

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 031973

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2019.03.29

(21) Номер заявки

201591130

(22) Дата подачи заявки

2013.12.13

(51) Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)

A01H 3/04 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

A01H 5/06 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, УСТОЙЧИВЫХ К ГЕРБИЦИДАМ

(31) 12196858.0; 61/736,817

(32) 2012.12.13

(33) EP; US

(43) 2015.11.30

(86) PCT/EP2013/076618

(87) WO 2014/091021 2014.06.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

СЕСВАНДЕРХАВЕ Н.В. (BE)

(72) Изобретатель:

Вейенс Ги, Лефебвр Марк (BE), Хайн Рюдигер, Иоганн Герхард (DE)

(74) Представитель:

Харин А.В., Котов И.О., Буре Н.Н.
(RU)

(56) WO-A1-2012049268

WO-A1-2012049266

HALL R.D. ET AL.: "SUGAR BEET GUARD CELL PROTOPLASTS DEMONSTRATE A REMARKABLE CAPACITY FOR CELL DIVISION ENABLING APPLICATIONS IN STOMATAL PHYSIOLOGY AND MOLECULAR BREEDING", JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 48, no. 307, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 255-263, XP000893145, ISSN: 0022-0957, DOI: 10.1093/JXB/48.2.255, abstract, page 262, left-hand column, line 23-35

GUREL EKREM ET AL.: "Biotechnology applications for sugar beet", CRITICAL REVIEWS IN PLANT SCIENCES, vol. 27, no. 2, 2008, pages 108-140, XP009167608, DOI: 10.1080/07352680802202000, abstract, page 116, left-hand column, line 30 - right-hand column, line 6, page 117, left-hand column, line 37-54

WO-A1-9510178

Dyer, Hess, Holt and Duke: "Potential Benefits and Risks of Herbicide-Resistant Crops Produced by Biotechnology" In: "Horticultural Reviews", 1993, John Wiley & Sons, XP002693215, ISBN: 978-0-471-57338-8, vol. 15, pages 367-408, page 379, line 6-19

REY P. ET AL.: "ATRAZINE AND DIURON RESISTANT PLANTS FROM PHOTOAUTOTROPHIC PROTOPLAST-DERIVED CULTURES OF NICOTIANA-PLUMBAGINIFOLIA", PLANT CELL REPORTS, vol. 9, no. 5, 1990, pages 241-244, XP009167607, ISSN: 0721-7714, abstract, page 241, left-hand column, line 33 - right-hand column, line 7

HORIKOSHI MAMORU ET AL.: "Selection of tobacco cell lines resistant to photobleaching herbicides", JOURNAL OF PESTICIDE SCIENCE, vol. 24, no. 1, 1999, pages 13-16, XP009167605, ISSN: 0385-1559, abstract, page 13, right-hand column, line 16-23

TAN S. ET AL.: "IMIDAZOLINONE-TOLERANT CROPS: HISTORY, CURRENT STATUS AND FUTURE", PEST MANAGEMENT SCIENCE, WILEY & SONS, BOGNOR REGIS, GB, vol. 61, no. 3, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 246-257, XP009058795, ISSN: 1526-498X, DOI: 10.1002/PS.993, abstract, tables 1, 2

DUGGLEBY ET AL.: "Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase", PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, GAUTHIER-VILLARS, PARIS, FR, vol. 46, no. 3, 14 January 2008 (2008-01-14), pages 309-324, XP022550175, ISSN: 0981-9428, abstract, table 1

DUGGLEBY R.G. ET AL.: "ACETOHYDROXYACID SYNTHASE", JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, KOREAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, KR, vol. 33, no. 1, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 1-36, XP001119823, ISSN: 1225-8687, abstract, table 1

WO-A1-2012150335

EP-A2-0257993

(57) Способ получения устойчивого к гербицидам растения сахарной свеклы, включающий стадии получения протопластов из замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы; применения в отношении клеток композиции, содержащей гербицид ALS в концентрации, которая является смертельной для указанных клеток; и регенерации растений сахарной свеклы из выживших клеток.

B1

031973

031973 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения растений сахарной свеклы, устойчивых к гербицидам, например ингибитору(ам) фермента синтазы ацетогидроксикислоты (ALS).

Настоящее изобретение также относится к растениям, которые получают при помощи этого способа.

Сахарная свекла представляет собой важную сельскохозяйственную культуру в умеренных и субтропических областях.

В современном сельском хозяйстве гербициды широко используются для того, чтобы контролировать размножение сорняков.

Выведение растений сахарной свеклы, устойчивых к гербициду(ам), таким как ингибиторы ALS, может быть осуществлено путем использования трансгенных подходов.

Действительно, введение чужеродной ДНК, несущей ген, придающий устойчивость в отношении гербицида, успешно проводили в различных полевых культурах, включая сахарную свеклу.

В WO 95/10178 раскрыта трансгенно-индукционная устойчивость к гербициду биалафосу. Ген, кодирующий устойчивость, вводят в протопласты замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы, затем эти протопласти регенерируют в растения сахарной свеклы. Эти растения также устойчивы к химическому фосфинотрицину и его производному глюфосинату. Не трансформированные растения не приобретают устойчивость к биалафосу.

В лучшем случае, 28 трансформированных каллусов регенерировали из 83000 протопластов; в худшем случае, 1 каллус регенерировал из 190000 протопластов. Впоследствии, некоторые из этих каллусов могли демонстрировать соматический эмбриогенез и растения сахарной свеклы могли регенерироваться с эффективностью, составляющей 1% и обнаруженной весьма благоприятной характеристикой до 30%.

Тем не менее, этот подход обычно не используется в области техники, в которой более широко используется более прямая трансформация каллусов из эксплантов, полученных из органов сахарной свеклы, таких как зародыши и/или диски листочка.

Все же сохраняется важная потребность в выведении устойчивых к гербицидам растений, таких как среди сельскохозяйственной культуры сахарной свеклы, и которые не основаны на векторах ДНК и/или на внедрении чужеродных генов.

С другой стороны, выведение растения сахарной свеклы, устойчивой к гербициду(ам), таким как ингибиторы ALS, теоретически может быть осуществлено при помощи классического скрещивания с растением сахарной свеклы, естественным образом содержащим ген устойчивости. Тем не менее, такой подход требует затрат времени и, в соответствии с имеющимися у авторов изобретения сведениями, не приводит в результате к успеху, несмотря на тот факт, что имеется информация о встречающихся в природе растениях, устойчивых к ингибитору ALS, по меньшей мере, для видов, отличающихся от сахарной свеклы, включающих различные виды сорняков. В особенности, весьма маловероятно, что двойной мутант (т.е. растение, имеющее две мутации в одном и том же гене ALS) встречается в природе.

В заявке на патент WO 98/02527 раскрыт способ получения растения сахарной свеклы, устойчивого к некоторым ингибиторам ALS, таким как гербициды на основе сульфонилмочевины, при котором осуществляют стадии воздействия сульфонилмочевиной на каллусы, полученные из эксплантов *B. vulgaris*, и регенерации растений из немногих спонтанных мутантов, которые могут расти в присутствии этого гербицида.

Этот способ позволяет получать растение, имеющее мутацию в гене ALS, где пролин в позиции 188 кодируемого фермента ALS (соответствующей позиции 197 фермента ALS *Arabidopsis thaliana*) заменен на серин. Тем не менее, этот мутант не используется коммерчески, поскольку обработка предпочтительными современными гербицидами ALS на основе сульфонилмочевины (например, форамсульфуроном) демонстрируют некоторую фитотоксичность в полевых исследованиях при необходимом уровне дозы.

Заявка на патент WO 2012/049268 основана на том же самом способе за исключением того, что каллусы, полученные из эксплантов *B. Vulgaris*, подвергают воздействию форамсульфуроном, и, таким образом, они приводят в результате к растению сахарной свекле, устойчивой к нескольким ингибиторам ALS, включающим форамсульфурон.

Этот способ позволяет получать растение, имеющее мутацию в гене ALS, где триптофан в позиции 569 кодируемого фермента ALS (соответствующей позиции 574 в ферменте ALS *Arabidopsis thaliana*) заменен на лейцин.

Полевые исследования этого гомозиготного мутанта 569/569 продемонстрировали хорошую устойчивость к форамсульфурону, к йодосульфурону (еще один ингибитор ALS), а также к смесям различных ингибиторов ALS.

Оба этих опубликованных метода имеют выгоду хорошо известных стадий выделения каллусов из отдельных эксплантов, таких как эмбрионы. Тем не менее, этот подход представляет собой подход, отнимающий много времени, включающий (1) выделение большого количества свежих эмбрионов, (2) их повторное выращивание на культуральной среде с затвердевшим агаром и (3) выбор регенерируемых каллусов с использованием подходов морфологического отбора.

Разработаны другие стратегии переноса генетических признаков сахарной свекле, основанные на протопластах мезофилла (которые отличаются от протопластов замыкающих клеток устьиц) в качестве исходного материала (Krens et al., 1990, Theor. appl. Genet., vol. 79, с. 390-396).

В Gurel et al. 2008, Critical reviews in Plant Science, 27, 108-140, раскрыты биотехнологические применения сахарной свеклы. Раскрыты семь различных способов культивирования *in vitro*. Среди них используют культуру протопластов из замыкающих клеток устьиц для задач трансформации, или из рыхлого каллуса из этиолированных эксплантатов гипокотиля, причем последние являются гораздо более эффективными. Тем не менее, этот подход с использованием протопластов ассоциируется со значительными трудностями.

В Hall et al. 1997, J. Exp. Botany, 48, 255-263 используется культура 500000 протопластов замыкающих клеток устьиц для проведения эксперимента по трансформации чужеродной ДНК. Эффективность трансформации была больше 2%. С другой стороны сообщали о том, что выращивание растений *in vitro* сопровождается неудачей в случае устьиц, свидетельствуя о проблемах с соответствующими клетками, и, таким образом, получают очень большое количество протопластов замыкающих клеток устьиц, таких как количества, необходимые для осуществления способа, включающего наличие мутации.

Краткое описание изобретения

В широком аспекте, в настоящем изобретении раскрыт способ получения мутантного растения сахарной свеклы, устойчивого к гербициду, при котором осуществляют стадии

получения протопластов из замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы; применения в отношении культуры *in vitro* указанных протопластов композиции, содержащей указанный гербицид в концентрации, которая является смертельной для более чем 99% культивируемых *in vitro* клеток; и

регенерации растений сахарной свеклы из выживших указанных культивируемых *in vitro* клеток, возможно отбор регенерированных растений сахарной свеклы, имеющих мутацию в гене, кодирующем пептид(ы), являющийся мишенью указанного гербицида,

при этом указанные протопласти замыкающих клеток устьиц предварительно отбирают по их способности регенерировать в растение сахарной свеклы, и при этом указанный гербицид применяют в отношении более чем 20000000 из этих протопластов.

Гербицид, используемый в способе по настоящему изобретению, может представлять собой гербицид, не направленный против гена ALS.

Предпочтительные гербициды (не направленные против ALS) выбирают из группы, состоящей из ингибиторов 4-HPPD (4-гидроксифенилпирватдиоксигеназа) (таких как мезотрион, изоксафлутол, пирасульфотол, бензобициклон, бензофенап, пиразолинат, пиразоксилен, темботрион, топрамезон, сулькотрион и сулькотрион), ингибиторов биосинтеза каротеноидов (таких как флуртамон, флуридон, флуорхлоридон, бефлубутамид, норфлуразон, николинаfen и дифлуфеникан);

ингибиторов синтазы EPSP (5-енолпирувилшикимат-3-фосфат) (таких как глифосат или глифосат-тримезиум);

ингибиторов фосфосистемы II (таких как фенилкарбаматы) (например, фенмедифам или десмеди-фам), пиридазинонов (например, хлоридазон=пиразон), триазинов (например, цианазин, ремтал, эглиназин-этил, проглиназин-этил, аметрин, атразин, десметрин, диметаметрин, прометон, прометрин, пропазин, симазин, симетрин, тербутилон, тербутилазин, тербутирин, метопротрин), триазинонов (например, метамитрон, метрибузин, гексазинон, метрибузин), урацилов (бромацил, ленацил, тербацил), мочевин (димефурон, изопротурон, линурон, монолинурон, этидимурон, метабензтиазуруон, тебутиурон, диурон, фенуuron, небуруон, сидуруон, изоуруон, хлорбромуруон, хлоротолуруон, хлороксурон, флуометуруон, метабромуруон метоксурон, тиазафлурон, могурон, циклурон, монолинурон) или амикарбазона, солана, пропанила, бентазона, бромоксилила, иоксилила, бромофеноксима, пиридата, пиридафола;

ингибиторов фосфосистемы I (таких как дикват или параква);

ингибиторов клеточного деления (таких как карбетамид, хлорпрофам, профам, напроанилид, дифенамид, напропамид, бутенахлор, метазахлор, дизатил-этил, ацетохлор, алахлор, бутахлор, пропахлор монсанто, прописохлор, диметахлор, диметенамид, метолахлор, претилахлор, S-метолахлор, петоксамид, тенилхлор, анилофос, кафенстрол, инданофан, бромобутид, пиперофос, флуфенацет, мефенацет, фентранзамид);

ингибиторов сборки микротрубочек (таких как пропизамид=пронамид, тебутам, хлорталдиметил=DCPA, флюхлоралин, пендиметалин, бутралин, бенефин=бенфлуралин, эталфлуралин, оризалин, трифлуралин, продиамин, динитрамин, бутамифос, дитиопир, тиазопир);

ингибиторов протопорфириноген оксидазы (таких как дифениловые эфиры (ацифлуорфен-натрий, бифенокс, этоксифен-этил, хлорнитрофен, флуорогликофен-этил, оксифлуорфен, хлометоксифен, флуордифен, фомезафен, лактофен, нитрофен, аклонифен), N-фенилфталимида (цинидон-этил, флумиклорак-пентил, флумиклорак-пентил), оксациазолы (оксадиаргил, оксациазон) оксазолидиндионы, (пентоксазон), фенилпиразолы (флуазолат, флуазолат, пирафлуор-этил), пирамидиндиионы (сафлufenацил, бензфендин, бутафенацил), тиадиазолы (тидиазимин, флутиацет-метил), триазолиноны (азафенидин, карфентразон-этил сульфентразон), пираклонил, профлуазол, флуфенпир-этил);

ингибиторов ацетил КоA карбоксилазы (таких как арилоксиfenоксипропионаты (такие как клодинафоп-пропаргил, цигалофоп-бутил, диклофоп-метил, феноксапроп-Р-этил, флуазифоп-Р-бутил, галоксифоп-этотил, галоксифоп-метил, галоксифоп-Р-метил, пропаквизафоп, квазалофон-Р-этотил или квазалофон-Р-тефурил), циклогександионы (такие как аллоксидим, бутроксидим, клетодим, циклоксидим, профоксидим, сетоксидим, тетраплоксидим или траллоксидим) или фенилпиразолин (пиноксаден));

ингибиторов синтеза клеточной стенки (таких как индазифлам, изоксабен, хлортиамид, дихлобенил, квинклорак или флуопексам);

ингибиторов глутамин синт(ет)азы (глюфосинат-аммоний или биалафос=биланафос) и синтетического ауксина (такого как ТВА, дикамба, хлорамбен, беназолин-этил 4, дихлорпроп-Р, мекопроп-Р, 2,4,5-T (Weedar) 2,4-D (Weedar), 2,4-DB (бутиrol), дихлорпроп, МСРВВ, мекопроп, МСРВ-тиоэтил, кломе-проп, агроксон 4, аминопирилид, клопирилид, флуоксицир, галауксифен-метил, пиклорам, триклопир, хинклорак или хинмерак), более предпочтительно, из группы, состоящей из ингибиторов 4-HPPD, ингибиторов биосинтеза каротиноидов, ингибиторов синтазы EPSP, ингибиторов фосфосистемы II, ингибиторов фосфосистемы I, ингибиторов сборки микротрубочек, ингибиторов протопорфирина оксидазы и синтетического ауксина.

Еще один весьма предпочтительный гербицид представляет собой ингибитор ALS.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения мутантного растения сахарной свеклы, устойчивой к одному или более чем одному ингибитору(ам) фермента синтазы ацетогидроксикислоты (ALS), включающему стадии

получения протопластов из замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы;

применения в отношении культуры *in vitro* указанных протопластов композиции, содержащей один или более ингибитор ALS в концентрации,

которая является смертельной в отношении более чем 99% (предпочтительно более чем 99,9% или даже более чем 99,99%) культивируемых *in vitro* клеток (даже позволяя некоторым мутантам приобрести устойчивость); и

регенерации растений сахарной свеклы из выживших указанных культивируемых *in vitro* клеток,

при этом указанные протопласти замыкающих клеток устьиц предварительно отбирают по их способности регенерировать в растение сахарной свеклы и/или где указанный(е) ингибитор(ы) ALS применяют для более 2000000 (предпочтительно более 10000000, более предпочтительно для более 20000000 или даже более 50000000) указанных протопластов.

Предпочтительно способ включает подстадии выделения протопластов замыкающих клеток устьиц из растений сахарной свеклы различных генотипов и измерения для каждого генотипа доли указанных протопластов, растущих при помещении указанных протопластов в культуру.

Предпочтительно способ дополнительно включает стадию секвенирования генома регенерированных растений из жизнеспособных культивируемых *in vitro* клеток, преимущественно для идентификации мутации в гене ALS и/или для отбора регенерированных растений сахарной свеклы, имеющих одну или несколько, предпочтительно одну, две или несколько мутаций в гене ALS.

Примущественно, растение сахарной свеклы, имеющую одну или несколько мутаций в гене ALS в позициях, кодирующих аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из глицина 112, аланина 113, метионина 115, аргинина 133, валина 187, аргинина 190, аланина 196, фенилаланина 197, лизина 247, метионина 346, гистидина 347, аргинина 368, аспартата 370, аспартата 371, аргинина 372, метионина 565, валина 566, фенилаланина 573, серина 648 и глицина 649, предпочтительно выбранные из группы, состоящей из аланина 196, аспартата 371, аргинина 372, серина 648 и глицина 649, получают и/или отбирают при помощи способа по настоящему изобретению.

Еще одно предпочтительное растение сахарной свеклы, имеющую мутацию пролина в позиции 188 и триптофана в позиции 569, получают и/или отбирают при помощи способа по настоящему изобретению.

Предпочтительно растение сахарной свеклы, имеющее две или несколько мутаций, имеет две мутации в одной аллели, т.е. кодируемый пептид содержит две мутации, оказывающие синергическое действие в отношении устойчивости к ингибиторам ALS (особенно в отношении композиций, содержащих несколько ингибиторов ALS). Примеры наиболее предпочтительного растения сахарной свеклы представляют собой сахарную свеклу, имеющую мутацию пролина в позиции 188 и триптофана в позиции 569 в одной аллели (и, возможно, те же самые мутации во второй аллели; альтернативно, вторая аллель содержит различные мутации).

Альтернативно, сахарная свекла, имеющая две мутации, имеет одну мутацию в каждой аллели.

Способ по настоящему изобретению позволяет регенерировать растению сахарной свеклы, имеющему одну мутацию в гене ALS в позициях, кодирующих пролин 188, и одну или несколько мутаций в гене ALS в позициях, кодирующих глицин 112, аланин 113, метионин 115, аргинин 133, валин 187, аргинин 190, аланин 196, фенилаланин 197, лизин 247, метионин 346, гистидин 347, аргинин 368, аспартат 370, аспартат 371, аргинин 372, метионин 565, валин 566, триптофан 569 (предпочтительно мутирован в глицин), фенилаланин 573, серин 648 и глицин 649. Примеры предпочтительного растения сахарной свеклы представляют собой сахарную свеклу, имеющую мутацию пролина в позиции 188 и еще одну

мутацию (возможно не триптофан 569 или Trp569Gly) в той же самой аллели.

Способ по настоящему изобретению позволяет регенерировать растению сахарной свеклы, имеющему одну мутацию в гене ALS в позиции, кодирующей триптофан 569 (предпочтительно мутирован до лейцина) и одну или несколько мутаций в гене ALS в позициях, кодирующих глицин 112, аланин 113, метионин 115, аргинин 133, валин 187, пролин 188 (предпочтительно мутированы до треонина, аргинина, лейцина, глутамина или аланина), аргинин 190, аланин 196, фенилаланин 197, лизин 247, метионин 346, гистидин 347, аргинин 368, аспартат 370, аспартат 371, аргинин 372, метионин 565, валин 566, фенилаланин 573, серин 648 и глицин 649.

Примеры предпочтительного растения сахарной свеклы представляют собой сахарную свеклу, имеющую мутацию триптофана в позиции 569 и еще одну мутацию (возможно не пролин 188 или Pro188Ser) в той же самой аллели.

Способ по настоящему изобретению позволяет регенерировать растению сахарной свеклы, имеющему одну или несколько мутаций в гене ALS, при этом указанную мутацию(и) выбирают из группы, состоящей из аланина 113, пролина 188, аланина 196, аспартата 371, аргинина 372, триптофана 569, серина 648 и глицина 649, при этом указанный аланин 113 мутирован до валина или треонина, указанный пролин 188 мутирован до треонина, аргинина, лейцина, глутамина или аланина, указанный аланин 196 мутирован до валина, указанный аспартат 371 мутирован до глутамата, указанный аргинин 372 мутирован до гистидина, указанный триптофан 569 мутирован до глицина, указанный серин 648 мутирован до треонина и указанный глицин 649 мутирован до аспартата.

Предпочтительно сахарная свекла, имеющая две или несколько из этих специфических мутаций, имеет две мутации в одной аллели, т.е. кодируемый пептид содержит две мутации, оказывающие синергическое действие в отношении устойчивости к ингибиторам ALS (в особенности в отношении композиций, содержащих несколько ингибиторов ALS).

Способ по настоящему изобретению позволяет регенерировать растению сахарной свеклы, имеющему одну мутацию в гене ALS в позиции, кодирующей пролин 188, и одну мутацию в гене ALS в позиции, кодирующей триптофан 569.

Преимущественно, способ включает предварительную стадию определения концентрации одного или более ингибитора ALS, при которой композиция (содержащая один или более ингибитор ALS) смертельна для по меньшей мере 99% (предпочтительно по меньшей мере 99,9 или даже 99,99%) культивируемых *in vitro* клеток (позволяя некоторым мутантам приобрести устойчивость).

Предпочтительный ингибитор ALS, представленный в композиции (указанная композиция содержит дополнительно к другому ингибитору ALS, предпочтительно из класса, отличающегося от ингибитора ALS на основе сульфонилмочевины, такого как тиенкарбазон-метил), добавляемый к культивируемым *in vitro* протопластам замыкающих клеток устьиц, представляет собой форамсульфурон, предпочтительно в концентрации от 10^{-9} моль/л до (более предпочтительно) 10^{-6} моль/л.

Еще один подходящий ингибитор ALS, представленный в композиции, добавляемой к культивируемым *in vitro* протопластам замыкающих клеток устьиц, представляет собой этоксисульфурон (возможно эта композиция также содержит другие ингибиторы ALS).

Связанный аспект настоящего изобретения представляет собой мутантное растение сахарной свеклы, получаемое при помощи способа по настоящему изобретению, такое как сахарную свеклу, имеющую мутацию по триптофану 569 и/или пролину 188.

Еще один связанный аспект настоящего изобретения представляет собой мутантное растение сахарной свеклы, содержащее последовательность SEQ ID NO: 3 (или SEQ ID NO: 4) и/или последовательность SEQ ID NO: 5 (или SEQ ID NO: 6).

Предпочтительное растение сахарной свеклы по настоящему изобретению соответствует номеру NCIMB (Национальная коллекция промышленных, морских и пищевых бактерий Великобритании) 42050 или NCIMB 42051.

Настоящее изобретение также относится к ткани или части растения (например, замыкающим клеткам устьиц или листовым пластинкам) или семенам, полученным из мутантных растений по изобретению, а также к их применению для получения еще одного генетического признака.

Настоящее изобретение также относится к применению (хорошая регенерация) протопластов замыкающих клеток устьиц, полученных в настоящем изобретении, для введения генетического признака, отличающегося от устойчивости к ингибиторам ALS.

Подробное описание изобретения

Авторы изобретения обнаружили, что протопласти из замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы представляют собой хороший исходный материал для того, чтобы вызывать устойчивость к гербицидам, таким как ингибиторы ALS, несмотря на тот факт, что регенерация растения сахарной свеклы из протопластов замыкающих клеток устьиц является очень сложной, обладает низкой частотой и требует более длительных и более сложных процедур, чем прямая регенерация из каллусов, полученных из эксплантов, обычно используемая в области техники.

Действительно, каллус (каллусы) из эксплантов представляет(ют) собой массу недифференцированных (или дифференцированных) клеток, которые в подходящих условиях культивирования диффе-

ренцируются (или редифференцируются) и регенерируют в полностью функциональное растение сахарной свеклы. В таком способе семена собирают в больших количествах, затем немного стерилизуют и, таким образом, эксплантаты получают в больших количествах. Такой способ является удобным, поскольку дает возможность для осуществления значительной части работы без сложностей стерильных условий.

С другой стороны, замыкающие клетки устьиц обладают хорошо определенной организацией в растении, и их выделение из растительной ткани приводит в результате к отдельной(ым) клетке(ам) с последующей обработкой на отдельные протопласты.

В способе по настоящему изобретению проростки должны выращиваться *in vitro* и поддерживаться в стерильных условиях, затем замыкающие клетки устьиц выделяют из этих небольших проростков, и протопласты получают при поддержании стерильных условий. Затем эти отдельные протопласты вновь индуцируют для продукции своей клеточной стенки, для выращивания сначала в микрокаллусы, а затем в растение сахарной свеклы.

Обнаружено, что протопласт замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы является весьма уязвимым, уменьшая объем их применения: например обнаружено, что добавление мутагена вместо того, чтобы благоприятствовать появлению желательного генетического признака, является для протопластов во множестве случаев смертельным.

Другими словами, достижение успеха при использовании протопластов замыкающих клеток устьиц в качестве исходного материала для выведения растения сахарной свеклы, имеющей приобретенный и желаемый генетический признак путем мутации, было совершенно неожиданным.

Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что способность протопластов замыкающих клеток устьиц к делению, зависит от генотипов растений сахарной свеклы: протопласти замыкающих клеток устьиц из большинства генотипов демонстрируют очень низкую (почти нулевую) способность к делению (росту), тогда как протопласти из некоторых специфических генотипов обладают масштабируемой значительной способностью расти *in vitro*.

Авторы изобретения обнаружили, что выращивание на твердой среде (среда, содержащая полимер, такой как альгинат, или среда, содержащая агарозу) в очень больших количествах указанных протопластов замыкающих клеток устьиц, затем воздействие на выращенный материал (обычно в форме регенерированных каллусов) гербицидами, такими как ингибитор(ы) ALS, приводит в результате к отбору некоторых мутантных клеток, устойчивых к этой молекуле гербицида, несмотря на то, что в отсутствие добавленных мутагенов известно, что спонтанные мутации являются очень редкими, и этот способ не может обеспечить преимущество генетического разнообразия в популяции, при отборе уже существующего мутантного растения, демонстрирующего желаемую устойчивость к одному или более чем одному ингибитору ALS.

Некоторые из этих мутантных клеток, обладающих приобретенной устойчивостью к гербицидам, таким как ингибирование ALS, также способны регенерировать в живое растение сахарной свеклы. Хотя протопласти очень сложно применять на практике, тем не менее, способ по настоящему изобретению позволяет очень быстро получать стабильные мутанты, обладающие приобретенной устойчивостью к гербициду.

Способ по настоящему изобретению позволяет получать устойчивые к гербицидам (устойчивые к ингибитору ALS) растения сахарной свеклы, имеющих одну или несколько мутаций, включающих одну или несколько мутации в ферменте, являющимся мишенью для гербицида, например ингибитора ALS (такую как мутация гена ALS, где ген ALS кодирует белок ALS, содержащий аминокислоту, отличающуюся от триптофана, в позиции 569 белка ALS; соответствующую позиции 574 ALS *Arabidopsis thaliana*), возможно дополнительно по меньшей мере к еще одной мутации в этом гене и/или к другим мутациям в других генах.

Таким образом, аспект настоящего изобретения представляет собой способ получения растения сахарной свеклы (*Beta vulgaris*; таким образом, также *Beta vulgaris maritima* ssp), устойчивого к одному или более ингибитору ALS, включающий стадии

получения (протопластов из) замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы (чувствительной к ингибиторам ALS);

применения в отношении указанных культивируемых *in vitro* клеток композиции, содержащей один или более ингибитор ALS в концентрации, которая является смертельной для культивируемых *in vitro* клеток (по меньшей мере 99% (дикого типа) клеток уничтожаются ингибитором ALS, но некоторые мутанты могут приобрести устойчивость к обработке); и

регенерации растений сахарной свеклы из выживших клеток.

Этот способ можно рассматривать как альтернативный к введению трансгена (например, раскрытое в WO 95/10178). Тем не менее, способ, основанный на мутации эндогенного(ых) гена(ов), является более трудным по сравнению с трансгенным подходом. Действительно, введение трансгенного (мутантного) гена является гораздо более быстрым, гибким и предсказуемым.

Отсутствие вызванной трансгеном устойчивости связано с тем фактом, что приобретенная устойчивость к ингибитору(ам) ALS не прямо вызывается встраиванием *in vitro* (чужеродной) ДНК в протопласт

замыкающих клеток устьиц (или в полученные из него клетки), такой как (чужеродная) ДНК, кодирующая белок, непосредственно обеспечивающий устойчивость к ингибитору(ам) ALS, такой как белок, локально уменьшающий токсичность ингибитора(ов) ALS (например, фермент, деградирующий ингибитор(ы) ALS или уменьшающий его внутриклеточную концентрацию), или белок ALS, устойчивый к ингибитору(ам) ALS, такой как мутантный фермент ALS, который сохраняет значительную активность и функциональность даже в присутствии ингибитора(ов).

Тем не менее, растение, полученное при помощи способа по изобретению, может также быть скрещено с трансгенным растением для передачи потомству еще одного генетического признака. Растение (или его часть), полученное при помощи настоящего изобретения, также может быть использовано в последующем трансгенном способе для введения еще одного генетического признака (отличающегося от генетического признака, полученного в способе по настоящему изобретению).

Возможно, в этом способе также осуществляют стадию добавления агента-мутагена в культуру выделенных протопластов замыкающих клеток устьиц.

Подходящие агенты-мутагены представляют собой физическое (такое как УФ (ультрафиолетовое) или рентгеновское) воздействие или воздействие химических агентов (таких как этилметансульфонат (EMS), например в концентрации 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 или даже 2,5%). Тем не менее, показано, что на жизнеспособность протопластов пагубно влияют некоторые обычно проводимые мутагенные обработки, такие как обработка более чем 0,2% EMS.

Альтернативно, этот способ не содержит стадию добавления мутагенного агента.

В контексте настоящего изобретения гербицид предпочтительно относится к любой молекуле, которая, примененная в заданной дозе, используется для контроля уровня сорняков.

Предпочтительные гербициды, используемые в способе по настоящему изобретению (для получения растений сахарной свеклы, устойчивой к этому гербициду) обладают специфической известной активностью в отношении одного пептида (таким образом, что единичная мутация в соответствующем гене может придавать устойчивость к этому гербициду). Другими словами, предпочтительные гербициды являются специфическими в отношении одной пептидной мишени (обычно специфически ингибируя активность одного растительного фермента) и/или их пептид-мишень известна (таким образом, что находится в позиции для скрининга устойчивой сахарной свеклы в отношении мутации в гене-мишени)

В контексте настоящего изобретения ингибитор ALS относится к любой молекуле, ингибирующей функцию гена ALS.

Предпочтительно ингибитор(ы) ALS, используемый(е) в настоящем изобретении не ингибирует(ют) ферменты (сахарная свекла), отличающиеся от ALS.

Предпочтительно ингибитор(ы) ALS выбирают и используют в настоящем изобретении в такой концентрации, что более чем 90% (более чем 95%, более чем 99%, более чем 99,9%) функции фермента ALS дикого типа ингибировано, но по существу нет влияния на функцию неродственных ферментов.

Подходящие ингибиторы ALS (для осуществления способа) выбраны из группы, состоящей из гербицидов на основе сульфонилмочевины, гербицидов на основе сульфониламинокарбонилтриазолиона, гербицидов на основе имидазолиона, гербицидов на основе триазолопиримидина и гербицидов на основе пиримидинил(тио)бензоата. Предпочтительно гербицидная композиция содержит по меньшей мере один гербицид на основе сульфонилмочевины и по меньшей мере один триазолопиримидин.

Предпочтительные ингибиторы ALS (для осуществления способа) представляют собой форамсульфурон, амидосульфурон, тиенкарбазон-метил, этоксисульфурон и их смесь (в особенности композиция, содержащая тиенкарбазон-метил и форамсульфурон или амидосульфурон); тем не менее, регенерированный мутант сахарной свеклы благоприятно устойчив в отношении нескольких ингибиторов ALS.

Могут быть использованы другие ингибиторы ALS (включающие смеси ингибиторов ALS), и специалисту в данной области техники известно, какая мутация обеспечивает сильную устойчивость к данному ингибитору ALS (например, известно, что мутация триптофана в позиции 569 ассоциируется с устойчивостью к форамсульфурону); следовательно, учитывая гибкость и эффективность способа по настоящему изобретению, специалист в данной области техники может сконструировать растения сахарной свеклы, имеющие несколько приобретенных мутаций, и, таким образом, более широкую устойчивость к гербицидам, таким как ингибиторы ALS (например, смеси ингибиторов ALS).

Более предпочтительно способ включает предварительную стадию отбора генотипа (линий) растения сахарной свеклы в отношении способности ее протопlasma замыкающих клеток устьиц регенерировать в полностью функциональное растение сахарной свеклы, и/или способ по настоящему изобретению осуществляют на протопластах замыкающих клеток устьиц, выделенных из хорошо регенерирующих генотипов (линий) сахарной свеклы.

На подходящей предварительной стадии (отбор генотипов растения сахарной свеклы в отношении способности протопластов ее замыкающих клеток устьиц регенерировать в растение сахарной свеклы) осуществляют сравнение (независимо от их возможных благоприятных особенностей, таких как выход или устойчивость к паразитическим инфекциям) по меньшей мере 10 различных генотипов растения сахарной свеклы (из различных генотипов), предпочтительно по меньшей мере 15 различных генотипов, или даже по меньшей мере 30 различных генотипов, в отношении способности протопластов их замы-

кающих клеток устьиц регенерировать в растение сахарной свеклы (гораздо более предпочтительно их способность расти *in vitro* и/или с образованием каллусов), и отбор хорошо регенерирующего генотипа (линии) для осуществления способа по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения хорошо регенерирующий протопласт замыкающих клеток устьиц относится к протопластам, имеющим вероятность более чем 0,25% (количество растущих протопластов: общее количество протопластов в культуре; растущих: общему количеству), предпочтительно более чем 1% (растущих: общему количеству), более предпочтительно, более чем 5% (растущих: общему количеству), еще более предпочтительно более чем 10% (растущих: общему количеству) или даже более чем 20% (растущих: общему количеству) или 50% (растущих: общему количеству) для деления и/или для роста, и/или регенерации в жизнеспособный каллус сахарной свеклы (при росте в подходящих культуральных средах и без экзогенного давления отбора, такого как токсичные молекулы/гербицид, применимые в способе по настоящему изобретению).

Каллус (каллусы) относится к массе недифференцированных клеток. В области техники каллусы могут быть получены из эксплантатов, таких как эмбрионы, или полученных из паренхимы эксплантатов из листьев или семядоли. Тем не менее, в контексте настоящего изобретения каллусы представляют собой результат роста (хорошо регенерирующих) протопластов замыкающих клеток устьиц.

Благоприятно, каллусы, полученные при помощи этих хорошо регенерирующих протопластов, имеют более чем 10% (количество каллусов, производящих побеги: общее количество каллусов; побегов: общее количество), предпочтительно более чем 20% (побегов: общее количество) или даже более чем 30% (побегов: общее количество) способности давать побеги.

Предпочтительно хорошо регенерирующий протопласт замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы относится к протопластам, имеющим более чем 0,1% (растение сахарной свеклы: общее количество протопластов) (более предпочтительно более чем 1%) способности регенерировать в жизнеспособное растение сахарной свеклы.

Также предпочтительно, в этом способе композиция, содержащая гербицид (например, один или более чем один ингибитор(ы) ALS) применяют в отношении клеточной культуры *in vitro* более чем 2000000 из этих (хорошо регенерирующих) протопластов замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы.

Альтернативно, или более предпочтительно, дополнительно к стадии предварительного отбора композицию, содержащую гербицид (например, один или более чем один ингибитор(ы) ALS) применяют в отношении клеточной культуры *in vitro* более чем 5000000, или даже более чем 10000000, 20000000, или 50000000 из этих (хорошо регенерирующих) протопластов замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы.

Предпочтительно по меньшей мере 50000, приблизительно 100000 (хорошо регенерирующих) протопластов замыкающих клеток устьиц на миллилитр выращивали на содержащей полимер среде (такой как среда, содержащая альгинат или агарозу).

Возможно, указанные (хорошо регенерирующие) протопласти замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы выращивают в течение по меньшей мере приблизительно одной недели (предпочтительно приблизительно 3 недель и/или менее чем 4 недель) в содержащей полимер (альгинат) среде до применения композиции, содержащей гербицид (например, один или более чем один) ингибитор(ы) ALS, такой как форамсульфурон и, возможно, тиенкарбазон-метил.

Предпочтительно в этом способе также осуществляют стадию сравнения роста мутантных замыкающих клеток устьиц и роста замыкающих клеток устьиц дикого типа (и/или наивных и/или еще не обработанных гербицидом) на среде, которая не содержит ингибитор ALS, и возможно отбор мутанта(ов), сохраняющих по меньшей мере 75% роста, предпочтительно по меньшей мере 90% роста соответствующей клетки дикого типа.

Предпочтительно или дополнительно способ включает стадию сравнения роста и/или выхода регенерированной из мутантной клетки сахарной свеклы и роста и/или выхода сахарной свеклы дикого типа (и/или наивной и/или еще не обработанной ингибитором ALS) в тепличных анализах и в агротехнических условиях без какого-либо ингибитора ALS, и возможно стадию отбора устойчивых к ингибитору ALS мутантных растений сахарной свеклы, сохраняющих по меньшей мере 75% роста и/или выхода, предпочтительно по меньшей мере 90% роста и/или выхода сахарной свеклы дикого типа.

Предпочтительно способ включает дополнительную стадию секвенирования регенерированных растений из жизнеспособных протопластов и/или идентификации одной или нескольких мутаций, которые (могут быть) ассоциированы с устойчивостью к гербициду (например, одному или более ингибитору ALS).

В контексте настоящего изобретения термин "мутация" предпочтительно относится к одному (единичному) изменению нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид, являющийся мишенью гербицида (например, белок ALS), которое вызывает одно изменение соответствующей аминокислоты, такое, что получающееся в результате растение приобретает некоторую устойчивость к гербициду, такому как ингибиторы ALS. Другими словами, в контексте настоящего изобретения "мутацию" предпочтительно понимают как эквивалент "точечной мутации", которая позволяет приобретать некоторую устойчивость к гербициду (ингибитор ALS). Соответственно, "несколько мутаций" предпочтительно в на-

стоящем изобретении относится к (набору) множеству точечных мутаций, где каждая точечная мутация вызывает изменение кодируемой аминокислоты, придающее некоторую устойчивость к гербициду (например, ингибитору ALS и/или гербициду, отличающемуся от ингибитора ALS). Таким образом, предпочтительно, в контексте настоящего изобретения "мутация" не включает изменение нуклеотидной последовательности, которое не модифицирует кодируемый белок (такое как изменение третьей аминокислоты кодирующего триплета), изменение аминокислот, которые не ассоциируются с устойчивостью к гербициду (такому как ингибитор ALS), а также множественные одновременные изменения нуклеотидной последовательности.

Преимущественно, эту стадию идентификации мутации(й), ассоциирующихся с устойчивостью к (одному или более) ингибитору ALS (предпочтительно одна или две мутации в гене ALS), сочетают с разработкой олигонуклеотидных праймеров, включающих эту мутацию.

Преимущественно, за стадией идентификации мутации(й) в гене ALS следуют измерения (*in vitro*) ферментативной активности белка, кодируемого геном ALS дикого типа и мутантным геном ALS.

Предпочтительно ферментативные измерения фермента ALS дикого типа и мутантного фермента ALS осуществляют в присутствии одного или более ингибитора ALS (в одной или в нескольких концентрациях для построения кривой ингибирования).

Возможно, это ферментативное измерение фермента дикого типа и мутантного фермента (также) осуществляют в отсутствие ингибиторов ALS (для сравнения ферментативной активности мутантного фермента; предпочтительно в отсутствие ингибитора ALS, мутантный фермент сохраняет по меньшей мере 50% активности фермента дикого типа, более предпочтительно по меньшей мере 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или даже по меньшей мере 99%).

Предпочтительно способ по настоящему изобретению включает стадию сравнения композиций, содержащих один или более ингибитор ALS в различных концентрациях, и установления концентрации, при которой ингибитор ALS и/или ингибитор ALS в специальном препарате в этой композиции является смертельным для культуры *in vitro* протопластов замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы (таких как протопласти замыкающих клеток устьиц, выращиваемые на альгинате в течение по меньшей мере одной недели).

Например, эту стадию определения концентрации, при которой (один или более) ингибитор ALS является смертельным для протопластов замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы, осуществляют в культуре *in vitro* протопластов замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы дикого типа (и/или наивного и/или еще не обработанного ингибитором ALS).

В контексте настоящего изобретения смертельная концентрация композиции, содержащей (один или более) ингибитор ALS, относится к концентрации, достаточной для того, чтобы убить по меньшей мере 99%, предпочтительно по меньшей мере 99,9%, более предпочтительно по меньшей мере 99,99% культивируемых клеток (все же позволяя некоторым мутантам приобрести устойчивость).

Альтернативно или дополнительно указанную стадию определения концентрации, при которой (один или более) ингибитор ALS является смертельным для культуры *in vitro* протопластов замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы, (также) осуществляют в культуре *in vitro* мутантных замыкающих клеток устьиц (клеток, имеющих приобретенную мутацию в гене ALS и устойчивых к ингибиторам ALS)).

Сравнение смертельной концентрации ингибитора ALS (в композиции, содержащей этот ингибитор ALS) с использованием наивных и мутантных клеток благоприятно выражают в виде отношения (или в виде нескольких отношений, одно тестируемое отношение на ингибитор ALS).

Предпочтительно для одного ингибитора ALS смертельная концентрация в отношении наивной(ых) клетки(ок) в 50 раз меньше, чем смертельная концентрация в отношении мутантной(ых) клетки(ок), более предпочтительно, смертельная концентрация в отношении наивной(ых) клетки(ок) в 200 раз меньше чем смертельная концентрация в отношении мутантной(ых) клетки(ок), еще более предпочтительно, смертельная концентрация в отношении наивной(ых) клетки(ок) в 1000 раз меньше чем смертельная концентрация в отношении мутантной(ых) клетки(ок).

Гербицид (используемый в способе по настоящему изобретению) может представлять собой смесь (ингибиторов), содержащую по меньшей мере один ингибитор ALS, такой как форамсульфурон.

Возможно, ингибитор ALS, используемый в способе по изобретению, представляет собой смесь ингибиторов ALS, таких как сульфонилмочевина (например, форамсульфурон), и еще один ингибитор ALS, выбранный из группы, состоящей из йодосульфурана, амидосульфурана и тиенкарбазон-метила.

Предпочтительно ингибитор ALS, используемый в способе по изобретению, представляет собой (или содержит) форамсульфурон, такой как форамсульфурон, применяемый в отношении однодневной (или трехнедельной) культуры *in vitro* протопластов (конкретной культуры *in vitro*, содержащей каллусы, регенерированные из этих культивируемых протопластов), на содержащей альгинат среде, и поддерживается в течение выращивания *in vitro* культуры клеток в концентрации 10^{-9} - 10^{-6} моль/л (или 10^{-9} - 10^{-6} моль/л).

Связанный аспект настоящего изобретения представляет собой мутантное растение сахарной свеклы, получаемую при помощи этого способа (например, когда в этих способах применяют один или более

чем один гербицид (не ингибиторы ALS) или применяют один или более чем один ингибитор ALS, или применяют один ингибитор ALS и один гербицид, не представляющий собой ингибитор ALS).

Таким образом, один из аспектов настоящего изобретения представляет собой сахарную свеклу (получаемую при помощи способа по настоящему изобретению), имеющую одну или несколько мутаций в гене ALS в позициях, кодирующих аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из глицина 112, аланина 113, метионина 115, аргинина 133, валина 187, аргинина 190, аланина 196, фенилаланина 197, лизина 247, метионина 346, гистидина 347, аргинина 368, аспартата 370, аспартата 371, аргинина 372, метионина 565, валина 566, фенилаланина 573, серина 648 и глицина 649.

Предпочтительная сахарная свекла (получаемая при помощи способа по настоящему изобретению) имеет одну или несколько мутаций в гене ALS в позициях, кодирующих аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из аланина 113 (например, мутированного до валина или треонина), пролина 188, мутированного до треонина, аргинина, лейцина, глутамина или аланина, аланина 196 (например, мутированного до валина), аспартата 371 (например, мутированного до глутамата), аргинина 372 (например, мутированного до гистидина), триптофана 569, мутированного до глицина, серина 648 (например, мутированного до треонина) и глицина 649 (например, мутированного до аспартата).

Связанный аспект настоящего изобретения представляет собой мутантное растение сахарной свеклы (или клетку мутантного растения сахарной свеклы, такую как мутантные замыкающие клетки устьиц, выделенные из сахарной свеклы), содержащую мутацию в гене ALS, где триптофан в позиции 569 в кодируемом ферменте ALS (соответствующей позиции 574 в ферменте ALS *Arabidopsis thaliana*) заменен на другую аминокислоту (такую как лейцин), и возможно еще другую (одну или несколько) мутаций, предпочтительно еще другую (одну или несколько) мутаций в гене ALS, такую как мутацию, вызывающую еще одну аминокислотную замену в гене ALS.

Еще одно предпочтительное растение сахарная свекла имеет мутацию триптофана до лейцина в позиции 569 и одну или несколько мутаций в гене ALS в позициях, кодирующих аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из глицина 112, аланина 113, метионина 115, аргинина 133, валина 187, аргинина 190, аланина 196, фенилаланина 197, лизина 247, метионина 346, гистидина 347, аргинина 368, аспартата 370, аспартата 371, аргинина 372, метионина 565, валина 566, фенилаланина 573, серина 648 и глицина 649.

Предпочтительная сахарная свекла (получаемая при помощи способа по настоящему изобретению) имеет одну мутацию триптофана до лейцина в позиции 569 и одну или несколько мутаций в гене ALS в позициях, кодирующих аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из аланина 113 (например, мутированного до валина или треонина), пролина 188, мутированного до треонина, аргинина, лейцина, глутамина или аланина, аланина 196 (например, мутированного до валина), аспартата 371 (например, мутированного до глутамата), аргинина 372 (например, мутированного до гистидина), серина 648 (например, мутированного до треонина) и глицина 649 (например, мутированного до аспартата).

Это мутантное растение сахарная свекла устойчива к одному или нескольким используемым ингибиторам ALS, таким как сульфонилмочевина (например, форамсульфурон) и благоприятно к другому(им) ингибитору(ам) ALS, предпочтительно выбранному(ым) из группы, состоящей из йодосульфурана, амидосульфурана и тиенкарбазон-метила.

Связанный аспект настоящего изобретения представляет собой мутантное растение сахарной свеклы (или клетку мутантного растения сахарной свеклы, такую как мутантные замыкающие клетки устьиц, выделенных из сахарной свеклы), содержащую мутацию в гене ALS, где пролин в позиции 188 в кодируемом ферменте ALS (соответствующем позиции 197 в ферменте ALS *Arabidopsis thaliana*) заменен на другую аминокислоту (такую как серин).

Альтернативно, предпочтительное растение сахарной свеклы (получаемое при помощи способа по настоящему изобретению) имеет мутацию пролина до серина в позиции 188 и одну или несколько мутаций в гене ALS в позициях, кодирующих аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из глицина 112, аланина 113, метионина 115, аргинина 133, валина 187, аргинина 190, аланина 196, фенилаланина 197, лизина 247, метионина 346, гистидина 347, аргинина 368, аспартата 370, аспартата 371, аргинина 372, метионина 565, валина 566, фенилаланина 573, серина 648 и глицина 649.

Предпочтительная растение сахарной свеклы (получаемое при помощи способа по настоящему изобретению) имеет одну мутацию пролина до серина в гене ALS в позиции 188 и одну или несколько мутаций гена ALS в позициях, кодирующих аланин 113 (например, мутированный до валина или треонина), аспартат 371 (например, мутированный до глутамата), аргинин 372 (например, мутированный до гистидина), триптофан 569, мутированный до глицина, серин 648 (например, мутированный до треонина) и глицин 649 (например, мутированный до аспартата).

Еще один связанный аспект настоящего изобретения представляет собой мутантное растение сахарной свеклы (или мутантные клетки растения сахарной свеклы, такие как мутантные замыкающие клетки устьиц, выделенные из сахарной свеклы), содержащую мутацию триптофана в позиции 569 в ферменте ALS и мутацию пролина в позиции 188 в ферменте ALS, а также возможно еще одну (одну или несколько) мутацию, предпочтительно еще одну (одну или несколько) мутаций в гене ALS.

Предпочтительно (одна аллель) гена ALS этого мутантного растения сахарной свеклы соответствует-

ет SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

Предпочтительно мутантное растение сахарной свеклы по настоящему изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 3 (в одной аллели) и последовательность SEQ ID NO: 5 (во второй аллели).

Возможно, мутантное растение сахарная свекла по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO: 3 (в одной аллели) и SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7 (во второй аллели).

Еще один связанный аспект настоящего изобретения представляет собой нуклеотидный фрагмент (по меньшей мере 20 или по меньшей мере 25 последовательных нуклеотидов, но меньше чем 200 последовательных нуклеотидов, предпочтительно меньше чем 50 последовательных нуклеотидов), охватывающий одну или более чем одну мутацию; возможно, этот фрагмент предназначен для применения в качестве праймера или зонда (включающего нуклеотидный зонд, также меченный, например ненуклеотидной группировкой или с использованием радиоактивности, зонд, меченный последовательностью нукleinовой кислоты, чужеродной для гена ALS сахарной свеклы).

Еще один связанный аспект настоящего изобретения представляет собой применение этого нуклеотидного фрагмента, включающего мутацию, для выбора с помощью маркера растений сахарной свеклы, обладающих устойчивостью к токсической молекуле (гербициду).

Примеры

Сравнительный пример.

Поскольку мутантное растение сахарной свеклы успешно получали в области техники (например, в WO 98/02527) при добавлении гербицида ALS к каллусам, представляющим собой эксплантаты из сахарной свеклы дикого типа, авторы изобретения, во-первых, выбрали генотип (линию) сахарной свеклы, полученный из линии WO 98/02527, и выделили протопласты из замыкающих клеток устьиц.

Несколько миллионов из указанных протопластов (в среднем приблизительно от 2 до приблизительно 5 млн, и до 11 млн в эксперименте; всего, гербицид ALS применяли в отношении приблизительно 150 миллионов протопластов) выделяли как в WO 95/10178, помещали в культуральную среду, содержащую альгинат, и обрабатывали культуральной средой MS (Мурасиге-Скуга), содержащей от 10^{-9} до 10^{-6} моль/л формамсульфурана.

Авторы изобретения затем проводили регенерацию растения сахарной свеклы в соответствии с протоколом, описанным в WO 95/10178, и обнаружили только несколько каллусов, выживших под действием ингибитора ALS. Тем не менее, за одним исключением, ни один из этих регенерированных каллусов не был способен развиться в растение сахарной свеклы. Единственное регенерированное растение сахарной свеклы демонстрировало отсутствие мутации в гене ALS (кодирующем фермент-мишень для формамсульфурана).

Таким образом, эта линия сахарной свеклы, родительская линия которой на основе прямого воздействия на каллусы (из эксплантата) гербицидом приобретает вызванную мутацией устойчивость к этому гербициду, не является пригодной для этой же самой задачи, когда способ включает протопласт замыкающих клеток устьиц.

Пример 1.

Отбор генотипов (линий) сахарной свеклы для хорошо регенерирующих протопластов.

Авторы изобретения сравнили несколько генотипов растений сахарной свеклы в отношении их способности к регенерации из протопластов замыкающих клеток устьиц.

Авторы изобретения обнаружили генотипы, обладающие приблизительно 0,01% (или даже меньший) способностью регенерировать, и несколько генотипов, обладающих (гораздо) большей чем 0,1% способностью регенерировать.

Авторы изобретения также установили различие между ростом протопластов (их способностью к росту и делению *in vitro*), способностью к росту каллусов с образованием побегов и долей растущих каллусов, регенерирующих до растения.

Таблица 1

Сравнение нескольких генотипов сахарной свеклы

Генотип	Протопласти/грамм	Процентная доля растущих клеток	Процентная доля образования побегов	Процентная доля полученных растений
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

Хотя величины, отражающие способность протопластов замыкающих клеток устьиц регенерировать в целое растение сахарной свеклы, взятые в общем, были выше для клеточной линии "Rel1", эту клеточную линию рассматривали как не достаточно подходящую для настоящего изобретения.

Авторы изобретения также сделали заключение о том, что параметр "процент растущих клеток" го-

раздо более важен для настоящего изобретения, чем другие параметры.

Авторы изобретения выбрали генотип, имеющий более чем 0,25% протопластов замыкающих клеток устьиц, способных расти *in vitro*.

Пример 2.

Обработка протопластов гербицидом.

Авторы изобретения применили тот же самый подход как в сравнительном примере, но основываясь на хорошо растущих протопластах замыкающих клеток устьиц (например, идентифицированных в примере 1; также могут быть использованы растения, размещенные под номерами NCIMB 42050 или NCIMB 42051, а также другие растения сахарной свеклы, имеющие высокую долю растущих протопластов замыкающих клеток устьиц).

В общем, приблизительно 68 млн хорошо растущих протопластов замыкающих клеток устьиц обрабатывали композицией гербицида ALS, содержащей до 10^{-6} М форамсульфурана.

Авторы изобретения получили 46 каллусов.

Нескольких регенерированных растений демонстрируют мутацию в гене-мишени, гена ALS: в каждом случае мутация в кодоне триптофана в позиции 569 (W569L; соответствующей триптофану в позиции 574 у *Arabidopsis thaliana*). Две аллели гена ALS этого мутанта кодируются последовательностями SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 7. Другие растущие каллусы были секвенированы и имели мутации в гене ALS, (включающие мутации в других позициях), но не регенерировали в растение.

Таким образом, авторы изобретения сделали заключение о том, что способ по настоящему изобретению может быть применен для получения растений, имеющих выявленные мутации, вызывающие устойчивость к гербициду, в особенности, поскольку этот способ не требует применения чужеродной ДНК и/или введения векторов ДНК, кодирующих генетические элементы, которые, как уже известно, придают устойчивость к ингибиторам ALS и позволяют получить положительные результаты в течение всего лишь нескольких месяцев.

Авторы изобретения затем повторили указанный способ и также применили мутаген (от 0,05% до 0,2% EMS) к протопластам для увеличения количества мутаций.

Пример 3.

Обработка сахарной свеклы ингибитором ALS.

Авторы изобретения сравнили поведение регенерированных растений сахарной свеклы, имеющих мутантную последовательность SEQ ID NO: 3 (гетерозигота для этой мутации), и сахарной свеклы дикого типа (наивной), имеющейся в продаже.

Мутантный (гетерозиготный) сорт демонстрировал хорошую устойчивость к форамсульфурану (12,5 г/га; до 3 применений), даже тогда, когда гербицид комбинировался с органическим соединением (25 г/га метилового эфира рапсового масла) для усиления его действия.

Как ожидалось, растение дикого типа (наивное) было очень чувствительным к форамсульфурану, даже после первого применения.

Тот же самый эксперимент осуществляли с использованием амидосульфурана (15 г/га) и добивались того же уровня устойчивости у мутантных растений.

С другой стороны, растения дикого типа (наивные) были весьма чувствительны к амидосульфурану, особенно, будучи комбинированными с органическим соединением, и/или после нескольких применений амидосульфурана.

Тот же самый эксперимент проводили с использованием йодосульфурана (3,5 г/га) и продемонстрировали хороший уровень устойчивости у мутантных растений при добавлении йодосульфурана, но эта устойчивость уменьшалась при применении йодосульфурана вместе с органическим соединением.

Как ожидалось, растение дикого типа (наивное) было очень чувствительным к йодосульфурану, даже после одного применения и без органического соединения.

Тот же самый эксперимент провели с использованием 7,5 г/га тиенкарбазон-метила, и получили приблизительно тот же самый уровень устойчивости, как для йодосульфурана у мутантных растений. Растение дикого типа (наивное) было очень чувствительным к тиенкарбазон-метилу при всех тестируемых концентрациях и независимо от добавления органического соединения.

Авторы изобретения сделали заключение о том, что при сравнении с диким типом мутантное растение сахарная свекла, содержащая SEQ ID NO: 3 (размещенная в соответствии с Будапештским договором под номером NCIMB 42051), обеспечивает наилучшую устойчивость к форамсульфурану.

Авторы изобретения также сделали заключение о том, что эти (гетерозиготные) мутантные растения также приобретают некоторую (хотя и частичную) устойчивость к другим ингибиторам ALS, включаяющим ингибиторы, относящиеся к другим химическим классам.

Пример 4.

Обработка ингибитором ALS растения сахарной свеклы, имеющей дополнительные мутации в гене ALS.

Авторы изобретения получили мутантное растение сахарной свеклы, содержащее последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 (в двух различных аллелях). Такой получившийся в результате двойной мутант был размещен в соответствии с Будапештским договором под номером NCIMB 42050. Расте-

ние, содержащее последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5, может быть создано, основываясь на нескольких способах, включающих, например, последующую стадию мутагенеза, применяемую к единичному мутанту NCIMB 42051.

Авторы изобретения сравнили устойчивость указанного растения двойного мутанта (мутация в одной аллели по аминокислоте 569 и мутация в другой аллели по аминокислоте 188) с устойчивостью единичного мутанта (мутация в позиции 569) сахарной свеклы.

Линия растения с двойной мутацией, по меньшей мере, сохраняет все свойства устойчивости, как в примере 3, и также приобретает хорошую устойчивость (совместимую с полевым применением) к обработке тиенкарбазон-метилом и амидосульфуроном, даже при погружении в композицию с органическими соединениями.

Таким образом, указанный двойной мутант демонстрирует улучшенную синергическую устойчивость к некоторым ингибиторам ALS при сравнении с устойчивостью, характерной для растения с единичной мутацией (в позиции 569 в гене ALS).

Пример 5.

Тепличные исследования: обработка ингибитором ALS различных растений сахарной свеклы для прямого сравнения.

Мутантные растения сахарной свеклы, содержащие последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5 (в двух различных аллелях) в соответствии с настоящим изобретением (как описано в примере 4 выше, "Линия А") обрабатывали различными ингибиторами ALS для прямого сравнения с растениями сахарной свеклы, где триптофан в позиции 569 кодируемого фермента ALS заменен на лейцин ("Линия В"), растениями сахарной свеклы, описанными в WO 98/02527, где пролин в позиции 188 кодируемого фермента ALS заменен на серин ("Линия С"), и традиционными сортами (дикий тип) растений сахарной свеклы, не имеющих мутацию в позициях 569 и 188 ("Линия WT").

Несколько групп семян четырех различных упомянутых растений сахарной свеклы сеяли отдельно в теплице и выращивали до стадии BBCN 14 для Beta vulgaris L. ssp. vulgaris (т.е. 4 не развернувшихся листа (вторая пара)) в соответствии с монографией "Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen", 2nd edition, 2001, ed. Uwe Meier, Biologische Bundesanstalt fur Land und Forstwirtschaft". Затем каждую из получающихся в результате отдельных групп растений сахарной свеклы индивидуально обрабатывали ингибитором ALS (ALS-ин) в количествах (г/га), представленным в таблице 2.

На 14 сутки после применения соответствующего ингибитора ALS поражение (т.е. фитотоксичность) для каждого растения сахарной свеклы оценивали по шкале от 0% (т.е. отсутствие поражения, отсутствие фитотоксичности) до 100% (т.е. растения полностью погибли). Средняя оценка для каждой группы растений также представлена в табл. 2.

Таблица 2

ALS-ин	ALS-ин г/га	Линия А	Линия В	Линия С	Линия WT
Форамсульфурон	13	26,9%	45,6%	77,5%	80,0%
Йодосульфурон- метил Na	3,5	22,5%	38,8%	80,0%	82,5%
Амидосульфурон	15	6,3%	37,5%	51,9%	73,1%
Тиенкарбазон- метил	7,5	8,1%	35,6%	37,5%	84,4%
Бисбирибак-Na	50	17,5%	38,1%	71,7%	80,0%
Метосулам	15	13,1%	40,6%	69,4%	79,4%

Дополнительно, типичные ранние фенотипы каждого растения сахарной свеклы проверяли после обработки смесью, содержащей тиенкарбазон-метил и форамсульфурон. Типичный ранний фенотип каждой линии представлен на фигуре.

Фигура также демонстрирует, что растения сахарной свеклы в соответствии с настоящим изобретением ("Линия А") демонстрируют улучшенную устойчивость к ингибитору ALS, т.е. обнаружен превосходный рост и меньше фитотоксических эффектов по сравнению с другими ранними фенотипами.

Пример 6.

Полевые исследования: обработка ингибитором ALS различных растений сахарной свеклы для прямого сравнения.

Таблица 3

Действие ингибиторов ALS на растение сахарной свеклы. Значения представляют собой средние процентные величины измеренного поражения

		Чувствительный	574 гетеро	574 197	и 574 гомо
1	Не обработанные	0	0	0	0
2	AE F 130360 00 WG50 A1 25 г/га	97	22	5	0
	(Форамсульфурон)				
3	BYH18636 15 г/га (тиенкарбазон)	97	339	5	0
4	Ae f115008 00 wg 10 a2 7 г/га (йодосульфурон)	98	65	23	28
5	AE F130060 00 WG75 A2 60 г/га (мезозульфурон)	91	24	18	0
6	HOESTAR 30 г/га (амидосульфурон)	97	34	0	0
7	AEF095404 00 WG60 A2 60 г/га (этоксисульфурон)	99	39	0	0
8	RAPTOR 40 г/га (имазамокс)	98	44	35	8
9	TACCO 30 г/га (метосулам)	97	27	0	3
10	NOMINEE 50 г/га (биспиробак)	98	78	70	28
11	MOTIVELL 60 г/га (никосульфурон)	98	53	28	13
12	GROPPER SX 8 г/га (метосульфурон)	100	74	50	35
13	LEXUS 50 DF 10 г/га (флупирисульфурон)	70	0	0	0
14	ATTRIBUT 70 г/га (пропоксикарбазон)	91	25	0	5
15	SIMPLICITY 50 г/га (пироксисулам)	97	45	28	0
16	PRIMUS 10 г/га (флорасулам)	99	55	38	0
17	POINTER SX 30 г/га	98	74	28	20
	(трибенурон)				
18	CATO 13 г/га (римсульфурон)	68	8	0	0
19	MONITOR 80 WG 10 г/га (сульфосульфурон)	93	23	0	0
20	DEBUT YX1 15 г/га (трифлусульфурон)	0	0	0	0
21	EVEREST 40 г/га (флукарбазон)	93	18	0	0
22	HARMONY 7,5 г/га (тиенсульфурон)	98	39	0	0
23	№2 и №3 (форамсульфурон + тиенкарбазон) 1 л/га	100	65	35	5

Авторы изобретения протестировали имеющиеся в продаже композиции в дозе, обеспечивающей гибель сорняков.

Контроль чувствительности (т.е. сахарная свекла, не имеющая мутацию в гене ALS) погибал под

действием всех гербицидов за исключением одного. Авторы изобретения измерили небольшие поражения по сравнению с контрольным (не обработанным) растением, которые достигали иногда 35% или даже 40%. Эти "поражения" отражают агротехнические условия полевого исследования.

С другой стороны, растение сахарная свекла, представляющая собой гетерозиготу в позиции 569 (574), приобретает частичную устойчивость к нескольким гербицидным композициям. Растение, включающее мутацию 569 (574) в обеих аллелях и, таким образом, являющееся гомозиготой (569/569), также обладает увеличенной устойчивостью: только 7 гербицидных композиций умеренно токсичны (от 5% до 35%).

Растение сахарной свеклы, имеющее мутацию в позиции 569 (574) в одной аллели гена ALS и мутацию в позиции 188 (197) во второй аллели гена ALS, также приобретает улучшенную устойчивость, поскольку 9 гербицидных композиций умеренно токсичны и только 3 весьма токсичны. Неожиданно обнаружено, что такое растение, в котором утрачена мутация, обеспечивающая сильную устойчивость (569), и добавлена мутация, обеспечивающая только слабую устойчивость (188) к ингибитору ALS, обеспечивает еще более хорошую устойчивость по сравнению с гомозиготным (569/569) растением в 3 различных условиях указанного полевого теста.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SES

<120> Способ получения растений сахарной свеклы, устойчивых к гербицидам

<130> SES0010

<140> PCT/EP2013/076618

<141> 2013-12-13

<150> EP12196858

<151> 2012-12-13

<150> US61/736817

<151> 2012-12-13

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1998

<212> ДНК

<213> Свекла обыкновенная

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1998)

<223> 4D6834 WT all

<400> 1
atg gct acc ttc aca aac cca aca ttt tcc cct tcc tca act cca 48
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
1 5 10 15

tta acc aaa acc cta aaa tcc caa tct tcc atc tct tca acc ctc ccc 96
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
20 25 30

ttt tcc acc cct ccc aaa acc cca act cca ctc ttt cac cgt ccc ctc 144
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
35 40 45

caa atc tca tcc tcc caa tcc cac aaa tca tcc gcc att aaa aca caa 192

031973

Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln			
50	55	60	
act caa gca cct tct cca gct att gaa gat tca tct ttc gtt tct			240
Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser			
65	70	75	80
cga ttt ggc cct gat gaa ccc aga aaa ggg tcc gat gtc ctc gtt gaa			288
Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu			
85	90	95	
gct ctt gag cgt gaa ggt gtt acc aat gtg ttt gct tac cct ggt ggt			336
Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly			
100	105	110	
gca tct atg gaa atc cac caa gct ctc aca cgc tct aaa acc atc cgc			384
Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg			
115	120	125	
aat gtc ctc cct cgc cat gaa caa ggc ggg gtt ttc gcc gcc gag gga			432
Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly			
130	135	140	
tat gct aga gct act gga aag gtt ggt gtc tgc att gcg act tct ggt			480
Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly			
145	150	155	160
cct ggt gct acc aac ctc gta tca ggt ctt gct gac gct ctc ctt gat			528
Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp			
165	170	175	
tct gtc cct ctt gtt gcc atc act ggc caa gtt cca cgc cgt atg att			576
Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile			
180	185	190	
ggc act gat gct ttt cag gag act cca att gtt gag gtg aca agg tct			624
Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser			
195	200	205	
att act aag cat aat tat tta gtt ttg gat gta gag gat att cct aga			672
Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg			
210	215	220	
att gtt aag gaa gcc ttt ttt tta gct aat tct ggt agg cct gga cct			720
Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro			
225	230	235	240
gtt ttg att gat ctt cct aaa gat att cag cag caa ttg gtt gtt cct			768
Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Leu Val Val Pro			
245	250	255	
gat tgg gat agg cct ttt aag ttg ggt ggg tat atg tct agg ctg cca			816
Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro			
260	265	270	
aag tcc aag ttt tcg acg aat gag gtt gga ctt ctt gag cag att gtg			864
Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val			
275	280	285	
agg ttg atg agt gag tcg aag aag cct gtc ttg tat gtg gga ggt ggg			912
Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly			
290	295	300	

031973

tgt ttg aat tct agt gag gag ttg agg aga ttt gtt gag ttg aca ggg Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly 305 310 315 320	960
att ccg gtg gct agt act ttg atg ggg ttg ggg tct tac cct tgt aat Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn 325 330 335	1008
gat gaa ctg tct ctt cat atg ttg ggg atg cac ggg act gtt tat gcc Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala 340 345 350	1056
aat tat gcg gtg gat aag gcg gat ttg ttg ctt gct ttc ggg gtt agg Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg 355 360 365	1104
ttt gat gat cgt gtg acc ggg aag ctc gag gcg ttt gct agc cgt gct Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala 370 375 380	1152
aag att gtg cat att gat att gac tct gct gag att ggg aag aac aag Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys 385 390 395 400	1200
cag ccc cat gtg tcc att tgt gct gat gtt aaa ttg gca ttg cgg ggt Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly 405 410 415	1248
atg aat aag att ctg gag tct aga ata ggg aag ctg aat ttg gat ttc Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe 420 425 430	1296
tcc aag tgg aga gaa gaa tta ggt gag cag aag gaa ttc cca ctg Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu 435 440 445	1344
agt ttt aag aca ttt ggg gat gca att cct cca caa tat gcc att cag Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln 450 455 460	1392
gtg ctt gat gag ttg acc aat ggt aat gct att ata agt act ggt gtt Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val 465 470 475 480	1440
ggg cag cac caa atg tgg gct gcg cag cat tac aag tac aga aac cct Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro 485 490 495	1488
cgc caa tgg ctg acc tct ggt ggg ttg ggg gct atg ggg ttt ggg cta Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu 500 505 510	1536
cca gcc gcc att gga gct gca gtt gct cga cca gat gca gtg gtt gtc Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val 515 520 525	1584
gat att gat ggg gat ggc agt ttt att atg aat gtt caa gag ttg gct Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala 530 535 540	1632
aca att agg gtg gaa aat ctc cca gtt aag ata atg ctg cta aac aat Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn 545 550 555 560	1680

caa cat tta ggt atg gtc caa tgg gaa gat agg ttc tat aaa gct 1728
 Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala
 565 570 575

aac cgg gca cat aca tac ctt gga aac cct tcc aaa tct gct gat atc 1776
 Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile
 580 585 590

ttc cct gat atg ctc aaa ttc gct gag gca tgt gat att cct tct gcc 1824
 Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala
 595 600 605

cgt gtt agc aac gtg gct gat ttg agg gcc gcc att caa aca atg ttg 1872
 Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu
 610 615 620

gat act cca ggg ccg tac ctg ctc gat gtg att gta ccg cat caa gag 1920
 Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
 625 630 635 640

cat gtg ttg cct atg att cca agt ggt gcc ggt ttc aag gat acc att 1968
 His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile
 645 650 655

aca gag ggt gat gga aga acc tct tat tga 1998
 Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
 660 665

<210> 2
<211> 665
<212> PRT
<213> Свекла обыкновенная

<400> 2

Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
 1 5 10 15

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

Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
 35 40 45

Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
 50 55 60

Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg

031973

355	360	365
Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala		
370	375	380
Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys		
385	390	395
400		
Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly		
405	410	415
Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe		
420	425	430
Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu		
435	440	445
Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln		
450	455	460
Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val		
465	470	475
480		
Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro		
485	490	495
Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu		
500	505	510
Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val		
515	520	525
Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala		
530	535	540
Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn		
545	550	555
560		
Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala		
565	570	575
Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile		
580	585	590
Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala		
595	600	605

031973

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

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

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

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
660 665

<210> 3
<211> 1998
<212> ДНК
<213> Свекла обыкновенная

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1998)
<223> 4D6834 W574

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1998)
<223> 4D6834 W574

<400> 3
atg gct acc ttc aca aac cca aca ttt tcc cct tcc tca act cca 48
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
1 5 10 15

tta acc aaa acc cta aaa tcc caa tct tcc atc tct tca acc ctc ccc 96
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro
20 25 30

ttt tcc acc cct ccc aaa acc cca act cca ctc ttt cac cgt ccc ctc 144
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
35 40 45

caa atc tca tcc tcc caa tcc cac aaa tca tcc gcc att aaa aca caa 192
Gln Ile Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
50 55 60

act caa gca cct tct tct cca gct att gaa gat tca tct ttc gtt tct 240
Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
65 70 75 80

cga ttt ggc cct gat gaa ccc aga aaa ggg tcc gat gtc ctc gtt gaa 288
Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
85 90 95

gct ctt gag cgt gaa ggt gtt acc aat gtg ttt gct tac cct ggt ggt 336
Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly
100 105 110

gca tct atg gaa atc cac caa gct ctc aca cgc tct aaa acc atc cgc 384
Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Thr Ile Arg

031973

115	120	125	
aat gtc ctc cct cgc cat gaa caa ggc ggg gtt ttc gcc gcc gag gga Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly			432
130	135	140	
tat gct aga gct act gga aag gtt ggt gtc tgc att gcg act tct ggt Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly			480
145	150	155	160
cct ggt gct acc aac ctc gta tca ggt ctt gct gac gct ctc ctt gat Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp			528
165	170	175	
tct gtc cct ctt gtt gcc atc act ggc caa gtt cca cgc cgt atg att Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile			576
180	185	190	
ggc act gat gct ttt cag gag act cca att gtt gag gtg aca agg tct Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser			624
195	200	205	
att act aag cat aat tat tta gtt ttg gat gta gag gat att cct aga Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg			672
210	215	220	
att gtt aag gaa gcc ttt ttt tta gct aat tct ggt agg cct gga cct Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro			720
225	230	235	240
gtt ttg att gat ctt cct aaa gat att cag cag caa ttg gtt gtt cct Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro			768
245	250	255	
gat tgg gat agg cct ttt aag ttg ggt ggg tat atg tct agg ctg cca Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro			816
260	265	270	
aag tcc aag ttt tcg acg aat gag gtt gga ctt ctt gag cag att gtg Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val			864
275	280	285	
agg ttg atg agt gag tcg aag aag cct gtc ttg tat gtg gga ggt ggg Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly			912
290	295	300	
tgt ttg aat tct agt gag gag ttg agg aga ttt gtt gag ttg aca ggg Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly			960
305	310	315	320
att ccg gtg gct agt act ttg atg ggg ttg ggg tct tac cct tgt aat Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn			1008
325	330	335	
gat gaa ctg tct ctt cat atg ttg ggg atg cac ggg act gtt tat gcc Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala			1056
340	345	350	
aat tat gcg gtg gat aag gcg gat ttg ttg ctt gct ttc ggg gtt agg Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg			1104
355	360	365	
ttt gat gat cgt gtg acc ggg aag ctc gag gcg ttt gct agc cgt gct			1152

031973

Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala			
370	375	380	
aag att gtg cat att gat att gac tct gct gag att ggg aag aac aag			1200
Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys			
385	390	395	400
cag ccc cat gtg tcc att tgt gct gat gtt aaa ttg gca ttg cgg ggt			1248
Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly			
405	410	415	
atg aat aag att ctg gag tct aga ata ggg aag ctg aat ttg gat ttc			1296
Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe			
420	425	430	
tcc aag tgg aga gaa tta ggt gag cag aag gaa ttc cca ctg			1344
Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu			
435	440	445	
agt ttt aag aca ttt ggg gat gca att cct cca caa tat gcc att cag			1392
Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln			
450	455	460	
gtg ctt gat gag ttg acc aat ggt aat gct att ata agt act ggt gtt			1440
Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val			
465	470	475	480
ggg cag cac caa atg tgg gct gcg cag cat tac aag tac aga aac cct			1488
Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro			
485	490	495	
cgc caa tgg ctg acc tct ggt ggg ttg ggg gct atg ggg ttt ggg cta			1536
Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu			
500	505	510	
cca gcc gcc att gga gct gca gtt gct cga cca gat gca gtg gtt gtc			1584
Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val			
515	520	525	
gat att gat ggg gat ggc agt ttt att atg aat gtt caa gag ttg gct			1632
Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala			
530	535	540	
aca att agg gtg gaa aat ctc cca gtt aag ata atg ctg cta aac aat			1680
Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn			
545	550	555	560
caa cat tta ggt atg gtt gtc caa ttg gaa gat agg ttc tat aaa gct			1728
Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala			
565	570	575	
aac cgg gca cat aca tac ctt gga aac cct tcc aaa tct gct gat atc			1776
Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile			
580	585	590	
ttc cct gat atg ctc aaa ttc gct gag gca tgt gat att cct tct gcc			1824
Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala			
595	600	605	
cgt gtt agc aac gtg gct gat ttg agg gcc gcc att caa aca atg ttg			1872
Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu			
610	615	620	

031973

gat act cca ggg ccg tac ctg ctc gat gtg att gta ccg cat caa gag Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu 625 630 635 640	1920
cat gtg ttg cct atg att cca agt ggt gcc ggt ttc aag gat acc att His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile 645 650 655	1968
aca gag ggt gat gga aga acc tct tat tga Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr 660 665	1998
 <210> 4 <211> 665 <212> PRT <213> Свекла обыкновенная	
 <400> 4	
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro 1 5 10 15	
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro 20 25 30	
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu 35 40 45	
Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln 50 55 60	
Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser 65 70 75 80	
Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu 85 90 95	
Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly 100 105 110	
Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg 115 120 125	
Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly 130 135 140	
Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly 145 150 155 160	
Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp 165 170 175	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
 660 665

<211> 1998
<212> ДНК
<213> Свекла обыкновенная

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1998)
<223> Pro мутантный

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1998)

<400> 5			
atg gcg gct acc ttc aca aac cca aca ttt tcc cct tcc tca act cca			48
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro			
1 5 10 15			
tta acc aaa acc cta aaa tcc caa tct tcc atc tct tca acc ctc ccc			96
Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro			
20 25 30			
ttt tcc acc cct ccc aaa acc cca act cca ctc ttt cac cgt ccc ctc			144
Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu			
35 40 45			
caa atc tca tcc tcc caa tcc cac aaa tca tcc gcc att aaa aca caa			192
Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln			
50 55 60			
act caa gca cct tct tct cca gct att gaa gat tca tct ttc gtt tct			240
Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser			
65 70 75 80			
cga ttt ggc cct gat gaa ccc aga aaa ggg tcc gat gtc ctc gtt gaa			288
Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu			
85 90 95			
gct ctt gag cgt gaa ggt gtt acc aat gtg ttt gct tac cct ggt ggt			336
Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly			
100 105 110			
gca tct atg gaa atc cac caa gct ctc aca cgc tct aaa acc atc cgc			384
Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg			
115 120 125			
aat gtc ctc cct cgc cat gaa caa ggc ggg gtt ttc gcc gcc gag gga			432
Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly			
130 135 140			
tat gct aga gct act gga aag gtt ggt gtc tgc att gcg act tct ggt			480
Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly			
145 150 155 160			
cct ggt gct acc aac ctc gta tca ggt ctt gct gac gct ctc ctt gat			528
Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp			
165 170 175			
tct gtc cct ctt gtt gcc atc act ggc caa gtt tca cgc cgt atg att			576
Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Ser Arg Arg Met Ile			
180 185 190			

031973

ggc act gat gct ttt cag gag act cca att gtt gag gtg aca agg tct Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser 195 200 205	624
att act aag cat aat tat tta gtt ttg gat gta gag gag att cct aga Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg 210 215 220	672
att gtt aag gaa gcc ttt ttt tta gct aat tct ggt agg cct gga cct Ile Val Lys Glu Ala Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro 225 230 235 240	720
gtt ttg att gat ctt cct aaa gat att cag cag caa ttg gtt gtt cct Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro 245 250 255	768
gat tgg gat agg cct ttt aag ttg ggt ggg tat atg tct agg ctg cca Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro 260 265 270	816
aag tcc aag ttt tcg acg aat gag gtt gga ctt ctt gag cag att gtg Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val 275 280 285	864
agg ttg atg agt gag tcg aag aag cct gtc ttg tat gtg gga ggt ggg Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly 290 295 300	912
tgt ttg aat tct agt gag gag ttg agg aga ttt gtt gag ttg aca ggg Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly 305 310 315 320	960
att ccg gtg gct agt act ttg atg ggg ttg ggg tct tac cct tgt aat Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn 325 330 335	1008
gat gaa ctg tct ctt cat atg ttg ggg atg cac ggg act gtt tat gcc Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala 340 345 350	1056
aat tat gcg gtg gat aag gcg gat ttg ttg ctt gct ttc ggg gtt agg Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg 355 360 365	1104
ttt gat gat cgt gtg acc ggg aag ctc gag gcg ttt gct agc cgt gct Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala 370 375 380	1152
aag att gtg cat att gat att gac tct gct gag att ggg aag aac aag Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys 385 390 395 400	1200
cag ccc cat gtg tcc att tgt gct gat gtt aaa ttg gca ttg cgg ggt Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly 405 410 415	1248
atg aat aag att ctg gag tct aga ata ggg aag ctg aat ttg gat ttc Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe 420 425 430	1296
tcc aag tgg aga gaa gaa tta ggt gag cag aag aag gaa ttc cca ctg Ser Lys Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu 435 440 445	1344

agt ttt aag aca ttt ggg gat gca att cct cca caa tat gcc att cag Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln 450	455	460	1392
gtg ctt gat gag ttg acc aat ggt aat gct att ata agt act ggt gtt Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val 465	470	475	1440
ggg cag cac caa atg tgg gct gcg cag cat tac aag tac aga aac cct Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro 485	490	495	1488
cgc caa tgg ctg acc tct ggt ggg ttg ggg gct atg ggg ttt ggg cta Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu 500	505	510	1536
cca gcc gcc att gga gct gca gtt gct cga cca gat gca gtg gtt gtc Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val 515	520	525	1584
gat att gat ggg gat ggc agt ttt att atg aat gtt caa gag ttg gct Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala 530	535	540	1632
aca att agg gtg gaa aat ctc cca gtt aag ata atg ctg cta aac aat Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn 545	550	555	1680
caa cat tta ggt atg gtt gtc caa tgg gaa gat agg ttc tat aaa gct Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala 565	570	575	1728
aac cg ^g gca cat aca tac ctt gga aac cct tcc aaa tct gct gat atc Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile 580	585	590	1776
t ^{tc} cct gat atg ctc aaa ttc gct gag gca tgt gat att cct tot gcc Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala 595	600	605	1824
cgt gtt agc aac gtg gct gat ttg agg gcc gcc att caa aca atg ttg Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu 610	615	620	1872
gat act cca ggg ccg tac ctg ctc gat gtg att gta ccg cat caa gag Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu 625	630	635	1920
cat gtg ttg cct atg att cca agt ggt gcc ggt ttc aag gat acc att His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile 645	650	655	1968
aca gag ggt gat gga aga acc tct tat tga Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr 660	665		1998

<210> 6
<211> 665
<212> PRT
<213> Свекла обыкновенная

031973

<400> 6

Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Pro
1 5 10 15

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

Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu
35 40 45

Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln
50 55 60

Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
65 70 75 80

Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro

031973

245

250

255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

031973

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
660 665

<210> 7
<211> 1998
<212> ДНК
<213> Свекла обыкновенная

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1998)
<223> 4D6834 a12 WT

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1998)

<400> 7
atg gcg gct acc ttc aca aac cca aca ttt tcc cct tcc tca act caa
Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Gln
1 5 10 15

48

tta acc aaa acc cta aaa tcc caa tct tcc att tct tca acc ctc ccc Leu Thr Lys Thr Leu Lys Ser Gln Ser Ser Ile Ser Ser Thr Leu Pro 20 25 30	96
ttt tcc acc cct ccc aaa acc cca act cca ctc ttt cac cgt ccc ctc Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu 35 40 45	144
caa atc tca tcc tcc caa tcc cac aaa tca tcc gcc att aaa aca caa Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln 50 55 60	192
act caa gca cct tct tct cca gct att gaa gat tca tct ttc gtt tct Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser 65 70 75 80	240
cga ttt ggc cct gat gaa ccc aga aaa ggg tcc gat gtc ctc gtt gaa Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu 85 90 95	288
gct ctt gag cgt gaa ggt gtt acc aat gtg ttt gct tac cct ggt ggt Ala Leu Glu Arg Glu Gly Val Thr Asn Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly 100 105 110	336
gca tct atg gaa atc cac caa gct ctg acg cgc tct aaa acc atc cgc Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Lys Thr Ile Arg 115 120 125	384
aat gtc ctc ccc cgc cat gaa caa ggc ggg gtt ttc gcc gcc gag gga Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly 130 135 140	432
tat gct aga gct act gga aag gtt ggt gtc tgc att gcg act tct ggt Tyr Ala Arg Ala Thr Gly Lys Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly 145 150 155 160	480
cct ggt gct acc aac ctc gta tca ggt ctt gct gac gct ctc ctt gat Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp 165 170 175	528
tct gtc cct ctt gtt gcc atc act ggc caa gtt cca cgc cgt atg att Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile 180 185 190	576
ggc act gat gct ttt cag gag act cca att gtt gag gta aca agg tct Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser 195 200 205	624
att act aag cat aat tat ttg gtt ttg gat gta gaa gat att cct aga Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg 210 215 220	672
att gtt aag gaa gcc ttt ttt tta gct aat tct ggc agg cct gga cct Ile Val Lys Glu Ala Phe Phe Leu Ala Asn Ser Gly Arg Pro Gly Pro 225 230 235 240	720
gtt ttg att gat ctt cct aaa gat att cag cag caa ctg gtt gtt cct Val Leu Ile Asp Leu Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Leu Val Val Pro 245 250 255	768
gat tgg gat agg cct ttt aag ttg ggt ggg tat atg tct agg ctg cca Asp Trp Asp Arg Pro Phe Lys Leu Gly Gly Tyr Met Ser Arg Leu Pro	816

031973

260	265	270	
aag tcc aag ttt tcg acg aat gag gtt gga ctt ctt gag cag att gtg Lys Ser Lys Phe Ser Thr Asn Glu Val Gly Leu Leu Glu Gln Ile Val 275 280 285			864
agg ttg atg agt gag tcg aag aag cct gtc ttg tat gtg gga ggt ggg Arg Leu Met Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly 290 295 300			912
tgt ttg aat tct agt gag gag ttg agg aga ttt gtt gag ttg aca ggg Cys Leu Asn Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly 305 310 315 320			960
att ccg gtg gct agt act ttg atg ggg ttg ggg tct tac cct tgt aat Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asn 325 330 335			1008
gat gaa ctg tct ctt cat atg ttg ggg atg cac ggg act gtt tat gcc Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala 340 345 350			1056
aat tat gcg gtg gat aag gcg gat ttg ttg ctt gct ttc ggg gtt agg Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg 355 360 365			1104
ttt gat gat cgt gtg act ggg aag ctc gag gcg ttt gct agc cgt gct Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala 370 375 380			1152
aag att gtg cat att gat att gac tct gct gag att ggg aag aac aag Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys 385 390 395 400			1200
cag ccc cat gtg tcc att tgt gct gat gtt aaa ttg gca ttg cgg ggt Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Arg Gly 405 410 415			1248
atg aat aag att ctg gag tct aga ata ggg aag ctg aat ttg gat ttc Met Asn Lys Ile Leu Glu Ser Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Asp Phe 420 425 430			1296
tcc agg tgg aga gaa gaa tta ggt gag cag aag aag gaa ttc cca ctg Ser Arg Trp Arg Glu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Lys Glu Phe Pro Leu 435 440 445			1344
agt ttt aag aca ttt ggg gat gca atc cct cca caa tat gcc att cag Ser Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln 450 455 460			1392
gtg ctt gat gag ttg acc aat ggt aat gct att ata agt act ggt gtt Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asn Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val 465 470 475 480			1440
ggg cag cac caa atg tgg gct gcg cag cat tac aag tac aga aac cct Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln His Tyr Lys Tyr Arg Asn Pro 485 490 495			1488
cgc caa tgg ctg acc tct ggt ggg ttg ggg gct atg ggg ttt ggg cta Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu 500 505 510			1536
cca gcc gcc att gga gct gca gtt gct cga cca gat gca gtg gtt gtc			1584

031973

Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala Arg Pro Asp Ala Val Val Val			
515	520	525	
gat att gat ggg gat ggc agt ttt att atg aat gtt caa gag ttg gct			1632
Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala			
530	535	540	
aca att agg gtg gaa aat ctc cca gtt aag ata atg ctg cta aac aat			1680
Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn			
545	550	555	560
caa cat tta ggt atg gtt gtc caa tgg gaa gat agg ttc tat aaa gct			1728
Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala			
565	570	575	
aat cgg gca cat aca tac ctt gga aac cct tcc aaa tct gct gat atc			1776
Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Lys Ser Ala Asp Ile			
580	585	590	
tcc cct gat atg ctc aaa ttc gct gag gca tgt gat att cct tct gcc			1824
Phe Pro Asp Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Asp Ile Pro Ser Ala			
595	600	605	
cgt gtt agc aac gtg gct gat ttg agg gcc gcc att caa aca atg ttg			1872
Arg Val Ser Asn Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Thr Met Leu			
610	615	620	
gat act cca ggg ccg tac ctg ctc gat gtg att gta ccg cat caa gag			1920
Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu			
625	630	635	640
cat gtg ttg cct atg att cca agt ggt gcc ggt ttc aag gat acc att			1968
His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Ala Gly Phe Lys Asp Thr Ile			
645	650	655	
aca gag ggt gat gga aga acc tct tat tga			1998
Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr			
660	665		

<210> 8
<211> 665
<212> PRT
<213> Свекла обыкновенная

<400> 8

Met Ala Ala Thr Phe Thr Asn Pro Thr Phe Ser Pro Ser Ser Thr Gln			
1	5	10	15

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

Phe Ser Thr Pro Pro Lys Thr Pro Thr Pro Leu Phe His Arg Pro Leu			
35	40	45	

Gln Ile Ser Ser Ser Gln Ser His Lys Ser Ser Ala Ile Lys Thr Gln			
50	55	60	

031973

Thr Gln Ala Pro Ser Ser Pro Ala Ile Glu Asp Ser Ser Phe Val Ser
65 70 75 80

Arg Phe Gly Pro Asp Glu Pro Arg Lys Gly Ser Asp Val Leu Val Glu
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Ser Tyr
660 665

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения мутантного растения сахарной свеклы, устойчивого к одному или более ингибитору фермента синтазы ацетогидроксикислоты (ALS), включающий стадии

получения протопластов из замыкающих клеток устьиц, выделенных из растения сахарной свеклы; отбора протопластов по их способности регенерировать в растение сахарной свеклы;

обработки культивируемых *in vitro* указанных отобранных протопластов композицией, содержащей один или более ингибитор ALS в концентрации, которая является смертельной более чем для 99%, но менее чем для 100% протопластов; и

регенерации растений сахарной свеклы из выживших указанных культивируемых *in vitro* протопластов,

и при этом указанный(ые) ингибитор(ы) ALS применяют в отношении более чем 20000000 указанных протопластов.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия отбора протопластов, способных регенерировать в растение сахарной свеклы, включает выделение протопластов замыкающих клеток устьиц из растений сахарной свеклы различных генотипов и измерения для каждого генотипа доли протопластов, способных к росту при их культивировании *in vitro*, для отбора хорошо регенерирующего генотипа.

3. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий стадию секвенирования генома регенерированных растений.

4. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий стадию секвенирования гена ALS в регенерированных растениях сахарной свеклы или каллусах, регенерированных из выживших протопластов, для идентификации мутаций в гене ALS.

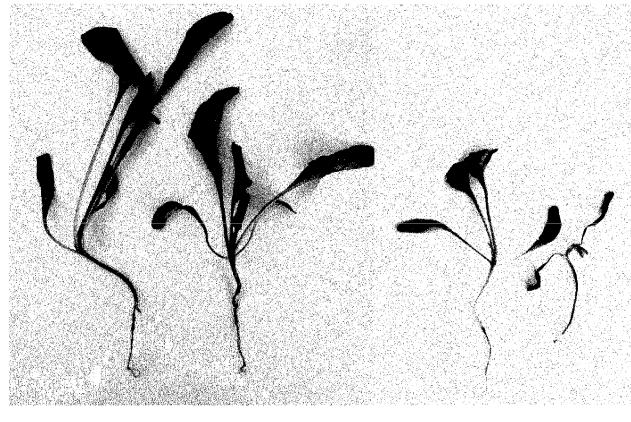
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что регенерированное растение сахарной свеклы имеет одну или несколько мутаций в гене фермента ALS, имеющего любую из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 или 7, 8, при этом указанная мутация выбрана из группы, включающей замену аланина на валин или треонин в положении аминокислоты 113, замену пролина на треонин, аргинин, лейцин, глутамин или аланин в положении 188, замену аланина на валин в положении 196, замену аспартата на глутамат в положении 371, замену аргинина на гистидин в положении 372, замену триптофана на глицин в положении 569, замену серина на треонин в положении 648 и замену глицина на аспартат в положении 649.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что композиция, содержащая один или более ингибитор ALS, применяется в отношении клеточной *in vitro* культуры более чем 50000000 протопластов замыкающих клеток устьиц.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что композиция, содержащая один или более ингибитор ALS, содержит форамсульфурон.

8. Способ по п.7, где форамсульфурон применяют в концентрации от 10^{-9} до 10^{-6} моль/л.

9. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что композиция, содержащая один или более ингибитор ALS, содержит этоксисульфурон.



Линия А

Линия В

Линия С

Линия WT



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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