCCCATGTGCCATTTGTGCTGATGTTAAATTGGCATTGCGGGGTATGAATAAGATT

Последовательность SEQ ID No1
(1261)
CTGGAGTCTAGAATAGGGAAGCTGAATTTGGATTTCTCAAGTGGAGAGAAGAATTAGGT
Последовательность SEQ ID No 3
(1261)
CTGGAGTCTAGAATAGGGAAGCTGAATTTGGATTTCTCAAGTGGAGAGAAGAATTAGGT

Последовательность SEQ ID No1
(1321)
GAGCAGAAAGGAATTCCTCACTGAGTTTTAAGACATTTGGGGATGCAATTCCTCCACAA
Последовательность SEQ ID No 3
(1321)
GAGCAGAAAGGAATTCCTCACTGAGTTTTAAGACATTTGGGGATGCAATTCCTCCACAA

Последовательность SEQ ID No1
(1381)
TATGCCATTACAGGTGCTTATGATGAGTTGACCAATGGTAATGCTATTATAAGTACTGGTGT
Последовательность SEQ ID No 3
(1381)
TATGCCATTACAGGTGCTTATGATGAGTTGACCAATGGTAATGCTATTATAAGTACTGGTGT

Последовательность SEQ ID No1
(1441)
GGGCAGCACCAAATGTGGGCTGCGCAGCATTACAAGTACAGAAACCCCTCGCCAATGGCTG
Последовательность SEQ ID No 3
(1441)
GGGCAGCACCAAATGTGGGCTGCGCAGCATTACAAGTACAGAAACCCCTCGCCAATGGCTG

Последовательность SEQ ID No1
(1501)
ACCTCTGGTGGGTTGGGGCTATGGGGTTGGGCTACCAGCCGCCATTGGAGCTGCAATT
Последовательность SEQ ID No 3
(1501)
ACCTCTGGTGGGTTGGGGCTATGGGGTTGGGCTACCAGCCGCCATTGGAGCTGCAATT

Последовательность SEQ ID No1
(1561)
GCTCGACCAGATGCAGTGGTTGTCGATATTGATGGGGATGGCAGTTTTATTGAATGTT
Последовательность SEQ ID No 3
(1561)
GCTCGACCAGATGCAGTGGTTGTCGATATTGATGGGGATGGCAGTTTTATTGAATGTT

Последовательность SEQ ID No1
(1621)
CAAGAGTTGGCTACAATTAGGGTGAAAACTCCAGTTAAGATAATGCTGCTAAACAAT

Последовательность SEQ ID No 3
(1621)
CAAGAGTTGGCTACAATTAGGGTGAAAACTCCCAGTTAAGATAATGCTGCTAAACAAT

Последовательность SEQ ID No1
(1681)
CAACATTTAGGTATGGTTGTCCAATGGGAAGATAGGTTCTATAAAGCTAACCGGGCACAT
Последовательность SEQ ID No 3
(1681)
CAACATTTAGGTATGGTTGTCCAATGGGAAGATAGGTTCTATAAAGCTAACCGGGCACAT

Последовательность SEQ ID No1
(1741)
ACATACCTTGGAAACCCTTCCAAATCTGCTGATATCTCCCTGATATGCTCAAATTCGCT
Последовательность SEQ ID No 3
(1741)
ACATACCTTGGAAACCCTTCCAAATCTGCTGATATCTCCCTGATATGCTCAAATTCGCT

Последовательность SEQ ID No1
(1801)
GAGGCATGTGATATTCCTTCTGCCCGTGTAGCAACGTGGCTGATTTGAGGGCCGCCATT
Последовательность SEQ ID No 3
(1801)
GAGGCATGTGATATTCCTTCTGCCCGTGTAGCAACGTGGCTGATTTGAGGGCCGCCATT

Последовательность SEQ ID No1
(1861)
CAAACAATGTTGGATACTCCAGGGCGTACCTGCTCGATGTGATTGTACCGCATCAAGAG
Последовательность SEQ ID No 3
(1861)
CAAACAATGTTGGATACTCCAGGGCGTACCTGCTCGATGTGATTGTACCGCATCAAGAG

Последовательность SEQ ID No1
(1921)
CATGTGTTGCCTATGATTCGAAGTGGTCCCGTTTCAAGGATACCATTACAGAGGGTGAT
Последовательность SEQ ID No 3
(1921)
CATGTGTTGCCTATGATTCGAAGTGGTCCCGTTTCAAGGATACCATTACAGAGGGTGAT

Последовательность SEQ ID No1
(1981)
GGAAGAACCTCTTATTGA
Последовательность SEQ ID No 3
(1981)
GGAAGAACCTCTTATTGA

Последовательность SEQ ID No. 2
(1)
MAATFTNPTFSPSSTPLTKLKSQSSISSTLPFSTPPKPTPLFHRPLQISSSQSHKSSA
Последовательность SEQ ID No. 4
(1)
MAATFTNPTFSPSSTPLTKLKSQSSISSTLPFSTPPKPTPLFHRPLQISSSQSHKSSA

Последовательность SEQ ID No. 2
(61)
IKTQTQAPSSPAIEDSSFVSRFGPDEPRKGSVDLVEALEREVTVNFAYPGGASMEIHQA
Последовательность SEQ ID No. 4
(61)
IKTQTQAPSSPAIEDSSFVSRFGPDEPRKGSVDLVEALEREVTVNFAYPGGASMEIHQA

Последовательность SEQ ID No. 2
(121)
LTRSKTIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGKVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLDSVPL
Последовательность SEQ ID No. 4
(121)
LTRSKTIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGKVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLDSVPL

Последовательность SEQ ID No. 2
(181)
VAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSRPGP
Последовательность SEQ ID No. 4
(181)
VAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSRPGP

Последовательность SEQ ID No. 2
(241)
VLIDLPKDIQQQLVDPDWDRPFKGGYMSRLPKSKFSTNEVGLLEQIVRLMSESKPVLV

Последовательность SEQ ID No. 4
(241)
VLIDLPKDIQQQLVVPDWRPFKLGGYMSRLPKSKFSTNEVGLLEQIVRLMSESKKPVLY

Последовательность SEQ ID No. 2
(301)
VGGGCLNSSEELRRFVELTGIPVASTLMGLGSPCNDELSLHMLGMHGTYYANYAVDKAD

Последовательность SEQ ID No. 4
(301)
VGGGCLNSSEELRRFVELTGIPVASTLMGLGSPCNDELSLHMLGMHGTYYANYAVDKAD

Последовательность SEQ ID No. 2
(361)
LLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSIKADVKLALRGMNKI

Последовательность SEQ ID No. 4
(361)
LLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSIKADVKLALRGMNKI

Последовательность SEQ ID No. 2
(421)
LESRIGKLNLDLFSKWREELGEQKKEFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVDELDTNGNAIISTGV

Последовательность SEQ ID No. 4
(421)
LESRIGKLNLDLFSKWREELGEQKKEFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVDELDTNGNAIISTGV

Последовательность SEQ ID No. 2
(481)
GQHQMWAQAQHYKYRNPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPDVAVVVIDDGDGGSFIMNV

Последовательность SEQ ID No. 4
(481)
GQHQMWAQAQHYKYRNPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPDVAVVVIDDGDGGSFIMNV

Последовательность SEQ ID No. 2
(541)
QELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPSSADIFPDMMLKFA

Последовательность SEQ ID No. 4
(541)
QELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPSSADIFPDMMLKFA

Последовательность SEQ ID No. 2
(601)
EACDIPSARVSNVADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVPMIPSGAGFKDTITEGD

Последовательность SEQ ID No. 4
(601)
EACDIPSARVSNVADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVPMIPSGAGFKDTITEGD

Последовательность SEQ ID No. 2
(661)
GRTSY-

Последовательность SEQ ID No. 4
(661)
GRTSY-

Однако вообще предпочтительно, чтобы растения *B. vulgaris* данного изобретения и их части были пригодны для агрономического использования. "Агрономическое использование" означает, что растения *B. vulgaris* plants и их части являются полезными для агрономических целей. Например, растения *B. vulgaris* должны служить цели быть полезными для производства сахара, производства биотоплива (такого как производство биогаза, биобутанола и этанола), производства этанола, производства бетаина и/или уридина. Термин "агрономическое использование" в том случае, когда он применяется здесь, также включает, что растения *B. vulgaris* данного изобретения являются предпочтительно менее чувствительными к ALS ингибиторным гербицидам, предпочтительно как минимум в 100 раз менее чувствительными, более предпочтительно как минимум в 500 раз менее чувствительными, еще более предпочтительно как минимум в 1000 раз менее чувствительными и наиболее предпочтительно как минимум в 2000 раз менее чувствительными. К ALS-ингибиторным гербицидам относится один или более из описанных здесь, предпочтительно им является форамсульфурон сам по себе или в комбинации с одним или более другими ALS-ингибиторными гербицидами или из подкласса сульфонилмочевинных гербицидов или из любого другого подкласса ALS-ингибиторных гербицидов, более предпочтителен форамсульфурон в комбинации с другим сульфонилмочевинным гербицидом и/или ALS ингибитором из подкласса сульфо-ниламинокарбонилтриазиолинонов.

Предпочтительно агрономически используемые растения *B. vulgaris*, более предпочтительно растения сахарной свеклы данного изобретения являются полностью фертильными (плодовитыми), более предпочтительно имеют фертильность дикого типа. Фертильность является самым важным свойством растений *B. vulgaris* данного изобретения для того, чтобы быть агрономически используемыми.

Примером агрономически используемого растения *B. vulgaris* является сахарная свекла. Растения

сахарной свеклы данного изобретения при культивировании на площади одного гектара дают урожай (около 80000-90000 сахарных свекел), из которого можно предпочтительно получить как минимум 4 т сахара.

Альтернативно, растение сахарной свеклы данного изобретения предпочтительно имеет содержание сахара 15-20%, предпочтительно как минимум 17% для того, чтобы быть агрономически используемым. Таким образом, растения сахарной свеклы, которые имеют содержание сахара 15-20%, предпочтительно как минимум 17%, являются предпочтительным воплощением данного изобретения.

Растения данного изобретения могут быть идентифицированы, используя любой способ генотипного анализа. Генотипное определение растений включает применение техники, такой как изоферментный электрофорез, полиморфизм ограниченных длин фрагментов (RFLPs), случайно расширенные полиморфные ДНК (RAPDs), произвольно проведенная полимеразная цепная реакция (AP-PCR), аллель-зависимая полимеразная цепная реакция (AS-PCR), ДНК расширенные "отпечатки пальцев" (DAF), характеризующиеся последовательностью расширенных областей (SCARs), полиморфизм расширенных длин фрагментов (AFLPs), повторение простых последовательностей (SSRs), которое также обозначают как "микросателлиты". Дополнительные композиции и способы для анализа генотипа растений, которые предусмотрены здесь, включают способы, открытые в патентах США №№ 2004/0171027, 2005/02080506 и 2005/0283858.

Другим аспектом данного изобретения является применение растения *Beta vulgaris*, описанного здесь, и/или снимаемых в виде урожая частей растения или материала для размножения, описанного здесь, для получения/размножения растений *Beta vulgaris*. Способы получения/размножения растений *B. vulgaris* plants описаны здесь. Такие способы получения/размножения можно применять для создания растений *B. vulgaris* данного изобретения, которые дополнительно включают новые свойства растений, такие как толерантность к стрессам, таким как, но не ограничиваясь ими, стресс от засухи, жары, холода или стресс от содержания соли в почве и т.п.

Еще один другой аспект данного изобретения предусматривает применение толерантных к гербицидам растений *Beta vulgaris*, которые описаны здесь, и/или снимаемых в виде урожая частей или материала для размножения, полученных из них, в способе отбора для селекции растений, толерантных к ALS-ингибиторным гербицидам.

Лучшее понимание данного изобретения и многих его преимуществ можно получить из следующих примеров, предлагаемых только для иллюстративных целей, но ни в коем случае никак не ограничивающих охват данного изобретения.

Пример 1. Выделение мутанта.

Клеточные культуры сахарной свеклы были получены из рассады диплоидной сахарной свеклы генотипа 7T9044 (как описано, например, в реферате Alexander Dovzhenko, PhD Thesis, Title: "Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.)", Ludwig-Maximilians-Universität München, Германия, 2001).

Семена сахарной свеклы погружают на 60 с в 70%-й этанол, затем дважды промывают стерильной водой с 0,01% детергента и после этого инкубируют в течение 1-4 ч в 1%-м NaOCl отбеливателе. Затем семена промывают 3 раза стерильной H₂O и семена сохраняют в стерильной воде в течение ночи при температуре 4°C. Эмбрионы выделяют, используя пинцет и скальпель.

Свежеприготовленные эмбрионы помещают в 0,5%-й NaOCl на 30 мин и затем промывают 3 раза стерильной H₂O. После последней стадии промывания их помещают в свободную от гормонов MS агаровую среду (Murashige и Skoog (1962), *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497). Такие эмбрионы, которые развиваются в стерильные сеянцы, были использованы для инициирования регенерируемых культур сахарной свеклы.

Семядоли, а также гипокотили были разрезаны на сегменты длиной 2-5 мм и затем были культивированы на агаровой (0,8%) отвержденной MS среде, содержащей или 1 мг/л бензиламинопурина (BAP), или 0,25 мг/л тидиазулона (TDZ). Спустя 4 недели развившиеся ростковые культуры были перенесены на свежую агаровую среду того же состава и затем получали субкультуру с месячным интервалом. Культуры выдерживали при температуре 25°C при сумеречном свете с циклом 12 ч/12 ч светло/темно.

Через 7-10 дней субкультуры ростковых культур, которые выращивались на среде, содержащей тидиазурон, сформировали явный тип каллюса, который быстро рос, был мягким и рыхлым. Цвет этого типа каллюса был желтоватый до слегка зеленого. Некоторые из этих рыхлых каллюсов сообразно производили хлорофилл, содержащий исходные ростковые, подобные эмбриону структуры. Эти быстрорастущие регенерируемые каллюсы были использованы для селекции мутантов сахарной свеклы, толерантных к ALS-ингибиторным гербицидам.

Когда этот тип каллюса подвергали экспозиции с 10⁻⁹ М ALS-ингибиторного гербицида форамсульфулона (относящегося к подклассу сульфонилмочевин, см. выше), клетки выжили, однако произвели менее чем 50% от той биомассы, которую дали их близнецы в среде, которая не содержала ингибитора. В среде, которая содержала 3×10⁻⁸ М форамсульфулона, не было обнаружено никакого роста. Для широкой шкалы экспериментов по селекции мутантов была выбрана концентрация 10⁻⁷ М форамсульфулона. Ко-

лонии выживших и растущих клеток пронумеровывали и переносили по прохождении 4-6 недель на свежую среду, содержащую 3×10^{-7} М ингибитора. Одна из этих клеточных колоний была способна расти не только при этой концентрации ингибитора, но даже в присутствии 3×10^{-6} М форамсульфурана.

Из этого клона (SB574TL) ростки были регенерированы в присутствии ALS-ингибиторных гербицидов и затем ростки были перенесены в MS-среду, содержащую 0,05 мг/л нафталинуксусной кислоты (NAA).

В течение 4-12 недель ростки формируют стебли, после этого их переносят в стерильные контейнеры для растений, заполненные влажным, стерилизованным перлитом, поливают в половину силы MS неорганическими ингредиентами. Альтернативно, растение переносят напрямую из агаровой твердой среды в почвенную смесь, содержащую перлит, в теплицу. В течение первых 10-15 дней после переноса в почву, содержащую субстрат, растения выдерживают в окружении с высокой влажностью воздуха. Во время этого и после этого, когда их выдерживают при нормальных условиях влажности в теплице, растения выдерживают в парнике при искусственном освещении (12 ч) при температуре $20 \pm 3^\circ\text{C} / 15 \pm 2^\circ\text{C}$ день/ночь.

Спустя 3-5 недель регенерированные растения от полученных выше толерантных к форамсульфурану клеточных культур (SB574TL), а также от дикого типа клеточных культур обрабатывают форамсульфураном, йодсульфуран-метил-натрием (CAS RN 144550-3-7) и смесью обоих этих активных веществ. Тестируемые гербицидные дозы были эквивалентны 7-70 г а.в./га для форамсульфурана и 1-10 г а.в./га для йодсульфуран-метил-натрия. Регенерированные растения этой толерантной линии клеток были толерантны даже при самой высокой дозе гербицида (форамсульфуран, йодсульфуран-метил-натрий и их смеси в соотношении 7:1), тогда как уже самые низкие дозы убивали растения дикого типа.

Пример 2. Тестирование отпрысков.

Основываясь на линии SB574TL F2 и F3 семена экспериментальных гибридов, включающих устойчивые аллели в гетерозиготном состоянии, а также F4-F6 семена, содержащие мутантные аллели в гомозиготном состоянии, были посеяны в поле и обработаны форамсульфураном, йодсульфуран-метил-натрием, а также смесью обоих ALS-ингибиторных гербицидов, когда в растениях развились 3-5 розеточных листочков. Гомозиготные сеянцы оказались толерантными к смеси 35 г форамсульфурана/га + 7 г йодсульфуран-метил-натрия/га без остановки роста или любых видимых признаков повреждения. В некоторых случаях гетерозиготные линии обнаружили признаки остановки роста и некоторый хлороз листьев при этих расходных количествах, но они восстановились в течение 3-5 недель, тогда как обычные сеянцы сахарной свеклы были убиты ALS-ингибиторными гербицидами.

Пример 3. Молекулярная характеристика полученного мутанта сахарной свеклы (SB574TL).

Экстракция и анализ последовательности нуклеиновых кислот полученного мутанта был проведен фирмой LGC Genomics GmbH, Berlin, Германия согласно исправленным стандартным протоколам.

Последовательность нуклеиновых кислот, полученная для мутанта сахарной свеклы SB574TL, показана последовательностью SEQ ID NO: 3 с последовательностью SEQ ID NO: 4, представляющей соответствующую аминокислотную последовательность, тогда как последовательность SEQ ID NO: 1 была получена после установления последовательности для дикого типа растения сахарной свеклы, которая была взята в качестве исходного материала. Последовательность SEQ ID NO: 2 представляет соответствующую аминокислотную последовательность дикого типа сахарной свеклы.

Сравнение всех этих последовательностей ясно показывает, что существует только одна мутация в позиции 574, но не существует никаких других изменений в любой другой части этого эндогенного ALS гена этого материала из растения сахарной свеклы.

Пример 4. Измерение активности энзима.

Кодирующая последовательность *Beta vulgaris* дикого типа и W574L-мутантного (SB574TL) ALS генов были клонированы в Novagen pET-32a(+) векторы и векторы трансформированы в *Escherichia coli* AD4 94 согласно инструкциям изготовителя. Бактерии выращивают при температуре 37°C в LB-среде (Luria-Broth-среде), содержащей 100 мг/л карбенициллина и 25 мг/л канамицина, индуцированного 1 mM изопропил-b-D-тиогактопиранозидом при поглощении OD_{600} , равном 0,6, культивируют в течение 16 ч при температуре 18°C и выделяют урожай центрифугированием. Бактериальные пиллюли ресуспендируют в 100 mM буфере из фосфата натрия pH 7,0, содержащем 0,1 mM тиаминфосфата, 1 mM MgCl_2 , и 1 мкМ FAD при концентрации 1 г влажного веса на 25 мл буфера и разрушают, обрабатывая звуком. Сырой экстракт белка, полученный после центрифугирования, был использован для измерений активности ALS.

Опыты с ALS проводили на микротитровальных пластинках с 96-углублениями, используя модификацию процедуры, которая описана в работе Ray (1984). Реакционная смесь содержала 20 mM фосфатно-калиевого буфера pH 7,0, 20 mM пирувата натрия, 0,45 mM тиамин-пирофосфата, 0,45 mM MgCl_2 , 9 мкМ FAD, ALS энзим и различные концентрации ALS-ингибиторов в конечном объеме 90 мкл. Опыты иницировались добавлением энзима и останавливались через 75 мин инкубирования при температуре 30°C путем добавления 40 мкл 0,5M H_2SO_4 . После выдерживания в течение 60 мин при комнатной температуре добавляют 80 мкл раствора 1,4% α -нафтола и 0,14% креатинина в 0,7M NaOH и дополнительно

инкубируют 45 мин при комнатной температуре и определяют поглощение при длине волны 540 нм. rI_{50} -значения для ингибирования ALS определяют, как описано в статье Ray (1984), используя программу XLFit Excel add-in version 4.3.1 для подгонки кривой фирмы ID Business Solutions Limited.

В сумме мутантный энзим был как минимум в 2000 раз менее чувствительным по отношению к ALS-ингибитору форамсульфуруну чем дикого типа энзим.

Пример 5. Измерение активности энзима (из растений).

ALS был экстрагирован из культур листьев сахарной свеклы или тканей сахарной свеклы, как описано в статье Ray (1984), Plant Physiol., 75:827-831.

ALS активность была определена в экстрактах листьев дикого типа сахарной свеклы и экстрактах листьев, полученных из SB574TL в присутствии различных концентраций форамсульфуруна, как описано в примере 4.

В сумме мутантный энзим был как минимум в 2000 раз менее чувствительным по отношению к ALS-ингибитору форамсульфуруну чем дикого типа энзим.

Пример 6. Полевые испытания при применении гомозиготных толерантных к ALS-ингибиторным гербицидам растений сахарной свеклы.

Основываясь на SB574TL F4-F6 семена, включающие мутантные аллели эндогенного ALS гена в гомозиготном состоянии, были использованы для дальнейшего тестирования.

Семена растений гомозиготных SB574TL мутантных растений и семена традиционного сорта KLARINA (обычно используемый для сравнения, чувствительный к ALS-ингибиторам сорт сахарной свеклы, не имеющий соответствующих мутаций в позиции 569 его ALS белка) были посеяны в поле и выращены до различных стадий роста согласно BBCH стандарту (как описано в монографии "Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen", 2nd edition, 2001, ed. Uwe Meier, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft).

После этого растения были обработаны соответствующими ALS-ингибиторными гербицидами, как специфицировано ниже в табл. 1, которые были идентичны гербицидам, применявшимся во время процедуры селекции. Расходное количество воды, использованной во время различных применений, составляло 200 л/га.

Через 8, 14 и 28 дней (как указано в табл. 1) после применения (ДПП = дней после применения) соответствующего(их) ALS-ингибиторного(ых) гербицида(ов), оценивают повреждение фитотоксичность/фито у различных растений сахарной свеклы в соответствии со шкалой от 0 до 100%.

В этом контексте "0%" означает "нет фитотоксичности/фито" и "100%" означает, что все растения убиты (в таблице под фито имеется в виду фитотоксичности/фито).

Виды характеристик	Сорт KLARINA	Сахарная свекла на основе SB574TL	Сорт KLARINA	Сахарная свекла на основе SB574TL	Сорт KLARINA	Сахарная свекла на основе SB574TL	
Стадия во время обработки	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	
Отношение	%фито	% фито	% фито	% фито	% фито	% фито	
Интервал от обработки до измерения	8 дней	8 дней	14дней	14 дней	28 дней	28 дней	
Активное вещество	г.а.в./га						
Форамсульфурон	25 г/га	85	0	83	0	86	0
Форамсульфурон	50 г/га	90	0	92	0	94	0
Йодсульфурон-метил-натрий	7 г/га	90	0	97	0	100	0

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Bayer CropScience AG and KWS SAAT AG
 <120> Мутанты *Beta vulgaris*, толерантные к ALS ингибиторным гербицидам
 <130> BCS 09-1021 / KWS 0172 EP
 <160> 6
 <170> патент в версии 3.3
 <210> 1
 <211> 1998
 <212> ДНК
 <213> *Beta vulgaris*

<400> 1
 atggcggcta ccttcacaaa cccaacattt tccccttcct caactccatt aaccacaaacc 60
 ctaaaatccc aatcttccat ctcttcaacc ctcccctttt caaccctccc caaaacccca 120
 actccaactct ttcaaccgtcc cctccaaatc tcactctccc aatcccacaa atcatccgcc 180
 attaaaaaac aaactcaagc acctctctct ccagctatg aagattcatc ttctgtttct 240
 cgatttgccc ctgatgaacc cagaaaaggg tccgatgccc tctgtgaagc tcttgagcgt 300
 gaagggtgta ccaatgtggt tgcttaccct ggtggtgcat ctatggaaat ccaccaagct 360
 ctcacacgct ctaaaacatc ccgcaatgtc ctccctcgcc atgaacaagc cgggggtttc 420
 gccgcccagg gatatgctag agctactgga aagggtggtg tctgattgc gactctgtgt 480
 cctggtgcta ccaacctcgt atcaggctct gctgacgctc tcttgattc tgtccctctt 540
 gttgccatca ctggccaagt tccaacgctg atgattggca ctgatgcttt tcagagagact 600
 ccaatgtgtg aggtgacaag gtctattact aagcataatt atttagtttt ggatgtagag 660
 gatattccta gaattgttaa ggaagccttt tttttagcta attctgtag gcctggacct 720
 gtttgattg atcttctaa agatattcag cagcaattgg ttgttctga ttgggatagg 780
 ccttttaagt tgggtgggta tatgtctagg ctgccaagt ccaagtttc gacgaatgag 840
 gttggacttc ttgagcagat tgtgaggttg atgagtgagt cgaagaagcc tgtcttgat 900
 gtgggaggtg ggtgtttgaa ttctagttag gagttgagga gattgttga gttgacaggg 960
 attccggtgg ctagtacttt gatggggttg gggtcttacc cttgtaatga tgaactgtct 1020
 ctcatatgt tggggatgca cgggactggt tatgccaatt atgcccgtgga taaggcggat 1080
 ttgttgcttg ctttcggggt taggtttgat gatcgtgta ccgggaaact cgaggcgttt 1140
 gctagccctg ctaagattgt gcatattgat attgactctg ctgagattgg gaagaacaag 1200
 cagccccatg tgtccatttg tctgatggtt aaattggcat tgcggggtat gaataagatt 1260
 ctggagtcta gaatagggaa gctgaatttg gatttctcca agtgagagaga agaattaggt 1320
 gagcagaaga aggaattccc actgagtttt aagacatttg gggatgcaat tctccacaa 1380
 tatgccaatc aggtgcttga tgagttgacc aatgtaatg ctattataag tactggtggt 1440
 gggcagcacc aaatgtgggc tgcgcagcat tacaagtaca gaaacctcg ccaatggctg 1500
 acctctggtg ggttgggggc tatggggttt gggctaccag ccgccattgg agctgcagtt 1560
 gctcgaccag atgcagtggt tctcgatatt gatggggatg gcagttttat tatgaatgt 1620
 caagagtttg ctacaattag ggtgaaaaat ctcccagtta agataatgct gctaaacaat 1680
 caacatttag gtatggttgt ccaatgggaa gataggttct ataaagctaa ccgggcaat 1740
 acataccttg gaaaccttc caaatctgct gatattctcc ctgatatgct caaattcgtc 1800
 gaggcattg atattccttc tgcctgtggt agcaactgag ctgatttgag ggcgccatt 1860
 caaacaatgt tggatactcc aqqccqctac ctgctcagat tgattgtacc qcatcaagaq 1920
 catgtgtgac ctatgattcc aagtgggtcc ggtttcaagg ataccattac agagggtgat 1980
 ggaagaacct cttattga 1998

<210> 2
 <211> 665
 <212> PPT
 <213> *Beta vulgaris*

<400> 2
 Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
 20 25 30
 Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
 35 40 45
 Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
 50 55 60
 Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu

036006

85 90 95

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

Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg
115 120 125

Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly
130 135 140

Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly
145 150 155 160

Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp
165 170 175

Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile
180 185 190

Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser
195 200 205

Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg
210 215 220

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

Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro
245 250 255

Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro
260 265 270

Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val
275 280 285

Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly
290 295 300

Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly
305 310 315 320

Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn
325 330 335

Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala
340 345 350

Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
355 360 365

Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
370 375 380

Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
385 390 395 400

Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly
405 410 415

Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe
420 425 430

Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu
435 440 445

Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
450 455 460

Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val
465 470 475 480

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
485 490 495

Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
500 505 510

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
515 520 525

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala
530 535 540

Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn

036006

<220>
 <221> MISC_СВОЙСТВА
 <222> (569)..(569)
 <223> замещение триптофана на лейцин
 <400> 4
 Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
 20 25 30
 Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
 35 40 45
 Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
 50 55 60
 Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
 85 90 95
 Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly
 100 105 110
 Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg
 115 120 125
 Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly
 130 135 140
 Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp
 165 170 175
 Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile
 180 185 190
 Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser
 195 200 205
 Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg
 210 215 220
 Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro
 225 230 235 240
 Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro
 245 250 255
 Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro
 260 265 270
 Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val
 275 280 285
 Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly
 290 295 300
 Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly
 305 310 315 320
 Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn
 325 330 335
 Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala
 340 345 350
 Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg
 355 360 365
 Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala
 370 375 380
 Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys
 385 390 395 400
 Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly
 405 410 415
 Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe
 420 425 430

036006

Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu
 435 440 445

Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln
 450 455 460

Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val
 465 470 475 480

Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro
 485 490 495

Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu
 500 505 510

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val
 515 520 525

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala
 530 535 540

Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn
 545 550 555 560

Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
 565 570 575

Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
 580 585 590

Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
 595 600 605

Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
 610 615 620

Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
 625 630 635 640

His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
 645 650 655

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
 660 665

<210> 5
 <211> 2013
 <212> DHK
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5
 atggcgggcg caacaacaac aacaacaaca tcttcttcga tctctctctc caccacaaca 60
 tctctctctc cctccaatc accattacca atctccagat tctccctccc attctcccta 120
 aacccaaca aatcctctc ctctccccc cgccgggta tcaaatccag ctctccctcc 180
 tccatctccg ccgtgctcaa cacaccacc aatgtcacia caactccctc tccaacaaa 240
 cctaccaaac ccgaacatt catctcccga ttctctccag atcaaccccg caaaggcgct 300
 gatctctcgc tcgaagcttt agaacgtcaa ggcgtagaaa cagtattcgc ttaccctgga 360
 ggtgcatcaa tggagattca ccaagcctta acccgcctct cctcaatccg taacgtcctt 420
 cctcgtcacg aacaaggagg tgtattcgca gcagaaggat acgctcgatc ctccaggtaa 480
 ccaggtatct gtatagccac ttcaggctcc ggagctacaa atctcgttag cggattagcc 540
 gatgcgttgt tagatagtgt tctctctgta gcaatcacag gacaagtccc tctcgtatg 600
 attggtacag atgcgtttca agagactccg attgtgagg taacgcgttc gattacgaag 660
 cataactatc ttgtgatgga tgttgaagat atccctagga ttattgagga agctttcttt 720
 ttactactt ctggtagacc tggacctggt ttggtgatg ttctaaaga tattcaaca 780
 cagcttgcca ttctaatg ggaacaggct atgagattac ctggttata gtctaggatg 840
 cctaacctc ccgaagattc tcatttgag cagattgta ggttgattc tgagtctaag 900
 aagcctgtgt tgtatgttg tgggtgtgt ttgaattota gcgatgaatt ggtaggttt 960
 gttgagctta cgggatccc tgttcgagt acgttgatgg ggotgggato ttatcctgt 1020
 gatgatgagt tgtcgttaca tatgcttga atgcatgga cgggtatgc gaattacgct 1080
 gtggagcata gtgatttgtt gttggcgttt ggggtgaggt ttgatgatc cgtcacgggt 1140
 aagcttgagg cttttgctag tagggctaa attgttcaata ttgatattga ctctctgag 1200
 attggaaga ataagactcc tcatgtgtct gtgtgtggtg atgtcaagct ggctttgcaa 1260
 gggatgaata aggttcttga gaaccgagct gaggagctta agcttgattt tggagtttgg 1320
 aggaatgagt tgaacgtaca gaaacagaag ttctcgttga gotttaagac gtttgggaa 1380
 gctattcctc cacagtatgc gattaaggtc cttgatgagt tgactgatgg aaaagccata 1440
 ataagtactg gtgtcgggca acatcaaatg tggcgggcgc agttctacaa ttacaagaag 1500

036006

```

ccaaggcagt ggctatcacc aggagccctt ggagctatgg gttttggaact tcctgtgccc 1560
attggagcgt ctgttgctaa cctgatgca atagttgtgg atattgacgg agatggaagc 1620
tttataatga atgtgcaaga gctggccaca atccgtgtag agcaacttcc agtgaagata 1680
ctcttattaa acaaccagca tcttggcatg gttatgcaat gggaagatcg gttctacaag 1740
gtaaccggag ctcacacatt tctcggggat cgggctcagg aggaagagat attcccgaac 1800
atgttgctgt ttgcagcagc ttgcgggatt ccagcggcga gggtgacaaa gaaagcagat 1860
ctccgagaag ctattcagac aatgctggat acaccaggac cttacctgtt ggatgtgatt 1920
tgtccgacc aagaacatgt gttgccgatg atcccgatg gtggcacttt caacgatgtc 1980
ataacggaag gagatggccg gattaatac tga 2013

<210> 6
<211> 670
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6
Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe
1 5 10 15

Ser Thr Lys Pro Ser Pro Ser Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser
20 25 30

Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser
35 40 45

Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ile Ser Ala
50 55 60

Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys
65 70 75 80

Pro Thr Lys Pro Glu Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro
85 90 95

Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
100 105 110

Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
115 120 125

Ala Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
130 135 140

Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys
145 150 155 160

Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
165 170 175

Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile
180 185 190

Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
195 200 205

Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu
210 215 220

Val Met Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe
225 230 235 240

Leu Ala Thr Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys
245 250 255

Asp Ile Gln Gln Gln Leu Ala Ile Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg
260 265 270

Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His
275 280 285

Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu
290 295 300

Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe
305 310 315 320

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

Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His
340 345 350

Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu

```

```

355                360                365

Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala
370                375                380

Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu
385                390                395

Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys
405                410                415

Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu
420                425                430

Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys
435                440                445

Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro
450                455                460

Gln Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile
465                470                475

Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr
485                490                495

Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala
500                505                510

Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
515                520                525

Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn
530                535                540

Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
545                550                555

Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp
565                570                575

Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala
580                585                590

Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys
595                600                605

Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala
610                615                620

Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile
625                630                635

Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Thr
645                650                655

Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr
660                665                670

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Толерантное к ALS-ингибиторным гербицидам растение *Beta vulgaris* и его органы, которые включают мутацию эндогенного гена ацетолактатсинтазы (ALS) в положении, соответствующем положению 1705-1707 эталонной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, причем указанный мутантный ген ALS кодирует ALS полипептид, который как минимум на 95% идентичен ALS полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, причем указанный ALS полипептид содержит аминокислоту, отличную от триптофана и выбранную из аланина, глицина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, пролина, валина или аргинина, в положении 569, а растение *Beta vulgaris* является как минимум в 500 раз менее чувствительным к ALS ингибитору по сравнению с растением дико-го типа, не содержащим указанную мутацию.

2. Растение *Beta vulgaris* и его органы согласно п.1, в которых ALS полипептид содержит в положении 569 аминокислоту лейцин, а эндогенный ALS ген имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

3. Растение *Beta vulgaris* и его органы согласно п.1, в которых указанная мутация является гомозиготной.

4. Растение *Beta vulgaris* и его органы согласно п.1, где ALS-ингибиторные гербициды выбраны из группы, состоящей из сульфонилмочевинных гербицидов, сульфониламинокарбонилтриазолиноновых

гербицидов, имидазолиновых гербицидов, триазолопиримидиновых гербицидов и пиримидинил(тио)бензоатных гербицидов и их комбинаций.

5. Органы растения *Beta vulgaris* согласно п.1, представляющие собой семена.

6. Способ получения растения *Beta vulgaris* и его органов по п.1, который включает следующие стадии:

(a) экспонирование каллюсов *B. vulgaris* в присутствии около 10^{-7} - 10^{-9} М ALS-ингибиторного гербицида;

(b) отбор колоний клеток, которые могут расти в присутствии до 3×10^{-6} М ALS-ингибиторного гербицида;

(c) регенерирование ростков в присутствии ALS-ингибиторного гербицида;

(d) отбор регенерированных растеньиц с помощью ALS-ингибиторного гербицида, которые содержат мутацию эндогенного гена ацетолактатсинтазы (ALS) в положении, соответствующем положению 1705-1707 эталонной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, причем указанный мутантный ген ALS кодирует ALS полипептид, который как минимум на 95% идентичен ALS полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, причем указанный ALS полипептид содержит аминокислоту, отличную от триптофана и выбранную из аланина, глицина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, пролина, валина или аргинина, в положении 569 ALS.

7. Способ по п.6, в котором ALS-ингибиторный гербицид на стадиях (a), (b) и/или (c) является форамсульфураном.

8. Способ по п.6 или 7, в котором на стадии (d) в качестве ALS-ингибиторного гербицида используют форамсульфуран, йодсульфуран-метил-натрий и/или их комбинацию.

9. Способ по п.8, в котором доза форамсульфурана эквивалентна 7-70 г а.в./га, а доза йодсульфуран-метил-натрия эквивалентна 1-10 г а.в./га.

