

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6276780号
(P6276780)

(45) 発行日 平成30年2月7日(2018.2.7)

(24) 登録日 平成30年1月19日(2018.1.19)

(51) Int.Cl.

F 1

AO1H 1/06	(2006.01)	AO1H	1/06	Z N A
AO1H 5/00	(2018.01)	AO1H	5/00	Z
C12N 15/01	(2006.01)	C12N	15/00	X
C12N 5/04	(2006.01)	C12N	5/04	
AO1H 6/02	(2018.01)	AO1H	6/02	

請求項の数 21 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-547057 (P2015-547057)
(86) (22) 出願日	平成25年12月13日 (2013.12.13)
(65) 公表番号	特表2016-506245 (P2016-506245A)
(43) 公表日	平成28年3月3日 (2016.3.3)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/076618
(87) 國際公開番号	W02014/091021
(87) 國際公開日	平成26年6月19日 (2014.6.19)
審査請求日	平成28年5月31日 (2016.5.31)
(31) 優先権主張番号	12196858.0
(32) 優先日	平成24年12月13日 (2012.12.13)
(33) 優先権主張國	欧洲特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号	61/736,817
(32) 優先日	平成24年12月13日 (2012.12.13)
(33) 優先権主張國	米国 (US)

微生物の受託番号 NCIMB NCIMB42050

(73) 特許権者	515160507 セスヴァンダーハーブ・エヌ・ブイ S E S V a n d e r H a v e N. V. ベルギー国、バーー 3300 ティエネン 、ソルダーテンプレイン・ゾーン 2、ナ ンバー15、インダストリーパルク
(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(72) 発明者	ウェインズ、ギー ベルギー国、バーー 1650 ベールセル 、ドウェルスボス 25
(72) 発明者	ルフェーヴル、マルク ベルギー国、バーー 1370 ジョドワ ーニュ・スヴレーヌ、リュ・ドゥ・ラ・シ ャペル・ストゥヴナエール 75

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】除草剤抵抗性のテンサイ植物を生育する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つ以上のアセトヒドロキシ酸シンターゼ酵素 (ALS) 阻害剤に対して抵抗性である突然変異テンサイ植物を産生するための方法であって、

- テンサイ植物から単離された気孔孔辺細胞からプロトプラストを得る工程；
- 該プロトプラストのインビトロ培養液に、インビトロ培養細胞の99%超に対して致死的である濃度で1つ以上のALS阻害剤(群)を含む組成物を適用する工程；及び
- 該インビトロ培養細胞の生き延びた細胞からテンサイ植物を再生する工程

を含み、該気孔孔辺細胞プロトプラストは、テンサイ植物へのその再生能について予め選択され、該予め選択されたプロトプラストは、10%を超える、分裂し、及び生存可能なカルスへと再生する確率(成長しているプロトプラストの数：培養液に入れたプロトプラストの総数)を有し、該プロトプラストによって得られたカルスは、10%を超える、シユートを発生する能力(シユートを產生しているカルスの下部：カルスの総数)を有し、該ALS阻害剤(群)は2000000個を超える該プロトプラストに適用される、前記方法。

【請求項 2】

テンサイ植物へと再生することのできる気孔孔辺細胞プロトプラストを選択する工程は、種々の遺伝子型のテンサイ植物から気孔孔辺細胞プロトプラストを単離し、該プロトプラストをインビトロ培養液に入れた場合に成長している該プロトプラストの比率を各遺伝子型について測定するサブ工程を含む、請求項1の方法。

【請求項 3】

生き延びたインビトロ培養細胞から再生した植物のゲノムをシークエンスする工程をさらに含む、請求項 1 又は 2 の方法。

【請求項 4】

A L S 遺伝子の突然変異を同定するために A L S 遺伝子をシークエンスする工程をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

A L S 遺伝子に突然変異を有する再生されたテンサイ植物を選択する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

再生されたテンサイ植物が、A L S 遺伝子においてグリシン 112、アラニン 113、メチオニン 115、アルギニン 133、バリン 187、アルギニン 190、アラニン 196、フェニルアラニン 197、リジン 247、メチオニン 346、ヒスチジン 347、アルギニン 368、アスパラギン酸 370、アスパラギン酸 371、アルギニン 372、メチオニン 565、バリン 566、フェニルアラニン 573、セリン 648、及びグリシン 649 からなる群より選択されたアミノ酸をコードする位置に 1 つ又はいくつかの突然変異（群）を有する、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 7】

再生されたテンサイ植物が、A L S 遺伝子においてプロリン 188 をコードする位置に 1 つの突然変異、並びに、A L S 遺伝子においてグリシン 112、アラニン 113、メチオニン 115、アルギニン 133、バリン 187、アルギニン 190、アラニン 196、フェニルアラニン 197、リジン 247、メチオニン 346、ヒスチジン 347、アルギニン 368、アスパラギン酸 370、アスパラギン酸 371、アルギニン 372、メチオニン 565、バリン 566、トリプトファン 569、フェニルアラニン 573、セリン 648、及びグリシン 649 をコードする位置に 1 つ以上の突然変異（群）を有する、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 8】

再生されたテンサイ植物が、A L S 遺伝子においてトリプトファン 569 をコードする位置に 1 つの突然変異、並びに、A L S 遺伝子においてグリシン 112、アラニン 113、メチオニン 115、アルギニン 133、バリン 187、プロリン 188、アルギニン 190、アラニン 196、フェニルアラニン 197、リジン 247、メチオニン 346、ヒスチジン 347、アルギニン 368、アスパラギン酸 370、アスパラギン酸 371、アルギニン 372、メチオニン 565、バリン 566、フェニルアラニン 573、セリン 648、及びグリシン 649 をコードする位置に 1 つ以上の突然変異（群）を有する、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 9】

再生されたテンサイ植物が、A L S 遺伝子において 1 つ以上の突然変異（群）を有し、1 つ以上の該突然変異が、アラニン 113、プロリン 188、アラニン 196、アスパラギン酸 371、アルギニン 372、トリプトファン 569、セリン 648、及びグリシン 649 からなる群より選択され、該アラニン 113 が、バリン又はトレオニンに突然変異し、該プロリン 188 がトレオニン、アルギニン、ロイシン、グルタミン、又はアラニンに突然変異し、該アラニン 196 がバリンに突然変異し、該アスパラギン酸 371 がグルタミン酸に突然変異し、該アルギニン 372 がヒスチジンに突然変異し、該トリプトファン 569 がグリシンに突然変異し、該セリン 648 がトレオニンに突然変異し、該グリシン 649 がアスパラギン酸に突然変異している、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 10】

再生されたテンサイ植物が、A L S 遺伝子においてプロリン 188 をコードする位置に 1 つの突然変異、及び、A L S 遺伝子においてトリプトファン 569 をコードする位置に 1 つの突然変異を有する、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 11】

1つ以上のALS阻害剤(群)を含む組成物がインビトロ培養細胞の少なくとも99%に対して致死的である濃度を推定する予備工程を含む、請求項1～10のいずれか記載の方法。

【請求項 12】

1つ以上のALS阻害剤(群)が50000000個を超える気孔孔辺細胞プロトプラストのインビトロ培養液に適用される、請求項1～11のいずれか記載の方法。

【請求項 13】

1つ以上のALS阻害剤(群)を含む組成物がホラムスルフロンを含む、請求項1～12のいずれか記載の方法。 10

【請求項 14】

ホラムスルフロンが 10^{-9} mol/lから 10^{-6} mol/lの範囲の濃度で適用される、請求項10の方法。

【請求項 15】

1つ以上のALS阻害剤(群)を含む組成物がエトキシスルフロンを含む、請求項1～14のいずれか記載の方法。

【請求項 16】

除草剤に対して抵抗性である突然変異テンサイ植物を產生するための方法であって、

- テンサイ植物から単離された気孔孔辺細胞からプロトプラストを得る工程；
- 該プロトプラストのインビトロ培養液に、インビトロ培養細胞の99%超に対して致死的である濃度で該除草剤を含む組成物を適用する工程； 20
- 該インビトロ培養細胞の生き延びた細胞からテンサイ植物を再生する工程；及び
- 該除草剤によって標的にされたペプチドをコードする遺伝子に突然変異を有する再生されたテンサイ植物を選択する工程

を含み、該気孔孔辺細胞プロトプラストは、テンサイ植物へのその再生能について予め選択され、該予め選択されたプロトプラストは、10%を超える、分裂し、及び生存可能なカルスへと再生する確率(成長しているプロトプラストの数：培養液に入れたプロトプラストの総数)を有し、該プロトプラストによって得られたカルスは、10%を超える、シートを発生する能力(シートを產生しているカルスの下部：カルスの総数)を有し、該除草剤は20000000個を超える該プロトプラストに適用される、前記方法。 30

【請求項 17】

該除草剤が、4-HPPD阻害剤、カロテノイド生合成阻害剤、EPPSPシンターゼ阻害剤、光化学系II阻害剤、光化学系I阻害剤、細胞分裂阻害剤、微小管会合阻害剤、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害剤、アセチルCoAカルボキシラーゼ阻害剤、細胞壁合成阻害剤、グルタミンシンテターゼ阻害剤、及び合成オーキシンからなる群より選択される、請求項16の方法。

【請求項 18】

ALS遺伝子の一方の対立遺伝子上に配列番号3を、ALS遺伝子の第二の対立遺伝子上に配列番号5を含む、突然変異テンサイ植物。

【請求項 19】

NCIMB42050で寄託された種子によって得ることのできる請求項18記載の突然変異テンサイ植物。 40

【請求項 20】

請求項18又は19の突然変異植物から単離された気孔孔辺細胞プロトプラスト。

【請求項 21】

1つ以上のさらなる遺伝形質の導入のための請求項20のプロトプラストの使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

発明の分野

50

本発明は、除草剤、例えばアセトヒドロキシ酸シンターゼ酵素（ALS）阻害剤に対して抵抗性であるテンサイ植物を生成する方法に関する。

【0002】

本発明はさらに、この方法によって得られる植物に関する。

【0003】

テンサイは、温帯及び亜熱帯地域において重要な農業作物である。

【0004】

現代の農業においては、雑草の増殖を管理するために除草剤が広く使用されている。

【0005】

ALS阻害剤などの除草剤（群）に対して抵抗性のテンサイ植物の生育は、トランスジェニックアプローチを使用することによって行なわれ得る。 10

【0006】

実際に、除草剤に対する抵抗性を付与する遺伝子を有する外来DNAの導入は、テンサイを含む様々な農作物で成功して実施されている。

【0007】

国際公開公報第95/10178号は、除草剤ビアラホスに対するトランスジェニックにより誘導された抵抗性を開示する。抵抗性をコードする遺伝子が、テンサイの孔辺細胞のプロトプラストに導入され、その後、これらのプロトプラストはテンサイ植物へと再生される。こうした植物はさらに、化学物質のホスフィノトリシン及びその誘導体のグルホシネートに対して抵抗性である。形質転換されなかった植物はビアラホスに対する抵抗性を獲得しなかった。 20

【0008】

最善の場合では、83000個のプロトプラストから28個の形質転換されたカルスが再生され、最悪の場合でも19000個のプロトプラストから1個のカルスが再生された。続いて、これらのカルスのいくつかは体細胞胚形成を示し得、テンサイ小植物を1%の効率で再生し得、特徴が非常に有益と認められたのは30%以下であった。

【0009】

胚などのテンサイ器官から及び／又はリーフディスクから得られた外植片からのカルスのより直接的な形質転換に非常に依拠する、このアプローチは当技術分野においてそれにも関わらず一般的に使用されていない。 30

【0010】

DNAベクター及び／又は外来遺伝子の挿入に依拠することなく、テンサイ作物などの除草剤抵抗性植物を生育する重要な必要性が依然として存在する。

【0011】

一方で、ALS阻害剤などの除草剤（群）に対するテンサイ抵抗性植物の生育は、理論的には、天然の抵抗性遺伝子を含むテンサイ植物との古典的な交配を介して行なわれ得る。しかしながら、このようなアプローチは時間がかかり、出願人の知る限りでは、天然のALS阻害剤抵抗性植物が、様々な雑草種をはじめとするテンサイ以外の種に関しては少なくとも記述されているという事実にも関わらず成功しなかった。特に二重突然変異体（すなわち、同じALS遺伝子に2つの突然変異を有する植物）は自然には非常に起こりにくいようである。 40

【0012】

特許出願国際公開公報第98/02527号は、いくつかのALS阻害剤、例えばスルホニル尿素除草剤などに対して抵抗性であるテンサイ植物の製造法を開示し、これは、B. vulgarisの外植片から得られたカルスをスルホニル尿素に曝し、この除草剤の存在下で成長することのできる僅かな自発的突然変異体から植物を再生する工程を含む。

【0013】

この方法により、ALS遺伝子に突然変異を有する植物が得られ、コードされているALS酵素の188位（シロイナズナALS酵素の197位に相当する）のプロリンが、セリンによって置換されている。しかしながら、この突然変異体は、商業的に使用されてい 50

ない。なぜなら、好ましい現代的なスルホニル尿素ALS除草剤（例えばホラムスルフロン）を用いての処理は、野外試験において必要な用量率で幾分の植物毒性を示すからである。

【0014】

特許出願国際公開公報第2012/049268号は、*B.vulgaris*の外植片から得られたカルスがホラムスルフロンに曝されることを除いて同じ方法に依拠し、よって、ホラムスルフロンを含むいくつかのALS阻害剤に対して抵抗性のテンサイ植物が得られる。

【0015】

この方法により、ALS遺伝子に突然変異を有する植物が得られ、コードされているALS酵素の569位（シロイナズナALS酵素の574位に相当する）のトリプトファンがロイシンによって置換されている。10

【0016】

このホモ接合体569/569突然変異体の野外試験は、ホラムスルフロン、ヨードスルフロン（別のALS阻害剤）、並びに種々のALS阻害剤の混合物に対して良好な抵抗性を示した。

【0017】

これらのどちらの公開された方法も、胚などの個々の外植片からカルスを単離する十分に確立された工程の恩恵を受ける。しかしながら、これは（i）多数の新鮮な胚を単離すること、（ii）寒天で固めた培養培地上でのその反復培養、及び（iii）形態学的な選択アプローチを使用した再生可能なカルスの選択、を必要とする時間のかかるアプローチである。20

【0018】

テンサイに遺伝形質を導入するための他の戦略が開発され、これは出発物質として葉肉プロトプラスト（これは気孔孔辺細胞プロトプラストとは異なる）に依拠する（Krens et al., 1990, *Theor. appl. Genet.*, vol 79, pages 390-396）。Gurel et al. 2008, *Critical reviews in Plant Science*, 27, 108-140は、テンサイについてのバイオテクノロジーの応用を開示している。7つの異なるインビトロ培養技術が開示されている。その中には、形質転換の目的のための気孔孔辺細胞からの、又は黄化胚軸外植片に由来する脆弱なカルスからのいずれかからのプロトプラストの培養があり、後者がはるかにより効率的である。しかしながら、プロトプラストを使用したこのアプローチは、大きな困難を伴う。Hall et al. 1997, *J. Exp. Botany*, 48, 255-263は、外来DNAを用いて形質転換実験を実施するために、500000個の気孔孔辺細胞プロトプラストの培養液を使用した。形質転換効率は2%より高かった。他方で、インビトロ植物培養液は、気孔の不完全を伴うことが報告され、これは対応する細胞の問題、及び、非常に多量の気孔孔辺細胞プロトプラスト、例えば突然変異事象を含む方法を実施するために必要とされる量の產生を指摘する。30

【0019】

発明の要約

広い態様において、本発明は、

- テンサイ植物から単離された気孔孔辺細胞からプロトプラストを得る工程；
- これらのプロトプラストのインビトロ培養液に、インビトロ培養細胞の99%超に対して致死的である濃度でこの除草剤を含む組成物を適用する工程；及び
- これらのインビトロ培養細胞の生き延びた細胞からテンサイ植物を再生する工程、
- この除草剤によって標的化されたペプチド（群）をコードする遺伝子に突然変異を有する再生されたテンサイ植物をおそらく選択する工程

を含む、除草剤に対して抵抗性である突然変異テンサイ植物を产生するための方法を開示し、これらの気孔孔辺細胞プロトプラストは、テンサイ植物へのその再生能について予め選択され、この除草剤は2000000個を超えるこれらのプロトプラストに適用される。

【0020】

40

50

本発明の方法に使用される除草剤は、ALS遺伝子を標的にしない除草剤であってよい。

【0021】

好みしい除草剤(ALSを標的にしない)は、

- 4-HPPD阻害剤(例えばメソトリオン、イソキサフルトール、ピラスルホトル、ベンゾビシクロロン、ベンゾフェナップ、ピラゾリネット、ピラゾキシフェン、テンボトリオン、トプラメゾン、スルコトリオン(sulcotrione)、及びスルコトリオン(sulcotrion)、カロテノイド生合成阻害剤(例えばフルルタモン、フルリドン、フルロクロリドン、ペフルブタミド、ノルフルラゾン、ピコリナフェン、及びジフルフェニカン)；

- EPSPシンターゼ阻害剤(例えばグリホサート又はグリホサートトリメシウム塩)；

- 光化学系II阻害剤(例えばフェニルカルバメート(例えばフェンメジファム又はデスマジファム)、ピリダジノン(例えばクロロリダゾン=ピラゾン)、トリアジン(例えばシアナジン、レムタル(remtal)、エグリナジンエチル、プログリナジンエチル、アメトリン、アトラジン、デスマトリン、ジメタメトリン、プロメトン、プロメトリン、プロパジン、シマジン、シメトリン、テルブメトン、テルブチラジン、テルブトリン、メトプロチン(methoprotyn))、トリアジノン(例えばメタミトロン、メトリブジン、ヘキサジノン、メトリブジン)、ウラシル(プロマシル、レナシル、テルバシル)、尿素(ジメフロン、イソプロツロン、リニュロン、モノリニュロン、エチジムロン、メタベンズチアズロン、テブチウロン、ジウロン、フェニュロン、ネブロン、シデュロン、イソウロン、クロロプロムロン、クロロトルロン、クロロクスロン、フルオメツロン、メトプロムロン、メトクスロン、チアザフルロン、モヌロン、シクルロン、モノリヌロン)、又はアミカルバゾン、ソラン、プロパニル、ベンタゾン、プロモキシニル、アイオキシニル、プロモフェノキシム、ピリデート、ピリダフォル；

- 光化学系I阻害剤(例えばジクワット又はパラコート(paraqua))；

- 細胞分裂阻害剤(例えば、カルベタミド、クロロプロファム、プロファム、ナプロアニリド、ジフェナミド、ナプロパミド、ブテナクロール、メタザクロール、ジエタチルエチル、アセトクロール、アラクロール、ブタクロール、モンサント社のプロパクロール、プロピソクロール、ジメタクロール、ジメテナミド、メトラクロール、プレチラクロール、S-メトラクロール、ペトキサミド、テニルクロール、アニロホス、カフェンストロール、インダノファン、プロモブチド、ピペロホス、フルフェナセット、メフェナセット、フェントラザミド)；

- 微小管会合阻害剤(例えばプロピザミド=プロナミド、テブタム、クロルタールジメチル=D C P A、フルクロラリン、ベンジメタリン、ブトルアリン、ベネフィン=ベンフルラリン、エタルフルラリン、オリザリン、トリフルラリン、プロジアミン、ジニトラミン、プタミホス、ジチオピル、チアゾピル)、

- プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害剤(例えばジフェニルエーテル(アシフルオルフェンナトリウム、ビフェノックス、エトキシフェンエチル、クロルニトロフェン、フルオログリコフェンエチル、オキシフルオルフェン、クロメトキシフェン、フロロジフェン、ホメサフェン、ラクトフェン、ニトロフェン、アクロニフェン)、N-フェニルフタルイミド(シニドンエチル、フルミクロラックペンチル、フルミオキサジン、フルミクロラックペンチル)、オキサジアゾール(オキサジアルギル、オキサジアゾン)、オキサゾリジンジオン(ペントキサゾン)、フェニルピラゾール(フルアゾレート、フルアゾレート、ピラフルフェンエチル)、ピリミジンジオン(サフルフェナシル、ベンズフェンジゾン、ブタフェナシル)、チアジアゾール(チアジアジミン、フルチアセットメチル)、トリアゾリノン(アザフェニジン、カルフェントラゾンエチル、スルフェントラゾン)、ピラクロニル、プロフルアゾール(profluazol)、フルフェンピルエチル)；

- アセチルC o Aカルボキシラーゼ阻害剤(例えばアリールオキシフェノキシプロピオネート(例えばクロジナホッププロパルギル、シハロホップブチル、ジクロホップメチル、フェノキサプロップPエチル、フルアジホップPブチル、ハロキシホップエトチル、

ハロキシホップメチル、ハロキシホップPメチル、プロパキザホップ、キザロホップPエチル、又はキザロホップPテフリル)、シクロヘキサンジオン(例えばアロキシジム、ブトロキシジム、クレトジム、シクロキシジム、プロホキシジム、セトキシジム、テプラロキシジム、又はトラルコキシジム)又はフェニルピラゾリン(ピノキサデン))；

- 細胞壁合成阻害剤(例えばインダジフラム、イソキサベン、クロルチアミド、ジクロロベニル、キンクロラック、又はフルボキサム)；

- グルタミンシンターゼ(シンテターゼ)阻害剤(グルホシネートアンモニウム又はピアラホス=ピラナホス)、及び

- 合成オーキシン(例えばTBA、ジカンバ、クロラムベン、ベナゾリンエチル4、ジクロロプロップ-P、メコプロップ-P、2,4,5-T(Weedar)、2,4-D(Weedar)、2,4-DB(Butyrol)、ジクロロプロップ、MCPB、メコプロップ、MCPA-チオエチル、クロメプロップ、アグロキソン4、アミノピラリド、クロピラリド、フルロキシビル、ハロウキシフェンメチル、ピクロラム、トリクロピル、キンクロラック、又はキンメラック)

からなる群より選択され、より好ましくは、4-HPPD阻害剤、カロテノイド生合成阻害剤、EPS Pシンターゼ阻害剤、光化学系II阻害剤、光化学系I阻害剤、微小管会合阻害剤、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害剤、及び合成オーキシンからなる群より選択される。

【0022】

別の非常に好ましい除草剤はALS阻害剤である。

20

【0023】

それ故、本発明は、

- テンサイ植物から単離された気孔孔辺細胞からプロトプラストを得る工程；
- インビトロの該プロトプラスト培養液に、インビトロ培養細胞(の99%超(好ましくは99.9%超、又はさらには99.99%超))に対して致死的である(しかしにくつかの突然変異体は回避することのできる)濃度で1つ以上のALS阻害剤(群)を含む組成物を適用する工程；及び
- 該インビトロ培養細胞の生き延びた細胞からテンサイ植物を再生する工程

を含む、1つ以上のアセトヒドロキシ酸シンターゼ酵素(ALS)阻害剤に対して抵抗性である突然変異テンサイ植物を產生するための方法に関し、

30

該気孔孔辺細胞プロトプラストは、テンサイ植物へのその再生能について予め選択され、及び/又は、該ALS阻害剤(群)は、2000000個を超える(好ましくは1000000個を超える、より好ましくは2000000個を超える、又はさらには500000個を超える)該プロトプラストに適用される。

【0024】

好ましくは、この方法は、種々の遺伝子型のテンサイ植物から気孔孔辺細胞プロトプラストを単離し、該プロトプラストが培養液に入れられた場合に成長している該プロトプラストの比率を各遺伝子型について測定するサブ工程を含む。

【0025】

好ましくは、この方法はさらに、有利にはALS遺伝子における突然変異を同定するために、及び/又は、ALS遺伝子に1つ以上、好ましくは1つ、2つ又はそれ以上の突然変異を有する再生されたテンサイ植物を選択するために、生き延びたインビトロ培養細胞から再生された植物のゲノムをシークエンスする工程を含む。

40

【0026】

有利には、ALS遺伝子の、グリシン112、アラニン113、メチオニン115、アルギニン133、バリン187、アルギニン190、アラニン196、フェニルアラニン197、リジン247、メチオニン346、ヒスチジン347、アルギニン368、アスパラギン酸370、アスパラギン酸371、アルギニン372、メチオニン565、バリン566、フェニルアラニン573、セリン648、及びグリシン649からなる群より選択された、好ましくは、アラニン196、アスパラギン酸371、アルギニン372、

50

セリン648及びグリシン649からなる群より選択されたアミノ酸をコードする位置に1つ又はいくつかの突然変異(群)を有するテンサイが、本発明の方法によって得られる及び/又は選択される。188位のプロリン及び569位のトリプトファンの突然変異を有する別の好ましいテンサイ植物が、本発明の方法によって得られる及び/又は選択される。

【0027】

好ましくは、2つ以上の突然変異を有するテンサイは、一方の対立遺伝子に2つの突然変異を有し、このことは、コードされたペプチドが、ALS阻害剤に対する(特に、いくつかのALS阻害剤を含む組成物に対する)抵抗性の相乗作用を起こす2つの突然変異を有することを意味する。最も好ましいテンサイの一例は、一方の対立遺伝子における188位にプロリン及び569位にトリプトファンの突然変異(及びおそらく第二の対立遺伝子において同じ突然変異；あるいは、第二の対立遺伝子は異なる突然変異を有する)を有するテンサイである。10

【0028】

あるいは、2つの突然変異を有するテンサイは、各対立遺伝子上に1つの突然変異を有する。

【0029】

本発明の方法は、ALS遺伝子においてプロリン188をコードする位置に1つの突然変異、及び、ALS遺伝子においてグリシン112、アラニン113、メチオニン115、アルギニン133、バリン187、アルギニン190、アラニン196、フェニルアラニン197、リジン247、メチオニン346、ヒスチジン347、アルギニン368、アスパラギン酸370、アスパラギン酸371、アルギニン372、メチオニン565、バリン566、トリプトファン569(好ましくはグリシンへと突然変異)、フェニルアラニン573、セリン648、及びグリシン649をコードする位置に1つ以上の突然変異(群)を有するテンサイ植物の再生を可能とする。好ましいテンサイの一例は、188位にプロリンの突然変異、及び同じ対立遺伝子に別の突然変異(おそらくトリプトファン569又はTrp569Glyではない)を有するテンサイである。20

【0030】

本発明の方法は、ALS遺伝子においてトリプトファン569(好ましくはロイシンへと突然変異)をコードする位置に1つの突然変異、及び、ALS遺伝子においてグリシン112、アラニン113、メチオニン115、アルギニン133、バリン187、プロリン188(好ましくはトレオニン、アルギニン、ロイシン、グルタミン、又はアラニンへと突然変異)、アルギニン190、アラニン196、フェニルアラニン197、リジン247、メチオニン346、ヒスチジン347、アルギニン368、アスパラギン酸370、アスパラギン酸371、アルギニン372、メチオニン565、バリン566、フェニルアラニン573、セリン648、及びグリシン649をコードする位置に1つ以上の突然変異(群)を有するテンサイ植物の產生を可能とする。好ましいテンサイの一例は、569位のトリプトファンの突然変異、及び同じ対立遺伝子に別の突然変異(おそらくプロリン188又はPro188Serではない)を有するテンサイである。30

【0031】

本発明の方法は、ALS遺伝子に1つ以上の突然変異(群)を有するテンサイ植物の再生を可能とし、1つ以上の該突然変異は、アラニン113、プロリン188、アラニン196、アスパラギン酸371、アルギニン372、トリプトファン569、セリン648、及びグリシン649からなる群より選択され、該アラニン113は、バリン又はトレオニンへと突然変異し、該プロリン188はトレオニン、アルギニン、ロイシン、グルタミン、又はアラニンへと突然変異し、該アラニン196はバリンへと突然変異し、該アスパラギン酸371はグルタミン酸へと突然変異し、該アルギニン372はヒスチジンへと突然変異し、該トリプトファン569はグリシンへと突然変異し、該セリン648はトレオニンへと突然変異し、該グリシン649はアスパラギン酸へと突然変異している。40

【0032】

50

好ましくは、これらの特定の突然変異の2つ以上を有するテンサイは一方の対立遺伝子に2つの突然変異を有し、このことはコードされたペプチドが、ALS阻害剤に対する（特にいくつかのALS阻害剤を含む組成物に対する）抵抗性の相乗作用を起こす2つの突然変異を有することを意味する。

【0033】

本発明の方法は、ALS遺伝子においてプロリン188をコードする位置に1つの突然変異、及びALS遺伝子においてトリプトファン569をコードする位置に1つの突然変異を有する、テンサイ植物の再生を可能とする。

【0034】

有利には、この方法は、該組成物（1つ以上のALS阻害剤（群）を含む）が、インビトロ培養細胞の少なくとも99%（好ましくは少なくとも99.9%又はさらには99.99%）に対して致死的（しかしいくつかの突然変異体は回避することのできる）である1つ以上のALS阻害剤（群）の濃度を推定する予備工程を含む。10

【0035】

インビトロで培養されている気孔孔辺細胞プロトプラストに加えようとする組成物（該組成物はさらに、好ましくはスルホニル尿素ALS阻害剤ではない別のクラスに由来する別のALS阻害剤、例えばチエンカルバゾンメチルを含む）に存在する好ましいALS阻害剤は、好ましくは 10^{-9} mol/lから（より好ましくは） 10^{-6} mol/lの濃度のホラムスルフロンである。20

【0036】

インビトロで培養されている気孔孔辺細胞プロトプラストに加えようとする組成物に存在する別の適切なALS阻害剤は、エトキシスルフロンである（おそらくこの組成物はさらに他のALS阻害剤を含む）。

【0037】

本発明の関連した態様は、本発明の方法によって得ることのできる突然変異テンサイ植物、例えば、トリプトファン569及び/又はプロリン188に突然変異を有するテンサイである。

【0038】

本発明の別の関連した態様は、配列番号3（又は配列番号4）及び/又は配列番号5（又は配列番号6）を含む突然変異テンサイ植物である。30

【0039】

本発明による好ましいテンサイ植物は、NCIMB42050又はNCIMB42051以下の寄託物に対応する。

【0040】

本発明はまた、本発明の突然変異植物から得られた組織又は植物部分（例えば気孔孔辺細胞又は葉の一片）又は種子、並びに、別の遺伝形質の導入のためのその使用に関する。

【0041】

本発明はまた、ALS阻害剤に対する抵抗性ではない別の遺伝形質の導入のための、本発明において生育された（良好に再生している）気孔孔辺細胞プロトプラストの使用に関する。40

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】図1は、代表的な各株の初期表現型を示す。

【0043】

発明の詳細な説明

本発明者らは、気孔孔辺細胞プロトプラストからのテンサイ植物の再生は非常に困難で、起きた頻度が低く、かつ、当技術分野において通常使用されるような外植片から得られたカルスからの直接的な再生よりもより長く複雑な手順を必要とするという事実にも関わらず、テンサイの気孔孔辺細胞からのプロトプラストが、ALS阻害剤などの除草剤に対する抵抗性を誘導するための良好な出発材料を示すことを発見した。50

【0044】

実際に、外植片からのカルス（カルス群）は、非分化（又は脱分化）細胞の塊であり、これは適切な培養条件下で分化（又は再分化）して、完全な機能的なテンサイ植物を再生するだろう。このような方法においては、大量の種子が収集され、その後、容易に滅菌され、よって外植片が大量に得られる。このような方法は、大部分の仕事を滅菌環境の困難さを伴わずに実施することを可能とするため簡便である。他方で、気孔孔辺細胞は、植物において詳細に明らかにされた組織を有し、植物組織からのその単離により個々の細胞（群）が得られ、その後、処理の後には個々のプロトプラストが得られる。本発明の方法において、小植物はインビトロで成長及び無菌条件下で維持されなければならず、その後、気孔孔辺細胞はこれらの小植物から単離され、プロトプラストが無菌条件を維持しつつ得られ、その後、これらの個々のプロトプラストはその細胞壁を再度產生し、最初にミクロカルスへと成長し、その後、テンサイ植物へと成長するように誘導される。テンサイの気孔孔辺細胞プロトプラストは、非常に脆弱であり、その適用範囲は狭められることが判明した：例えば、突然変異源の添加は、所望の遺伝形質の出現を支持するのではなく、多くの場合においてプロトプラストに対して致死的であることが判明した。別の言葉で言えば、突然変異を通して所望の遺伝形質を獲得したテンサイ植物を生育させるための出発材料として、気孔孔辺細胞プロトプラストを使用することに成功することは全くもって予想外であった。

10

【0045】

さらに、本発明者らは、気孔孔辺細胞プロトプラストの分裂能は、テンサイ遺伝子型に非常に依存していることを発見した：大半の遺伝子型の気孔孔辺細胞プロトプラストは、非常に低い（ほぼ皆無の）分裂（成長）能を示すが、いくつかの特定の遺伝子型のプロトプラストはインビトロで成長する大きな能力を有する。

20

【0046】

本発明者らは、非常に大量のこれらの気孔孔辺細胞プロトプラストの固体培地（ポリマー含有培地、例えばアルギネート又はアガロース様含有培地）上での培養、その後、培養材料（通常、再生カルスの形態の）をALS阻害剤などの除草剤に曝すことにより、この除草剤分子に対して抵抗性であるいくつかの突然変異細胞が選択されることを同定した。添加される突然変異原がなければ、自発的な突然変異は非常に稀であることが知られ、該方法は、1つ以上のALS阻害剤に対して所望の抵抗性を示す既存の突然変異植物の選択の際に、個体群内における遺伝的多様性を活用できないという事実にも関わらずである。

30

【0047】

ALS阻害剤などの除草剤に対する抵抗性を獲得したこれらの突然変異細胞のいくつかは、生存可能なテンサイ植物（群）へとさらに再生することができた。プロトプラストは実践で使用するのが非常に困難であるが、本発明の方法はそれにも関わらず、除草剤に対する抵抗性を獲得した安定な突然変異体を非常に迅速に生じた。

【0048】

本発明の方法は、1つ又いくつかの突然変異、例えばALS阻害剤などの除草剤の標的である酵素における1つ又はいくつかの突然変異（例えばALS遺伝子の突然変異、該ALS遺伝子は、シロイナズナALSの574位に相当する、ALSタンパク質の569位においてトリプトファンとは異なるアミノ酸を含有するALSタンパク質をコードする）を、おそらく、この遺伝子における少なくとも別の突然変異及び/又は他の遺伝子における他の突然変異に加えて含む、除草剤抵抗性（ALS阻害剤抵抗性）テンサイ植物の產生を可能とする。

40

【0049】

それ故、本発明の態様は、

- テンサイ植物（ALS阻害剤に対して感受性である）から単離された気孔孔辺細胞（からプロトプラスト）を得る工程；
- これらのインビトロ培養細胞に、これらのインビトロ培養細胞に対して致死的である（野生型）細胞の少なくとも99%がALS阻害剤によって死滅するが、いくつかの

50

突然変異体は処理を回避することができる)濃度で1つ以上のALS阻害剤を含む組成物を適用する工程;及び

生き延びた細胞からテンサイ植物を再生する工程

を含む、1つ以上のALS阻害剤(群)に対して抵抗性であるテンサイ植物(*Beta vulgaris*;従ってまた、ハマフダンソウ(*Beta vulgaris maritima ssp*))を产生するための方法である。

【0050】

この方法は、導入遺伝子の導入に対する代替法と見なすことができる(例えば国際公開公報第95/10178号に開示)。しかしながら、内因性遺伝子(群)の突然変異に基づいた方法は、トランスジェニックアプローチと比較するとより骨が折れる。実際に、トランスジェニック(突然変異)遺伝子の導入ははるかにより迅速で柔軟で予測可能である。10

【0051】

導入遺伝子により誘導された抵抗性がないということは、ALS阻害剤(群)に対する獲得された抵抗性は、気孔孔辺細胞プロトプラストへの(又はその得られた細胞への)(外来)DNA、例えば、ALS阻害剤(群)に対する抵抗性を直接与えるタンパク質、例えばALS阻害剤(群)の毒性を局所的に低減させるタンパク質(例えばALS阻害剤(群)を分解する又はその細胞内濃度を減少させる酵素)、又はALS阻害剤(群)に対して抵抗性であるALSタンパク質、例えば阻害剤(群)の存在下でさえ有意な活性及び機能性を維持するALS突然変異酵素をコードする(外来)DNAのインビトロでの挿入によって直接引き起こされないという事実を指す。20

【0052】

しかしながら、本発明の方法によって得られた植物をさらにトランスジェニック植物と交雑して、子孫に別の遺伝形質を積み重ねることができる。本発明によって得られた植物(又はその一部)を、その後のトランスジェニック法にさらに使用して、別の遺伝形質(本発明の方法で得られた遺伝形質とは異なる)を導入することができる。

【0053】

おそらく、この方法はさらに、突然変異原物質を、単離された気孔孔辺細胞プロトプラストの培養液に加える工程を含む。適切な突然変異原物質は、物理的(例えばUV又はX線)曝露又は化学物質(例えば0.05%、0.1%、0.15%、0.2%又はさらには2.5%の例えばメタンスルホン酸エチル(EMS))への曝露である。しかしながら、プロトプラスト生存能は、通常実施されるいくつかの突然変異誘発処理、例えば0.2%を超えるEMSによる処理などによって有害な影響を受けることが示された。30

【0054】

あるいは、この方法は、突然変異原物質を添加する工程を含まない。

【0055】

本発明の脈絡において、除草剤は好ましくは、所与の用量で適用された場合、雑草の駆除のために使用される任意の分子を指す。

【0056】

本発明の方法に使用される(この除草剤に対して抵抗性であるテンサイ植物を生育させるために)好ましい除草剤は、1つのペプチドに対して特異的な公知の活性を有する(よって、対応する遺伝子における单一の突然変異は、この除草剤に対する抵抗性を付与することができる)。別の言葉で言えば、好ましい除草剤は1つのペプチド標的にに対して特異的であり(通常、1つの植物酵素の活性を特異的に阻害する)、及び/又は、その標的ペプチドは公知である(標的遺伝子における突然変異について抵抗性テンサイが選別されるような位置にある)。40

【0057】

本発明の脈絡において、ALS阻害剤は、ALS遺伝子の機能を阻害する任意の分子を指す。

【0058】

50

好ましくは、本発明において使用されるALS阻害剤（群）は（実質的に）ALS以外の他の（テンサイ）酵素を阻害しない。

【0059】

有利には、ALS阻害剤（群）は、本発明において、野生型ALS酵素の機能の90%超（95%超、99%超、99.9%超）が阻害されるが、非関連酵素の機能に実質的に影響を及ぼさない濃度で選択及び使用される。

【0060】

適切なALS阻害剤（本発明を実施するための）は、スルホニル尿素除草剤、スルホニアミノカルボニルトリアゾリノン除草剤、イミダゾリノン除草剤、トリアゾロピリミジン除草剤、及びピリミジニル（チオ）ベンゾエート除草剤からなる群より選択される。有利には、除草剤組成物は、少なくとも1つのスルホニル尿素除草剤及び少なくとも1つのトリアゾロピリミジンを含む。好ましいALS阻害剤（本発明を実施するための）は、ホラムスルフロン、アミドスルフロン、チエンカルバゾンメチル、エトキシスルフロン、及びその混合物（特に、チエンカルバゾンメチルと、ホラムスルフロン又はアミドスルフロンのいずれかとを含む組成物）であるが；しかしながら、再生されたテンサイ突然変異体は、有利には、いくつかのALS阻害剤に対して抵抗性である。10

【0061】

他のALS阻害剤（ALS阻害剤の混合物を含む）も使用され得、当業者は、どの突然変異が所与のALS阻害剤に対して強力な抵抗性を与えるのかを知っている（例えば、569位のトリプトファンの突然変異は、ホラムスルフロンに対する抵抗性に関連していることが知られている）；従って、本発明の方法の柔軟性及び効力から、当業者は、いくつかの突然変異を獲得し、従って、ALS阻害剤（例えばALS阻害剤の混合物）などの除草剤に対してより幅広い抵抗性を有するテンサイ植物を設計することができる。20

【0062】

より好ましくは、この方法は、気孔孔辺細胞プロトプラストが完全に機能的なテンサイ植物へと再生するその能力についてテンサイ植物遺伝子型（株）を選択する予備工程を含み、及び／又は、本発明の方法は、良好に再生しているテンサイ遺伝子型（株）から単離された気孔孔辺細胞プロトプラストに対して実施される。

【0063】

適切な予備工程（その気孔孔辺細胞プロトプラストがテンサイ植物へと再生する能力についてテンサイ植物遺伝子型を選択する工程）は、その気孔孔辺細胞プロトプラストがテンサイ植物へと再生する能力について（はるかにより好ましくは、インビトロにおいて成長する及び／又はカルスを形成するその能力について）少なくとも10個の異なるテンサイ植物遺伝子型（異なる遺伝子型バックグラウンドに由来）、好ましくは少なくとも15個の異なる遺伝子型、又はさらには少なくとも30個の異なる遺伝子型の比較（収率又は寄生虫感染に対する抵抗性などのその可能性ある有利な特徴とは独立して）、及び、本発明の方法を実施するための良好に再生している遺伝子型（株）の選択を含む。30

【0064】

本発明の脈絡において、良好に再生している気孔孔辺細胞プロトプラストは、分裂して及び／又は生存可能なテンサイカルスへと成長及び／又は再生する（適切な培養培地において、かつ、本発明の方法において適用しようとする毒性分子／除草剤などの外因性の選択圧がない中で成長させた場合）0.25%を超える（成長しているプロトプラストの数：培養液に入れたプロトプラストの総数；成長数：全体数）、好ましくは1%を超える（成長数：全体数）、より好ましくは5%を超える（成長数：全体数）、さらにより好ましくは10%を超える（成長数：全体数）、又はさらには20%（成長数：全体数）若しくは50%を超える（成長数：全体数）確率を有するプロトプラストを指す。40

【0065】

カルス（カルス群）は、未分化細胞の塊を指す。当技術分野において、カルスは、胚などの外植片から、又は葉若しくは子葉などの柔組織に由来する外植片から得ることができる。しかしながら、本発明の脈絡において、カルスは、（良好に再生している）気孔孔辺50

細胞プロトプラストの成長の結果である。有利には、これらの良好に再生しているプロトプラストによって得られたカルスは、10%を超える（シートを產生しているカルスの数：カルスの総数；シート数：全体数）、好ましくは20%を超える（シート数：全体数）、又はさらには30%を超える（シート数：全体数）シートを發生する能力を有する。

【0066】

好ましくは、良好に再生しているテンサイ気孔孔辺細胞プロトプラストは、0.1%を超える（テンサイ植物：プロトプラストの総数）（より好ましくは1%を超える）生存可能なテンサイ植物への再生能を有するプロトプラストを指す。

【0067】

また好ましくは、この方法において、除草剤（例えば1つ以上のALS阻害剤（群））を含む組成物が、2000000個を超えるこれらの（良好に再生している）テンサイ気孔孔辺細胞プロトプラストのインビトロ培養液に適用される。

【0068】

あるいは、又はより好ましくはプレ選択工程に加えて、除草剤（例えば1つ以上のALS阻害剤（群））を含む組成物が、5000000個を超える、又はさらには10000000個、20000000個、又は50000000個を超えるこれらの（良好に再生している）テンサイ気孔孔辺細胞プロトプラストのインビトロ培養液に適用される。

【0069】

好ましくは、1mlあたり少なくとも50000個、例えば約100000個の（良好に再生している）気孔孔辺細胞プロトプラストを、ポリマー含有培地（例えばアルギネート又はアガロース含有培地）上で成長させた。

【0070】

おそらく、これらの（良好に再生している）テンサイ気孔孔辺細胞プロトプラストを、除草剤（例えば1つ以上のALS阻害剤（群）、例えばホラムスルフロン及びおそらくチエンカルバゾンメチル）を含む組成物の適用前に、少なくとも約1週間（好ましくは約3週間、及び／又は4週間未満）ポリマー（アルギネート）含有培地上で成長させる。

【0071】

好ましくは、この方法はさらに、ALS阻害剤を含まない培地上での、突然変異気孔孔辺細胞の成長と、野生型気孔孔辺細胞（及び／又はナイープ及び／又はまだ除草剤で処理されていない）の成長とを比較する工程、及びおそらく、対応する野生型細胞の成長の少なくとも75%、好ましくは該成長の少なくとも90%を維持する突然変異体（群）を選択する工程を含む。

【0072】

好ましくは、又は加えて、この方法はさらに、ALS阻害剤を全く含まない温室アッセイ及び農学的な条件における、突然変異細胞から再生されたテンサイの成長及び／又は収率と、野生型（及び／又はナイープ及び／又はまだALS阻害剤によって処理されていない）テンサイの成長及び／又は収率とを比較する工程、及びおそらく、野生型テンサイの成長及び／又は収率の少なくとも75%、好ましくは該成長及び／又は収率の少なくとも90%を維持するALS阻害剤抵抗性突然変異体（群）テンサイ植物を選択する工程を含む。

【0073】

好ましくは、この方法はさらに、生き延びたプロトプラストから再生された植物をシーケンスする工程、及び／又は、除草剤（例えば1つ以上のALS阻害剤（群））に対する抵抗性に関連した（関連し得る）1つ又はいくつかの突然変異（群）を同定する工程を含む。

【0074】

本発明の脈絡において、「突然変異」という用語は好ましくは、対応するアミノ酸における1つの変化を引き起こす、除草剤（例えばALSタンパク質）によって標的にされるペプチドをコードするヌクレオチド配列における1つの（1つの単一の）変化を指し、よ

10

20

30

40

50

つて、得られた植物は、ALS阻害剤などの除草剤に対して幾分の抵抗性を獲得する。別の言葉で言えば、本発明の脈絡において、「突然変異」は好ましくは、除草剤（ALS阻害剤）に対する幾分の抵抗性を可能とする「点突然変異」に等しいと理解される。従って、「いくつかの突然変異」は好ましくは、本発明において、複数の点突然変異（の積み重ね）を指し、各々の点突然変異は、コードアミノ酸の変化を引き起こして、除草剤（例えばALS阻害剤及び／又はALS阻害剤ではない除草剤）に対する幾分の抵抗性を与える。それ故、好ましくは、本発明の脈絡において、「突然変異」は、コードタンパク質を改変しないヌクレオチド配列における変化も（例えばコーディングトリプレットの第3アミノ酸の変化など）、除草剤（例えばALS阻害剤）抵抗性に関連していないアミノ酸の変化も、ヌクレオチド配列における複数の同時変化も含まない。

10

【0075】

有利には、（1つ以上の）ALS阻害剤（群）に対する抵抗性に関連した突然変異（群）（好ましくはALS遺伝子における1つ又は2つの突然変異（群））のこの同定工程は、この突然変異上に及ぶオリゴヌクレオチドプライマーの開発と連関される。

【0076】

有利には、ALS遺伝子における突然変異（群）のこの同定工程の後に、野生型によって及び突然変異ALS遺伝子によってコードされるタンパク質の（インビトロにおける）酵素活性の測定が行なわれる。

【0077】

好ましくは、野生型ALS酵素及び突然変異ALS酵素のこれらの酵素的測定は、1つ以上のALS阻害剤の存在下で（阻害曲線を得るために1つ又はいくつかの濃度で）実施される。

20

【0078】

おそらく、野生型酵素及び突然変異酵素のこれらの酵素的測定は、ALS阻害剤の非存在下で（さらに）実施される（突然変異酵素の酵素活性を比較するために；好ましくは、ALS阻害剤の非存在下で、突然変異酵素は、野生型酵素の活性の少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、さらにより好ましくは少なくとも90%、少なくとも95%、又はさらには少なくとも99%を維持する）。

【0079】

好ましくは、本発明の方法は、1つ以上のALS阻害剤を種々の濃度で含む組成物を比較する工程、及び、ALS阻害剤及び／又はこの組成物内の特定の处方のALS阻害剤が、テンサイ植物から単離された気孔孔辺細胞プロトプラストのインビトロ培養液（例えば、少なくとも1週間、アルギネート上で成長させた気孔孔辺細胞プロトプラスト）に対して致死的である濃度を推定する工程を含む。

30

【0080】

例えば、（1つ以上の）ALS阻害剤（群）が、テンサイ植物から単離された気孔孔辺細胞プロトプラストに対して致死的である濃度を推定するこの工程は、野生型テンサイ植物（及び／又はナイーブ及び／又はALS阻害剤によってまだ処理されていない）から単離された気孔孔辺細胞プロトプラストのインビトロ培養液上で実施される。

【0081】

本発明の脈絡において、（1つ以上の）ALS阻害剤（群）を含む組成物の致死的濃度は、培養細胞の少なくとも99%、好ましくは少なくとも99.9%、より好ましくは少なくとも99.99%を死滅させるに十分な（しかしいくつかの突然変異体はこの処理から回避することができる）濃度を指す。

40

【0082】

あるいは、又はさらに、（1つ以上の）ALS阻害剤（群）が、テンサイ植物から単離された気孔孔辺細胞プロトプラストのインビトロ培養液に対して致死的である濃度を推定するこの工程は、突然変異気孔孔辺細胞のインビトロ培養液上で（ALS遺伝子において突然変異を獲得し、ALS阻害剤（群）に対して抵抗性である細胞上で）（さらに）実施される。

50

【0083】

ナイーブ細胞及び突然変異細胞に対するALS阻害剤（ALS阻害剤を含む組成物における）の致死的濃度の比較は、有利には、1つの比率として表現される（又はいくつかの比率として、試験された1つのALS阻害剤あたり1つの比率として）。

【0084】

好ましくは、1つのALS阻害剤に対して、ナイーブ細胞（群）に対する致死的濃度は、突然変異細胞（群）に対する致死的濃度よりも50倍低く、より好ましくはナイーブ細胞（群）に対する致死的濃度は、突然変異細胞（群）に対する致死的濃度よりも200倍低く、さらにより好ましくはナイーブ細胞（群）に対する致死的濃度は、突然変異細胞（群）に対する致死的濃度よりも1000倍低い。

10

【0085】

除草剤（本発明の方法において使用される）は、少なくとも1つのALS阻害剤、例えばホラムスルフロンを含む（阻害剤の）混合物であり得る。

【0086】

おそらく、本発明の方法に使用されるALS阻害剤は、スルホニル尿素（例えばホラムスルフロン）などのALS阻害剤と、ヨードスルフロン、アミドスルフロン及びチエンカルバゾンメチルからなる群より選択された別のALS阻害剤との混合物である。

【0087】

好ましくは、本発明の方法に使用されるALS阻害剤は、ホラムスルフロン、例えば、アルギネート含有培地上で1週令（又は3週令）のインビトロプロトプラスト培養液（より特定すると、これらの培養されたプロトプラストから再生されたカルスを含むインビトロ培養液）に適用されたホラムスルフロンであり（又はこれを含み）、インビトロ細胞培養中に $10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/l（又は $10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/l）の濃度で維持される。

20

【0088】

本発明の関連した態様は、この方法によって得ることのできる突然変異テンサイ植物である（例えば、この方法が1つ以上の除草剤（ALS阻害剤ではない）の使用又は1つ以上のALS阻害剤の使用を含むか、或いは、1つのALS阻害剤とALS阻害剤ではない1つの除草剤の使用を含む場合）。

【0089】

それ故、本発明の1つの態様は、ALS遺伝子においてグリシン112、アラニン113、メチオニン115、アルギニン133、バリン187、アルギニン190、アラニン196、フェニルアラニン197、リジン247、メチオニン346、ヒスチジン347、アルギニン368、アスパラギン酸370、アスパラギン酸371、アルギニン372、メチオニン565、バリン566、フェニルアラニン573、セリン648、及びグリシン649からなる群より選択されたアミノ酸をコードする位置に1つ又はいくつかの突然変異（群）を有するテンサイ（本発明の方法によって得ることのできる）である。

30

【0090】

好ましいテンサイ（本発明の方法によって得ることのできる）は、ALS遺伝子においてアラニン113（例えばバリン又はトレオニンへと突然変異）、プロリン188（トレオニン、アルギニン、ロイシン、グルタミン、又はアラニンへと突然変異）、アラニン196（例えばバリンへと突然変異）、アスパラギン酸371（例えばグルタミン酸へと突然変異）、アルギニン372（例えばヒスチジンへと突然変異）、トリプトファン569（グリシンへと突然変異）、セリン648（例えばトレオニンへと突然変異）、及びグリシン649（例えばアスパラギン酸へと突然変異）からなる群より選択されたアミノ酸をコードする位置に1つ又はいくつかの突然変異（群）を有する。

40

【0091】

本発明の関連した態様は、ALS遺伝子における突然変異（コードされているALS酵素における569位（シロイナズナALS酵素の574位に相当）のトリプトファンが別のアミノ酸（例えばロイシン）によって置換されている）、及びおそらく別の（1つ又はいくつかの）突然変異、好ましくはALS遺伝子における別の（1つ又はいくつかの）突

50

然変異、例えばALS遺伝子におけるさらなるアミノ酸置換を引き起こす突然変異を含む、突然変異テンサイ植物（又は突然変異テンサイ植物細胞、例えばテンサイから単離された突然変異気孔孔辺細胞）である。

【0092】

別の好ましいテンサイ植物は、ALS遺伝子の569位においてトリプトファンからロイシンへの突然変異、及び、グリシン112、アラニン113、メチオニン115、アルギニン133、バリン187、アルギニン190、アラニン196、フェニルアラニン197、リジン247、メチオニン346、ヒスチジン347、アルギニン368、アスパラギン酸370、アスパラギン酸371、アルギニン372、メチオニン565、バリン566、フェニルアラニン573、セリン648、及びグリシン649からなる群より選択されたアミノ酸をコードする位置に1つ又はいくつかの突然変異（群）を有する。

10

【0093】

好ましいテンサイ（本発明の方法によって得ることのできる）はALS遺伝子の569位においてトリプトファンからロイシンへの突然変異という1つの突然変異、及び、アラニン113（例えばバリン又はトレオニンへの突然変異）、プロリン188（トレオニン、アルギニン、ロイシン、グルタミン又はアラニンへの突然変異）、アラニン196（例えばバリンへの突然変異）、アスパラギン酸371（例えばグルタミン酸への突然変異）、アルギニン372（例えばヒスチジンへの突然変異）、セリン648（例えばトレオニンへの突然変異）、及びグリシン649（例えばアスパラギン酸への突然変異）からなる群より選択されたアミノ酸をコードする位置に1つ又はいくつかの突然変異（群）を有する。

20

【0094】

この突然変異テンサイ植物は、使用される1つ又はいくつかのALS阻害剤（群）、例えばスルホニル尿素（例えばホラムスルフロン）、及び有利には、好ましくはヨードスルフロン、アミドスルフロン及びチエンカルバゾンメチルからなる群より選択された他のALS阻害剤（群）に対して抵抗性である。

【0095】

本発明の関連した態様は、ALS遺伝子における突然変異を含む突然変異テンサイ植物（又は、突然変異テンサイ植物細胞、例えばテンサイから単離された突然変異気孔孔辺細胞）であり、コードされているALS酵素における188位（シロイナズナALS酵素の197位に相当）のプロリンが別のアミノ酸（例えばセリン）によって置換されている。

30

【0096】

あるいは、好ましいテンサイ植物（本発明の方法によって得ることのできる）は、188位におけるプロリンからセリンへの突然変異、及び、ALS遺伝子のグリシン112、アラニン113、メチオニン115、アルギニン133、バリン187、アルギニン190、アラニン196、フェニルアラニン197、リジン247、メチオニン346、ヒスチジン347、アルギニン368、アスパラギン酸370、アスパラギン酸371、アルギニン372、メチオニン565、バリン566、フェニルアラニン573、セリン648、及びグリシン649からなる群より選択されたアミノ酸をコードする位置に1つ又はいくつかの突然変異（群）を有する。

40

【0097】

好ましいテンサイ（本発明の方法によって得ることのできる）は、ALS遺伝子の188位に1つのプロリンからセリンへの突然変異、及び、ALS遺伝子のアラニン113（例えばバリン又はトレオニンへと突然変異）、アスパラギン酸371（例えばグルタミン酸へと突然変異）、アルギニン372（例えばヒスチジンへと突然変異）、トリプトファン569（グリシンへと突然変異）、セリン648（例えばトレオニンへと突然変異）、及びグリシン649（例えばアスパラギン酸へと突然変異）をコードする位置に1つ以上の突然変異（群）を有する。

【0098】

本発明の別の関連した態様は、ALS酵素の569位にトリプトファンの突然変異、及

50

び、ALS酵素の188位のプロリンの突然変異、並びに、おそらく別の（1つ又はいくつかの）突然変異、好ましくはALS遺伝子における別の（1つ又はいくつかの）突然変異を含む、突然変異テンサイ植物（又は、突然変異テンサイ植物細胞、例えばテンサイから単離された突然変異気孔孔辺細胞）である。

【0099】

好ましくは、この突然変異テンサイ植物のALS遺伝子（の一方の対立遺伝子）は、配列番号3又は配列番号5に相当する。

【0100】

有利には、本発明の突然変異テンサイ植物は、配列番号3（一方の対立遺伝子における）及び配列番号5（第二の対立遺伝子における）を含む。 10

【0101】

おそらく、本発明の突然変異テンサイ植物は、配列番号3（一方の対立遺伝子における）及び配列番号1又は配列番号7のいずれか（第二の対立遺伝子における）を含む。

【0102】

本発明の別の関連した態様は、1つ以上の突然変異を網羅するヌクレオチドフラグメント（少なくとも20又は少なくとも25連続ヌクレオチドであるが、200未満の連続ヌクレオチド、好ましくは50未満の連続ヌクレオチドである）であり；おそらく、このフラグメントは、プライマー又はプローブ（例えば非ヌクレオチド部分によって又は放射能を使用してさらに標識されたヌクレオチドプローブ、又は、テンサイのALS遺伝子に対して外来的な核酸配列を用いて標識されたプローブを含む）として使用するためのものである。 20

【0103】

本発明のさらに別の関連した態様は、毒性分子（除草剤）に対する抵抗性を有するテンサイ植物のマーカー支援選択のための突然変異上に及ぶこのヌクレオチドフラグメントの使用である。

【0104】

実施例

比較実施例

突然変異テンサイは、当技術分野において（例えば国際公開公報第98/02527号において）、野生型テンサイ由来の外植片であるカルスにALS除草剤を添加すると成功して生成されたので、本発明者らはまず、国際公開公報第98/02527号の株から得られたテンサイ遺伝子型（株）を選択し、その気孔孔辺細胞からプロトプラストを単離した。 30

【0105】

数百万個のこれらのプロトプラスト（平均して約200万から約500万個、実験によつては1100万個まで；合計すると、ALS除草剤は、約1億5000万個のプロトプラストに適用された）が国際公開公報第95/10178号のように単離され、アルギネートを含む培養培地に入れられ、 10^{-9} から 10^{-6} mol/lのホラムスルフロンを含むMS培養培地を用いて処理された。

【0106】

本発明者らは、その後、国際公開公報第95/10178号に記載のプロトコールに従つてテンサイを再生し、ALS阻害剤から生き延びたほんの僅かなカルスを観察した。しかしながら、1つの例外を除いて、これらの再生されたカルスのいずれも、テンサイ植物へと生育することができなかった。唯一の再生されたテンサイ植物は、（ホラムスルフロンの標的酵素をコードする）ALS遺伝子における突然変異を全く示さなかった。 40

【0107】

それ故、このテンサイ株（その親株は、除草剤への（外植片に由来する）カルスの直接的な曝露に基づいて、この除草剤に対する、突然変異により誘導された抵抗性を獲得したことが示された）は、該方法が気孔孔辺細胞プロトプラストを含む場合、同じ目的に対して有用ではなかった。 50

【0108】

実施例1 良好に再生しているプロトプラストについてのテンサイ遺伝子型（株）の選択

本発明者らは、その後、気孔孔辺細胞プロトプラストからのその再生能についていくつかのテンサイ植物の遺伝子型を比較した。

【0109】

本発明者らは、約0.01%（又はさらにはそれ未満）の再生能を有する遺伝子型、及び、0.1%を（はるかに）超える再生能を有するいくつかの遺伝子型を発見した。

【0110】

本発明者らはさらに、プロトプラストの成長（インビトロにおけるその成長能及び分裂能）、成長したカルスがシートを形成する能力、及び成長しているカルスが植物を再生する割合との間の区別を確立した。 10

【0111】**【表1】**

遺伝子型	プロトプラスト/g	成長している細胞の比率	シート形成の比率	得られた植物の比率
F06R38309	1500000	0,02	55,67	3,43
F06R38313	500000	0,04	0,14	0,00
F06R38323	1000000	0,19	0,49	10,81
F07R38836	500000	0,26	10,51	0,73
REL1	1000000	0,07	70,00	44,00

表1: いくつかのテンサイ遺伝子型の比較

20

【0112】

気孔孔辺細胞プロトプラストが完全なテンサイ植物へと再生する能力を反映する数値が、概して、細胞株「REL1」についてより高かった場合、この細胞株は、本発明を実施するのに十分なほど有用ではないと判断された。

【0113】

本発明者らはさらに、「成長している細胞の比率」パラメーターは、他のパラメーターよりも本発明を実施する際にはるかにより重要であると結論付けた。

【0114】

本発明者らは、インビトロで成長することのできる0.25%を超える気孔孔辺細胞プロトプラストを有する遺伝子型を選択した。 30

30

【0115】**実施例2 除草剤によるプロトプラストの処理**

本発明者らは、比較実施例と同じアプローチを適用したが、良好に成長している気孔孔辺細胞プロトプラストに依拠した（例えば、実施例1において同定；NCIMB42050又はNCIMB42051として寄託された植物も、高い比率の成長している気孔孔辺細胞プロトプラストを有する他のテンサイ植物と同様に使用され得る）。

【0116】

合計して約6800万個の良好に成長している気孔孔辺細胞プロトプラストを、10⁻⁶M以下のホラムスルフロンを含むALS除草剤組成物を用いて処理した。

【0117】

本発明者らは46個のカルスを得た。 40

【0118】

いくつかの再生された植物は、標的遺伝子であるALS遺伝子において突然変異を；各場合において、569位のトリプトファンについてのコドンの突然変異（W569L；シリカニズナの574位のトリプトファンに相当）を示している。この突然変異体のALS遺伝子の2つの対立遺伝子は、配列番号3及び配列番号7によってコードされている。他の成長しているカルスをシークエンスし、ALS遺伝子に突然変異（他の位置における突然変異を含む）を有するが、植物へと再生しなかった。

【0119】

本発明者らはそれ故、本発明の方法は、除草剤に対する抵抗性を引き起こす突然変異を 50

生じた植物を生育させるのに非常に有用であると結論付ける。なぜなら、特に、この方法は、外来DNAの使用及び／又はALS阻害剤に対する抵抗性を付与することが既知である遺伝子配列をコードするDNAベクターの導入を含まず、僅か数か月でプラスの結果を生じたからである。

【0120】

本発明者らは、その後、この方法を繰り返し、突然変異源（0.05%から0.2%のEMS）をプロトプラストにさらに適用して、突然変異の数を増加させた。

【0121】

実施例3 ALS阻害剤によるテンサイの処理

本発明者らは、突然変異した配列番号3（この突然変異についてヘテロ接合型）を有する再生されたテンサイと、野生型（ナイーブ）テンサイの商業品種の挙動を比較した。（ヘテロ接合型）突然変異品種は、除草剤を有機化合物（25g/haの菜種油メチルエステル）と組み合わせてその効果を高めた場合にさえも、ホラムスルフロン（12.5g/ha；3回までの適用）に対する良好な抵抗性を示した。予想された通り、野生型（ナイーブ）植物は、最初の適用後さえも、ホラムスルフロンに対して非常に感受性であった。

10

【0122】

同じ実験を、アミドスルフロン（15g/ha）を使用して実施し、突然変異植物において同レベルの抵抗性を生じた。他方で、野生型（ナイーブ）植物は、特に有機化合物と組み合わせた場合、及び／又はアミドスルフロンの数回の適用後に、アミドスルフロンに対して非常に感受性であった。

20

【0123】

同じ実験をヨードスルフロン（3.5g/ha）を使用して実施し、ヨードスルフロンを添加した場合に突然変異植物において良好なレベルの抵抗性を示したが、その抵抗性はヨードスルフロンを、有機化合物と一緒に適用する場合に下降した。予想された通り、野生型（ナイーブ）植物は、有機化合物を伴わずに1回適用した後でさえ、ヨードスルフロンに対して非常に感受性であった。

30

【0124】

同じ実験を7.5g/haのチエンカルバゾンメチルを使用して実施し、突然変異植物においてヨードスルフロンとほぼ同じレベルの抵抗性を生じた。野生型（ナイーブ）植物は、試験された全ての濃度で有機化合物の添加に関わらず、チエンカルバゾンメチルに対して非常に感受性であった。

【0125】

本発明者らは、野生型と比較することにより、配列番号3（ブダペスト条約NCIMB42051で寄託）を含む突然変異テンサイ植物はホラムスルフロンに対する最善の抵抗性を与えると結論する。

【0126】

本発明者らはさらに、この（ヘテロ接合型）突然変異植物がさらに、他の化学分類に属する阻害剤に対するものを含む、他のALS阻害剤に対する幾つかの（部分的ではあるが）抵抗性を獲得したと結論する。

40

【0127】

実施例4 ALS阻害剤による、ALS遺伝子にさらなる突然変異を有するテンサイの処理

【0128】

本発明者らは、その後、配列番号3及び配列番号5（2つの異なる対立遺伝子上の）を含む突然変異テンサイ植物を生育した。このような生じた二重突然変異体は、ブダペスト条約によるNCIMB42050として寄託された。配列番号3及び配列番号5の両方を含む植物は、例えば、単一突然変異体NCIMB42051に適用されたその後の突然変異誘発工程を含む、いくつかの技術に依拠することによって生成され得る。

【0129】

本発明者らはその後、この二重突然変異体植物（一方の対立遺伝子のアミノ酸569に

50

おける突然変異、及び他方の対立遺伝子のアミノ酸 188 における突然変異)と、単一突然変異体(569位における突然変異)テンサイの抵抗性を比較した。

【0130】

二重突然変異体植物株は、実施例3のように全ての抵抗性特徴を少なくとも維持し、また、有機化合物と共に組成物に入れられた場合にさえ、チエンカルバゾンメチルによる処置に対する及びアミドスルフロンによる処置に対する良好な抵抗性(野外散布に適応する)を獲得した。それ故、この二重突然変異体植物は、単一突然変異体植物(ALS遺伝子における569位における)に帰する抵抗性との比較により、いくつかのALS阻害剤に対する改善された、相乗的な抵抗性を示す。

【0131】

実施例5 温室試験：直接比較のための、ALS阻害剤による種々のテンサイの処理

【0132】

本発明による配列番号3及び配列番号5(2つの異なる対立遺伝子上)を含む突然変異テンサイ植物(上記の実施例4に記載のような「A株」)を、テンサイ植物(コードされているALS酵素の569位のトリプトファンがロイシンによって置換されている「B株」)、国際公開公報第98/02527号に記載のテンサイ植物(コードされているALS酵素の188位置のプロリンがセリンによって置換されている「C株」)、及び569位及び188位に突然変異を有さない伝統的な品種の(野生型)テンサイ植物('WT株')との直接比較のために、種々のALS阻害剤を用いて処理した。

【0133】

4つの異なる記載されたテンサイ植物のいくつかの群の種子を温室に別々に蒔き、研究書「Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen」, 2nd edition, 2001, ed. Uwe Meier, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaftに従って、Beta vulgaris L. ssp. vulgarisについてBBC H 14のステージまで(すなわち4つの葉(第二の対)が折り畳まれていない)成長させた。続いて、得られた別々の群のテンサイ植物を、各々個々に、表2で示された量(g/ha)のALS阻害剤(ALS-in)を用いて処理した。

【0134】

それぞれのALS阻害剤を適用した後14日目に、各テンサイ植物についての傷害(すなわち植物毒性)を、0%(すなわち傷害なし、植物毒性なし)から100%(すなわち植物は完全に死滅した)までの尺度で格付けした。各植物群についての平均格付けも、表2に示されている。

【0135】

【表2】

表2:

ALS阻害剤	ALS阻害剤 g/ha	A株	B株	C株	WT株
ホラムスルフロン	13	26.9%	45.6%	77.5%	80.0%
ヨードスルフロン メチル Na	3.5	22.5%	38.8%	80.0%	82.5%
アミドスルフロン	15	6.3%	37.5%	51.9%	73.1%
チエンカルバゾン メチル	7.5	8.1%	35.6%	37.5%	84.4%
ビスピリバック Na	50	17.5%	38.1%	71.7%	80.0%
メトラム	15	13.1%	40.6%	69.4%	79.4%

【0136】

10

20

30

40

50

さらに、各テンサイ植物の典型的な初期表現型を、チエンカルバゾンメチル及びホラムスルフロンを含む混合物を用いての処理後に検査した。代表的な各株の初期表現型を図1に示す(図1)。

【0137】

図1はまた、本発明によるテンサイ植物(「A株」)がALS阻害剤に対する改善された抵抗性を示し、すなわち、優れた成長及びより少ない植物毒性作用が他の初期表現型と比較して観察されたことを実証する。

【0138】

実施例6 野外試験：直接比較のための、ALS阻害剤による種々のテンサイの処理

【0139】

【表3】

表3:

		Sensitive	574 hetero	574&197	574 homo
1	非処理	0	0	0	0
2	AE F 130360 00 WG50 A1 25g/Ha (ホラムスルフロン)	97	22	5	0
3	BYH18636 15 g/Ha (チエンカルバゾン)	97	39	5	0
4	ae f115008 00 wg 10 a2 7g/Ha (ヨードスルフロン)	98	65	23	28
5	AE F130060 00 WG75 A2 60 g/Ha (メソスルフロン)	91	24	18	0
6	HOESTAR 30 g/Ha (アミドスルフロン)	97	34	0	0
7	AEF095404 00 WG60 A2 60 g/Ha (エトキシスルフロン)	99	39	0	0
8	RAPTOR 40 g/Ha (イマザモックス)	98	44	35	8
9	TACCO 30 g/Ha (メトラム)	97	27	0	3
10	NOMINEE 50 g/Ha (ビスピリバッカ)	98	78	70	28
11	MOTIVELL 60 g/Ha (ニコスルフロン)	98	53	28	13
12	GROPPER SX 8 g/Ha (メトスルフロン)	100	74	50	35
13	LEXUS 50 DF 10 g/Ha (フルピルスルフロン)	70	0	0	0
14	ATTRIBUT 70 g/Ha (プロポキシカルバゾン)	91	25	0	5
15	SIMPLICITY 50 g/Ha (ピロキシスラム)	97	45	28	0
16	PRIMUS 10 g/Ha (フロラスラム)	99	55	38	0
17	POINTER SX 30 g/Ha (トリベヌロン)	98	74	28	20
18	CATO 13 g/Ha (リムスルフロン)	68	8	0	0
19	MONITOR 80 WG 10 g/Ha (スルホスルフロン)	93	23	0	0
20	DEBUT YX1 15 g/Ha (トリフルスルフロン)	0	0	0	0
21	EVEREST 40 g/Ha (フルカルバゾン)	93	18	0	0
22	HARMONY 7.5 g/Ha (チエンスルフロン)	98	39	0	0
23	2番及び3番(ホラムスルフロン+チエンカルバゾン) 1L/Ha	100	65	35	5

表3: テンサイ植物に対するALS阻害剤の効果。数値は、測定された傷害の平均比率を示す。

【0140】

本発明者らは、雑草の破壊を可能とする用量で市販の組成物を試験した。

【0141】

感受性対照(すなわち、ALS遺伝子において突然変異を全く有さないテンサイ)は、1つを除く全ての除草剤によって死滅した。本発明者らは、コントロールの(非処理)植物への小さな傷害を測定し、傷害は時に35%又はさらには40%にまで達した。これらの「傷害」はこの野外試験の農業条件を反映する。

【0142】

他方で、569(574)位にヘテロ接合体を有するテンサイ植物は、いくつかの除草剤組成物に対して部分的に抵抗性となった。両方の対立遺伝子上に569突然変異(574)を取り込み、従って(569/569)ホモ接合体である植物は、さらに増加した抵抗性を有する:僅か7つの除草剤組成物が中程度の毒性である(5%から35%)。

【0143】

10

20

30

40

50

A L S 遺伝子の一方の対立遺伝子の 5 6 9 (5 7 4) 位に突然変異、及び A L S 遺伝子の第二の対立遺伝子の 1 8 8 (1 9 7) 位に突然変異を取り込んだテンサイ植物もまた、改善された抵抗性を獲得した。なぜなら、9 個の除草剤組成物が中程度に毒性であり、僅か 3 つが極めて毒性であるからである。驚くべきことに、A L S 阻害剤に対して強力な抵抗性を与える突然変異 (5 6 9) がなく、弱い抵抗性しか与えない突然変異 (1 8 8) が付加されたこのような植物は、3 つの異なるこの野外試験の条件において、ホモ接合体 (5 6 9 / 5 6 9) 植物よりもさらにより良好な抵抗性を与える。

【 0 1 4 4 】

【表4】

PCT

プリントアウト(電子書面の原本)
(この用紙は、国際出願の一部ではなく、国際出願の一枚とは数えない)

0-1	書面 PCT/RO/134 (SAFE) 寄託微生物又は他の生物材料に 関する表示 (PCT 規則 13bis)		
0-1-1	右記を使用して準備	PCT オンライン出願 バージョン 3.5.000.235 MT/FOP 20020701/0.20.5.20	10
0-2	国際出願番号	PCT/EP2013/076618	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	BPSESS0010PC	
1	以下になされた表示は、明細書に言及 された寄託微生物又は他の生物材料に 関する：		
1-1	段落番号	8	
1-3	寄託の確認	NCIMB NCIMB Ltd.	
1-3-1	寄託機関名		
1-3-2	寄託機関の住所	Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, United Kingdom	
1-3-3	寄託日	2012年9月24日 (24.09.2012)	20
1-3-4	アクセスションナンバー	NCIMB 42050	
1-4	追加の表示	段落 39, 114, 124, 127	
1-5	表示が行なわれる指定国	全ての指定国	
2	以下になされた表示は、明細書に言及 された寄託微生物又は他の生物材料に 関する：		
2-1	段落番号	8	
2-3	寄託の確認	NCIMB NCIMB Ltd.	
2-3-1	寄託機関名		
2-3-2	寄託機関の住所	Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, United Kingdom	30
2-3-3	寄託日	2012年9月24日 (24.09.2012)	
2-3-4	アクセスションナンバー	NCIMB 42051	
2-4	追加の表示	段落 39, 114, 124, 127	
2-5	表示が行なわれる指定国	全ての指定国	

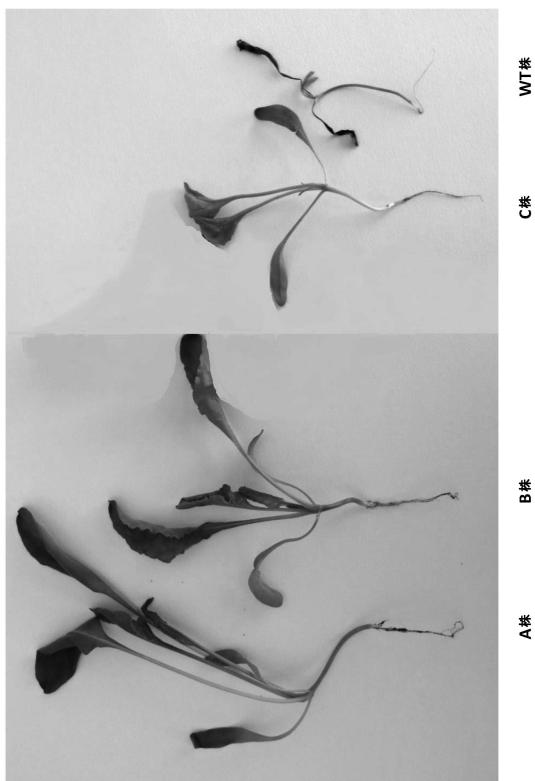
受理官庁のみが使用する欄

0-4	この書面は、国際出願により受理 された： (はい又はいいえ)	はい	
0-4-1	特許庁審査官	Aoustin, Isabelle	40

国際事務局のみが使用する欄

0-5	この書面は、国際事務局によって受理 された：	
0-5-1	担当官	

【図1】



【配列表】

0006276780000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 0 1 N 43/54 (2006.01) A 0 1 N 43/54 D

微生物の受託番号 NCIMB NCIMB42051

(72)発明者 ハイン , リューディガー
ドイツ国、6 0 5 9 4 フランクフルト、ドライアイヒシュトラーセ 4 4

(72)発明者 ヨハン , ゲルハルト
ドイツ国、5 1 3 9 9 ブルシャイト、ビュルガーマイスター - シュミット - シュトラーセ 2 4

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 特表2 0 1 3 - 5 4 2 7 2 5 (J P , A)
特表平0 9 - 5 0 3 6 6 8 (J P , A)
特表平1 1 - 5 1 3 8 9 5 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
A 0 1 H 1 / 0 0 , 5 / 0 0
A 0 1 N 4 3 / 0 0
C 1 2 N 5 / 0 4 , 1 5 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s (J D r e a m I I I)
U n i P r o t / G e n e S e q