

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036108**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

<b>(45)</b> Дата публикации и выдачи патента <b>2020.09.29</b>	<b>(51)</b> Int. Cl. <i>C12N 15/82</i> (2006.01) <i>C12N 9/88</i> (2006.01) <i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>A01H 5/00</i> (2006.01) <i>A01H 5/10</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01)
<b>(21)</b> Номер заявки <b>201691453</b>	
<b>(22)</b> Дата подачи заявки <b>2008.04.03</b>	

**(54) РЕЗИСТЕНТНЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ РАСТЕНИЯ BRASSICA И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

<b>(31)</b> 60/910,008	<b>(56)</b> US-A1-20050283858
<b>(32)</b> 2007.04.04	WO-A1-2006024351
<b>(33)</b> US	US-A1-20040171027
<b>(43)</b> 2017.03.31	
<b>(62)</b> 200970925; 2008.04.03	
<b>(71)(73)</b> Заявитель и патентовладелец: <b>БАСФ СЕ (DE); ВАЙТЕРРА, ИНК.</b> <b>(CA)</b>	
<b>(72)</b> Изобретатель: <b>Яо Кенинг, Поттс Дерек, Мэйлс Дарил</b> <b>(CA)</b>	
<b>(74)</b> Представитель: <b>Медведев В.Н. (RU)</b>	

**(57)** Изобретение относится к трансгенным или нетрансгенным растениям с повышенными уровнями устойчивости к АНАС-ингибирующим гербицидам. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим мутанты большой субъединицы синтазы ацетогидроксикислот (АНАС), экспрессирующим векторам, к растениям, содержащим полинуклеотиды, кодирующие субъединицы АНАSL, содержащие одну, две или больше мутаций, к растениям, содержащим один, два или более полипептидов субъединицы АНАSL с одной мутацией, к способам получения и применения указанных объектов и к способам борьбы с сорняками.

**B1**

**036108**

**036108**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка притязает на приоритет на основании предварительной заявки на выдачу патента США № 60/910008, поданной 4 апреля 2007 года, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к резистентным к гербицидам растениям Brassica и новым полинуклеотидным последовательностям, которые кодируют белки большой субъединицы синтазы ацетогидроксикислоты растений Brassica дикого типа и резистентных к имидазолинонам, к семенам и способам применения таких растений.

### Уровень техники

Синтаза ацетогидроксикислоты (AHAS; EC 4.1.3.18, также известная как ацетолактатсинтаза или ALS) является первым ферментом, который катализирует биохимический синтез

аминокислот с разветвленной цепью валина, лейцина и изолейцина (Singh (1999) «Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine», в Plant Amino Acid, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. New York, New York, pp. 227-247). AHAS является местом действия пяти структурно отличающихся семейств гербицидов, включая сульфонилмочевины (Tan et al. (2005) Pest Manag. Sci. 61: 246-57; Mallory-Smith и Retzinger (2003) Weed Technology 17: 620-626; "LaRossa и Falco (1984) Trends Biotechnol. 2: 158-161), имидазолиноны (Shaner et al. (1984) Plant Physiol. 76: 545-546), триазолопиримидины (Subramanian и Gerwick (1989) «Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines», в Biocatalysis in Agricultural Biotechnology, Whitaker, J.R. и Sonnet, P.E. eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 277-288), Tan et al. (2005) Pest Manag. Sci. 61: 246-57; Mallory-Smith и Retzinger (2003) Weed Technology 17: 620-626, сульфониламинокарбонилтриазолиноны (Tan et al. (2005) Pest Manag. Sci. 61: 246-57; Mallory-Smith и

Retzinger (2003) Weed Technology 17: 620-626). Гербициды на основе имидазолинона и сульфонилмочевины широко используются в настоящее время в сельском хозяйстве благодаря их эффективности при очень низких нормах внесения и относительной нетоксичности для животных. Посредством ингибирования активности AHAS указанные семейства гербицидов предотвращают дальнейший рост и развитие чувствительных растений, включая многие виды сорняков. Некоторыми примерами коммерчески доступных имидазолиноновых гербицидов являются PURSUIT® (имазетапир), SCEPTER® (имзахин) и ARSENAL® (имзапир). Примерами гербицидов на основе сульфонилмочевин являются хлорсульфурон, метсульфуронметил, сульфометуронметил, хлоримуронэтил, тифенсульфуронметил, трибенуронметил, бенсульфуронметил, никоссульфурон, этаметсульфуронметил, римсульфурон, трифлусульфуронметил, триасульфурон, примисульфуронметил, циносульфурон, амидосульфурон, флузасульфурон, имазосульфурон, пиразосульфуронэтил и галосульфурон.

Вследствие высокой эффективности и низкой токсичности имидазолиноновые гербициды являются предпочтительными для применения посредством опрыскивания сверху большой площади поверхности, занятой растительностью. Возможность распылять гербицид сверху над большой площадью растительности снижает затраты, связанные с посадкой и поддержанием насаждений, и снижает необходимость в подготовке места перед применением таких химикатов. Опыление сверху требуемого толерантного вида также дает возможность достигать максимального потенциально возможного урожая требуемого вида благодаря отсутствию конкурирующих видов. Однако возможность применения такой методики опыления сверху зависит от присутствия резистентного к имидазолинону вида нужных растений на опыляемой площади.

Среди основных сельскохозяйственных культур некоторые виды бобовых, такие как соя, резистентны к имидазолиноновым гербицидам от природы, благодаря своей способности быстро метаболизировать гербицидные соединения (Shaner и Robinson (1985) Weed Sd. 33: 469-471). Другие культуры, такие как кукуруза (Newhouse et al. (1992) Plant Physiol. 100: 882886) и рис (Barrett et al. (1989) Crop Safeners for Herbicides, Academic Press, New York, pp. 195-220) в определенной степени чувствительны к имидазолиноновым гербицидам. Различная чувствительность к имидазолиноновым гербицидам зависит от химической природы конкретного гербицида и разного метаболизма соединения из токсичной в нетоксичную форму в каждом растении (Shaner et al. (1984) Plant Physiol. 76: 545-546; Brown et al., (1987) Pestic. Biochem. Physiol. 27: 24-29). Другие физиологические различия растений, такие как всасывание и передвижение вещества, также играют важную роль в чувствительности (Shaner и Robinson (1985) Weed Sd. 33: 469-471).

Растения, резистентные к имидазолинонам, сульфонилмочевинам и триазолопиримидинам, были успешно получены с использованием мутагенеза семени, микроспоры, пыльцы и каллуса Zea mays, Arabidopsis thaliana, Brassica napus (т.е. канолы), Glycine max, Nicotiana tabacum и Oryza sativa (Sebastian et al. (1989) Crop. Sci. 29: 1403-1408; Swanson et al., 1989 Theor. Appl. Genet. 78: 525-530; Newhouse et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 83: 65-70; Sathasivan et al. (1991) Plant Physiol. 97: 1044-1050; Mourand et al. (1993) J. Heredity 84: 91-96; патент США № 5545822). Во всех случаях резистентность придает один не полностью доминантный ядерный ген. Четыре резистентных к имидазолинону растений пшеницы также были ранее

выделены после мутагенеза семян *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse et al. (1992) *Plant Physiol.* 100: 882-886). Исследования наследования подтвердили, что резистентность придает один не полностью доминантный ген. На основании исследований аллелей авторы пришли к выводу, что мутации в четырех идентифицированных линиях находились в одном и том же локусе. Один из генов резистентности культурного сорта Fidel назван FS-4 (Newhouse et al. (1992) *Plant Physiol.* 100: 882-886).

В результате компьютерного моделирования трехмерной конформации комплекса АНАС-ингибитор спрогнозировано наличие нескольких аминокислот в предполагаемом кармане связывания ингибитора в качестве сайтов, индуцированные мутации в которых вероятно могли бы придавать избирательную резистентность к имидазолиномам (Ott et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 359-368). Растения пшеницы, полученные с некоторыми из таких рационально сконструированных мутаций в предполагаемых сайтах связывания фермента АНАС действительно обладали специфичной резистентностью к одному классу гербицидов (Ott et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 359-368). О резистентности растений к имидазолиновым гербицидам также сообщалось в нескольких патентах. В патентах США № 4761373, 5331107, 5304732, 6211438, 6211439 и 6222100 в общем описано применение измененного гена АНАС для того, чтобы вызвать резистентность к гербицидам у растений, и, в частности, описаны некоторые резистентные к имидазолиномам линии кукурузы. В патенте США № 5013659 описаны растения, обладающие резистентностью к гербицидам вследствие мутаций, по меньшей мере, в одной аминокислоте в одном или нескольких консервативных областях. Описанный в указанной публикации мутации кодируют либо перекрестную резистентность к имидазолиномам и сульфонилмочевинам, либо специфичную резистентность к сульфонилмочевинам, но специфичная к имидазолиномам резистентность не описана. В патенте США № 5731180 и патенте США № 5767361 обсуждается изолированный ген, имеющий одну аминокислотную замену в аминокислотной последовательности АНАС однодольного растения дикого типа, который приводит к специфичной к имидазолиномам резистентности. Кроме того, были созданы растения риса, которые резистентны к гербицидам, которые отрицательно влияют на АНАС, в результате селекции мутаций, а также с помощью отбора резистентных к гербицидам растений из пула растений риса, полученных в результате культивирования пыльника. Смотрите патенты США №№ 5545822, 5736629, 5773703, 5773704, 5952553 и 6274796.

В растениях, так же как во всех других исследованных организмах, фермент АНАС состоит из двух субъединиц: большой субъединицы (каталитическая роль) и малой субъединицы (регуляторная роль) (Duggleby и Pang (2000) *J. Biochem. Mol. Biol.* 33: 1-36). Большая субъединица АНАС (также называемая в настоящем описании АНАСL) может кодироваться одним геном, как в случае *Arabidopsis* и риса, или несколькими представителями семейства генов, как у кукурузы, канолы и хлопка. Специфичные однонуклеотидные замены в большой субъединице придают ферменту некоторую степень нечувствительности к одному или нескольким классам гербицидов (Chang и Duggleby (1998) *Biochem J.* 333: 765-777).

Например, пшеница обыкновенная, *Triticum aestivum* L., содержит три гомологичных гена большой субъединицы синтазы ацетогидроксиацетата. Каждый из генов экспрессируется на значительном уровне, о чем свидетельствует реакция на гербициды и биохимические данные, полученные для мутантов по каждому из трех генов (Ascenzi et al. (2003) International Society of Plant Molecular Biologists Congress, Barcelona, Spain, Ref. No. S10-17). Кодированные последовательности всех трех генов имеют обширную гомологию на нуклеотидном уровне (WO 03/014357). Посредством секвенирования генов АНАСL нескольких сортов *Triticum aestivum* обнаружено, что молекулярной основой толерантности к гербицидам у большинства ИМ-толерантных (толерантных к имидазолиномам) линий является мутация Ser653(At)Asn, означающая замену серина на аспарагин в положении, эквивалентном присутствию серина в положении аминокислоты 653 у *Arabidopsis thaliana* (WO 03/014357). Указанная мутация является следствием однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в последовательности ДНК, кодирующей белок АНАСL.

Также известно, что многочисленные гены АНАСL встречаются у видов двудольных растений. Недавно, Kolkman et al. ((2004) *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159) сообщили об идентификации, клонировании и секвенировании трех генов АНАСL (АНАСL1, АНАСL2 и АНАСL3) из резистентных к гербицидам генотипов и генотипов дикого типа подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Kolkman et al. сообщили, что резистентность к гербицидам является следствием либо замены Pro197Leu (используется обозначение положений аминокислот АНАСL), либо замены Ala205Val в белке АНАСL1, и что каждая из указанных замен придавала резистентность как к имидазолиновым гербицидам, так и гербицидам на основе сульфонилмочевины.

Принимая во внимание высокую эффективность и низкую токсичность, имидазолиновые гербициды являются предпочтительными для применения в сельском хозяйстве. Однако возможность применения имидазолиновых гербицидов в конкретной системе возделывания сельскохозяйственных культур зависит от возможности использования резистентных к имидазолиномам сортов представляющего интерес культурного растения. Чтобы фермеры могли более гибко использовать типы и нормы внесения имидазолиновых гербицидов и гербициды на основе сульфонилмочевины, часто требуется более высокая степень толерантности к гербицидам. Также для селекционеров растений, которые разрабатывают толерантные к гербицидам сорта, желательна работа с мутациями, которые обеспечивают более высокую толерантность к гербицидам, обеспечивающим для селекционеров большую гибкость в подборе исход-

ной зародышевой плазмы, которую они используют для создания новых сортов. Чтобы получить такие резистентные к имидазолинонам сорта, селекционерам растений необходимо создавать дополнительные селекционные линии, предпочтительно с повышенной резистентностью к имидазолинонам. Таким образом, необходимы дополнительные резистентные к имидазолинонам селекционные линии и сорта культурных растений, а также способы и композиции для получения и применения резистентных к имидазолинонам селекционных линий и сортов.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к растениям Brassica, обладающим повышенной резистентностью к гербицидам, по сравнению с растением Brassica дикого типа. В частности, растения Brassica согласно изобретению обладают повышенной резистентностью по меньшей мере к одному гербициду, который отрицательно влияет на активность фермента AHAS по сравнению с растением Brassica дикого типа. Растение Brassica содержит в своем геноме, по меньшей мере, одну копию полинуклеотида большой субъединицы синтазы ацетогидроксиацетата (AHASL), который кодирует резистентный к гербициду полипептид AHASL, при этом полипептид AHASL выбран из группы, состоящей из: а) полипептида, имеющего аспарагин в положении, соответствующем положению 653 в последовательности SEQ ID NO: 1 или положению 638 в последовательности SEQ ID NO: 2, или положению 635 в последовательности SEQ ID NO: 3; б) полипептида, имеющего треонин в положении, соответствующем положению 122 в последовательности SEQ ID NO: 1 или положению 107 в последовательности SEQ ID NO: 4, или положению 104 в последовательности SEQ ID NO: 5; и в) полипептида, имеющего лейцин в положении, соответствующем положению 574 в последовательности SEQ ID NO: 1 или положению 557 в последовательности SEQ ID NO: 6.

Настоящее изобретение также относится к повышенной устойчивости к гербицидам, которая достигается в случае сочетания мутаций AHAS из разных геномов в растении *B. juncea*. В одном примере растения, сочетающие в себе мутацию bR (AHAS1) (в геноме *B. juncea*) с введенной в результате интрогрессии мутацией PM2 (AHAS3) (в геноме *A. napus*, интрогрессированной в *B. juncea*). Полученная устойчивость гибридов значительно повышена и оказывает неожиданный синергетический эффект по сравнению с эффектом, который наблюдается в современном коммерческом продукте, в котором сочетаются PM1 и PM2. В другом примере предлагается растение *B. juncea*, в котором сочетаются мутации aR (AHAS1) (в геноме *A. juncea*) с мутацией A107T (в геноме *B. juncea*), которые также обеспечивают синергетические уровни устойчивости к гербицидам по сравнению с растениями, сочетающими в себе мутации PM1 и PM2.

В одном варианте настоящее изобретение относится к резистентным к гербицидам двойным мутантным растениям Brassica, которые происходят из линии Brassica, которая была названа J05Z-07801. В другом варианте настоящее изобретение относится к резистентным к гербицидам растениям Brassica, которые происходят из линии Brassica, которая была названа J04E-0139. В еще одном варианте настоящее изобретение относится к резистентным к гербицидам растениям Brassica, которые происходят из линии Brassica, которая была названа J04E-0130. В еще одном варианте, настоящее изобретение относится к резистентным к гербицидам растениям Brassica, которые происходят из линии Brassica, которая была названа J04E-0122.

Резистентное к гербицидам растение Brassica согласно изобретению может содержать одну, две, три, четыре или больше копий гена или полинуклеотида, кодирующего резистентный к гербицидам белок AHASL согласно изобретению. Резистентное к гербицидам растение Brassica согласно изобретению может содержать ген или полинуклеотид, кодирующий резистентный к гербицидам белок AHASL, содержащий одиночную, двойную или большее количество мутаций. Растения Brassica согласно изобретению также включают семена и растения-потомки, которые содержат, по меньшей мере, одну копию гена или полинуклеотида, кодирующего резистентный к гербицидам белок AHASL согласно изобретению. Семена или полученные из них растения-потомки, которые содержат один полинуклеотид, кодирующий полипептид AHASL, содержащий одиночную, двойную или большее количество мутаций, или два или более полинуклеотидов, кодирующих полипептиды AHASL с одиночной мутацией, имеют неожиданно более высокий уровень устойчивости к AHAS-ингибирующему гербициду, например, имидазолиноновому гербициду или гербициду на основе сульфенилмочевины, чем предполагается на основании данных о наличии полипептидов AHASL с одиночной мутацией в одном растении. В растениях и их потомстве наблюдается синергетический эффект, а не аддитивный эффект в отношении устойчивости к гербицидам, при этом уровень устойчивости к гербицидам у растений и их потомства, содержащих множественные мутации, выше чем уровень устойчивости к гербицидам у растения, содержащего белок AHASL с единичной мутацией.

Настоящее изобретение относится к способу борьбы с сорняками, растущими рядом с нетрансгенными и трансгенными резистентными к гербицидам растениями согласно изобретению. Такие растения включают, например, резистентные к гербицидам растения Brassica, описанные выше, и растения, трансформированные молекулой полинуклеотида, кодирующего резистентный к гербицидам белок AHASL согласно изобретению. Трансформированные растения содержат в своих геномах по меньшей мере одну кассету экспрессии, содержащую промотор, который управляет экспрессией гена в раститель-

ной клетке, при этом промотор оперативно связан с полинуклеотидом AHASL согласно изобретению. Способ включает в себя применение эффективного количества гербицида по отношению к сорнякам и резистентному к гербицидам растению, при этом резистентное к гербицидам растение имеет повышенную резистентность, по меньшей мере, к одному гербициду, в частности, к имидазолиноновому или сульфониломочевинному гербициду, по сравнению с растением дикого типа или нетрансформированным растением. Настоящее изобретение относится к способам повышения активности AHAS в растении для получения резистентного к гербицидам растения и для повышения устойчивости к гербицидам уже устойчивого к гербицидам растения. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы включают в себя трансформацию растительной клетки полинуклеотидной конструкции, содержащей нуклеотидную последовательность, оперативно связанную с промотором, который управляет экспрессией в растительной клетке, и регенерацию трансформированного растения из трансформированной растительной клетки. Нуклеотидная последовательность выбрана из таких нуклеотидных последовательностей, которые кодируют резистентные к гербицидам белки AHASL согласно изобретению. В других вариантах способы включают в себя обычную селекцию растений, которая заключается в перекрестном опылении резистентного к гербицидам растения согласно изобретению с другим растением и, кроме того, может включать в себя отбор потомства, которое обладает свойствами резистентности к гербицидам родительского растения, которое является резистентным к гербицидам растением согласно изобретению.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к изолированным молекулам полинуклеотидов и изолированным полипептидам белков AHASL Brassica. Молекулы полинуклеотидов согласно изобретению содержат нуклеотидные последовательности, которые кодируют резистентные к гербицидам белки AHASL согласно изобретению. Резистентные к гербицидам белки AHASL согласно изобретению содержат полипептид, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: а) нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 13; б) нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 14; с) нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 15; d) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 13, при этом белок имеет аспарагин в положении, соответствующем положению 653 в последовательности SEQ ID NO: 1, или положению 638 в последовательности SEQ ID NO: 2, или положению 635 в последовательности SEQ ID NO: 3; e) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 14, при этом белок имеет треонин в положении, соответствующем положению 122 в последовательности SEQ ID NO: 1, или положению 107 в последовательности SEQ ID NO: 4, или положению 104 в последовательности SEQ ID NO: 5; f) нуклеотидной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 15, при этом белок имеет треонин в положении, соответствующем положению 122 в последовательности SEQ ID NO: 1, или положению 107 в последовательности SEQ ID NO: 4, или положению 104 в последовательности SEQ ID NO: 5. Вышеуказанный белок AHASL дополнительно содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из а) аспарагина в положении, соответствующем положению 653 в последовательности SEQ ID NO: 1, или положению 638 в последовательности SEQ ID NO: 2, или положению 635 в последовательности SEQ ID NO: 3; б) треонина в положении, соответствующем положению 122 в последовательности SEQ ID NO: 1, или положению 107 в последовательности SEQ ID NO: 4, или положению 104 в последовательности SEQ ID NO: 5; и с) лейцина в положении, соответствующем положению 574 в последовательности SEQ ID NO: 1 или положению 557 в последовательности SEQ ID NO: 6.

Также предлагаются кассеты экспрессии, векторы для трансформации, трансформированные клетки-хозяева, отличные от клеток человека, и трансформированные растения, части растений и семена, которые содержат одну или несколько молекул полинуклеотидов согласно изобретению.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 изображено выравнивание нуклеотидных последовательностей кодирующих областей гена AHASL дикого типа из *Arabidopsis thaliana* (AtAHASL, SEQ ID NO: 11), резистентного к гербицидам гена BjAHASL1B-S653N *Brassica juncea* из линии J04E-0044 (J04E-0044, SEQ ID NO: 12), резистентного к гербицидам гена BjAHASL1A-S653N *Brassica juncea* из линии J04E-0139 (J04E-0139, SEQ ID NO: 13), резистентного к гербицидам гена BjAHASL1B-A122T *Brassica juncea* из линии J04E-0130 (J04E-0130, SEQ ID NO: 14), резистентного к гербицидам гена BjAHASL1A-A122T *Brassica juncea* из линии J04E-0122 (BjAHASL1A, SEQ ID NO: 15), резистентного к гербицидам гена BnAHASL1A-W574L *Brassica napus* из линии PM2 (BnAHASL1A, SEQ ID NO: 16), гена BjAHASL1A дикого типа *Brassica juncea* (BjAHASL1A, SEQ ID NO: 17), гена BjAHASL1B дикого типа *Brassica juncea* (BjAHASL1B, SEQ ID NO: 18), гена BnAHASL1A дикого типа *Brassica napus* (BnAHASL1A, SEQ ID NO: 19), гена BnAHASL1C дикого типа *Brassica napus* (BnAHASL1C, SEQ ID NO: 20). Анализ осуществляли с помощью пакета программ Vector NTI, использующих алгоритм Fast Algorithm (открытие пробела 15, продолжение пробела 6,66 и разделение пробелов 8, матрица swgapdnamt).

На фиг. 2 изображено выравнивание аминокислотных последовательностей гена AHASL дикого типа из *Arabidopsis thaliana* (AtAHASL, SEQ ID NO: 1), резистентного к гербицидам гена BjAHASL1B-

S653N Brassica juncea из линии J04E-0044 (J04E-0044, SEQ ID NO: 2), резистентного к гербицидам гена BjAHASL1A-S653N Brassica juncea из линии J04E-0139 (J04E-0139, SEQ ID NO: 3), резистентного к гербицидам гена BjAHASL1B-A122T Brassica juncea из линии J04E-0130 (J04E-0130, SEQ ID NO: 4), резистентного к гербицидам гена BjAHASL1A-A122T Brassica juncea из линии J04E-0122 (J04E-0122, SEQ ID NO: 5), резистентного к гербицидам гена BnAHASL1A-W574L Brassica napus из линии PM2 (BnAHASL1A, SEQ ID NO: 6), гена BjAHASL1A дикого типа Brassica juncea (BjAHASL1A, SEQ ID NO: 7), гена BjAHASL1B дикого типа Brassica juncea (BjAHASL1B, SEQ ID NO: 8), гена BnAHASL1A дикого типа Brassica napus (BnAHASL1A, SEQ ID NO: 9), гена BnAHASL1C дикого типа Brassica napus (BnAHASL1C, SEQ ID NO: 10). Анализ осуществляли, используя пакет программ Vector NTI (штраф за открытие пробела равен 10, штраф за продолжение пробела равен 0,05, штраф за разделение пробелов равен 8, матрица blosum 62MT2).

Фиг. 3 представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую результаты анализа активности фермента AHAS для линий растений B. juncea.

Фиг. 4 представляет собой диаграмму, показывающую результаты анализа опрыскивания в теплице линий растений B. juncea.

На фиг. 5 приведена таблица, показывающая идентификационные номера соответствующих последовательностей ДНК или белка.

На фиг. 6 показана активность фермента AHAS в белковых экстрактах, выделенных из гомозиготных линий B. juncea, линий, содержащих сочетания мутаций aR, bR, A107T и A104T B. juncea друг с другом и с интрогрессированной в B. juncea мутацией PM2, при концентрации имазамокса 100 мкМ.

На фиг. 7 показано среднее значение повреждения растений (фитотоксичность) линий F2 B. juncea, имеющих разную зиготность и разные сочетания мутаций AHAS aR и A107T, через 2 недели после опрыскивания теплицы 35 г активного ингредиента имазамокса/га.

На фиг. 8 показано среднее значение фитотоксичности для растений линий DH B. juncea, содержащих сочетания мутаций B. juncea aR, bR, A107T и A104T друг с другом и с интрогрессированной в B. juncea мутацией PM2, после опрыскивания 35 г активного ингредиента имазамокса/га (Raptor®).

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к растениям Brassica, имеющим повышенную резистентность к гербицидам по сравнению с растением Brassica дикого типа. Резистентные к гербицидам растения Brassica получали как подробно описано ниже, воздействуя на изолированные микроспоры Brassica дикого типа (в отношении резистентности к гербицидам) мутагеном, культивируя микроспоры в присутствии эффективного количества имидазолинового гербицида и отбирая выжившие зародыши. Из выживших зародышей получали гаплоидные растения Brassica и затем хромосомы удваивали, чтобы получить способные к размножению дигаплоидные растения Brassica, которые имеют повышенную резистентность к имидазолиновому гербициду по сравнению с резистентностью растения Brassica дикого типа. В одном варианте настоящее изобретение относится к резистентной к гербицидам линии Brassica, называемой в настоящем описании J04E-0139, которая была получена в результате мутагенеза микроспор, как подробно описано ниже. В другом варианте настоящее изобретение относится к резистентной к гербицидам линии Brassica, называемой в настоящем описании J04E-0130, которая была получена в результате мутагенеза микроспор. В еще одном варианте настоящее изобретение относится к резистентной к гербицидам линии Brassica, называемой в настоящем описании J04E-0122, которая была получена в результате мутагенеза микроспор. В еще одном варианте настоящее изобретение относится к резистентной к гербицидам линии Brassica, называемой в настоящем описании J05Z-07801, которая была получена скрещиванием мутантной линии B. juncea bR (U.S. 2005/0283858) с мутантной линией PM2 (см. US 2004/0142353 и US 2004/0171027; также см. Hattori et al., Mol. Gen. Genet. 246: 419-425, 1995), которая исходно была получена в результате интрогрессии в Brassica juncea из Brassica napus.

Таким образом, настоящее изобретение относится к растениям Brassica juncea, обладающим резистентностью к гербицидам, ингибирующим AHAS. Предлагаются линии B. juncea, которые содержат одиночную мутацию по меньшей мере в одном полинуклеотиде AHASL, при этом одиночная мутация выбрана из группы, состоящей из трансверсии G-на-A, которая соответствует аминокислоте в положении 653 последовательности AHASL1 Arabidopsis thaliana, и трансверсии G-на-A, которая соответствует аминокислоте в положении 122 последовательности AHASL1 A. thaliana.

Из резистентных к гербицидам растений Brassica juncea J04E-0139 и растений Brassica juncea дикого типа выделяли кодирующую область гена большой субъединицы синтазы ацетогидроксикислот (называемого AHASL1) посредством амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенировали. В результате сравнения полинуклеотидных последовательностей резистентных к гербицидам растений Brassica и растений Brassica дикого типа было обнаружено, что кодирующая область полинуклеотидной последовательности AHASL1 из резистентного к гербицидам растения Brassica локализована в геноме A Brassica juncea и отличается от полинуклеотидной последовательности AHASL1 растения дикого типа одним нуклеотидом в результате трансверсии G-на-A (фиг. 1). Указанная трансверсия G-на-A в полинуклеотидной последовательности AHASL1 приводит к новой замене Ser на Asp в положении аминокислоты 635 (соответствующей аминокислоте 653 AHASL1 A. thaliana) в консервативной области рас-

считанной аминокислотной последовательности белка AHASL1 в сравнении с аминокислотной последовательностью белка AHASL1 дикого типа (фиг. 2).

Из резистентных к гербицидам растений *Brassica juncea* J04E-0130 и растений *Brassica juncea* дикого типа выделяли кодирующую область гена большой субъединицы синтазы ацетогидроксикислот (называемого AHASL1) посредством амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенировали. В результате сравнения полинуклеотидных последовательностей резистентных к гербицидам растений *Brassica* и растений *Brassica* дикого типа было обнаружено, что кодирующая область полинуклеотидной последовательности AHASL1 из резистентной к гербицидам линии *Brassica* J04E-0130 локализована в геноме В *Brassica juncea* и отличается от полинуклеотидной последовательности AHASL1 растения дикого типа одним нуклеотидом в результате трансверсии G-на-A (фиг. 1). Указанная трансверсия G-на-A в полинуклеотидной последовательности AHASL1 приводит к новой замене Ala на Thr в положении аминокислоты 107 (соответствующей аминокислоте 122 AHASL1 *A. thaliana*) в консервативной области рассчитанной аминокислотной последовательности белка AHASL1 в сравнении с аминокислотной последовательностью белка AHASL1 дикого типа (фиг. 2).

Из резистентных к гербицидам растений *Brassica juncea* J04E-0122 и растений *Brassica juncea* дикого типа выделяли кодирующую область гена большой субъединицы синтазы ацетогидроксикислот (называемого AHASL1) посредством амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенировали. В результате сравнения полинуклеотидных последовательностей резистентных к гербицидам растений *Brassica* и растений *Brassica* дикого типа было обнаружено, что кодирующая область полинуклеотидной последовательности AHASL1 из резистентной к гербицидам линии *Brassica* J04E-0122 локализована в геноме А *Brassica juncea* и отличается от полинуклеотидной последовательности AHASL1 растения дикого типа одним нуклеотидом в результате трансверсии G-на-A (фиг. 1). Указанная трансверсия G-на-A в полинуклеотидной последовательности AHASL1 приводит к новой замене Ala на Thr в положении аминокислоты 104 (соответствующей аминокислоте 122 AHASL1 *A. thaliana*) в консервативной области рассчитанной аминокислотной последовательности белка AHASL1 в сравнении с аминокислотной последовательностью белка AHASL1 дикого типа (фиг. 2).

Настоящее описание также относится к растениям В. *juncea*, которые содержат по меньшей мере два мутантных полинуклеотида AHASL. Такие растения также называют в настоящем описании растениями, содержащими "сочетанные" мутации. Мутации могут быть в одном и том же или в разных геномах растения В. *juncea*. Растения В. *juncea* могут содержать любое количество мутантных полинуклеотидов AHASL и любое сочетание мутаций, включая без ограничения мутации, соответствующие положению 653 в последовательности SEQ ID NO: 1, положению 638 в последовательности SEQ ID NO: 2, положению 635 в последовательности SEQ ID NO: 3, положению 122 в последовательности SEQ ID NO: 1, положению 107 в последовательности SEQ ID NO: 4, положению 104 в последовательности SEQ ID NO: 5, положению 574 в последовательности SEQ ID NO: 1 или положению 557 в последовательности SEQ ID NO: 6.

Также в настоящем изобретении предлагаются растения В. *juncea*, имеющие два мутантных полинуклеотида AHASL в разных геномах, один мутантный полинуклеотид AHASL в геноме А и второй мутантный полинуклеотид AHASL в геноме В. Такие растения В. *juncea*, имеющие два мутантных полинуклеотида AHASL, включают растения, содержащие мутацию bR мутация и мутацию PM2. К таким растениям относятся растения В. *juncea* линии J05Z-07801, а также их семена и потомство, а также потомки, полученные от скрещиваний с линией В. *juncea* J05Z-07801. В другом аспекте растения В. *juncea*, имеющие две мутации AHASL, включают растения, в которых сочетается мутация aR (например, из линии J04E-0139) с мутацией A122T (например, из линии J04E-0130), в линии потомков В. *juncea*. В одном аспекте такие растения, сочетающие в себе две мутации AHASL1, имеют синергетический уровень устойчивости к гербицидам по сравнению с аддитивными уровнями устойчивости к гербицидам растений В. *juncea*, содержащих соответствующие отдельные мутации.

Мутации PM1 и PM2 получали, используя мутагенез микроспор *Brassica napus*, как описано в Swanson et al. (*Plant Cell Reports* 7: 83-87(1989)). Мутация PM2 характеризуется заменой одного нуклеотида (G на T) на 3'-конце гена AHAS3, предположительно в геноме А *Brassica napus* (Rutledge et al. *Mol. Gen. Genet.* 229: 31-40 (1991)), что приводит к аминокислотной замене Trp на Leu, Trp556(Bn)Leu (Hattori et al., *Mol. Gen. Genet.* 246: 419-425, 1995). Мутация PM1, предположительно присутствующая в геноме С *Brassica napus* (Rutledge et al. *Mol. Gen. Genet.* 229: 31-40 (1991)), характеризуется заменой одного нуклеотида в геноме AHAS1 (G на A), приводящей к аминокислотной замене Ser на Asn, Ser638(Bn)Asn (смотрите Sathasivan et al., *Plant Physiol.* 97: 1044-1050, 1991 и Hattori et al., *Mol. Gen. Genet.* 232: 167-173, 1992; также см. US 2004/0142353 и US 2004/0171027). Сообщалось, что мутантные гены PM1 (AHAS1) и PM2 (AHAS3) действуют аддитивно, обеспечивая устойчивость к имидазолиновым гербицидам (Swanson et al., *Theor. Appl. Genet.* 78: 525-530, 1989).

Поскольку полагают, что PM2 локализована в геноме А *Brassica napus*, и оба вида: *Brassica juncea* и *Brassica rapa*, содержат геном А, то перенос мутантного гена PM2 из *napus* либо в *juncea*, либо в *rapa* можно осуществить, используя скрещивание видов (интрогрессию) и отбор при селекции у условиях низких уровней гербицида. Поскольку полагают, что PM1 локализована в геноме С *Brassica napus*, то

интрогрессия такого мутанта из *B. napus* в *Brassica juncea* (A,B) или *Brassica rapa* (A,A) намного более сложна, так как она зависит от того произойдет ли редкое событие хромосомной транслокации (между геномом *C Brassica napus* и либо геномом A, либо геномом B *Brassica juncea*). Такое событие хромосомной транслокации часто может быть отягощено отсутствием стабильности, а также неспособностью исключить сопротивление связывания, которое часто имеет место при использовании такого способа. В патенте США № 6613963 описаны устойчивые к гербицидам растения *Brassica juncea* PM1/PM2, полученные с использованием такого способа интрогрессии. Исходя из аддитивной устойчивости, обеспечиваемой мутациями PM1 и PM2 у *B. napus*, можно ожидать, что интрогрессия двух мутаций, PM1 и PM2, в *Brassica juncea* также приведет в аддитивной устойчивости к гербицидам.

Чтобы преодолеть проблемы, связанные с переносом признака устойчивости к гербицидам из генома *C Brassica napus* в геномы A или B *Brassica rapa* и/или *Brassica juncea*, предпочтительно прямое получение мутации в требуемом геноме. В заявке на выдачу патента США 2005/0283858 описана устойчивая к гербицидам мутация ANAS1 *Brassica juncea*, bR, которую получали прямым мутагенезом, приводящим к SNP в гене ANAS1, что вызывало замену Ser638Asn (положение 653 на основании использования номенклатуры положений аминокислот в ANASL *Arabidopsis*) в гене ANASL в геноме B.

Растения *B. juncea*, имеющие две или более мутаций ANASL, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь повышенные уровни резистентности к гербицидам по сравнению с аддитивными уровнями резистентности в случае отдельных мутаций. Растения, имеющие две или более мутаций ANASL, могут иметь уровни резистентности, которые на 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50%, или еще выше в сравнении с аддитивными уровнями резистентности, обеспечиваемые отдельными мутациями ANASL.

Увеличение резистентности можно измерить, используя любой способ определения резистентности ANAS. Например, резистентность можно измерить, определяя резистентность в *B. juncea* в процентах через период времени, составляющий 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 или 28 дней, после обработки гербицидом, ингибирующим ANAS. Затем резистентность в процентах можно сравнить с уровнями, полученными суммированием резистентности в процентах растений, содержащих соответствующие отдельные мутации ANASL. В одном аспекте резистентность определяют измерением резистентности растений в процентах через 14 дней после обработки 2-кратным количеством гербицида, ингибирующего ANAS.

Изобретение, кроме того, относится к изолированным молекулам полинуклеотидов, содержащим нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки большой субъединицы синтазы ацетогидроксиацетата (ANASL), и к таким белкам ANASL. Изобретение раскрывает выделение и нуклеотидную последовательность полинуклеотида, кодирующего резистентный к гербицидам белок ANASL1 *Brassica*, из резистентного к гербицидам растения *Brassica*, которое было получено с помощью химического мутагенеза растений *Brassica* дикого типа. Резистентные к гербицидам белки ANASL1 согласно изобретению имеют замену серина на аспарагин в положении 635 гена ANASL1 *B. juncea*, локализованного в геноме A, или замену аланина на треонин в положении 107 гена ANASL1 *B. juncea*, локализованного в геноме B, или замену аланина на треонин в положении 104 гена ANASL1 *B. juncea*, локализованного в геноме A. В изобретении, кроме того, раскрыто выделение и нуклеотидная последовательность молекулы полинуклеотида, кодирующей белок ANASL1 дикого типа *Brassica*.

Настоящее изобретение относится к изолированным молекулам полинуклеотидов, которые кодируют белки ANASL1 из *Brassica*, в частности *Brassica juncea*. В частности, изобретение относится к изолированным молекулам полинуклеотидов, содержащим нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, нуклеотидные последовательности, кодирующие белок ANASL1, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, нуклеотидные последовательности, кодирующие белок ANASL1, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4, нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, нуклеотидные последовательности, кодирующие белок ANASL1, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и фрагменты и варианты таких нуклеотидных последовательностей, которые кодируют функциональные белки ANASL1.

Изолированные резистентные к гербицидам молекулы полинуклеотидов ANASL1 согласно изобретению содержат нуклеотидные последовательности, которые кодируют резистентные к гербицидам белки ANASL1. Такие молекулы полинуклеотидов можно использовать в полинуклеотидных конструкциях для трансформации растений, в частности культурных растений, чтобы повысить резистентность растений к гербицидам, в частности, гербицидам, которые, как известно, ингибируют активность ANAS, более конкретно к имидазолиновым гербицидам. Такие полинуклеотидные конструкции можно использовать в кассетах экспрессии, экспрессирующих векторах, векторах для трансформации, плаزمиды и тому подобном. Трансгенные растения, полученные после трансформации такими полинуклеотидными конструкциями, проявляют повышенную резистентность к ANAS-ингибирующим гербицидам, таким как, например, имидазолиновые и сульфониломочевинные гербициды.

Композицию согласно изобретению включают в себя нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки ANASL1. В частности, настоящее изобретение относится к изолированным молекулам полинуклеотидов, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3, 4 или 5, и их фрагменты и варианты, которые кодируют

полипептиды, обладающие активностью АНАС. Кроме того, предлагаются полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидной молекулой, описанной в настоящей публикации, например нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 13, 14 или 15 и ее фрагментами и вариантами, которые кодируют полипептиды, обладающие активностью АНАС.

Настоящее изобретение относится к белкам АНАСL с аминокислотными заменами в конкретных аминокислотных положениях в консервативных областях белков АНАСL Brassica, раскрытых в настоящем описании. Если в настоящем описании не оговорено особо, конкретные аминокислотные положения относятся к положению такой аминокислоты в полноразмерной аминокислотной последовательности АНАСL *A. thaliana*, указанной в SEQ ID NO: 1. Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что такие аминокислотные положения могут варьировать в зависимости от того, добавляются или удаляются аминокислоты, например, на N-конце аминокислотной последовательности. Таким образом, изобретение охватывает аминокислотные замены в указанном положении или эквивалентном положении (например, "в положении аминокислоты 653 или эквивалентном положении").

Подразумевается, что "эквивалентное положение" означает положение, которое находится в той же самой консервативной области, что и указанное положение аминокислоты. Например, аминокислота 122 в последовательности SEQ ID NO: 1 находится в положении, эквивалентном положению аминокислоты 107 в последовательности SEQ ID NO: 4, и в положении, эквивалентном положению аминокислоты 104 в последовательности SEQ ID NO: 5. Подобным образом, аминокислота 653 в белке АНАСL *Arabidopsis thaliana*, имеющем аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, находится в положении, эквивалентном положению аминокислоты 638 в АНАСL1B Brassica и положению аминокислоты 635 в белках АНАСL1A Brassica, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2 и 3 соответственно.

Изобретение охватывает изолированные или по существу очищенные композиции нуклеиновых кислот или белков. "Изолированная" или "очищенная" молекула полинуклеотида или белка или его биологически активная часть в значительной степени или по существу не содержит компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с молекулой полинуклеотида или белком и обнаружены в его природном окружении. Таким образом, изолированная или очищенная молекула полинуклеотида или белка по существу не содержит других клеточных компонентов или культуральной среды при получении основанными на рекомбинации способами, или по существу не содержит химических предшественников или других химических вещества при химическом синтезе. Предпочтительно "изолированная" нуклеиновая кислота не содержит последовательностей (предпочтительно кодирующих белок последовательностей), которые в природе фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательностей, расположенных на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого нуклеиновая кислота получена. Например, в различных вариантах изолированная молекула полинуклеотида может содержать меньше, чем примерно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1 т.п.н. нуклеотидных последовательностей, которые в природе фланкируют молекулу полинуклеотида в геномной ДНК клетки, из которой нуклеиновая кислота получена. Белок, который по существу не содержит клеточного материала, включает препараты белка, содержащие менее чем примерно 30, 20, 10, 5 или 1% (сухой массы) загрязняющего белка. В том случае, когда белок согласно изобретению или его биологически активную часть получают способами на основе рекомбинации, предпочтительно культуральная среда составляет менее чем примерно 30, 20, 10, 5 или 1% (сухой массы) химических предшественников или химических вещества, отличных от представляющего интерес белка.

Настоящее изобретение относится к изолированным полипептидам, составляющим белки АНАСL1. Изолированные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 3, 4 или 5, аминокислотных последовательностей, кодируемых нуклеотидными последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, и функциональных фрагментов и вариантов указанных аминокислотных последовательностей, которые кодируют полипептид АНАСL1, обладающий активностью АНАС. Под "функциональными фрагментами и вариантами" подразумевают фрагменты и варианты указанных полипептидов, которые обладают активностью АНАС.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способы включают в себя применение устойчивых к гербицидам или резистентных к гербицидам растений. Под "устойчивым к гербицидам" или "резистентным к гербицидам" растением подразумевают растение, которое устойчиво или резистентно, по меньшей мере, к одному гербициду на уровне, которое обычно может убивать или ингибировать рост нормального растения или растения дикого типа. В одном варианте осуществления изобретения устойчивые к гербицидам растения согласно изобретению содержат устойчивый к гербицидам или резистентный к гербицидам белок АНАСL. Под "устойчивым к гербицидам белком АНАСL" или "резистентным к гербицидам белком АНАСL" подразумевают, что такой белок АНАСL обладает более высокой активностью АНАС по сравнению с активностью АНАС белка АНАСL дикого типа в присутствии по меньшей мере одного гербицида, который, как известно, препятствует проявлению активности АНАС, и при концентрации или уровне гербицида, который, как известно, ингибирует активность АНАС белка АНАСL дикого типа. Кроме того, активность АНАС такого устойчивого к гербицидам или резистентного к гер-

бицидам белка AHASL может быть названа в настоящем описании "устойчивой к гербицидам" или "резистентной к гербицидам" активностью AHAS.

Для настоящего изобретения термины "устойчивый к гербицидам" и "резистентный к гербицидам" используют взаимозаменяемо, и подразумевается, что термины имеют эквивалентное значение и эквивалентный диапазон использования. Подобным образом, термины "устойчивость к гербицидам" и "резистентность к гербицидам" используют взаимозаменяемо, и подразумевается, что термины имеют эквивалентное значение и эквивалентный диапазон. Подобным образом, термины "резистентный к имидазолинонам" и "резистентность к имидазолинонам" используют взаимозаменяемо, и подразумевается, что термины имеют эквивалентное значение и эквивалентный диапазон как и термины "устойчивый к имидазолинонам" и "устойчивость к имидазолинонам" соответственно.

Изобретение охватывает резистентные к гербицидам полинуклеотиды AHASL1 и резистентные к гербицидам белки AHASL1. Под "резистентным к гербицидам полинуклеотидом AHASL1" подразумевают полинуклеотид, который кодирует белок, обладающий резистентной к гербицидам активностью AHAS. Под "резистентным к гербицидам белком AHASL1" подразумевают белок или полипептид, который обладает резистентной к гербицидам активностью AHAS. Кроме того, понятно, что устойчивый к гербицидам или резистентный к гербицидам белок AHASL может быть введен в растение в результате трансформации растения или его предка нуклеотидной последовательностью, кодирующей устойчивый к гербицидам или резистентный к гербицидам белок AHASL. Такие устойчивые к гербицидам или резистентные к гербицидам белки AHASL кодируются устойчивыми к гербицидам или резистентными к гербицидам полинуклеотидами AHASL. Альтернативно устойчивый к гербицидам или резистентный к гербицидам белок AHASL может встречаться в растении в результате происходящей в природе или индуцированной мутации в эндогенном гене AHASL в геноме растения или его предка.

Настоящее изобретение относится к растениям, растительным тканям, растительным клеткам и клеткам-хозяевам с увеличенной и/или повышенной резистентностью или устойчивостью, по меньшей мере, к одному гербициду, в частности, к гербициду, который препятствует проявлению активности фермента AHAS, более конкретно к имидазолиноновому или сульфонилмочевинному гербициду. Термин "повышенная" относится к увеличению резистентности или устойчивости в большей степени, чем ожидается. Предпочтительное количество или концентрация гербицида является "эффективным количеством" или "эффективной концентрацией". "Под эффективным количеством" и "эффективной концентрацией" подразумевают количество и концентрацию соответственно, которые достаточны для того, чтобы убить или ингибировать рост сходного растения дикого типа, растительной ткани, растительной клетки, микроспоры или клетки-хозяина, но такое указанное количество не убивает или не ингибирует так сильно рост резистентного к гербицидам растения, растительной ткани, растительных клеток, микроспор и клеток-хозяев согласно настоящему изобретению. Обычно эффективное количество гербицида представляет собой количество, которое обычно используют в системах производства сельскохозяйственной продукции, чтобы убить представляющие интерес сорняки. Такое количество известно специалистам в данной области или может быть легко определено способами, известными в данной области. Кроме того, понятно, что эффективное количество гербицида в системах производства сельскохозяйственной продукции может в значительной степени отличаться от эффективного количества гербицида для системы культивирования растений, такой как, например, система культивирования микроспор.

Гербициды согласно настоящему изобретению представляют собой гербициды, которые препятствуют проявлению активности фермента AHAS, например активность AHAS снижается в присутствии гербицида. Такие гербициды также могут быть названы в настоящем описании "AHAS-ингибирующими гербицидами" или просто "ингибиторами AHAS". В используемом в настоящем описании смысле "AHAS-ингибирующий гербицид" или "ингибитор AHAS" не означает ограничение одним гербицидом, который препятствует проявлению активности фермента AHAS. Таким образом, если не указано или не очевидно из контекста иное, "AHAS-ингибирующий гербицид" или "ингибитор AHAS" может означать один гербицид или смесь двух, трех, четырех или более гербицидов, каждый из которых препятствует проявлению активности фермента AHAS.

Под "сходным растением дикого типа, растительной тканью, растительной клеткой или клеткой-хозяином" подразумевают растение, растительную ткань, растительную клетку или клетку-хозяина соответственно, которые не обладают свойствами резистентности к гербицидам и/или которые не имеют конкретного полинуклеотида согласно изобретению, который раскрыт в настоящем описании. Следовательно, использование термина "дикого типа" не означает, что растение, растительная ткань, растительная клетка, или другая клетка-хозяин не имеет рекомбинантной ДНК в своем геноме и/или не обладает свойствами резистентности к гербицидам, которые отличаются от свойств, описанных в настоящей публикации.

В используемом в настоящем описании смысле и если четко не указано иное, термин "растение" означает растение на любой стадии развития, а также любую часть или части растения, которые могут быть отделены или отделены от целого интактного растения. Такие части растения включают без ограничения органы, ткани и клетки растения, включая каллусы растений, скопления растительных клеток, протопласты растений и культуры растительных клеток, из которых растения могут быть регенерированы.

Примеры конкретных частей растения включают стебель, лист, корень, соцветие, цветок, цветок компактного соцветия, плод, цветоножку, плодоножку, тычинку, пыльник, рыльце, столбик, завязь, лепесток, чашелистик, плодолистик, кончик корня, корневой чехлик, корневой волосок, волосок семени, пальцевое зерно, микроспору, зародыш, семяпочку, семядолю, гипокотиль, эпикотиль, ксилему, флоэму, паренхиму, эндосперм, клетку-спутницу, замыкающую клетку и любые другие известные органы, ткани и клетки растения. Кроме того, понятно, что семя относится к понятию "растение"».

Растения согласно настоящему изобретению включают как нетрансгенные растения, так и трансгенные растения.

Подразумевается, что "нетрансгенное растение" означает растение, не имеющее рекомбинантной ДНК в своем геноме. "Трансгенное растение" означает растение, содержащее рекомбинантную ДНК в своем геноме. Такое трансгенное растение может быть получено введением рекомбинантной ДНК в геном растения. В том случае, когда такую рекомбинантную ДНК вводят в геном трансгенного растения, потомство растения также может содержать рекомбинантную ДНК. Растение-потомок, которое содержит по меньшей мере часть рекомбинантной ДНК по меньшей мере, одного трансгенного растения-предка, также является трансгенным растением.

Настоящее изобретение относится к резистентной к гербицидам линии Brassica, которую называют в настоящем описании J04E-0122. Депонировано по меньшей мере 2500 семян Brassica линии J04E-0122 в депозитарии для нужд патентования Американской коллекции типов культур (ATCC), Mansassas, VA 20110 USA, 19 октября 2006 г. с номером патентуемого депозита ATCC PTA-7944. Настоящее изобретение относится к резистентной к гербицидам линии Brassica, которую называют в настоящем описании J04E-0130. Депонировано по меньшей мере 2500 семян Brassica линии J04E-0130 19 октября 2006 г. с номером патентуемого депозита ATCC PTA-7945. Настоящее изобретение относится к резистентной к гербицидам линии Brassica, которую называют в настоящем описании J04E-0139. Депонировано по меньшей мере 2500 семян Brassica линии J04E-0139 19 октября 2006 г. с номером патентуемого депозита ATCC PTA-7946. Настоящее изобретение относится к резистентной к гербицидам двойной мутантной линии Brassica, которую называют в настоящем описании J05Z-07801. По меньшей мере, 625 семян линии Brassica J05Z-07801 депонировано 2 апреля 2007 г., остальные 1875 депонированы 15 января 2008 г. с номером патентуемого депозита ATCC PTA-8305. Депозит будет храниться по условиям Будапештского договора о признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Депозит линий Brassica J04E-0122, J04E-0130, J04E-0130 и J05Z-07801 помещен на срок по меньшей мере 30 лет и будет храниться по меньшей мере 5 лет с момента последнего запроса о выдаче образца депозита, полученного ATCC. Кроме того, заявители удовлетворили все требования статьи 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, включая предоставление свидетельства о жизнеспособности образца.

Имеющие одиночную мутацию резистентные к гербицидам линии Brassica J04E-0122, J04E-0130 и J04E-0139 согласно настоящему изобретению получали в результате мутационной селекции. Микроспоры Brassica дикого типа подвергали мутагенезу, воздействуя мутагеном, в частности химическим мутагеном, более конкретно этилнитрозомочевинной (ENU). Однако настоящее изобретение не ограничено резистентными к гербицидам растениями Brassica, которые получены способом мутагенеза с использованием химического мутагена ENU. Любой способ мутагенеза, известный в данной области, может быть использован для получения резистентных к гербицидам растений Brassica согласно настоящему изобретению. Такие способы мутагенеза могут включать в себя, например, использование любого одного или нескольких из следующих мутагенов: излучения, такого как рентгеновское излучение, гамма-излучение (например, кобальт-60 или цезий-137), нейтроны (например, продукт деления ядра урана-235 в атомном реакторе), бета-излучение (например, испускаемого радиоактивными изотопами, такими как фосфор-32 или углерод-14) и ультрафиолетовое излучение (предпочтительно от 250 до 290 нм), и химические мутагены, такие как этилметансульфонат (EMS), аналоги оснований (например, 5-бром урацил), родственные соединения (например, 8-этоксикофеин), антибиотики (например, стрептомицин), алкилирующие агенты (например, сернистый иприт, азотистый иприт, эпоксиды, этиленамины, сульфаты, сульфонаты, сульфоны, лактоны), азид, гидроксилламин, азотистая кислота или акридины. Резистентные к гербицидам растения также могут быть получены с использованием способов культивирования тканей, чтобы отобрать растительные клетки, содержащие мутации резистентности к гербицидам, и затем из них регенерировать резистентные к гербицидам растения. Смотрите, например, патенты США № 5773702 и 5859348, которые включены в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме. Дополнительные подробности мутационной селекции можно найти в публикации "Principals of Cultivar Development", Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company, содержание которой включено в настоящее описание в виде ссылки.

Анализ гена AHASL1 растения Brassica линии J04E-0139 выявил мутацию, которая приводит к замене серина на аспарагин в положении аминокислоты 635 в гене AHASL генома *A. thaliana* и придает повышенную резистентность к гербициду. Таким образом, настоящее изобретение раскрывает тот факт, что замена серина другой аминокислотой в положении 635 (соответствующем положению аминокислоты 653 в AHASL1 *A. thaliana*) может быть причиной того, что растение Brassica приобретает повышенную резистентность к гербициду, в частности к имидазолиноновому и/или сульфониломочевинному гербициду. Резистентные к гербицидам растения Brassica согласно изобретению включают без ограничения

такие растения Brassica, которые содержат в своих геномах, по меньшей мере, одну копию полинуклеотида AHASL1, который кодирует резистентный к гербицидам белок AHASL1, который содержит аспарагин в положении аминокислоты 635 или эквивалентном положении.

Анализ гена AHASL1 растения Brassica линии J04E-0130 выявил мутацию, которая приводит к замене аланина на треонин в положении аминокислоты 107 в гене AHASL в геноме *B. juncea* и придает повышенную резистентность к гербициду. Таким образом, настоящее изобретение раскрывает тот факт, что замена аланина другой аминокислотой в положении 107 (соответствующем положению аминокислоты 122 в AHASL1 *A. thaliana*) может быть причиной того, что растение Brassica приобретает повышенную резистентность к гербициду, в частности к имидазолиноновому и/или сульфонилмочевинному гербициду. Резистентные к гербицидам растения Brassica согласно изобретению включают без ограничения такие растения Brassica, которые содержат в своих геномах по меньшей мере одну копию полинуклеотида AHASL1, который кодирует резистентный к гербицидам белок AHASL1, который содержит треонин в положении аминокислоты 107 или эквивалентном положении.

Анализ гена AHASL1 растения Brassica линии J04E-0122 выявил мутацию, которая приводит к замене аланина на треонин в положении аминокислоты 104 в гене AHASL в геноме *A. B. juncea* и придает повышенную резистентность к гербициду. Таким образом, настоящее изобретение раскрывает тот факт, что замена аланина другой аминокислотой в положении 104 (соответствующем положению аминокислоты 122 в AHASL1 *A. thaliana*) может быть причиной того, что растение Brassica приобретает повышенную резистентность к гербициду, в частности к имидазолиноновому и/или сульфонилмочевинному гербициду. Резистентные к гербицидам растения Brassica согласно изобретению включают без ограничения такие растения Brassica, которые содержат в своих геномах по меньшей мере одну копию полинуклеотида AHASL1, который кодирует резистентный к гербицидам белок AHASL1, который содержит треонин в положении аминокислоты 104 или эквивалентном положении.

Растения Brassica согласно изобретению дополнительно включают растения, которые содержат, по сравнению с белком AHASL1 дикого типа, аспарагин в положении аминокислоты 653 (номенклатура для *A. thaliana*), треонин в положении аминокислоты 122 (номенклатура для *A. thaliana*) и одну или несколько дополнительных замен в белке AHASL1 по сравнению с белком AHASL1 дикого типа, при этом такое растение Brassica обладает повышенной резистентностью по меньшей мере к одному гербициду по сравнению с растением Brassica дикого типа.

Настоящее изобретение относится к растениям и способам получения растений Brassica, резистентных к гербицидам, действующим на AHAS, растений Brassica, обладающих повышенной устойчивостью к AHAS-гербицидам, и семенам таких растений. Таким образом, растения, описанные в настоящей публикации, могут быть использованы в программах селекции, чтобы создать дополнительные устойчивые к гербицидам растения *B. juncea*, такие как коммерческие сорта *B. juncea*. В соответствии с такими способами первое родительское растение Brassica может быть использовано в скрещиваниях со вторым родительским растением Brassica, при этом по меньшей мере одно из указанных двух родительских растений Brassica имеет по меньшей мере одну мутацию, придающую резистентность AHAS к гербицидам. Одним из применений способа является применение для получения гибридных растений F<sub>1</sub>. Другой важный аспект такого способа заключается в том, что способ может быть использован для создания новых родительских дигаплоидных или инбредных линий. Например, линия Brassica, которая описана в настоящей публикации, может быть скрещена с любым вторым растением, и полученное гибридное потомство подвергнуто самоопылению и/или скрещиванию между сибсами в течение примерно 5-7 поколений или большего количества поколений, с получением таким образом большого количества отдельных родительских линий. Затем указанные родительские линии могут быть скрещены с другими линиями, и полученное гибридное потомство может быть подвергнуто анализу в отношении наличия полезных свойств. Таким образом могут быть идентифицированы новые линии, придающие требуемые свойства. В указанных способах можно использовать различные методики селекции, включая гаплоидию, способ отбора "педигри», способ отбора одного семени в потомстве, модифицированный способ отбора одного семени в потомстве, повторяющийся отбор и возвратное скрещивание.

Линии Brassica можно скрещивать, используя любые естественные или механические методики. Механическое опыление может быть осуществлено посредством контролирования типов пыльцы, которая может быть перенесена на рыльце, либо ручным опылением.

Растения-потомки Brassica можно оценивать любым способом, чтобы определить присутствие мутантного полинуклеотида или полипептида AHASL. Такие способы включают фенотипическую оценку, генотипическую оценку или их сочетания. Потомство растений Brassica можно оценить в последующих поколениях в отношении резистентности к гербицидам и других требуемых свойств. Резистентность к ингибирующим AHAS гербицидам можно оценить, подвергая растения воздействию одного или нескольких подходящих ингибирующих AHAS гербицидов и оценивая повреждение гербицидами. Некоторые свойства, такие как устойчивость к полеганию и высота растения, можно оценивать посредством визуального осмотра растений, тогда как способность быстро созревать, могут быть оценены в результате визуального осмотра семян в стручках. Другие свойства, такие как процентное содержание масла, процентное содержание белка и общее содержание глюкозинолатов в семенах, могут быть оценены с

использованием таких методик, как спектроскопия в ближней инфракрасной области и/или жидкостная хроматография и/или газовая хроматография. Генотипическая оценка растений Brassica включает в себя применение таких методик, как электрофорез изоферментов, оценка полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), оценка случайно амплифицированных полиморфных ДНК (RAPD), случайно праймируемая полимеразная цепная реакция (AP-ПЦР), фингерпринтинг амплифицированной ДНК (DAF), оценка амплифицированной области с охарактеризованной последовательностью (SCAR), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP), оценка повторов простых последовательностей (SSR), которые также называют "микросателлитами".

Дополнительные композиции и способы анализа генотипа растений Brassica, предлагаемых в настоящем изобретении, включают способы, описанные в публикации патента США № 2004/0171027, публикации патента США № 2005/02080506 и публикации патента США № 2005/0283858, полное содержание которых включено в настоящее описание в виде ссылки.

Оценка и обработка (посредством воздействия одного или нескольких подходящих АНАС-ингибирующих гербицидов) может быть осуществлена на протяжении нескольких поколений. Эффективность новых линий можно оценить, используя объективные критерии в сравнении с контрольными сортами. Линии, обладающие требуемыми сочетаниями свойств, либо скрещивают с другой линией, либо подвергают самоопылению, чтобы получить семена. Самоопыление относится к переносу пыльцы с одного цветка на тот же самый цветок или другой цветок на том же растении. Растения, которые были подвергнуты самоопылению и селекции в отношении типа в течение многих поколений, становятся гомозиготными почти по всем локусам и дают однородную популяцию гомозиготного потомства.

Любой способ селекции можно использовать в способах согласно настоящему изобретению. В одном примере резистентные к гербицидам растения согласно настоящему изобретению можно разводить, используя способ на основе гаплоидов. В таких способах родителей, имеющих генетическую базу для требуемого дополнения свойств, скрещивают, используя простое или сложное скрещивание. Скрещивание (или перекрестное опыление) относится к переносу пыльцы с одного растения на другое растение. Потомство от скрещивания выращивают и микроспоры (незрелые пыльцевые зерна) отделяют и фильтруют, используя методики, известные специалистам в данной области [(например, Swanson, E. B. et al., "Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos in Brassica napus, L. Plant Cell Reports", 6: 94-97 (1987); и Swanson, E. B., Microspore culture in Brassica, pp. 159-169 in Methods in Molecular Biology, vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture, Humana Press, (1990)]. В указанные микроспорах наблюдается расщепление генов. Микроспоры культивируют в присутствии подходящего АНАС-ингибирующего гербицида, такого как имазетапир (например, PURSUIT.TM.) или имазамокс (например, RAPTOR.TM.) или смесь 50/50 имазетапира и имазамокса (например, ODYSSEY.TM.), который убивает микроспоры, в которых отсутствуют мутации, ответственные за резистентность к гербициду. Микроспоры, несущие гены, ответственные за резистентность к гербициду, выживают и дают зародыши, которые образуют гаплоидные растения. Затем их хромосомы удваивают, получая удвоенные гаплоиды.

Другие способы селекции также используют согласно настоящему изобретению. Например, отбор способом "педигри" можно использовать для улучшения в основном самоопыляющихся культур, таких как Brassica и канола. Селекцию "педигри" начинают со скрещивания двух генотипов, каждый из которых может иметь одно или несколько требуемых свойств, которые отсутствуют в другом или которые дополняют другое свойство. Если два исходных родителя не обеспечивают всех требуемых свойств, то в план скрещиваний можно включать дополнительных родителей.

Таких родителей можно скрещивать в виде простого или сложного скрещивания, чтобы получить простые или сложные гибриды  $F_1$ . Популяцию  $F_2$  получают из  $F_1$  в результате самоопыления одного или нескольких растений  $F_1$  или взаимного скрещивания двух растений  $F_1$  (т.е. скрещивания между сибсами).

Отбор наилучших вариантов можно начинать в  $F_2$ -поколении, и начиная с  $F_3$ , отбирают лучшие семьи, и наилучших представителей в наилучших семьях. Повторное тестирование семей можно начинать в  $F_4$ -поколении, чтобы повысить эффективность селекции в отношении свойств с низкой наследуемостью. На поздней стадии инбридинга (т.е.  $F_6$  и  $F_7$ ) наилучшие линии или смеси фенотипически сходных линий можно тестировать в отношении возможного выпуска новых сортов. Однако способ селекции педигри более трудоемок, чем способ на основе гаплоидии, для создания улучшенных растений с резистентной к гербицидам АНАС, поскольку растения дают расщепление в течение нескольких поколений и выход требуемых свойств является относительно низким.

Способ отбора одного семени в потомстве (SSD) также можно использовать для селекции улучшенных сортов. Способ SSD в строгом смысле относится к посадке сегрегирующей популяции, сбора образца в виде одного семени от растения и использование популяции из одиночных семян для посадки с целью получения следующего поколения. Когда популяция будет доведена от  $F_2$  до требуемого уровня инбридинга, каждое из растений, из которых получены линии, можно будет проследить до разных особей  $F_2$ . Количество растений в популяции снижается в каждом поколении вследствие неспособности некоторых семян прорасти или неспособности некоторых растений дать по меньшей мере одно семя. В результате не все растения, образцы которых были исходно взяты в популяции  $F_2$ , будут представлены потомством, когда продвижение поколений будет завершено.

В случае способа, основанного на использовании нескольких семян, селекционеры канолы обычно собирают один или несколько стручков с каждого растения в популяции и молотят их вместе, получая общую массу. Часть общей массы используют для посадки следующего поколения, а часть откладывают в запас. Способ был назван модифицированным способом отбора одного семени в потомстве или способом отбора массы семян одного стручка в потомстве. Способ отбора нескольких семян использовали для того, чтобы уменьшить трудозатраты на сбор. Значительно быстрее обмолотить стручки машиной, чем извлекать одно семя из каждого стручка вручную в случае способом отбора одного семени в потомстве. Способ отбора нескольких семян также позволяет высаживать одинаковое количество семян в популяции каждого поколения при инбридинге. Собирают достаточное количество семян, чтобы компенсировать растения, которые не прорастают или не дают семян.

Возвратное скрещивание можно использовать для переноса гена или генов легко и в высокой степени наследуемого признака от исходного сорта или линии (родитель-донор) в другой требуемый культурный сорт или инбредную линию (рекуррентного родителя, т.е. родительскую форму, с которой гибрид скрещивается вновь). После начального скрещивания особи, имеющие фенотип родителя-донора, отбирают и повторно скрещивают (подвергают возвратному скрещиванию) с рекуррентным родителем. Ожидается, что после выполнения возвратного скрещивания полученное растение будет обладать признаками рекуррентного родителя и требуемым свойством, перенесенным от родителя-донора.

В результате повторяющегося отбора также могут быть созданы улучшенные сорта. Генетически разнообразную популяцию гетерозиготных особей либо идентифицируют, либо создают в результате взаимного скрещивания нескольких разных родителей. Наилучшие растения отбирают на основании их собственного превосходства, выдающегося потомства или превосходной способности к скрещиванию. Отобранные растения подвергают взаимному скрещиванию, получая новую популяцию, в которой продолжают последующие циклы селекции.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения растения Brassica, обладающего резистентностью к AHAS-гербицидам, включающему в себя: (а) скрещивание первой линии Brassica со второй линией Brassica, чтобы получить сегрегирующую популяцию, при этом первая линия Brassica представлена резистентным к AHAS-гербицидам растением Brassica; (b) скрининг популяции в отношении повышенной резистентности к AHAS-гербицидам; и (с) отбор одного или нескольких представителей популяции, имеющих повышенную резистентность.

#### **AHAS по сравнению с растением Brassica дикого типа**

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу интрогрессии признака резистентности к гербицидам, действующим на AHAS, в растение Brassica, включающему в себя: (а) скрещивание, по меньшей мере, первой линии Brassica, резистентной к гербицидам, действующим на AHAS, со второй линией Brassica с получением сегрегирующей популяции; (b) скрининг популяции в отношении повышенной резистентности к гербицидам, действующим на AHAS; и (с) отбор по меньшей мере одного представителя популяции, обладающего резистентностью к действующим на AHAS гербицидам.

Альтернативно в другом аспекте изобретения и первое и второе родительские растения Brassica могут быть резистентными к действующему на AHAS гербициду растениями Brassica, которые описаны в настоящей публикации. Таким образом, любое растение Brassica, полученное с использованием растения Brassica, обладающего повышенной резистентностью к действующему на AHAS гербициду, которое описано в настоящей публикации, составляет часть изобретения. В используемом в настоящем описании смысле скрещивание может означать самоопыление, скрещивание сибсов, возвратное скрещивание, скрещивание с другой или той же самой родительской линией, скрещивание с популяциями и тому подобное.

Настоящее изобретение также относится к способам получения резистентного к гербицидам растения, в частности резистентного к гербицидам растения Brassica, посредством обычной селекции растений, основанной на половом размножении. Способы включают в себя скрещивание первого растения, которое является резистентным к гербициду, со вторым растением, которое не является резистентным к гербициду. Первое растение может быть любым резистентным к гербицидам растением согласно настоящему изобретению, включая, например, трансгенные растения, содержащие по меньшей мере один из полинуклеотидов согласно настоящему изобретению, которые кодируют резистентную к гербицидам AHASL, и нетрансгенные растения Brassica, которые обладают свойствами резистентности к гербицидам растения Brassica J05Z-07801, J04E-0139, J04E-0130 или J04E-0122. Второе растение может быть любым растением, которое способно давать жизнеспособное потомство (т.е. семена) при скрещивании с первым растением. Обычно, но не обязательно, первое и второе растения относятся к одному и тому же виду. Способы согласно изобретению дополнительно могут включать в себя одно или несколько возвратных скрещиваний растений-потомков от первого скрещивания с растением такой же линии или генотипа, как и первое или второе растение. Альтернативно, потомство от первого скрещивания или любого последующего скрещивания может быть скрещено с третьим растением, которое является растением другой линии или другого генотипа, чем в случае первого или второго растения. Способы согласно изобретению дополнительно могут включать в себя отбор растений, которые обладают свойствами резистентности к гербицидам первого растения.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам повышения резистентности к гербицидам растения, в частности, резистентного к гербицидам растения Brassica, посредством обычной селекции растений, основанной на половом размножении. Способы включают в себя скрещивание первого растения, которое является резистентным к гербициду, со вторым растением, которое может являться или не являться резистентным к гербициду или может быть резистентным к другому гербициду или гербицидам, отличным от гербицида, к которому резистентно первое растение. Первое растение может представлять собой любое резистентное к гербицидам растение согласно настоящему изобретению, включая, например, трансгенные растения, содержащие, по меньшей мере, один из полинуклеотидов согласно настоящему изобретению, которые кодируют резистентную к гербициду AHASL, и нетрансгенные растения Brassica, которые обладают свойствами резистентности к гербицидам растения Brassica J05Z-07801, J04E-0139, J04E-0130 или J04E-0122. Вторым растением может быть любое растение, которое способно давать жизнеспособные растения-потомки (т.е. семена) при скрещивании с первым растением. Обычно, но не обязательно, первое и второе растения относятся к одному и тому же виду; а также первое и второе растения могут относиться к разным видам, но в пределах одного рода (пример: Brassica juncea×Brassica napus, Brassica juncea×Brassica rapa, Brassica juncea×Brassica oleracea, Brassica juncea×Brassica nigra и т.д.), а также первое и второе растения относятся к разным родам (пример: Brassica×Sinapis). Растения-потомки, полученные таким способом согласно настоящему изобретению, обладают повышенной резистентностью к гербициду по сравнению либо с первым, либо со вторым растением, либо с обоими растениями. В том случае, когда первое и второе растения резистентны к разным гербицидам, растения-потомки будут обладать комбинированными свойствами резистентности к гербицидам первого и второго растений. Способы согласно изобретению дополнительно могут включать в себя одно или несколько возвратных скрещиваний растений-потомков от первого скрещивания с растением такой же линии или генотипа, как и первое или второе растение. Альтернативно, потомство от первого скрещивания или любого последующего скрещивания может быть скрещено с третьим растением, которое является растением другой линии или другого генотипа, чем в случае первого или второго растения. Способы согласно изобретению дополнительно могут включать в себя отбор растений, которые обладают свойствами резистентности к гербицидам первого растения, второго растения или обоих растений.

Растения согласно настоящему изобретению могут быть трансгенными или нетрансгенными. Примером нетрансгенного растения Brassica, обладающего повышенной резистентностью к имидазолиноновым и/или сульфонилмочевинным гербицидам, является растение Brassica J05Z-07801, J04E-0139, J04E-0130 или J04E-0122; или мутантное, рекомбинантное или генетически сконструированное производное растения J05Z-07801, J04E-0139, J04E-0130 или J04E-0122; или любое потомство растения J05Z-07801, J04E-0139, J04E-0130 или J04E-0122; или растение, которое является потомком любого из указанных растений; или растение, которое обладает свойствами резистентности к гербицидам растения J05Z-07801, J04E-0139, J04E-0130 или J04E-0122.

Настоящее изобретение также относится к растениям, органам растения, растительным тканям, растительным клеткам, семенам и клеткам-хозяевам, отличным от клеток человека, которые трансформированы по меньшей мере одной молекулой полинуклеотида, кассетой экспрессии или вектором для трансформации согласно изобретению. Такие трансформированные растения, органы растений, растительные ткани, растительные клетки, семена и клетки-хозяева, отличные от клеток человека, обладают повышенной устойчивостью или резистентностью по меньшей мере к одному гербициду, при использовании урвной гербицида, которые убивают или ингибируют рост нетрансформированного растения, растительной ткани, растительной клетки или клетки-хозяина, отличной от клетки человека соответственно. Предпочтительно трансформированные растения, растительные ткани, растительные клетки и семена согласно изобретению представляют собой растения Brassica и сельскохозяйственные растения.

Настоящее изобретение также относится к семенам растения Brassica, способного давать растение Brassica, обладающее резистентностью к AHAS-гербициду, полученному из растений Brassica, которые получены способами согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к растению, выращенному из семени растения Brassica, обладающего резистентностью к AHAS-гербициду, полученному из растений Brassica, выращенных для получения семян, обладающих свойством резистентности к гербицидам, а также частям растений и культурам тканей из таких растений.

Также в настоящем изобретении предлагаются емкости с семенами Brassica, при этом семена способны производить резистентное к AHAS-гербициду растение Brassica. Емкость с семенами Brassica может содержать любое количество, массу или объем семян. Например, емкость может содержать, по меньшей мере или больше чем примерно 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или больше семян. Альтернативно емкость может содержать по меньшей мере или больше чем примерно 1 унцию (28,3 г), 5 унций (141,5 г), 10 унций (283 г), 1 фунт (0,453 кг), 2 фунта (0,906 кг), 3 фунта (1,359 кг), 4 фунта (1,812 кг), 5 фунтов (22665 кг) или большую массу семян.

Емкости с семенами Brassica могут представлять собой любую емкость, имеющуюся в данной об-

ласти. В качестве не ограничивающего примера емкость может представлять собой коробку, мешок, пачку, пакет, ленточный рулон, ведро, крышку чашки Петри или пробирку.

В другом аспекте семена, находящиеся в емкостях с семенами Brassica, могут представлять собой обработанные или необработанные семена. В одном аспекте семена могут быть обработаны для улучшения прорастания, например, с помощью проращивания семян, или посредством дезинфекции, чтобы защитить против имеющихся в семенах патогенов. В другом аспекте семена могут быть покрыты любым доступным покрытием, чтобы улучшить, например, посев, прорастание семян и защиту от патогенов, имеющихся на семенах. Покрытие семян может представлять собой любую форму покрытия для семян, включая без ограничения дражирование, пленочное покрытие и инкрустацию.

Настоящее изобретение также относится к способам повышения активности AHAS в растении, включающим в себя трансформацию растения полинуклеотидной конструкцией, содержащей промотор, оперативно связанный с нуклеотидной последовательностью AHASL1 согласно изобретению. Способы включают в себя введение полинуклеотидной конструкции согласно изобретению, по меньшей мере, в одну растительную клетку и регенерацию из нее трансформированного растения. Полинуклеотидная конструкция содержит, по меньшей мере, один нуклеотид, который кодирует резистентный к гербицидам белок AHASL согласно изобретению, в частности, нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 4 или 5, и их фрагменты и варианты. Способы, кроме того, включают в себя использование промотора, который способен управлять экспрессией генов в растительной клетке. Предпочтительно такой промотор является конститутивным промотором или тканеспецифичным промотором. Растение, полученное указанным способом, обладает повышенной активностью AHAS, в частности, устойчивой к гербицидам активностью AHAS, по сравнению с нетрансформированным растением. Таким образом, способы применимы для усиления или повышения резистентности растения, по меньшей мере, к одному гербициду, который препятствует проявлению каталитической активности фермента AHAS, в частности, к имидазолиноновому гербициду.

Настоящее изобретение относится к способу получения резистентного к гербицидам растения, включающему в себя трансформацию растительной клетки полинуклеотидной конструкцией, содержащей нуклеотидную последовательность, оперативно связанную с промотором, который управляет экспрессией в растительной клетке, и регенерацию трансформированного растения из указанной трансформированной растительной клетки. Нуклеотидная последовательность выбрана из таких нуклеотидных последовательностей, которые кодируют резистентные к гербицидам белки AHASL согласно изобретению, в частности нуклеотидных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, 4 или 5, и их фрагментов и вариантов. Резистентное к гербицидам растение, полученное таким способом, обладает повышенной резистентностью по сравнению с нетрансформированным растением, по меньшей мере, к одному гербициду, в частности, к гербициду, который препятствует проявлению активности фермента AHAS, такому как, например, имидазолиноновый гербицид или сульфонилмочевинный гербицид.

Настоящее изобретение относится к кассетам экспрессии для экспрессии полинуклеотидных молекул согласно изобретению в растениях, растительных клетках и других клетках-хозяевах, отличных от клеток человека. Кассеты экспрессии содержат промотор, экспрессируемый в растении, растительной клетке или других представляющих интерес клетках-хозяевах, оперативно связанный с молекулой полинуклеотида согласно изобретению, которая кодирует резистентный к гербицидам белок AHASL. В случае необходимости целенаправленной экспрессии в хлоропласте кассета экспрессии также может содержать оперативно связанную направляющую в хлоропласт последовательность, которая кодирует транзитный пептид хлоропласта, чтобы направить экспрессированный белок AHASL в хлоропласт.

Кассеты экспрессии согласно изобретению применимы в способе повышения устойчивости к гербицидам растения или клетки-хозяина. Способ заключается в трансформации растения или клетки-хозяина кассетой экспрессии согласно изобретению, при этом кассета экспрессии содержит промотор, экспрессируемый в представляющем интерес растения или клетке-хозяине, и промотор оперативно связан с полинуклеотидом согласно изобретению, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую резистентный к гербицидам белок AHASL1 согласно изобретению. Кроме того, способ включает в себя регенерацию трансформированного растения из трансформированной растительной клетки.

Использование в настоящем описании термина "полинуклеотидные конструкции" не означает ограничение настоящего изобретения полинуклеотидными конструкциями, содержащими ДНК. Специалистам в данной области будет понятно, что полинуклеотидные конструкции, в частности, полинуклеотиды и олигонуклеотиды, состоящие из рибонуклеотидов и сочетаний рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов также могут быть использованы в способах, раскрытых в настоящем описании. Таким образом, полинуклеотидные конструкции согласно настоящему изобретению охватывают все полинуклеотидные конструкции, которые могут быть использованы в способах согласно настоящему изобретению для трансформации растений, включая без ограничения полинуклеотидные конструкции, состоящие из де-

зоксирибонуклеотидов, рибонуклеотидов и их сочетаний. Такие дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды включают как встречающиеся в природе молекулы, так и синтетические аналоги. Полинуклеотидные конструкции согласно изобретению также охватывают все формы полинуклеотидных конструкций, включая без ограничения однонитевые формы, двунитевые формы, шпильки, структуры типа "стебель-петля" и тому подобное. Кроме того, специалистам в данной области понятно, что каждая из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящей публикации, также охватывает комплемент такой описанной нуклеотидной последовательности.

Кроме того, понятно, что в способах согласно изобретению может быть использована полинуклеотидная конструкция, которая способна в трансформированном растении управлять экспрессией по меньшей мере одного белка или по меньшей мере одной РНК, такой как, например, антисмысловая РНК, которая комплементарна по меньшей мере части мРНК. Обычно такая полинуклеотидная конструкция состоит из последовательности, кодирующей белок или РНК, оперативно связанной с 5'- и 3'-областями регуляции транскрипции. Альтернативно также понятно, что в способах согласно изобретению можно использовать полинуклеотидную конструкцию, которая не способна управлять экспрессией белка или РНК в трансформированном растении.

Кроме того, понятно что для экспрессии полинуклеотидов согласно изобретению в представляющей интерес клетке-хозяине полинуклеотид обычно оперативно связан с промотором, который способен управлять экспрессией гена в представляющей интерес клетке-хозяине. Способы согласно изобретению для экспрессии полинуклеотидов в клетках-хозяевах не зависят от конкретного промотора. Способы охватывают применение любого промотора, который известен в данной области и который способен управлять экспрессией гена в представляющей интерес клетке-хозяине.

Настоящее изобретение охватывает молекулы полинуклеотидов АНАSL1 и их фрагменты и варианты. Молекулы полинуклеотидов, которые представляют собой фрагменты таких нуклеотидных последовательностей, также входят в объем настоящего изобретения. "Фрагмент" означает часть нуклеотидной последовательности, кодирующую белок АНАSL1 согласно изобретению. Фрагмент нуклеотидной последовательности АНАSL1 согласно изобретению может кодировать биологически активную часть белка АНАSL1 или может представлять собой фрагмент, который может быть использован в качестве зонда для гибридизации или праймера ПЦР с использованием описанных ниже способов. Биологически активная часть белка АНАSL1 может быть получена посредством выделения части одной из нуклеотидных последовательностей АНАSL1 согласно изобретению, экспрессии кодируемой части белка АНАSL1 (например, в результате экспрессии рекомбинантов *in vitro*) и оценки активности кодируемой части белка АНАSL1. Молекулы полинуклеотидов, которые представляют собой фрагменты нуклеотидной последовательности АНАSL1, содержат по меньшей мере примерно 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850 или 900 нуклеотидов, или вплоть до количества нуклеотидов, присутствующих в полноразмерной нуклеотидной последовательности, раскрытой в настоящем описании, в зависимости от предполагаемого применения.

Фрагмент нуклеотидной последовательности АНАSL1, которая кодирует биологически активную часть белка АНАSL1 согласно изобретению будет кодировать, по меньшей мере, примерно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 или 250 соседних аминокислот или вплоть до общего количества аминокислот, присутствующих в полноразмерном белке АНАSL1 согласно изобретению. Фрагменты нуклеотидной последовательности АНАSL1, которые применимы в качестве зондов гибридизации для ПЦР-праймеров обычно не должны кодировать биологически активную часть белка АНАSL1.

Молекулы полинуклеотидов, которые представляют собой варианты нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящей публикации, также входят в объем настоящего изобретения. К "вариантам" нуклеотидных последовательностей АНАSL1 согласно изобретению относятся последовательности, которые кодируют белки АНАSL1, описанные в настоящей публикации, но которые имеют консервативные отличия вследствие вырожденности генетического кода. Такие встречающиеся в природе аллельные варианты могут быть идентифицированы с использованием хорошо известных способов молекулярной биологии, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и способы гибридизации, которые описаны ниже. Варианты нуклеотидных последовательностей также включают синтетически полученные нуклеотидные последовательности, которые были созданы, например, с использованием сайт-специфичного мутагенеза, но которые все еще кодируют белок АНАSL1, раскрытый в настоящем изобретении, как обсуждается ниже. Обычно варианты нуклеотидных последовательностей согласно изобретению будут по меньшей мере примерно на 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны конкретной нуклеотидной последовательности, раскрытой в настоящем описании. Вариант нуклеотидной последовательности АНАSL1 будет кодировать белок АНАSL1, соответственно, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности белка АНАSL1, раскрытого в настоящем описании.

Кроме того, специалисту будет понятно, что изменения могут быть введены в результате мутации в нуклеотидных последовательностях согласно изобретению, таким образом приводящих к изменениям в аминокислотной последовательности кодируемых белков АНАSL1 без изменения биологической активности белков АНАSL1. Таким образом, изолированная молекула полинуклеотида, кодирующего белок

AHASL1, имеющий последовательность, которая отличается от последовательности, указанной в SEQ ID NO: 11, может быть создана введением одной или нескольких нуклеотидных замен, добавлений или делеций в соответствующую нуклеотидную последовательность, описанную в настоящей публикации, так что одна или несколько аминокислотных замен, добавлений или делеций вводится в кодируемый белок. Мутации могут быть введены стандартными способами, такими как сайт-специфичный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие варианты нуклеотидных последовательностей также входят в объем настоящего изобретения.

Например, предпочтительно консервативные аминокислотные замены могут быть осуществлены в одном или нескольких вычисленных несущественных аминокислотных остатках.

"Несущественным" аминокислотным остатком является остаток, который может быть изменен по сравнению с последовательностью дикого типа белка AHASL1 (например, последовательностью SEQ ID NO: 1) без изменения биологической активности, тогда как "существенный" аминокислотный остаток необходим для биологической активности. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, в случае которой аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области. Такие семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Такие замены не могут быть осуществлены в случае консервативных аминокислотных остатков или в случае аминокислотных остатков, находящихся в консервативном мотиве.

Белки согласно изобретению могут быть изменены различными путями, включая аминокислотные замены, делеции, укорочения и инсерции. Способы таких обработок, в общем, известны в данной области. Например, варианты аминокислотных последовательностей белков AHASL1 могут быть получены в результате мутаций в ДНК. Способы мутагенеза и изменений нуклеотидных последовательностей хорошо известны в данной области. Смотрите, например, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154: 367-382; патент США № 4873192; Walker и Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) и приведенные в указанных публикациях ссылки. Инструкции по поводу соответствующих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес белка, можно найти в описании модели Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), включенном в настоящее описание в виде ссылки. Предпочтительными могут быть консервативные замены, такие как замена одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные свойства.

Альтернативно варианты нуклеотидных последовательностей AHASL1 могут быть получены в результате случайного введения мутаций на протяжении всей или части кодирующей последовательности AHASL1, например с помощью насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу в отношении активности AHAS, чтобы идентифицировать мутанты, которые сохраняют активность AHAS, включая резистентную к гербицидам активность AHAS. После мутагенеза кодируемый белок может быть экспрессирован рекомбинантно, и активность белка может быть определена стандартными способами анализа.

Таким образом, нуклеотидные последовательности согласно изобретению включают последовательности, раскрытые в настоящем описании, а также их фрагменты и варианты. Нуклеотидные последовательности AHASL1 согласно изобретению и их фрагменты и варианты могут быть использованы в качестве зондов и/или праймеров для идентификации и/или клонирования гомологов AHASL в других растениях. Такие зонды могут быть использованы для выявления транскриптов или геномных последовательностей, кодирующих одинаковые или идентичные белки.

Таким образом, способы, такие как ПЦР, гибридизация и тому подобные, могут быть использованы для идентификации таких последовательностей, имеющих значительную идентичность с последовательностями согласно изобретению. См., например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) и Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY). Нуклеотидные последовательности AHASL, выделенные на основе идентичности их последовательности с нуклеотидными последовательностями AHASL1, указанными в настоящем описании, или их фрагменты и варианты входят в объем настоящего изобретения.

В способе гибридизации вся или часть известной нуклеотидной последовательности AHASL1 может быть использована для скрининга кДНК или геномных библиотек. Способы конструирования такой кДНК и геномных библиотек, в общем, известны в данной области и описаны в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY). Так называемые зонды гибридизации могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, фрагменты

кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды, и их можно метить регистрируемой группой, такой как  $^{32}\text{P}$  или любым другим регистрируемым маркером, таким как другие радиоизотопы, флуоресцирующее соединение, фермент или кофактор фермента. Зонды для гибридизации могут быть получены мечением синтетических олигонуклеотидов, основанных на известной нуклеотидной последовательности AHASL1, описанной в настоящей публикации. Кроме того, могут быть использованы вырожденные праймеры, сконструированные на основе консервативных нуклеотидов или аминокислотных остатков в известной нуклеотидной последовательности AHASL1. Зонд обычно содержит область нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в жестких условиях, по меньшей мере примерно с 12, предпочтительно примерно с 25, более предпочтительно примерно с 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 следующих друг за другом нуклеотидов нуклеотидной последовательности AHASL1 согласно изобретению или ее фрагмента или варианта. Получение зондов для гибридизации в общем известно в данной области и описано в публикации Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), включенной в настоящее описание в виде ссылки.

Например, полная последовательность AHASL1, описанная в настоящей публикации, или одна или несколько из ее частей могут быть использованы в качестве зонда, способного специфично гибридизоваться с соответствующими последовательностями AHASL1 и матричными РНК. Способы гибридизации включают основанный на гибридизации скрининг посеянных на чашках библиотек ДНК (либо блюшек, либо колоний; смотрите, например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Гибридизацию таких последовательностей можно осуществлять в жестких условиях. Под "жесткими условиями" или "жесткими условиями гибридизации" подразумевают условия, в которых зонд будет гибридизоваться с своей последовательностью-мишенью в регистрируемо более высокой степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза выше фона). Условия жесткости зависят от последовательности и будут отличаться в разных случаях.

Обычно жесткие условия могут представлять собой условия, при которых концентрация соли меньше чем примерно 1,5 М иона Na, обычно концентрация соли составляет примерно от 0,01 до 1,0 М ионов Na (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, и температура составляет по меньшей мере примерно 30°C в случае коротких зондов (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере примерно 60°C в случае длинных зондов (например, больше 50 нуклеотидов). Жестких условий также можно достичь с помощью добавления дестабилизирующих средств, таких как формамид. Примеры условий низкой жесткости включают гибридизацию с использованием буферного раствора, содержащего от 30 до 35% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрия), при 37°C и промывку в  $1 \times - 2 \times$  SSC ( $20 \times$  SSC = 3,0 М NaCl/0,3 М цитрат тринатрия) при 50-55°C. Примеры условий умеренной жесткости включают гибридизацию в 40-45% формамиде, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в  $0,5 \times - 1 \times$  SSC при 55-60°. Примеры условий высокой жесткости включают гибридизацию в 50% формамиде, 1 М NaCl, 1% SDS при 37°C и промывку в  $0,1 \times$  SSC при 60-65°C. Необязательно буферы для промывки содержат примерно от 0,1 до примерно 1% SDS. Продолжительность гибридизации обычно составляет менее чем примерно 24 ч, обычно примерно от 4 до примерно 12 ч.

Специфичность обычно зависит от промывок после гибридизации, при этом решающими факторами являются ионная сила и температура конечного раствора для промывки. В случае гибридов ДНК-ДНК  $T_m$  может быть аппроксимирована из уравнения Meinkoth и Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138: 267-284:  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$ ; где M означает молярность одновалентных катионов, %GC означает процентное содержание гуанозинового и цитозинового нуклеотидов в ДНК, % form означает процентное содержание формамида в растворе для гибридизации, и L означает длину гибрида в парах нуклеотидов.  $T_m$  означает температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной последовательности-мишени гибридизуется с идеально совпадающим зондом.  $T_m$  снижают примерно на 1°C для каждого 1% ошибочных спариваний; таким образом,  $T_m$ , условия гибридизации и/или промывки можно корректировать для последовательностей, имеющих требуемую идентичность. Например, если необходимо найти последовательности с >90% идентичностью, то  $T_m$  может быть снижена на 10°C. Обычно условия жесткости выбирают так, чтобы температура была на 5°C ниже, чем температура точки плавления ( $T_m$ ) для конкретной последовательности и ее комплемента при определенной ионной силе и pH. Однако при очень жестких условиях можно использовать гибридизацию и/или промывку при температуре на 1, 2, 3 или 4°C ниже, чем температура точки плавления ( $T_m$ ); в случае умеренно жестких условиях можно использовать гибридизацию и/или промывку при температуре на 6, 7, 8, 9 или 10°C ниже, чем температура точки плавления ( $T_m$ ); в случае условий низкой жесткости можно использовать гибридизацию и/или промывку при температуре на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже, чем температура точки плавления ( $T_m$ ). При использовании уравнения, составов для гибридизации и промывки и требуемой  $T_m$  специалистам в данной области будет понятно, что варианты жесткости растворов для гибридизации и/или промывки по сути описаны. Если требуемая степень ошибочного спаривания приводит к  $T_m$  менее чем 45°C (водный раствор) или 32°C (раствор формамида), то предпочти-

тельно увеличить концентрацию SSC так, чтобы можно было использовать более высокую температуру.

Всестороннее руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в публикации Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); и Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Смотрите Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Понятно, что молекулы полинуклеотидов и белки согласно изобретению охватывают молекулы полинуклеотидов и белки, содержащие нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которая в достаточной степени идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и/или 15 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 4 и/или 5. Термин "в значительной степени идентичный" используют в настоящем описании по отношению к первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное количество идентичных или эквивалентных (например, со сходной боковой цепью) аминокислотных остатков или нуклеотидов по сравнению со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью, так что первая и вторая аминокислотные или нуклеотидные последовательности имеют общий структурный домен и/или обладают общей функциональной активностью. Например, аминокислотные или нуклеотидные последовательности, которые содержат общий структурный домен, имеющие, по меньшей мере примерно 45, 55 или 65% идентичность, предпочтительно 75% идентичность, более предпочтительно 85, 95 или 98% идентичность, определяют в настоящем описании как идентичные в достаточной степени.

Чтобы определить идентичность в процентах двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения. Идентичность в процентах между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, имеющих в последовательностях (т.е. идентичность в процентах равно количеству идентичных положений/общее количество положений (например, перекрывающихся положений) $\times 100$ ). В одном варианте две последовательности имеют одинаковую длину. Идентичность в процентах между двумя последовательностями может быть определена с помощью способов, подобных способам, описанным ниже, с учетом или без учета пробелов. При расчете идентичности в процентах обычно подсчитывают точные совпадения.

Определение идентичности в процентах между двумя последовательностями можно осуществить, используя математический алгоритм. Предпочтительным не ограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм, описанный в Karlin и Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264, модифицированный как описано в Karlin и Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403. Поиски нуклеотидов BLAST могут быть осуществлены с использованием программы NBLAST, счет равен 100, длина слова равна 12, чтобы получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам полинуклеотидов согласно изобретению. Поиски белков BLAST могут быть осуществлены с использованием программы XBLAST, счет равен 50, длина слова равна 3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам белков согласно изобретению. Чтобы получить выравнивания с пробелами в целях сравнения, можно использовать Gapped BLAST, который описан в Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389. Альтернативно можно использовать PSI-Blast, чтобы осуществить итерационный поиск, который позволяет выявлять отдаленные взаимосвязи между молекулами. Смотрите Altschul et al. (1997) выше. В случае применения программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным не ограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм, описанный в Myers и Miller (1988) *CABIOS* 4: 11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета компьютерных программ для выравнивания последовательностей GCG. В случае применения программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать матрицу весов остатков PAM120, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4. Выравнивание также можно осуществлять вручную с помощью просмотра.

Если не указано иное, значения идентичности/сходства последовательностей, приведенные в настоящем описании, относятся к значению, полученному с использованием полноразмерных последовательностей согласно изобретению и с использованием множественного выравнивания с помощью алгоритма Clustal W (*Nucleic Acid Research*, 22(22): 4673-4680, 1994), используя программу AlignX, входящую в пакет компьютерных программ Vector NTI, версия 9 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) с параметрами по умолчанию; или любую эквивалентную программу. Под "эквивалентной программой" подразумевают любую программу для сравнения последовательностей, которая в случае любых двух рассматриваемых последовательностей осуществляет выравнивание, дающее идентичные совпадения нуклеотидов или аминокислотных остатков и одинаковую идентичность последовательностей в процентах в сравнении с соответствующим выравниванием, осуществляемым с помощью AlignX, входящей в пакет компьютерных программ Vector NTI, версия 9.

Нуклеотидные последовательности AHASL1 согласно изобретению включают как встречающиеся в

природе последовательности, так и мутантные формы, в частности мутантные формы, которые кодируют белки AHASL1, обладающие резистентной к гербицидам AHAS-активностью. Подобным образом белки согласно изобретению охватывают как встречающиеся в природе белки, так и их варианты и модифицированные формы. Такие варианты продолжают обладать требуемой AHAS-активностью. Очевидно что мутации, которые могут быть осуществлены в ДНК, кодирующей вариант, не должны выводить последовательность из рамки считывания и предпочтительно не будут создавать комплементарные области, которые могут вызывать образование вторичной структуры мРНК. См. заявку на выдачу патента EP № 75444.

Предполагается, что делеции, инсерции и замены последовательностей белков, входящих в настоящее изобретение, не вызывают коренных изменений свойств белка. Однако в том случае, когда трудно предсказать точный эффект замены, делеции или инсерции до их осуществления, специалисту в данной области будет понятно, что эффект можно оценить в обычных скрининговых анализах. То есть активность можно оценить с помощью анализов активности AHAS. Смотрите, например, публикацию Singh et al. (1988) *Anal. Biochem.* 171: 173-179, включенную в настоящее описание в виде ссылки.

Варианты нуклеотидной последовательности и белки также охватывают последовательности и белки, полученные с помощью способов мутагенеза и рекомбинации, таких как перетасовка ДНК. В случае такого способа одну или несколько разных кодирующих последовательностей AHASL можно подвергнуть обработке, чтобы создать новый белок AHASL, обладающий требуемыми свойствами. Таким образом создают библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов из популяции родственных полинуклеотидных последовательностей, содержащих области последовательности, которые обладают существенной идентичностью и могут быть подвергнуты гомологичной рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Например, с использованием указанного способа мотивы последовательности, кодирующие представляющий интерес домен, могут быть перетасованы между геном AHASL1 согласно изобретению и другими известными генами AHASL, чтобы получить новый ген, кодирующий белок с улучшенным представляющим интерес свойством, таким как повышенный  $K_m$  в случае фермента. Методики такой перетасовки ДНК известны в данной области. Смотрите, например, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370: 389-391; Crameri et al. (1997) *Nature Biotech.* 15: 436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272: 336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4504-4509; Crameri et al. (1998) *Nature* 391: 288-291 и патенты США № 5605793 и 5837458.

Нуклеотидные последовательности согласно изобретению могут быть использованы для выделения соответствующих последовательностей из других организмов, в частности из других растений, более конкретно других двудольных растений. Таким образом, способы, такие как ПЦР, гибридизация и тому подобные, могут быть использованы для идентификации таких последовательностей на основе гомологии их последовательностей с последовательностями, указанными в настоящем описании. Последовательности, выделенные на основе идентичности их последовательностей с полными последовательностями AHASL1, указанными в настоящем описании, или с их фрагментами, входят в объем настоящего изобретения. Таким образом, изолированные последовательности, которые кодируют белок AHASL и которые гибридизуются в жестких условиях с последовательностью, описанной в настоящей публикации, или с ее фрагментами, входят в объем настоящего изобретения.

В случае применения способа ПЦР могут быть сконструированы олигонуклеотидные праймеры для использования в реакциях ПЦР, чтобы амплифицировать соответствующие последовательности ДНК из кДНК или геномной ДНК, экстрагированной из любого представляющего интерес растения. Способы конструирования праймеров для ПЦР и ПЦР-клонирования, в общем, известны в данной области и описаны в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York). See also Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); и Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Известные способы ПЦР включают без ограничения способы с использованием спаренных праймеров, вложенных праймеров, отдельных специфичных праймеров, вырожденных праймеров, специфичных для гена праймеров, специфичных для вектора праймеров, частично ошибочно спариваемых праймеров и тому подобных.

Полинуклеотидные последовательности AHASL1 согласно изобретению предлагаются в кассетах экспрессии для экспрессии в представляющем интерес растении. Кассета будет содержать 5'- и 3'-регуляторные последовательности, оперативно связанные с полинуклеотидной последовательностью AHASL1 согласно изобретению. Под "оперативно связанной" подразумевается функциональная связь между промотором и второй последовательностью, при этом промоторная последовательность инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Обычно оперативно связанная означает, что связанные последовательности нуклеиновой кислоты являются соседними и, в случае необходимости связать две кодирующие белки области, являются соседними и находящимися в одной и той же рамке считывания. Кассета дополнительно может содержать, по меньшей мере, один дополнительный ген, который необходим для котрансформации организма. Альтернативно дополнительный ген (гены) может находиться в кассетах для множественной экспрессии.

Такая кассета экспрессии снабжена множеством сайтов рестрикции для инсерции полинуклеотид-

ной последовательности AHASL1 под транскрипционным контролем регуляторных областей. Кассета экспрессии дополнительно может содержать гены селективируемых маркеров.

Кассета экспрессии может содержать в 5'-3'-направлении транскрипции область инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), полинуклеотидную последовательность AHASL1 согласно изобретению и область терминации транскрипции и трансляции (т.е. область терминации), функционирующие в растениях. Промотор может быть нативным или аналогичным или чужеродным или гетерологичным по отношению к растению-хозяину и/или полинуклеотидной последовательности AHASL1 согласно изобретению. Кроме того, промотор может представлять собой природную последовательность или альтернативно синтетическую последовательность. В том случае, когда промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" по отношению к растению-хозяину, подразумевается, что промотор не встречается в нативном растении, в которое вводят промотор. В то случае, когда промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" по отношению к полинуклеотидной последовательности AHASL1 согласно изобретению, подразумевается, что промотор не является нативным или встречающимся в природе промотором для оперативно связанной полинуклеотидной последовательности AHASL1 согласно изобретению. В используемом в настоящем описании смысле химерный ген содержит кодирующую последовательность оперативно, связанную с областью инициации транскрипции, которая является гетерологичной по отношению к кодирующей последовательности.

Хотя предпочтительно можно экспрессировать полинуклеотиды AHASL1 согласно изобретению с использованием гетерологичных промоторов, можно использовать нативные промоторные последовательности. Такие конструкции могут изменять уровни экспрессии белка AHASL1 в растении или растительной клетке. Таким образом, изменяется фенотип растения или растительной клетки.

Область терминации может быть нативной по отношению к области инициации транскрипции, может быть нативной по отношению к оперативно связанной представляющей интерес последовательности AHASL1, может быть нативной по отношению к растению-хозяину или может быть получена из другого источника (т.е. быть чужеродной или гетерологичной по отношению к промотору, представляющей интерес полинуклеотидной последовательности AHASL1, растению-хозяину или любому их сочетанию). Подходящие области терминации доступны из Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, такие как области терминации октопинситазы и нопалинситазы. Смотрите также Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64: 671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91: 151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891-7903; и Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15: 9627-9639.

В подходящих случаях ген (гены) могут быть оптимизированы для повышенной экспрессии в трансформированном растении. То есть гены могут быть синтезированы с использованием предпочтительных для растения кодонов для повышенной экспрессии. Смотрите, например, публикацию Campbell и Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11, в которой обсуждается предпочтительное для хозяина использованием кодонов. В данной области имеются способы синтеза предпочтительных для растения генов. См., например, патенты США № 5380831 и 5436391 и Murtagy et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498, включенные в настоящее описание в виде ссылки.

Известно, что дополнительные модификации последовательности усиливают экспрессию генов в клетке-хозяине. Такие модификации включают исключение последовательностей, кодирующих ложные сигналы полиаденилирования, сигналов сайтов экзон-интронного сплайсинга, подобных транспозонам повторов и других хорошо охарактеризованных последовательностей, которые вредить экспрессии генов. Содержание G-C в последовательности можно корректировать до средних уровней для данной клетки-хозяина, которые рассчитывают на основании известных генов, экспрессируемых в клетке-хозяине. Когда это возможно, последовательность модифицируют так, чтобы избежать образования предполагаемых вторичных структур мРНК в виде шпилек.

Нуклеотидные последовательности для усиления экспрессии генов также могут быть использованы в экспрессирующих векторах растений. К таким последовательностям относятся интроны гена *AdhI intron1* кукурузы (Callis et al. *Genes and Development* 1: 1183-1200, 1987) и лидерные последовательности (W-последовательность) из вируса мозаики табака (TMV), вируса хлоротической пятнистости кукурузы и вируса мозаики люцерны (Gallie et al. *Nucleic Acid Res.* 15: 8693-8711, 1987 и Skuzeski et al. *Растение Mol. Biol.* 15: 65-79, 1990). Показано, что первый интрон из локуса *shrunkent-1* кукурузы увеличивает экспрессию генов в химерных генных конструкциях. В патентах США № 5424412 и 5593874 раскрыто применение специфичных интронов в экспрессирующих генных конструкциях и в Gallie et al. (*Plant Physiol.* 106: 929-939, 1994) также показано, что интроны применимы для регуляции экспрессии генов на тканеспецифичной основе. Чтобы дополнительно усилить или оптимизировать экспрессию гена малой субъединицы AHAS, экспрессирующие векторы растений согласно изобретению также могут содержать последовательности ДНК, содержащие области прикрепления к матриксу (MAR). Растительные клетки, трансформированные такими модифицированными системами экспрессии, затем могут осуществлять сверхэкспрессию или конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности согласно изобретению.

Кассеты экспрессии дополнительно могут содержать 5'-лидерные последовательности в конструк-

ции кассеты экспрессии.

Такие лидерные последовательности могут действовать, усиливая трансляцию. Лидеры трансляции известны в данной области и включают лидеры пикорнавирусов, например, лидер EMCV (5'-некодирующая область энцефаломиокардита) (Elroy-Stein et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6126-6130); лидеры потивирусов, например, лидер TEV (вируса гравировки табака) (Gallie et al. (1995) Gene 165(2): 233-238), лидер MDMV (вируса карликовой мозаики кукурузы) (Virology 154: 9-20) и белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина человека (BiP) (Macejak et al. (1991) Nature 353: 90-94); не-транслируемый лидер из мРНК белка оболочки вируса мозаики люцерны (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) Nature 325: 622-625); лидер вируса мозаики табака (TMV) (Gallie et al. (1989) в Molecular Biology of RNA, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256) и лидер вируса хлоротической пятнистости кукурузы (MCMV) (Lommel et al. (1991) Virology 81: 382-385). Также смотрите Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84: 965-968. Также можно использовать другие способы, которые, как известно, усиливают трансляцию, например, с использованием интронов и тому подобного.

При получении кассеты экспрессии можно подвергать обработке различные фрагменты ДНК так, чтобы получить последовательности ДНК в правильной ориентации и, в соответствующем случае, в правильной рамке считывания. Для этой цели можно использовать адаптеры и линкеры, чтобы связать фрагменты ДНК, или можно использовать другие манипуляции, чтобы ввести подходящие сайты рестрикции, удалить избыточную ДНК, удалить сайты рестрикции или тому подобное. Для указанной цели можно использовать мутагенез *in vitro*, репарацию с праймерами, рестрикцию, отжиг, повторные замены, например транзиции и трансверсии.

Ряд промоторов можно использовать при практическом осуществлении изобретения. Промоторы могут быть выбраны на основе требуемого результата. Нуклеиновые кислоты можно сочетать с конститутивными, предпочтительными для определенной ткани или другими промоторами для экспрессии в растениях.

Такие конститутивные промоторы включают, например, коровый промотор промотора Rsyn7 и другие конститутивные промоторы, описанные в WO 99/43838 и патенте США № 6072050; коровый промотор CaMV 35S (Odell et al. (1985) Nature 313: 810-812); промотор актина риса (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2: 163-171); убиквитина (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 619-632 и Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689); pEMU (Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 581-588); MAS (Velten et al. (1984) EMBO J. 3: 2723-2730); промотор ALS (патент США № 5659026) и тому подобные. Другие конститутивные промоторы включают, например, промоторы, описанные в патентах США №№ 5608149, 5608144, 5604121, 5569597, 5466785, 5399680, 5268463, 5608142 и 6177611.

Предпочтительные для ткани промоторы могут быть использованы для обеспечения целенаправленной усиленной экспрессии AHASL1 в конкретной растительной ткани. Такие предпочтительные для ткани промоторы включают без ограничения предпочтительные для листьев промоторы, предпочтительные для корней промоторы, предпочтительные для семян промоторы и предпочтительные для стебля промоторы. Предпочтительные для ткани промоторы описаны в Yamamoto et al. (1997) Plant J. 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) Plant Cell Physiol. 38 (7):792-803; Hansen et al. (1997) Mol. Gen Genet. 254(3): 337-343; Russell et al. (1997) Transgenic Res. 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996) Plant Physiol. 112(3): 1331-1341; Van Camp et al. (1996) Plant Physiol. 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) Plant Physiol. 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) Plant Cell Physiol. 35 (5):773-778; Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 181-196; Orozco et al. (1993) Plant Mol Biol. 23 (6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90(20): 9586-9590 и Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J. 4(3):495-505. Такие промоторы при необходимости могут быть модифицированы в отношении слабой экспрессии.

В одном варианте представляющие интерес нуклеиновые кислоты направляют в мишень - хлоропласт, для экспрессии. Таким образом, когда представляющая интерес нуклеиновая кислота непосредственно не встроена в хлоропласт, кассета экспрессии будет дополнительно содержать направляющую в хлоропласт последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует транзитный пептид хлоропласта, для того, чтобы направить продукт представляющего интерес гена в хлоропласты. Такие транзитные пептиды известны в данной области. Что касается направляющих в хлоропласт последовательностей, то "оперативно связанная" означает, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая транзитный пептид (т.е. направляющая в хлоропласт последовательность), связана с полинуклеотидом AHASL1 согласно изобретению так, что две последовательности непосредственно следуют друг за другом и находятся в одной и той же рамке считывания. См., например, Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104-126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84: 965-968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414-1421; и Shah et al. (1986) Science 233: 478-481. Хотя белки AHASL1 согласно изобретению включают в себя нативный транзитный пептид хлоропласта, любой транзитный пептид хлоропласта, известный в данной области, может быть слит с аминокислотной последовательностью зрелого белка AHASL1 согласно изобретению посредством оперативного связывания направляющей в хлоропласт последовательности с 5'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелый белок AHASL1 согласно изобретению.

Направляющие в хлоропласт последовательности известны в данной области и включают малую

субъединицу рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилазы хлоропласта (Rubisco) (de Castro Silva Filho et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 30: 769-780; Schnell et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(5): 3335-3342); 5-(енолпирувил)шикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS) (Archer et al. (1990) *J. Bioenerg. Biomemb.* 22(6): 789-810); триптофансинтазу (Zhao et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270(11): 6081-6087); пластоцианин (Lawrence et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(33): 20357-20363); хоризматсинтазу (Schmidt et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268(36): 27447-27457); и светособирающий хлорофилл a/b-связывающий белок (LHBP) (Lamppa et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14996-14999). Смотрите также Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84: 965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421; и Shah et al. (1986) *Science* 233: 478-481.

Способы трансформации хлоропластов известны в данной области. Смотрите, например, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8526-8530; Svab и Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917; Svab и Maliga (1993) *EMBOJ.* 12: 601-606. Способ основан на использовании пушки для частиц для доставки ДНК, содержащей селективируемый маркер, и целенаправленного встраивания ДНК в геном пластида с помощью гомологичной рекомбинации. Кроме того, трансформация пластов может быть осуществлена посредством транскрипции молчащего трансгена, который несут пластыды, в результате тканеспецифичной экспрессии кодируемой в ядре и направленной в пластыды РНК-полимеразы. Такая система описана в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7301-7305.

Представляющие интерес нуклеиновые кислоты, которые необходимо направить в хлоропласт, могут быть оптимизированы для экспрессии в хлоропласте с учетом различий в использовании кодонов между ядром растения и данным органоидом. Таким образом, представляющие интерес нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы с использованием предпочтительных для хлоропластов кодонов. См., например, патент США № 5380831, включенный в настоящее описание в виде ссылки.

Как указано в настоящем описании, нуклеотидные последовательности ANASL1 согласно изобретению применимы для усиления устойчивости к гербицидам растений, которые содержат в своих геномах ген, кодирующий устойчивый к гербицидам белок ANASL1. Такой ген может представлять собой эндогенный ген или трансген. Кроме того, в некоторых вариантах последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению можно комплектовать с любым сочетанием представляющих интерес полинуклеотидных последовательностей, чтобы создать растения с требуемым фенотипом. Например, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению можно сочетать с любыми другими полинуклеотидами, кодирующими полипептиды, обладающие пестицидной и/или инсектицидной активностью, такие как, например, белки токсины *Bacillus thuringiensis* (описанные в патентах США №№ 5366892, 5747450, 5737514, 5723756, 5593881 и Geiser et al. (1986) *Gene* 48: 109). Полученные комбинации также могут включать в себя множественные копии любого одного из представляющих интерес полинуклеотидов.

Понятно, что наряду с такими нуклеотидными последовательностями могут быть сконструированы антисмысловые конструкции, комплементарные, по меньшей мере, части полинуклеотидных последовательностей матричной РНК (мРНК) для ANASL1. Антисмысловые нуклеотиды конструируют для гибридизации с соответствующими мРНК. Могут быть осуществлены модификации антисмысловых последовательностей при условии, что последовательности гибридизуются и препятствуют экспрессии соответствующей мРНК. Таким образом, могут быть использованы антисмысловые конструкции, имеющие 70%, предпочтительно 80%, более предпочтительно 85% идентичность последовательности с соответствующими антисмысловыми последовательностями. Кроме того, части антисмысловых нуклеотидов могут быть использованы для нарушения экспрессии гена-мишени. Обычно можно использовать последовательности длиной по меньшей мере 50, 100, 200 нуклеотидов или больше.

Нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению также можно использовать в смысловой ориентации, чтобы подавить экспрессию эндогенных генов в растениях. Способы подавления экспрессии генов в растениях с использованием нуклеотидных последовательностей в смысловой ориентации известны в данной области. Способы обычно включают в себя трансформацию растений конструкцией ДНК, содержащей промотор, который управляет экспрессией в растении, оперативно связанный, по меньшей мере, с частью нуклеотидной последовательности, которая соответствует транскрипту эндогенного гена. Обычно такая нуклеотидная последовательность имеет значительную идентичность последовательности с последовательностью транскрипта эндогенного гена, предпочтительно больше чем примерно 65% идентичность последовательности, более предпочтительно больше чем примерно 85% идентичность последовательности, наиболее предпочтительно больше чем примерно 95% идентичность последовательности. См. патенты США № 5283184 и 5034323, включенные в настоящее описание в виде ссылки.

Хотя резистентные к гербицидам полинуклеотиды ANASL1 согласно изобретению применимы в качестве генов селективируемых маркеров для трансформации растений, кассеты экспрессии согласно изобретению могут содержать другой ген селективируемого маркера для селекции трансформированных клеток. Гены селективируемых маркеров, включая гены согласно настоящему изобретению, применяют для селекции трансформированных клеток или тканей. Маркерные гены включают без ограничения гены,

кодирующие резистентность к антибиотикам, такие как гены, кодирующие неомисцинофосфотрансферазу II (NEO) и гигромицинофосфотрансферазу (HTR), а также гены, придающие резистентность к гербицидным соединениям, таким как глюофосинат аммония, бромоксилин, имидазолиноны и 2,4-дихлорфеноксиацетат (2,4-D). В общем, смотрите Yarranton(1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao et al. (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley et al. (1980) in *The Operon*, pp. 177-220; Hu et al. (1987) *Cell* 48:555-566; Brown et al. (1987) *Cell* 49:603-612; Figge et al. (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle et al. (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921; Labow et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Baim et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struct. Biol.* 10:143-162; Degenkolb et al. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva et al. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka et al. (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill et al. (1988) *Nature* 334:721-724.

Указанные публикации включены в настоящее описание в виде ссылки.

Приведенный выше список генов селективируемых маркеров не следует рассматривать как ограничивающий. В настоящем изобретении можно использовать любой ген селективируемого маркера.

Изолированные молекулы полинуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует белки AHASL1 согласно изобретению, можно использовать в векторах для трансформации растений, для того чтобы созданные растения имели повышенную резистентность к гербицидам, в частности, к имидазолиноновым гербицидам. Изолированные молекулы полинуклеотидов AHASL1 согласно изобретению можно использовать в векторах отдельно или в сочетании с нуклеотидной последовательностью, кодирующей малую субъединицу фермента AHAS (AHASS), для придания растениям резистентности к гербицидам. См. патент США № 6348643, который включен в настоящее описание в виде ссылки.

Таким образом, настоящее изобретение относится к векторам для трансформации, содержащим ген селективируемого маркера согласно изобретению. Ген селективируемого маркера содержит промотор, который управляет экспрессией в клетке-хозяине, оперативно связанный с полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, которая кодирует резистентный к гербицидам белок AHASL1 согласно изобретению. Вектор для трансформации дополнительно может содержать представляющий интерес ген, который необходимо экспрессировать в клетке-хозяине, а также, при необходимости, может содержать направляющую в хлоропласт последовательность, которая оперативно связана с полинуклеотидом согласно изобретению.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам применения векторов для трансформации согласно изобретению для селекции в отношении клеток, трансформированных представляющим интерес геном. Такие способы заключаются в трансформации клетки-хозяина трансформирующим вектором, воздействии на клетку определенным уровнем имидазолинонового или сульфонилмочевинного гербицида, который может убивать или ингибировать рост нетрансформированной клетки-хозяина, и идентификации трансформированной клетки-хозяина по ее способности расти в присутствии гербицида. В одном варианте согласно изобретению клетка-хозяин представляет собой растительную клетку, и ген селективируемого маркера содержит промотор, который управляет экспрессией в растительной клетке.

Векторы для трансформации согласно изобретению можно применять для получения растений, трансформированных представляющим интерес геном. Векторы для трансформации будут содержать ген селективируемого маркера согласно изобретению и представляющий интерес ген, который необходимо ввести и, как правило, экспрессировать в трансформированном растении. Такой ген селективируемого маркера содержит резистентный к гербицидам полинуклеотид AHASL1 согласно изобретению, оперативно связанный с промотором, который управляет экспрессией в клетке-хозяине. В случае применения в растениях и растительных клетках вектор для трансформации содержит ген селективируемого маркера, включающий в себя резистентный к гербицидам полинуклеотид AHASL1 полинуклеотид согласно изобретению, оперативно связанный с промотором, который управляет экспрессией в растительной клетке.

Изобретение также относится к экспрессирующему вектору растений, содержащему промотор, который управляет экспрессией в растении, оперативно связанный с изолированной молекулой полинуклеотида согласно изобретению. Изолированная молекула полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок AHASL1, в частности белок AHASL1, содержащий аминокислотную последовательность, которая указана в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 6, или ее функциональный фрагмент и вариант. Экспрессирующий вектор растений согласно изобретению не зависит от конкретного промотора, за исключением того, что такой промотор должен обладать способностью управлять экспрессией генов в растительной клетке. Предпочтительные промоторы включают конститутивные промоторы и предпочтительные для тканей промоторы.

Представляющие интерес гены согласно изобретению варьируют в зависимости от требуемого результата. Например, интерес могут представлять различные изменения фенотипа, включая модификацию состава жирных кислот в растении, изменение содержания аминокислот в растении, изменение механизмов защиты растения от насекомых и/или патогенов и тому подобные. Указанные результаты могут быть достигнуты в результате экспрессии гетерологичных продуктов или повышенной экспрессии эндогенных продуктов в растениях. Альтернативно результаты могут быть достигнуты в результате снижения экспрессии одного или нескольких эндогенных продуктов в растении, в частности, ферментов или кофакторов. Такие изменения приводят к изменению фенотипа трансформированного растения.

В одном варианте осуществления изобретения представляющими интерес генами являются гены резистентности к насекомым, например такие как гены белка токсина *Bacillus thuringiensis* (патенты США №№ 5366892, 5747450, 5736514, 5723756, 5593881 и Geiser et al. (1986) Gene 48: 109).

Белки или полипептиды AHASL1 согласно изобретению могут быть очищены, например, из растений *Brassica* и могут быть использованы в композициях. Также изолированная молекула полинуклеотида, кодирующего белок AHASL1 согласно изобретению, может быть использована для экспрессии белка AHASL1 согласно изобретению в микроорганизме, таком как *E. coli* или дрожжи. Экспрессированный белок AHASL1 можно очистить из экстрактов *E. coli* или дрожжей любым способом, известным специалисту в данной области.

Изобретение также относится к способу создания трансгенного растения, которое резистентно к гербицидам, включающему в себя трансформацию растения экспрессирующим вектором растений, содержащим промотор, который управляет экспрессией в растении, оперативно связанный с изолированной молекулой полинуклеотида согласно изобретению. Изолированная молекула полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок AHASL1 согласно изобретению, в частности белок AHASL1, содержащий аминокислотную последовательность, которая указана в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 6, аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15 или 16, или функциональный фрагмент и вариант указанных аминокислотных последовательностей.

Изобретение также относится к нетрансгенным растениям *Brassica*, трансгенным растениям, полученным способами согласно изобретению, и потомству и другим потомкам таких нетрансгенных и трансгенных растений, при этом растения обладают усиленной или повышенной резистентностью к гербицидам, которые отрицательно влияют на фермент AHAS, в частности, имидазолиновым и сульфониломочевинным гербицидам.

Полинуклеотиды AHASL1 согласно изобретению, в частности, полинуклеотиды, кодирующие резистентные к гербицидам белки AHASL1, применимы в способах усиления резистентности устойчивых к гербицидам растений. В одном варианте осуществления изобретения устойчивые к гербицидам растения содержат устойчивый к гербицидам или резистентный к гербицидам белок AHASL. Устойчивые к гербицидам растения включают как растения, трансформированные устойчивыми к гербицидам нуклеотидными последовательностями AHASL, так и растения, которые содержат в своих геномах эндогенный ген, который кодирует устойчивый к гербицидам белок AHASL. Такое устойчивое к гербицидам растение может представлять собой устойчивое к гербицидам растение, которое было генетически сконструировано для получения устойчивости к гербицидам, или устойчивое к гербицидам растение, которое было создано способами, в которых не используют рекомбинантную ДНК, например, такие как растения *Brassica* согласно настоящему изобретению. Нуклеотидные последовательности, кодирующие устойчивые к гербицидам белки AHASL, и устойчивые к гербицидам растения, содержащие эндогенный ген, который кодирует устойчивый к гербицидам белок AHASL, включают полинуклеотиды и растения согласно настоящему изобретению или полинуклеотиды и растения, которые известны в данной области. Смотрите, например, патенты США №№ 5013659, 5731180, 5767361, 5545822, 5736629, 5773703, 5773704, 5952553 и 6274796, которые все включены в настоящее описание в виде ссылки. Такие способы усиления резистентности устойчивых к гербицидам растений включают в себя трансформацию устойчивого к гербицидам растения, по меньшей мере, одной полинуклеотидной конструкцией, содержащей промотор, который управляет экспрессией в растительной клетке, который оперативно связан с резистентным к гербицидам полинуклеотидом AHASL1 согласно изобретению, в частности, полинуклеотидом, кодирующим резистентный к гербицидам белок AHASL1, указанный в SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15 или 16, полинуклеотидами, кодирующими аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 6, и фрагментами и вариантами указанных полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды, обладающие резистентной к гербицидам активностью AHAS. Растение, полученное таким способом обладает повышенной резистентностью по меньшей мере к одному гербициду по сравнению с резистентным к гербицидам растением до трансформации полинуклеотидной конструкцией согласно изобретению.

Доступны многочисленные векторы для трансформации растений и способы трансформации растений. См., например, An G. et al. (1986) *Plant Physiol.* 81: 301-305; Fry, J., et al. (1987) *Plant Cell Rep.* 6: 321-325; Block, M. (1988) *Theor. Appl Genet.* 16: 161-114; Hinchee, et al. (1990) *Stadler. Genet. Symp.* 203212.203-212; Cousins, et al. (1991) *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 481-494; Chee, P.P. и Slightom, J.L. (1992) *Gene.* 118: 255-260; Christou et al. (1992) *Trends. Biotechnol.* 10: 239-246; D'Halluin, et al. (1992)

Bio/Technol. 10: 309-314; Dhir, et al. (1992) Plant Physiol. 99: 81-88; Casas et al. (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 11212-11216; Christou, P. (1993) In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant; 29P: 119-124; Davies, et al. (1993) Plant Cell Rep. 12: 180-183; Dong, J.A. и Mchughen, A. (1993) Plant Sci. 91: 139-148; Franklin, C.I. и Trieu, T.N. (1993) Plant. Physiol. 102: 167; Golovkin, et al. (1993) Plant Sci. 90: 41-52; Guo Chin Sci. Bull. 38: 2072-2078; Asano, et al. (1994) Plant Cell Rep. 13; Ayeres N.M. и Park, W.D. (1994) Crit. Rev. Plant. Sci. 13: 219-239; Barcelo, et al. (1994) Plant. J. 5: 583-592; Becker, et al. (1994) Plant. J. 5: 299-307; Borkowska et al. (1994) Acta. Physiol Plant. 16: 225-230; Christou, P. (1994) Agro. Food. Ind. Hi Tech. 5: 17-27; Eapen et al. (1994) Plant Cell Rep. 13: 582-586; Hartman, et al. (1994) Bio-Technology 12: 919923; Ritala, et al. (1994) Plant. Mol. Biol. 24: 317-325; и Wan, Y.C. и Lemaux, P.G. (1994) Plant Physiol. 104: 3748.

Способы согласно изобретению заключаются во введении полинуклеотидной конструкции в растение. Под "введением" подразумевают воздействие на растение полинуклеотидной конструкцией таким образом, чтобы конструкция получила доступ внутрь клетки растения. Способы согласно изобретению не зависят от конкретного способа введения полинуклеотидной конструкции в растение при условии, что полинуклеотидная конструкция получает доступ внутрь по меньшей мере одной клетки растения. Способы введения полинуклеотидных конструкций в растения известны в данной области, включая без ограничения способы стабильной трансформации, способы временной трансформации и опосредованные вирусами способы.

Под "стабильной трансформацией" подразумевают, что полинуклеотидная конструкция, введенная в растение, интегрируется в геном растения и может наследоваться его потомством. Под "временной трансформацией" подразумевают, что полинуклеотидная конструкция, введенная в растение, не интегрируется в геном растения.

Для трансформации растений и растительных клеток нуклеотидные последовательности согласно изобретению встраивают, используя стандартные методики, в любой вектор, известный в данной области, который подходит для экспрессии нуклеотидных последовательностей в растении или растительной клетке. Выбор вектора зависит от предпочтительной методики трансформации и вида растения-мишени, которое необходимо трансформировать. В одном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность ANASL1 оперативно связана с промотором растений, который, как известно, обеспечивает высокие уровни экспрессии в растительной клетке, и такую конструкцию затем вводят в растение, которое является чувствительным к имидазолиновому гербициду, и регенерируют трансформированное растение. Трансформированное растение устойчиво к воздействию такого уровня имидазолинового гербицида, который убивает или в значительной степени повреждает нетрансформированное растение. Указанный способ может быть применим для любого вида растения; однако он наиболее полезен для применения по отношению к культурным растениям, в частности культурным растениям, которые обычно выращивают в присутствии по меньшей мере одного гербицида, в частности имидазолинового гербицида.

Методики конструирования кассет экспрессии в растениях и введения чужеродных нуклеиновых кислот в растения, в общем, известны в данной области и описаны ранее. Например, чужеродную ДНК можно вводить в растения, используя векторы на основе индуцирующих опухоли (Ti)-плазмид. Способы трансформации на основе *Agrobacterium* хорошо известны в данной области. Штамм *Agrobacterium* (например, *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*) содержит плазмиду (Ti- или Ri-плазмиду) и элемент T-ДНК, который переносят в растение в результате инфекции *Agrobacterium*. T-ДНК (переносимая ДНК) интегрируется в геном растительной клетки. T-ДНК может быть локализована в Ri- или Ti-плазмиде или содержится отдельно в так называемом бинарном векторе. Способы опосредованной *Agrobacterium* трансформации описаны, например, в Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f. Опосредованная *Agrobacterium* трансформация может быть использована как для двудольных растений, так и для однодольных растений. Трансформация растений с помощью *Agrobacteria* описана в White FF, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, edited by S.D. Kung и R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, edited by S.D. Kung и R. Wu, Academic Press, pp. 128-143; Potrykus (1991) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol 42: 205-225. Другие способы, используемые для доставки чужеродной ДНК, включают в себя применение опосредованной ПЭГ трансформации протопластов, электропорацию, микроинъекцию нитевидных кристаллов и баллистические способы или бомбардировку микрочастицами для прямого захвата ДНК. Такие способы известны в данной области (патент США № 5405765, Vasil et al.; Bilang et al. (1991) Gene 100: 247-250; Scheid et al., (1991) Mol Gen. Genet, 228: 104-112; Guerche et al., (1987) Plant Science 52: 111-116; Neuhaus et al., (1987) Theor. Appl Genet. 75: 30-36; Klein et al., (1987) Nature 327: 70-73; Howell et al., (1980) Science 208:1265; Horsch et al., (1985) Science 227: 1229-1231; DeBlock et al., (1989) Plant Physiology 91: 694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach и Weissbach, eds.) Academic Press, Inc. (1988) и Methods in Plant Molecular Biology (Schuler и Zielinski, eds.) Academic Press, Inc. (1989). Способ трансформации зависит от растительной клетки, которую необходимо трансформировать, стабильности используемых векторов, уровня экспрессии генных продуктов и других параметров.

Другие подходящие способы введения нуклеотидных последовательностей в растительные клетки и

последующего встраивания в геном растения, включают микроинъекцию, как описано в Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4: 320-334, электропорацию, как описано в Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606, опосредованную *Agrobacterium* трансформацию, как описано Townsend et al. в патенте США № 5563055, Zhao et al. в патенте США № 5981840, прямой перенос генов, как описано в Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722, и баллистическое ускорение частиц, как описано, например, Sanford et al. в патенте США № 4945050; Tomes et al. в патенте США № 5879918; Tomes et al. в патенте США № 5886244; Bidney et al. в патенте США № 5932782; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg и Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6: 923-926; и трансформацию *Led* (WO 00/28058). Также см. Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford et al. (1987) *Paniculate Science and Technology* 5: 27-37 (лук); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (соя); McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (соя); Finer и McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (соя); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (соя); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (рис); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (кукуруза); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (кукуруза); Tomes, патент США № 5240855; Buising et al., патенты США №№ 5322783 и 5324646; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," в *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin) (кукуруза); Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (кукуруза); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (кукуруза); Ноукаас-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; Bowen et al., патент США № 5736369 (злаковые); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (лилейные); De Wet et al. (1985) в *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (пыльца); Каепплер et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 и Каепплер et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566 (опосредованная нитевидными кристаллами трансформация); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (электропорация); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250-255 и Christou и Ford (1995) *Annals of Botany* 75: 407-413 (рис); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (кукуруза посредством *Agrobacterium tumefaciens*); все публикации включены в настоящее описание в виде ссылки.

Полинуклеотиды согласно изобретению могут быть введены в растения в результате контактирования растений с вирусом или вирусными нуклеиновыми кислотами. В общем, такие способы заключаются во введении полинуклеотидной конструкции согласно изобретению в молекулу вирусной ДНК или РНК. Понятно, что белок ANASL1 согласно изобретению может быть исходно синтезирован в виде части вирусного полибелка, который позднее процессируется в результате протеолиза *in vivo* или *in vitro* с образованием требуемого рекомбинантного белка. Кроме того, понятно, что промоторы согласно изобретению также охватывают промоторы, используемые для транскрипции вирусными РНК-полимеразами. Способы введения полинуклеотидных конструкций в растения и экспрессии в растениях кодируемого белка, включая введение молекул вирусных ДНК или РНК, известны в данной области. Смотрите, например, патенты США №№ 5889191, 5889190, 5866785, 5589367 и 5316931, включенные в настоящее описание в виде ссылки.

Из клеток, которые были трансформированы, можно вырастить растения согласно обычным способам. Смотрите, например, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Такие растения затем могут быть выращены и опылены либо такой же трансформированной линией, либо другой линией, и может быть идентифицирован полученный гибрид, имеющий конститутивную экспрессию требуемого фенотипического признака. Могут быть выращены два или больше поколений, чтобы удостовериться, что экспрессия требуемого фенотипического признака стабильно поддерживается и наследуется, и затем могут быть собраны семена, чтобы гарантировать, что достигнута экспрессия требуемого фенотипического признака. Таким образом, настоящее изобретение относится к трансформированному семени (также называемому "трансгенным семенем"), содержащему полинуклеотидную конструкцию согласно изобретению, например кассету экспрессии согласно изобретению, стабильно внедренную в его геном.

Настоящее изобретение можно применять для трансформации любого вида растения, включая без ограничения однодольные и двудольные растения. Примеры представляющих интерес видов растений включают без ограничения кукурузу (*Zea mays*), виды *Brassica* (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), в частности, виды *Brassica*, применимые в качестве источников масла, получаемого из семян, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, просо африканское (*Pennisetum glaucum*), просо обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо итальянское (*Setaria italica*), элевзине (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*, *T. Turgidum* ssp. *durum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solatum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), батат (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кофе (*Coffea* spp.), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (*Citrus* spp.), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), бананы (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), смоковницу (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливу (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамино (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарную свеклу

(Beta vulgaris), сахарный тростник (Saccharum spp.), овес, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные. Предпочтительно растения согласно настоящему изобретению представляют собой сельскохозяйственные растения (например, подсолнечник, виды Brassica, хлопчатник, сахарный тростник, свеклу, сою, арахис, люцерну, сафлор, табак, кукурузу, рис, пшеницу, рожь, ячмень, тритикале, сорго, просо и т.д.).

Резистентные к гербицидам растения согласно изобретению применимы в способах борьбы с сорняками. Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, относится к способу борьбы с сорняками, растущими рядом с резистентным к гербицидам растением согласно изобретению. Способ включает в себя нанесение эффективного количества гербицида на сорняки и резистентное к гербициду растение, при этом растение обладает повышенной резистентностью по меньшей мере к одному гербициду, в частности к имидазолиновому или сульфонилмочевинному гербициду, по сравнению с растением дикого типа. В таком способе борьбы с сорняками резистентные к гербицидам растения согласно изобретению предпочтительно являются сельскохозяйственными растениями, включая без ограничения подсолнечник, люцерну, виды Brassica, сою, хлопчатник, сафлор, арахис, табак, томат, картофель, пшеницу, рис, кукурузу, сорго, ячмень, рожь, просо и сорго.

Благодаря получению растений, обладающих повышенной резистентностью к гербицидам, в частности, имидазолиновым и сульфонилмочевинным гербицидам, можно использовать широкое множество препаратов для защиты растений от сорняков, для того чтобы ускорить рост растений и снизить конкуренцию за питательные вещества. Гербицид можно использовать отдельно для довсходовой, послевсходовой, предпосевной и осуществляемой при посеве борьбы с сорняками на площадях, окружающих растения, описанные в настоящей публикации, или можно использовать препараты имидазолиновых гербицидов, которые содержат другие добавки. Гербицид также можно применять для обработки семян. То есть эффективную концентрацию или эффективное количество гербицида или композиции, содержащей эффективную концентрацию или эффективное количество гербицида можно вносить непосредственно в семена перед или во время посева семян. Добавки, имеющиеся в препарате или композиции имидазолинового или сульфонилмочевинного гербицида, включают другие гербициды, детергенты, адъюванты, средства для распыления, склеивающие средства, стабилизаторы или тому подобное. Гербицидный препарат может представлять собой влажный или сухой препарат, и такие препараты включают без ограничения сыпучие порошки, эмульгируемые концентраты и жидкие концентраты. Гербицид и гербицидные препараты можно применять согласно обычным способам, например, опрыскиванием, орошением, опылением, нанесением покрытия и тому подобными способами.

Настоящее изобретение относится к способам, которые заключаются в применении АНАС-ингибирующего гербицида. В таких способах АНАС-ингибирующий гербицид можно применять, используя любой способ, известный в данной области, включая без ограничения обработку семян, обработку почвы и внесорневую обработку.

Настоящее изобретение относится к способам повышения устойчивости или резистентности растения, растительной ткани, растительной клетки или другой клетки-хозяина, по меньшей мере, к одному гербициду, который препятствует проявлению активности Фермента АНАС. Предпочтительно такой ингибирующий АНАС гербицид является имидазолиновым гербицидом, сульфонилмочевинным гербицидом, триазолопиримидиновым гербицидом, пиримидинилоксибензоатным гербицидом, сульфониламинокарбонилтриазолиновым гербицидом или их смесью. Более предпочтительно такой гербицид является имидазолиновым гербицидом, сульфонилмочевинным гербицидом или их смесью. В случае настоящего изобретения имидазолиновые гербициды включают без ограничения PURSUIT® (имазетапир), CADRE® (имазапик), RAPTOR® (имазамокс), SCEPTER® (имазахин), ASSERT® (имазетабенз), ARSENAL® (имазапир), производное любого из вышеназванных гербицидов и смесь двух или более из вышеназванных гербицидов, например, имзапир/имазамокс (ODYSSEY®). Более конкретно имидазолиновый гербицид может быть выбран из группы, без ограничения состоящей из 2-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)никотиновой кислоты, [2-(4-изопропил-4-)[метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил]-3-хинолинкарбоновой] кислоты, [5-этил-2-(4-изопропил-)-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил]никотиновой кислоты, 2-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)-5-(метоксиметил)никотиновой кислоты, [2-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)-5-метилникотиновой кислоты и смеси метил[6-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)-м-толуата и метил[2-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)-п-толуата. Применение 5-этил-2-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)никотиновой кислоты и [2-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)-5-(метоксиметил)никотиновой кислоты является предпочтительным. В частности, предпочтительно применение [2-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)-5-(метоксиметил)никотиновой кислоты.

В случае настоящего изобретения к сульфонилмочевинным гербицидам относятся без ограничения хлорсульфурон, метсульфуронметил, сульфометуронметил, хлоримуронэтил, трифенсульфуронметил, трибенуронметил, бенсульфуронметил, никоссульфурон, этаметсульфуронметил, римсульфурон, трифлуорсульфуронметил, триасульфурон, примисульфуронметил, циносульфурон, амидосульфурон, флузасульфурон, имазосульфурон, пиразосульфуронэтил, галосульфурон, азимсульфурон, циклосульфурон, этоксисульфурон, флазасульфурон, флупирсульфуронметил, форамсульфурон, йодосульфурон, оксасульфурон

рон, мезосульфурон, просульфурон, сульфосульфурон, трифлоросульфурон, тритосульфурон, производное любого из вышеуказанных гербицидов и смесь двух или более из вышеуказанных гербицидов. Триазолопиримидиновые гербициды согласно изобретению включают без ограничения клорансулам, диклосулам, флорасулам, флуметсулам, метосулам и пенекссулам. Пиримидинилоксибензоатные гербициды согласно изобретению включают без ограничения биспирибак, пиритиобак, пириминобак, пирибензоксим и пирифталид.

Сульфониламинокарбонилтриазолиновые гербициды включают без ограничения флукарбазон и пропоксикарбазон.

Понятно, что пиримидинилоксибензоатные гербициды являются близко родственными пиримидинилтиобензоатным гербицидам, и Американским научным обществом по исследованию сорняков указанным гербицидам присвоено одно общее последнее название. Соответственно к гербицидам согласно настоящему изобретению дополнительно относятся пиримидинилтиобензоатные гербициды, включая без ограничения пиримидинилоксибензоатные гербициды, описанные выше.

Перед применением АНАС-ингибирующий гербицид может быть превращен в обычные препараты, например растворы, эмульсии, суспензии, пылевидные препараты, порошки, пасты и гранулы. Форма применения зависит от конкретной предполагаемой цели; в каждом случае она должна гарантировать тонкодисперсное и равномерное распределение соединения согласно изобретению.

Препараты готовят известным способом (смотрите, например обзор в US 3060084, EP-A707445 (жидкие концентраты), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, 4 декабря 1967 г., 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, стр. 8-57 и et seq. WO 91/13546, US 4172714, US 4144050, US 3920442, US 5180587, US 5232701, US 5208030, GB 2095558, US 3299566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 и Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Germany), 2001, 2. D. A. Knowles, Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998 (ISBN 0-7514-0443-8), например, посредством введения вместе с активным соединением вспомогательных средств, подходящих для приготовления агрохимикатов, таких как растворители и/или носители, при необходимости эмульгаторов, поверхностно-активных веществ и диспергирующих агентов, консервантов, противопенных средств, антифризы, в случае препарата для обработки семян также необязательно красители и/или связывающие средства и/или гелеобразующие средства.

Примерами подходящих растворителей являются вода, ароматические растворители (например продукты Solvesso, ксилен), парафины (например фракции минерального масла), спирты (например, метанол, бутанол, пентанол, бензиловый спирт), кетоны (например, циклогексанон, гамма-бутиролактон), пирролидоны (NMP, NOP), ацетаты (гликольдиацетат), гликоли, диметиламиды жирных кислот, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот. В принципе, также можно использовать смеси растворителей.

Примерами подходящих носителей являются измельченные природные минералы (например, каолины, глины, тальк, мел) и измельченные синтетические минералы (например, высокодисперсный диоксид кремния, силикаты).

Подходящими эмульгаторами являются неионные и анионные эмульгаторы (например, эфиры полиоксиэтилена и жирных спиртов, алкилсульфонаты и арилсульфонаты). Примерами диспергирующих средств являются лигнин-отработанный сульфитный щелок и метилцеллюлоза.

Подходящими используемыми поверхностно-активными веществами являются соли щелочных металлов, щелочно-земельных металлов и аммония и лигносульфоновой кислоты, нафталинсульфоновой кислоты, фенолсульфоновой кислоты, дибутилнафталинсульфоновой кислоты, алкиларилсульфонаты, алкилсульфаты, алкилсульфонаты, сульфаты жирных спиртов, жирных кислот и сульфатированные гликолевые эфиры жирных спиртов, а также конденсаты сульфонированного нафталина и производных нафталина с формальдегидом, конденсаты нафталина или нафталинсульфоновой кислоты с фенолом и формальдегидом, полиоксиэтиленоктилфеноловый эфир, этоксилированный изооктилфенол, октилфенол, нонилфенол, эфиры алкилфенолполигликоля, эфир трибутилфенилполигликоля, эфир тристеарилфенилполигликоля, алкиларилполиэфирные спирты, конденсаты этиленоксида со спиртами и жирными спиртами, этоксилированное касторовое масло, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, этоксилированный полиоксипропилен, ацеталь полигликолевого эфира лаурилового спирта, сложные эфиры сорбита, лигносульфитный отработанный щелок и метилцеллюлоза.

Веществами, которые подходят для получения непосредственно разбрызгиваемых растворов, эмульсий, паст или масляных дисперсий, являются фракции минерального масла с точкой кипения от среднего до высокого значения, такие как керосин или дизельное топливо, кроме того, каменноугольные смолы и масла растительного или животного происхождения, алифатические, циклические и ароматические углеводороды, например толуол, ксилол, парафин, тетрагидронафталин, алкилированные нафталины или их производные, метанол, этанол, пропанол, бутанол, циклогексанол, циклогексанон, изофорон, высоко полярные растворители, например, диметилсульфоксид, N-метилпирролидон или вода.

Также в препарат могут быть добавлены антифризы, такие как глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль и бактерицидные средства.

Подходящими противоположными средствами являются, например, противоположные средства на основе кремния или стеарата магния. Препараты для обработки семян дополнительно могут содержать связывающие средства и необязательно красители.

Связывающие средства могут быть добавлены для улучшения адгезии активных вещества на семенах после обработки. Подходящими связывающими средствами являются поверхностно-активные вещества на основе блок-сополимеров ЕО/РО, а также поливиниловые спирты, поливинилпирролидоны, полиакрилаты, полиметакрилаты, полибутены, полиизобутилены, полистирол, полиэтиленамины, полиэтиленамиды, полиэтиленимины (Lupasol®, Polymín®), полиэферы, полиуретаны, поливинилацетат, тилоза и сополимеры, полученные из таких полимеров.

Необязательно в препарат также могут быть включены красители. Подходящими красителями для препаратов, используемых для обработки семян, являются родамин В, С.І. пигмент красный 112, С.І. растворитель-красный 1, пигмент синий 15:4, пигмент синий 15:3, пигмент синий 15:2, пигмент синий 15:1, пигмент синий 80, пигмент желтый 1, пигмент желтый 13, пигмент красный 112, пигмент красный 48:2, пигмент красный 48:1, пигмент красный 57:1, пигмент красный 53:1, пигмент оранжевый 43, пигмент оранжевый 34, пигмент оранжевый 5, пигмент зеленый 36, пигмент зеленый 7, пигмент белый 6, пигмент коричневый 25, основной фиолетовый 10, основной фиолетовый 49, кислый красный 51, кислый красный 52, кислый красный 14, кислый синий 9, кислый желтый 23, основной красный 10, основной красный 108.

Примером подходящего гелеобразующего средства является карраген (Satiagel®). Порошки, вещества для рассеивания и распыляемые продукты могут быть получены смешиванием или совместным измельчением активных веществ с твердым носителем.

Гранулы, например гранулы с покрытием, гранулы пропиткой и гомогенные гранулы, могут быть получены связыванием активных соединений с твердыми носителями. Примерами твердых носителей являются минералы, такие как силикагели, силикаты, тальк, каолин, аттапульгит, известняк, известь, мел, железистая известковая глина, лесс, глина, доломит, диатомовая земля, сульфат кальция, сульфат магния, оксид магния, измельченные синтетические материалы, удобрения, такие как, например, сульфат аммония, фосфат аммония, нитрат аммония, мочевины и продукты растительного происхождения, такие как мука из злаков, мука из древесной коры, древесная мука и мука из ореховой скорлупы, целлюлозные порошки и другие твердые носители.

В общем, препараты содержат от 0,01 до 95 мас.%, предпочтительно от 0,1 до 90 мас.% АНАС-ингибирующего гербицида. В данном случае применяют АНАС-ингибирующие гербициды с чистотой от 90 до 100 мас.%, предпочтительно от 95 до 100 мас.% (согласно ЯМР-спектру). В целях обработки семян соответствующие препараты можно разбавить в 2-10 раз, получая концентрации в готовых к применению препаратах от 0,01 до 60 мас.% активного соединения, предпочтительно от 0,1 до 40 мас.%.

АНАС-ингибирующий гербицид может быть использован как таковой, в форме препаратов или в виде полученных из них форм для применения, например в форме непосредственно разбрызгиваемых растворов, порошков, суспензий или дисперсий, эмульсий, масляных дисперсий, паст, распыляемых продуктов, веществ для рассеивания или гранул, с помощью разбрызгивания, распыления, опыливания, рассеивания или заливки. Формы для применения полностью зависят от предполагаемых целей; они должны в каждом случае гарантировать наилучшее распределение АНАС-ингибирующего гербицида согласно изобретению.

Применяемые водные формы могут быть получены из концентратов эмульсий, паст или смачиваемых порошков (распыляемых порошков, масляных дисперсий) посредством добавления воды. Чтобы получить эмульсии, пасты или масляные дисперсии вещества как таковые или растворенные в масле или растворителе могут быть гомогенизированы в воде с использованием увлажнителя, вещества для повышения клейкости, диспергирующего средства или эмульгатора. Однако также можно получать концентраты, состоящие из активного вещества, увлажнителя, вещества для повышения клейкости, диспергирующего средства или эмульгатора, и в соответствующем случае растворителя или масла, и такие концентраты являются подходящими для разбавления водой.

Количества концентратов активного соединения в готовых к применению препаратах могут варьировать в относительно широких диапазонах. В общем они составляют от 0,0001 до 10%, предпочтительно от 0,01 до 1 мас.%.

АНАС-ингибирующий гербицид также можно успешно применять в способе, основанном на использовании сверхмалых объемов (ULV), и при этом можно применять препараты, содержащие более 95 масс.% активного соединения, или даже применять активное соединение без добавок.

Далее приведены примеры препаратов:

1) Продукты для разбавления водой в случае внекорневой обработки. В целях обработки семян такие продукты можно наносить на семена разбавленными или неразбавленными.

А) Растворимые в воде концентраты (SL, LS)

10 мас.ч. АНАС-ингибирующего гербицида растворяют в 90 мас.ч. воды или водорастворимого растворителя. В качестве альтернативы добавляют увлажнители или другие вспомогательные вещества.

АНАС-ингибирующий гербицид растворяется при разбавлении водой, при этом получают препарат, содержащий 10% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида.

В) Диспергируемые концентраты (DC)

Двадцать массовых частей АНАС-ингибирующего гербицида растворяют в 70 мас.ч циклогексана с добавлением 10 мас.ч. диспергирующего агента, например поливинилпирролидона. Разбавление водой дает дисперсию, при этом получают препарат, содержащий 20% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида.

С) Эмульгируемые концентраты (EC)

Пятнадцать массовых частей АНАС-ингибирующего гербицида растворяют в 7 массовых частях ксилена с добавлением додецилбензолсульфоната кальция и этоксилата касторового масла (в каждом случае 5 мас.ч). Разбавление водой дает эмульсию, при этом получают препарат, содержащий 15% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида.

Д) Эмульсии (EW, EO, ES)

25 мас.ч. АНАС-ингибирующего гербицида растворяют в 35 мас.ч. ксилена с добавлением с добавлением додецилбензолсульфоната кальция и этоксилата касторового масла (в каждом случае 5 мас.ч.). Полученную смесь вводят в 30 мас.ч. воды с помощью эмульгирующего устройства (например, Ultraturax) и получают гомогенную эмульсию. Разбавление водой дает эмульсию, при этом получают препарат, содержащий 25% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида.

Е) Суспензии (SC, OP, FS)

Во встряхиваемой шаровой мельнице измельчают 20 мас.ч. АНАС-ингибирующего гербицида с добавлением 10 мас.ч. диспергирующих средств, увлажнителей и 70 мас.ч. воды или органического растворителя, получая тонкодисперсную суспензию АНАС-ингибирующего гербицида.

Разбавление водой дает стабильную суспензию АНАС-ингибирующего гербицида, при этом получают препарат, содержащий 20% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида.

Ф) Диспергируемые в воде гранулы и водорастворимые гранулы (WG, SG)

50 мас.ч. АНАС-ингибирующего гербицида тонко измельчают с добавлением 50 мас.ч. диспергирующих средств и увлажнителей и получают в виде диспергируемых в воде или водорастворимых гранул с помощью технических устройств (например, с помощью экструзии, скруббера с разбрызгивающим устройством, псевдооживленного слоя).

Разбавление водой дает стабильную дисперсию или раствор АНАС-ингибирующего гербицида, при этом получают препарат, содержащий 50% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида.

Г) Диспергируемые в воде порошки и водорастворимые порошки (WP, SP, SS, WS)

75 мас.ч. АНАС-ингибирующего гербицида измельчают в роторно-статорной мельнице с добавлением 25 мас.ч. диспергирующих средств, увлажнителей и силикагеля. Разбавление водой дает стабильную дисперсию или раствор АНАС-ингибирующего гербицида, при этом получают препарат, содержащий 75% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида.

И) Гелевый препарат (GF)

Во встряхиваемой шаровой мельнице измельчают 20 мас.ч. АНАС-ингибирующего гербицида с добавлением 10 мас.ч. диспергирующих средств, 1 мас.ч. гелеобразующих средств и 70 мас.ч. воды или органического растворителя, получая тонкодисперсную суспензию АНАС-ингибирующего гербицида. Разбавление водой дает стабильную суспензию АНАС-ингибирующего гербицида, при этом получают препарат, содержащий 20% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида. Указанный гелевый препарат подходит для применения при обработке семян.

2. Продукты, применяемые неразбавленными для некорневых обработок. В целях обработки семян такие продукты можно наносить на семена разбавленными.

А) Распыляемые порошки (DP, DS)

Пять массовых частей АНАС-ингибирующего гербицида тонко измельчают и тщательно смешивают с 95 мас.ч. тонкодисперсного каолина. При этом получают распыляемый продукт, содержащий 5% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида.

В) Гранулы (GR, FG, GG, MG)

Половину массовой части АНАС-ингибирующего гербицида тонко измельчают и объединяют с 95,5 мас.ч. носителей, при этом получают препарат, содержащий 0,5% (мас./мас.) АНАС-ингибирующего гербицида. Используют имеющиеся в настоящее время способы экструзии, сушки с распылением или оживленного слоя. При этом получают гранулы, которые используют неразбавленными при некорневой обработке.

Обычные препараты для обработки семян включают, например, текучие концентраты FS, растворы LS, порошки для сухой обработки DS, диспергируемые в воде порошки для обработки взвесями WS, растворимые в воде порошки SS и эмульсии ES и EC и гелевый препарат GF. Такие препараты можно использовать для обработки семян разбавленными или неразбавленными. Обработку семян осуществляют перед посевом или непосредственно наносят на семена.

В предпочтительном варианте для обработки семян используют препарат FS. Обычно препарат FS может содержать 1-800 г/л активного ингредиента, 1-200 г/л поверхностно-активного вещества, от 0 до

200 г/л антифриза, от 0 до 400 г/л связывающего средства, от 0 до 200 г/л пигмента и до 1 л растворителя, предпочтительно воды.

Настоящее изобретение относится к нетрансгенным и трансгенным семенам резистентных гербицидам растений согласно настоящему изобретению. Такие семена включают, например, нетрансгенные семена Brassica, обладающие признаками резистентности к гербицидам растения J05Z-07801, J04E-0139, J04E-0130 или J04E-0122, и трансгенные семена, содержащие молекулу полинуклеотида согласно изобретению, которая кодирует резистентный к гербицидам белок AHASL1.

В случае обработки семян семенами резистентными к гербицидам растений согласно настоящему изобретению обрабатывают гербицидами, предпочтительно гербицидами, выбранными из группы, состоящей из AHAS-ингибирующих гербицидов, таких как амидосульфурон, азимсульфурон, бенсульфурон, хлоримурон, хлорсульфурон, циноссульфурон, циклосульфамурон, этаметсульфурон, этоксисульфурон, флазасульфурон, флупирсульфурон, форамсульфурон, галосульфурон, имазосульфурон, йодсульфурон, мезосульфурон, метсульфурон, никосульфурон, оксасульфурон, примисульфурон, просульфурон, пиразосульфурон, римсульфурон, сульфометурон, сульфосульфурон, тифенсульфурон, триасульфурон, трибенурон, трифтоксисульфурон, трифлусульфурон, тритосульфурон, имазаметабенз, имазамокс, имазапик, имазапир, имазахин, имазетапир, клорансулам, диклосулам, флорасулам, флуметсулам, метосулам, пеноксулам, биспирибак, пириминобак, пропоксикарбазон, флукарбазон, пирибензоксим, пирифталид, пиритиобак и их смеси, или препаратом, содержащим AHAS-ингибирующий гербицид.

Термин "обработка семян" включает в себя все подходящие способы обработки семян, известные в данной области, такие как протравливание семян, дражирование семян, опудривание семян, намачивание семян и пеллетирование семян.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения дополнительным объектом изобретения является способ обработки почвы, в частности внесением в рядовую сеялку: либо гранулярного препарата, содержащего AHAS-ингибирующий гербицид, в виде композиции/препарат, например, гранулярного препарата, необязательно с одним или несколькими твердыми или жидкими приемлемыми для сельского хозяйства носителями и/или необязательно с одним или несколькими приемлемыми для сельского хозяйства поверхностно-активными веществами. Такой способ преимущественно применяют, например, для обработки почвы, приготовленной для посева зерновых, кукурузы, хлопчатника и подсолнечника.

Настоящее изобретение также относится к семенам, покрытым или содержащим препарат для обработки семян, содержащий, по меньшей мере, один ALS-ингибитор, выбранный из группы, состоящей из амидосульфурона, азимсульфурона, бенсульфурона, хлоримурона, хлорсульфурона, циноссульфурона, циклосульфамурона, этаметсульфурона, этоксисульфурона, флазасульфурона, флупирсульфурона, форамсульфурона, галосульфурона, имазосульфурона, йодсульфурона, мезосульфурона, метсульфурона, никосульфурона, оксасульфурона, примисульфурона, просульфурона, пиразосульфурона, римсульфурона, сульфометурона, сульфосульфурона, тифенсульфурона, триасульфурона, трибенурона, трифтоксисульфурона, трифлусульфурона, тритосульфурона, имазаметабенза, имазамокса, имазапика, имазапира, имазахина, имазетапира, клорансулама, диклосулама, флорасулама, флуметсулама, метосулама, пеноксулама, биспирибака, пириминобака, пропоксикарбазона, флукарбазона, пирибензоксима, пирифталида, пиритиобака.

Термин "семя" охватывает семена и участвующие в размножении части растений всех видов, включая без ограничения настоящие семена, кусочки семян, корневые отпрыски, клубнелуковицы, луковицы, плоды, клубни, зерно, черенки, отрезки и тому подобное, и в предпочтительном варианте термин означает настоящие семена.

Термин "покрытый и/или содержащий", в общем, означает, что активный ингредиент главным образом находится на поверхности продукта размножения во время применения, хотя большая или меньшая часть ингредиента может проникать в продукт размножения, в зависимости от способа применения. Когда указанный продукт размножения снова высевает, он может поглощать активный ингредиент.

Проведение обработки семян AHAS-ингибирующим гербицидом или препаратом, содержащим AHAS-ингибирующий гербицид, осуществляют опрыскиванием или опудриванием семян перед посевом растений и перед всходами растений.

При обработке семян соответствующие препараты применяют в виде обработки семян эффективным количеством AHAS-ингибирующего гербицида или препарата, содержащего AHAS-ингибирующий гербицид. В данном случае нормы внесения обычно составляют от 0,1 г до 10 кг активного ингредиента (или смеси активного ингредиента или препарата) на 100 кг семян, предпочтительно от 1 г до 5 кг на 100 кг семян, в частности, от 1 г до 2,5 кг на 100 кг семян. В случае конкретных сельскохозяйственных культур, таких как салат-латук, норма может быть выше.

Настоящее изобретение относится к способу борьбы с нежелательными растениями или борьбы с сорняками, включающему в себя осуществление контакта семян резистентных растений согласно настоящему изобретению перед посевом и/или после предварительного проращивания AHAS-ингибирующим гербицидом.

Способ дополнительно может включать в себя посев семян, например, в почву на поле или в среду

для горшечных культур в теплице. Способ имеет особое применение для борьбы с нежелательными растениями или борьбы с сорняками, находящимися в непосредственной близости с семенами.

Подразумевается, что борьба с нежелательными растениями означает уничтожение сорняков и/или иным образом замедление или ингибирование нормального роста сорняков. Подразумевают, что сорняки в широком смысле означают все растения, которые растут с тех мест, где они нежелательны.

Сорняки согласно настоящему изобретению включают, например, двудольные и однодольные сорняками. К двудольным сорнякам без ограничения относятся сорняки родов: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus* и *Taraxacum*. К однодольным сорнякам без ограничения относятся сорняки родов: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus* и *Apera*.

Кроме того, сорняки согласно настоящему изобретению могут включать, например, культурные растения, которые растут в нежелательном месте. Например, самосевное растение кукурузы, которое находится на поле, на котором преимущественно растут растения сои, можно считать сорняком, если растение кукуруза нежелательно на поле с растениями сои.

Упоминание слов в единственном числе используют в настоящем описании по отношению к одному или больше чем одному (т.е., по меньшей мере, к одному) грамматическому объекту в описании. В качестве примера, "элемент" означает один или несколько элементов.

В используемом в настоящем описании смысле слово "содержащие" или его варианты, такие как "содержит" или "содержащий" следует понимать как означающее включение указанного элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключение какого-либо другого элемента, целого числа или стадии, или группы элементов, целых чисел или стадий.

Следующие примеры предлагаются в целях иллюстрации, но не в целях ограничения.

Пример 1 - Анализ фермента АНАS *in vitro*

Анализ фермента АНАS представляет собой быстрый колориметрический способ, который используют для количественной оценки уровней устойчивости разных образцов посредством измерения уровня активности фермента АНАS в присутствии ингибиторов АНАS, как описано в Singh et al. (*Anal. Biochem.* 171: 173-179, 1988). Применяют два типа тестов: основной тест с использованием только одного ингибитора и усиленный тест, который требует использования двух ингибиторов. Оба теста показывают уровни устойчивости к имидазолинону, при этом усиленный тест дает возможность точно определять незначительные различия в уровнях устойчивости между некоторыми линиями растений. Исходный раствор для анализа АНАS содержит: 0,2 М однозамещенный фосфат натрия+0,2 М двузамещенный фосфат натрия+50 мМ 1,1-циклопропандикарбоновую кислоту (СРСА)+полный состав основных солей Мурасиге и Скуга+1 мМ имазамок (АС 299263 технической чистоты)+5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+2 М NaOH+2,5% α-нафтол+0,25% креатин в 1 М фосфатном буфере, рН 6,0.

Конечные растворы для анализа АНАS представляют собой три типа растворов: Раствор А содержит: 10 мМ фосфатный буфер+10% среда M & S+500 мкМ СРСА+0,5% L-аланин+50 мМ пируват. Раствор В содержит: раствор А+2,5 мкМ имазамок. Раствор С содержит: раствор В+0,2 мкМ хлорсульфурон.

Основной тест АНАS: Ингибитор имазамок

Тест проводили в 96-луночных планшетах. Каждый 96-луночный планшет находился в камере на 19-21 образцов, включая контроли. Каждая лунка содержала 100 мкл АНАS-буфера, который описан ниже. В вытяжном шкафу с ламинарным потоком стерильный АНАS-буфер асептически переносили в две лунки для растворов, промаркированных А и В. В лунку «В» добавляли имазамок из исходного раствора, который имел концентрацию 2,5 мкМ. 100 мкл раствора А переносили во все нечетные ряды на каждом планшете, и 100 мкл раствора В переносили во все четные ряды.

Фаза 1: Отбор образцов

Четыре диска вырезали с нижней части наименьшей листовой пластинки десятидневных саженцев, используя сверло для пробок. Образцы растений брали перед стадией стрелкования, так как после указанной стадии роста активируется другой ген АНАS, следовательно, потенциально возможно получение ложных результатов. После вырезания диски переносили в лунки планшета для микротитрования, содержащие растворы А и В.

После заполнения всего планшета для микротитрования его инкубировали при люминесцентном освещении и комнатной температуре в течение 14-18 ч. Для остановки инкубации после указанного периода времени планшеты замораживали в морозильной камере при -80°C.

Фаза 2: Реакция

АНАS-планшеты вынимали из морозильной камеры с температурой -80°C и размораживали при комнатной температуре или при 60°C в инкубаторе. В каждую лунку добавляли 25 мкл 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Планшеты после подкисления инкубировали при 60°C до тех пор, пока все диски не становились коричневыми.

ми, примерно в течение 15 мин. В течение этого периода времени готовили раствор нафтола и затем в каждую лунку добавляли 150 мкл раствора  $\alpha$ -нафтола/креатина. Каждый планшет инкубировали при 60°C в течение 15 мин. После инкубации визуально сравнивали различия в активности АНАС между образцами, обработанными имидазолиноном, и образцами, не обработанными имидазолиноном. Интенсивность "красной" окраски в результате проявления активности АНАС измеряли, используя считывающее устройство для планшетов для микротитрования, получая количественное значение для образцов, обработанных и не обработанных имидазолиноном.

Оптическую плотность в каждой лунке регистрировали при 530 нм. При таких параметрах получали значение, которое отображает интенсивность красного. Полученную интенсивность красного переводили в количественное значение активности АНАС в каждой лунке. Когда активность АНАС в лунке, содержащей данный образец с добавлением имазамокса, делили на активность АНАС в контроле, то получали отношение в виде "активности АНАС в процентах от контроля".

Усиленный тест АНАС: Ингибиторы имазамокс и хлорсульфурон

Введение хлорсульфурона, SU, в тесте АНАС основано на свойстве устойчивости генов PM1 и bR. PM1 и bR не устойчивы к SU, тогда как PM2 проявляет определенную устойчивость ко SU. Отношение, полученное при делении активности SU на активность имазамокса дает уникальное значение для всех четырех уровней устойчивости (PM1/PM2, PM2, PM1, WT).

Результаты показаны на фиг. 3 для bR, PM2 и bR/PM2 у *V. juncea* при ингибировании имазамоksom и хлорсульфуроном.

#### **Активность фермента АНАС для разных сочетаний мутаций у *V. juncea* в присутствии имазамокса**

Активность фермента АНАС в белковых экстрактах гомозиготных дигиплоидных (DH) линий *V. juncea*, содержащих разные сочетания мутаций (aR×bR, PM2×A107T, PM2×bR, A104T×bR) измеряли в виде процента активности от активности в необработанном (0 мкМ имазамокса) образце. В качестве контроля также были включены белковые экстракты из трех линий *V. parvus*: *V. parvus* PM1, *V. parvus* PM2 и *V. parvus* PM1/PM2. Результаты для указанных мутантных сочетаний и проверки при концентрации имазамокса 100 мкМ показаны на фиг. 6.

Пример 2 - Тестирование устойчивости к гербицидам в теплице

Проведение первого эксперимента планировалось для определения того, имеются ли различия в устойчивости к гербициду имидазолинону между линиями *V. juncea*, содержащими один ген (bR или PM2) и два гена (bR/PM2), и линией *V. parvus*, содержащей два гена (PM1/PM2).

Шесть отдельных растений из каждой линии подвергали обработке опрыскиванием. Имидазолиновый гербицид Odyssey® наносили в дозе 1× (17 г активного ингредиента/акр (0,4 га)), 2× (34 г активного ингредиента/акр (0,4 га)) и 3× (51 г активного ингредиента/акр (0,4 га)) на стадии 2-3 листьев. Растения опрыскивали на стадии 2-3 листьев примерно через 14 дней после посадки. Давление в камере для опрыскивания устанавливали при 40 фунтах на кв. дюйм (0,279 МПа) и скорость устанавливали на значении "80" (34,98 л/акр (0,4 га)). Для получения 25 мл исходного раствора Odyssey® проводили следующий расчет:  $17 \times 0,025 / 34,98 = 0,1215$  г гранул Odyssey®. Расчет был основан на следующих допущениях: количество Odyssey®, необходимого на акр (0,4 га) составляло 17 г; и 8,33 мл раствора подается за каждый проход из камеры для опрыскивания. Merge® добавляли в соотношении 0,5 л/100 л или 0,000125 л или 125 мкл. После опрыскивания растения случайным образом распределяли на поддонах. Растения оценивали по визуальному повреждению (через 7-10 дней после опрыскивания) согласно следующему рейтингу:

- 1) растения, у которых не наблюдается никакого повреждения;
- 2) растения, у которых наблюдается обесцвечивание листьев или небольшое скручивание листьев;
- 3) растения, у которых наблюдается сильное обесцвечивание листьев (например, листья становятся желтыми или багровыми), а также наблюдается некоторое базальное ветвление;
- 4) растения, у которых наблюдается сильное повреждение, приводящее к гибели или тяжелой задержке развития.

Рост растения и биомассу (массу растения) измеряли после появления повреждения. Проводили сравнения между растениями после обработки опрыскиванием и контролями для каждого сорта. Результаты показаны в табл. 1.

Таблица 1. Измерения повреждений гербицидом линий *V. juncea*, содержащих bR и/или PM2 по сравнению с контролем *V. parvus* PM1/PM2

N=6 для всех точек получения данных						
Сорт	Опрыскивание Норма внесения	Повреждение (1-4)	Высота растений		Масса растений	
			(см)	(% от контроля)	(г)	(% от контроля)
Коммерческий <i>V. parvus</i> (PM1+PM2)	0	1,0	7,3	100,0	1,120	100,0
	1	1,0	6,0	81,4	1,020	91,1
	3	1,1	5,5	75,4	1,130	100,9
<i>V. juncea</i> J03Z-16413 (PM2)	0	1,0	8,1	100,0	1,200	100,0
	1	1,0	7,3	90,4	1,160	96,7
	3	1,6	6,4	78,8	1,200	100,0
<i>V. juncea</i> J05Z-00791 (bR+PM2)	0	1,0	6,1	100,0	0,690	100,0
	1	1,0	6,2	101,0	0,750	108,7
	3	1,1	5,6	91,0	0,850	123,2
<i>V. juncea</i> XJ04-057-034 (bR+PM2)	0	1,0	7,6	100,0	1,230	100,0
	1	1,0	7,0	92,2	1,210	98,4
	3	1,2	5,3	70,5	1,250	101,6
<i>V. juncea</i> J04E-0044 (bR)	0	1,0	7,0	100,0	0,780	100,0
	1	1,4	6,6	94,1	0,750	96,2
	3	2,8	3,1	44,3	0,290	37,2
<i>V. juncea</i> Arid (дикий тип)	0	1,0	7,2	100,0	1,080	100,0
	1	3,3	2,7	37,5	0,090	8,3
	3	3,8	2,7	37,1	0,040	3,7

Проведение второго эксперимента планировалось для сравнения разных мутаций, bR, bR/PM2, PM2, aR, A104T и A107T у *V. juncea* при обработке разными дозами имазамокса в теплице. Образцы, используемые для тестирования опрыскивания имазамоксом (второй эксперимент в теплице) показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Линии *V. juncea*, используемые во втором эксперименте в теплице

№ объекта	Вид	Мутация	Линия	Примечание/описание
1	<i>V. juncea</i>	aR	J04E-0139	M4 aR S653N геном А
2	<i>V. juncea</i>	A107T	J04E-0130	M3 A122T геном В
3	<i>V. juncea</i>	bR	J04E-0044	M3 bR S653N геном В
4	<i>V. juncea</i>	A104T	J04E-0122	M3 A122T геном А
5	<i>V. juncea</i>	-	Arid	Lot C3J3
6	<i>V. juncea</i>	bR/PM2	J05Z-07801	DH <sub>1</sub> bR/PM2
7	<i>V. juncea</i>	PM2	J03Z-03315	PM2 Lot M5T2-002

Двенадцать отдельных растений каждой линии подвергали обработке на определенном уровне, как показано в табл. 3. Проводили 7 обработок имазамоксом (Raptor®)+0,5% об./об Merge®. Растения обрабатывали на стадии 1-2 настоящих листьев. Результаты показаны на фиг. 4.

Таблица 3. Уровни обработки

Обработка	Имазамокс (г активного ингредиента/га)
1	0
2	10
3	20
4	35
5	40
6	70
7	100

В другом эксперименте в теплице получали линии DH *V. juncea* в результате скрещивания между линиями *V. juncea*, которые содержали мутацию ANAS в геноме А (aR, A104T или PM2), и линиями *V. juncea*, которые содержали мутацию ANAS в геноме В (bR, A107T). Линии DH, которые, как было подтверждено, были гомозиготными по мутациям как в геноме А, так и в геноме В (например, aR/bR или A104T/bR и т.д.), отбирали для последующего тестирования устойчивости к гербициду в теплице с использованием 0, 35, 70 и 100 г активного ингредиента/га имазамокса (Raptor®+0,75% Merge®). Фитоксичность оценивали по шкале от 0 до 9, где значение 0 эквивалентно отсутствию повреждения культуры, а 9 эквивалентно наличию тяжелого некроза растения, приводящего к гибели растения. Результаты в ви-

де графиков фитотоксичности показаны на фиг. 8.

В случае таких сочетаний, при которых не идентифицировали дважды гомозиготной линии DH (как в случае сочетания мутаций aR/A107T), в теплице высевали сегрегирующую популяцию F2. Каждую особь F2 подвергали секвенированию, чтобы определить природу мутации и зиготность, и затем опрыскивали 35 г активного ингредиента/га имазамокса, чтобы определить соответствующий фенотип повреждения. Результаты определения взаимосвязи между генотипом и фенотипом повреждения культуры в случае мутаций aR и A107T показаны на фиг. 7.

Пример 3 - Тестирование устойчивости к гербицидам на поле

Четыре объекта *V. juncea* и один объект *V. napus* тестировали в испытаниях на основе плана с рандомизированными расщепленными блоками (4 повтора) в четырех местах в Северной Дакоте в отношении устойчивости к гербицидам (различные обработки смотрите в таблице 4) и урожайности. Делянки имели размер минимум 1,5×5 м, и на отдельных делянках проводили валкование и при созревании собирали урожай. Из четырех объектов исследования *V. juncea* один объект представлял собой линию PM1/PM2 *V. juncea*, которую получали в результате интрогрессии обеих мутаций PM1 и PM2 из *Brassica napus* в *Brassica juncea* с использованием обычной методики возвратного скрещивания с последующим самоопылением на протяжении двух поколений, чтобы получить гомозиготную линию *V. juncea* PM1/PM2. Другие три объекта *V. juncea* имели разные генотипы *V. juncea*, содержащие мутацию bR в геноме *V* вместе с мутацией PM2. Все линии bR/PM2 *V. juncea* были гомозиготными по обеим мутациям. Объект *V. napus* представлял собой коммерческий контрольный сорт CLEARFIELD®, гомозиготный по мутациям PM1/PM2. Оценка повреждения культур (% фитотоксичности) проводили через 5-7 дней после обработки (DAT) и через 18-24 DAT. Средняя фитотоксичность в процентах для одного из четырех местоположений представлена в табл. 5.

Таблица 4

<b>Обработки:</b>	1. Необработанные 2. 1× норма внесения следующих гербицидных продуктов для канолы Clearfield®: 30 г активного ингредиента/га Odyssey®+0,5% (об./об.) Merge®
<b>Объем опрыскивания:</b>	100 литров/га
<b>Стадия роста:</b>	2-4 листа

CLEARFIELD® и уникальное название CLEARFIELD являются зарегистрированными торговыми марками BASF

Таблица 5. Средняя фитотоксичность в процентах и средняя урожайность объектов исследования *V. juncea* PM1/PM2 и *V. juncea* bR/PM2 после 1× обработки гербицидом Odyssey в одном местоположении в Велва, Северная Дакота

Объект исследования	Обработка	Средняя фитотоксичность в % через 5-7 дней после обработки	Средняя фитотоксичность в % через 18-24 дня после обработки	Средняя урожайность кг/га
<b><i>V. juncea</i> PM1/PM2</b>	<b>Необработанные</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>896</b>
<i>V. napus</i> PM1/PM2	Необработанные	0,00	0,00	1119
<i>V. juncea</i> bR/PM2 (S006)	Необработанные	0,00	0,00	1217
<i>V. juncea</i> bR/PM2 (S007)	Необработанные	0,00	0,00	1382
<i>V. juncea</i> bR/PM2 (S008)	Необработанные	0,00	0,00	1343
<b><i>V. juncea</i> PM1/PM2</b>	<b>1× Odyssey</b>	<b>48,75</b>	<b>50,00</b>	<b>351</b>
<i>V. napus</i> PM1/PM2	1× Odyssey	13,75	3,75	910
<i>V. juncea</i> bR/PM2 (S006)	1× Odyssey	3,75	1,25	1231
<i>V. juncea</i> bR/PM2 (S007)	1× Odyssey	6,25	1,25	1334
<i>V. juncea</i> bR/PM2 (S008)	1× Odyssey	5,00	2,50	1527
		5,01	3,40	254
				13,96
				<b>LCD (P=0,05)</b>
				<b>CV</b>

Результаты в табл. 5 показывают, что мутации PM1/PM2, интрогрессированные в *V. juncea*, не обеспечивают устойчивости, достаточной для коммерческого применения. Значение фитотоксичности после обработки гербицидом (Odyssey®) для линии PM1/PM2 *V. juncea* было в диапазоне от 25 до 50% во всех тестируемых местоположениях (Velva, Mohall, Fargo, Hettinger), тогда как урожайность обработанного Odyssey® объекта PM1/PM2 *V. juncea* была снижена в среднем на 50% по сравнению с не опрыскиваемым объектом PM1/PM2 *V. juncea*. В случае объектов bR/PM2 *V. juncea* (S006, S007, S008) не показана фитотоксичность при обработке 1× Odyssey® во всех тестируемых местоположениях и не показано какое-либо существенное снижение урожайности. В случае объектов bR/PM2 *V. juncea* также показана более низкие значения фитотоксичности, чем для объекта PM1/PM2 *V. napus* во всех местопо-

ложениях.

Подобным образом двадцать восемь разных объектов (генотипов) *V. juncea*, содержащих сочетанную мутацию bR/PM2, вместе только с одним объектом *V. juncea* PM2 (J03Z-16413) и одним коммерческим контрольным сортом CLEARFIELD® *V. parvus*, содержащим сочетанные мутации PM1/PM2, тестировали на поле в трех местоположениях, использовали план с рандомизированными целостными блоками (1 обработка) с 2 повторами, при этом средний размер делянки составлял 1,5×5 м. Использовали региональные нормы высева канолы, и нормы высева на отдельных делянках корректировали для достижения одинаковой плотности посева в каждом местоположении на основании массы 1000 семян каждого объекта. В данном испытании гербицид применяли по отношению ко всем объектам как показано в таблице ниже.

Таблица 6. Обработка гербицидом

<b>Обработки:</b>	<b>2× норма внесения гербицидного продукта Clearfield®:</b>	<b>следующего для канолы</b>
	70 г активного ингредиента/га Beyond®+0,5% (об./об.) Merge®	
<b>Объем опрыскивания:</b>	100 литров/га	
<b>Стадия роста:</b>	2-4 листа	

CLEARFIELD® и уникальное название CLEARFIELD являются зарегистрированными торговыми марками BASF

Таблица 7. Агрономическая оценка

кг/га	Урожайность в килограммах на гектар, преобразованная из данных в граммах/делянку с использованием площади сбора урожая - 7% расчетная влажность
% от контролей	Относительная урожайность по сравнению со средним значением для 4 контролей
кг/га	Урожайность в килограммах на гектар, преобразованная из данных в граммах/делянку с использованием площади сбора урожая - 7% расчетная влажность
Агрономическая	Агрономическая оценка по шкале от 0 до 9, 0 означает очень плохо, 9 означает очень хорошо
Повреждение	Визуальная оценка повреждения в % на ранней стадии - 7-10 дней после опрыскивания Beyond®
Дни цветения	Дни от посева до первого цветка
Продолжительность цветения	Дни от первого цветка до конца цветения
Созревание	Дни от посева до созревания
Высота	Высота при созревании в см
Полегание	Оценка полегания по шкале от 1 до 5, 1 означает отсутствие полегания, 5 означает значительное полегание

Таблица 8. Результаты тестирования на поле

Предварительное полевое испытание устойчивых к имидазолинону растений <i>V. juncea</i>												
Суммарные данные для 3 местоположений (Канада, год 1), 2 повтора для каждого местоположения, все делянки опрыскивали 2× Beyond												
Контроль равен объект 2 (коммерческая линия Clearfield®, CL, <i>V. napus</i> : PM1/PM2)												
Гербицид												
Агрон. Повреждение Цветение Созревание Высота Полегание Урожайность												
Название	Мутационное событие	Вид	Объект	(1-9)	(%)	(дни)	(продолжительность)	(дни)	(см)	(1-5)	(кг/га)	(% от контроля: объект 2)
J03Z-16413	PM2	<i>V. juncea</i>	1	3,6	19,2	48,7	20,0	95,5	127,7	2,2	2661,8	78,2
Коммерческий CL <i>V. napus</i>	PM1/PM2	<i>V. napus</i>	2	6,8	12,3	47,2	14,9	91,5	120,9	1,8	3402,9	100,0
J05Z-08310	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	3	5,6	2,7	45,3	17,1	91,8	142,6	1,2	3468,4	101,9
J05Z-08333	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	4	5,3	2,0	46,2	16,8	92,1	142,7	1,5	3696,9	108,6
J05Z-08347	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	5	6,0	2,0	45,0	17,7	90,0	137,6	1,6	3685,3	108,3
J05Z-08433	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	6	6,3	1,7	44,2	18,1	89,3	139,8	1,3	3555,9	104,5
J05Z-07317	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	7	5,2	2,7	45,3	17,1	92,3	147,9	1,4	3492,4	102,6
J05Z-07322	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	8	5,0	3,3	44,0	17,5	88,9	143,4	1,8	3248,3	95,5
J05Z-07366	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	9	5,7	2,3	43,4	18,5	91,3	150,6	1,5	4082,3	120,0
J05Z-09273	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	10	6,5	2,7	44,2	15,2	89,7	148,2	1,5	3754,5	110,3
J05Z-06609	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	11	5,7	2,3	43,1	17,3	90,4	146,4	1,6	4315,7	126,8
J05Z-07756	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	12	6,1	7,7	44,2	17,7	89,5	136,6	1,2	3537,0	103,9
J05Z-07814	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	13	6,1	8,7	42,0	18,2	87,7	137,0	1,7	3758,0	110,4
J05Z-07830	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	14	6,5	2,8	44,8	18,2	90,6	143,7	1,1	3642,5	107,0
J05Z-07848	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	15	5,7	7,3	43,0	18,8	88,3	133,7	1,4	3570,0	104,9
J05Z-07937	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	16	6,2	5,0	43,2	17,2	89,7	132,7	1,6	3570,6	104,9
J05Z-07952	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	17	6,8	4,7	44,6	16,9	91,8	136,3	1,4	3545,1	104,2
J05Z-07957	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	18	5,9	2,0	44,4	18,3	89,9	139,6	1,2	3839,5	112,8
J05Z-07975	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	19	5,3	3,0	41,8	16,9	89,9	128,6	2,0	3642,1	107,0
J05Z-07984	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	20	5,4	9,5	43,9	17,8	90,2	130,1	1,5	3637,3	106,9
J05Z-07989	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	21	7,3	2,3	44,3	18,0	89,9	134,0	1,2	3989,5	117,2
J05Z-07994	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	22	6,7	6,0	43,2	18,6	89,3	129,7	1,4	3710,6	109,0
J05Z-08018	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	23	7,1	1,7	43,3	18,6	88,8	129,2	1,4	3977,1	116,9
J05Z-08029	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	24	6,5	2,0	45,0	18,3	92,2	143,1	1,1	3469,5	102,0
J05Z-08045	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	25	5,9	2,3	43,0	18,2	92,1	131,2	1,5	3304,2	97,1
J05Z-08122	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	26	6,8	2,3	43,4	16,0	87,9	131,6	1,2	3760,7	110,5
J05Z-08131	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	27	5,2	4,7	42,3	15,5	88,1	129,7	2,0	3411,9	100,3
J05Z-08133	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	28	7,2	6,0	42,3	17,2	91,4	134,9	1,1	3947,6	116,0
J05Z-08159	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	29	6,8	4,7	43,2	17,6	88,4	135,1	1,3	3959,5	116,4
J05Z-08190	bR/PM2	<i>V. juncea</i>	30	7,1	4,3	43,5	16,1	88,6	123,3	1,2	3883,3	114,1
Средняя генеральная				6,0	4,7	44,1	17,5	90,2	136,2	1,4	3650,7	
CV				12,5	58,7	0,8	5,6	2,3	3,0	23,0	8,1	
LSD				1,3	3,7	0,6	1,7	2,8	6,9	0,6	401,9	

Два дополнительные разных объекта *V. juncea* (генотипы), содержащих сочетанные мутации bR/PM2, и один коммерческий контроль CLEARFIELD® *V. napus*, содержащий сочетанные мутации PM1/PM2, подвергали полевому испытанию в нескольких местоположениях на протяжении двух следующих друг за другом лет. Использовали региональные нормы высева канолы, и нормы высева на отдельных делянках корректировали для достижения одинаковой плотности посева в каждом местоположении на основании массы 1000 семян каждого объекта. В данном испытании гербицид (Beyond®) применяли по отношению ко всем объектам как показано в табл. 9 ниже.

Таблица 9

Местоположение	Сорт		Норма внесения	Повреждение		Цветение	Созревание	Высота	Урожайность
				7-10 день	14-21 день	(дни)	(дни)	(см)	(кг/га)
	<b>Year 1</b>								
Watrous	B. parus контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	46	89,8	134,5	3867,1
Watrous	B. parus контроль	PM1/PM2	1×	8,3	0,0	46,3	87,8	132,5	4463,8*
Watrous	B. parus контроль	PM1/PM2	2×	12,5					
Watrous	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	44,8	94,8	158,8	4661,7
Watrous	J05Z-08376	bR/PM2	1×	0,0	0,0	45	93	156,8	4807,8
Watrous	J05Z-08376	bR/PM2	2×	3,0					
Watrous	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	43,8	94,3	151,3	4571,6
Watrous	J05Z-07784	bR/PM2	1×	0,5	0,0	44,3	95,3	157,5	4870,7
Watrous	J05Z-07784	bR/PM2	2×	2,0					
	CV (%)								7,4
	LSD (0,05)			1,6	1,4	0,64	3,12	10,1	450,6
Avonlea	B. parus контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	50,5	90,8	117,8	2940,7
Avonlea	B. parus контроль	PM1/PM2	1×	2,5	0,0	50,5	90,5	115,8	3150,7
Avonlea	B. parus контроль	PM1/PM2	2×	7,0					
Avonlea	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	48,5	89,3	138,8	3295,4
Avonlea	J05Z-08376	bR/PM2	1×	1,5	0,5	48,3	90,3*	140,8	3608,4*
Avonlea	J05Z-08376	bR/PM2	2×	1,0					
Avonlea	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	46,5	88,8	131,3	3532,7
Avonlea	J05Z-07784	bR/PM2	1×	2,0	0,0	46,5	89,5	138,8*	3438,5
Avonlea	J05Z-07784	bR/PM2	2×	1,0					
	CV (%)								6,6
	LSD (0,05)			2,7	1,8	0,76	0,85	6,9	309,7
Hanley	B. parus контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	49,8	92,8	124,5	2473,6
Hanley	B. parus контроль	PM1/PM2	1×	15,0	9,3	49,3	92,0	123,8	3057,4*
Hanley	B. parus контроль	PM1/PM2	2×	20,0					
Hanley	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	48,8	86,0	147,3	2915,1
Hanley	J05Z-08376	bR/PM2	1×	2,8	11,0	48,0	84,3	146,3	3316,9*
Hanley	J05Z-08376	bR/PM2	2×	2,0					
Hanley	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	48,3	87,8	142,3	3356,3
Hanley	J05Z-07784	bR/PM2	1×	2,8	2,0	47,0	87,3	141,8	3702,7*
Hanley	J05Z-07784	bR/PM2	2×	3,5					
	CV (%)								6,3
	LSD (0,05)			4,7	3,6	3,2	2,52	7,4	277
Craik	B. parus контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	49,0	86,0	116,5	3394,6
Craik	B. parus контроль	PM1/PM2	1×	2,0	0,0	49,0	86,0	110,5	3213,5
Craik	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	47,0	87,8	132,0	3137,4
Craik	J05Z-08376	bR/PM2	1×	0,8	0,3	46,5	85,0	121,8*	2904,6
Craik	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	46,0	88,8	132,8	3633,9
Craik	J05Z-07784	bR/PM2	1×	3,5	0,0	46,3	87,0	130,0	3626,0
	CV (%)								8,3
	LSD (0,05)			5,0	2,1	1,0	3,8	7,4	365,5
Trochu	B. parus контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	49,8	102,0	132,5	4791,1
Trochu	B. parus контроль	PM1/PM2	1×	0,5	4,3	49,8	102,0	136,3	4831,1
Trochu	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	47,8	103,3	148,8	6021,3
Trochu	J05Z-08376	bR/PM2	1×	1,0	0,5	47,8	101,3*	150,0	5954,2
Trochu	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	47,0	103,5	148,8	6413,1
Trochu	J05Z-07784	bR/PM2	1×	3,0	0,5	45,8*	103,5	153,0	5954,2
	CV (%)								8,3
	LSD (0,05)			13,1	14,5	0,9	1,9	10,7	627,9
	<b>Year 2</b>								
Watrous	B. parus контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	36,8	87,8	122,0	3886,1
Watrous	B. parus контроль	PM1/PM2	2×	0,0	1,0	37,0	85,5	129,3	3506,9
Watrous	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	35,8	81,8	130,3	3525,9
Watrous	J05Z-08376	bR/PM2	2×	2,5	0,0	35,8	82,8	136,8	3615,5

Watrous	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	35,3	86,0	131,3	3952,8
Watrous	J05Z-07784	bR/PM2	2×	2,0	1,0	35,8	84,5	127,8	3818,0
Watrous	PM2	PM2		0,0	0,0	39,8	>90	118,0	3987,0
Watrous	PM2	PM2	2×	22,5	25,0	44,3*	>90	103,5*	2984,9*
	CV (%)								11,7
	LSD (0,05)			5,7	5,8	0,9	2,9	6,6	584,4
Craik	V. парус контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	49,5	84,3	114,5	2165,0
Craik	V. парус контроль	PM1/PM2	2×	2,5	0,3	49,3	84,5	115,0	2171,3
Craik	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	47,5	87,8	139,0	2372,6
Craik	J05Z-08376	bR/PM2	2×	1,0	0,0	48,0	90,0	140,3	3080,5*
Craik	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	47,8	88,5	136,8	2194,3
Craik	J05Z-07784	bR/PM2	2×	1,5	0,3	47,5	88,3	133,3	3085,5*
Craik	PM2	PM2		0,0	0,0	52,0	91,0	115,0	1874,2
Craik	PM2	PM2	2×	4,5	3,3	55,8*	90,3	108,0	1980,8
	CV (%)								9,9
	LSD (0,05)			1,8	1,0	1,1	2,4	7,9	330,1
Eyebrow	V. парус контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	41,5	74,3	121,3	1687,1
Eyebrow	V. парус контроль	PM1/PM2	2×	1,5	0,0	42,0	72,8	114,8	1477,1
Eyebrow	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	38,8	73,5	147,8	2034,1
Eyebrow	J05Z-08376	bR/PM2	2×	2,8	1,0	38,0	71,8	133,8*	2131,2
Eyebrow	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	39,0	72,3	134,8	1909,5
Eyebrow	J05Z-07784	bR/PM2	2×	3,3	1,8	39,3	74,8	124,8*	1903,7
Eyebrow	PM2	PM2		0,0	0,0	44,0	78,7	113,5	1434,4
Eyebrow	PM2	PM2	2×	1,9	2,8	49,5*	82,3*	97,0*	742,4*
	CV (%)								9,7
	LSD (0,05)			1,5	1,1	1,0	2,9	7,8	277,7
Vulcan	V. парус контроль	PM1/PM2		0,0	0,0		88,0	103,8	3527,5
Vulcan	V. парус контроль	PM1/PM2	2×	1,0	0,5		88,0	101,9	3202,4
Vulcan	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0		89,8	123,8	4177,0
Vulcan	J05Z-08376	bR/PM2	2×	6,3	2,8		85,0	118,8	3807,9
Vulcan	J05Z-07784	D-R/PM2		0,0	0,0		89,8	115,0	2995,2
Vulcan	J05Z-07784	bR/PM2	2×	13,8	11,3		88,5	108,8	2672,5
Vulcan	PM2	PM2		0,0	0,0		88,0	108,8	2566,2
Vulcan	PM2	PM2	2×	42,5	26,3		91,5	100,6	2357,2
	CV (%)								13,3
	LSD (0,05)			12,0	9,6		5,2	16,4	619,6
Orkney	V. парус контроль	PM1/PM2		0,0	0,0	46,3	88,8	87,5	1407,3
Orkney	V. парус контроль	PM1/PM2	2×	3,0	0,5	47,5	90,0	77,8*	1398,0
Orkney	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0	46,8	88,5	89,0	2028,8
Orkney	J05Z-08376	bR/PM2	2×	9,3	5,0	47,3	92,0*	93,3	2000,8
Orkney	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0	47,3	91,3	91,3	2002,3
Orkney	J05Z-07784	bR/PM2	2×	13,8	6,8	48,3	91,5	93,3	2062,8
Orkney	PM2	PM2		0,0	0,0	49,0	90,3	80,3	1315,1
Orkney	PM2	PM2	2×	10,0	11,3	51,5*	99,5*	73,5	316,4*
	CV (%)								10,5
	LSD (0,05)			29,2	12,7	2,2	3,5	9,0	256,4
Hanley	V. парус контроль	PM1/PM2		0,0	0,0		85,3	133,0	1084,6
Hanley	V. парус контроль	PM1/PM2	5×	16,5	14,8		89,5*	117,5*	1287,3
Hanley	J05Z-08376	bR/PM2		0,0	0,0		90,3	144,0	1808,8
Hanley	J05Z-08376	bR/PM2	5×	41,5	21,5		88,5	143,0	1866,3
Hanley	J05Z-07784	bR/PM2		0,0	0,0		90,8	134,0	1909,0
Hanley	J05Z-07784	bR/PM2	5×	24,3	14,3		91,0	129,3	1761,1
Hanley	PM2	PM2		0,0	0,0		94,0	122,3	1249,6
Hanley	PM2	PM2	5×	26,5	74,5		99,5*	92,5*	746,2*
	CV (%)								16,0
	LSD (0,05)			21,3	14,9		4,2	7,4	404,7

Данные о фитотоксичности в полевых условиях также получали для 3 разных линий, содержащих обе мутации bR и PM2 (гомозиготных по bR/PM2), и сравнивали с фитотоксичностью в полевых услови-

ях для коммерческой линии *B. napus*, содержащей обе мутации PM1 и PM2 (гомозиготной по PM1/PM2). Указанные линии опрыскивали 1× BEYOND® (35 г активного ингредиента/га имазамокса) и оценивали в отношении фитотоксичности через 7-10 дней после обработки (DAT). Линию *B. juncea* дикого типа (т.е. не имеющую мутаций AHAS) также опрыскивали 1× BEYOND® в качестве контроля. Результаты представлены в табл. 10 ниже.

Таблица 10

Полевой сезон 1 года – агрономические характеристики <i>B. juncea</i> , опрыскиваемых 1× Beyond®	
	Фитотоксичность в % на 7-10 день после обработки
<i>B. napus</i> PM1/PM2	5,7
<i>B. juncea</i> bR/PM2 S 002	1,2
<i>B. juncea</i> bR/PM2 S 003	2,4
<i>B. juncea</i> bR/PM2 S 006	2,8

Сходную группу экспериментов проводили на четырех дополнительных линиях *B. juncea* со средним содержанием олеиновой кислоты, которые содержали обе мутации bR и PM2 (гомозиготные по bR/PM2), опрыскиваемых 2× BEYOND™. Результаты представлены в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Полевой сезон 1 года – агрономические характеристики линий <i>B. juncea</i> , опрыскиваемых 2× Beyond®	
	Фитотоксичность в % на 7-10 день после обработки
<i>B. napus</i> PM1/PM2	13,2
<i>B. juncea</i> bR/PM2 J05Z-5105	4,2
<i>B. juncea</i> bR/PM2 J05Z-7146	1,3
<i>B. juncea</i> bR/PM2 J05Z07154	2,2
<i>B. juncea</i> bR/PM2 J05Z07160	2,3

Чтобы исследовать влияние сочетания мутаций bR и PM2 вместе по сравнению с соответствующими отдельными мутациями проводили полевые испытания устойчивости к гербицидам на объектах *B. juncea*, содержащих либо мутацию PM2 отдельно, либо мутацию bR отдельно, или объекты, содержащие обе мутации bR и PM2. Все мутации были гомозиготными у всех объектов. Использовали план с рандомизированными полными блоками (4 обработки), состоящий из 3 повторов, со средним размером делянок 1,5×5 м. Использовали региональные нормы высева канолы, и нормы высева на отдельных делянках корректировали для достижения одинаковой плотности посева в каждом местоположении на основании массы 1000 семян каждого объекта. В данном испытании гербицид (Beyond®, 1× доза составляла 35 г активного ингредиента/га) применяли по отношению ко всем объектам как показано в таблице 10 ниже. Линии *B. juncea*, имеющие одиночные или комбинированные признаки, обрабатывали гербицидом на уровне 0×, 1×, 2× или 4×, и оценивали на 10, 12, 14 или 28 день после обработки (DAT). Два разных человека оценивали фитотоксичность на 10, 12, 14 и/или 28 день после обработки соответствующими количествами гербицида (как показано в табл. 12: исследователь 1 по сравнению с исследователем 2). Результаты представлены в табл. 12 ниже.

Таблица 12

Средняя фитотоксичность в процентах (3 повтора)				
	Исследователь 1	Исследователь 2	Исследователь 1	Исследователь 1
Объект и доза гербицида	10 DAT	12 DAT	14 DAT	28 DAT
bR/PM2 0x	0,0	0,0	0,0	0,0
bR/PM2 1x	4,0	7,5	2,3	0,7
bR/PM2 2x	11,7	10,8	10,0	3,0
bR/PM2 4x	25,0	21,7	28,3	15,0
PM2 0x	0,0	0,0	0,0	0,7
PM2 1x	11,7	17,5	6,7	5,7
PM2 2x	35,0	28,3	35,0	33,3
PM2 4x	53,3	36,7	56,7	65,0
bR 0x	0,0	0,0	0,0	0,0
bR 1x	98,7	81,7	99,3	99,0
bR 2x	100,0	85,0	99,7	99,3
bR 4x	100,0	93,3	100,0	73,3
CV	16,4	9,5	19,0	48,3
LSD	10,2	5,1	11,8	26,9

Чтобы более четко продемонстрировать, что устойчивость линии с сочетанными мутациями bR/PM2 выше, чем сумма устойчивости отдельных мутантных линий (повреждение культур или фитотоксичность показана в табл. 12), фактически полученную устойчивость к гербициду в процентах для сочетания bR/PM2 сравнивали с суммой устойчивости к гербицидам в процентах линии с отдельной мутацией bR и линии с отдельной мутацией PM2 (предполагаемая устойчивость к гербициду) (табл. 13). При уровнях гербицида, которые ограничивают или подавляют отдельные мутации (наиболее заметно при 2x- и 4x-дозах), уровни устойчивости к гербицидам, наблюдаемые для линии с сочетанными мутациями bR/PM2, превышают устойчивость к гербициду, получаемую при сложении двух отдельных значений устойчивости bR+PM2 вместе. В линии с сочетанными мутациями bR/PM2 наблюдается синергетический уровень устойчивости к гербициду, а не аддитивный уровень. Такой повышенный (синергетический) уровень устойчивости к имидазолинону наблюдали у более чем 30 разных генотипов *V. juncea*, содержащих сочетанные мутации bR/PM2.

Таблица 13

Устойчивость к имидазолинону в процентах				
Описание объекта	10 DAT	12 DAT	14 DAT	28 DAT
bR/PM2 0x	100,0	100,0	100,0	100,0
bR/PM2 1x	96,0	92,5	97,7	99,3
bR/PM2 2x	88,3	89,2	90,0	97,0
bR/PM2 4x	75,0	78,3	71,7	85,0
PM2 0x	100,0	100,0	100,0	99,3
PM2 1x	88,3	82,5	93,3	94,3
PM2 2x	65,0	71,7	65,0	66,7
PM2 4x	46,7	63,3	43,3	35,0
bR 0x	100,0	100,0	100,0	100,0
bR 1x	1,3	18,3	0,7	1,0
bR 2x	0,0	15,0	0,3	0,7
bR 4x	0,0	6,7	0,0	26,7
Устойчивость к имидазолинону, предполагаемая на основании отдельных испытаний				
PM2+bR 1x	89,6	100,8	94,0	95,3
PM2+bR 2x	65,0	86,7	65,3	67,4
PM2+bR 4x	46,7	70,0	43,3	61,7

В заключение, показано, что синергетический или повышенный уровень устойчивости линий *V. juncea* bR/PM2 больше чем уровень устойчивости, наблюдаемый в линиях *V. parvus* с сочетанными мутациями PM1/PM2, а также намного больше, чем устойчивость, наблюдаемая в линиях *V. juncea* с сочетанными мутациями PM1/PM2 (табл. 5). В линиях *V. juncea* bR/PM2 не обнаружено какого-либо снижения урожайности при обработке имидазолиновыми гербицидами, тогда как в линии *V. juncea* PM1/PM2 обнаружено значительное снижение урожайности при обработке коммерческими дозами имидазолинового гербицида.

Все публикации и заявки на выдачу патента, упоминаемые в описании, являются показателем уровня специалистов в области, к которой относится изобретение. Все публикации и заявки на выдачу патентов включены в настоящее описание в виде ссылки в такой же степени, как в случае, когда специально и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или заявка на выдачу патента включена в виде ссылки.

Хотя раскрытое выше изобретение описано подробно в качестве иллюстрации и примера в целях для лучшего понимания, будет очевидно, что в объеме прилагаемой формулы изобретения на практике могут быть осуществлены некоторые изменения и модификации.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устойчивое к АНАS-ингибирующим гербицидам растение *Brassica juncea*, содержащее геном А, содержащий ген большой субъединицы синтазы ацетогидроксикислот (АНАSЛ), кодирующий устойчивый к гербициду полипептид АНАSЛ, имеющий замещение на аспарагин в положении, соответствующем положению 635 в последовательности SEQ ID NO: 3.

2. Растение *Brassica juncea* по п.1, дополнительно содержащее геном В, содержащий ген АНАSЛ, кодирующий устойчивый к указанным гербицидам полипептид АНАSЛ, имеющий замещение на треонин в положении, соответствующем положению 107 в последовательности SEQ ID NO: 4, при этом устойчивые к указанным гербицидам полипептиды АНАSЛ обеспечивают синергетический уровень устойчивости указанного растения *Brassica juncea* к АНАS-ингибирующим гербицидам.

3. Растение *Brassica juncea* по п.1, дополнительно содержащее геном В, содержащий ген АНАSЛ, кодирующий устойчивый к указанным гербицидам полипептид АНАSЛ, имеющий замещение на аспарагин в положении, соответствующем положению 638 в последовательности SEQ ID NO: 2.

4. Растение *Brassica juncea* по п.2, которое обладает по меньшей мере на 10% более высокой устойчивостью к указанным гербицидам по сравнению с аддитивными уровнями устойчивости у растения *Brassica*, имеющего только ген АНАSЛ генома А, и у растения *Brassica*, имеющего только ген АНАSЛ генома В.

5. Растение *Brassica juncea* по п.4, которое обладает по меньшей мере на 20% более высокой устойчивостью к указанным гербицидам по сравнению с аддитивными уровнями устойчивости у растения *Brassica*, имеющего только ген АНАSЛ генома А, и у растения *Brassica*, имеющего только ген АНАSЛ генома В.

6. Растение *Brassica juncea* по п.5, которое обладает по меньшей мере на 30% более высокой устойчивостью к указанным гербицидам по сравнению с аддитивными уровнями устойчивости у растения *Brassica*, имеющего только ген АНАSЛ генома А, и у растения *Brassica*, имеющего только ген АНАSЛ генома В.

7. Часть устойчивого к АНАS-ингибирующим гербицидам растения *Brassica juncea* по любому из пп.1-6, которая содержит гены АНАSЛ, кодирующие устойчивые к указанным гербицидам полипептиды АНАSЛ, охарактеризованные в п.1 или 2, выбранная из каллусов, протопластов, стеблей, листьев, корней, соцветий, цветков, цветков сложных соцветий, плодов, цветоножек, плодоножек, тычинок, пыльников, рылец, столбиков, завязей, лепестков, чашелистиков, плодолистиков, кончиков корней, корневых чехликов, корневых волосков, листовых волосков, волосков семени, пыльцы, микроспор, зародышей, семязпочек, семядолей, гипокотилей, эпикотилей, ксилемы, флоэмы, паренхимы, эндосперма, клеточных стенок и замыкающих клеток.

8. Часть растения по п.7, выбранная из пыльцы, протопластов и семязпочек.

9. Клетка устойчивого к АНАS-ингибирующим гербицидам растения *Brassica juncea* по любому из пп.1-6, которая содержит гены АНАSЛ, кодирующие устойчивые к указанным гербицидам полипептиды АНАSЛ, охарактеризованные в п.1 или 2.

10. Семя устойчивого к АНАS-ингибирующим гербицидам растения *Brassica juncea* по любому из пп.1-6, содержащее гены АНАSЛ, кодирующие устойчивые к указанным гербицидам полипептиды АНАSЛ, охарактеризованные в п.1 или 2.

11. Семя по п.10, где семя обработано препаратом для обработки семян, содержащим АНАS-ингибирующий гербицид.

12. Семя по п.11, где препарат для обработки семян содержит один или более из следующих гербицидов: имидазолиновый гербицид, сульфонилмочевинный гербицид, триазолопиримидиновый гербицид и пиримидинилоксибензоатный гербицид.

13. Семя по п.12, где препарат для обработки семян содержит имидазолиновый гербицид.

14. Семя по п.13, где имидазолиновый гербицид выбран из имазетапира, имзапика, имзамокса, имзаквины, имзапира и их комбинаций.

15. Семя по п.11, где семя обработано любым из способов: опрыскиванием семян, протравливанием семян, покрыванием семян оболочкой, опудриванием семян, намачиванием семян, дражированием семян или сочетанием указанных способов.

16. Семя по п.11, обработанное перед посевом и/или после предварительного проращивания.

17. Способ борьбы с сорняками на поле с Brassica, включающий выращивание на поле устойчивого к АНАС-ингибирующим гербицидам растения Brassica juncea по любому из пп.1-6 и осуществление контакта указанного растения Brassica juncea и сорняков на поле с эффективным количеством АНАС-ингибирующего гербицида.

18. Способ по п.17, где указанный гербицид выбран из имидазолинонового гербицида, сульфонилмочевинного гербицида, триазолопиримидинового гербицида, пиримидинилоксибензоатного гербицида и их комбинаций.

19. Способ по п.18, где гербицид представляет собой имидазолиноновый гербицид.

20. Способ по п.19, где имидазолиноновый гербицид выбран из имазетапира, имзапика, имзамокса, имзаквины, имзапира и их комбинаций.

21. Способ борьбы с сорняками на поле, где будут произрастать растения Brassica, включающий посев обработанного семени по любому из пп.11-14.

22. Способ отбора устойчивого к АНАС-ингибирующим гербицидам растения Brassica juncea из множества растений Brassica, включающий

получение множества растений Brassica, которые могут включать устойчивое к указанным гербицидам растение Brassica juncea по любому из пп.1-6;

нанесение эффективного количества АНАС-ингибирующего гербицида на указанное множество растений Brassica juncea и

отбор растения Brassica juncea, способного расти в присутствии указанного гербицида.

23. Способ по п.22, где гербицид выбран из имидазолинонового гербицида, сульфонилмочевинного гербицида, триазолопиримидинового гербицида, пиримидинилоксибензоатного гербицида и их комбинаций.

24. Способ по п.23, где гербицид представляет собой имидазолиноновый гербицид.

25. Способ по п.24, где имидазолиноновый гербицид выбран из имазетапира, имзапика, имзамокса, имзаквины, имзапира и их комбинаций.

26. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий устойчивый к АНАС-ингибирующему гербициду полипептид АНАSL генома A Brassica, имеющий замещение на аспарагин в положении, соответствующем положению 635 в последовательности SEQ ID NO: 3.

27. Растение, трансформированное экспрессирующим вектором по п.26 и имеющее повышенную устойчивость к АНАС-ингибирующим гербицидам.

28. Растение по п.27, где указанный гербицид выбран из имидазолиноновых гербицидов, сульфонилмочевинных гербицидов, триазолопиримидиновых гербицидов и пиримидинилоксибензоатных гербицидов.

29. Растение по п.28, где растение выбрано из B. juncea, B. napus, B. rapa, B. carinata, B. oleracea и B. nigra.

30. Способ получения трансгенного растения, имеющего повышенную устойчивость к АНАС-ингибирующим гербицидам, включающий

трансформацию растительной клетки экспрессирующим вектором по п.26 и

регенерацию из растительной клетки трансгенного растения, которое экспрессирует полипептиды АНАSL, обеспечивающие повышенную устойчивость к указанным гербицидам.

31. Способ отбора устойчивых к АНАС-ингибирующим гербицидам трансформированной растительной клетки, растительной ткани или растения или его части из множества трансформированных растительных клеток, растительных тканей или растений или их частей, включающий

получение множества трансформированных растительных клеток, растительных тканей или растений или их частей, которые могут включать полинуклеотид АНАSL, входящий в состав экспрессирующего вектора по п.26, причем полинуклеотид АНАSL кодирует мутантный полипептид АНАSL, который обеспечивает устойчивость к АНАС-ингибирующему гербициду трансформированной растительной клетки, растительной ткани или растения или его части, экспрессирующих полипептид, при этом полипептид применяют в качестве селективируемого маркера;

осуществление контакта указанного множества трансформированных растительных клеток, растительных тканей, растений или их частей по меньшей мере с одним АНАС-ингибирующим гербицидом;

определение того, подвергается ли растительная клетка, растительная ткань, растение или его часть воздействию АНАС-ингибирующего гербицида; и

отбор трансформированной растительной клетки, растительной ткани, растения или его части, способных к росту в присутствии указанных гербицидов, как содержащих полинуклеотид АНАSL, входящий в состав экспрессирующего вектора по п.26.

32. Способ получения устойчивого к АНАС-ингибирующим гербицидам растения Brassica, включающий

скрещивание первого растения Brassica, которое является устойчивым к указанным гербицидам, со вторым растением Brassica, которое не является устойчивым к указанным гербицидам, при этом первое растение представляет собой растение Brassica juncea по любому из пп.1-6; и

отбор растения-потомка, которое является устойчивым к указанным гербицидам.

33. Устойчивое к АНАS-ингибирующим гербицидам растение, полученное способом по п.32.  
 34. Семя растения по п.33, где семя содержит гены АНАSЛ первого растения.  
 35. Способ получения устойчивых к АНАS-ингибирующим гербицидам семян Brassica, включающий скрещивание первого растения Brassica со вторым растением Brassica с получением растения-потомка, при этом первое растение Brassica представляет собой устойчивое к указанным гербицидам растение Brassica juncea по любому из пп.1-6 и сбор семян от растения-потомка.  
 36. Применение семени по любому из пп.10 и 34 для получения масла.  
 37. Применение семени по любому из пп.10 и 34 для получения жмыха.  
 38. Способ идентификации растения по п.1, включающий:  
 (а) получение биологического материала из растения,  
 (б) осуществление основанного на ПЦР или гибридизации тестирования генов АНАSЛ в указанном биологическом материале, чтобы определить, содержит ли его геном А ген АНАSЛ, который кодирует первый полипептид АНАSЛ по п.1, и  
 (с) идентификацию, основанную на результатах стадии (б), того, что растение со стадии (а) является растением по п.1.

39. Способ по п.38, где указанным биологическим материалом является семя растения.

	1				50
AtAHASL	.....	.....	.....	.....	.....
Bn_PM2	.....	.....	.....	.....	.....
BnAHASL1A	CACGTTCA	AACTCATCA	TCATCTCTCT	STCATTCTCTC	.TCCTCTCTCT
BnAHASL1C	.....	.....CA	CGTTCACAAA	STCATTCTCTC	ATCTCTCTCT
BjAHASL1A	CACGTTCA	AACTCATCA	TCATCTCTCT	STCATTCTCTC	...TCTCTCT
BjAHASL1B	CACGTTCA	AACTCATCA	TCATCTCTCG	STCATTCTCTC	...TCCTCTCT
J04E-0044	CACGTTCA	AACTCATCA	TCATCTCTCG	STCATTCTCTC	...TCCTCTCT
J04E-0122	CACGTTCA	AACTCATCA	TCATCTCTCT	STCATTCTCTC	...TCTCTCT
J04E-0130	CACGTTCA	AACTCATCA	TCATCTCTCG	STCATTCTCTC	...TCCTCTCT
J04E-0139	CACGTTCA	AACTCATCA	TCATCTCTCT	STCATTCTCTC	...TCTCTCT
	51				100
AtAHASL	.....A	TGGCGGCGGC	AACAACAACA	ACAACAACAT	CTTCTTCGAT
Bn_PM2	.....A	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCGAT
BnAHASL1A	CATCTAACCA	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCGAT
BnAHASL1C	CTCTAACCA	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCGAT
BjAHASL1A	CATCTAACCA	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCGAT
BjAHASL1B	CTCTAACCA	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCAAT
J04E-0044	CTCTAACCA	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCAAT
J04E-0122	CATCTAACCA	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCGAT
J04E-0130	CTCTAACCA	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCAAT
J04E-0139	CATCTAACCA	TGGCGGCGGC	AACATCG...	.....T	CTTCTCCGAT
	101				150
AtAHASL	CTCCTTACC	ACCAAACCTT	CTCCTTCCCT	CTCCAATCCA	CCATTACCAA
Bn_PM2	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	C...T....	.TCCAATCC	CCTCTACCCA
BnAHASL1A	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	CT.....	.TCCAATCC	CCTCTACCCA
BnAHASL1C	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	CT.....	.TCCAATCC	CCTCTACCCA
BjAHASL1A	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	CT.....	.TCCAATCC	CCTCTACCCA
BjAHASL1B	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	CT.....	.TCCAATCC	CTTTTACCCA
J04E-0044	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	CT.....	.TCCAATCC	CTTTTACCCA
J04E-0122	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	CT.....	.TCCAATCC	CCTCTACCCA
J04E-0130	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	CT.....	.TCCAATCC	CTTTTACCCA
J04E-0139	CTCCTTACC	GCTAAACCTT	CT.....	.TCCAATCC	CCTCTACCCA
	151				200
AtAHASL	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	ACCCACAGAA	ATCATCTTCC
Bn_PM2	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	ACCCACAGAA	ACC.....C
BnAHASL1A	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	ACCCACAGAA	ACC.....C
BnAHASL1C	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	ACCCACAGAA	AGA.....C
BjAHASL1A	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	ACCCACAGAA	ACC.....C
BjAHASL1B	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	TCCCGCAGAA	ACC.....C
J04E-0044	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	TCCCGCAGAA	ACC.....C
J04E-0122	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	ACCCACAGAA	ACC.....C
J04E-0130	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	TCCCGCAGAA	ACC.....C
J04E-0139	TTTCCAGATT	CTCCCTTCCC	TTCTCCTTAA	ACCCACAGAA	ACC.....C

```

201
AtAHASL TCCTCCC GCCGCGGTAT CAAATCCAGC TCTCCCTCCT CCATCTCCGC 250
  Bn_PM2 TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCACTC.G CCATCTCCGC
BnAHASL1A TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCACTC.G CCATCTCCGC
BnAHASL1C TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCTCTC.G CCATCTCCGC
BjAHASL1A TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCTCTC.G CCATCTCCGC
BjAHASL1B TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCTCTC.T CCATCTCAGC
J04E-0044 TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCTCTC.T CCATCTCAGC
J04E-0122 TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCTCTC.G CCATCTCCGC
J04E-0130 TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCTCTC.T CCATCTCAGC
J04E-0139 TCCTCCC TCCACCGT.. .. CCTCTC.G CCATCTCCGC

300
AtAHASL CGTGCTCAAC ACAACCACCA ATGTCACAAC CACTCCCTCT CCAACCAAAC
  Bn_PM2 CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C.....T.. GAAA..AAAC
BnAHASL1A CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C..T..... GAAA..AAAC
BnAHASL1C CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C.....T.. GAAA..AAAC
BjAHASL1A CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C.....T.. GAAA..AAAC
BjAHASL1B CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C.....T.. GAAA..AAAC
J04E-0044 CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C.....T.. GAAA..AAAC
J04E-0122 CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C.....T.. GAAA..AAAC
J04E-0130 CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C.....T.. GAAA..AAAC
J04E-0139 CGTTCTCAAC TCACCCGTCA ATGTCGCA.C C.....T.. GAAA..AAAC

301
AtAHASL CTACCAAACC CGAAACATTC ATCTCCCGAT TCGCTCCAGA TCAACCCCGC 350
  Bn_PM2 CGACAAGATC A.AGACTTTC ATCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC
BnAHASL1A CGACAAGATC A.AGACTTTC ATCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC
BnAHASL1C CGACAAGAAC A.AGACTTTC GTCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC
BjAHASL1A CGACAAGATC A.AGACTTTC ATCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC
BjAHASL1B TGAAAAGAAC A.AGACTTTC ATCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC
J04E-0044 TGAAAAGAAC A.AGACTTTC ATCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC
J04E-0122 CGACAAGATC A.AGACTTTC ATCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC
J04E-0130 TGAAAAGAAC A.AGACTTTC ATCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC
J04E-0139 CGACAAGATC A.AGACTTTC ATCTCCCGCT ACGCTCCCGA CGAGCCCCGC

351
AtAHASL AAGGGTGTG ATATCCTCGT CGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC 400
  Bn_PM2 AAGGGTGTG ATATCCTCGT GGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC
BnAHASL1A AAGGGTGTG ATATCCTCGT GGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC
BnAHASL1C AAGGGTGTG ATATCCTCGT CGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC
BjAHASL1A AAGGGTGTG ATATCCTCGT GGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC
BjAHASL1B AAGGGTGTG ATATCCTCGT CGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC
J04E-0044 AAGGGTGTG ATATCCTCGT CGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC
J04E-0122 AAGGGTGTG ATATCCTCGT GGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC
J04E-0130 AAGGGTGTG ATATCCTCGT CGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC
J04E-0139 AAGGGTGTG ATATCCTCGT GGAAGCCCTC GAGCGTCAAG GCGTCGAAAC

```

401 450

AtAHASL CGTATTTCGCT TACCCGGAG GTGCATCAAT GGAGATTCAC CAAGCCTTAA  
 Bn\_PM2 CGTCTTCGCT TATCCCGGAG GTGCCTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTGA  
 BnAHASL1A CGTCTTCGCT TATCCCGGAG GTGCCTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTGA  
 BnAHASL1C CGTCTTCGCT TATCCCGGAG GTGCCTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTGA  
 BJAHASL1A CGTCTTCGCT TATCCCGGAG GTGCCTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTGA  
 BJAHASL1B CGTCTTCGCT TACCCGGAG GTGCTTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTAA  
 J04E-0044 CGTCTTCGCT TACCCGGAG GTGCTTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTAA  
 J04E-0122 CGTCTTCGCT TATCCCGGAG GTACCTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTGA  
 J04E-0130 CGTCTTCGCT TACCCGGAG GTACTTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTAA  
 J04E-0139 CGTCTTCGCT TATCCCGGAG GTGCCTCCAT GGAGATCCAC CAAGCCTTGA

451 500

AtAHASL CCCGCTCTTC CTCAATCCGT AACGTCTTTC CTCGTCACGA ACAAGGAGGT  
 Bn\_PM2 CTCGCTCCTC CACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA  
 BnAHASL1A CTCGCTCCTC CACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA  
 BnAHASL1C CTCGCTCCTC CACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA  
 BJAHASL1A CTCGCTCCTC CACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA  
 BJAHASL1B CTCGATCCTC TACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA  
 J04E-0044 CTCGATCCTC TACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA  
 J04E-0122 CTCGCTCCTC CACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA  
 J04E-0130 CTCGATCCTC TACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA  
 J04E-0139 CTCGCTCCTC CACCATCCGT AACGTCTTCC CCCGTCACGA ACAAGGAGGA

501 550

AtAHASL GTATTTCGAG CAGAAGGATA CGCTCGATCC TCAGGTAAAC CAGGTATCTG  
 Bn\_PM2 GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCCGGCAAAC CGGGAATCTG  
 BnAHASL1A GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCCGGCAAAC CGGGAATCTG  
 BnAHASL1C GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCCGGCAAAC CGGGAATCTG  
 BJAHASL1A GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCCGGCAAAC CGGGAATCTG  
 BJAHASL1B GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCTGGTAAAC CGGGAATCTG  
 J04E-0044 GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCTGGTAAAC CGGGAATCTG  
 J04E-0122 GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCCGGCAAAC CGGGAATCTG  
 J04E-0130 GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCTGGTAAAC CGGGAATCTG  
 J04E-0139 GTCTTCGCCG CCGAGGGTTA CGCTCGTTCC TCCGGCAAAC CGGGAATCTG

551 600

AtAHASL TATAGCCACT TCAGGTCCCG GAGCTACAAA TCTCGTTAGC GGATTAGCCG  
 Bn\_PM2 CATAGCCACT TCGGTCCCG GAGCTACCAA CCTCGTCAGC GGTTAGCCG  
 BnAHASL1A CATAGCCACT TCGGTCCCG GAGCTACCAA CCTCGTCAGC GGTTAGCCG

BnAHASL1C CATAGCCACT TCGGTCCCG GAGCTACCAA CCTCGTCAGC GGTTAGCCG  
 BJAHASL1A CATTGCCACT TCGGTCCCG GAGCTACCAA CCTCGTCAGC GGTTAGCCG  
 BJAHASL1B CATAGCCACG TCAGGTCCCG GAGCCACCAA CCTCGTTAGC GGTTAGCCG  
 J04E-0044 CATAGCCACG TCAGGTCCCG GAGCCACCAA CCTCGTTAGC GGTTAGCCG  
 J04E-0122 CATTGCCACT TCGGTCCCG GAGCTACCAA CCTCGTCAGC GGTTAGCCG  
 J04E-0130 CATAGCCACG TCAGGTCCCG GAGCCACCAA CCTCGTTAGC GGTTAGCCG  
 J04E-0139 CATTGCCACT TCGGTCCCG GAGCTACCAA CCTCGTCAGC GGTTAGCCG

	601				650
AtAHASL	ATGCGTTGTT	AGATAGTGTT	CCTCTGTAG	CAATCACAGG	ACAAGTCCCT
Bn_PM2	ACGCGATGCT	TGACAGTGTT	CCTCTCGTCG	CCATCACAGG	ACAGGTCCCT
BnAHASL1A	ACGCGATGCT	TGACAGTGTT	CCTCTCGTCG	CCATCACAGG	ACAGGTCCCT
BnAHASL1C	ACGCGATGCT	TGACAGTGTT	CCTCTGTGTCG	CCATTACAGG	ACAGGTCCCT
BjAHASL1A	ACGCGATGCT	TGACAGTGTT	CCTCTCGTCG	CCATTACAGG	ACAGGTCCCT
BjAHASL1B	ACGCGATGCT	CGACAGTGTC	CCTCTCGTCG	CTATTACAGG	ACAGGTCCCT
J04E-0044	ACGCGATGCT	CGACAGTGTC	CCTCTCGTCG	CTATTACAGG	ACAGGTCCCT
J04E-0122	ACGCGATGCT	TGACAGTGTT	CCTCTCGTCG	CCATTACAGG	ACAGGTCCCT
J04E-0130	ACGCGATGCT	CGACAGTGTC	CCTCTCGTCG	CTATTACAGG	ACAGGTCCCT
J04E-0139	ACGCGATGCT	TGACAGTGTT	CCTCTCGTCG	CCATTACAGG	ACAGGTCCCT
	651				700
AtAHASL	CGTCGTATGA	TTGGTACAGA	TGCGTTTCAA	GAGACTCCGA	TTGTTGAGGT
Bn_PM2	CGCCGGATGA	TCGGTACTGA	CGCGTTCCAA	GAGACGCCAA	TCGTTGAGGT
BnAHASL1A	CGCCGGATGA	TCGGTACTGA	CGCGTTCCAA	GAGACGCCAA	TCGTTGAGGT
BnAHASL1C	CGCCGGATGA	TCGGTACTGA	CGCCTTCCAA	GAGACCCAA	TCGTTGAGGT
BjAHASL1A	CGCCGGATGA	TCGGTACTGA	CGCCTTCCAA	GAGACGCCAA	TCGTTGAGGT
BjAHASL1B	CGTCGGATGA	TTGGTACTGA	CGCGTTCCAG	GAGACGCCAA	TCGTTGAGGT
J04E-0044	CGTCGGATGA	TTGGTACTGA	CGCGTTCCAG	GAGACGCCAA	TCGTTGAGGT
J04E-0122	CGCCGGATGA	TCGGTACTGA	CGCCTTCCAA	GAGACGCCAA	TCGTTGAGGT
J04E-0130	CGTCGGATGA	TTGGTACTGA	CGCGTTCCAG	GAGACGCCAA	TCGTTGAGGT
J04E-0139	CGCCGGATGA	TCGGTACTGA	CGCCTTCCAA	GAGACGCCAA	TCGTTGAGGT
	701				750
AtAHASL	AACGCGTTCG	ATTACGAAGC	ATAACTATCT	TGTGATGGAT	GTTGAAGATA
Bn_PM2	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATCT	GGTGATGGAT	GTTGATGACA
BnAHASL1A	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATCT	GGTGATGGAT	GTTGATGACA
BnAHASL1C	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATTT	GGTGATGGAT	GTTGATGACA
BjAHASL1A	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATCT	GGTGATGGAT	GTTGATGACA
BjAHASL1B	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATCT	GGTCATGGAT	GTTGATGACA
J04E-0044	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATCT	GGTCATGGAT	GTTGATGACA
J04E-0122	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATCT	GGTGATGGAT	GTTGATGACA
J04E-0130	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATCT	GGTCATGGAT	GTTGATGACA
J04E-0139	AACGAGGTCT	ATTACGAAAC	ATAACTATCT	GGTGATGGAT	GTTGATGACA
	751				800
AtAHASL	TCCCTAGGAT	TATTGAGGAA	GCTTTCCTTC	TAGCTACTTC	TGGTAGACCT
Bn_PM2	TACCTAGGAT	CGTTC AAGAA	GCATTCTTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC
BnAHASL1A	TACCTAGGAT	CGTTC AAGAA	GCATTCTTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC
BnAHASL1C	TACCTAGGAT	CGTTC AAGAA	GCTTTCCTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC
BjAHASL1A	TACCTAGGAT	CGTTC AAGAA	GCTTTCCTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC
BjAHASL1B	TACCTAGGAT	CGTGCAAGAG	GCTTTCCTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC
J04E-0044	TACCTAGGAT	CGTGCAAGAG	GCTTTCCTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC
J04E-0122	TACCTAGGAT	CGTTC AAGAA	GCTTTCCTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC
J04E-0130	TACCTAGGAT	CGTGCAAGAG	GCTTTCCTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC
J04E-0139	TACCTAGGAT	CGTTC AAGAA	GCTTTCCTTC	TAGCTACTTC	CGGTAGACCC

	801		850
AtAHASL	GGACCTGTTT	TGGTTGATGT	TCCTAAGGAT
Bn_PM2	GGACCGGTTT	TGGTTGATGT	TCCTAAGGAT
BnAHASL1A	GGACCGGTTT	TGGTTGATGT	TCCTAAGGAT
BnAHASL1C	GGACCGGTTT	TGGTTGATGT	TCCTAAGGAT
BjAHASL1A	GGACCGGTTT	TGGTTGACGT	TCCTAAGGAT
BjAHASL1B	GGACCGGTTT	TAGTTGATGT	TCCTAAGGAT
J04E-0044	GGACCGGTTT	TAGTTGATGT	TCCTAAGGAT
J04E-0122	GGACCGGTTT	TGGTTGACGT	TCCTAAGGAT
J04E-0130	GGACCGGTTT	TAGTTGATGT	TCCTAAGGAT
J04E-0139	GGACCGGTTT	TGGTTGACGT	TCCTAAGGAT
	851		900
AtAHASL	TCCTAACTGG	GAACAGGCTA	TGAGATTACC
Bn_PM2	TCCTAACTGG	GATCAACCTA	TGCGCTTGCC
BnAHASL1A	TCCTAACTGG	GATCAACCTA	TGCGCTTGCC
BnAHASL1C	TCCTAACTGG	GATCAACCTA	TGCGCTTGCC
BjAHASL1A	TCCTAACTGG	GATCAACCTA	TGCGCTTGCC
BjAHASL1B	TCCTAACTGG	GATCAGCCTA	TGCGCTTGCC
J04E-0044	TCCTAACTGG	GATCAGCCTA	TGCGCTTGCC
J04E-0122	TCCTAACTGG	GATCAACCTA	TGCGCTTGCC
J04E-0130	TCCTAACTGG	GATCAGCCTA	TGCGCTTGCC
J04E-0139	TCCTAACTGG	GATCAACCTA	TGCGCTTGCC
	901		950
AtAHASL	CTAACCTCC	GGAAGTTTCT	CAITTTGGAGC
Bn_PM2	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
BnAHASL1A	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
BnAHASL1C	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
BjAHASL1A	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
BjAHASL1B	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
J04E-0044	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
J04E-0122	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
J04E-0130	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
J04E-0139	CTCAGCCACC	GGAAGTTTCT	CAGTTAGGCC
	951		1000
AtAHASL	GAGTCTAAGA	AGCCTGTTTT	GTATGTTGGT
Bn_PM2	GAGTCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTACGTTGGT
BnAHASL1A	GAGTCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTACGTTGGT
BnAHASL1C	GAGTCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTACGTTGGT
BjAHASL1A	GAGTCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTACGTTGGT
BjAHASL1B	GAATCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTATGTTGGT
J04E-0044	GAATCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTATGTTGGT
J04E-0122	GAGTCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTACGTTGGT
J04E-0130	GAATCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTATGTTGGT
J04E-0139	GAGTCTAAGA	GGCCTGTTTT	GTACGTTGGT

	1001				1050
AtAHASL	CGATGAATTG	GGTAGGTTTG	TTGAGCTTAC	GGGGATCCCT	GTTGCGAGTA
Bn_PM2	TGAAGAACTG	GGGAGATTTG	TCGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTTGCGAGTA
BnAHASL1A	TGAAGAACTG	GGGAGATTTG	TCGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTTGCGAGTA
BnAHASL1C	TGAAGAACTG	GGGAGATTTG	TCGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTTGCGAGTA
BjAHASL1A	TGAAGAACTG	GGGAGATTTG	TCGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTTGCGAGTA
BjAHASL1B	TGATGAACTG	GGGAGGTTTG	TGGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTCGCGAGTA
J04E-0044	TGATGAACTG	GGGAGGTTTG	TGGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTCGCGAGTA
J04E-0122	TGAAGAACTG	GGGAGATTTG	TCGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTTGCGAGTA
J04E-0130	TGATGAACTG	GGGAGGTTTG	TGGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTCGCGAGTA
J04E-0139	TGAAGAACTG	GGGAGATTTG	TCGAGCTTAC	TGGGATCCCT	GTTGCGAGTA
	1051				1100
AtAHASL	CGTTGATGGG	GCTGGGATCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
Bn_PM2	CGTTGATGGG	GCTGGGATCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
BnAHASL1A	CGTTGATGGG	GCTGGGATCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
BnAHASL1C	CTTTGATGGG	GCTTGGCTCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
BjAHASL1A	CGTTGATGGG	GCTTGGCTCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
BjAHASL1B	CTTTGATGGG	GCTTGGCTCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
J04E-0044	CTTTGATGGG	GCTTGGCTCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
J04E-0122	CGTTGATGGG	GCTTGGCTCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
J04E-0130	CTTTGATGGG	GCTTGGCTCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
J04E-0139	CGTTGATGGG	GCTTGGCTCT	TATCCTTGTA	ACGATGAGTT	GTCCTGTCAG
	1101				1150
AtAHASL	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
Bn_PM2	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
BnAHASL1A	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
BnAHASL1C	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
BjAHASL1A	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
BjAHASL1B	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
J04E-0044	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
J04E-0122	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
J04E-0130	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
J04E-0139	ATGCTTGGA	TGCACGGGAC	TGTGTATGCT	AACTACGCTG	TGGAGCATAG
	1151				1200
AtAHASL	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
Bn_PM2	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
BnAHASL1A	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
BnAHASL1C	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
BjAHASL1A	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
BjAHASL1B	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
J04E-0044	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
J04E-0122	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
J04E-0130	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA
J04E-0139	TGATTTGTTG	TTGGCGTTTG	GGGTAAGGTT	TGATGACCGT	GTCACGGGAA

	1201		1250
AtAHASL	AGCTTGAGGC	TTTTCCTAGT	AGGGCTAAGA
Bn_PM2	AGCTCGAGGC	GTTTTCGAGC	AGGGCTAAGA
BnAHASL1A	AGCTCGAGGC	GTTTTCGAGC	AGGGCTAAGA
BnAHASL1C	AGCTCGAGGC	TTTTCCTAGC	AGGGCTAAAA
BjAHASL1A	AGCTCGAGGC	GTTTTCGAGC	AGGGCTAAGA
BjAHASL1B	AGCTCGAGGC	TTTTCCTAGC	AGGGCTAAGA
J04E-0044	AGCTCGAGGC	TTTTCCTAGC	AGGGCTAAGA
J04E-0122	AGCTCGAGGC	GTTTTCGAGC	AGGGCTAAGA
J04E-0130	AGCTCGAGGC	TTTTCCTAGC	AGGGCTAAGA
J04E-0139	AGCTCGAGGC	GTTTTCGAGC	AGGGCTAAGA
	1251		1300
AtAHASL	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	TAAGACTCCT
Bn_PM2	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	TAAGACACCT
BnAHASL1A	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	TAAGACACCT
BnAHASL1C	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	TAAGACACCT
BjAHASL1A	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	TAAGACACCT
BjAHASL1B	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	CAAGACGCCT
J04E-0044	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	CAAGACGCCT
J04E-0122	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	TAAGACACCT
J04E-0130	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	CAAGACGCCT
J04E-0139	TCTGCTGAGA	TTGGGAAGAA	TAAGACACCT
	1301		1350
AtAHASL	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAATAA
Bn_PM2	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
BnAHASL1A	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
BnAHASL1C	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
BjAHASL1A	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
BjAHASL1B	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
J04E-0044	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
J04E-0122	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
J04E-0130	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
J04E-0139	TGTTAAAGCTG	GCTTTGCAAG	GGATGAACAA
	1351		1400
AtAHASL	AGGAGCTTAA	GCTTGATTTT	GGAGTTTGGG
Bn_PM2	AGGAGCTCAA	GCTTGATTTT	GGAGTTTGGG
BnAHASL1A	AGGAGCTCAA	GCTTGATTTT	GGAGTTTGGG
BnAHASL1C	AGGAGCTCAA	GCTTGATTTT	GGAGTTTGGG
BjAHASL1A	AGGAGCTCAA	GCTTGATTTT	GGAGTTTGGG
BjAHASL1B	AGGAGCTCAA	GCTTGACTTC	GGAGTTTGGG
J04E-0044	AGGAGCTCAA	GCTTGACTTC	GGAGTTTGGG
J04E-0122	AGGAGCTCAA	GCTTGATTTT	GGAGTTTGGG
J04E-0130	AGGAGCTCAA	GCTTGACTTC	GGAGTTTGGG
J04E-0139	AGGAGCTCAA	GCTTGATTTT	GGAGTTTGGG

	1401				1450
AtAHASL	AAACAGAAGT	TCCCGTTGAG	CTTAAAGACG	TTTGGGGAAG	CTATTCTCTCC
Bn_PM2	AAACAGAAGT	TCCCGTTGAG	CTTCAAAACG	TTTGGAGAAG	CCATTCTCTCC
BnAHASL1A	AAACAGAAGT	TCCCGTTGAG	CTTCAAAACG	TTTGGAGAAG	CCATTCTCTCC
BnAHASL1C	AAACAGAAGT	TCCCTTTGAG	CTTCAAAACG	TTTGGAGAAG	CCATTCTCTCC
BjAHASL1A	AAACAGAAGT	TCCCGTTGAG	CTTCAAAACG	TTTGGAGAAG	CCATTCTCTCC
BjAHASL1B	AAACAAAAGT	TCCCGTTGAG	TTTAAAACG	TTTGGAGAAG	CTATTCTCTCC
J04E-0044	AAACAAAAGT	TCCCGTTGAG	TTTAAAACG	TTTGGAGAAG	CTATTCTCTCC
J04E-0122	AAACAGAAGT	TCCCGTTGAG	CTTCAAAACG	TTTGGAGAAG	CCATTCTCTCC
J04E-0130	AAACAAAAGT	TCCCGTTGAG	TTTAAAACG	TTTGGAGAAG	CTATTCTCTCC
J04E-0139	AAACAGAAGT	TCCCGTTGAG	CTTCAAAACG	TTTGGAGAAG	CCATTCTCTCC
	1451				1500
AtAHASL	ACAGTATGCG	ATTCAGGTCC	TTGATGAGTT	GACTGATGGA	AAAGCCATAA
Bn_PM2	GCAGTACGCG	ATTCAGGTCC	TAGACGAGCT	AACCCAAGGG	AAGGCAATTA
BnAHASL1A	GCAGTACGCG	ATTCAGGTCC	TAGACGAGCT	AACCCAAGGG	AAGGCAATTA
BnAHASL1C	GCAGTACGCG	ATTCAGATCC	TCGACGAGCT	AACCCAAGGG	AAGGCAATTA
BjAHASL1A	GCAGTACGCG	ATTCAGGTCC	TAGACGAGCT	AACCCAAGGG	AAGGCAATTA
BjAHASL1B	ACAGTACGCG	ATTCAGGTCC	TCGACGAGCT	AACCGATGGG	AAGGCAATCA
J04E-0044	ACAGTACGCG	ATTCAGGTCC	TCGACGAGCT	AACCGATGGG	AAGGCAATCA
J04E-0122	GCAGTACGCG	ATTCAGGTCC	TAGACGAGCT	AACCCAAGGG	AAGGCAATTA
J04E-0130	ACAGTACGCG	ATTCAGGTCC	TCGACGAGCT	AACCGATGGG	AAGGCAATCA
J04E-0139	GCAGTACGCG	ATTCAGGTCC	TAGACGAGCT	AACCCAAGGG	AAGGCAATTA
	1501				1550
AtAHASL	TAAGTACTGG	TGTCGGGCAA	CATCAATGT	GGGCGGCGCA	GTTTCTACAAT
Bn_PM2	TCAGTACTGG	TGTTGGACAG	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
BnAHASL1A	TCAGTACTGG	TGTTGGACAG	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
BnAHASL1C	TCAGTACTGG	TGTTGGACAG	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
BjAHASL1A	TCAGTACTGG	TGTTGGACAG	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
BjAHASL1B	TCAGTACTGG	TGTTGGGCAA	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
J04E-0044	TCAGTACTGG	TGTTGGGCAA	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
J04E-0122	TCAGTACTGG	TGTTGGACAG	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
J04E-0130	TCAGTACTGG	TGTTGGGCAA	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
J04E-0139	TCAGTACTGG	TGTTGGACAG	CATCAGATGT	GGGCGGCGCA	GTTTTACAAG
	1551				1600
AtAHASL	TACAAGAAAC	CAAGGCAGTG	GCTATCATCA	GGAGGCCTTG	GAGCTATGGG
Bn_PM2	TACAGGAAGC	CGAGGCAGTG	GCTGTCTGTC	TCAGGACTCG	GAGCTATGGG
BnAHASL1A	TACAGGAAGC	CGAGGCAGTG	GCTGTCTGTC	TCAGGACTCG	GAGCTATGGG
BnAHASL1C	TACAGGAAGC	CGAGACAGTG	GCTGTCTGTC	TCAGGACTCG	GAGCTATGGG
BjAHASL1A	TACAGGAAGC	CGAGGCAGTG	GCTGTCTGTC	TCAGGACTCG	GAGCTATGGG
BjAHASL1B	TACAGGAAGC	CGAGGCAGTG	GTTGTTCATCA	TCAGGCCTTG	GAGCTATGGG
J04E-0044	TACAGGAAGC	CGAGGCAGTG	GTTGTTCATCA	TCAGGCCTTG	GAGCTATGGG
J04E-0122	TACAGGAAGC	CGAGGCAGTG	GCTGTCTGTC	TCAGGACTCG	GAGCTATGGG
J04E-0130	TACAGGAAGC	CGAGGCAGTG	GTTGTTCATCA	TCAGGCCTTG	GAGCTATGGG
J04E-0139	TACAGGAAGC	CGAGGCAGTG	GCTGTCTGTC	TCAGGACTCG	GAGCTATGGG

	1601		1650
AtAHASL	ATTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
Bn_PM2	TTTTCGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
BnAHASL1A	TTTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
BnAHASL1C	TTTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
BjAHASL1A	TTTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
BjAHASL1B	TTTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
J04E-0044	TTTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
J04E-0122	TTTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
J04E-0130	TTTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
J04E-0139	TTTTGGACTT	CCTGCTGCGA	TTGGAGCGTC
	1651		1700
AtAHASL	TAGTTGTGGA	TATTGACGGA	GATGGAAGCT
Bn_PM2	TTGTTGTGGA	CATTGACGGT	GATGGAAGCT
BnAHASL1A	TTGTTGTGGA	CATTGACGGT	GATGGAAGCT
BnAHASL1C	TTGTTGTGGA	TATTGACGGA	GATGGAAGCT
BjAHASL1A	TTGTTGTGGA	CATTGACGGT	GATGGAAGCT
BjAHASL1B	TTGTTGTGGA	CATTGACGGT	GATGGAAGCT
J04E-0044	TTGTTGTGGA	CATTGACGGT	GATGGAAGCT
J04E-0122	TTGTTGTGGA	CATTGACGGT	GATGGAAGCT
J04E-0130	TTGTTGTGGA	CATTGACGGT	GATGGAAGCT
J04E-0139	TTGTTGTGGA	CATTGACGGT	GATGGAAGCT
	1701		1750
AtAHASL	CTAGCCACTA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCA
Bn_PM2	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
BnAHASL1A	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
BnAHASL1C	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
BjAHASL1A	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
BjAHASL1B	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
J04E-0044	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
J04E-0122	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
J04E-0130	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
J04E-0139	CTGGCCACAA	TCCGTGTAGA	GAATCTTCCCT
	1751		1800
AtAHASL	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
Bn_PM2	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
BnAHASL1A	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
BnAHASL1C	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
BjAHASL1A	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
BjAHASL1B	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
J04E-0044	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
J04E-0122	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
J04E-0130	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG
J04E-0139	CAACCAGCAT	CTTGGCATGG	TTATGCAATG

	1801				1850
AtAHASL	CTAACGAGC	TCACACTTT	CTCGGGGATC	CGGCTCAGGA	GGACGAGATA
Bn_PM2	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGACC	CGGCAAGGGA	GAACGAGATC
BnAHASL1A	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGACC	CGGCAAGGGA	GAACGAGATC
BnAHASL1C	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGACC	CGGCAAGGGA	GAACGAGATC
BjAHASL1A	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGACC	CGGCAAGGGA	GAACGAGATC
BjAHASL1B	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGATC	CGGCAAAGGA	GAACGAGATC
J04E-0044	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGATC	CGGCAAAGGA	GAACGAGATC
J04E-0122	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGACC	CGGCAAGGGA	GAACGAGATC
J04E-0130	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGATC	CGGCAAAGGA	GAACGAGATC
J04E-0139	CTAACAGAGC	TCACACTTAT	CTCGGGGACC	CGGCAAGGGA	GAACGAGATC
	1851				1900
AtAHASL	TTCCCGAACA	TGTTGCTGTT	TGCAGCAGCT	TGCGGGATTC	CAGCGGCGAG
Bn_PM2	TTCCCTAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCT	TGCGGGATTC	CAGCTGCCGAG
BnAHASL1A	TTCCCTAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCT	TGCGGGATTC	CAGCTGCCGAG
BnAHASL1C	TTCCCTAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCT	TGCGGGATTC	CAGCTGCCGAG
BjAHASL1A	TTCCCTAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCT	TGCGGGATTC	CAGCTGCCGAG
BjAHASL1B	TTCCCAAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCC	TGTGGGATTC	CAGCTGCCGAG
J04E-0044	TTCCCAAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCC	TGTGGGATTC	CAGCTGCCGAG
J04E-0122	TTCCCTAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCT	TGCGGGATTC	CAGCTGCCGAG
J04E-0130	TTCCCAAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCC	TGTGGGATTC	CAGCTGCCGAG
J04E-0139	TTCCCTAACA	TGCTGCAGTT	TGCAGGAGCT	TGCGGGATTC	CAGCTGCCGAG
	1901				1950
AtAHASL	GGTGACAAAG	AAAGCAGATC	TCCGAGAAGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
Bn_PM2	AGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGAAGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
BnAHASL1A	AGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGAAGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
BnAHASL1C	AGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGAAGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
BjAHASL1A	AGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGAAGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
BjAHASL1B	GGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGATGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
J04E-0044	GGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGATGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
J04E-0122	AGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGAAGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
J04E-0130	GGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGATGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
J04E-0139	AGTGACGAAG	AAAGAAGAAC	TCCGAGAAGC	TATTCAGACA	ATGCTGGATA
	1951				2000
AtAHASL	CACCAGGACC	TTACCTGTTG	GATGTGATTT	GTCCGCACCA	AGAACATGTG
Bn_PM2	CACCTGGACC	GTACCTGTTG	GATGTCATCT	GTCCGCACCA	AGAACATGTG
BnAHASL1A	CACCTGGACC	GTACCTGTTG	GATGTCATCT	GTCCGCACCA	AGAACATGTG
BnAHASL1C	CACCAGGACC	ATACCTGTTG	GATGTGATAT	GTCCGCACCA	AGAACATGTG
BjAHASL1A	CACCTGGACC	GTACCTGTTG	GATGTCATCT	GTCCGCACCA	AGAACATGTG
BjAHASL1B	CACCAGGACC	ATACCTGTTG	GATGTGATCT	GTCCGCACCA	AGAGCATGTG
J04E-0044	CACCAGGACC	ATACCTGTTG	GATGTGATCT	GTCCGCACCA	AGAGCATGTG
J04E-0122	CACCTGGACC	GTACCTGTTG	GATGTCATCT	GTCCGCACCA	AGAACATGTG
J04E-0130	CACCAGGACC	ATACCTGTTG	GATGTGATCT	GTCCGCACCA	AGAGCATGTG
J04E-0139	CACCTGGACC	GTACCTGTTG	GATGTCATCT	GTCCGCACCA	AGAACATGTG
	2001				2050
AtAHASL	TTGCCGATGA	TCCCGAGTGG	TGGCACTTTC	AACGATGTCA	TAACCGAAGG
Bn_PM2	TTACCGATGA	TCCCAAGTGG	TGGCACTTTC	AAAGATGTAA	TAACCGAAGG
BnAHASL1A	TTACCGATGA	TCCCAAGTGG	TGGCACTTTC	AAAGATGTAA	TAACCGAAGG
BnAHASL1C	TTACCGATGA	TCCCAAGTGG	TGGCACTTTC	AAAGATGTAA	TAACAGAAGG
BjAHASL1A	TTACCGATGA	TCCCAAGTGG	TGGCACTTTC	AAAGATGTAA	TAACCGAAGG
BjAHASL1B	TTACCGATGA	TCCCAAGTGG	TGGTACTTTC	AAAGATGTCA	TAACAGAAGG
J04E-0044	TTACCGATGA	TCCCAATATG	TGGTACTTTC	AAAGATGTCA	TAACAGAAGG
J04E-0122	TTACCGATGA	TCCCAAGTGG	TGGCACTTTC	AAAGATGTAA	TAACCGAAGG
J04E-0130	TTACCGATGA	TCCCAAGTGG	TGGTACTTTC	AAAGATGTCA	TAACAGAAGG
J04E-0139	TTACCGATGA	TCCCAATATG	TGGCACTTTC	AAAGATGTAA	TAACCGAAGG
	2051				
AtAHASL	AGATGGCCCG	ATTAAATACT	GA		
Bn_PM2	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		
BnAHASL1A	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		
BnAHASL1C	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		
BjAHASL1A	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		
BjAHASL1B	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		
J04E-0044	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		
J04E-0122	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		
J04E-0130	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		
J04E-0139	GGATGGTCGC	ACTAAGTACT	GA		

Фиг. 1

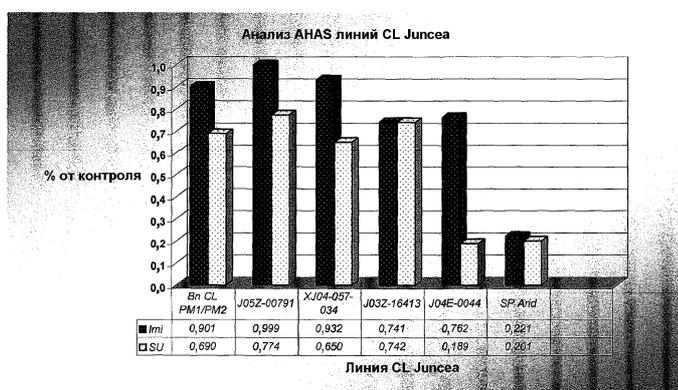
	1		50
AtAHASL	MAAATTTTT	SSSISFSTKP	SPSSSKSPLP
Bn_PM2	MAAATS...	SSPISLTAKP	S...SKSPLP
BnAHASL1A	MAAATS...	SSPISLTAKP	S...SKSPLP
BnAHASL1C	MAAATS...	SSPISLTAKP	S...SKSPLP
BjAHASL1A	MAAATS...	SSPISLTAKP	S...SKSPLP
BjAHASL1B	MAAATS...	SSPISFTAKP	S...SKSLLP
J04E-0044	MAAATS...	SSPISFTAKP	S...SKSLLP
J04E-0122	MAAATS...	SSPISLTAKP	S...SKSPLP
J04E-0130	MAAATS...	SSPISFTAKP	S...SKSLLP
J04E-0139	MAAATS...	SSPISLTAKP	S...SKSPLP
	51		100
AtAHASL	RRGIKSSSPS	SISAVLNTTT	NVTTTTPSPTK
Bn_PM2	...RLHRPL	AISAVLNSPV	NVA...PEK
BnAHASL1A	...RLHRPL	AISAVLNSPV	NVA...PEK
BnAHASL1C	...RLHRPL	AISAVLNSPV	NVAP.PSPEK
BjAHASL1A	...RLHRPL	AISAVLNSPV	NVA...PEK
BjAHASL1B	...LRHSPL	SISAVLNTPV	NVAP.PSPEK
J04E-0044	...LRHSPL	SISAVLNTPV	NVAP.PSPEK
J04E-0122	...RLHRPL	AISAVLNSPV	NVA...PEK
J04E-0130	...LRHSPL	SISAVLNTPV	NVAP.PSPEK
J04E-0139	...RLHRPL	AISAVLNSPV	NVA...PEK
	101		150
AtAHASL	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL
Bn_PM2	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL
BnAHASL1A	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL
BnAHASL1C	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL
BjAHASL1A	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL
BjAHASL1B	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL
J04E-0044	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL
J04E-0122	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GTSMEIHQAL
J04E-0130	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GTSMEIHQAL
J04E-0139	DILVEALERQ	GVETVFAYPG	GASMEIHQAL
	151		200
AtAHASL	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
Bn_PM2	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
BnAHASL1A	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
BnAHASL1C	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
BjAHASL1A	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
BjAHASL1B	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
J04E-0044	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
J04E-0122	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
J04E-0130	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA
J04E-0139	AEGYARSSGK	PGICIATSGP	GATNLVSGLA

	201				250
AtAHASL	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVED	IPRIIEEAF	LATSGRPGPV
Bn_PM2	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
BnAHASL1A	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
BnAHASL1C	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
BjAHASL1A	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
BjAHASL1B	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
J04E-0044	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
J04E-0122	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
J04E-0130	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
J04E-0139	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQEAF	LATSGRPGPV
	251				300
AtAHASL	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWEQA	MRLPGYMSRM	PKPPEDSHLE	QIVRLISESK
Bn_PM2	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
BnAHASL1A	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
BnAHASL1C	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
BjAHASL1A	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
BjAHASL1B	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
J04E-0044	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
J04E-0122	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
J04E-0130	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
J04E-0139	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEVSQLG	QIVRLISESK
	301				350
AtAHASL	KPVLYVGGGC	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	DDELSLHMLG
Bn_PM2	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
BnAHASL1A	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
BnAHASL1C	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
BjAHASL1A	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
BjAHASL1B	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
J04E-0044	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
J04E-0122	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
J04E-0130	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
J04E-0139	KPVLYVGGGS	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS	TLMGLGSYPC	NDELSLQMLG
	351				400
AtAHASL	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
Bn_PM2	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
BnAHASL1A	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
BnAHASL1C	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
BjAHASL1A	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
BjAHASL1B	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
J04E-0044	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
J04E-0122	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
J04E-0130	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
J04E-0139	MHGTVYANYA	VEHSDLLLAF	GVRFDDRVTG	KLEAFASRAK	IVHIDIDSAB
	401				450
AtAHASL	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RNELNVQKQK
Bn_PM2	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
BnAHASL1A	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
BnAHASL1C	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
BjAHASL1A	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
BjAHASL1B	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
J04E-0044	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
J04E-0122	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
J04E-0130	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
J04E-0139	IGKNKTPHVS	VCGDVKLALQ	GMNKVLENRA	EELKLDGFWV	RSELSEQKQK
	451				500
AtAHASL	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIKV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
Bn_PM2	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
BnAHASL1A	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
BnAHASL1C	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
BjAHASL1A	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
BjAHASL1B	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
J04E-0044	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
J04E-0122	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
J04E-0130	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
J04E-0139	FPLSFKTFGE	AIPPPQYAIQV	LDELTQKAI	ISTGVGQHQM	WAAQFYKYRK
	501				550
AtAHASL	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
Bn_PM2	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
BnAHASL1A	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
BnAHASL1C	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
BjAHASL1A	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
BjAHASL1B	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
J04E-0044	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
J04E-0122	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
J04E-0130	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
J04E-0139	PRQWLSSSGL	GAMGFGLPAA	IGASVANPDA	IVVDIDGDS	FIMNVQELAT
	551				600
AtAHASL	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PAQEDEIFPN
Bn_PM2	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN
BnAHASL1A	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN
BnAHASL1C	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN
BjAHASL1A	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN
BjAHASL1B	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN
J04E-0044	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN
J04E-0122	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN
J04E-0130	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN
J04E-0139	IRVENLPVKI	LLLNNQHLGM	VMQWEDRFYK	ANRAHTYFLGD	PARENEIFPN

601  
 AtAHASL MLLFAAACGI PAARVTKKAD LREAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 Bn\_PM2 MLQFAGACGI PAARVTKKEE LREAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 BnAHASL1A MLQFAGACGI PAARVTKKEE LREAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 BnAHASL1C MLQFAGACGI PAARVTKKEE LREAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 BJAHASL1A MLQFAGACGI PAARVTKKEE LREAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 BJAHASL1B MLQFAGACGI PAARVTKKEE LRDAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 J04E-0044 MLQFAGACGI PAARVTKKEE LRDAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 J04E-0122 MLQFAGACGI PAARVTKKEE LREAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 J04E-0130 MLQFAGACGI PAARVTKKEE LRDAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP  
 J04E-0139 MLQFAGACGI PAARVTKKEE LREAIQTMLD TPGPYLLDVI CPHQEHVLP

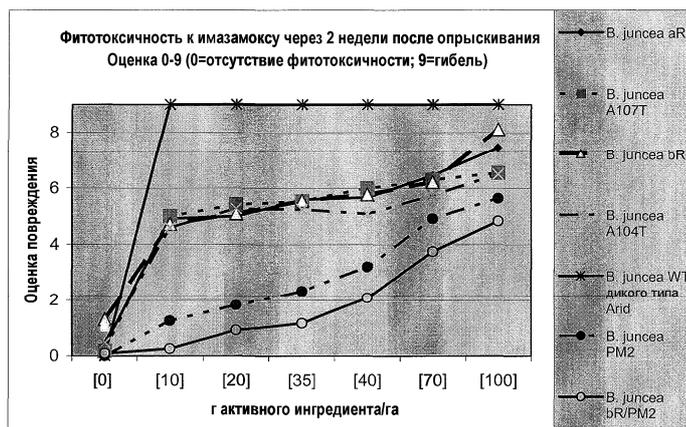
651  
 AtAHASL IPSGGTFNDV ITEGDGRITKY  
 Bn\_PM2 IPSGGTFKDV ITEGDGRITKY  
 BnAHASL1A IPSGGTFKDV ITEGDGRITKY  
 BnAHASL1C IPSGGTFKDV ITEGDGRITKY  
 BJAHASL1A IPSGGTFKDV ITEGDGRITKY  
 BJAHASL1B IPSGGTFKDV ITEGDGRITKY  
 J04E-0044 IPNGGTFKDV ITEGDGRITKY  
 J04E-0122 IPSGGTFKDV ITEGDGRITKY  
 J04E-0130 IPSGGTFKDV ITEGDGRITKY  
 J04E-0139 IPNGGTFKDV ITEGDGRITKY

Фиг. 2



1. *B. juncea* Arid (контроль - отсутствие устойчивости к гербицидам)
2. *B. napus* Коммерческий CLEARFIELD Контроль (PM1/PM2)
3. *B. juncea* J04E-0044 (bR)
4. *B. juncea* J03Z-16413 (PM2)
5. *B. juncea* XJ04-057-034 F5 (bR/PM2)
6. *B. juncea* J05Z-00791 (bR/PM2)

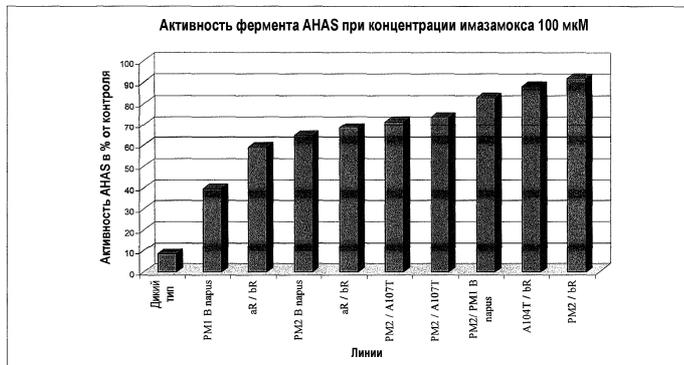
Фиг. 3



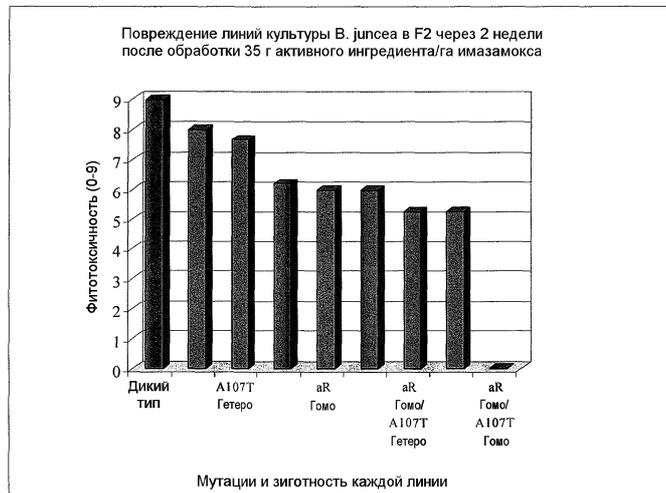
Фиг. 4

SEQ ID NO:	Тип последовательности	Номенклатура гена AHAS (номенклатура аминокислотных положений <i>A. thaliana</i> )	Сокращенное название мутации/код линии или дикий тип
1	белок	AtAHASL	<i>A. thaliana</i> дикого типа
2	белок	BjAHASL1B-S653(At)N	BR(638)/J04E-0044
3	белок	BjAHASL1A-S653(At)N	AR(638)/J04E-0139
4	белок	BjAHASL1B-A122(At)T	A107T/J04E-0130
5	белок	BjAHASL1A-A122(At)T	A104T/J04E-0122
6	белок	BnAHASL1A-W574(At)L	PM2 (557)
7	белок	BjAHASL1A	<i>B. juncea</i> дикого типа
8	белок	BjAHASL1B	<i>B. juncea</i> дикого типа
9	белок	BnAHASL1A	<i>B. napus</i> дикого типа
10	белок	BnAHASL1C	<i>B. napus</i> дикого типа
11	ДНК	AtAHASL	<i>A. thaliana</i> дикого типа
12	ДНК	BjAHASL1B-S653(At)N	BR(638)/J04E-0044
13	ДНК	BjAHASL1A-S653(At)N	AR(638)/J04E-0139
14	ДНК	BjAHASL1B-A122(At)T	A107T/J04E-0130
15	ДНК	BjAHASL1A-A122(At)T	A104T/J04E-0122
16	ДНК	BnAHASL1A-W574(At)L	PM2 (557)
17	ДНК	BjAHASL1A	<i>B. juncea</i> дикого типа
18	ДНК	BjAHASL1B	<i>B. juncea</i> дикого типа
19	ДНК	BnAHASL1A	<i>B. napus</i> дикого типа
20	ДНК	BnAHASL1C	<i>B. napus</i> дикого типа

Фиг. 5



Фиг. 6



Шкала фитотоксичности (от 0 до 9): где 0 означает отсутствие повреждения растений, и 9 означает тяжелый некроз растения, приводящий к гибели растения; n означает количество отдельных растений, оцениваемых в случае каждого мутантного/зиготного генотипа

Фиг. 7



Шкала фитотоксичности (от 0 до 9): где 0 означает отсутствие повреждения растений, и 9 означает тяжелый некроз растения, приводящий к гибели растения

Фиг. 8

