



(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, Лефевр 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.

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-индуцированная устойчивость к гербициду биалафосу. Ген, кодирующий устойчивость, вводят в протопласты замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы, затем эти протопласты 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 регенерировали из 190000 протопластов. Впоследствии, некоторые из этих каллусов могли демонстрировать соматический эмбриогенез и растения сахарной свеклы могли регенерировать 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 эксплантатов, 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 сульфонилмочевинной на каллусы, полученные из эксплантатов *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, форамсульфураном) 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 эксплантатов *B. Vulgaris*, подвергают воздействию форамсульфураном, 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 форамсульфурану, 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 эксплантатов, 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 этилированных эксплантатов гипокоты, 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 мутацию.

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 протопласты 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-НРРД (4-гидроксибензилпириватдиоксигеназа) (таких как мезотрион, изоксафлутол, пирасульфотол, бензобизиклон, бензофенап, пиразолинат, пиразоксифен, темботрион, топрамезон, сулькотрион и сулькотрион), ингибиторов биосинтеза каротиноидов (таких как флуртамон, флуридон, флуорохлоридон, бифлутамид, норфлуразон, пиклолиафен и дифлуфеникан);

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

ингибиторов фосфосистемы II (таких как фенилкарбаматы) (например, фенмедифам или десмедифам), пиридазинов (например, хлоридазон=пиразон), триазинов (например, цианазин, ремтал, эглиназин-этил, проглиназин-этил, аметрин, атразин, десметрин, диметаметрин, прометон, прометрин, пропазин, симазин, симетрин, тербутетон, тербутилазин, тербутрин, метопротин), триазинов (например, метамитрон, метрибузин, гексазинон, метрибузин), урацилов (бромацил, ленацил, тербазил), мочевины (димефурон, изопротурон, линурон, монолинурон, этидимурон, метабензтиазурон, тебутиурон, диурон, фенурон, небурон, сидурон, изоурон, хлорбромурон, хлоротолурон, хлороксурон, флуометурон, метобромурон, метоксурон, тиазафлуорон, могулон, циклуорон, монолинурон) или амикарбазона, солана, пропанила, бентазона, бромоксимила, иоксимила, бромифеноксима, пиридата, пиридафола;

ингибиторов фосфосистемы I (таких как дикват или параква);

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

ингибиторов сборки микротрубочек (таких как пропизамид=пронамид, тебутам, хлортал-диметил=ДСРА, флухлоралин, пендиметалин, бутралин, бенефин=бенфлуралин, эталфлуралин, оризалин, трифлуралин, продиамин, динитрамин, бутаифос, дитиопир, тиазопир);

ингибиторов протопорфириноген оксидазы (таких как дифениловые эфиры (ацифлуорфен-натрий, бифенокс, этоксифен-этил, хлорнитрофен, флуорогликофен-этил, оксифлуорфен, хлорметоксифен, флуордифен, фомезафен, лактофен, нитрофен, аклонифен), N-фенилфталимиды (цинидон-этил, флумиклорак-пентил, флумиоксазин, флумиклорак-пентил), оксадиазолы (оксадиаргил, оксадиазон) оксазолидиндионы, (пентоксазон), фенилпиразолы (флуазолат, флуазолат, пирафлуфен-этил), пиримидиндионы (сафлуфенацил, бензфендизон, бутафенацил), тиадиазолы (тиадиазимин, флутиацет-метил), триазилины (азафенидин, карфентразон-этил сульфентразон), пираклонил, профлуазол, флуфенпир-этил);

ингибиторов ацетил КоА карбоксилазы (таких как арилоксифеноксипропионаты (такие как клодинафоп-пропаргил, цигалофоп-бутил, диклофоп-метил, феноксапроп-Р-этил, флуазифоп-Р-бутил, галоксифоп-этиол, галоксифоп-метил, галоксифоп-Р-метил, пропаквизафоп, квизалофоп-Р-этил или квизалофоп-Р-тефурил), циклогександионы (такие как аллоксидим, бутроксидим, клетодим, циклоксидим, профоксидим, сетоксидим, тефралоксидим или тралоксидим) или фенилпиразолин (пиноксаден));

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

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-Т (Weedar) 2,4-D (Weedar), 2,4-DB (бутирол), дихлорпроп, МСРВВ, мекопроп, МСРВ-тиоэтил, клеме-проп, агроксон 4, аминопиралид, клопиралид, флуроксипир, галауксифен-метил, пиклорам, триклопир, хинклорак или хинмерак), более предпочтительно, из группы, состоящей из ингибиторов 4-НРРД, ингибиторов биосинтеза каротиноидов, ингибиторов синтазы EPSP, ингибиторов фосфосистемы II, ингибиторов фосфосистемы I, ингибиторов сборки микротрубочек, ингибиторов протопорфириноген 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 протопласты 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.

Преимущественно, растение сахарной свеклы, имеющее 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, имеющее 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, аспарат 370, аспарат 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 аспарат 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 тисенкарбазон-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 протопласты 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 эксплантатов, обычно используемая в области техники.

Действительно, каллус (калусы) из эксплантатов 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 микрокалусы, 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: протопласты замыкающих клеток устьиц из большинства генотипов демонстрируют очень низкую (почти нулевую) способность к делению (росту), тогда как протопласты 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 протопласты 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 мутаций 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 ингибитору 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, раскрытого 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

закрывающих 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 закрывающих 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 сульфенилмочевины, гербицидов на основе сульфениламинокарбонилтриазинона, гербицидов на основе имидазолинона, гербицидов на основе триазолопиримидина и гербицидов на основе пиримидинил(тио)бензоата. Предпочтительно гербицидная композиция содержит по меньшей мере один гербицид на основе сульфенилмочевины 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 (линии) растения сахарной свеклы в отношении способности ее протопласта закрывающих клеток устьиц регенерировать в полностью функциональное растение сахарной свеклы, и/или способ по настоящему изобретению осуществляют на протопластах закрывающих клеток устьиц, выделенных из хорошо регенерирующих генотипов (линий) сахарной свеклы.

На подходящей предварительной стадии (отбор генотипов растения сахарной свеклы в отношении способности протопластов ее закрывающих 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, применяемые в способе по настоящему изобретению).

Каллус (калусы) 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 семян. 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, продуцирующих 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) протопласты замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы выращивают в течение по меньшей мере приблизительно одной недели (предпочтительно приблизительно 3 недели и/или менее чем 4 недели) 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 протопласты 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 йодосульфурона, амидосульфурона и тиенкарбазон-метила.

Предпочтительно ингибитор ALS, используемый в способе по изобретению, представляет собой (или содержит) форамсульфурон, такой как форамсульфурон, применяемый в отношении однонедельной (или трехнедельной) культуры in vitro протопластов (конкретней 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 йодосульфурона, амидосульфурона и тисенкарбазон-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 соответству-

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 нуклеиновой 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 форамсульфурона.

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 форамсульфурона).

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 меньшей) 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	Протопласты/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 форамсульфуруна.

Авторы изобретения получили 46 каллусов.

Несколько 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 форамсульфуруну (12,5 г/га; до 3 применений), даже тогда, когда гербицид комбинировали с органическим соединением (25 г/га метилового эфира рапсового масла) для усиления его действия.

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

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

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

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

Как ожидалось, растение дикого типа (наивное) было очень чувствительным к йодосульфурону, 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 йодосульфурона 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 форамсульфуруну.

Авторы изобретения также сделали заключение о том, что эти (гетерозиготные) мутантные растения также приобретают некоторую (хотя и частичную) устойчивость к другим ингибиторам ALS, включающим 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 нескольким 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 традиционным сортом (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 BBCH 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 für 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 погибали). 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%
Тиенокарбазон-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 и 197	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	BYN18636 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 (мезосульфурон)	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 (биспирибак)	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 (флупирсульфурон)	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 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	ggg	gtt	acc	aat	gtg	ttt	gct	tac	cct	ggg	ggg	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	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly	
	130					135					140					
tat	gct	aga	gct	act	gga	aag	gtt	ggg	gtc	tgc	att	gcg	act	tct	ggg	480
Tyr	Ala	Arg	Ala	Thr	Gly	Lys	Val	Gly	Val	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	
145					150					155					160	
cct	ggg	gct	acc	aac	ctc	gta	tca	ggg	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	ggg	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	Gln	Leu	Val	Val	Pro	
				245					250					255		
gat	tgg	gat	agg	cct	ttt	aag	ttg	ggg	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	ggg	ggg	912
Arg	Leu	Met	Ser	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	
	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 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 465 470 475 480	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 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

 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

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 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 Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly 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 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 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 ggt 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 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			1152

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	gaa	tta	ggt	gag	cag	aag	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 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> 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 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

<210> 5

<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 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

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 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 ggt 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 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	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 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> 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					

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

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 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

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 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

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

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> 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

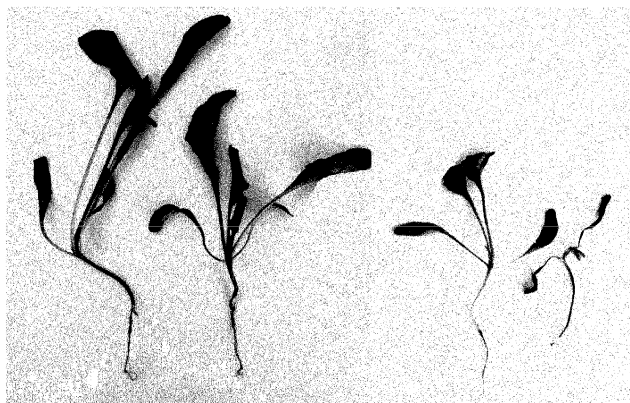
Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu
625 630 635 640

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 мутации 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, ЕАПВ

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