

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036298**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.23

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

(21) Номер заявки
201592011

(22) Дата подачи заявки
2014.04.16

(54) **ГИБРИДНЫЕ РАСТЕНИЯ BRASSICA И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **13164421.3**

(56) WO-A1-0141558
WO-A2-0131042

(32) **2013.04.19**

(33) **EP**

(43) **2016.02.29**

(86) **PCT/EP2014/057770**

(87) **WO 2014/170387 2014.10.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БАСФ АГРИКАЛЧЕРАЛ
СОЛЮШНС СИД ЮС ЛЛК (US)**

(72) Изобретатель:
Руан Доминик, Де Бот Грета (BE)

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.
(RU)**

(57) Предусмотрены трансгенные растения Brassica, растительный материал и семена, в частности растения масличного рапса, характеризующиеся тем, что эти растения содержат новое сочетание двух специфических событий трансформации, а именно MS-B2, включающего трансген мужской стерильности, с RF-BN1, включающим трансген восстановления фертильности. Также предусмотрены пары растений Brassica, каждое из которых содержит одно из событий, и их применение в получении гибридного семени.

B1

036298

036298

B1

Область техники

Изобретение относится к трансгенным растениям Brassica, растительному материалу и семенам, в частности растениям масличного рапса, характеризующимся тем, что эти растения имеют сочетание двух специфических событий трансформации, в частности, присутствием гена мужской стерильности в определенном месте в геноме Brassica и гена восстановления фертильности в другом определенном месте в геноме Brassica. Настоящее изобретение также относится к паре трансгенных растений Brassica, в частности растений масличного рапса, которые особенно хорошо подходят для получения гибридных семян. Конкретнее, одно из растений характеризуется тем, что оно обладает мужской стерильностью из-за присутствия в его геноме гена мужской стерильности, в то время как другое характеризуется тем, что оно содержит ген-восстановитель фертильности, который может препятствовать активности гена мужской стерильности. Пара растений Brassica настоящего изобретения сочетает в себе способность к образованию гибридных семян с оптимальными общими агрономическими характеристиками, генетической стабильностью и адаптацией к различным генетическим фонам.

Предпосылки создания изобретения

Фенотипическое проявление трансгена в растении определяется как структурой самого гена, так и его расположением в геноме растения. Вместе с этим наличие трансгена (в чужеродной ДНК) в разных местах в геноме будет по-разному влиять на фенотип растения в целом. Агрономически или промышленно успешное внедрение представляющего коммерческий интерес признака в растение с помощью генетической манипуляции может быть очень длинной процедурой, зависящей от различных факторов. Фактическая трансформация и регенерация генетически трансформированных растений являются лишь первыми в ряде стадий отбора, которые включают подробную генетическую характеристику, селекцию и оценку в полевых испытаниях.

Термин "рапсовое семя" охватывает все семена видов Brassica. Brassica выращивают от Китая и Индии до Финляндии и Канады в качестве одной из наиболее ценных масличных культур. Большинство видов Brassica относится к семейству Cruciferae. Они возникли как диплоидные виды, имеющие анеуплоидное число хромосом от 7 (*Brassica fruticulosa*) до 12 (*Sinapsis alba*). Выращиваемый в самых широких масштабах в Канаде вид Brassica известен как репа масличная или *Brassica campestris* (aa, n=10). *Brassica oleracea* (aa, n=9) породил многообразие в недавней эволюционной истории в виде по крайней мере шести основных плодовоовощных видов, включая брокколи, цветную капусту и капусту. *Brassica nigra* (bb, n=8) или черная горчица является менее важной коммерчески культурой, в основном снискавшей известность своими семенами, из которых была сначала изготовлена горчица. Из этих основных видов произошли амфилоидные гибриды на более поздних стадиях эволюции в результате интеркросса. Самыми важными из них являются *Brassica napus* (aacc), озимые виды которого дают самые высокие урожаи рапсовых семян в Северной Европе, и *Brassica juncea* (aabb) или горчица китайская, которая является одной из основных масличных культур Индийского субконтинента. Хотя интеркросс между разными видами Brassica (особенно видами с совместимыми геномами) возможен и часто осуществляется с целью селекции, не все признаки (или гены) смогут передаваться от одного вида к другому, или, в случае передачи отличными видам, сохраняют идентичные характеристики (или профили экспрессии). Таким образом, генетический локус, дающий оптимальную экспрессию природного или химерного гена в одном виде Brassica, будет необязательно иметь тот же эффект в другом виде.

Виды Brassica являются двуполоыми и, как правило, самоопыляемыми на 60-70%. Получение гибридов и введение генетической вариации в качестве основы для селекции традиционно зависело от адаптации встречающихся в природе явлений, таких как самонесовместимость и цитоплазматическая мужская стерильность. Методы контроля с помощью искусственного опыления, такие как эмаскуляция вручную или использования гаметоцитов, не применяются широко при селекции Brassica из-за их ограниченной осуществимости и высокой стоимости соответственно.

Были разработаны трансгенные методы для получения растений, обладающих мужской или женской стерильностью, которые обеспечивают интересную альтернативу традиционным методам.

В EP 0344029 описывается система для получения ядерной мужской стерильности, согласно которой растения трансформируют геном мужской стерильности, который включает, например, ДНК, кодирующую молекулу барназы под контролем специфического для тапетума промотора TA29, который при введении в растение обеспечивает селективное разрушение клеток тапетума. Трансформация растений табака и масличного рапса таким геном дала в результате растения, в которых образование пыльцы было полностью предотвращено (Mariani et al. 1990, Nature 347:737-741).

Цитохимический и гистохимический анализ развития пыльников растений *Brassica napus*, содержащих химерный ген РТА29:барназа, описывается De Block и De Brouwer (1993, Planta 189: 218-225).

Для восстановления фертильности в потомстве растений с мужской стерильностью была разработана система, в соответствии с которой растение с мужской стерильностью скрещивают с трансгенным растением, содержащим ген-восстановитель фертильности, который при экспрессии обладает способностью ингибировать или препятствовать активности(и) гена мужской стерильности (патенты США №№ 5689041; 5792929; De Block и De Brouwer, выше). Использование корегулирующихся генов для получения растений с мужской стерильностью с целью увеличения частоты трансформантов, имеющих

хорошие агрономические характеристики, описано в WO 96/26283. Как правило, когда придающая стерильность ДНК кодирует барназу, то корегулирующаяся ДНК будет кодировать барстар.

Элитное событие (трансформации) MS-B2 и обладающие мужской стерильностью растения, включающие это элитное событие, придающее мужскую стерильность, подробно описаны в заявке WO 01/31042 (включенной сюда посредством ссылки), включая характеристику трансгена и ДНК-последовательностей растений, непосредственно фланкирующих вставленный трансген.

Семя ссылочного растения, включающее элитное событие MS-B2, было депонировано в АТСС (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) 14 октября 1999 г. под номером доступа в АТСС - РТА-850. Другой образец этого же семени был депонирован под номером доступа РТА-2485. Альтернативным названием MS-B2 является MS-11.

Элитное событие RF-BN1 и растения, включающие это элитное событие, придающее мужскую стерильность, подробно описаны в заявке WO 01/41558 (включенной сюда посредством ссылки), включая характеристику трансгена и ДНК-последовательностей растений, непосредственно фланкирующих вставленный трансген.

Семя ссылочного растения, включающее элитное событие RF-BN1, было депонировано в АТСС (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) 20 сентября 1999 г. под номером доступа в АТСС - РТА-730. Альтернативным названием RF-BN1 является Rf3.

В WO 01/41558 также описывается элитное событие MS-BN1, обладающие мужской стерильностью растения, включающие это событие, а также способы идентификации таких растений и их потомства. Альтернативным названием MS-BN1 является MS-8.

События MS-BN1 и RF-BN1 содержатся в гибридных растениях *B. napus*, продаваемых под торговой маркой In Vigor® Canola.

В этих документах, упомянутых раньше, не описывается ни конкретное сочетание MS-B2 с RF-BN1 в растениях Brassica, ни его применение в получении гибридных семян. Также до сих пор не описано RF-BN1 в Brassica juncea, а также применение MS-B2 для увеличения урожая масличных растений Brassica.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ получения гибридных семян от растений масличного рапса, таких как Brassica napus или Brassica juncea, включающий стадии обеспечения обладающего мужской стерильностью женского родительского растения масличного рапса, включающего элитное событие MS-B2, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850; обеспечения обладающего мужской фертильностью мужского родительского растения масличного рапса, включающего элитное событие RF-BN1, предпочтительно в гомозиготном состоянии, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730; допуска опыления пыльцой указанного мужского родительского растения масличного рапса указанного женского родительского растения масличного рапса и сбора урожая гибридных семян с указанного женского родительского растения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретением обеспечивается растение масличного рапса, такое как Brassica napus или Brassica juncea, содержащее в своем ядерном геноме по крайней мере одну копию элитного события MS-B2, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850, и по крайней мере одну копию элитного события RF-BN1, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730. Также обеспечиваются клетки, или ткани, или семена таких растений масличного рапса.

Тем не менее, в другом варианте осуществления настоящего изобретения обеспечивается пара растений масличного рапса для применения в получении гибридных семян, причем одно из растений масличного рапса включает элитное событие MS-B2, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850, а другое из указанных растений масличного рапса включает элитное событие RF-BN1, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730.

Также целью настоящего изобретения является обеспечение геномной ДНК растения масличного рапса, такого как Brassica napus или Brassica juncea, содержащего в своем ядерном геноме по крайней мере одну копию элитного события MS-B2, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850, и по крайней мере одну копию элитного события RF-BN1, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730.

Настоящим изобретением также обеспечивается Brassica juncea, а также его клетки и семена, включающие элитное событие RF-BN1, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730. Такие растения могут, кроме того, включать элитное событие MS-B2, при этом семя ссылочного растения, включающее ука-

занное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850.

Кроме того, в настоящем изобретении предусматривается применение элитного события MS-B2, при этом семя ссылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850, для увеличения урожая семян в трансгенном растении масличного рапса, таком как растение *Brassica juncea*.

Тем не менее, в другом варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ увеличения урожая растений масличного рапса, включающий стадию обеспечения растения масличного рапса с элитным событием MS-B2, при этом ссылочное семя, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - сравнение силы после применения гербицидов к MS/RF гибридным линиям *B. napus*. Панель А: отсутствие применения глюфосината аммония. Панель В: одно применение глюфосината аммония. Панель С: два применения глюфосината аммония. Квадраты: растения MS-BN1/RF-BN1; точки: растения MS-B2/RF-BN1.

Фиг. 2 - сравнение урожайности после применения гербицидов к MS/RF гибридным линиям *B. napus*. Панель А: отсутствие применения глюфосината аммония. Панель В: одно применение глюфосината аммония. Панель С: два применения глюфосината аммония. Темно-серые столбики: MS-BN1/RF-BN1 растения; светло-серые столбики: MS-B2/RF-BN1 растения. Loc1 - Loc5: местоположения полевых испытаний; AVG: в среднем по всем местоположениям. Урожайность представлена в виде % по сравнению с таковой MS-BN1/RF-BN1 растений, принятой за 100%.

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение описывает новое сочетание придающего мужскую стерильность события MS-B2 с событием восстановления фертильности RF-B1 в растениях масличного, в частности *Brassica napus* или *Brassica juncea*.

Настоящее изобретение основано, среди прочего, на неожиданном открытии того, что элитное событие RF-BN1, дающее восстановление фертильности, является достаточно эффективным в растениях масличного рапса *Brassica* для восстановления фертильности, когда растение, кроме того, также содержит элитное событие MS-B2, придающее мужскую стерильность. Несмотря на то, RF-BN1 ранее успешно использовалось для восстановления фертильности у растений масличного рапса, включающих элитное событие MS-BN1, нельзя было предсказать, может ли RF-BN1 также использоваться для восстановления фертильности у растений масличного рапса, включающих элитное событие MS-B2. Различные придающие мужскую стерильность элитные события имеют разные уровни экспрессии продукта барназы, экспрессируемого с трансгенного гена мужской стерильности, и невозможно предсказать, будут ли уровни ингибитора барназы, барстара, продуцируемого с трансгенного гена восстановления фертильности в RF-BN1, соответствовать экспрессии барназы в случае других отдельных событий, придающих мужскую стерильность. Как указано в приведенных ниже примерах, сочетание настоящего изобретения привело к более высокому, в действительности, урожаю, чем сочетание этого же придающего мужскую стерильность события MS-B2 с другими событиями восстановления фертильности.

Кроме того, ранее было описано, что RF-BN1 расположено в С-геноме (см. WO 01/31042, см. также, например, www.agbios.com/dbase.php?action=showProd&data=MS8xRF3).

Соответственно, введение RF-BN1 из *B. napus* (aacc) в *B. juncea* (aabb), который не содержит С-геном, не будет считаться простым квалифицированным в данной области специалистом. При текущем уточнении предоставлены данные, что RF-BN1, однако, расположено в А-геноме, что делает возможным введение в *B. juncea* путем скрещивания.

Кроме того, в результате полевых испытаний было обнаружено, что наличие MS-B2 увеличивает среднюю урожайность (урожай зерна) по сравнению с изогенной линией растений, не содержащей MS-B2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, таким образом, обеспечивается способ получения гибридных семян от растений масличного рапса, таких как *Brassica napus* или *Brassica juncea*, включающий стадии

обеспечения обладающего мужской стерильностью женского родительского растения масличного рапса, включающего элитное событие MS-B2, включающее ген мужской стерильности;

обеспечения обладающего мужской фертильностью мужского родительского растения масличного рапса, включающего элитное событие RF-BN1, включающее ген восстановления фертильности, предпочтительно в гомозиготном состоянии;

допуска опыления пыльцой мужского родительского растения масличного рапса женского родительского растения масличного рапса и

сбора урожая гибридных семян с женского родительского растения.

Используемый здесь термин "ген" относится к любой последовательности ДНК, включающей несколько функционально связанных фрагментов ДНК, таких как промотор и 5' нетранслируемая область (5' UTR), которые вместе образуют район промотора, кодирующая область (которая может кодировать

или может не кодировать белок) и 3' нетранслируемая область (3' UTR), включающая сайт полиаденилирования. Как правило, в клетках растений 5' -UTR, кодирующая область и 3'-UTR транскрибируются в РНК, которая в случае кодирующего белок гена транслируется в белок. Ген может включать дополнительные фрагменты ДНК, такие как, например, интроны. Как здесь используется, генетический локус представляет собой положение конкретного гена в геноме растения.

Термин "химерный" в отношении последовательности гена или ДНК используется для указания на то, что последовательность гена или ДНК включает по крайней мере два функционально соответствующих фрагмента ДНК (таких как промотор, 5' UTR, кодирующая область, 3' UTR, интрон), которые не связаны в природе друг с другом и происходят, например, из различных источников. "Чужеродная" в отношении последовательности гена или ДНК по отношению к виду растения используется для указания на то, что последовательность гена или ДНК не встречается в природе в этом виде растения или не встречается в природе в этом генетическом локусе в этом виде растения. Термин "чужеродная ДНК" будет использоваться здесь для обозначения последовательности ДНК, коль скоро она была включена в геном растения в результате трансформации. "Трансформирующая ДНК", как здесь используется, относится к рекомбинантной молекуле ДНК, используемой для трансформации. Трансформирующая ДНК обычно включает по крайней мере один "представляющий интерес ген" (например, химерный ген), который способен придавать одну или более специфических особенностей трансформированному растению. Термин "рекомбинантная молекула ДНК" используется для иллюстрации и, таким образом, может включать выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, которая может быть ДНК и которая может быть получена с помощью рекомбинантных или других процедур.

Используемый здесь термин "трансген" относится к представляющему интерес гену, включенному в геном растения. "Трансгенное растение" относится к растению, содержащему по крайней мере один трансген в геноме всех своих клеток.

Чужеродная ДНК, присутствующая в растениях настоящего изобретения, будет предпочтительно включать два представляющих интерес гена, конкретнее или ген мужской стерильности и ген устойчивости к гербицидам, или ген-восстановитель фертильности и ген устойчивости к гербицидам.

"Ген мужской стерильности", как здесь используется, относится к гену, который при экспрессии в растении делает растение неспособным продуцировать фертильную, жизнеспособную пыльцу. Примером гена мужской стерильности является ген, включающий последовательность ДНК, кодирующую барназу, под контролем промотора, управляющего экспрессией в клетках тапетума. Конкретнее, в соответствии с настоящим изобретением геном мужской стерильности является "ТА29-барназа", описанный здесь.

"Ген-восстановитель фертильности", как здесь используется, относится к гену, который при экспрессии в растении, содержащем ген мужской стерильности, может препятствовать фенотипическому проявлению гена мужской стерильности, восстанавливая фертильность у растения. Конкретнее, ген-восстановитель фертильности будет включать ДНК, кодирующую белок или полипептид, который может препятствовать фенотипическому проявлению гена мужской стерильности, под контролем промотора, управляющего экспрессией, по крайней мере, в клетках, в которых экспрессируется ДНК мужской стерильности. Конкретнее, в соответствии с настоящим изобретением ген-восстановитель фертильности представляет собой "ТА29-барстар", описанный здесь.

Включение рекомбинантной молекулы ДНК в геном растения обычно является результатом трансформации клетки или ткани (или другой генетической манипуляции). Конкретный сайт включения возникает или случайно, или в заданном месте (в случае использования процесса направленной интеграции).

Чужеродная ДНК может быть охарактеризована по расположению и конфигурации в сайте включения рекомбинантной молекулой ДНК в геном растения. Сайт в геноме растения, в который была вставлена рекомбинантная ДНК, также называют "местом вставки" или "сайтом-мишенью". Введение трансгена в геном растения может сопровождаться делецией ДНК растений, называемой "делецией сайта-мишени". "Фланкирующая область" или "фланкирующая последовательность", как здесь используется, относится к последовательности по крайней мере из 20 п.о., предпочтительно по крайней мере 50 п.н. и вплоть до 5000 п.н. генома растений, которая расположена или непосредственно перед (5') чужеродной ДНК и граничит с ней, или непосредственно после (3') чужеродной ДНК и граничит с ней. Процедуры трансформации, ведущие к случайной интеграции чужеродной ДНК, будут приводить к трансформантам с различными фланкирующими областями, которые являются характерными и уникальными для каждого трансформанта. Когда трансген вводят в растение с помощью традиционного скрещивания, сайт его вставки в геном растения, или его фланкирующие области, не будут, как правило, изменены. "Район вставки", как здесь используется, относится к району, соответствующему району по крайней мере из 40 п.о., предпочтительно по крайней мере 100 п.н. и вплоть до 10000 п.о., входящему в состав 5' и 3' фланкирующих областей трансгена в геноме (не трансформированного) растения и включающему сайт вставки (и возможную делецию сайта вставки). Принимая во внимание незначительные различия вследствие мутаций внутри вида, район вставки будет сохраняться по крайней мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно 100% идентичность последовательности с последова-

тельностью, включающей 5' и 3' фланкирующие области чужеродной ДНК в конкретном растении этого вида.

Экспрессия представляющего интерес гена относится к тому факту, что ген придает растению один или более фенотипических признаков (например, устойчивость к гербицидам), которые намеривались придать посредством введения рекомбинантной молекулы ДНК - трансформирующей ДНК - используемой во время трансформации (на основе структуры и функции части или всего представляющего интерес гена(ов)).

"Событие" (трансформации) определяется как (искусственный) генетический локус, который в результате генетической манипуляции содержит чужеродную ДНК, включающую по крайней мере одну копию представляющего интерес гена(ов). Типичными аллельными состояниями события являются наличие или отсутствие чужеродной ДНК. Как здесь используются, событие "MS" и событие "RF" будут относиться к событиям, содержащим трансгены "ТА29-барназа" и "ТА29-барстар" соответственно. Событие характеризуется фенотипически экспрессией одного или нескольких трансгенов. На генетическом уровне событие является частью генетического состава растения. На молекулярном уровне событие характеризуется рестрикционной картой (например, определяемой с помощью блоттинга по Саузерну) и/или 5' и/или 3' фланкирующими последовательностями трансгена и/или молекулярной конфигурацией трансгена. Обычно трансформация растения трансформирующей ДНК, включающей по крайней мере один представляющий интерес ген, приводит к множеству событий, каждое из которых является уникальным.

"Элитное событие", как здесь используется, представляет собой событие, которое выбирают из группы событий, достигаемых путем трансформации той же трансформирующей ДНК или путем обратного скрещивания с растениями, полученными путем такой трансформации, на основе экспрессии и стабильности трансгена и его совместимости с оптимальными агрономическими характеристиками растения, включающего его. Таким образом, критериями отбора элитного события являются один или более, предпочтительно два или более, предпочтительно все из следующих критериев:

а) то, что присутствие трансгена не влияет негативно на другие желаемые характеристики растения, такие как те, которые относятся к агрономическим характеристикам или промышленной ценности;

б) то, что событие характеризуется четко определенной молекулярной конфигурацией, которая стабильно наследуется, и для которой соответствующие диагностические средства контроля идентичности могут быть разработаны;

с) то, что представляющий интерес ген(ы) в трансгене демонстрирует правильное, соответствующее и стабильное пространственное и временное фенотипическое проявление, как в гетерозиготном (или гемизиготном), так и гомозиготном состоянии события, на промышленно приемлемом уровне в диапазоне условий окружающей среды, которому растения, содержащие событие, вероятно, будут подвергаться при нормальном агрономическом использовании.

Предпочтительно, когда чужеродная ДНК связана с положением в геноме растения, которое делает возможной интрогрессию в желаемые коммерческие генетические фоны.

Состояние события в виде элитного события подтверждается интрогрессией элитного события в различные соответствующие генетические фоны и отмечением соответствия с одним, двумя или всеми критериями, например а), б) и с) выше.

Кроме того, в случае трансгенов, кодирующих мужскую стерильность и восстановление фертильности, описанных здесь, отбор элитных событий также будет делаться по совместимости между этими событиями, конкретнее по тому, что потомство, являющееся результатом скрещивания растения, содержащего событие мужской стерильности, с растением, содержащим событие восстановления фертильности, в котором присутствуют оба события, имеет следующие характеристики:

а) соответствующее фенотипическое проявление фенотипа восстановленной фертильности, т.е. мужской фертильности; и

б) фенотипическое проявление на промышленно приемлемом уровне в диапазоне условий окружающей среды, которому растения, содержащие два события, вероятно, будут подвергаться при нормальном агрономическом использовании.

Таким образом, "элитное событие" относится к генетическому локусу, включающему трансген, который отвечает вышеописанным критериям. Растение, растительный материал или потомство, такое как семена, могут содержать одно или более элитных событий в своем геноме.

Элитное событие MS-B2 было охарактеризовано детально, как описано в WO 01/31042 (см., в частности, примеры 1 и 3). Трансформирующая ДНК была описана в примере 1. Фланкирующие последовательности ДНК растения после вставки трансгена были выделены и идентифицированы (см. WO 01/31042, в частности примеры 3.2, а также SEQ ID NO: 1 и 2). Диагностическая ПЦР, позволяющая идентифицировать элитное событие MS-B2 в биологическом материале, была также описана в WO 01/31042, в частности примере 5. Когда элитное событие MS-B2 присутствует в растениях, клетках, семенах или тканях Brassica, их геномная ДНК может использоваться для амплификации фрагмента ДНК размером между 160 и 200 п.о., в частности приблизительно 183 п.о., используя полимеразную цепную реакцию с использованием двух праймеров, имеющих нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3

и SEQ ID NO: 4 соответственно. Семя ссылочного растения было депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-850 или РТА-2485. Альтернативным названием элитного события MS-B2 является MS-11.

Элитное событие RF-BN1 было охарактеризовано детально, как описано в WO 01/41558 (см., в частности, примеры 1b и 4.2.2). Трансформирующая ДНК была описана в примере 1b. Фланкирующие последовательности ДНК растения после вставки трансгена были выделены и идентифицированы (см. WO 01/31042, в частности примеры 4.2.2, а также SEQ ID NO: 5 и 6). Диагностическая ПЦР, позволяющая идентифицировать элитное событие RF-BN1 в биологическом материале, была также описана в WO 01/41558, в частности примере 5.2. Когда элитное событие RF-BN1 присутствует в растениях, клетках, семенах или тканях Brassica, их геномная ДНК может использоваться для амплификации фрагмента ДНК размером между 195 и 235 п.о., в частности приблизительно 215 п.н., используя полимеразную цепную реакцию с использованием двух праймеров, имеющих нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно. Семя ссылочного растения было депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730. Альтернативным названием RF-BN1 является RF3 или ACS-BN003-6.

Растения, содержащие RF-BN1 или MS-B2, можно, например, получить из семян, депонированных в АТСС. Такие растения могут быть, кроме того, размножены и/или использованы в обычной схеме селекции с целью введения элитного события настоящего изобретения в другие сорта того же вида растений. Депонированные семена относятся к виду Brassica napus. Тем не менее, способы введения аллелей или трансгенов, расположенных в А-геноме, из B. napus в B. juncea хорошо известны в данной области техники и включают повторное возвратное скрещивание.

Настоящим изобретением впервые обеспечиваются растения, семена, клетки и ткани B. juncea, содержащие в своем ядерном геноме элитное событие RF-BN1, включающее геном восстановления фертильности. Имеющаяся ранее информация указывала на то, что элитное событие RF-BN1 присутствует в С-геноме; однако представленная здесь информация определила место вставки RF-BN1 в А-геноме, что делает возможным передачу B. juncea этого элитного события.

Растения Brassica, содержащие MS-B2 и/или RF-BNL, также характеризуются их устойчивостью к глюфосинату, которая в контексте настоящего изобретения предусматривает, что растения являются устойчивыми к гербициду Liberty™. Устойчивость к Liberty™ определяется в соответствии с тем критерием, что опрыскивание растений на стадии трех-четырёх листьев (3V-4V) по крайней мере 200 г активного ингредиента/га, предпочтительно 400 г активного ингредиента/га и, возможно, до 1600 г активного ингредиента/га не убивает растения. Растения, содержащие MS-B2 и/или RF-BNL, могут, кроме того, характеризоваться присутствием в их клетках фосфинотрицинацетилтрансферазы, определяемой в анализе РАТ (De Block et al., 1987, EMBO J., 6: 2513-2518).

Растения Brassica этого изобретения могут быть выращены обычным способом. Наличие гена 35S-bar обеспечивает то, что они устойчивы к глюфосинату. По этой причине с сорняками на полях, на которых выращивают такие растения Brassica, можно бороться посредством применения гербицидов, включающих глюфосинат в качестве активного ингредиента (например, Liberty™).

Полевые испытания, кроме того, позволили выявить, что присутствие MS-B2 в растениях Brassica приводит к увеличению урожая семян или зерна по сравнению с изогенной линией растений без MS-B2. Соответственно, вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ увеличения урожая семян в растениях масличного рапса, включающий стадию обеспечения растения масличного рапса с элитным событием MS-B2.

Как используется в приведенной ниже формуле изобретения, если не указано иное, термин "растение" предназначен для охвата тканей растений, на любой стадии зрелости, а также любых клеток, тканей или органов, взятых из или полученных из любого такого растения, включая без ограничения, любые семена, листья, стебли, цветы, корни, отдельные клетки, гаметы, клеточные культуры, культуры тканей или протопласты. Клетки растений, как здесь используются, охватывают нерегенеративные клетки растений.

Растения "Brassica", как здесь используются, относятся к растениям семейства Brassicaceae, предпочтительно растениям, содержащим А-геном. Предпочтительно растение Brassica будет относиться к одному из видов Brassica napus, Brassica rapa (или campestris) или Brassica juncea. Кроме того, растение может относиться к виду, возникшему в результате интеркросса этих видов Brassica, таких как B. napo-campestris, или искусственного скрещивания одного из этих видов Brassica с другим видом Cruciferaeae. Используемый здесь термин "масличное растение" относится к любому одному из видов Brassica napus, Brassica rapa (или campestris) или Brassica juncea.

Масличные растения в соответствии с настоящим изобретением также можно обрабатывать гербицидами, включающими Клопиралид, Диклофоп, Флуазифоп, Глюфосинат, Глифосат, Метазахлор, Трифлуралин, Этаметсульфурон, Квинмерак, Квизалофоп, Клетодим, Тетралоксидим; фунгицидами, включающими Азоксистробин, Карбендазим, Флудиоксонил, Ипродион, Прохлораз, Винклозолин, или инсектицидами, включающими Карбофуран, Органофосфаты, Пиретроиды, Тиаклоприд, Дельтаметрин, Ими-

даклоприд, Клотиаинидин, Тиаметоксам, Ацетамиприд, Динотефуран, β -Цифлутрин, γ - и λ -Цигалотрин, τ -Флювалинат, Этипрол, Спинозад, Спиноторам, Флубендиамид, Ринаксипир, Циазипир или 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он.

Используемый здесь термин "включающий (содержащий)" следует интерпретировать как изложение наличия указанных признаков, целых чисел, стадий или компонентов, которые упомянуты, но не исключает наличия или добавления одного или более признаков, целых чисел, стадий или компонентов или их групп. Таким образом, например, нуклеиновая кислота или белок, включающая(ий) последовательность нуклеотидов или аминокислот, может содержать больше нуклеотидов или аминокислот, чем фактически приведенные нуклеотиды или аминокислоты, т.е. быть частью большей нуклеиновой кислоты или белка. Химерный ген, включающий последовательность ДНК, которая функционально или структурно определена, может содержать дополнительные последовательности ДНК и т.д.

Следующие примеры описывают характеристики растений масличного рапса, содержащих элитные события MS-B2 и RF-BN1.

Если не указано иное, все методы рекомбинантных ДНК осуществляются в соответствии со стандартными протоколами, описанными в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY и в тт. 1 и 2 Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Стандартные материалы и методы для молекулярного исследования растений описаны в *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) by R.D.D. Croy published by BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, UK.

В описании и в примерах приводится ссылка на следующие последовательности:

- SEQ ID NO: 1: 5' фланкирующая последовательность MS-B2,
- SEQ ID NO: 2: 3' фланкирующая последовательность MS-B2,
- SEQ ID NO: 3: олигонуклеотидный праймер 1 для обнаружения MS-B2,
- SEQ ID NO: 4: олигонуклеотидный праймер 2 для обнаружения MS-B2,
- SEQ ID NO: 5: 5' фланкирующая последовательность RF-BN1,
- SEQ ID NO: 6: 3' фланкирующая последовательность RF-BN1,
- SEQ ID NO: 7: олигонуклеотидный праймер 1 для обнаружения RF-BN1,
- SEQ ID NO: 8: олигонуклеотидный праймер 2 для обнаружения RF-BN1,
- SEQ ID NO: 9: плазмида рTHW118,
- SEQ ID NO: 10: плазмида рTCO113.

Приведенное выше описание настоящего изобретения предназначено для иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения или модификации в описанных вариантах осуществления могут прийти на ум квалифицированных в данной области техники специалистов. Они могут быть осуществлены без отступа от сущности или объема настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Краткое описание MS-B2 и RF-BN1.

1.1. Элитное событие MS-B2.

Элитное событие MS-B2 было вызвано с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений *V. parvis* химерной ДНК, включающей ген барназы под контролем специфического для тапетума промотора (рTCO113).

Плазмида рTCO113 была, по существу, получена из промежуточного вектора рGSV1. Сам вектор рGSV1 был получен из рGSC1700 (Comelissen and Vandewielle, 1989), но включает искусственную T-область, состоящую из левой и правой пограничных последовательностей формы рTiB6S3 TL-ДНК, и происходящие из полилинкера сайты клонирования, позволяющие вводить химерные гены между являющимися повторами границами T-ДНК. Вектор рGSV1 снабжен геном барстара в основе плазмиды с регуляторными сигналами для экспрессии в *E. coli*.

Полное описание ДНК, заключенной между являющимися границами повторами рTCO113, приведено в табл. 1 (SEQ ID NO: 10).

Таблица 1

Положения нуклеотидов ДНК, заключенной между являющимися границами повторами рTCO113

Положения нуклеотидов	Ориентация	Описание и ссылки
1-25		Являющийся правой границей повтор из TL-ДНК из рTiB6S3 (Gielen et al. (1984) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846)
26-53		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности

54-90		Остаточная последовательность из TL-ДНК у являющегося правой границей повтора
91-97		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
309-98	против часовой стрелки	3' нетранслируемый конец гена 7 TL-ДНК (3'g7) pTiB6S3 (Velten and Schell (1985) Nucleic Acids Research 13: 6981-6998; Dhaese et al. (1983) The EMBO Journal 3: 835-846)
310-331		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
883-332	против часовой стрелки	Кодирующая последовательность гена устойчивости к бифлафосу (bar) <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Thompson et al. (1987) The EMBO Journal 6: 2519-2523). Два N-концевых кодона кодирующей области bar дикого типа были заменены на кодоны ATG и GAC, соответственно
2609-884	против часовой стрелки	Промотор гена малой субъединицы atS1A рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы из <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) (Krebbbers et al. (1988) Plant Molecular Biology 11: 745-759)
2610-2659		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
2920-2660	против часовой стрелки	TaqI-фрагмент размером 260 п.о. из 3' нетранслируемого конца гена нопалинсинтазы (3' nos) из T-ДНК pTiT37 и с содержанием сигналов полиаденилирования растений (Depicker et al. (1982) Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573)
2921-2936		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
3032-2937		3' нетранслируемый район, находящийся 3' от кодирующей барназы последовательности <i>B. amyloliquefaciens</i>
3368-3033	против часовой стрелки	Кодирующая область гена барназы из <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202: 913-915)
4878-3369	против часовой стрелки	Район промотора специфического для пыльника гена TA29 из <i>Nicotiana tabacum</i> . Промотор включает последовательность размером 1,5 т.п.о., находящуюся 3' от иницирующего кодона ATG (Seurinck et al. (1990) Nucleic Acids Research 18: 3403)
4879-4924		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности

4925-5215		Промотор гена нопалинсинтазы из Т-ДНК pTiT37 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (PNos). Нуклеотидная последовательность промотора PNos описана в Depicker et al., (1982) <i>Journal of Molecular and Applied Genetics</i> 1: 561-573
5216-5217		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
5218-5490	по часовой стрелке	Кодирующая область гена барстара из <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) <i>Journal of Molecular Biology</i> 202: 913-915)
5491-5530		Последовательность из 3' нетранслируемого конца гена барстара из <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
5531-5554		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
5555-5766	по часовой стрелке	3' нетранслируемый конец гена 7 TL-ДНК (3'g7) pTiB6S3 (Velten and Schell (1985) <i>Nucleic Acids Research</i> 13: 6981-6998; Dhaese et al. (1983) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846)
5767-5773		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
5774-5810		Остаточные последовательности из TL-ДНК у являющегося правой границей повтора
5811-5840		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
5841-5865		Являющийся левой границей повтор из TL-ДНК из pTiB6S3 (Gielen et al. (1984) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-846)

Фланкирующие последовательности были выделены, как описано в WO 01/31042.

Правая (5') фланкирующая область.

5' фланкирующая область была амплифицирована в виде фрагмента размером приблизительно 415 п.н., полная последовательность которого была определена (SEQ ID NO: 1). Последовательность между нуклеотидами 1 и 234 соответствует ДНК растения, в то время как последовательность между нуклеотидами 235 и 415 соответствует Т-ДНК.

Левая (3') фланкирующая область.

3' фланкирующая область была амплифицирована в виде фрагмента размером приблизительно 416 п.н., полная последовательность которого была определена (SEQ ID NO: 2). Последовательность между нуклеотидами 1 и 193 соответствует Т-ДНК, в то время как последовательность между нуклеотидами 194 и 416 соответствует ДНК растения.

Идентификация MS-B2 с помощью ПЦР.

Как описано в WO 01/31042, включающий MS-B2 биологический материал можно идентифицировать, используя представленный там протокол идентификации с помощью ПЦР.

Могут быть использованы следующие праймеры, которые специфически распознают чужеродную ДНК и фланкирующую последовательность MS-B2:

B01: 5'-gAA.ATC.CAT.gTA.AAg.CAg.CAg.gg-3' (SEQ ID NO: 3) (мишень: ДНК растений).

B02: 5'-gCT.Tgg.ACT.ATA.ATA.CTT.gAC-3' (SEQ ID NO: 4) (мишень: Т-ДНК).

Ожидаемыми амплифицированными фрагментами в ПЦР-реакции являются для пары праймеров B01-B02: 183 п.о. (элитное событие MS-B2).

1.2. Элитное событие RF-BN1.

Элитное событие RF-BN1 было вызвано с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений *V. parus* химерной ДНК, включающей ген барстара под контролем промотора TA29

(pTHW118).

Плазмида pTHW118 также была, по существу, получена из промежуточного вектора pGSV1 (описанного выше). Полное описание ДНК, заключенной между являющимися границами повторами pTHW118, приведено в табл. 2 (SEQ ID NO: 9).

Таблица 2

Т-ДНК плазмиды pTHW118

Положения нуклеотидов	Ориентация	Описание и ссылки
1-25		Являющийся правой границей повтор из TL-ДНК из pTiB6S3 (Gielen et al. (1984) The EMBO Journal 3: 835-846);
26-33		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
54-90		Остаточная последовательность из TL-ДНК у являющегося правой границей повтора
91-97		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
309-98	против часовой стрелки	3' нетранслируемый конец гена 7 TL-ДНК (3'g7) pTiB6S3 (Velten and Schell (1985) Nucleic Acids Research 13: 6981-6998; Dhaese et al. (1983) The EMBO Journal 3: 835-846)
310-330		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
883-331	против часовой стрелки	Кодирующая последовательность гена устойчивости к бифлафосу (bar) Streptomyces hygrosopicus (Thompson et al. (1987) The EMBO Journal 6: 2519-2523). Два N-концевых кодона кодирующей области bar дикого типа были заменены на кодоны ATG и GAC, соответственно
2608-883	против часовой стрелки	Промотор гена малой субъединицы atS1A рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы из Arabidopsis thaliana (PssuAra) (Krebbers et al. (1988) Plant Molecular Biology 11: 745-759)
2609-2658		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
2919-2659	против часовой стрелки	TaqI-фрагмент размером 260 п.о. из 3' нетранслируемого конца гена нопалинсинтазы (3' nos) из Т-ДНК pTiT37 и с содержанием сигналов полиаденилирования растений (Depicker et al. (1982) Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573)
2920-2940		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
2941-2980		3' нетранслируемый район, находящийся 3' от кодирующей барстар последовательности Bacillus amyloliquefaciens;

3253-2981	против часовой стрелки	Кодирующая область гена барстара из <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202: 913-915);
4762-3254	против часовой стрелки	Район промотора специфического для пыльника гена TA29 из <i>Nicotiana tabacum</i> . Промотор включает последовательность размером 1,5 т.п.о., находящуюся 3' от иницирующего кодона ATG (Seurinck et al. (1990) Nucleic Acids Research 18: 3403)
4763-4807		Происходящие из синтетического полилинкера последовательности
4808-4832		Являющийся левой границей повтор из TL-ДНК из pTiB6S3 (Gielen et al. (1984) The EMBO Journal 3: 835-846).

Фланкирующие последовательности были выделены, как описано в WO 01/41558.

Правая (5') фланкирующая область.

5' фланкирующая область была амплифицирована в виде фрагмента размером приблизительно 1077 п.н., полная последовательность которого была определена (SEQ ID NO: 5). Последовательность между нуклеотидами 1 и 881 соответствует ДНК растения, в то время как последовательность между нуклеотидами 882 и 1077 соответствует Т-ДНК.

Левая (3') фланкирующая область.

3' фланкирующая область была амплифицирована в виде фрагмента размером приблизительно 1500 п.н., полная последовательность которого была определена (SEQ ID NO: 6). Последовательность между нуклеотидами 1 и 166 соответствует Т-ДНК, в то время как последовательность между нуклеотидами 167 и 1441 соответствует ДНК растения.

Идентификация RF-BNL с помощью ПЦР.

Как описано в WO 01/31042, включающий RF-BN1 биологический материал можно идентифицировать, используя представленный там протокол идентификации с помощью ПЦР.

Для идентификации растительного материала, включающего RF-BN1, используют следующие праймеры, которые специфически распознают трансген и фланкирующую последовательность RF-BNL.

BNA03: 5'-TCA.TCT.ACg.gCA.ATg.TAC.CAg-3' (SEQ ID NO: 7) (мишень: трансген).

BNA04: 5'-Tgg.ACC.CCT.Agg.TAA.ATg.CC-3' (SEQ ID NO: 8) (мишень: ДНК растения).

Ожидаемыми амплифицированными фрагментами в ПЦР-реакции являются для пары праймеров BNA03-BNA04: 215 п.о. (элитное событие RF-BNL).

Пример 2. Идентификация генома, в котором расположен локус RF-BNL, и введение в *Brassica juncea*.

Для определения того, расположен ли локус RF-BN1 в А- или С-геноме *Brassica napus*, совместное наследование или сцепление RF-BN1 с известными маркерами в геноме *Brassica* были проанализированы в 4 различных расщепляющихся популяциях BC1 В. *napus*, полученных в результате скрещивания линии донора, содержащей трансген RF-BN1 в гомозиготном состоянии, и рекуррентного родителя, не содержащего трансгена. Способ с использованием AFLP (полиморфизма длины амплифицированных фрагментов) был использован для создания генетических маркеров. Анализ AFLP был адаптирован из Vos et al. (1995, NAR 23: 4407-4414, EP0534858 и патента США с № 6045994). Для идентификации маркеров AFLP, сцепленных с RF-BN1, массовый сегрегационный анализ (BSA) проводили в соответствии с Michelmore et al. (1991, Proc Natl Acad Sci USA 88: 9828-9823).

Все генетические маркеры AFLP, которые продемонстрировали дифференциальную амплификацию между пулами позитивных по RF-BN1 растений (содержащих видимый маркер AFLP) и негативных по RF-BN1 растений (в которых тот же маркер не был виден), были проанализированы по крайней мере в 46 отдельных образцах популяции BC1, в которой маркер AFLP, как было установлено в анализе BSA, является потенциально сцепленным. Только маркеры, которые продемонстрировали значительную степень косегрегации с ПЦР-маркером RF-BN1, были сохранены, другие потенциальные маркеры, не удовлетворяющие этому критерию, были отброшены как ложноположительные из анализа BSA. Анализ сцепления был проведен, используя данные от сохраненных маркеров AFLP и данные от ПЦР-маркера RF-BN1, выработанные на единичных растениях для каждой популяции BC1 отдельно, используя версию 3.0 JoinMap (Van Ooijen and Voorrips (2001) JoinMap Version 3.0, Software for the calculation of genetic linkage

maps, Plant Research International, Wageningen, The Netherlands). Поскольку 4 индивидуальные карты вокруг локуса RF-BN1 показали значительное соответствие, эти 4 карты для BC1 могут быть объединены в одну карту для BC1, представляющую область вокруг локуса RF-BN1, используя то же программное обеспечение, что делает возможным локальное картирование локуса RF-BN1.

Результирующую локальную карту района RF-BN1 затем сравнивали со ссылкой генетической картой, которая представляет все хромосомы *V. parus*. В случае этой ссылки карты, номера хромосом уже были присвоены в соответствии с Sharpe и др. (1995, Genome 38: 112-1121) и Parkin и др. (1995, Genome 38: 1122-1131). N01-N10 являются хромосомами А-генома, в то время как N11-N19 являются хромосомами С-генома. Очень четкая корреляция отмечалась между картой района RF-BN1 и хромосомой N07 на ссылке карте, которая, как известно, является хромосомой А-генома. RF-BN1 расположено в А-геноме *V. parus*.

Событие RF-BN1 было введено путем повторного возвратного скрещивания из растений сорта Drakkar, включающих событие RF-BN1, в сорт *Brassica juncea*. После по крайней мере 4 поколений ускоренных беккроссов растения *V. juncea* были исследованы, и было установлено, что

а) присутствие чужеродной ДНК не влияло негативно на другие желаемые характеристики растения, такие как те, которые относятся к агрономическим характеристикам или промышленной ценности;

б) событие характеризовалось четко определенной молекулярной конфигурацией, которая стабильно наследовалась;

в) представляющий интерес ген(ы) в чужеродной ДНК продемонстрировал правильное, соответствующее и стабильное пространственное и временное фенотипическое проявление, как в гетерозиготном (или гемизиготном), так и гомозиготном состоянии события, на промышленно приемлемом уровне в диапазоне условий окружающей среды, которому растения, содержащие событие, вероятно, будут подвергаться при нормальном агрономическом использовании. Кроме того, растения были оценены в отношении их агрономических характеристик и качества по сравнению с видом *Brassica juncea* дикого типа.

Всесторонняя проверка в поле показала, что RF-BN1 в *Brassica juncea* давало в результате растения, которые продемонстрировали достаточную экспрессию представляющих интерес генов в чужеродной ДНК, т.е. фенотип мужской стерильности, в сочетании с оптимальными агрономическими характеристиками. Таким образом, неожиданно было обнаружено, что RF-BN1, хотя первоначально выявленное в *V. parus*, также является элитным событием в *Brassica juncea*. Кроме того, RF-BN1 может быть эффективно использован для восстановления фертильности у растений *V. juncea*, включающих MS-B2.

Пример 3. Агрономические характеристики включающих MS-B2/RF-BN1 растений.

Растения масличного рапса *Brassica*, включающие события MS-B2/RF-BN1, были проверены в полевых условиях, вместе с изогенными, нетрансгенными контрольными образцами, а также включающими MS-B2 растениями, включающими другие события восстановления. Соответствующие данные, касающиеся урожайности, суммированы в приведенных ниже таблицах.

Обратите внимание, что данные полевых испытаний дополнительных линий растений были включены в анализ для расчета среднего значения, статистически достоверного и т.д.

Будет ясно, что линии растений, включающие MS-B2 и RF-BN1, приносят значительно больший урожай, чем линии растений, включающие MS-B2 и другие события восстановления мужской фертильности, такие как RF-BN2.

Кроме того, будет ясно, что линии растений, включающие MS-B2, приносят больший урожай, чем линии изогенных нетрансгенных растений.

Таблица 3

Полевые испытания в географическом местоположении 1

Описание переменной	Урожайность (9)	
	кг	кг
Пedigри	Среднее значение	% от контрольных образцов
MS-B2 BC4	1458,95	102,31
Изогенная линия	1529,45	107,26
Изогенная линия	1552,57	108,88
Изогенная линия (75% плотность посева семян)	1560,60	109,44
Изогенная линия (50% плотность посева семян)	1560,93	109,46
Изогенная линия (50% плотность посева семян)	1573,65	110,35
Изогенная линия (75% плотность посева семян)	1581,22	110,89
MS-B2 BC4	1886,26	132,28
MS-B2 BC4 x RF-BN1+accBC3	1468,76	103,00
MS-B2 BC4 x RF-BN2	1013,52	71,08
Ms11 BC4 x RF-BN1+accBC3	1486,27	104,23
Ms11 BC4 x RF-BN2+BC4	1017,70	71,37
Ms11 BC4 x RF-BN1+accBC3	1522,29	106,75
Ms11 BC4 x RF-BN2+BC5	1183,72	83,01
Ms11 BC4 x RF-BN1+accBC3	1565,97	109,82

Ms11 BC4 x RF-BN2+BC5		1172,28	82,21
Среднее значение		1403,99	98,46
Среднее значение для контрольных образцов		1425,99	100,00
Значимость		**	**
P.p.d.s. 5%		362,98	25,45
P.p.d.s. 1%		479,76	33,64
P.p.e.s. 5%		486,84	34,14
P.p.e.s. 1%		548,55	38,47
Непрерывная переменная		20,50%	20,50%
Соответствующее среднееквадратическое отклонение		289,36	20,29
# проанализированных представителей		4	4

Таблица 4

Полевые испытания в географическом местоположении 2

Описание переменной	Урожайность (9)	
	кг	кг
Педигри	Среднее значение	% от контрольных образцов
MS-B2 BC4	1573,12	93,52
Изогенная линия (50% плотность посева семян)	1671,86	99,39
Изогенная линия (75% плотность посева семян)	1689,03	100,41
Изогенная линия	1692,71	100,63
MS-B2BC4 x RF-BN1+accBC3	1776,16	105,59
MS-B2BC4 x RF-BN2+BC4	1285,16	76,40
MS-B2BC4 x RF-BN1+accBC3	1716,48	102,04
MS-B2BC4 x RF-BN2+BC5	1255,13	74,61
MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2	1973,41	117,31
Среднее значение	1586,57	94,32
Среднее значение для контрольных образцов	1682,17	100,00
Значимость	**	**
P.p.d.s. 5%	186,23	11,07
P.p.d.s. 1%	247,68	14,72
P.p.e.s. 5%	274,69	16,33
P.p.e.s. 1%	326,83	19,43
Непрерывная переменная	8,28%	8,28%
Соответствующее среднееквадратическое отклонение	131,68	7,83
# проанализированных представителей	4	4

Таблица 5

Полевые испытания в географическом местоположении 3

Описание переменной	VIGAB	Урожайность (9)	Урожайность (9)
	1-9	кг	кг
Код переменной			
Педигри	Среднее значение	Среднее значение	% от контрольных образцов
MS-B2 BC4	4,91	1914,55	102,88
MS-B2 BC4	4,94	1932,70	103,85
MS-B2 BC4	4,89	1952,49	104,92
Изогенная линия	7,34	1783,81	95,85
Изогенная линия (50% плотность посева семян)	7,33	1784,18	95,87
Изогенная линия	7,31	1786,08	95,98
Изогенная линия (75% плотность посева семян)	7,37	1792,20	96,30
Изогенная линия (50% плотность посева семян)	7,33	1811,31	97,33
MS-B2 BC4	4,90	1946,01	104,57
MS-B2BC4 x RF-BN1+accBC3	5,56	2066,72	111,06
MS-B2BC4 x RF-BN2+BC4	5,23	1690,12	90,82
MS-B2BC4 x RF-BN2+BC4	5,19	1719,02	92,37
MS-B2BC4 x RF-BN2+BC5	5,22	1742,14	93,61
MS-B2BC4 x RF-BN2+BC5	5,20	1755,62	94,34
MS-B2BC4 x RF-BN1+accBC3	5,98	1954,28	105,01

MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2		6,27	1965,55	105,62
MS-B2 BC4 x RF-BN1+accBC3		6,01	1996,10	107,26
MS-B2BC4 x RF-BN1+accBC3		5,51	2062,47	110,83
MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2		5,55	1921,95	103,28
Среднее значение		5,93	1853,67	99,61
Среднее значение для контрольных образцов		6,91	1860,98	100,00
Значимость		**	**	**
P.p.d.s. 5%		0,42	140,25	7,54
P.p.d.s. 1%		0,55	185,37	9,96
P.p.e.s. 5%		0,56	188,11	10,11
P.p.e.s. 1%		0,63	211,95	11,39
Непрерывная переменная		5,67%	6,17%	6,17%
Соответствующее среднеквадратическое отклонение		0,34	113,87	6,12
# проанализированных представителей		4	4	4

Таблица 6

Сводка полевых испытаний

	СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ (N=7)	
	УРОЖАЙНОСТЬ (Т)	
ПЕДИГРИ	NTR	1 APP
MS-B2 X RF-BN1	108,1%	113,7%
ИЗОГЕННАЯ НЕТРАНСГЕННАЯ ЛИНИЯ	100%	104,5%
MS-B2	114,1%	112,1%
RF-BN1	95,1%	92,3%
НЕПРЕРЫВНАЯ ПЕРЕМЕННАЯ		
ЛОГАРИФИЧЕСКОЕ		10,6%
СРЕДНЕКВАДРАТИЧЕСКОЕ ОТКЛОНЕНИЕ		

Пример 4. Агрономические характеристики включающих MS-B2/RF-BN1 растений *V. parvus* по сравнению с включающими MS-BN1/RF-BN1 растениями *V. parvus*.

Полевые испытания проводились в 5 местоположениях (4 повторности/заполненные участки) для подтверждения восстановления и оценки устойчивости к гербицидам и агрономических характеристик MS-B2/RF-BN1 гибридов *V. parvus* в сравнении с MS-BN1/RF-BN1 гибридами на том же генетическом фоне.

Урожайность и силу определяли в отсутствие распыления глюфосината (A) или при обработке один раз (B) или два раза (C) глюфосинатом в виде обычного применения (Liberty®).

Результаты суммированы на фиг. 1. Сила MS-B2/RF-BN1 гибридов всегда больше силы MS-B1/RF-BN1, будь-то необработанные (A), обработанные один раз (B) или обработанные два раза (C) аммонием глюфосината гибриды.

В общем, MS-B2/RF-BN1 гибриды, как правило, зацветали (начало и конец) раньше и созревали раньше, чем MS-B1/RF-BN1 гибриды.

Урожайность также была определена для полевых испытаний типа A, B, C, описанного выше, и результаты суммированы на фиг. 2. MS-B2/RF-BN1 гибриды имеют на 2-5% более высокую урожайность, чем MS-BN1/RF-BN1 гибриды.

Было также отмечено, что восстановление в MS-B2/RF-BN1 было полным относительно всех генотипов и местоположений.

Итак, настоящее изобретение составлено в вариантах осуществления, описанных в следующих пронумерованных пунктах.

1. Способ получения гибридных семян от растений масличного рапса, включающий стадии:

a) обеспечение обладающего мужской стерильностью женского родительского растения масличного рапса, включающего элитное событие MS-B2, при этом семя ссыльного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в ATCC под регистрационным номером ATCC_PTA-2485 или ATCC_PTA-850;

b) обеспечение обладающего мужской фертильностью мужского родительского растения масличного рапса, включающего элитное событие RF-BN1, предпочтительно в гомозиготном состоянии, при этом семя ссыльного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в ATCC под регистрационным номером ATCC_PTA-730;

c) допуск опыления пыльцой указанного мужского родительского растения масличного рапса указанного женского родительского растения масличного рапса и

d) сбор урожая гибридных семян с указанного женского родительского растения.

2. Способ по п.1, причем указанные растения масличного рапса относятся к виду *Brassica napus* или

Brassica juncea.

3. Растение масличного рапса, содержащее в своем ядерном геноме по крайней мере одну копию элитного события MS-B2, при этом семя сылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850, и по крайней мере одну копию элитного события RF-BN1, при этом семя сылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730.

4. Растение масличного рапса по п.3, причем указанные растения масличного рапса относятся к виду *Brassica napus* или *Brassica juncea*.

5. Клетка, или ткань, или семя растения масличного рапса по п.3.

6. Пара растений масличного рапса для применения в получении гибридных семян, причем одно из указанных растений масличного рапса включает элитное событие MS-B2, при этом семя сылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850, а другое из указанных растений масличного рапса включает элитное событие RF-BN1, при этом семя сылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730.

7. Геномная ДНК растения масличного рапса по п.2.

8. Растение или клетка растения *Brassica juncea*, включающее(ая) элитное событие RF-BN1, при этом семя сылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730.

9. Семя от растения *Brassica juncea* по п.5, включающее элитное событие RF-BN1, при этом сылочное семя, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-730.

10. Растение или клетка по п.8, включающее(ая), кроме того, элитное событие MS-B2, при этом семя сылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850.

11. Применение элитного события MS-B2, при этом семя сылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850, для увеличения урожая семян в трансгенном растении масличного рапса.

12. Применение по п.11, причем указанным растением масличного рапса является *Brassica juncea*.

13. Способ увеличения урожая растений масличного рапса, включающий стадию обеспечения указанного растения масличного рапса элитным событием MS-B2, при этом семя сылочного растения, включающее указанное элитное событие, депонировано в АТСС под регистрационным номером АТСС_РТА-2485 или АТСС_РТА-850.

14. Способ получения гибридных семян и растений *B. juncea*, включающий:

а) подсев к растениям *B. juncea*, включающим элитное событие MS-B2, растений *B. juncea*, включающих элитное событие RF-BN1;

б) допуск перекрестного опыления растений;

с) сбор семян с растения *B. juncea*, включающего элитное событие MS-B2.

15. Применение растения *B. juncea*, включающего элитное событие RF-BN1, для получения растений-потомков или получения семян.

16. Применение RF-BN1 для восстановления мужской фертильности в растении *B. juncea*, включающем элитное событие MS-B2.

17. Геномная ДНК *B. juncea*, включающая RF-BN1.

18. Геномная ДНК по п.17, включающая, кроме того, MS-B2.

19. Клетка растения, растение или семя *B. juncea*, содержащая(ее) в своем геноме последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, и последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6, содержащая(ее), кроме того, кодирующую ингибитор барстара последовательность между указанными, отмеченными последовательностями.

20. Клетка растения, растение или семя по п.19, содержащая(ее), кроме того, в своем геноме последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, содержащая(ее), кроме того, кодирующую ингибитор барназы последовательность между указанными, отмеченными последовательностями.

21. Способ получения гибридных семян и растений *B. napus*, включающий:

а) подсев к растениям *B. napus*, включающим элитное событие MS-B2, растений *B. napus*, включающих элитное событие RF-BN1;

б) допуск перекрестного опыления растений;

с) сбор семян с растений *B. napus*, включающих элитное событие MS-B2.

22. Геномная ДНК *B. napus*, включающая RF-BN1, включающая, кроме того, MS-B2.

23. Клетка растения, растение или семя *B. napus*, содержащая(ее) в своем геноме последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, и последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6, содержащая(ее), кроме того, кодирующую ингибитор барстара последовательность между указанными, отмеченными последовательностями, а также последо-

вательность, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, содержащая(е), кроме того, кодирующую ингибитор барназы последовательность между указанными, отмеченными последовательностями.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гибридных семян *Brassica napus* или *Brassica juncea*, включающий подсев обладающего мужской стерильностью женского родительского растения *B. napus* или *B. juncea*, включающего вызывающую мужскую стерильность чужеродную ДНК, содержащую ген барназы под контролем промотора, управляющего экспрессией в клетках тапетума, к обладающему мужской фертильностью мужскому родительскому растению *B. napus* или *B. juncea*, включающему обеспечивающую восстановление фертильности чужеродную ДНК, содержащую ген барстара под контролем промотора TA29; где указанная вызывающая мужскую стерильность чужеродная ДНК вставлена в геном растения в участке, имеющем 5' и 3' фланкирующие последовательности, где

5' фланкирующая последовательность и смежный участок чужеродной молекулы ДНК включают последовательность SEQ ID NO: 1,

3' фланкирующая последовательность и смежный участок чужеродной молекулы ДНК включают последовательность SEQ ID NO: 2, причем

указанные выше чужеродная ДНК и 5' и 3' фланкирующие последовательности происходят от семян ATCC_PTA-2485 или ATCC_PTA-850, и их можно идентифицировать с помощью полимеразной цепной реакции с двумя праймерами, имеющими нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, в результате которой образуется фрагмент 183 п.о.; где

указанная обеспечивающая восстановление фертильности чужеродная ДНК вставлена в геном растения в участке, имеющем 5' и 3' фланкирующие последовательности, где

5' фланкирующая последовательность и смежный участок чужеродной ДНК включают последовательность SEQ ID NO: 5,

3' фланкирующая последовательность и смежный участок чужеродной ДНК включают последовательность SEQ ID NO: 6, причем

указанные выше восстанавливающая фертильность чужеродная ДНК и 5' и 3' фланкирующие последовательности происходят от семян ATCC_PTA-730, и их можно идентифицировать с помощью полимеразной цепной реакции с двумя праймерами, имеющими нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, в результате которой образуется фрагмент 215 п.о., и

сбор урожая гибридных семян с указанного женского родительского растения, опыленного пыльцой указанного мужского родительского растения.

2. Способ по п.1, где указанное обладающее мужской фертильностью мужское родительское растение включает указанные обеспечивающую восстановление мужской фертильности чужеродную ДНК и 5' и 3' фланкирующие последовательности в гомозиготном состоянии.

3. Растение *Brassica napus*, содержащее в своем ядерном геноме по крайней мере одну копию вызывающей мужскую стерильность чужеродной ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1, и по крайней мере одну копию обеспечивающей восстановление мужской фертильности чужеродной ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1, где указанное растение имеет более высокую урожайность по сравнению с изогенным, нетрансгенным растением.

4. Растение *Brassica juncea*, содержащее в своем ядерном геноме по крайней мере одну копию вызывающей мужскую стерильность чужеродной ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1, и по крайней мере одну копию обеспечивающей восстановление мужской фертильности чужеродной ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1, где указанное растение имеет более высокую урожайность по сравнению с изогенным, нетрансгенным растением.

5. Ткань растения по п.3 или 4.

6. Семя растения по п.3 или 4.

7. Пара растений *Brassica napus* или пара растений *Brassica juncea* для получения гибридных семян, обеспечивающая более высокую урожайность по сравнению с изогенным, нетрансгенным растением, путем скрещивания друг с другом, причем одно растение включает вызывающую мужскую стерильность чужеродную ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1, и другое растение включает вызывающую восстановление мужской фертильности чужеродную ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1.

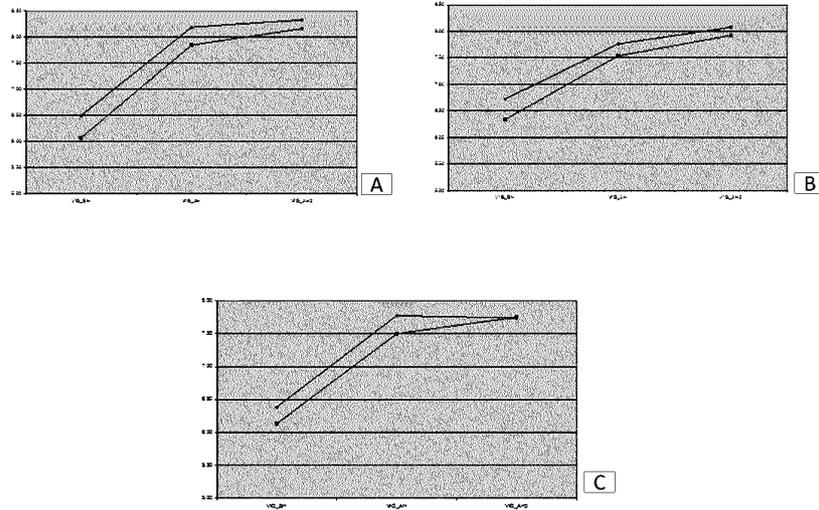
8. Геномная ДНК, полученная из растения по п.3, где указанное растение имеет более высокую урожайность по сравнению с изогенным, нетрансгенным растением.

9. Геномная ДНК, полученная из растения по п.4, где указанное растение имеет более высокую урожайность по сравнению с изогенным, нетрансгенным растением.

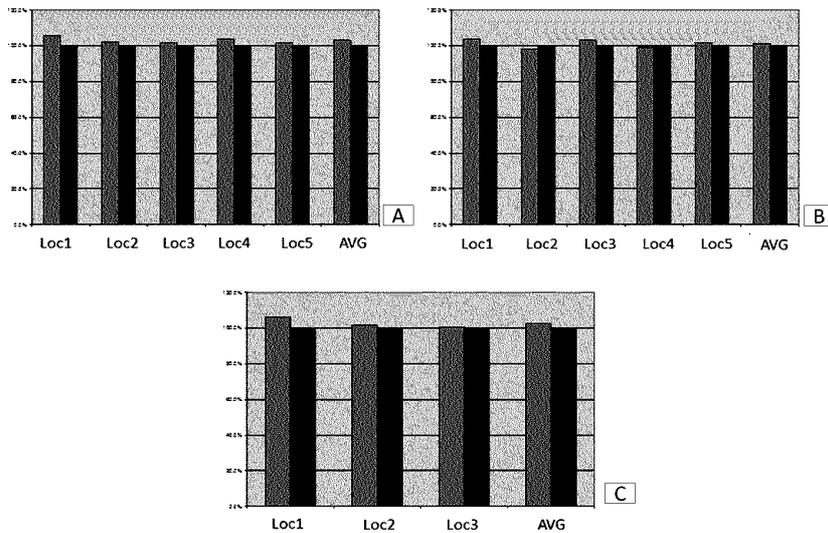
10. Применение женского родительского растения, включающего вызывающую мужскую стериль-

ность чужеродную ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1, и мужского родительского растения, включающего вызывающую восстановление мужской фертильности чужеродную ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1, для получения гибридного растения *Brassica napus* или *Brassica juncea*.

11. Способ получения гибридного растения *Brassica napus* или *Brassica juncea*, включающий стадию скрещивания женского родительского растения, содержащего вызывающую мужскую стерильность чужеродную ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1, с мужским родительским растением, содержащим вызывающую восстановление мужской фертильности чужеродную ДНК, фланкированную 5' и 3' последовательностями, охарактеризованными в п.1.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2