



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113721** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)

**A01H 5/00**

**C12N 15/29** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2013 06008</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>13.10.2011</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.03.2017</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/394,463, 10187751.2</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>19.10.2010, 15.10.2010</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, EP</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>10.07.2013, Бюл.№ 13</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.03.2017, Бюл.№ 5</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/EP2011/067925, 13.10.2011</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Хаін Рюдігер (DE), Бентінг Юрген (DE), Донн Гюнтер (DE), Кніттель-Оттлебен Наталі (FR/DE), Хольтшульте Бернд (DE), Лоокк Андреас (DE), Шпрінгманн Клеменс (DE), Янсен Рудольф (DE)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>БАЕР ІНТЕЛЛЕКЧУЕЛ ПРОПЕРТІ ГМБХ, Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim, Germany (DE), КВС ЗААТ АГ, Grimsehlstr. 31, 37555 Einbeck, Germany (DE)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Пахаренко Олександр Володимирович, реєстр. №136</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Charles A et al. Molecular strategies for crop improvement. Journal of cellular biochemistry, Wiley-Liss INC., US, Vol. 44, no. Supplement 16.04.1990, pages 257–360 DE 19821613 A1, 18.11.1999 WO 9802526 A1, 22.01.1998 WO 9802527 A1, 22.01.1998</p>
---	--

## (54) ТОЛЕРАНТНИЙ ДО ІНГІБУЮЧОГО ALS ГЕРБІЦИДУ МУТАНТ БУРЯКУ ЗВИЧАЙНОГО

### (57) Реферат:

Винахід стосується толерантної до інгібуючих ALS гербіцидів рослини буряку звичайного та її частин, які включають мутацію ендогенного гена ацетолактатсинтази (ALS), причому ALS ген кодує поліпептид ALS, який містить лейцин замість триптофану, у позиції 569 поліпептиду ALS.

UA 113721 C2



Даний винахід стосується толерантних до інгібуючих ALS гербіцидів рослин буряка звичайного та їх частин, а також способу їх одержання.

Культурні форми буряка звичайного (як визначено у публікації Ford-Lloyd (2005) Sources of genetic variation, Genus Beta. In: Biancardi E, Campbell L G, Skaracis G N, De Biaggi M (eds) Genetics and Breeding of Sugar Beet. Science Publishers, Enfield (NH), USA, pp 25-33) є важливими сільськогосподарськими культурами у районах з помірним та субтропічним кліматом. Наприклад, близько 20 % світового виробництва цукру здійснюється на основі цукрового буряка. Оскільки сіянці та молоді рослини буряка протягом перших 6-8 тижнів їхнього життя є чутливими до жорсткої конкуренції, спричиненої швидко зростаючими бур'янами, які пригнічують молоді культурні рослини, надійні заходи з боротьби з бур'янами є нагальною потребою на площах вирощування культури.

Вже понад 40 років гербіциди є оптимальними засобами для боротьби з бур'янами на площах вирощування буряків. Продукти, які застосовуються з цією метою, такі, як феномедифам, десмедифам та метамітрон, пригнічувати бур'яни на полях цукрового буряка без зашкодження культурі. Незважаючи на це, за несприятливих екологічних умов ефективність цих продуктів ще є далекою від максимальної, особливо у випадках, коли такі бур'яни, як *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus* та/або *Tripleurospermum inodora* розвиваються протягом тривалого періоду часу.

Нові гербіцидні активні інгредієнти є дуже бажаними для розширення засобів боротьби з бур'янами на площах вирощування буряка. Такі сполуки мають діяти проти широкого спектра бур'янів, в оптимальному варіанті – від проростання до повного розвитку рослин бур'янів, без ураження культури буряків незалежно від її стадії розвитку. При застосуванні класичного відбору гербіцидів за останні десятиліття не вдавалося виявити активних інгредієнтів з вибірковою гербіцидною активністю для буряків, які б мали всі ці чіткі властивості, що забезпечували б агрономічні переваги.

Деякі хімічні речовини інгібують фермент "синтазу ацетогідроксикислоти" (AHAS), також відомий як "ацетолактатсинтаза" (ALS [EC 4.1.3.18]). ALS є місцем дії п'яти різних за структурою родин гербіцидів, які належать до класу інгібуючих ALS гербіцидів, таких, як (a) сульфонілсечовинні гербіциди (Beyer E.M et al. (1988), Sulfonylureas in Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action; Marcel Dekker, New York, 1988, 117-189), (b) сульфоніламінокарбонілтріазолінонові гербіциди (Pontzen, R., Pflanz.-Nachrichten Bayer, 2002, 55, 37-52), (c) імідазолінонові гербіциди (Shaner, D.L., et al., Plant Physiol., 1984, 76, 545-546; Shaner, D.L., and O'Connor, S.L. (Eds.) The Imidazolinone Herbicides, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991), (d) тріазолпіримідинові гербіциди (Kleschick, W.A. et al., Agric. Food Chem., 1992, 40, 1083-1085), та (e) піримідиніл(тіо)бензоатні гербіциди (Shimizu, T.J., Pestic. Sci., 1997, 22, 245-256; Shimizu, T. et al., Acetolactate Synthase Inhibitors in Herbicide Classes in Development, Böger, P., Wakabayashi, K., Hirai, K., (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 2002, 1-41).

ALS бере участь у перетворенні двох молекул пірувату на молекулу ацетолактату та діоксид вуглецю. У реакції застосовують тіамінпірофосфат з метою з'єднання двох молекул пірувату. Одержаний в результаті продукт цієї реакції, ацетолактат, зрештою стає валіном, лейцином та ізолейцином (Singh (1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine", in Plant Amino Acids, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker Inc. New York, New York, pp. 227-247).

Інгібітори ALS переривають біосинтез валіну, лейцину та ізолейцину в рослинах. Внаслідок цього відразу вичерпуються запаси відповідних амінокислот, що викликає припинення біосинтезу білків, призводячи до припинення росту рослини та, зрештою, її загибелі або щонайменше ураження.

Інгібуючі ALS гербіциди широко застосовуються у сучасному сільському господарстві завдяки їхній ефективності при помірних нормах внесення та відносній нетоксичності для тварин. Через інгібування активності ALS ці родини гербіцидів запобігають подальшому росту та розвитку сприйнятливих рослин, включаючи багато видів бур'янів. Для забезпечення рослин з підвищеною толерантністю до ще більших концентрацій інгібуючих ALS гербіцидів, які можуть вимагатися для достатнього контролю над бур'янами, потрібні додаткові резистентні до інгібуючих ALS гербіцидів лінії та сорти культурних рослин, а також способи та композиції для виведення та застосування резистентних до інгібуючих ALS гербіцидів ліній та сортів.

Широкий вибір інгібуючих ALS гербіцидів дозволяє фермерам боротися з різними видами бур'янів незалежно від стадії їхнього росту, але ці високоефективні гербіциди не можуть бути застосовані для буряка, оскільки традиційні рослини цукрового буряка / комерційні сорти цукрового буряка, є дуже уразливими перед цими інгібуючими ALS гербіцидами. Незважаючи на це, такі інгібуючі ALS гербіциди демонструють відмінну гербіцидну активність проти широколистяних та трав'янистих видів бур'янів. Перші гербіциди, механізмом дії яких було

інгібування ALS, були розроблені для їх застосування у сільському господарстві ще 30 років тому. Нині активні інгредієнти цього класу гербіцидів демонструють високу ефективність у боротьбі з бур'янами і широко застосовуються для захисту кукурудзи та злаків, а також для дводольних культур, але не для буряків.

Єдиним інгібуючим ALS гербіцидом, який нині є відомим як такий, що може застосовуватися для післясходового внесення для буряків, є Debut®. Цей гербіцид (який містить трифлусульфурон-метил як активний інгредієнт плюс специфічні сполуки для рецептування) розщеплюється рослиною буряка, перш, ніж зможе інгібувати ендогенний ALS фермент буряка, але він має серйозні пропуски у боротьбі з бур'янами на площах вирощування буряка.

З часу запровадження інгібуючих ALS гербіцидів у сільському господарстві спостерігалось, що сприйнятливі види рослин, включаючи природні бур'яни, іноді розвивають спонтанну толерантність до цього класу гербіцидів. Окремі заміни пар нуклеотидів у певних сайтах гена ALS зазвичай ведуть до більш або менш резистентних різновидів ферменту ALS, які демонструють різні рівні інгібування через інгібуючі ALS гербіциди.

Таким чином, рослини, які надають мутантні алелі ALS, демонструють різний рівень толерантності до інгібуючих ALS гербіцидів, залежно від хімічної структури інгібуючого ALS гербіциду та місця точкової мутації у гені ALS.

Наприклад, у публікації Hattori et al. (1995), Mol. Gen. Genet. 246: 419-425, описується односпрямована мутація у кодоні Trp 557 лінії клітин *Brassica napus* (згідно з нумерацією послідовності *Arabidopsis thaliana*, яка застосовується в літературі, з метою порівняння всіх мутантів ALS/AHAS вона відповідає позиції "574") – що дорівнює позиції 569 послідовності ALS буряка. Ці автори спостерігали резистентність до кількох представників підкласів інгібуючих ALS гербіцидів, таких, як сульфонілсечовини, імідазолінони та тріазолпіримідини.

Були описані мутанти буряка, які забезпечують точкову мутацію в кодоні Ala 122, які ведуть до певної толерантності до імідазолінонів підкласу інгібуючих ALS гербіцидів (документ WO 98/02526), яка все ж є недостатньою для боротьби з бур'янами у програмах сільськогосподарського застосування. Не містилось відомостей про перехресну толерантність до інших класів інгібуючих ALS гербіцидів при застосуванні цього мутанта. Крім того, рослини буряка, які забезпечують другу точкову мутацію у кодоні Pro 197 продемонстрували помірну толерантність до інгібуючих ALS гербіцидів, які належать до підкласу сульфонілсечовинних гербіцидів. Також було описано подвійні мутанти, що складаються з цих двох (документ WO 98/02527). Однак жоден з цих мутантів не було застосовано для впровадження на ринок сортів буряків, оскільки рівень толерантності до інгібуючих ALS гербіцидів у цих мутантах був недостатньо високим для агрономічного застосування.

У публікації Stougaard et al. (1990), J. Cell Biochem., Suppl. 14E, 310, описується виділення мутантів ALS у культурі тетраплоїдних клітин цукрового буряка. Було виділено два різні ALS гени (ALS I та ALS II), які відрізнялися лише в амінокислотній позиції 37. Мутант 1 містив у його ALS I гені 2 мутації, а мутант 2 містив 3 мутації в його ALS II гені. Після відокремлення мутацій для визначення конкретної мутації, яка має забезпечувати резистентність до інгібітора ALS, було виявлено, що ALS, синтезована з рекомбінантної *E. coli*, була резистентною до гербіцидів, якщо містила точкову мутацію в кодоні Trp 574 (згідно з нумерацією послідовності *Arabidopsis thaliana*, яка застосовується в літературі, з метою порівняння всіх мутантів ALS) – що дорівнює позиції 569 послідовності ALS буряка, що веде до заміни амінокислоти "Trp" на амінокислоту "Leu". Автори Stougaard et al. не продемонстрували на цукровому буряку, що мутація у позиції 569 будь-якого з ALS генів цукрового буряка є достатньою для досягнення прийнятного рівня толерантності до інгібуючих ALS гербіцидів. Крім того, Stougaard et al. не регенерували і не розглядали рослини цукрового буряка, які включають мутації, включаючи мутацію Trp → Leu у позиції 569 ALS цукрового буряка.

На основі цих відомостей Stougaard et al. побудували вектори трансформації рослин, які містили різні ALS гени, для застосування у трансформації рослин. Однак до нинішнього часу цими або іншими авторами протягом наступних понад 20 років більше не повідомлялося ніяких даних, зокрема, стосовно впливу застосування інгібуючих ALS гербіцидів до рослин та/або сільськогосподарських площ, з включенням цієї мутації у рослини буряка звичайного, або піддані генній інженерії, або мутовані.

У документі WO 99/57965 в цілому описуються резистентні до сульфонілсечовини рослини цукрового буряка та способи їх одержання шляхом мутагенезу, викликаного EMS (етилметансульфонатом).

Однак, крім дослідження, необхідного для одержання таких мутантів, у цій публікації не представлено таких рослин і не описується конкретне розташування у гені ALS, яке може бути пов'язане з одержанням мутантів, толерантних до інгібуючих ALS гербіцидів, а також не

розкривається будь-який спосіб їх агрономічного застосування. Крім того, існує висока ймовірність, що при використанні такої високомутагенної сполуки, як EMS, можуть відбуватися різні інші мутації в будь-якому іншому місці геному, які можуть призводити до порушень, аж до нефертильності та/або уповільнення росту одержаних таким чином рослин. Крім того, через

5 хімічну взаємодію з ДНК застосування EMS може мати пропуски у викликанні специфічних мутацій на зразок перетворення триплету TGG на TTG, оскільки EMS завжди перетворює гуанозин на аденозин.

У деяких видах бур'янів, таких, як *Amaranthus*, мутація Trp 574 Leu може бути виявлена у популяціях рослин, які багаторазово піддавалися дії інгібуючих ALS гербіцидів. Ці мутанти Trp

10 574 Leu демонструють високий рівень толерантності до кількох хімічних класів інгібуючих ALS гербіцидів, таких, як ті, що є вибраними з групи, до якої належать сульфонілсечовини та сульфоніламінокарбонілтриазолінони.

У документі WO 2008/124495 описуються подвійні та потрібні ALS мутанти. Згідно з документом WO 2009/046334, забезпечувалися специфічні мутації у гені ALS. Однак придатні

15 для агрономічного застосування толерантні до гербіцидів мутанти буряка звичайного, які містять такі мутації згідно з документом WO 2009/046334, до цього часу не було одержано.

Більш того, зважаючи на те, що, наприклад, з цукрового буряка виробляється близько 20 % цукру у світі, існує висока потреба у наявності рослин цукрового буряка, які б мали перевагу росту порівняно з високоактивними бур'янами. Таким чином, існує висока потреба у наявності

20 нетрансгенних стосовно ALS гена рослин буряка звичайного, включаючи рослини цукрового буряка, які є толерантними до інгібуючих ALS гербіцидів. Отже, існує потреба у таких нетрансгенних рослинах буряка звичайного, зокрема, рослинах цукрового буряка, які були б толерантними до інгібуючих ALS гербіцидів на придатному для агрономічного застосування рівні інгібуючих ALS гербіцидів.

Таким чином, технічна проблема полягає у виконанні цієї потреби.

Даний винахід стосується цієї потреби, а отже, забезпечує як розв'язання технічної проблеми толерантної до інгібуючих ALS гербіцидів рослини буряка звичайного та її частин, які

25 включають мутацію ендogenous гена ацетолататсинтази (ALS), причому ALS ген кодує поліпептид ALS, який містить амінокислоту, відмінну від триптофану, у позиції 569 поліпептиду ALS.

Насіння згідно з даним винаходом було депоновано у NCIMB (Національній колекції промислових, харчових та морських бактерій), Aberdeen, Великобританія, під номером NCIMB 41705 12 березня 2010 р.

При застосуванні різних способів селекції можуть бути розроблені високоврожайні

35 комерційні сорти, які мають високу конкурентоспроможність на всіх відповідних ринках, з додатковою стійкою толерантністю до інгібуючих ALS гербіцидів шляхом використання первісно одержаних мутантних рослин.

Слід зазначити, що у контексті даного опису форми однини також можуть означати множину, якщо чітко не вказано іншого. Таким чином, наприклад, посилання на "реагент" передбачає

40 один або кілька таких різних реагентів, а посилання на "спосіб" передбачає посилання на рівноцінні етапи та способи, відомі спеціалістам уданій галузі, які можуть бути модифіковані або заміщені способами, описаними авторами цього винаходу.

Усі публікації та патенти, наведені в цьому описі є включеними шляхом посилання у повному обсязі. Якщо включені шляхом посилання матеріали суперечать або є несумісними з

45 цим описом, цей опис має пріоритет перед будь-яким з цих матеріалів.

Якщо спеціально не вказано іншого, термін "принаймні", вжитий перед переліком елементів, слід розуміти як такий, що стосується кожного елемента з переліку. Спеціалісти у даній галузі визнають або шляхом звичних експериментів зможуть переконатись у можливості багатьох

50 рівноцінних варіантів втілення описаного винаходу. Ці рівноцінні варіанти охоплюються обсягом даного винаходу.

В усьому тексті цього опису та у представлений нижче формулі винаходу, якщо контекстом не вимагається іншого, слово "включати" та його варіанти, такі, як "включає" та "включаючи", слід розуміти як таке, що означає включення цілого числа або етапу, або групи цілих чисел або

55 етапів, але не виключення будь-якого цілого числа або етапу, або групи цілих чисел або етапів. Слово "включати" та його варіанти з одного боку і слово "містити" та його аналогічні варіанти з іншого боку можуть вживатися взаємозамінно без надання переваги жодному з них.

Згідно з даним винаходом, одержували рослини буряка, які включають змінений ендogenous ALS ген (також відомий як "AHAS" ген), який має точкову мутацію в кодоні Trp 569 (для буряка звичайного контрольна амінокислотна послідовність ALS, показана як SEQ ID NO: 2; це

60 дорівнює позиції 574 контрольної послідовності *Arabidopsis thaliana*, як показано у SEQ ID NO:

б), і цієї точкової мутації досягали через кілька циклів селекції на спеціально вибраних інгібуючих ALS гербіцидах.

Через те, що рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом одержували шляхом виділення спонтанних клітин мутантних рослин, які були прямо регенеровані до повністю фертильних рослин буряка, які мають точкову мутацію, як описується авторами більш детально. Ці рослини є нетрансгенними стосовно ALS гена.

Крім того, самі рослини згідно з даним винаходом, а також їхнє потомство є фертильними, а отже, можуть використовуватися з метою розведення без будь-яких додаткових маніпуляцій, які можуть спричинювати стрес, викликаний подальшими змінами генетичного середовища. Такі рослини, одержані згідно з застосовуваною авторами цього винаходу процедурою селекції, можуть безпосередньо використовуватися з метою виведення сортів та/або гібридів буряка, які забезпечують агрономічно ефективний рівень толерантності до інгібуючих ALS гербіцидів, що, таким чином, дозволяє на новому рівні застосовувати заходи боротьби з бур'янами на площах вирощування буряка.

У контексті даного опису термін "трансгенний" означає, що ген – який може бути взятий з того самого або іншого виду – було включено у рослину через відповідний біологічний носій, такий, як *Agrobacterium tumefaciens*, або будь-яким іншим фізичним способом, таким, як трансформація протопластів або бомбардування частинками, і цей ген здатен експресуватися в новому середовищі, тобто, у генетично модифікованому організмі (ГМО).

Згідно з вищенаведеним визначенням, термін "нетрансгенний" означає прямо протилежне, тобто, відсутність включення відповідного гена через відповідний біологічний носій, або будь-яким іншим фізичним способом. Однак мутований ген може бути перенесений через запилення, природним шляхом або через процес селекції, для створення іншої рослини, яка не є трансгенною стосовно цього конкретного гена.

"Ендогенний" ген означає ген рослини, який не було включено у рослину через застосування технологій генної інженерії.

У контексті даного опису термін "послідовність" означає нуклеотидну(і) послідовність (послідовності), полінуклеотид(и), нуклеїновокислотну(і) послідовність (послідовності), нуклеїнову(і) кислоту(и), молекулу нуклеїнової кислоти, пептиди, поліпептиди та білки, залежно від контексту, в якому вжито термін "послідовність".

Терміни "нуклеотидна(і) послідовність (послідовності)", "полінуклеотид(и)", "нуклеїновокислотна(і) послідовність (послідовності)", "нуклеїнова(і) кислота(и)", "молекула нуклеїнової кислоти" у контексті даного опису вживаються взаємозамінно і стосуються нуклеотидів, або рибонуклеотидів, або дезоксирибонуклеотидів, або їх комбінації, у полімерній нерозгалуженій формі будь-якої довжини. До нуклеїновокислотних послідовностей належать ДНК, кДНК, геномні ДНК, РНК, синтетичні форми та змішані полімери, смислові та антисмислові ланцюги, або ж вони можуть містити неприродні або дериватизовані нуклеїнові основи, як може бути легко визначено спеціалістами у даній галузі.

Вжитий у контексті даного опису термін "поліпептид" або "білок" (обидва терміни у контексті даного опису вживаються взаємозамінно) означає пептид, білок або поліпептид, який охоплює амінокислотні ланцюги певної довжини, причому амінокислотні залишки з'єднуються ковалентними пептидними зв'язками. Однак винахід також охоплює пептидоміметики таких білків/поліпептидів, у яких амінокислоту(и) та/або пептидний(і) зв'язок (зв'язки) замінено функціональними аналогами, а також відмінні від 20-ген-кодованих амінокислоти, такі, як селеноцистеїн. Пептиди, олігопептиди та білки можуть називатися поліпептидами. Термін "поліпептид" також стосується і не виключає модифікацій поліпептиду, наприклад, глікозилювання, ацетилювання, фосфорилювання і т. ін. Такі модифікації належним чином описуються у навчальних посібниках та більш детальних монографіях, а також у дослідницькій літературі. Поліпептид (або білок) у контексті цього опису в оптимальному варіанті означає поліпептид ALS (або білок ALS) *B. vulgaris* [SEQ ID NO: 2].

Амінокислотні заміщення охоплюють амінокислотні зміни, в яких амінокислота є заміненою на інший природний амінокислотний залишок. Такі заміщення можуть бути класифіковані як "консервативні", у яких амінокислотний залишок, який міститься у білку ALS дикого типу, є заміненем на іншу природну амінокислоту з подібними характеристиками, наприклад Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln або Phe↔Trp↔Tyr. Заміщення, які охоплюються даним винаходом, також можуть бути "неконсервативними", при яких амінокислотний залишок, присутній у білку ALS дикого типу, є заміщенням амінокислотою з іншими властивостями, такою, як природна амінокислота з іншої групи (наприклад, заміщення зарядженої або гідрофобної амінокислоти аланіном). Термін "подібні амінокислоти" у контексті даного опису означає амінокислоти, які мають подібні амінокислотні бокові ланцюги, тобто, амінокислоти, які мають

полярні, неполярні або практично нейтральні бокові ланцюги. "Неподібні амінокислоти" у контексті даного опису означають амінокислоти, які мають різні амінокислотні бокові ланцюги, наприклад, амінокислота з полярним боковим ланцюгом не є подібною до амінокислоти з неполярним боковим ланцюгом. Полярні бокові ланцюги зазвичай є присутніми на поверхні білка, де вони можуть взаємодіяти з водним середовищем, яке міститься у клітинах ("гідрофільні" амінокислоти). З іншого боку, "неполярні" амінокислоти зазвичай містяться у центрі білка, де вони можуть взаємодіяти з подібними неполярними сусідніми амінокислотами ("гідрофобними" амінокислотами). Прикладами амінокислот, які мають полярні бокові ланцюги, є аргінін, аспарагін, аспартат, цистеїн, глутамін, глутамат, гістидин, лізин, серин та треонін (усі є гідрофільними, за винятком цистеїну, який є гідрофобним). Прикладами амінокислот, які мають неполярні бокові ланцюги, є аланін, гліцин, ізолейцин, лейцин, метіонін, фенілаланін, пролін та триптофан (усі є гідрофобними, за винятком гліцину, який є нейтральним).

В цілому при застосуванні термінів ALS, ALSL, AHAS або AHASL спеціалістам у даній галузі відомо, на основі загальних знань та контексту, чи мається на увазі нуклеотидна послідовність або нуклеїнова кислота, чи амінокислотна послідовність або поліпептид, відповідно.

У контексті даного опису термін "ген" означає полімерну форму нуклеотидів будь-якої довжини, або рибонуклеотидів, або дезоксирибонуклеотидів. Термін включає дво- та одноланцюгові ДНК та РНК. Він також охоплює відомі типи модифікацій, наприклад, метилування, "кепи", заміщення одного або кількох з природних нуклеотидів аналогом. В оптимальному варіанті ген включає кодуючу послідовність, яка кодує визначений поліпептид. "Кодуюча послідовність" є нуклеотидною послідовністю, яка транскрибується в мРНК і/або транлюється у поліпептид, коли є поміщеною або перебуває під контролем відповідних регуляторних послідовностей. Межі кодуючої послідовності визначають за старт-кодоном трансляції на 5'-кінці та стоп-кодоном трансляції на 3'-кінці. Кодуюча послідовність може включати, крім іншого, мРНК, кДНК, рекомбінантні нуклеїновокислотні послідовності або геномну ДНК, і при цьому за певних обставин можуть бути присутні інтрони.

У контексті цього опису термін "буряк звичайний" (*Beta vulgaris*) скорочено вказується як "*B. vulgaris*". Крім того, в описі вживається термін "буряк". Вищезгадані терміни вживаються взаємозамінно, і їх слід розуміти як такі, що повністю охоплюють культурні форми буряка звичайного, визначені у публікації Ford-Lloyd (2005) *Sources of genetic variation, Genus Beta*. In: Biancardi E, Campbell L G, Skaracis G N, De Biaggi M (eds) *Genetics and Breeding of Sugar Beet*. Science Publishers, Enfield (NH), USA, pp 25-33. Подібним чином, наприклад, термін "*Arabidopsis thaliana*" скорочено вказується як "*A. thaliana*". Обидва терміни вживаються взаємозамінно.

Термін "позиція", вжитий згідно з даним винаходом, означає або позицію амінокислоти в описаній авторами амінокислотній послідовності, або позицію нуклеотиду в описаній авторами нуклеотидній послідовності. Термін "відповідний" у контексті даного опису також передбачає, що позиція не лише визначається кількістю попередніх нуклеотидів / амінокислот.

Позиція даного нуклеотиду згідно з даним винаходом, який може бути заміщений, може змінюватися через делеції або додаткові нуклеотиди у будь-якому місці 5'-нетрансльованої ділянки (UTR) ALS, включаючи промоторні та/або будь-які інші регуляторні послідовності або ген (включаючи екзони та інтрони). Подібним чином позиція даної амінокислоти згідно з даним винаходом, яка може бути заміщена, може змінюватися через делецію або додавання амінокислот у будь-якому іншому місці поліпептиду ALS.

Таким чином, під "відповідною позицією" згідно з даним винаходом слід розуміти, що нуклеотиди / амінокислоти можуть відрізнятися за вказаним номером, але все одно можуть мати подібні сусідні нуклеотиди / амінокислоти. Вищезгадані нуклеотиди / амінокислоти, які можуть бути замінені, видалені або додані, також охоплюються терміном "відповідна позиція".

Для того, щоб визначити, чи відповідає нуклеотидний залишок або амінокислотний залишок у даній нуклеотидній / амінокислотній послідовності ALS певній позиції у нуклеотидній послідовності SEQ ID NO: 1 або амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2, спеціаліст у даній галузі може застосовувати засоби та способи, добре відомі спеціалістам у даній галузі, наприклад, вирівнювання, ручні або за допомогою комп'ютерних програм, таких, як BLAST (Altschul et al. (1990), *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410), тобто, Basic Local Alignment Search Tool, або ClustalW (Thompson et al. (1994), *Nucleic Acid Res.*, 22, 4673-4680), або будь-якої іншої прийнятної програми, яка є прийнятною для створення лінійних послідовностей.

SEQ ID NO: 1 представляє нуклеотидну послідовність, яка кодує ALS дикого типу буряка звичайного. SEQ ID NO: 2 представляє амінокислотну послідовність буряка звичайного, яка походить від SEQ ID NO: 1.

Відповідним чином, кодон у позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1 кодує амінокислоту у позиції 569 (тобто, амінокислоту "Trp" згідно з трилітерним кодом або "W" згідно з однолітерним кодом) SEQ ID NO: 2.

В альтернативному варіанті, для того, щоб визначити, чи відповідає нуклеотидний залишок або амінокислотний залишок у даній нуклеотидній / амінокислотній послідовності ALS певній позиції у нуклеотидній послідовності SEQ ID NO: 1, може використовуватися нуклеотидна послідовність, яка кодує ALS дикого типу *A. thaliana*, яку показано у SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 6 представляє амінокислотну послідовність *A. thaliana*, яка походить від SEQ ID NO: 5.

Відповідним чином, кодон у позиції 1720-1722 нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 5 кодує амінокислоту у позиції 574 (тобто, амінокислоту "Trp" згідно з трилітерним кодом або "W" згідно з однолітерним кодом) SEQ ID NO: 6.

Якщо нуклеотидна послідовність ALS дикого типу *A. thaliana*, показана у SEQ ID NO: 5, застосовується як контрольна послідовність (як описується у більшості літературних джерел, а отже, застосовується для полегшення порівняння з такими відомими послідовностями), кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану, перебуває у позиції, що відповідає позиції 1720-1722 нуклеотидної послідовності ALS гена *A. thaliana*, показаний у SEQ ID NO: 5.

Однак SEQ ID NO: 1 віддають перевагу як контрольній нуклеотидній послідовності, а SEQ ID NO: 2 віддають перевагу як контрольній амінокислотній послідовності в усіх наступних описах.

Представлена нижче таблиця являє собою огляд контрольних послідовностей, які застосовують при визначенні позиції точкової мутації у нуклеотидній послідовності або заміщення в амінокислотній послідовності:

SEQ ID NO:	Тип послідовності	Вид
1	нуклеотидна послідовність	<i>B. vulgaris</i>
2	амінокислотна послідовність	<i>B. vulgaris</i>
3	нуклеотидна послідовність (мутована)	<i>B. vulgaris</i>
4	амінокислотна послідовність (мутована)	<i>B. vulgaris</i>
5	нуклеотидна послідовність	<i>A. thaliana</i>
6	амінокислотна послідовність	<i>A. thaliana</i>

Таким чином, у будь-якому разі рівноцінна позиція може бути визначена через вирівнювання та співставлення з контрольною послідовністю, такою, як SEQ ID NO: 1 або 5 (нуклеотидна послідовність) або SEQ ID NO: 2 або 6 (амінокислотна послідовність).

З огляду на розбіжності між ALS геном дикого типу *B. vulgaris* та ALS геном, який міститься у рослині *B. vulgaris* згідно з даним винаходом, ALS ген (або полінуклеотидна чи нуклеотидна послідовність), що міститься в рослині *B. vulgaris* згідно з даним винаходом, також може вважатися "мутантним ALS геном", "мутантним ALS алелем", "мутантним ALS полінуклеотидом" і т. ін. Таким чином, в у цьому тексті цього опису терміни "мутантний алель", "мутантний ALS алель", "мутантний ALS ген" або "мутантний ALS полінуклеотид" вживаються взаємозамінно.

Якщо не вказано іншого, ці терміни стосуються нуклеотидної послідовності, яка включає кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану, у позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності ALS гена *B. vulgaris*, показаної у SEQ ID NO: 1. Якщо йдеться про контрольну послідовність *A. thaliana*, показану у SEQ ID NO: 5, позиція кодону відповідає 1720-1722.

Подібним чином ці терміни стосуються нуклеотидної послідовності, яка кодує білок ALS, який у позиції, яка відповідає позиції 569 амінокислотної послідовності білка ALS буряка звичайного, показаний у SEQ ID NO: 2, має амінокислоту, відмінну від триптофану. Якщо йдеться про контрольну послідовність *A. thaliana*, показану у SEQ ID NO: 6, позиція відповідає 574.

"Амінокислота, відмінна від триптофану" (позначається як "Trp" у трилітерному коді або "W" у рівноцінному однолітерному коді) означає будь-яку природну амінокислоту, відмінну від триптофану. До цих природних амінокислот належать аланін (A), аргінін (R), аспарагін (N), аспартат (D), цистеїн (C), глутамін (Q), глутамат (E), гліцин (G), гістидин (H), ізолейцин (I), лейцин (L), лізин (K), метіонін (M), фенілаланін (F), пролін (P), серин (S), треонін (T), тирозин (Y) або валін (V).

Однак в оптимальному варіанті амінокислота, відмінна від триптофану (що належить до групи нейтрально-полярних амінокислот), є амінокислотою з фізико-хімічними властивостями, відмінними від властивостей триптофану, тобто, належить до будь-якої з амінокислот, які виявляють нейтрально-неполярні, кислотні або основні властивості. У ще кращому варіанті амінокислоту, відмінну від триптофану, вибирають з групи, до якої належать аланін, гліцин,



ізолейцин, лейцин, метіонін, фенілаланін, пролін, валін та аргінін. У ще кращому варіанті вищезгадана амінокислота є нейтрально-неполярною амінокислотою, такою, як аланін, гліцин, ізолейцин, лейцин, метіонін, фенілаланін, пролін або валін. Особливу перевагу серед вищезгаданих амінокислот віддають таким, як аланін, гліцин, ізолейцин, лейцин, валін. Ще кращими вважаються гліцин та лейцин. Найбільшу перевагу віддають лейцинові.

Натомість, якщо не вказано іншого, терміни "алель дикого типу", "ALS алель дикого типу", "ALS ген дикого типу" або "полінуклеотид ALS дикого типу" стосуються нуклеотидної послідовності, яка кодує білок ALS, у якому відсутнє W569 заміщення відносно SEQ ID NO: 2 (або W574 заміщення відносно SEQ ID NO: 6). Ці терміни також стосуються нуклеотидної послідовності, яка у позиції, що відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності ALS гена *B. Vulgaris*, показаної у SEQ ID NO: 1, включає кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану.

Такий "алель дикого типу", "ALS алель дикого типу", "ALS ген дикого типу" або "полінуклеотид ALS дикого типу" необов'язково може включати мутації, відмінні від мутації, що викликає W569 заміщення.

По суті, якщо йдеться про ALS ген, єдина розбіжність між рослиною *B. vulgaris* дикого типу та рослиною *B. vulgaris* згідно з даним винаходом в оптимальному варіанті (і головним чином) полягає в тому, що у зазначеній позиції (зокрема, у позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності ALS гена *B. Vulgaris*, показаній у SEQ ID NO: 1), рослина *B. vulgaris* згідно з даним винаходом включає кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану, в оптимальному варіанті кодон кодує амінокислоту, як вказано у будь-яких інших розділах цього опису. Однак, як було згадано вище, можуть бути наявними інші розбіжності, такі, як додаткові мутації, між ALS алелем дикого типу та мутантним ALS алелем, як вказується авторами. Втім, ці додаткові розбіжності не є релевантними за наявності розбіжностей, які пояснювалися вище.

Отже, W569 заміщення (або W574 заміщення, якщо амінокислотну послідовність ALS *A. thaliana* згідно з SEQ ID NO: 6 використовують як контрольну) є результатом зміни кодону в позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності, показаної у SEQ ID NO: 1 (або у позиції, яка відповідає позиції 1720-1722 нуклеотидної послідовності, показаної у SEQ ID NO: 5, відповідно).

В оптимальному варіанті заміщення у позиції 569 є W→L заміщенням, де "L" кодується будь-яким з кодонів "CTT", "CTC", "CTA", "CTG", "TTA" або "TTG".

У найкращому варіанті заміщення у позиції 569 є W→L заміщенням через трансверсію нуклеотиду "G" у позиції, яка відповідає позиції 1706 нуклеотидної послідовності, показаної у SEQ ID NO: 1 (або у позиції, яка відповідає позиції 1721 нуклеотидної послідовності, показаної у SEQ ID NO: 5, відповідно) на нуклеотид "T". Відповідним чином, кодон у позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності, показаної у SEQ ID NO: 1 (або у позиції, яка відповідає позиції 1720-1722 нуклеотидної послідовності, показаної у SEQ ID NO: 5, відповідно) змінюється з "TGG" на "TTG". Якщо кодон "TGG" кодує триптофан, то кодон "TTG" кодує лейцин.

Отже, у варіанті втілення, якому віддають найбільшу перевагу, даний винахід забезпечує рослину буряка звичайного, яка включає у нуклеотидній послідовності ендегенного ALS гена кодон TTG (який кодує лейцин) у позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності мутантного ALS гена *B. Vulgaris*, показаної у SEQ ID NO: 1, причому вищезгадана нуклеотидна послідовність включає SEQ ID NO: 3 (або у менш бажаному варіанті складається з неї).

Рослини *B. Vulgaris*, які кодують поліпептид ALS, який у позиції, що відповідає позиції 569 амінокислотної послідовності білка ALS буряка звичайного, показаної у SEQ ID NO: 2, має амінокислоту, відмінну від триптофану, в оптимальному варіанті включають у нуклеотидній послідовності ендегенного ALS гена кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану, у позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності ALS гена *B. Vulgaris*, показаної у SEQ ID NO: 1.

Термін "ALS" або "AHAS" ген *B. vulgaris* також охоплює нуклеотидні послідовності *B. Vulgaris*, які є принаймні на 90, 95, 97, 98 або 99 % ідентичними нуклеотидній послідовності ALS *B. vulgaris* згідно з SEQ ID NO: 1 або 3, причому ці на 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98 або 99 % ідентичні нуклеотидні послідовності у позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1, включають кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану.

Подібним чином ці принаймні на 90, 95, 97, 98 або 99 % ідентичні нуклеотидні послідовності кодують поліпептид ALS, який у позиції, яка відповідає позиції 569 SEQ ID NO: 2, включає амінокислоту, відмінну від триптофану. Вищезгадані ідентичні нуклеотидні послідовності кодують білок ALS, який зберігає активність, як описано авторами, у ще кращому варіанті

кодований таким чином поліпептид ALS є толерантним до одного або кількох інгібуючих ALS гербіцидів, як описано авторами. Вищезазначений термін також охоплює алельні варіанти та гомологи, які кодують поліпептид ALS, який в оптимальному варіанті є толерантним до одного або кількох інгібуючих ALS гербіцидів, як описано авторами.

Для того, щоб визначити, чи має нуклеїновокислотна послідовність певний ступінь ідентичності з нуклеотидними послідовностями згідно з даним винаходом, спеціаліст у даній галузі може застосовувати засоби та способи, добре відомі спеціалістам у даній галузі, наприклад, вирівнювання, ручні або за допомогою комп'ютерних програм, таких, як ті, що вказуються нижче у зв'язку з визначенням терміну "гібридизація" та ступенями гомології.

Наприклад, може застосовуватися BLAST, тобто, Basic Local Alignment Search Tool (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410), для пошуку місцевих збігів послідовностей. BLAST забезпечує вирівнювання як нуклеотидних, так і амінокислотних послідовностей для визначення подібності послідовностей. Через місцевий характер вирівнювання програма BLAST є особливо придатною для визначення точних збігів або для розпізнавання подібних послідовностей. Основною одиницею результату роботи алгоритму BLAST є пара сегментів з високою подібністю (High-scoring Segment Pair – HSP). HSP складається з двох фрагментів послідовності довільної, але однакової довжини, збіг яких у цьому місці є максимальним, і для яких показник збігу дорівнює пороговому або критичному показникові, встановленому користувачем, або перевищує його. Підхід з застосуванням BLAST передбачено для пошуку HSP між послідовністю запиту та послідовністю бази даних для оцінки статистичної значущості будь-яких виявлених збігів і для повідомлення лише про ті збіги, які відповідають вибраному користувачем порогові значущості. Параметр E визначає статистично значущий поріг для збігів послідовності зі звітною базою даних. E представляє верхню межу очікуваної частоти ймовірності HSP (або набору HSP) у межах пошуку в усій базі даних. Будь-яка послідовність бази даних, збіг якої відповідає E, повідомляється у результаті виконання програми.

Аналогічні комп'ютерні технології з застосуванням BLAST (Altschul (1997), loc. cit.; Altschul (1993), loc. cit.; Altschul (1990), loc. cit.) використовують для пошуку ідентичних або споріднених молекул у базах даних нуклеотидів, таких, як GenBank або EMBL. Цей аналіз є значно швидшим, ніж гібридизація на основі багат шарових мембран. Крім того, чутливість комп'ютерного пошуку може бути змінена для визначення категорії будь-якої відповідності як точної або подібної. Основою цього пошуку є показник добутку, що визначається як:

$$\frac{\% \text{ ідентичності послідовності} \times \% \text{ максимальний показник BLAST}}{100}$$

з врахуванням як ступеня подібності між двома послідовностями, так і довжини збігу послідовностей. Наприклад, при показнику добутку 40 відповідність має точність у межах похибки 1-2 %; а при 70 відповідність є точною. Подібні молекули зазвичай розпізнають шляхом відбору молекул з низькими показниками добутку від 15 до 40, хоча нижчі показники можуть визначати споріднені молекули.

Термін "поліпептид ALS" або "AHAS" *B. vulgaris* також охоплює амінокислотні послідовності, які є принаймні на 90, 95, 97, 98 або 99 % ідентичними амінокислотній послідовності ALS згідно з SEQ ID NO: 2 або 4, причому ці принаймні на 90, 95, 97, 98 або 99 % ідентичні амінокислотні послідовності у позиції, яка відповідає позиції 569 SEQ ID NO: 2, включають амінокислоту, відмінну від триптофану. Вищезгадані ідентичні амінокислотні послідовності зберігають активність ALS, як описано авторами, у ще кращому варіанті поліпептид ALS є толерантним до інгібуючих ALS гербіцидів, як описано авторами.

Активність ALS у разі необхідності може бути виміряна згідно з аналізом, описаним у публікації Singh (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4572-4576.

Однак вказані авторами нуклеотидні послідовності ALS, які кодують поліпептид ALS, в оптимальному варіанті забезпечують толерантність до одного або кількох інгібуючих ALS гербіцидів (або, навпаки, меншу чутливість до інгібуючого ALS гербіциду), як описано авторами. Це відбувається через точкову мутацію, що веде до заміщення амінокислот, як описано авторами.

Відповідним чином, толерантність до інгібуючого ALS гербіциду (або, навпаки, менша чутливість до інгібуючого ALS гербіциду) може вимірюватися шляхом порівняння активності ALS, одержаної з екстрактів клітин рослин, які містять мутовану послідовність ALS, та рослин з відсутністю мутованої послідовності ALS у присутності інгібуючого ALS гербіциду, як описується, наприклад, у публікації Singh et al (1988) [J. Chromatogr., 444, 251-261].

Однак ще кращий аналіз активності для поліпептиду ALS, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка включає кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану у позиції,

яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності ALS гена *B. Vulgaris*, показаної у SEQ ID NO: 1, може здійснюватися таким чином:

Кодуючу послідовність дикого типу буряка звичайного та мутантної рослини *B. vulgaris* клонують, наприклад, у вектори Novagen pET-32a(+) і вектори трансформують, наприклад, в AD494 *Escherichia coli* згідно з інструкціями виробника. Бактерії в оптимальному варіанті вирощують при 37 °C у середовищі під тиском відбору, наприклад, в LB-середовищі, яке містить 100 мг/л карбеніциліну та 25 мг/л канаміцину, стимулюють, використовуючи, наприклад, 1 мМ ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду при оптимальному OD<sub>600</sub> приблизно 0,6, культивують протягом приблизно 16 годин, в оптимальному варіанті при 18 °C і збирають шляхом центрифугування. Згустки бактерій ресуспендують у 100 мМ буфера з фосфату натрію, pH 7,0, який містить 0,1 мМ тіамінпірофосфату, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> та 1 мкМ FAD, у концентрації 1 г сирої маси на 25 мл буфера і руйнують шляхом ультразвукової обробки. Неочищений білковий екстракт, одержаний після центрифугування, використовують для вимірювання активності ALS.

Після цього здійснюють аналізи ALS, наприклад, у 96-лункових мікротитрувальних планшетах, застосовуючи модифікацію процедури, описаної у публікації Ray (1984), *Plant Physiol.*, 75, 827-831. Реакційна суміш в оптимальному варіанті містить 20 мМ буфера з фосфату калію, pH 7,0, 20 мМ пірувату натрію, 0,45 мМ тіамінпірофосфату, 0,45 мМ MgCl<sub>2</sub>, 9 мкМ FAD, фермент ALS та інгібітори ALS у різних концентраціях у кінцевому об'ємі приблизно 90 мкл.

Аналізи починають шляхом додавання ферменту і завершують в оптимальному варіанті після 75 хв інкубації при 30 °C шляхом додавання 40 мкл 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Приблизно через 60 хв при кімнатній температурі додають приблизно 80 мкл розчину 1,4 % α-нафтолу та 0,14 % креатину в 0,7 М NaOH і після додаткових приблизно 45 хв інкубації при кімнатній температурі визначають оптичну густину при 540 нм. Показники р150 для інгібування ALS визначали, як описано у публікації Ray (1984), *Plant Physiol.*, 75, 827-831, застосовуючи програму апроксимації кривих по точках XLFit Excel, додаткова версія 4.3.1, від ID Business Solutions Limited, Guildford, Великобританія.

При використанні рослин активність ALS в оптимальному варіанті визначають в екстрактах клітин або екстрактах листя дикого типу та екстрактах клітин або екстрактах листя одержаного мутанта *B. vulgaris* у присутності інгібуючих ALS гербіцидів у різних концентраціях, в оптимальному варіанті – сульфонілсечовинних гербіцидів або сульфоніламіно-карбонілтріазолінонових гербіцидів, у ще кращому варіанті – у присутності інгібуючого ALS гербіциду "форамсульфурон" у різних концентраціях. Таким чином, ALS в оптимальному варіанті видобувають з листя цукрового буряка або культур тканин цукрового буряка, як описано у публікації Ray (1984) in *Plant Physiol* 75: 827-831.

В оптимальному варіанті рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом є менш чутливими до інгібітора ALS, у ще кращому варіанті вони є принаймні у 100 разів менш чутливими, у ще кращому варіанті – у 500 разів, у ще кращому варіанті – у 1000 разів, і у найкращому варіанті – у 2000 разів. І навпаки, менш чутливі у контексті цього опису можуть розглядатись як "більш толерантні" або "більш резистентні". Подібним чином "більш толерантні" або "більш резистентні" можуть, у свою чергу, розглядатись як "менш чутливі".

Наприклад, рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом, зокрема, рослина *B. Vulgaris*, описана у супровідних Прикладах, є принаймні у 2000 разів менш чутливими до інгібуючого ALS гербіциду форамсульфурону (належить до підкласу інгібіторів ALS "сульфонілсечовинні гербіциди") порівняно з ферментом дикого типу.

В оптимальному варіанті рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом є менш чутливими різних представників інгібуючих ALS гербіцидів, таких, як сульфонілсечовинні гербіциди, сульфоніламіно-карбонілтріазолінонові гербіциди та імідазолінонові гербіциди. В оптимальному варіанті вибирають сульфонілсечовинні гербіциди та сульфоніламінокарбонілтріазолінонові гербіциди, до яких вищезгадані рослини є менш чутливими. У варіанті, якому віддають особливу перевагу, рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом є менш чутливими до інгібуючого ALS гербіциду форамсульфурону (сульфонілсечовинний гербіцид), окремо або у комбінації з одним або кількома іншими інгібуючими ALS гербіцидами, або з підкласу сульфонілсечовинних гербіцидів, або з будь-якого іншого підкласу інгібуючих ALS гербіцидів.

Отже, рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом, які в оптимальному варіанті є менш чутливими до інгібуючого ALS гербіциду, так само можуть характеризуватись як "більш толерантні до інгібітора ALS" (тобто, толерантні до інгібітора ALS рослини).

Таким чином, "толерантна до інгібітора ALS" рослина означає рослину, зокрема, рослину *B. Vulgaris*, яка є більш толерантною до принаймні одного інгібуючого ALS гербіциду на рівні, який зазвичай інгібує ріст нормальної рослини дикого типу, в оптимальному варіанті інгібуючий ALS

гербіцид стримує ріст нормальної рослини або рослини дикого типу. Вищезгадана нормальна рослина або рослина дикого типу не включає у нуклеотидній послідовності будь-якого алеля ендегенного ALS гена кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану, у позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності ALS гена *B. Vulgaris*, показаної у SEQ ID NO: 1.

Вищезгадана нуклеотидна послідовність в цілому також може характеризуватись як "толерантна до інгібуючого ALS гербіциду" нуклеотидна послідовність. Під "толерантною до інгібуючого ALS гербіциду нуклеотидною послідовністю" слід розуміти молекулу нуклеїнової кислоти, яка включає нуклеотидну послідовність, яка включає принаймні мутацію, яка в результаті забезпечує кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану, відносно білка ALS, який не має у позиції, яка відповідає позиції 569 амінокислотної послідовності білка ALS *B. Vulgaris*, показаної у SEQ ID NO: 2, амінокислоти, відмінної від триптофану, причому вищезгадана принаймні одна мутація в результаті забезпечує експресію білка ALS, менш чутливого до інгібуючого ALS гербіциду.

У разі "толерантного до гербіциду білка ALS" слід розуміти, що такий білок ALS демонструє вищу активність ALS відносно активності ALS білка ALS дикого типу у присутності принаймні одного інгібуючого ALS гербіциду, який перешкоджає активності ALS, і при концентрації або рівні вищезгаданого гербіциду, який інгібує активність ALS білка ALS дикого типу.

Подібним чином терміни "інгібуючий(и) ALS гербіцид(и)" або просто "інгібітор(и) ALS" вживаються взаємозамінно. У контексті даного опису "інгібуючий ALS гербіцид" або "інгібітор ALS" не обмежується одним гербіцидом, який перешкоджає активності ферменту ALS. Таким чином, якщо іншого не вказано і не впливає з контексту, "інгібуючий ALS гербіцид" або "інгібітор ALS" може бути одним гербіцидом або сумішшю двох, трьох, чотирьох або більшої кількості гербіцидів, відомих спеціалістам у даній галузі, в оптимальному варіанті – таких, як зазначено в цьому описі, кожен з яких перешкоджає активності ферменту ALS.

Несподівано було виявлено, що навіть одна точкова мутація згідно з даним винаходом забезпечує агрономічно ефективний і стійкий рівень толерантності до інгібуючих ALS гербіцидів у рослинах *B. Vulgaris*, а також у їхньому потомстві, зокрема, при встановленні гомозиготності. Порівняно з толерантними до гербіцидів рослинами буряка звичайного з однаковим генетичним середовищем, у яких така мутація є присутньою лише гетерозиготно, толерантна до гербіцидів рослина буряка звичайного, яка є гомозиготною щодо мутації, демонструє вищий агрономічний рівень толерантності до інгібуючих ALS гербіцидів.

Отже, даний винахід стосується толерантної до інгібуючих ALS гербіцидів рослини буряка звичайного, яка має мутацію ендегенного гена ацетолактатсинтази (ALS), причому ALS ген кодує поліпептид ALS, який містить амінокислоту, відмінну від триптофану, у позиції 569 поліпептиду ALS. Відповідна мутація може бути присутньою гетерозиготно і в оптимальному варіанті може бути єдиною мутацією ALS гена. У ще кращому варіанті відповідна мутація може бути гомозиготно присутньою, і у найкращому варіанті відповідна мутація є гомозиготно присутньою як єдина мутація ендегенного ALS гена.

Також не варто очікувати, що лише одна мутація ALS гена у буряку звичайному має бути достатньою, оскільки, наприклад, у документі WO 2010/037061 вказано, що подвійні або потрійні мутанти у гені ALS є необхідними для надання агрономічно ефективної толерантності до інгібуючих ALS гербіцидів.

Отже, рослини *B. vulgaris* та їх частини, які є гетерозиготними щодо мутації, є менш бажаними, але вони все ж охоплюються даним винаходом і можуть бути достатніми для певних режимів внесення та/або певних навколишніх умов. Також даний винахід охоплює рослини, які містять принаймні в одному алелі ендегенного ALS гена кодон, який кодує амінокислоту, відмінну від триптофану, в оптимальному варіанті – лейцин у позиції, яка відповідає позиції 1705-1707 нуклеотидної послідовності ALS гена *B. vulgaris*, показаній у SEQ ID NO: 1, і містять один (у разі диплоїдії) або кілька додаткових алелів (у разі поліплоїдії), які мають одну або кілька додаткових мутацій в ендегенному ALS гені.

Відповідним чином, у контексті цього опису термін "гетерозиготний" або "гетерозиготно" означає, що рослина згідно з даним винаходом має різні алелі у конкретному локусі, зокрема, у локусі ALS гена.

"Гомозиготний" або "гомозиготно" означає, що рослина згідно з даним винаходом має дві копії одного алеля на різних ланцюгах ДНК, зокрема, у локусі ALS гена.

У контексті даного опису, якщо чітко не вказано іншого, термін "рослина" означає рослину на будь-якій стадії розвитку.

В оптимальному варіанті рослина буряка звичайного згідно з даним винаходом є ортоплодною або анертоплодною. Ортоплодна рослина в оптимальному варіанті може бути

гаплоїдною, диплоїдною, тетраплоїдною, гексаплоїдною, октаплоїдною, декаплоїдною або додекаплоїдною, тоді, як анортоплоїдна рослина в оптимальному варіанті може бути триплоїдною або пентаплоїдною.

5 Частини рослин можуть приєднуватися або відокремлюватися від цілої інтактної рослини. До таких частин, крім інших, належать органи, тканини та клітини рослини, в оптимальному варіанті – насіння.

Відповідним чином, рослина *B. vulgaris* згідно з даним винаходом є нетрансгенною стосовно ендогенного ALS гена. Звичайно, чужорідні гени можуть бути перенесені у рослину або шляхом генної інженерії, або традиційними способами, такими, як схрещування. Вищезгадані гени 10 можуть бути генами, які надають толерантності до гербіцидів, в оптимальному варіанті – толерантності до гербіцидів, відмінної від толерантності до інгібуючих ALS гербіцидів, генами, які поліпшують врожайність, генами, які поліпшують резистентність до біологічних організмів, та/або генами, пов'язаними з модифікацією складу.

15 В іншому аспекті даний винахід стосується способу одержання рослини буряка звичайного та її частин, який включає такі етапи:

(a) піддавання калюсів, в оптимальному варіанті – з цукрового буряка, дії приблизно  $10^{-7}$  M- $10^{-9}$  M інгібуючого ALS гербіциду, в оптимальному варіанті – форамсульфурону;

(b) відбір колоній клітин, які можуть рости у присутності до  $3 \times 10^{-6}$  M інгібуючого ALS гербіциду, в оптимальному варіанті – форамсульфурону [CAS RN 173159-57-4];

20 (c) регенерація пагонів у присутності інгібуючого ALS гербіциду, в оптимальному варіанті – форамсульфурону;

(d) відбір регенованих паростків за допомогою інгібуючого ALS гербіциду, в оптимальному варіанті – форамсульфурону, йодосульфурон-метил-натрію [CAS RN 144550-36-7] та/або їх суміші, причому доза форамсульфурону в оптимальному варіанті є еквівалентною 7-70 г а.і./га, і 25 доза йодосульфурон-метил-натрію в оптимальному варіанті є еквівалентною 1-10 г а.і./га.

В іншому аспекті регеновані паростки, одержані згідно з вищезазначеними процесами (a) до (d), можуть використовуватися для подальшого одержання рослин буряка звичайного шляхом застосування таких етапів з (e) по (m):

(e) вегетативне розмноження окремих паростків з етапу (d) для збереження різних позитивних варіантів шляхом створення лінії клітин (клону) кожного толерантного до інгібуючих ALS гербіцидів паростка;

(f) довготривале зберігання кожного створеного клону у вегетативному стані;

(g) перенесення клонованих рослин кожного клону з місця довготривалого зберігання до теплиці;

35 (h) яровизація та адаптація у яровизаційних камерах для викликання цвітіння;

(i) перенесення яровизованих рослин до приміщень для вирощування (з регулюванням температури та світла);

(j) відбір рослин з найкращим летом пилку з клонів з найкращим цвітінням для схрещування з кастрованими рослинами елітної, але чутливої до інгібуючого ALS гербіциду лінії для подолання негативного впливу соматоклонального варіанта на генеративну фертильність (чоловічу та жіночу) паростків з етапу (d);

(k) зворотне схрещування з елітною лінією до відновлення фертильності та досягнення самозапиленими гетерозиготними рослинами гомозиготного стану;

45 (l) одержання тест-кросів з чутливим до інгібуючого ALS гербіциду партнером та самозапиленого насіння кожної підданої зворотному схрещуванню лінії для оцінки у польових умовах;

(m) внесення агрономічно прийнятних доз різних інгібуючих ALS гербіцидів для відбору найбільш ефективної лінії, в оптимальному варіанті – у її гомозиготному стані.

Лінії, одержані згідно з вищезазначеними етапами з (a) по (m), складають основу для виведення комерційних сортів через дотримання процедур, відомих серед селекціонерів, із залученням технологій молекулярної селекції (такими, як схрещування з використанням маркера або відбір з використанням маркера) для прискорення процесів та забезпечення належного відбору рослин або для одержання мутації в її гомозиготній формі, або, у разі наявності однієї або кількох мутацій у різних місцях кодуючого ендогенного ALS гена, для виконання належного відбору гетерозиготних рослин, які містять принаймні в одному з алелів W569 мутацію згідно з даним винаходом (огляд міститься у публікації Bertrand C.Y. et al. (2008), Phil. Trans. R. Soc. B., 363, 557-572).

Калюси одержують, застосовуючи засоби та способи, загальновідомі серед спеціалістів у даній галузі, наприклад, як описано у супровідних Прикладах.

Насіння, одержане на етапі (m), було депоновано у NCIMB (Національній колекції промислових, харчових та морських бактерій), Aberdeen, Великобританія, під номером NCIMB 41705.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу одержання толерантної до гербіцидів рослини буряка звичайного та її частин, який включає (i) мутацію ендегенного гена ацетолататсинтази (ALS), причому ALS ген кодує поліпептид ALS, який містить амінокислоту, відмінну від триптофану, у позиції 569 поліпептиду ALS, та (ii) додаткову мутацію в ендегенному ALS гені, причому спосіб включає такі етапи:

(a) одержання толерантної до інгібуючих ALS гербіцидів рослини буряка звичайного, яка включає мутацію ендегенного гена ацетолататсинтази (ALS), причому ALS ген кодує поліпептид ALS, який містить амінокислоту, відмінну від триптофану, у позиції 569 поліпептиду ALS (батьківська рослина A);

(b) схрещування батьківської рослини A з рослиною буряка звичайного (батьківська рослина B), яка містить одну або кілька додаткових мутацій в ендегенному ALS гені у позиціях, відмінних від амінокислотної позиції 569;

(c) одержання потомства буряка звичайного, яке є гетерозиготним щодо мутації ALS гена амінокислотної позиції 569 і однієї або кількох інших мутацій ALS гена, які кодуються батьківською рослиною B;

(d) причому процес селекції контролюють через

(i) застосування схрещування з використанням маркера та/або технологій мікросеквенування і/або

(ii) внесення агрономічно прийнятних доз одного або кількох інгібуючих ALS гербіцидів, до яких виведене потомство згідно з етапом (c) є толерантним.

Відповідним чином, передбачається, що даний винахід також стосується рослин *B. Vulgaris*, які можуть бути одержані з застосуванням вищезгаданих способів виробництва.

У необмежувальному прикладі рослини цукрового буряка згідно з даним винаходом одержували шляхом виконання описаного нижче необмежувального протоколу. Без прив'язування до будь-якої теорії такий самий протокол також може застосовуватися для одержання рослин *B. Vulgaris*, відмінних від цукрового буряка.

Клітинні культури цукрового буряка одержували з сіянців диплоїдного цукрового буряка генотипу 7T9044 (як описано, наприклад, у публікації Alexander Dovzhenko, PhD Thesis, "Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.)", Ludwig-Maximilians-Universität München, Німеччина, 2001).

Насіння цукрового буряка занурювали на 60 секунд у 70 %-й етанол, потім двічі промивали у стерильній воді з 0,01 % детергента, а потім інкубували протягом 1-4 годин в 1 % вилугувачі NaOCl. Після цього насіння тричі промивали стерильною  $H_2O$  і зберігали у стерильній воді до наступного дня при 4 °C. Після цього зародки відокремлювали за допомогою пінцета та скальпеля.

Щойно підготовлені зародки занурювали у 0,5 % NaOCl на 30 хв, а потім тричі промивали у стерильній воді. Після останнього етапу промивання їх поміщали на безгормональне MS-агарове середовище (Murashige and Skoog (1962), *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497). Зародки, з яких розвинулися стерильні сіянці, використовували для закладання клітинних культур цукрового буряка, що піддаються регенерації.

Сім'ядолі, а також гіпокотилі розрізали на відрізки по 2-5 мм завдовжки, а потім культивували на затверджені агаром (0,8 %) MS-агаровому середовищі, яке містило 1 мг/л бензиламінопурина (BAP) або 0,25 мг/л тидіазурону (TDZ). Через 4 тижні культури пагонів, що розвивалися, переносили на свіже агарове середовище такого самого складу, а потім субкультивували з одномісячними інтервалами. Культури тримали при 25 °C при тьмяному світлі з циклом 12 год. / 12 год. світла/темряви.

Через 7-10 днів субкультивування культури пагонів, які вирощували на середовищі, яке містило тидіазурон, утворювали калюс чіткого типу, який був швидко зростаючим, м'яким і крихким. Колір цього типу калюсу був від жовтуватого до світло-зеленого. Деякі з цих крихких калюсів незмінно продукували хлорофіловмісні примордії пагонів з зародкоподібних утворень. Ці швидко зростаючі калюси, що піддавалися регенерації, застосовували для відбору толерантних до інгібуючих ALS гербіцидів мутантів цукрового буряка.

Коли цей тип калюсу піддавали дії  $10^{-9}$  М сульфонілсечовини форамсульфурону (CAS RN 173159-57-4), клітини виживали, але продукували менше, ніж 50 % біомаси їхніх сиблінгів на середовищі, позбавленому інгібітора. На середовищі, яке містило  $3 \times 10^{-8}$  М форамсульфурону, ріст не виявлявся. Для великомасштабних експериментів з селекції мутантів вибирали  $10^{-7}$  М форамсульфурону. Колонії клітин, які вижили й зростали, нумерували й переносили через 4-6

тижнів на свіже середовище, яке містило  $3 \times 10^{-7}$  М інгібітора. Одна з цих колоній клітин була здатна зростати не лише при цій концентрації інгібітора, але й у присутності  $3 \times 10^{-6}$  М форамсульфурону.

З цього клону (SB574TL) регенерували пагони у присутності інгібуючого ALS гербіциду, а потім пагони переносили до MS-середовища, яке містило 0,05 мг/л нафталіноцтової кислоти (NAA).

Протягом 4-12 тижнів у пагонів формувалося коріння, а потім їх переносили у стерильні тепличні контейнери, заповнені вологим стерилізованим перлітом, і поливали з неорганічними інгредієнтами MS-середовища половинної концентрації. В альтернативному варіанті паростки переносили прямо з затвердженного агаром середовища у ґрунтову суміш з вмістом перліту у теплиці. Протягом перших 10-15 днів після перенесення у ґрунт, який містить субстрат, рослини тримали у середовищі з високою вологістю повітря. Під час та після їх переведення на режим нормальної тепличної вологості повітря рослини тримали у теплиці під штучним світлом (12 год.) при  $20 \pm 3$  °C /  $15 \pm 2$  °C денної/нічної температури.

Через 3-5 тижнів регенеровані рослини з підготовлених раніше толерантної до форамсульфурону культури клітин (SB574TL), а також з культур клітин дикого типу обробляли форамсульфуном, йодосульфурон-метил-натрієм (CAS RN 144550-3-7) та сумішшю обох активних інгредієнтів. Випробувані дози гербіциду були еквівалентні 7-70 г а.і./га для форамсульфурону і 1-10 г а.і./га для йодосульфурон-метил-натрію. Регенеровані рослини з цієї толерантної лінії клітин витримували навіть найвищі дози гербіцидів (форамсульфурону, йодосульфурон-метил-натрію та їхніх сумішей у співвідношенні 7:1, тоді, як рослини дикого типу гинули навіть від найнижчих доз.

Потомство випробували описаним нижче способом (необмежувальним):

На основі SB574TL насіння F2 та F3 експериментальних гібридів, які забезпечують алель резистентності у гетерозиготному стані, а також насіння F4 – F6, що забезпечує мутантний алель у гомозиготному стані, висівали у полі й обробляли форамсульфуном, йодосульфурон-метил-натрієм, а також сумішами обох інгібуючих ALS гербіцидів, коли у рослин розвивалися 3-5 листів розетки. Гомозиготні сіянці витримували суміші 35 г форамсульфурону/га + 7 г йодосульфурон-метил-натрію/га без затримки росту або будь-яких ознак видимої шкоди. У кількох випадках гетерозиготні лінії при такій кількості демонстрували ознаки уповільненого росту та певний хлороз листя, але вони відновлювалися за 3-5 тижнів, тоді, як звичайні сіянці цукрового буряка гинули від інгібуючих ALS гербіцидів.

ALS-мутанти характеризували таким чином:

Видобування та аналіз нуклеїновокислотної послідовності одержаного мутанта здійснювали за допомогою LGC Genomics GmbH, Берлін, Німеччина, згідно зі зміненими стандартними протоколами.

Нуклеїновокислотну послідовність, одержану з мутанта цукрового буряка SB574TL, показано у SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 4 представляє відповідну амінокислотну послідовність, тоді, як SEQ ID NO: 1 одержували після секвенування послідовності рослини цукрового буряка дикого типу, яку брали як вихідний матеріал. SEQ ID NO: 2 представляє відповідну амінокислотну послідовність цукрового буряка дикого типу.

Порівняння цих послідовностей виявляє лише одну мутацію у позиції 574, але більше не відбувалося ніяких змін у жодній іншій частині цього ендегенного ALS гена.

SEQ ID No 1

(1)  
ATGGCGGCTACCTTCACAAACCCAACATTTTCCCCTTCCTCAACTCCATTAACCAAAACC  
SEQ ID No 3

(1)  
ATGGCGGCTACCTTCACAAACCCAACATTTTCCCCTTCCTCAACTCCATTAACCAAAACC  
SEQ ID No 1

(61)  
CTAAAATCCCAATCTTCCATCTCTTCAACCCTCCCCTTTTCCACCCCTCCCAAAACCCCA  
SEQ ID No 3

(61)  
CTAAAATCCCAATCTTCCATCTCTTCAACCCTCCCCTTTTCCACCCCTCCCAAAACCCCA  
SEQ ID No 1

(121)  
ACTCCACTCTTTCACCGTCCCCTCCAAATCTCATCCTCCCAATCCCACAAATCATCCGCC  
SEQ ID No 3

(121)

ACTCCACTCTTTACCGTCCCCTCCAAATCTCATCCTCCCAATCCCACAAATCATCCGCC  
 SEQ ID No 1  
 (181)  
 5 ATTAAACACAACTCAAGCACCTTCTTCTCCAGCTATTGAAGATTCATCTTTCGTTTCT  
 SEQ ID No 3  
 (181)  
 ATTAAACACAACTCAAGCACCTTCTTCTCCAGCTATTGAAGATTCATCTTTCGTTTCT  
 SEQ ID No 1  
 (241)  
 10 CGATTTGGCCCTGATGAACCCAGAAAAGGGTCCGATGTCCTCGTTGAAGCTCTTGAGCGT  
 SEQ ID No 3  
 (241)  
 CGATTTGGCCCTGATGAACCCAGAAAAGGGTCCGATGTCCTCGTTGAAGCTCTTGAGCGT  
 SEQ ID No 1  
 (301)  
 15 GAAGGTGTTACCAATGTGTTTGCTTACCCTGGTGGTGCATCTATGGAAATCCACCAAGCT  
 SEQ ID No 3  
 (301)  
 GAAGGTGTTACCAATGTGTTTGCTTACCCTGGTGGTGCATCTATGGAAATCCACCAAGCT  
 SEQ ID No 1  
 (361)  
 20 CTCACACGCTCTAAAACCATCCGCAATGTCCTCCCTCGCCATGAACAAGGCGGGGTTTTTC  
 SEQ ID No 3  
 (361)  
 25 CTCACACGCTCTAAAACCATCCGCAATGTCCTCCCTCGCCATGAACAAGGCGGGGTTTTTC  
 SEQ ID No 1  
 (421)  
 GCCGCCGAGGGATATGCTAGAGCTACTGGAAAGGTTGGTGTCTGCATTGCGACTTCTGGT  
 SEQ ID No 3  
 (421)  
 30 GCCGCCGAGGGATATGCTAGAGCTACTGGAAAGGTTGGTGTCTGCATTGCGACTTCTGGT  
 SEQ ID No 1  
 (481)  
 35 CCTGGTGCTACCAACCTCGTATCAGGTCTTGCTGACGCTCTCCTTGATTCTGTCCCTCTT  
 SEQ ID No 3  
 (481)  
 CCTGGTGCTACCAACCTCGTATCAGGTCTTGCTGACGCTCTCCTTGATTCTGTCCCTCTT  
 SEQ ID No 1  
 (541)  
 40 GTTGCCATCACTGGCCAAGTTCCACGCCGTATGATTGGCACTGATGCTTTTCAGGAGACT  
 SEQ ID No 3  
 (541)  
 GTTGCCATCACTGGCCAAGTTCCACGCCGTATGATTGGCACTGATGCTTTTCAGGAGACT  
 SEQ ID No 1  
 (601)  
 45 CCAATTGTTGAGGTGACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATTTAGTTTTGGATGTAGAG  
 SEQ ID No 3  
 (601)  
 CCAATTGTTGAGGTGACAAGGTCTATTACTAAGCATAATTATTTAGTTTTGGATGTAGAG  
 SEQ ID No 1  
 (661)  
 50 GATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCCTTTTTTTTAGCTAATTCTGGTAGGCCTGGACCT  
 SEQ ID No 3  
 (661)  
 55 GATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCCTTTTTTTTAGCTAATTCTGGTAGGCCTGGACCT  
 SEQ ID No 1  
 (721)  
 60 GTTTTGATTGATCTTCCTAAAGATATTCAGCAGCAATTGGTTGTTCTGATTGGGATAGG  
 SEQ ID No 3  
 (721)



GTTTTGATTGATCTTCCTAAAGATATTCAGCAGCAATTGGTTGTTCTGATTGGGATAGG  
SEQ ID No 1  
(781)

5 CCTTTTAAGTTGGGTGGGTATATGTCTAGGCTGCCAAAGTCCAAGTTTTCGACGAATGAG  
SEQ ID No 3  
(781)

CCTTTTAAGTTGGGTGGGTATATGTCTAGGCTGCCAAAGTCCAAGTTTTCGACGAATGAG  
SEQ ID No 1  
(841)

10 GTTGGACTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTTGATGAGTGAGTCGAAGAAGCCTGTCTTGTAT  
SEQ ID No 3  
(841)

GTTGGACTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTTGATGAGTGAGTCGAAGAAGCCTGTCTTGTAT  
SEQ ID No 1  
(901)

15 GTGGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAGGAGTTGAGGAGATTTGTTGAGTTGACAGGG  
SEQ ID No 3  
(901)

GTGGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAGGAGTTGAGGAGATTTGTTGAGTTGACAGGG  
SEQ ID No 1  
(961)

20 ATTCCGGTGGCTAGTACTTTGATGGGGTTGGGGTCTTACCCTTGTAATGATGAACTGTCT  
SEQ ID No 3  
(961)

25 ATTCCGGTGGCTAGTACTTTGATGGGGTTGGGGTCTTACCCTTGTAATGATGAACTGTCT  
SEQ ID No 1  
(1021)

CTTCATATGTTGGGGATGCACGGGACTGTTTATGCCAATTATGCGGTGGATAAGGCCGGAT  
SEQ ID No 3  
(1021)

30 CTTCATATGTTGGGGATGCACGGGACTGTTTATGCCAATTATGCGGTGGATAAGGCCGGAT  
SEQ ID No 1  
(1081)

TTGTTGCTTGCTTTTCGGGGTTAGGTTTGTATGATCGTGTGACCGGGAAGCTCGAGGCGTTT  
SEQ ID No 3  
(1081)

35 TTGTTGCTTGCTTTTCGGGGTTAGGTTTGTATGATCGTGTGACCGGGAAGCTCGAGGCGTTT  
SEQ ID No 1  
(1141)

40 GCTAGCCGTGCTAAGATTGTGCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAACAAG  
SEQ ID No 3  
(1141)

GCTAGCCGTGCTAAGATTGTGCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAACAAG  
SEQ ID No 1  
(1201)

45 CAGCCCCATGTGTCCATTTGTGCTGATGTTAAATTGGCATTGCGGGGTATGAATAAGATT  
SEQ ID No 3  
(1201)

CAGCCCCATGTGTCCATTTGTGCTGATGTTAAATTGGCATTGCGGGGTATGAATAAGATT  
SEQ ID No 1  
(1261)

50 CTGGAGTCTAGAATAGGGAAGCTGAATTTGGATTTCTCCAAGTGGAGAGAAGAATTAGGT  
SEQ ID No 3  
(1261)

55 CTGGAGTCTAGAATAGGGAAGCTGAATTTGGATTTCTCCAAGTGGAGAGAAGAATTAGGT  
SEQ ID No 1  
(1321)

GAGCAGAAGAAGGAATTCCCACTGAGTTTTAAGACATTTGGGGATGCAATTCCTCCACAA  
SEQ ID No 3  
(1321)

60

GAGCAGAAGAAGGAATTCCCACTGAGTTTTAAGACATTTGGGGATGCAATTCCTCCACAA  
 SEQ ID No 1  
 (1381)  
 5 TATGCCATTCAGGTGCTTGATGAGTTGACCAATGGTAATGCTATTATAAGTACTGGTGTT  
 SEQ ID No 3  
 (1381)  
 TATGCCATTCAGGTGCTTGATGAGTTGACCAATGGTAATGCTATTATAAGTACTGGTGTT  
 SEQ ID No 1  
 (1441)  
 10 GGGCAGCACCAAATGTGGGCTGCGCAGCATTACAAGTACAGAAACCCTCGCCAATGGCTG  
 SEQ ID No 3  
 (1441)  
 GGGCAGCACCAAATGTGGGCTGCGCAGCATTACAAGTACAGAAACCCTCGCCAATGGCTG  
 SEQ ID No 1  
 (1501)  
 15 ACCTCTGGTGGGTTGGGGGCTATGGGGTTTGGGCTACCAGCCGCCATTGGAGCTGCAGTT  
 SEQ ID No 3  
 (1501)  
 ACCTCTGGTGGGTTGGGGGCTATGGGGTTTGGGCTACCAGCCGCCATTGGAGCTGCAGTT  
 SEQ ID No 1  
 (1561)  
 20 GCTCGACCAGATGCAGTGGTTGTCGATATTGATGGGGATGGCAGTTTTATTATGAATGTT  
 SEQ ID No 3  
 (1561)  
 GCTCGACCAGATGCAGTGGTTGTCGATATTGATGGGGATGGCAGTTTTATTATGAATGTT  
 SEQ ID No 1  
 (1621)  
 25 CAAGAGTTGGCTACAATTAGGGTGGAAAATCTCCCAGTTAAGATAATGCTGCTAAACAAT  
 SEQ ID No 3  
 (1621)  
 CAAGAGTTGGCTACAATTAGGGTGGAAAATCTCCCAGTTAAGATAATGCTGCTAAACAAT  
 SEQ ID No 1  
 (1681)  
 35 CAACATTTAGGTATGGTTGTCCAATGGGAAGATAGGTTCTATAAAGCTAACCGGGGCACAT  
 SEQ ID No 3  
 (1681)  
 CAACATTTAGGTATGGTTGTCCAATTGGAAGATAGGTTCTATAAAGCTAACCGGGGCACAT  
 SEQ ID No 1  
 (1741)  
 40 ACATACCTTGGAACCCTTCCAAATCTGCTGATATCTTCCCTGATATGCTCAAATTCGCT  
 SEQ ID No 3  
 (1741)  
 ACATACCTTGGAACCCTTCCAAATCTGCTGATATCTTCCCTGATATGCTCAAATTCGCT  
 SEQ ID No 1  
 (1801)  
 45 GAGGCATGTGATATTCCTTCTGCCCCGTGTTAGCAACGTGGCTGATTTGAGGGCCGCCATT  
 SEQ ID No 3  
 (1801)  
 GAGGCATGTGATATTCCTTCTGCCCCGTGTTAGCAACGTGGCTGATTTGAGGGCCGCCATT  
 SEQ ID No 1  
 (1861)  
 50 CAAACAATGTTGGATACTCCAGGGCCGTACCTGCTCGATGTGATTGTACCGCATCAAGAG  
 SEQ ID No 3  
 (1861)  
 55 CAAACAATGTTGGATACTCCAGGGCCGTACCTGCTCGATGTGATTGTACCGCATCAAGAG  
 SEQ ID No 1  
 (1921)  
 CATGTGTTGCCTATGATTCCAAGTGGTGCCGTTTCAAGGATACCATTACAGAGGGTGAT  
 SEQ ID No 3  
 (1921)  
 60

CATGTGTTGCCTATGATTCCAAGTGGTGCCGGTTTCAAGGATACCATTACAGAGGGTGAT  
 SEQ ID No. 1  
 (1981)  
 GGAAGAACCTCTTATTGA  
 5 SEQ ID No. 3  
 (1981)  
 GGAAGAACCTCTTATTGA  
 SEQ ID No. 2  
 (1)  
 10 MAATFTNPTFSPSSTPLTKTLKSQSSISSTLPFSTPPKTPTPLFHRPLQISSSQSHKSSA  
 SEQ ID No. 4  
 (1)  
 MAATFTNPTFSPSSTPLTKTLKSQSSISSTLPFSTPPKTPTPLFHRPLQISSSQSHKSSA  
 SEQ ID No. 2  
 15 (61)  
 IKTQTQAPSSPAIEDSSFVSRFGPDEPRKGSVDLVEALEREGVTNVFAYPGGASMEIHQA  
 SEQ ID No. 4  
 (61)  
 IKTQTQAPSSPAIEDSSFVSRFGPDEPRKGSVDLVEALEREGVTNVFAYPGGASMEIHQA  
 20 SEQ ID No. 2  
 (121)  
 LTRSKTIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARATGKVGVC IATSGPGATNLV SGLADALLDSVPL  
 SEQ ID No. 4  
 (121)  
 25 LTRSKTIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARATGKVGVC IATSGPGATNLV SGLADALLDSVPL  
 SEQ ID No. 2  
 (181)  
 VAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTR SITHKHN YLVDVEDIPRIVKEAFFLANSGRPGP  
 SEQ ID No. 4  
 30 (181)  
 VAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTR SITHKHN YLVDVEDIPRIVKEAFFLANSGRPGP  
 SEQ ID No. 2  
 (241)  
 VLIDL PKDIQQQLVVPDWDRPFKLGGYMSRLPKSKFSTNEVGLLEQIVRLMSES KKPVL Y  
 35 SEQ ID No. 4  
 (241)  
 VLIDL PKDIQQQLVVPDWDRPFKLGGYMSRLPKSKFSTNEVGLLEQIVRLMSES KKPVL Y  
 SEQ ID No. 2  
 (301)  
 40 VGGGCLNSSEELRRFVELTGIPVASTLMGLG SYPCNDELSHMLGMHGT VYANYAVDKAD  
 SEQ ID No. 4  
 (301)  
 VGGGCLNSSEELRRFVELTGIPVASTLMGLG SYPCNDELSHMLGMHGT VYANYAVDKAD  
 SEQ ID No. 2  
 45 (361)  
 LLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSICADV KLALRGMNKI  
 SEQ ID No. 4  
 (361)  
 LLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSICADV KLALRGMNKI  
 50 SEQ ID No. 2  
 (421)  
 LESRIGKLNLD FSKWREELGEQKKEFPLSF KTFGDAIPPQYAIQVLD ELTNGNAIISTGV  
 SEQ ID No. 4  
 (421)  
 55 LESRIGKLNLD FSKWREELGEQKKEFPLSF KTFGDAIPPQYAIQVLD ELTNGNAIISTGV  
 SEQ ID No. 2  
 (481)  
 GQHQMWA AQHYKYRNPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AVARPD AVVVDIDGDGSFIMNV  
 SEQ ID No. 4  
 60 (481)

GQHQMWAQAQHYKYRNPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGAARPDVAVVDIDGDSFIMNV  
SEQ ID No. 2  
(541)

5 QELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPSSADIFPDMLKFA  
SEQ ID No. 4  
(541)

QELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNPSSADIFPDMLKFA  
SEQ ID No. 2  
(601)

10 EACDIPSARVSNVADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGAGFKDTITEGD  
SEQ ID No. 4  
(601)

EACDIPSARVSNVADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGAGFKDTITEGD  
SEQ ID No. 2

15 (661) GRTSY-  
SEQ ID No. 4  
(661) GRTSY-

Втім, в оптимальному варіанті рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом та їх частини є придатними для агрономічного застосування. "Придатні для агрономічного застосування" означає, що рослини *B. vulgaris* та їх частини можуть використовуватися з агрономічними цілями. Наприклад, рослини *B. vulgaris* мають призначатися для використання у виробництві цукру, виробництві біологічного палива (такого, як біогаз, біобутанол), виробництві етанолу, виробництві бетаїну та/або уридину. У контексті цього опису термін "придатні для агрономічного застосування" також означає, що рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом в оптимальному варіанті є менш чутливими до інгібуючого ALS гербіциду, у ще кращому варіанті вони є принаймні у 100 разів менш чутливими, у ще кращому варіанті – у 500 разів, у ще кращому варіанті – у 1000 разів, і у найкращому варіанті – у 2000 разів. Інгібуючий ALS гербіцид являє собою один або кілька описаних авторами гербіцидів, в оптимальному варіанті – форамсульфурон, окремо або у комбінації з одним або кількома іншими інгібуючими ALS гербіцидами, або з підкласу сульфонілсечовинних гербіцидів, або з будь-якого іншого підкласу інгібуючих ALS гербіцидів, у найкращому варіанті – форамсульфурон у комбінації з іншим сульфонілсечовинним гербіцидом та/або інгібітором ALS з підкласу сульфоніламінокарбонілтріазолінонових гербіцидів.

В оптимальному варіанті придатні для агрономічного застосування рослини *B. vulgaris*, у найкращому варіанті – рослини цукрового буряка згідно з даним винаходом є повністю фертильними, у ще кращому варіанті – мають фертильність рослин дикого типу. Фертильність має надзвичайне значення для рослини *B. vulgaris* згідно з даним винаходом з точки зору придатності для агрономічного застосування.

Прикладом придатної для агрономічного застосування рослини *B. vulgaris* є цукровий буряк. Рослина цукрового буряка згідно з даним винаходом при культивуванні на площі в один гектар (з врожайністю приблизно від 80 000 до 90 000 цукрових буряків) в оптимальному варіанті служить для виробництва принаймні 4 тонн цукру.

В альтернативному варіанті рослина цукрового буряка рослина згідно з даним винаходом має містити 15-20 % цукру, у ще кращому варіанті – принаймні 17 %, щоб бути придатною для агрономічного застосування. Таким чином, рослини цукрового буряка, які мають вміст цукру 15-20 %, в оптимальному варіанті – принаймні 17 %, є оптимальним варіантом втілення даного винаходу.

Рослини згідно з даним винаходом можуть бути розпізнані з застосуванням будь-якого способу генотипного аналізу. Оцінка генотипну рослин включає застосування таких технологій, як електрофорез ізозимів, поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), випадкова ампліфікація поліморфних ДНК (RAPD), полімеразна ланцюгова реакція з довільними праймерами (AP-PCR), алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція (AS-PCR), фінгерпринтинг на основі ампліфікації ДНК (DAF), ампліфіковані ділянки з охарактеризованою послідовністю (SCAR), поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP), прості повторювані послідовності (SSR), які також називаються "мікросателітами". До передбачених авторами додаткових композицій та способів аналізу генотипу рослин належать способи, описані у Публікації США № 2004/0171027, Публікації США № 2005/02080506 та Публікації США № 2005/0283858.

Інший аспект даного винаходу стосується застосування описаної рослини буряка звичайного та/або описаних авторами придатних для збирання частин або матеріалу для розмноження для

вироснування/селекції рослин буряка звичайного. Способи вироснування/селекції рослин *B. Vulgaris* описуються в інших розділах цього опису. Такі способи вироснування/селекції можуть застосовуватися для одержання рослин *B. vulgaris* згідно з даним винаходом, які також мають нові особливості, такі, як стійкість до стресів, то яких, крім інших, належать посуха, спека, холод або надмірна мінералізація і т. ін.

У ще одному аспекті даний винахід передбачає застосування описаної авторами толерантної до гербіцидів рослини буряка звичайного та/або одержаних з них придатних для збирання частин або матеріалу для розмноження згідно зі способом відбору для відбору інгібуючих ALS гербіцидів.

Краще розуміння даного винаходу та багатьох його переваг забезпечують представлені нижче приклади, які мають лише ілюстративне призначення і жодним чином не обмежують обсягу даного винаходу.

#### Приклад 1: Виділення мутантів

Клітинні культури цукрового буряка одержували з сіянців диплоїдного цукрового буряка генотипу 7T9044 (як описано, наприклад, у публікації Alexander Dovzhenko, PhD Thesis, "Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.)", Ludwig-Maximilians-Universität München, Німеччина, 2001).

Насіння цукрового буряка занурювали на 60 секунд у 70 % етанол, потім двічі промивали у стерильній воді з 0,01 % детергента, а потім інкубували протягом 1-4 годин в 1 % вилуговувачі NaOCl. Після цього насіння тричі промивали стерильною  $H_2O$  і зберігали у стерильній  $H_2O$  до наступного дня при 4 °C. Після цього зародки відокремлювали за допомогою пінцета та скальпеля.

Щойно підготовлені зародки занурювали у 0,5 % NaOCl на 30 хв, а потім тричі промивали у стерильній  $H_2O$ . Після останнього етапу промивання їх поміщали на безгормональне MS-агарове середовище (Murashige and Skoog (1962), *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497). Зародки, з яких розвинулися стерильні сіянці, використовували для закладання клітинних культур цукрового буряка, що піддаються регенерації.

Сім'ядолі, а також гіпокотилі розрізали на відрізки по 2-5 мм завдовжки, а потім культивували на затвердженому агаром (0,8 %) MS-агаровому середовищі, яке містило 1 мг/л бензиламінопурину (BAP) або 0,25 мг/л тидіазурону (TDZ). Через 4 тижні культури пагонів, що розвивалися, переносили на свіже MS-агарове середовище такого самого складу, а потім субкультивували з одномісячними інтервалами. Культури тримали при 25 °C при тьмяному світлі з циклом 12 год. / 12 год. світла/темряви.

Через 7-10 днів субкультивування культури пагонів, які вироснували на середовищі, яке містило тидіазурон, утворювали калюс чіткого типу, який був швидко зростаючим, м'яким і крихким. Колір цього типу калюсу був від жовтуватого до світло-зеленого. Деякі з цих крихких калюсів незмінно продукували хлорофіловмісні примордії пагонів з зародкоподібних утворень. Ці швидко зростаючі калюси, що піддавалися регенерації, застосовували для відбору толерантних до інгібуючих ALS гербіцидів мутантів цукрового буряка.

Коли цей тип калюсу піддавали дії  $10^{-9}$  М інгібуючого ALS гербіциду форамсульфурону (який належить до сульфонілсечовинного підкласу, див. вище), клітини виживали, але продукували менше, ніж 50 % біомаси їхніх сиблінгів на середовищі, позбавленому інгібітора. На середовищі, яке містило  $3 \times 10^{-8}$  М форамсульфурону, ріст не виявлявся. Для великомасштабних експериментів з селекції мутантів вибирали,  $10^{-7}$  М форамсульфурону. Колонії клітин, які вижили й зростали, нумерували й переносили через 4-6 тижнів на свіже середовище, яке містило  $3 \times 10^{-7}$  М інгібітора. Одна з цих колоній клітин була здатна зростати не лише при цій концентрації інгібітора, але й у присутності  $3 \times 10^{-6}$  М форамсульфурону.

З цього клону (SB574TL) регенерували пагони у присутності інгібуючого ALS гербіциду, а потім пагони переносили до MS-середовища, яке містило 0,05 мг/л нафталіноцтової кислоти (NAA).

Протягом 4-12 тижнів у пагонів формувалося коріння, а потім їх переносили у стерильні тепличні контейнери, заповнені вологим стерилізованим перлітом, і поливали з неорганічними інгредієнтами MS-середовища половинної концентрації. В альтернативному варіанті паростки переносили прямо з затвердженого агаром середовища у ґрунтову суміш з вмістом перліту у теплиці. Протягом перших 10-15 днів після перенесення у ґрунт, який містить субстрат, рослини тримали у середовищі з високою вологістю повітря. Під час та після їх переведення на режим нормальної тепличної вологості повітря рослини тримали у теплиці під штучним світлом (12 год.) при 20  $\pm$  3 °C / 15  $\pm$  2 °C денної/нічної температури.

Через 3-5 тижнів регенеровані рослини з підготовлених раніше толерантної до форамсульфурону культури клітин (SB574TL), а також з культур клітин дикого типу обробляли

форамсульфуруном, йодосульфурон-метил-натрієм (CAS RN 144550-3-7) та сумішшю обох активних інгредієнтів. Випробувані дози гербіциду були еквівалентні 7-70 г а.і./га для форамсульфуруну і 1-10 г а.і./га для йодосульфурон-метил-натрію. Регенеровані рослини з цієї толерантної лінії клітин витримували навіть найвищі дози гербіцидів (форамсульфуруну, йодосульфурон-метил-натрію та їхніх сумішей у співвідношенні 7:1, тоді, як рослини дикого типу

гинули навіть від найнижчих доз.

Приклад 2: Випробування потомства

На основі SB574TL насіння F2 та F3 експериментальних гібридів, які забезпечують алель резистентності у гетерозиготному стані, а також насіння F4 – F6 що забезпечує мутантний алель у гомозиготному стані висівали у полі й обробляли форамсульфуруном, йодосульфурон-метил-натрієм, а також сумішами обох інгібуючих ALS гербіцидів, коли у рослин розвивалися 3-5 листів розетки. Гомозиготні сіянці витримували суміші 35 г форамсульфуруну/га + 7 г йодосульфурон-метил-натрію/га без затримки росту або будь-яких ознак видимої шкоди. Гетерозиготні лінії при такій кількості демонстрували ознаки уповільненого росту та певний хлороз листя, але вони відновлювалися за 3-5 тижнів, тоді, як звичайні сіянці цукрового буряка

гинули від інгібуючих ALS гербіцидів.

Приклад 3: Молекулярна характеристика одержаного мутанта цукрового буряка (SB574TL)

Видобування та аналіз нуклеїновокислотної послідовності одержаного мутанта здійснювали за допомогою LGC Genomics GmbH, Берлін, Німеччина, згідно зі зміненими стандартними протоколами.

Нуклеїновокислотну послідовність, одержану з мутанта цукрового буряка SB574TL, показано в SEQ ID NO: 3, причому SEQ ID NO: 4 представляє відповідну амінокислотну послідовність, тоді, як SEQ ID NO: 1 одержували після секвенування послідовності рослини цукрового буряка дикого типу, яку брали як вихідний матеріал. SEQ ID NO: 2 представляє відповідну амінокислотну послідовність цукрового буряка дикого типу.

Порівняння всіх цих послідовностей чітко виявляє лише одну мутацію у позиції 569, але більше не відбувалося ніяких змін у жодній іншій частині цього ендегенного ALS гена цього рослинного матеріалу цукрового буряка.

Приклад 4: Вимірювання ферментної активності

Кодуючі послідовності ALS гена буряка звичайного дикого типу та W574L-мутанта (SB574TL) клонували у вектори Novagen pET-32a(+) і вектори трансформували в AD494 Escherichia coli згідно з інструкціями виробника. Бактерії вирощували при 37 °C в LB-середовищі (Luria-Broth), яке містило 100 мг/л карбеніциліну та 25 мг/л канаміцину, стимулювали, використовуючи 1 мМ ізопропіл-b-D-тіогалактопіранозиду при OD<sub>600</sub> 0,6, культивували протягом 16 годин при 18 °C і збирали шляхом центрифугування. Згустки бактерій ресуспендували у 100 мМ буфера з фосфату натрію, pH 7,0, який містив 0,1 мМ тіамінпірофосфату, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> та 1 мкМ FAD, у концентрації 1 г сирової маси на 25 мл буфера і руйнували шляхом ультразвукової обробки. Неочищений білковий екстракт одержаний після центрифугування, використовували для вимірювання активності ALS.

Аналізи ALS здійснювали у 96-лункових мікротитрувальних планшетах, застосовуючи модифікацію процедури, описаної у публікації Ray (1984). Реакційна суміш містила 20 мМ буфера з фосфату калію pH 7,0, 20 мМ пірувату натрію, 0,45 мМ тіамінпірофосфату, 0,45 мМ MgCl<sub>2</sub>, 9 мкМ FAD, фермент ALS та інгібітори ALS у різних концентраціях у кінцевому об'ємі приблизно 90 мкл. Аналізи розпочинали шляхом додавання ферменту і завершували після 75 хв інкубації при 30 °C шляхом додавання 40 мкл 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Через 60 хв при кімнатній температурі додавали 80 мкл розчину 1,4 % α-нафтолу та 0,14 % креатину у 0,7 М NaOH і після додаткових 45 хв інкубації при кімнатній температурі визначали оптичну густину при 540 нм. Показники рI50 для інгібування ALS визначали, як описано у публікації Ray (1984), застосовуючи програму апроксимації кривих по точках XLFit Excel, додаткова версія 4.3.1, від ID Business Solutions Limited.

В цілому мутантний фермент був принаймні у 2000 разів менш чутливим до інгібітора ALS форамсульфуруну порівняно з ферментом дикого типу.

Приклад 5: Вимірювання активності ферменту (з рослин)

ALS видобували з листя цукрового буряка або культур тканин цукрового буряка, як описано у публікації Ray (1984), Plant Physiol 75:827-831.

Активність ALS визначали в екстрактах листя цукрового буряка дикого типу та екстрактах листя одержаного SB574TL у присутності різних концентрацій форамсульфуруну, як описано у Прикладі 4.

В цілому мутантний фермент був принаймні у 2000 разів менш чутливим до інгібітора ALS форамсульфуруну порівняно з ферментом дикого типу.

Приклад 6: Польові випробування з застосуванням гомозиготних толерантних до інгібуючих ALS гербіцидів рослин цукрового буряка

На основі SB574TL, насіння F4 – F6 що забезпечує мутантний алель ендегенного ALS гена у гомозиготному стані, застосовували для подальшого випробування.

5 Насіння гомозиготних мутантних рослин SB574TL та насіння традиційного сорту KLARINA (загальнодоступні чутливі до інгібітора ALS контрольні сорти цукрового буряка не мали відповідної мутації у позиції 569 у цьому білку ALS) висівали у полі й вирощували до різних стадій росту згідно зі стандартом BBCH (визначеним у монографії „Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen“, 2nd edition, 2001, ed. Uwe Meier, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft).

10 Після цього рослини обробляли відповідними інгібуючими ALS гербіцидами, які вказано нижче у Таблиці 1 і які є ідентичними тим, що застосовуються під час процедури відбору.

Кількість води, застосовуваної у різних випадках, дорівнювала 200 л/га.

15 Через 8, 14 та 28 днів (як вказано у Таблиці 1) після внесення (DAA) відповідного(их) інгібуючого(их) ALS гербіциду(ів) шкоду (фітотоксичність/фіто) для різних рослин цукрового буряка визначали за шкалою від 0 % до 100 %.

У цьому контексті "0 %" означає "відсутність фітотоксичності/фіто", а "100 %" означає, що рослини повністю загинули.

Таблиця 1

Характеристики сорту		KLARINA	Цукровий буряк на основі SB574TL	KLARINA	Цукровий буряк на основі SB574TL	KLARINA	Цукровий буряк на основі SB574TL
Етап внесення		BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14	BBCH 14
Показник		% фіто	% фіто	% фіто	% фіто	% фіто	% фіто
Інтервал Внесення – Оцінка		8 днів	8 днів	14 днів	14 днів	28 днів	28 днів
Активна речовина	г а.і./га						
Форамсульфурон	25 г/га	85	0	83	0	86	0
Форамсульфурон	50 г/га	90	0	92	0	94	0
Йодосульфурон-метил-натрій	7 г/га	90	0	9	0	100	0

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БАЕР ІНТЕЛЛЕКТУЕЛ ПРОПЕРТІ ГМБХ та КВС ЗААТ АГ  
 <120> Толерантні до інгібуючого ALS гербіциду мутанти буряка звичайного  
 <130> BCS 09-1021 / KWS 0172 EP  
 <160> 6  
 <170> PatentIn версія 3.3  
 <210> 1  
 <211> 1998  
 <212> ДНК  
 <213> Beta vulgaris  
 <400> 1  
 atggcggtcta ccttcacaaa cccaacattt tccccttctt caactccatt aaccaaaacc 60  
 ctaaaatccc aatcttccat ctcttcaacc ctcccctttt ccacccctcc caaaacccca 120  
 actccactct ttcacgtcc cctccaaatc tcatcctccc aatcccacaa atcatccgcc 180  
 attaaaacac aaactcaagc accttcttct ccagctattg aagattcatc tttcgtttct 240  
 cgatttggtc ctgatgaacc cagaaaaggg tccgatgtcc tcgttgaagc tcttgagcgt 300  
 gaaggtgtta ccaatgtgtt tgcttaccct ggtggtgcat ctatggaaat ccaccaagct 360  
 ctcacacgct ctaaaaccat ccgcaatgtc ctcccctgcc atgaacaagg cgggggtttc 420  
 gccgccgagg gatatgctag agctactgga aaggttggtg tctgcattgc gacttctggt 480  
 cctggtgcta ccaacctcgt atcaggtctt gctgacgctc tccttgattc tgtccctctt 540  
 gttgccatca ctggccaagt tccacgcgt atgattggca ctgatgctt tcaggagact 600  
 ccaattgttg aggtgacaag gtctattact aagcataatt atttagtttt ggatgtagag 660  
 gatattccta gaattgttaa ggaagccttt ttttagcta attctggtag gcctggacct 720  
 gttttgattg atcttcttaa agatattcag cagcaattgg ttgttctga ttgggtagag 780  
 ccttttaagt tgggtgggta tatgtctagg ctgccaaagt ccaagttttc gacgaatgag 840  
 gttggacttc ttgagcagat tgtgaggttg atgagtgagt cgaagaagcc tgtcttgat 900  
 gtgggaggtg ggtgtttgaa ttctagttag gagttgagga gatttggtga gttgacaggg 960  
 attccggttg ctagtacttt gatggggttg gggctctacc cttgtaatga tgaactgtct 1020  
 ctccatatgt tggggatgca cgggactgtt tatgccaaat atgcggtgga taaggcggat 1080  
 ttgttgcttg ctttcggggt taggtttgat gatcgtgtga ccgggaagct cgaggcgttt 1140  
 gctagccgtg ctaagattgt gcatattgat attgactctg ctgagattgg gaagaacaag 1200  
 cagccccatg tgtccatttg tgctgatgtt aaattggcat tgcggggtat gaataagatt 1260  
 ctggagtcta gaatagggaa gctgaatttg gatttctcca agtggagaga agaattaggt 1320  
 gagcagaaga aggaattccc actgagtttt aagacatttg gggatgcaat tcctccacaa 1380



```

tatgccattc aggtgcttga tgagttgacc aatggtaatg ctattataag tactggtggt 1440
gggcagcacc aaatgtgggc tgcgcagcat tacaagtaca gaaaccctcg ccaatggctg 1500
acctctggtg ggttgggggc tatgggggtt gggctaccag ccgccattgg agctgcagtt 1560
gctcgaccag atgcagtggt tgtcgatatt gatggggatg gcagttttat tatgaatgtt 1620
caagagtttg ctacaattag ggtggaaaat ctcccagtta agataatgct gctaaacaat 1680
caacatttag gtatggttgt ccaatgggaa gataggttct ataaagctaa ccgggcacat 1740
acataccttg gaaacccttc caaatctgct gatatcttcc ctgatatgct caaattcgct 1800
gaggcatgtg atattccttc tgcccgtgtt agcaacgtgg ctgatttgag ggccgccatt 1860
caaacaatgt tggatactcc agggccgtac ctgctcgatg tgattgtacc gcatcaagag 1920
catgtgttgc ctatgattcc aagtgtgccc ggtttcaagg ataccattac agagggtgat 1980
ggaagaacct cttattga 1998

```

```

<210> 2
<211> 665
<212> PRT
<213> Beta vulgaris

```

<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  
 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> Beta vulgaris

<220>  
<221> мутація  
<222> (1706)..(1706)  
<223> Заміщення гуанозиду тимідином

<400> 3  
atggcgggcta ccttcacaaa cccaacattt tcccccttct caactccatt aacccaaaacc 60  
ctaaaatccc aatcttccat ctcttcaacc ctcccccttt ccacccctcc caaaacccca 120  
actccactct ttcaccgtcc cctccaaatc tcactctccc aatcccacaa atcatccgcc 180  
attaaaacac aaactcaagc accttcttct ccagctattg aagattcatc tttcgtttct 240  
cgatttggcc ctgatgaacc cagaaaaggg tccgatgtcc tcgttgaagc tcttgagcgt 300  
gaaggtgtta ccaatgtgtt tgcttacctt ggtggtgcat ctatggaaat ccaccaagct 360  
ctcacacgct ctaaaacctat ccgcaatgtc ctccctcgcc atgaacaagg cgggggtttc 420  
gccgccgagg gatatgctag agctactgga aagggttggtg tctgcattgc gacttctggt 480  
cctggtgcta ccaacctcgt atcaggtctt gctgacgctc tccttgattc tgtccctctt 540  
gttgccatca ctggccaagt tccacgccgt atgattggca ctgatgcttt tcaggagact 600  
ccaattgttg aggtgacaag gtctattact aagcataatt atttagtttt ggatgtagag 660  
gatattccta gaattgttaa ggaagccttt ttttttagcta attctggtag gcctggacct 720  
gttttgattg atcttcctaa agatattcag cagcaattgg ttgttcctga ttgggatagg 780  
ccttttaagt tgggtgggta tatgtctagg ctgccaaagt ccaagttttc gacgaatgag 840  
gttggaactc ttgagcagat tgtgaggttg atgagtgagt cgaagaagcc tgtcttgat 900  
gtgggaggtg ggtgtttgaa ttctagttag gagttgagga gatttggtga gttgacagg 960  
attccggttg ctagtacttt gatgggggtg gggctctacc cttgtaatga tgaactgtct 1020  
cttcatatgt tggggatgca cgggactgtt tatgccaatt atgcggtgga taaggcggat 1080  
ttgttgcttg ctttcggggg taggtttgat gatcgtgtga ccgggaagct cgaggcgttt 1140  
gctagccgtg ctaagattgt gcatattgat attgactctg ctgagattgg gaagaacaag 1200  
cagcccatg tgtccatttg tgctgatgtt aaattggcat tgcggggtat gaataagatt 1260

```

ctygagtcta gaatagggaa gctgaatttg gatttctcca agtggagaga agaattaggt 1320
gagcagaaga aggaattccc actgagtttt aagacatttg gggatgcaat tcctccacaa 1380
tatgccattc aggtgcttga tgagttgacc aatggtaatg ctattataag tactggtggt 1440
gggcagcacc aaatgtgggc tgcgcagcat tacaagtaca gaaaccctcg ccaatggctg 1500
acctctggtg ggttgggggc tatgggggtt gggctaccag ccgccattgg agctgcagtt 1560
gctcgaccag atgcagtggg tgctgatatt gatggggatg gcagttttat tatgaatggt 1620
caagagtttg ctacaattag ggtggaaaat ctcccagtta agataatgct gctaaacaat 1680
caacatttag gtatggttgt ccaattggaa gataggttct ataaagctaa ccgggcacat 1740
acataccttg gaaacccttc caaatctgct gatattcttc ctgatatgct caaattcgct 1800
gaggcatgtg atattccttc tgcccgtgtt agcaacgtgg ctgatttgag ggccgccatt 1860
caaacaatgt tggatactcc agggccgtac ctgctcgatg tgattgtacc gcatcaagag 1920
catgtgttgc ctatgattcc aagtggtgcc gggttcaagg ataccattac agaggggtgat 1980
ggaagaacct cttattga 1998

```

```

<210> 4
<211> 665
<212> PRT
<213> Beta vulgaris

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (569)..(569)
<223> Заміщення триптофану лейцином

```

```

<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> 2013  
<212> ДНК  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5  
atggcgcgcg caacaacaac aacaacaaca tcttcttcga tctccttctc caccaaacca 60  
tctccttctc cctccaaatc accattacca atctccagat tctccctccc attctcccta 120  
aaccccaaca aatcactctc ctctctccgc cgcgcgggta tcaaattccag ctctcctccc 180  
tccatctcgc cgtgtctcaa cacaaccacc aatgtcacia ccaactcctc tccaacaaaa 240  
cctaccaaac ccgaaacatt catctccgga ttcgctccag atcaaccccg caaaggcgct 300  
gatatcctcg tcgaagcttt agaacgtcaa ggcgtagaaa ccgtattcgc ttaccctgga 360  
ggtgcatcaa tggagattca ccaagcctta acccgctctt cctcaatccg taacgtcctt 420  
cctcgtcacg aacaaggagg tgtattcgca gcagaaggat acgctcgatc ctccaggtaaa 480  
ccaggtatct gtatagccac ttcaggtccc ggagctacaa atctcgttag cggattagcc 540  
gatgcgttgt tagatagtgt tcctcttgta gcaatcacag gacaagtccc tcgtcgtatg 600  
attggtacag atgcgtttca agagactccg attgttgagg taacgcgttc gattacgaag 660  
cataactatc ttgtgatgga tgttgaagat atccctagga ttattgagga agctttcttt 720  
ttagctactt ctggtagacc tggacctgtt ttggttgatg ttcctaaaga tattcaacaa 780  
cagcttgcca ttcctaattg ggaacaggct atgagattac ctggttatat gtctaggatg 840  
cctaaacctc ccgaagattc tcatttgag cagattgtta gggtgatttc tgagtctaag 900  
aagcctgtgt tgtatgttg tgggtggtgt ttgaattcta gcgatgaatt gggtaggttt 960  
gttgagctta cggggatccc tgttgcgagt acgttgatgg ggctgggatc ttatccttgt 1020  
gatgatgagt tgctgttaca tatgcttgga atgcatggga cgggtgatgc gaattacgct 1080  
gtggagcata gtgatttggt gttggcggtt ggggtgaggt ttgatgatcg cgtcacgggt 1140  
aagcttgagg cttttgctag tagggctaag attgttcata ttgatattga ctctgctgag 1200  
attgggaaga ataagactcc tcattgtgtc gtgtgtggtg atgtcaagct ggctttgcaa 1260



```

gggatgaata aggttcttga gaaccgagct gaggagctta agcttgattt tggagtttgg 1320
aggaatgagt tgaacgtaca gaaacagaag tttccgttga gctttaagac gtttggggaa 1380
gctattcctc cacagtatgc gattaaggtc cttgatgagt tgactgatgg aaaagccata 1440
ataagtactg gtgtcgggca acatcaaattg tgggcggcgc agttctacaa ttacaagaag 1500
ccaaggcagt ggctatcatc aggaggcctt ggagctatgg gttttggact tcctgctgcc 1560
attggagcgt ctgttgctaa ccctgatgca atagttgtgg atattgacgg agatggaagc 1620
tttataatga atgtgcaaga gctggccaca atccgtgtag agcaacttcc agtgaagata 1680
ctcttattaa acaaccagca tcttggcatg gttatgcaat gggaagatcg gttctacaag 1740
gctaaccgag ctacacatt tctcggggat ccggctcagg aggacgagat attcccgaac 1800
atgttgctgt ttgcagcagc ttgcgggatt ccagcggcga gggtgacaaa gaaagcagat 1860
ctccgagaag ctattcagac aatgctggat acaccaggac cttacctgtt ggatgtgatt 1920
tgtccgcacc aagaacatgt gttgccgatg atcccgagtg gtggcacttt caacgatgtc 1980
ataacggaag gagatggccg gattaaatac tga 2013

```

```

<210> 6
<211> 670
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

```

```

Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe
1          5          10         15

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

Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser
35          40          45

Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ile Ser Ala
50          55          60

Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys
65          70          75          80

Pro Thr Lys Pro Glu Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro
85          90          95

Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
100         105         110

Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln

```

115							120						125				
Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Ser	Ser	Ile	Arg	Asn	Val	Leu	Pro	Arg	His	Glu		
130							135				140						
Gln	Gly	Gly	Val	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ser	Ser	Gly	Lys		
145					150					155					160		
Pro	Gly	Ile	Cys	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val		
				165					170					175			
Ser	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Ile		
			180					185					190				
Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu		
	195						200					205					
Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu		
	210						215				220						
Val	Met	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Ile	Glu	Glu	Ala	Phe	Phe		
225					230					235					240		
Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Lys		
				245					250					255			
Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Ala	Ile	Pro	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Met	Arg		
			260					265					270				
Leu	Pro	Gly	Tyr	Met	Ser	Arg	Met	Pro	Lys	Pro	Pro	Glu	Asp	Ser	His		
	275						280					285					
Leu	Glu	Gln	Ile	Val	Arg	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Leu		
	290					295					300						
Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Gly	Arg	Phe		
305					310					315					320		
Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly		
				325					330					335			
Ser	Tyr	Pro	Cys	Asp	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Met	Leu	Gly	Met	His		
			340					345					350				
Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu		
	355						360					365					
Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala		

370		375		380
Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu				
385		390		395
				400
Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys				
		405		410
				415
Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu				
		420		425
				430
Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys				
		435		440
				445
Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro				
		450		455
				460
Gln Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile				
		465		470
				475
				480
Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr				
		485		490
				495
Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala				
		500		505
				510
Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro				
		515		520
				525
Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn				
		530		535
				540
Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Val				
		545		550
				555
				560
Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp				
		565		570
				575
Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala				
		580		585
				590
Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys				
		595		600
				605
Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala				
		610		615
				620
Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile				

625

630

635

640

Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Thr  
645 650 655

Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr  
660 665 670

### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Толерантна до інгібуючих ALS гербіцидів рослина буряку звичайного та її органи, які включають мутацію в положенні, відповідному положенню 1705-1707 ендогенного гена ацетолактатсинтази (ALS), показаного еталонною нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1, причому ALS ген кодує поліпептид ALS, який містить лейцин замість триптофану, у позиції 569 поліпептиду ALS, і який є гомозиготним щодо зазначеної мутації ендогенного гена
- 10 ацетолактатсинтази (ALS).
2. Рослина буряку звичайного та її органи за п. 1, причому ALS ген кодує поліпептид ALS, який містить лейцин замість триптофану, у позиції 569 послідовності поліпептид ALS, як викладено у SEQ ID NO: 2.
3. Рослина буряку звичайного та її органи за п. 1, в яких амінокислотою є лейцин, і в яких
- 15 ендогенний ALS ген є ідентичним нуклеотидній послідовності, визначеній у SEQ ID NO: 3.
4. Рослина буряку звичайного та її органи за п. 1, які є толерантними до одного або кількох інгібуючих ALS гербіцидів, які належать до групи, яка складається з сульфонілсечовинних гербіцидів, сульфоніламінокарбонілтриазолінонових гербіцидів, імідазолінонових гербіцидів, триазолпіримідинових гербіцидів та піримідиніл(тіо)бензоатних гербіцидів.
- 20 5. Рослина буряку звичайного та її органи за п. 1, причому рослина буряку звичайного є принаймні у 2000 разів менш чутливою до інгібітора ALS.
6. Рослина буряку звичайного та її органи за п. 1, в яких зазначена мутація є гомозиготно присутньою як єдина мутація ендогенного ALS гена.
7. Рослина буряку звичайного та її органи за п. 1, причому органи є насінням.
- 25 8. Спосіб одержання рослини буряку звичайного та її органів за п. 1, який включає такі етапи:  
(а) піддання калюсів *B. vulgaris* дії приблизно  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  М інгібуючого ALS гербіциду;  
(б) відбір колоній клітин, які можуть рости у присутності до  $3 \times 10^{-6}$  М інгібуючого ALS гербіциду;  
(с) регенерація пагонів у присутності інгібуючого ALS гербіциду;  
(д) відбір регенерованих паростків за допомогою інгібуючого ALS гербіциду, причому паростки
- 30 включають мутацію в положенні, відповідному положенню 1705-1707 ендогенного гена ацетолактатсинтази (ALS), показаного еталонною нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 1, причому зазначений ALS ген кодує поліпептид ALS, який містить лейцин замість триптофану, у позиції 569 поліпептиду ALS, і причому зазначені паростки є гомозиготними щодо зазначеної мутації ендогенного гена ацетолактатсинтази (ALS).
- 35 9. Спосіб за п. 8, в якому на етапах (а), (б) та/або (с) як інгібуючий ALS гербіцид використовують форамсульфурон.
10. Спосіб за п. 8 або 9, в якому на етапі (д) як інгібуючий ALS гербіцид використовують форамсульфурон, йодосульфурон-метил-натрій та/або їх суміш.
11. Спосіб за п. 10, в якому доза форамсульфурону є еквівалентною 7-70 г а. і./га, і доза
- 40 йодосульфурон-метил-натрію є еквівалентною 1-10 г а. і./га.

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601