

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393150** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.02.29

(22) Дата подачи заявки
2022.06.08

(51) Int. Cl. *A01H 6/66* (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(54) **РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **63/208,007**

(32) **2021.06.08**

(33) **US**

(86) **PCT/IL2022/050607**

(87) **WO 2022/259249 2022.12.15**

(71) Заявитель:

**ЙЮССУМ РИСЕРЧ
ДЕВЕЛОПМЕНТ КОМПАНИ ОФ
ЗЕ ХИБРУ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ДЖЕРУЗАЛЕМ ЛТД. (IL)**

(72) Изобретатель:

**Пелег Цви, Гадри Ярон, Авнери Асаф
(IL)**

(57) Настоящее изобретение относится к растениям кунжута, устойчивым к гербицидам, которые ингибируют активность растительного фермента ацетолактатсинтазы (ALS), а также к композициям и способам их получения.

A1

202393150

202393150

A1

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к устойчивым к гербицидам растениям кунжута, в частности к растениям кунжута, устойчивым к гербицидам, которые ингибируют активность растительного фермента ацетолактатсинтазы (ALS), а также к композициям и способам их получения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Кунжут (*Sesamum indicum* L.; геном $2n=2x=26$), принадлежащий к роду *Sesamum* семейства *Padaliaceae*, является важной масличной культурой во всем мире. Его семена используются для самых разных целей, таких как производство масла и тахини, приготовление пищи и выпечка, а также в качестве источника ингредиентов, используемых в фармацевтических продуктах. Семена кунжута известны как одни из лучших масличных семян, поскольку они содержат значительное количество высококачественного масла, белков, углеводов и множество необходимых минеральных питательных веществ (Teboul et al., 2021. Genes, 11:1221). В последние годы спрос на семена кунжута (и вторичные продукты) растет в рамках глобальной тенденции к употреблению более здоровых источников пищи растительного происхождения.

Однако нынешнее производство семян кунжута в основном ограничено развивающимися странами, где используются традиционные методы выращивания, которые являются трудоемкими и нерентабельными. Несмотря на свой экономический и сельскохозяйственный потенциал, кунжут является «орфанной сельскохозяйственной культурой», исследования которой в современной генетике и селекции проводятся ограниченно. Таким образом, необходимо преодолеть разрыв в знаниях, возникающий из-за нынешнего ограниченного производства и потребностей рынка, с целью разработки новых сортов, адаптированных для современных крупномасштабных сельскохозяйственных методов.

Заражение сорняками является основным биотическим фактором, вызывающим снижение развития растений кунжута и урожайности. Вследствие своего медленного развития на начальной стадии роста (Gadri et al., 2020. Plant Science, 295:110105; Langham et al., 2007. Review of herbicide research on sesame (*Sesamum indicum* L.) ASGA, Gainesville, FL, USA),

кунжут плохо конкурирует с сорняками. Более того, длительный «критический период» (*т. е.* период в цикле роста сельскохозяйственных культур, в течение которого необходимо контролировать сорняки, чтобы предотвратить значительные потери урожая) еще больше подчеркивает важность эффективной практики борьбы с сорняками. Было обнаружено, что «критический период» для кунжута длится до 10 недель, в зависимости от градусо-дней роста и уровня заражения сорняками (см. *например*, Aref et al., 2013. Assiut Journal of Agricultural Sciences, 44:32-45; Karnas et al., 2019. Weed Biology and Management, 19:121-128; Vilan 2017. M.Sc. Работа, представленная в Еврейский университет Иерусалима, Израиль). Таким образом, если в течение этого времени не контролировать сорняки, это может привести к серьезному снижению урожайности примерно с 60% в Западной Бенгалии и до 78% в Турции (см. Duary and Hazga, 2013. Indian Journal of Weed Science, 45:253-256 и Karnas et al., 2019, *ibid*, соответственно) и вплоть до полной потери урожая (обзор Singh et al., 1992. Agricultural Reviews, 13:163-175).

С момента своего появления в 1940 году, химические вещества (*т. е.* гербициды) стали наиболее экономичным и эффективным методом борьбы с сорняками. Для большинства основных сельскохозяйственных культур гербициды позволяют избирательно бороться с сорняками. Однако большинство используемых химических гербицидов наносят определенный вред растениям кунжута. Хотя большинство способов действия (МОА) известных гербицидов (132 гербицида и 58 комбинаций гербицидов) были протестированы почти в 40 странах, все они привели к снижению урожайности кунжута (обзор Langham et al., 2018). Sesame Weed Control Part 1. Sesame Research LLC, doi:10.13140/RG.2.2.21216.94722). Было обнаружено, что некоторые гербициды, являющиеся ингибиторами ацетил-КоА-карбоксилазы (АССазы), безопасны; однако эта группа эффективна только для послевсходовой борьбы с травяными сорняками.

Среди различных МОА гербицидов, общей мишенью активности является ацетолактатсинтаза (ALS), также известная как синтаза ацетогидроксикислот (АНАС). ALS является ключевым ферментом, катализирующим начальный этап биосинтеза аминокислот с разветвленной цепью, включая валин, лейцин и изолейцин (Umberger, 1978. Annual Reviews in Biochemistry, 47:533-606). Ингибирование этого фермента в первую очередь приводит к голоданию растений, однако показано, что к гибели растений приводят и вторичные эффекты, такие как накопление 2-кетобутирата и нарушение транспорта фотосинтата (The Imidazoline Herbicides, 1991. Eds: Shaner and O'Connor, CRC Press). Гербициды, ингибирующие ALS, контролируют многие виды сорняков, обладают низкой токсичностью для млекопитающих и селективны в отношении многих культур (Yu et al., 2010. Journal of Experimental Botany, 61:3925-3934). Гербициды, ингибирующие ALS, подразделяются в соответствии с их

молекулярной структурой на пять химических классов: Имидазолиноны (IMI), сульфонилмочевины (SU), пиримидинилтиобензоаты (PTB), триазолопиримидины (TP) и сульфониламинокарбонилтриазолиноны (SCT). Имидазолиноны и сульфонилмочевины являются наиболее широко используемыми классами и включают в себя наибольшее количество серийно выпускаемых гербицидов (Saari et al., 1993). В: Resistance to Herbicides in Plants, Eds. S.B. Powles & J.A.M. Holtum. Lewis Publ. CRC Press, Boca Raton, FL). Устойчивость к точечным мутациям в разных участках гена *ALS* была обнаружена естественным путем у различных видов сорняков (weedsience.org) и индуцирована у сельскохозяйственных растений (см. *например*, Tan et al., 2005. Pest Management Science, 61:246-257; публикация международной заявки (PCT) № WO 2007/149069). Дополнительные источники мутаций, приводящих к устойчивости ALS к гербицидам, описаны, например, в патенте США № 5605011; публикация патентной заявки США № 2003/0097692 и международной заявки (PCT) WO 2012/049268).

Генетическая характеристика мутации устойчивости была классифицирована как полудоминантное наследование, при этом гетерозиготный аллель демонстрирует промежуточную устойчивость (Ghanizadeh et al., 2019. Critical Reviews in Plant Sciences, 38:295-312).

Широкий выбор гербицидов, ингибирующих ALS, позволяет фермерам контролировать широкий спектр видов сорняков независимо от стадии их роста. Однако эти высокоэффективные гербициды нельзя использовать для выращивания кунжута, поскольку обычные растения/коммерческие сорта кунжута очень восприимчивы к этим гербицидам, ингибирующим ALS.

Таким образом, существует острая необходимость в выведении новых сортов кунжута с повышенной резистентностью к гербицидам для обеспечения высокого уровня производства и устойчивости.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение отвечает вышеописанным потребностям и позволяет получить растения кунжута, устойчивые к гербицидам, ингибирующим активность ацетолактатсинтазы (ALS). В частности, в настоящем изобретении предлагаются растения кунжута и их части, содержащие мутантный ген *ALS* с одной мутацией, при этом указанные растения имеют пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с диким типом *S. indicum*. Растения кунжута,

содержащие мутантный ген *ALS*, являются толерантными и/или устойчивыми к гербицидам, ингибирующим ALS, применяемым в довсходовый или послевсходовый период, что позволяет бороться с сорняками на протяжении всего периода роста кунжута и является значительным преимуществом при выращивании в сельском хозяйстве. Неожиданно оказалось, что устойчивые растения кунжута после послевсходовой обработки гербицидом, ингибирующим ALS, показали значительно более высокую урожайность по сравнению с урожайностью, полученной при выращивании растений в условиях отсутствия сорняков (при механической или ручной прополке). Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, устойчивость можно объяснить изменением конформации белка в сайте связывания гербицида вследствие единственной мутации – замены аланина на валин, что приводит к снижению сродства гербицида к ферменту ALS.

В соответствии с определенными аспектами, в настоящем изобретении предлагается растение кунжута (*Sesamum indicum* L.) или его часть, содержащая по меньшей мере одну клетку, содержащую мутантный ген, кодирующий ацетолактатсинтазу (*mALS*), при этом *mALS* кодирует мутантный белок ацетолактатсинтазы (mALS), имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с белком ALS *S. indicum* (SiALS) дикого типа, и при этом указанное растение устойчиво к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения белок SiALS дикого типа содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, при этом аминокислотная последовательность содержит аланин в положении 188.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения белок SiALS дикого типа содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% или более идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, при этом аминокислотная последовательность содержит аланин в положении 188.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения белок SiALS дикого типа содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения белок mALS содержит аминокислоту, отличную от аланина, в положении 188

белка, имеющего по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения аланин заменен валином (Ala188Val). В соответствии с этими вариантами осуществления настоящего изобретения белок mALS содержит аминокислоту валин в положении 188 аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения белок mALS содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения ген *SiALS* дикого типа содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2, при этом указанная последовательность содержит последовательность, кодирующую аланин, в положениях 562-564. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения ген *SiALS* дикого типа содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 95% или более идентична последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2, при этом указанная последовательность содержит последовательность, кодирующую аланин, в положениях 562-564.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения ген *SiALS* дикого типа содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения последовательность, кодирующая аланин, содержит нуклеиновые кислоты 562-564 последовательности SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения полинуклеотид *mALS* содержит замещенный кодон, кодирующий аминокислоту, отличную от аланина, в положениях 562-564 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения замещенный кодон кодирует аминокислоту валин. В соответствии с этими вариантами осуществления настоящего изобретения полинуклеотид *mALS* содержит нуклеотид тимин (Т) в положении 563 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения полинуклеотид *mALS* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:4.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения мутантный полинуклеотид, кодирующий мутантную ацетолактатсинтазу, представляет собой мутант эндогенного ALS-кодирующего гена растения кунжута (*mSiALS*).

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения мутантный полинуклеотид, кодирующий мутантную ацетолактатсинтазу, представляет собой экзогенный полинуклеотид. Экзогенный полинуклеотид может представлять собой мутированный эндогенный ген *ALS* или гетерологичный ген *ALS*, кодирующий мутированный белок ALS (*mALS*).

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растение или его часть гомозиготны полинуклеотиду *mALS*.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растение или его часть гетерозиготны полинуклеотиду *mALS*.

Следует четко понимать, что хотя растения кунжута, гомозиготные по мутантному гену, кодирующему мутантный белок ALS, имеющие пониженное сродство к гербицидам, ингибирующим ALS, проявляют более высокую толерантность, обычно устойчивы к гербицидам, ингибирующим ALS, по сравнению с гетерозиготными растениями, гетерозиготные растения демонстрируют значительно повышенную толерантность/устойчивость по сравнению с растениями, содержащими ген *SiALS* дикого типа.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растения кунжута по настоящему изобретению устойчивы к гербицидам, ингибирующим ALS, независимо от времени применения гербицида к растению, его части

или к указанной среде обитания растения. Сроки применения гербицидов включают довсходовый период кунжута (после посева до появления всходов); послевсходовый период на стадии первой пары двух истинных листьев; и в любое время после этого до созревания растения.

Следует четко понимать, что растения, устойчивые к гербицидам, ингибирующим ALS, в соответствии с настоящим изобретением являются фертильными.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения ген *mALS* и/или белок mALS по существу не оказывают вредного воздействия на скорость и структуру роста растения кунжута при выращивании в стандартных условиях роста кунжута.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения растение, устойчивое к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, дает более высокий урожай семян после послевсходовой обработки гербицидом, ингибирующим ALS, по сравнению с урожайностью, полученной при выращивании растения в условиях отсутствия сорняков в результате применения альтернативных методов борьбы с сорняками (т. е. ручной прополкой).

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения гербицид, ингибирующий ALS, относится к типу, выбранному из группы, состоящей из гербицидно эффективных имидазолинонов (IMI), сульфонилмочевин (SU), пиримидинилтиобензоатов (PTB), триазолопиримидинов (TP) и сульфоаминокарбонилтриазолинона (SCT).

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения имидазолиноновый гербицид выбирают из группы, состоящей из 5-(метоксиметил)-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)пиридин-3-карбоновой кислоты (Имазамокс (Imazamox)); 5-метил-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)пиридин-3-карбоновой кислоты (Имазапик (Imazapic)); 5-этил-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)пиридин-3-карбоновой кислоты (Имазетапир (Imazethapyr)); 2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)пиридин-3-карбоновой кислоты (Имазапир (Imazapyr)); 4-метил-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)бензойной кислоты (Имазаметабенз); метил-4-метил-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)бензоата (Имазаметабенз метил (Imazamethabenz methyl)); 2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)хинолин-3-карбоновой кислоты (Имазахин (Imazaquin)) и 1-(2-хлоримидазо[1,2-а] пиридин-3-ил)сульфонил-3-

(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)мочевины (Имазосульфурон (Imazosulfuron). Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения сульфонилмочевинный гербицид выбирают из группы, состоящей из 2-[(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)карбамоилсульфамоил]-4-формамидо-N,N-диметилбензамида (форамсульфурана) и 1-(4, 6-диметоксипиримидин-2-ил)-3-[3-(2,2,2-трифторэтокси)пиримидин-2-ил]сульфонилмочевины (трифлорсульфуран). Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения пиримидинилтиобензоатный гербицид выбирают из группы, состоящей из N-(2,6-дифторфенил)-8-фтор-5-метокси-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-2-сульфонамида (Флорасулам) и натрий;2-хлор-6-(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)сульфанилбензоата (Пиритиобак натрия). Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения сульфониламинокарбонилтриазолинон представляет собой метил 2-[(4-метил-5-оксо-3-пропокси-1,2,4-триазол-1-карбонил)сульфамоил]бензоат (Пропоксикарбазон).

Следует четко понимать, что растения по настоящему изобретению могут быть устойчивы к одному или множеству типов гербицидов, ингибирующих ALS. В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения растения по настоящему изобретению устойчивы к множеству типов гербицидов, включая довсходовые гербициды, ингибирующие ALS, и послевсходовые гербициды, ингибирующие ALS.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения часть растения выбирают из группы, состоящей из семян, пыльцы, семяночек, листьев, зародышей, корней, кончиков корней, пыльников, цветков, плодов, стеблей и побегов. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Клетки и культуры тканей, полученные из растения или его части, также входят в сферу применения настоящего изобретения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растение кунжута по настоящему изобретению, характеризующееся устойчивостью к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, дополнительно характеризуется наличием нераскрывающихся капсул.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растение кунжута по настоящему изобретению является нетрансгенным растением.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения нетрансгенное растение получают путем создания мутации в указанном гене, кодирующем ацетолактатсинтазу растения, посредством сайт-направленного мутагеза. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения сайт-направленный мутагез осуществляют методом редактирования генов с помощью по меньшей мере одной искусственно сконструированной нуклеазы. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения эндонуклеазу выбирают из группы, состоящей из каспазы 9 (Cas9), Cpf1, нуклеаз «цинковые пальцы» (ZFN) и эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (TALEN). В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения мутацию встраивают с помощью системы CRISPR/Cas, гомологичной системы CRISPR/Cas или модифицированной системы CRISPR/Cas.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения растение кунжута по настоящему изобретению представляет собой трансгенное растение, содержащее по меньшей мере одну клетку, содержащую по меньшей мере один экзогенный полинуклеотид, кодирующий белок mALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с *SiALS* дикого типа.

Белок mALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, и кодирующие его полинуклеотиды описаны выше.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления, в настоящем изобретении предлагается семя растения кунжута по настоящему изобретению, при этом растение кунжута, выращенное из семени, содержит по меньшей мере одну клетку, содержащую мутантный ген, кодирующий ацетолактатсинтазу (*mALS*), при этом *mALS* кодирует мутантный белок ацетолактатсинтазы (mALS), имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по

сравнению с белком ALS *S. indicum* (SiALS) дикого типа, и при этом указанное растение устойчиво к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

В соответствии с дополнительными определенными аспектами, в настоящем изобретении предлагается способ получения растения кунжута, обладающего толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, при этом указанный способ включает введение по меньшей мере одной мутации в по меньшей мере один аллель эндогенного гена, кодирующего эндогенный белок ALS растения, при этом по меньшей мере одна мутация приводит к тому, что кодируемый белок ALS имеет пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с белком ALS, кодируемым немутантным геном.

Белки дикого типа и мутантные белки и полинуклеотиды, кодирующие их, а также гербицид, ингибирующий ALS, описаны выше.

В соответствии с дополнительными аспектами, в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, кодирующий белок ALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с белком ALS *S. indicum* дикого типа.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения кодируемый белок ALS содержит аминокислоту, отличную от аланина, в положении 188 белка, имеющего по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения кодируемый белок ALS содержит аминокислоту, отличную от аланина, в положении 188 белка, имеющего по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения кодируемый белок содержит аминокислоту валин в положении 188.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения кодируемый белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит замещенный кодон, кодирующий

аминокислоту, отличную от аланина, в положениях 562-564 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит замещенный кодон, кодирующий аминокислоту, отличную от аланина, в положениях 562-564 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит кодон, кодирующий валин, в положениях 562-564. В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит нуклеотид тимин (Т) в положении 563 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

В соответствии с дополнительными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит нуклеотид тимин (Т) в положении 563 SEQ ID NO:2 с формированием SEQ ID NO:4.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержится в конструкции ДНК, дополнительно содержащей по меньшей мере один регуляторный элемент. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения регуляторный элемент выбирают из группы, состоящей из промотора, энхансера, последовательности терминации и любой их комбинации. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид или содержащая его конструкция ДНК содержится в векторе экспрессии, совместимом с растительными клетками.

Клетка-хозяин растения кунжута, содержащая выделенные полинуклеотиды по настоящему изобретению, содержащая их конструкция ДНК и/или вектор экспрессии, также входят в объем настоящего изобретения, а также растение кунжута, содержащее клетку-хозяина.

В соответствии с другими дополнительными аспектами, в настоящем изобретении

предлагается способ идентификации растения кунжута, обладающего повышенной толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному типу гербицида, ингибирующего ALS, при этом указанный способ включает обнаружение в генетическом материале, полученном из растения, присутствия маркера нуклеиновой кислоты, амплифицированного парой праймеров, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:5 (CAGGTTCCCCGTCGTATG) и SEQ ID NO:6 (TCCCTTGACAACCCGAGGA). В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения амплифицированный маркер содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:7 (ATCGGCACTGATGTTTTTCCAAGAAACCCSTATTTGTTGAGGTAAGTGGTTCGATTACCAAGCATAATTATCTTGTTTTAGATGTTGAGGATAT).

В соответствии с определенными аспектами, в настоящем изобретении предлагается способ получения растения кунжута, обладающего толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, при этом указанный способ включает введение в по меньшей мере одну клетку растения кунжута, восприимчивого к гербициду, ингибирующему ALS, по меньшей мере, одного полинуклеотида, кодирующего белок ALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения белок ALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, содержит валин в положении 188 по сравнению с аланином в белке SiALS дикого типа.

Белок ALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, и выделенный полинуклеотид, кодирующий его, описаны выше.

В соответствии с другими дополнительными определенными аспектами, в настоящем изобретении предлагается способ борьбы с сорняками вблизи по меньшей мере одного растения кунжута, устойчивого к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, в соответствии с идеями настоящего изобретения, при этом указанный способ включает применение по меньшей мере одного гербицида, ингибирующего ALS, к сорнякам и растению в количестве, достаточном для ингибирования роста сорняков.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения количество гербицида, ингибирующего ALS, существенно не ингибирует

рост растения кунжута, устойчивого к гербициду.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения количество гербицида, ингибирующего ALS, ингибирует рост соответствующего растения кунжута, восприимчивого к такому гербициду.

В соответствии с определенным вариантом осуществления настоящего изобретения количество гербицида, ингибирующего ALS, приводит к увеличению урожая семян растения кунжута, устойчивого к гербициду, по сравнению с урожайностью соответствующего растения кунжута, устойчивого к гербициду, выращенного в среде, свободной от сорняков, полученной с помощью альтернативного способа борьбы с сорняками, при котором гербицид применяется после всходов.

Следует понимать, что любая комбинация каждого из аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, явно включена в описание настоящего изобретения.

Дополнительные варианты осуществления и полная сфера применимости настоящего изобретения станут очевидными из подробного описания, приведенного ниже. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из этого подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A-1D демонстрируют идентификацию и валидацию точечной мутации в гене *SiALS*.

Фиг. 1A: Геномная последовательность сегмента гена *SiALS*. Отмечены точечная мутация и аминокислотная замена. **Фиг. 1B:** Маркер расплава высокого разрешения (HRM) для разделения растений дикого типа (S-416), мутантных (SiRM) и гибридных (F₁) растений (H). Выбор для каждого генотипа (дикий тип – правая линия, мутант – левая линия и гибрид – средняя линия) измеряется в относительных единицах флуоресценции (RFU). **Фиг. 1C:** Репрезентативная фотография линий дикого типа (вверху) и SiRM (внизу) при применении возрастающей дозы Имазамокса: необработанный контроль (0), 3 (1/8X), 6 (1/4X), 12 (1/2X), 24 (X), 48 (2X), 96 (4X), 96 (8X) и 384 (16X) г АИ га⁻¹. Рекомендуемая доза (X=24 г АИ га⁻¹) подчеркнута. **Фиг. 1D:** Сухая масса побегов рассчитана относительно

необработанного контроля. Линейные кривые представляют среднее значение генотипа ($n=5$). Затененные области обозначают стандартную ошибку. Индекс устойчивости (RI) представляет собой соотношение ED_{50} между WT и SiRM.

Фиг. 2A-2F демонстрируют генетическую и физиологическую характеристику гибридных (F_1) растений в ответ на применение Имазамокса (48 г АИ га^{-1}). Фиг. 2A-D: Визуальная характеристика растений через 3, 4, 7 и 11 дней после обработки (DAT). Фиг. 2E: Продольная часовая динамика фотосинтетической ассимиляции (A) растений WT, F_1 и SiRM в ответ на применение Имазамокса. Фиг. 2F: Продольная динамика покрытия пологом (зеленые пиксели) на протяжении всего эксперимента. Сплошные кривые представляют среднее значение генотипа ($n=4$). Затененные области обозначают стандартную ошибку.

Фиг. 3A-3D демонстрируют генетическую и физиологическую характеристику гибридных (F_1) растений в ответ на применение Имазамокса (48 г АИ га^{-1}). Фиг. 3A: Репрезентативная фотография растений дикого типа (WT, S-416), гибридных (F_1) и мутантных (SiRM) растений по сравнению с необработанным контролем (UTC) и применением Имазамокса (ИМА, 48 г АИ га^{-1}) (ИМА) на момент окончания эксперимента (через 21 день после применения). Фиг. 3B-3D: Длина узлов (B), длина до первого цветка (C) и сухая масса побегов (D) растений WT, F_1 , и SiRM в условиях UTC и в ответ на применение Имазамокса. Данные были получены через 21 день после применения.

Фиг. 4A-4D продемонстрируют ответ растений дикого типа и SiRM на Имазапик и Имзетапир. Фиг. 4A: Репрезентативная фотография растений дикого типа (S-416, вверху) и SiRM (внизу) и Фиг. 4B: Зависимость «доза-ответ» при применении увеличивающейся дозировки Имазапика. Необработанный контроль (0), 6 ($1/8X$), 12 ($1/4X$), 24 ($1/2X$), 48 (X), 96 (2X), 192 (4X), 384 (8X) и 768 (16X) г АИ га^{-1} . Рекомендуемая доза ($X=48 \text{ г АИ га}^{-1}$) подчеркнута. Линейные кривые (пунктирные: SiRM; сплошные – WT) представляют среднее значение генотипа ($n=5$). Затененные области обозначают стандартную ошибку. Фиг. 4C: Репрезентативная фотография растений дикого типа (S-416, вверху) и SiRM (внизу) и Фиг. 4D: Зависимость «доза-ответ» на применение увеличивающейся дозировки Имзетапира. Необработанный контроль (0), 1,25 ($1/8X$), 2,5 ($1/4X$), 5 ($1/2X$), 10 (X), 20 (2X), 40 (4X), 80 (8X) и 160 (16X) г АИ га^{-1} . Рекомендуемая доза ($X=10 \text{ г АИ га}^{-1}$) подчеркнута. Линейные кривые (пунктирные: SiRM; сплошные – WT) представляют среднее значение генотипа ($n=5$). Затененные области обозначают стандартную ошибку.

Фиг. 5A-5E демонстрируют ответ на Имазамокс в условиях поля. Фиг. 5A:

Аэрофотоснимки участков в условиях поля (слева, необработанный контроль *A. palmeri*) и при применении Имазамокса (справа, 40 г АИ га⁻¹). Фиг. 5B: Фото дикого типа (S-416, WT) и мутанта (SiRM) через 84 дня после применения Имазамокса (40 г АИ га⁻¹). Фиг. 5C: Количественная оценка сорняков на участке. Фиг. 5D: Урожайность семян в конце эксперимента. Фиг. 5E: Наблюдение по аэрофотоснимкам за растениями WT (S-416; слева) и SiRM (справа) в поле, выращенными в контрольных условиях (вверху) и при применении Имазапика (48 г АИ га⁻¹).

Фиг. 6A-6C демонстрируют эффект довсходового применения Имазапика на растения SiRM. Фиг. 6A: Зависимость «доза-ответ» при довсходовом применении Имазапика на линии SiRM в глинистой почве. Фиг. 6B: Эффект от применения Имазапика (144 г АИ га⁻¹) в довсходовый период на развитие растений дикого типа (S-416) и мутантов (SiRM) и покрытие побегов пологом. Фиг. 6C: Объем корней растений SiRM в ответ на увеличение дозы Имазапика.

Фиг. 7A-7E демонстрируют ответ SiRM на гербициды, ингибирующие ALS. Фиг. 7A-7E: репрезентативное фото растений дикого типа (S-416, вверху) и SiRM (внизу) и зависимость «доза-ответ» при применении увеличивающейся дозировки следующих препаратов: (A) Трифлорисульфурон (Trifloxysulfuron) ($X = 12$ г АИ га⁻¹), (B) Форамсульфурон (Foramsulfuron) ($X = 450$ г АИ га⁻¹), (C) Пропоксикарбазон (Proprhexycarbazon) ($X = 48$ г АИ га⁻¹), (D) Флорасулам (Florasulam) ($X = 4$ г АИ га⁻¹), и (E) пиритиобак натрия (Pyriithiobac sodium) ($X = 68$ г АИ га⁻¹). Рекомендуемая доза подчеркнута. Сухая масса побегов рассчитана относительно необработанного контроля (UTC). Линейные кривые (пунктирная линия – SiRM; сплошная линия – WT) представляют среднее значение генотипа ($n=5$). Затененные области обозначают стандартную ошибку.

Фиг. 8A-8D демонстрируют теоретическую конфигурацию белка ALS дикого типа (WT; Фиг. 8A-8B) и мутированного (SiRM; Фиг. 8C-8D) белка ALS.

Фиг. 9A-9G демонстрируют эффект довсходового применения Имазапика на борьбу с сорняками в условиях поля. Фиг. 9A: Аэрофотоснимки поля через 25 дней после посева. Фиг. 9B: Увеличение масштаба репрезентативных участков в поле. Фиг. 9C: Общая сухая масса сорняков, зарегистрированная в конце эксперимента. Фиг. 9D: Время цветения, Фиг. 9E: Высота до первой капсулы, Фиг. 9F: Количество ветвей на растение, и Фиг. 9G: Урожайность семян. Ящичковые диаграммы представляют среднее значение ($n=6$), а статистический анализ проводили с помощью критерия Даннетта, сравнивающего

обработки с контролем без сорняков.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Засоренность сорняками является основным агрономическим фактором, препятствующим посеву кунжута в интенсивных агросистемах. Таким образом, крайне необходима разработка новых методов борьбы с сорняками. Настоящее изобретение является первым, в котором описаны линии кунжута с высокой толерантностью и/или устойчивостью к гербицидам, ингибирующим ALS. Устойчивость была получена путем индукции мутаций и отбора растений, устойчивых к гербицидам. Полученное устойчивое растение несет единственную мутацию в кодоне 188 Аланин (по отношению к эталонной аминокислотной последовательности ALS кунжута, указанной в SEQ ID NO:1), что приводит к изменению конфигурации белка ALS в месте связывания гербицида в сторону снижения сродства гербицида к ферменту. Растения кунжута по настоящему изобретению, несущие мутантный ALS, были толерантны к широколиственным гербицидам, ингибирующим ALS, применяемым до и после всходов. Таким образом, настоящее изобретение вносит значительный вклад во внедрение комплексной борьбы с сорняками в кунжуте для удовлетворения растущего глобального спроса на семена кунжута.

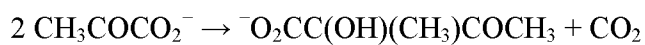
Определения

В контексте данного документа термины «растение» и «растение кунжута» используются взаимозаменяемо в самом широком смысле. Эти термины также относятся к множеству растительных клеток, которые в значительной степени дифференцированы в структуру, присутствующую на любой стадии развития растения. Такие структуры включают, помимо прочего, корень, стебель, побег, лист, цветок, лепесток и плод. В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения растения кунжута по настоящему изобретению представляют собой выносливые сорта, выращиваемые для коммерческого производства семян кунжута. В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения растения кунжута по настоящему изобретению являются нераскрывающимися, т.е. характеризуются капсулами (плодами), которые визуальнo закрыты при полном созревании (зрелости).

В контексте данного документа термин «часть растения» обычно относится к части растения кунжута. Примеры частей растений включают, помимо прочего, пыльцу,

семяпочки, листья, зародыши, корни, кончики корней, пыльники, цветы, плоды (капсулы), стебли, побеги и семена. Термин «часть растения» также охватывает отдельные клетки и клеточные ткани, такие как клетки растения, которые являются интактными в частях растения, скопления клеток и культуры тканей, из которых можно регенерировать растения кунжута.

В контексте данного документа термины «ацетолактатсинтаза», «ALS», «белок ALS» и «фермент ALS» используются взаимозаменяемо и относятся к ферменту (также известному как синтаза ацетогидроксикислоты [AHAS]), участвующему в превращении пирувата в ацетолактат:



В реакции используется пиродифосфат тиамин, чтобы связать две молекулы пирувата. Образующийся продукт этой реакции, ацетолактат, в конечном итоге превращается в валин, лейцин и изолейцин. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения, в отношении *SiALS* дикого типа, этот термин относится к *SiALS* кунжута, имеющему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, или к ферменту, имеющему по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1, содержащей аланин в положении 188.

Следует четко понимать, что ген *SiALS* кунжута дикого типа или кодируемый белок могут содержать или не содержать мутации, отличные от мутации, которая вызывает замену Ala188. В контексте данного документа термин «идентичность последовательности» или «идентичность» в контексте двух последовательностей полипептида или нуклеиновой кислоты включает ссылку на остатки в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании. Когда термин «процент идентичности последовательностей» используется по отношению к белкам, следует понимать, что положения остатков, которые не являются идентичными, часто отличаются консервативными аминокислотными заменами, когда аминокислотные остатки заменяются другими аминокислотными остатками со схожими химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность) и поэтому не меняют функциональные свойства молекулы. Если последовательности отличаются консервативными заменами, то процент идентичности последовательностей может быть скорректирован в сторону увеличения с учетом консервативного характера замен. Последовательности, которые отличаются такими консервативными заменами, считаются имеющими «сходство последовательностей» или «сходство». Средства для выполнения этой коррекции хорошо

известны специалистам в данной области техники. Обычно это предполагает оценку консервативной замены как частичного, а не полного несоответствия, тем самым увеличивая процент идентичности последовательности. Так, например, если идентичной аминокислоте присваивается балл 1, а неконсервативной замене присваивается балл нуль, консервативной замене присваивается балл от нуля до 1. Оценка консервативных замен рассчитывается, например, по алгоритму Henikoff S и Henikoff JG. (Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89(22), 10915-9, 1992).

Идентичность (например, процент гомологии) можно определить с помощью любого программного обеспечения для сравнения гомологии, включая, например, программное обеспечение BlastN, BlastX или Blastp Национального центра биотехнологической информации (NCBI), например, с использованием параметров по умолчанию.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения идентичность представляет собой глобальную идентичность, т.е. идентичность всей последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, а не ее частей.

Термин «ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), которая содержит кодирующие последовательности, необходимые для продуцирования РНК или полипептида. Полипептид может кодироваться полноразмерной кодирующей последовательностью или любой ее частью. Термин «его части» при использовании по отношению к гену относится к фрагментам этого гена. Размер фрагментов может варьироваться от нескольких нуклеотидов до всей последовательности гена минус один нуклеотид. Таким образом, «последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая по меньшей мере часть гена» может включать фрагменты гена или весь ген.

Термин «ген» также охватывает кодирующие области структурного гена и включает последовательности, расположенные рядом с кодирующей областью как на 5'-, так и на 3'-концах на расстоянии около 1 kb на каждом конце, так что ген соответствует длине полноразмерной мРНК. Последовательности, которые расположены на 5'-конце кодирующей области и присутствуют на мРНК, называются 5'-нетранслируемыми последовательностями. Последовательности, которые расположены на 3'-конце или ниже кодирующей области и присутствуют на мРНК, называются 3'-нетранслируемыми последовательностями.

Термины «полинуклеотид», «полинуклеотидная последовательность», «последовательность нуклеиновой кислоты» и «выделенный полинуклеотид»

используются в контексте данного документа взаимозаменяемо. Эти термины охватывают нуклеотидные последовательности и т.п. Полинуклеотид может представлять собой полимер РНК или ДНК или их гибрид, который является одно- или двухцепочечным, линейным или разветвленным и который необязательно содержит синтетические, неприродные или измененные нуклеотидные основания. Эти термины также охватывают гибриды РНК/ДНК.

В контексте данного документа термин «пониженное средство» в отношении взаимодействия фермента ALS и гербицида относится к уменьшению на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96% по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более силы взаимодействия «фермент mALS - гербицид» по сравнению с соответствующим взаимодействием «ALS дикого типа - гербицид». Сниженное средство mALS к гербициду приводит к уменьшению или отсутствию ингибирования активности mALS гербицидом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения фермент mALS проявляет активность в присутствии ALS-ингибирующего гербицида, которая составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96% по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или идентична его активности в отсутствие гербицида. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения фермент mALS проявляет активность в присутствии ALS-ингибирующего гербицида, которая составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96% по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или идентична активности соответствующего фермента ALS дикого типа в отсутствие гербицида.

В контексте данного документа термины «толерантный», «толерантность», «устойчивый» или «устойчивость» растения в отношении обработки гербицидом(ами) относятся к растению, которое выживает при обработке гербицидом. У выжившего

толерантного/устойчивого растения могут отсутствовать или уменьшаться симптомы, вызванные действием гербицида. В определённых вариантах осуществления настоящего изобретения у растения, толерантного и/или устойчивого к гербициду, при воздействии гербицида наблюдается уменьшение симптомов по сравнению с растением, восприимчивым к данному гербициду. Например, растение, толерантное и/или устойчивое к гербициду, после применения гербицида может проявлять один или большее количество симптомов, ассоциированных с действием гербицида (включая, например, увядание листьев, пожелтение листьев или сосудов), обесцвечивание колосков и т. д. и при этом не проявлять снижения урожайности по сравнению с урожайностью соответствующего растения, на которое гербицид не применялся и которое выращивалось в тех же условиях.

Применение химического мутагенеза с использованием этилметансульфоната (EMS) оказалось эффективным подходом для получения генетического разнообразия у многих сельскохозяйственных культур, таких как томат [*Solanum lycopersicum* (Dor E et al., 2016. *Weed Science*, 64:348-360)], рапс [*Brassica napus* L. (Channaoui et al., 2019. *Oilseeds fats Crop Lipids*, 26, 35)], кунжут (Kouighat et al., 2020. *Journal of Crop Improvement*. doi.org/10.1080/15427528.2020.1861155) и многие другие. В ходе работы над настоящим изобретением была создана большая EMS-мутагенизированная популяция (~80 000 растений M1) в соответствии с небольшим размером генома кунжута (~370 мб) и содержанием G:C. В публикации *Arabidopsis*, Jander et al. (2003. *Plant Physiology*, 131:139-146) указано, что для обнаружения мутации в любой данной паре оснований G:C в геноме необходимо менее 50 000 линий M1, подвергшихся EMS-мутагенизации. Аналогичным образом, в сое, Sebastian et al. (1989. *Crop Science*, 29:1403-1408) обнаружил устойчивость к гербициду ALS, используя популяцию из 70 000 растений M1. В результате скрининга ответа на гербицид Имидазолинон (IMI) в условиях поля было выявлено одно мутантное растение (SiRM).

Генетический анализ выявил точечную мутацию в гене *SiALS*, которая приводит к изменению аминокислоты Ala188.

Растения SiRM проявляли сильную устойчивость к Имазамоксу как в контролируемых (до 192 г АИ га⁻¹), так и в полевых (48 г АИ га⁻¹) условиях (Фиг. 1 и 5). Аналогичным образом, высокая устойчивость была обнаружена для других широко используемых представителей класса имидазолинонов, имазапика и имазетапира (Фиг. 4 и 6).

Таким образом, в соответствии с определенными аспектами, в настоящем

изобретении предлагается растение кунжута (*Sesamum indicum* L.) или его часть, содержащая по меньшей мере одну клетку, содержащую мутантный ген, кодирующий ацетолактатсинтазу (*mALS*), при этом *mALS* кодирует мутантный белок ацетолактатсинтазы (*mALS*), имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с белком ALS *S. indicum* (*SiALS*) дикого типа, и при этом указанное растение устойчиво к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения белок *SiALS* дикого типа содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1, при этом аминокислотная последовательность содержит аланин в положении 188. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения белок *SiALS* дикого типа содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения белок *mALS* содержит аминокислоту, отличную от аланина, в положении 188 белка, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения аланин заменен валином (*Ala188Val*). В соответствии с этими вариантами осуществления настоящего изобретения белок *mALS* содержит аминокислоту валин в положении 188 аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более

идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения белок *mALS* содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения ген *SiALS* дикого типа содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2, при этом эта последовательность содержит последовательность, кодирующую аланин, в положениях 562-564. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения ген *SiALS* дикого типа содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения последовательность, кодирующая аланин, содержит нуклеиновые кислоты 562-564 последовательности SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения полинуклеотид *mALS* содержит замещенный кодон, кодирующий аминокислоту, отличную от аланина, в положениях 562-564 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения замещенный кодон кодирует аминокислоту валин. В соответствии с этими

вариантами осуществления настоящего изобретения полинуклеотид *mALS* содержит нуклеотид тимин (Т) в положении 563 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения полинуклеотид *mALS* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:4.

В сельском хозяйстве полагаться на борьбу с сорняками с помощью гербицида одного только класса не рекомендуется, поскольку это может привести к быстрому селекционному давлению и появлению устойчивых сорняков (Kumar et al., 2018, International Journal of Chemical Studies, 6:2844-2850). Поэтому для проверки того, может ли вновь выявленная мутация способствовать развитию устойчивости к другим четырем классам ингибиторов ALS, были проанализированы репрезентативные гербициды каждого класса. В целом, растения SiRM были более устойчивы к каждому из протестированных гербицидов (т.е. $RI > 2$) по сравнению с растениями WT. При применении репрезентативных гербицидов SU, TP и SCT растения SiRM проявляли толерантность в полевых дозах, тогда как растения WT были восприимчивы ко всем классам (Фиг. 7, Табл. 3). Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает гибкость в применении классов гербицидов, ингибирующих ALS, для борьбы с более широким спектром сорняков и снижения до некоторой степени риска развития устойчивых сорняков.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения гербицид, ингибирующий ALS, выбирают из группы, состоящей из гербицидно эффективных имидазолинонов (IMI), сульфонилмочевин (SU), пиримидинилтиобензоатов (PTB), триазолопиримидинов (TP) и сульфоаминокарбонилтриазолинона (SCT).

В контексте данного документа термин «имидазолинон» означает гербицидную композицию, содержащую одно или большее количество химических соединений класса имидазолинонов, включая, помимо прочего, 2-(2-имидазолин-2-ил)пиридины, 2-(2-имидазолин) -2-ил)хинолины и 2-(2-имидазолин-2-ил)бензоаты или их производные,

включая их оптические изомеры, диастереомеры и/или таутомеры, проявляющие гербицидную активность. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения имидазолиноновый гербицид выбирают из группы, состоящей из 5-(метоксиметил)-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)пиридин-3-карбоновой кислоты (Имазамокс (Imazamox)); 5-метил-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)пиридин-3-карбоновой кислоты (Имазапик (Imazapic)); 5-этил-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)пиридин-3-карбоновой кислоты (Имазетапир (Imazethapyr)); 2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)пиридин-3-карбоновой кислоты (Имазапир (Imazapyr)); 4-метил-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)бензойной кислоты (Имазаметабенз); метил-4-метил-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)бензоата (Имазаметабенз метил (Imazamethabenz methyl)); 2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-ил-1H-имидазол-2-ил)хинолин-3-карбоновой кислоты (Имазахин (Imazaquin)) и 1-(2-хлоримидазо[1,2-a] пиридин-3-ил)сульфонил-3-(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)мочевины (Имазосульфурон (Imazosulfuron)). Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В контексте данного документа термин «сульфонилмочевина» относится к гербицидной композиции, содержащей одно или большее количество химических соединений класса сульфонилмочевины, которые обычно содержат сульфонилмочевинный мостик $-SO_2NHCONH-$, связывающий два ароматических или гетероароматических кольца. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения сульфонилмочевинный гербицид выбирают из группы, состоящей из 2-[(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)карбамоилсульфамоил]-4-формамидо-N,N-диметилбензамида (форамсульфурана) и 1-(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)-3-[3-(2,2,2-трифторэтоксипиридин-2-ил)сульфонилмочевины (трифлорсульфурон). Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения пиримидинилтиобензоатный гербицид выбирают из группы, состоящей из N-(2,6-дифторфенил)-8-фтор-5-метокси-[1,2,4]триазоло[1,5-c]пиримидин-2-сульфонамида (Флорасулам) и натрий;2-хлор-6-(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)сульфанилбензоата (Пиритиобак натрия). Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения сульфониламинокарбонилтриазолинон представляет собой метил 2-[(4-метил-5-оксо-3-пропокси-1,2,4-триазол-1-карбонил)сульфамоил]бензоат (Пропоксикарбазон).

Было высказано предположение, что генетическое наследование известной устойчивости к ингибиторам ALS контролируется полным или частичным доминантным аллелем (Yu and Powles, 2014. *Pest Management Science*, 70:1340-1350), и различается в зависимости от вида и дозы применения (Ghanizadeh et al., 2019, *ibid*). Для оценки способа наследования у кунжута была охарактеризована гибридный ответ на Имазамокс (48 г АИ га⁻¹) и родительских линий (WT и SiRM). Наблюдался промежуточный ответ растений F₁ в течение первых 4 дней после применения и полное восстановление фотосинтеза впоследствии. Эти результаты указывают на аддитивный эффект, при котором каждая копия аллеля устойчивости способствует более высокому уровню устойчивости. Imaizumi et al. (2008. *Weed Research*, 48:187-196), на основании тестирования аллелей в F₂ популяции SU-устойчивых × восприимчивых растений *Monochoria vaginalis*, предположили, что при низкой дозе (т.е. 25 г АИ га⁻¹ бенсульфурон-метила) наблюдается доминантный ответ аллеля устойчивости, а при высокой дозе (т. е. 225 г АИ га⁻¹) аллель восприимчивости является доминантным. В совокупности эти результаты показывают, что количество копий мутантного фермента ALS, с одной стороны, и количество молекул гербицидов, с другой, играют ключевую роль в уровне устойчивости и могут меняться в зависимости от вида и условий окружающей среды.

Настоящее изобретение теперь демонстрирует, что в полевых условиях растения SiRM, обработанные после всходов гербицидом Имазамоксом, ингибирующим ALS, показали в два раза больший урожай по сравнению с соответствующим UTC без сорняков (Фиг. 5D). Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, это явление может быть следствием флоэмической подвижности ALS-гербицидов, прежде всего, по апикальным меристемам (Russell et al., 2002. *Pestic Outlook*, 13:166-173).

Таким образом, в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растение, устойчивое к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, дает более высокий урожай семян после обработки гербицидом, ингибирующим ALS, по сравнению с урожайностью, полученной, когда растение выращивают в условиях механической/ручной борьбы с сорняками, при этом указанный

гербицид, ингибирующий ALS, применяется после всходов.

В первые два дня после внесения Имазамокса у мутантных растений наблюдается небольшое пожелтение верхушки, что может привести к нарушению доминирования апикальной меристемы и изменению соотношения «источник-сток». Аналогичным образом было показано, что срезание верхушечной почки у кунжута может увеличить образование боковых ветвей и повысить урожайность семян (Vasanthan et al., 2019. International Journal of Chemical Studies, 7:4180-4183). Неожиданно после упомянутого выше восстановления гибридные растения продемонстрировали компактный и кустистый фенотип (т.е. более короткие узлы) (Фиг. 3), что еще раз подтверждает частичное нарушение доминирования апикальной меристемы. Уменьшение высоты до первого цветка (= капсулы) наблюдалось в полевых испытаниях при довсходовом применении гербицида Имазапик, ингибирующего ALS (Фиг. 9). С агрономической точки зрения такая модификация архитектуры растений может способствовать более раннему развитию ветвей на первых междоузлиях, снижая риск полегания, максимизируя потенциал урожайности и поддерживая механический сбор мутантных растений по настоящему изобретению. Таким образом, это явление дает фермерам двойной эффект: не только эффективный контроль над сорняками (Фиг. 7), но и повышение урожайности.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растение кунжута по настоящему изобретению, характеризующееся устойчивостью к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, дополнительно характеризуется наличием нераскрывающихся капсул.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растение кунжута по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну клетку, содержащую мутантный ген ацетолактатсинтазы (mALS), кодирующий мутантный белок ацетолактатсинтазы (mALS), имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с белком ALS *S. indicum* дикого типа (SiALS), обладающим толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, дополнительно характеризующемуся нераскрывающимися капсулами, имеет генетическую основу растения *Sesamum indicum* S-91, семена которого были депонированы в NCIMB Ltd., Международном депозитарном органе под номером доступа 43877.

Устойчивые к гербицидам растения по настоящему изобретению, ингибирующие ALS, можно получить любым способом, который известен или будет известен

специалисту в данной области техники.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения мутантный полинуклеотид, кодирующий мутантную ацетолактатсинтазу, представляет собой мутант эндогенного ALS-кодирующего гена растения кунжута (*mSiALS*).

В полинуклеотид, кодирующий ALS, может быть введена любая мутация (мутации), включая делеции, вставки, сайт-специфические мутации, включая нуклеотидные замены и т.п., при условии, что мутация(и) приводит к снижению сродства кодируемого белка к гербициду, ингибирующему ALS.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения мутацию эндогенного ALS-кодирующего гена растения кунжута осуществляют посредством сайт-направленного мутагенеза. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения сайт-направленный мутагенез осуществляют методом редактирования генов.

Редактирование генома представляет собой метод обратной генетики, использующий искусственно сконструированные нуклеазы для разрезания и создания специфических двухцепочечных разрывов в желаемом месте (местах) генома, которые затем восстанавливаются эндогенными клеточными процессами, такими как направляемая гомологией репарация (HDR) и негомологичное соединение концов (NHEJ). NHEJ напрямую соединяет концы ДНК в двухцепочечном разрыве, тогда как HDR использует гомологичную последовательность в качестве матрицы для регенерации недостающей последовательности ДНК в точке разрыва. Для внесения специфических нуклеотидных модификаций в геномную ДНК в процессе HDR должен присутствовать шаблон репарации ДНК, содержащий нужную последовательность. Редактирование генома невозможно осуществить с помощью традиционных эндонуклеаз рестрикции, поскольку большинство ферментов рестрикции распознают несколько пар оснований на ДНК в качестве мишени, и очень велика вероятность того, что распознанная комбинация пар оснований будет обнаружена во многих местах генома, что приведет к многочисленным разрезам, не ограниченным желаемым местом. Для преодоления этой проблемы и создания сайт-специфических одно- или двухцепочечных разрывов к настоящему времени открыто и биоинженерно разработано несколько различных классов нуклеаз. К ним относятся мегануклеазы, нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN) и система CRISPR/Cas.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения растения по настоящему изобретению получают путем вставки мутации в эндогенный ген *ALS* кунжута с помощью системы CRISPR/Cas, гомологичной CRISPR/Cas и модифицированной CRISPR/Cas системы.

Система CRISPR/Cas для редактирования генома содержит два отдельных компонента: gPHK (направляющая PHK) и эндонуклеазу, например, Cas9.

gPHK обычно представляет собой последовательность из 20 нуклеотидов, кодирующую комбинацию целевой гомологичной последовательности (crPHK) и эндогенной бактериальной PHK, которая связывает crPHK с нуклеазой Cas9 (tracrPHK) в одном химерном транскрипте. Комплекс gPHK/Cas9 рекрутируется в целевую последовательность путем спаривания оснований между последовательностью gPHK и комплементарной геномной ДНК. Для успешного связывания Cas9, геномная целевая последовательность также должна содержать правильную последовательность протоспейсерного примыкающего мотива (Protospacer Adjacent Motif, PAM), следующую сразу за целевой последовательностью. Связывание комплекса gPHK/Cas9 локализует Cas9 в геномной целевой последовательности таким образом, что Cas9 может разрезать обе цепи ДНК, вызывая двухцепочечный разрыв. По сравнению с другими нуклеазами, редактирующими геном, нуклеазами «цинковые пальцы» (ZFN) и эффекторными нуклеазами, подобными активатору транскрипции (TALEN), двухцепочечные разрывы, производимые CRISPR/Cas, могут подвергаться гомологичной рекомбинации или негомологическому соединению концов (NHEJ). Нуклеаза Cas9 имеет два функциональных домена: RuvC и HNH, каждый из которых разрезает отдельную цепь ДНК. Когда оба этих домена активны, Cas9 вызывает двухцепочечные разрывы в геномной ДНК.

Поскольку большинство методов редактирования генома могут оставить после себя минимальные следы изменений ДНК, очевидные в небольшом количестве нуклеотидов по сравнению с трансгенными растениями, культуры, созданные с помощью редактирования генома, могут избежать строгих процедур регулирования, обычно связанных с созданием генетически модифицированных (GM) культур.

В соответствии с дополнительными аспектами, в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, кодирующий белок ацетолактатсинтазы (ALS), имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с белком ALS *S. indicum* дикого типа.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения кодируемый белок ALS содержит аминокислоту, отличную от аланина, в положении 188 белка, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1. В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения кодируемый белок содержит аминокислоту валин в положении 188.

В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения кодируемый белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит замещенный кодон, кодирующий аминокислоту, отличную от аланина, в положениях 562-564 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

В соответствии с определенными типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит кодон, кодирующий валин, в положениях 562-564. В соответствии с определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит нуклеотид тимин (Т) в положении 563 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

В соответствии с дополнительными определенными существующими типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержит нуклеотид тимин (Т) в положении 563 SEQ ID NO:2 с формированием SEQ ID NO:4.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид содержится в конструкции ДНК, дополнительно содержащей по меньшей мере один регуляторный элемент. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения регуляторный элемент выбирают из группы, состоящей из промотора, энхансера, последовательности терминации и любой их комбинации. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения выделенный полинуклеотид или содержащая его конструкция ДНК содержится в векторе экспрессии, совместимом с растительными клетками.

В соответствии с определенными дополнительными вариантами осуществления настоящего изобретения растения кунжута по настоящему изобретению, являясь толерантными и/или устойчивыми к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, представляют собой трансгенные растения, содержащие по меньшей мере одну клетку, содержащую по меньшей мере один экзогенный полинуклеотид, кодирующий мутированный белок ALS, как описано выше.

Любой способ, который известен и будет известен в данной области техники для введения выделенного полинуклеотида в растение кунжута или его часть, может быть использован в соответствии с идеями настоящего изобретения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения введение выделенного полинуклеотида в по меньшей мере одну клетку растения кунжута, чувствительного к гербициду, ингибирующему ALS, осуществляют с помощью методов редактирования генов, как описано выше.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения введение выделенного полинуклеотида в по меньшей мере одну клетку растения кунжута, восприимчивого к гербициду, ингибирующему ALS, включает трансформацию по меньшей мере одной клетки указанным выделенным полинуклеотидом.

В контексте данного документа термин «трансформация» или «трансформирование» описывает процесс, посредством которого последовательность чужеродной нуклеиновой кислоты, такая как вектор, проникает в клетку-реципиент и превращает ее в трансформированную, генетически модифицированную или трансгенную клетку. Трансформация может быть стабильной, когда последовательность нуклеиновой кислоты интегрирована в геном растения и представляет собой стабильный и наследуемый

признак, или переходной, когда последовательность нуклеиновой кислоты экспрессируется трансформированной клеткой, но не интегрирована в геном, и представляет собой переходный признак. В соответствии с типовыми вариантами осуществления настоящего изобретения последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению стабильно трансформируются в растительную клетку.

Трансформация растений с помощью выделенной последовательности нуклеиновой кислоты обычно включает создание вектора экспрессии, который будет функционировать в растительных клетках. В соответствии с идеями настоящего изобретения, такой вектор содержит выделенный полинуклеотид, кодирующий нутрированный белок ALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS. Обычно вектор содержит полинуклеотид, находящийся под контролем регуляторного элемента или функционально связанный с ним. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения регуляторный элемент выбирают из группы, состоящей из промотора, энхансера, последовательности терминации трансляции и любых их комбинаций. Вектор (векторы) может быть в форме плазмиды и может быть использованы отдельно или в комбинации с другими плазмидами в способе получения трансгенных, толерантных и/или устойчивых к гербицидам, ингибирующим ALS, растений кунжута.

Перенос генов, опосредованный *Agrobacterium*: Система, опосредованная *Agrobacterium*, включает использование плазмидных векторов, которые содержат определенные сегменты ДНК, которые интегрируются в геномную ДНК растения. Способы инокуляции растительной ткани различаются в зависимости от вида растения и системы доставки *Agrobacterium*. Широко применяемым подходом является процедура листового диска, которую можно выполнять с любым тканевым эксплантатом, который является хорошим источником для инициации дифференцировки всего растения (Horsch et al., 1988. Plant Molecular Biology Manual A5, 1-9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht). Дополнительный подход использует систему доставки *Agrobacterium* в комбинации с вакуумной инфльтрацией. Протоколы трансформации растений томата, опосредованной *Agrobacterium*, известны специалисту в данной области техники.

Прямой перенос нуклеиновой кислоты: Существуют различные способы прямого переноса нуклеиновой кислоты в растительные клетки. При электропорации протопласты кратковременно подвергаются воздействию сильного электрического поля, открывая мини-поры, позволяющие ДНК проникнуть внутрь. При микроинъекции нуклеиновая

кислота механически вводится непосредственно в клетки с помощью микропипеток. При бомбардировке микрочастицами нуклеиновая кислота адсорбируется на микрочастицах, таких как кристаллы сульфата магния или частицы вольфрама, и микрочастицы физически ускоряются в клетках или тканях растений. Другим способом введения нуклеиновых кислот в растения является обработка ультразвуком целевых клеток. В альтернативном варианте для введения векторов экспрессии в растения использовали слияние липосом или сферопластов.

Векторы экспрессии могут включать по меньшей мере один маркерный (репортерный) ген, функционально связанный с регуляторным элементом (таким как промотор), что позволяет восстанавливать трансформированные клетки, содержащие маркер, путем негативной селекции (путем ингибирования роста клеток, не содержащих селектируемый маркерный ген) или путем положительной селекции (путем скрининга на продукт, кодируемый маркерным геном). Многие обычно используемые селектируемые маркерные гены для трансформации растений известны в данной области техники и включают, например, гены, которые кодируют ферменты, которые метаболически детоксифицируют селективный химический агент, который может быть антибиотиком или гербицидом, или гены, которые кодируют измененную мишень, которая нечувствительна к ингибитору. В данной области техники известно несколько способов положительной селекции, таких как селекция с маннозой.

В альтернативном варианте, трансгенные, а также нетрансгенные растения кунжута по настоящему изобретению можно идентифицировать с использованием маркера, специфичного для мутантного белка ALS.

В соответствии с другими дополнительными определенными аспектами, в настоящем изобретении предлагается способ идентификации растения кунжута, обладающего повышенной толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному типу гербицида, ингибирующего ALS, при этом указанный способ включает обнаружение в генетическом материале, полученном из растения, присутствия маркера нуклеиновой кислоты, амплифицированного парой праймеров, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:5 (CAGGTTCCCGTCGTATG) и SEQ ID NO:6 (TCCCTTGACAACCCGAGGA). В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения амплифицированный маркер содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:7. SEQ ID NO:7 содержит азотистое основание тимин (Т) в

положении 14.

В соответствии с другими дополнительными определенными аспектами, в настоящем изобретении предлагается способ борьбы с сорняками вблизи по меньшей мере одного растения кунжута, устойчивого к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, в соответствии с идеями настоящего изобретения, при этом указанный способ включает применение по меньшей мере одного гербицида, ингибирующего ALS, к сорнякам и растению в количестве, достаточном для подавления роста сорняков.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения указанный способ включает борьбу с сорняками на поле, засеянном множеством растений, устойчивых к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, в соответствии с идеями настоящего изобретения. В соответствии с этими вариантами осуществления настоящего изобретения указанный способ включает внесение в поле по меньшей мере одного гербицида, ингибирующего ALS.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения количество гербицида, ингибирующего ALS, существенно не ингибирует рост растения кунжута, устойчивого к гербициду.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения количество гербицида, ингибирующего ALS, ингибирует рост соответствующего растения кунжута, восприимчивого к такому гербициду.

В соответствии с определенным вариантом осуществления настоящего изобретения количество гербицида, ингибирующего ALS, приводит к увеличению урожая семян растения кунжута, устойчивого к гербициду, по сравнению с урожайностью соответствующего растения кунжута, устойчивого к гербициду, выращенного в среде, свободной от сорняков, полученной с помощью альтернативного способа борьбы с сорняками, при котором гербицид применяется после всходов.

Следующие примеры представлены для более полной иллюстрации некоторых вариантов осуществления изобретения. Однако их никоим образом не следует истолковывать как ограничивающие широкий объем изобретения. Специалист в данной области техники может легко разработать множество вариантов и модификаций описанных в данном документе принципов, не выходя за рамки настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Создание мутантной популяции

Для настоящего исследования была выбрана линия кунжута дикого типа (WT) S-416. Эта адаптированная линия механического сбора урожая была ранее разработана изобретателями настоящего изобретения и их коллегами для средиземноморского климата (Sabag et al., 2021. BMC Plant Biology, 21:549). Растения подвергали самоопылению в течение шести поколений для получения гомозиготных однородных семян. Около 80 000 семян WT промывали и замачивали в воде в течение 6 часов. Семена помещали в пять контейнеров с ddH₂O и мутагеном этилметансульфонатом (EMS, Merck KGaA, США) в концентрации 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 или 1% (об/об). Через 16 часов семена промывали под проточной водой в течение 4 часов для удаления остатков мутагена. Семена M₁ высевали в посадочные лотки и через месяц пересаживали в поле. При созревании, семена M₂ собирали целиком и систематически смешивали для случайного распределения потомства каждого конкретного растения M₁.

Скрининг на устойчивые растения в полевых условиях

Основная масса семян M₂ была посеяна в поле (Moshav Revaha; 31°38'41.30"N, 34°45'51.72"E) с глинистой почвой из расчета 6 000 000 семян/га⁻¹ (~4,2 млн семян). На стадии двух настоящих листьев, растения опрыскивали Имазамоксом (Pulsar, BSAF, 48 г активного ингредиента (АИ) га⁻¹) с помощью коммерческого опрыскивателя (Degania Industries Ltd., Израиль). Для предотвращения возможного «ухода» растения от действия препарата была применена вторая доза через три недели. Еженедельно проводили наблюдения для выявления растений, не подвергшихся воздействию гербицида. Идентифицированное растение-кандидат собирали для дальнейшего исследования в лаборатории. Устойчивое мутантное растение *Sesamum indicum* (далее SiRM) подвергали самоопылению до поколения M₅.

Секвенирование генов *SiALS*

Образцы листьев (~2 мг) были взяты у двухнедельных растений SiRM M₃ и восприимчивого дикого типа (S-416). Растения опрыскивали Имазамоксом (48 г АИ га⁻¹) для валидации устойчивости (после отбора проб ДНК). Геномную ДНК экстрагировали по

протоколу СТАВ с модификацией кунжута, как описано ранее (Teboul et al., 2020. Genes, 11, 1221). Чтобы проверить возможные мутации в гене *SiALS*, было применено целевое секвенирование с использованием четырех пар праймеров, охватывающих всю последовательность гена (Таблица 1) в соответствии с секвенированным геномом кунжута (Zhongzhi No. 13; Wang et al., 2014. Genome Biology, 15:1-13). Ген амплифицировали и секвенировали продукты ПЦР (геномный центр HUJI, Израиль). Выравнивание последовательностей выполняли с помощью инструмента Clustal Omega (Madeira et al., 2019. Nucleic Acids Research, 47:636-641).

Таблица 1: Перечень праймеров, используемых для секвенирования сегментов гена SiALS кунжута.

Праймер	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO.
ALS1F	CCCCTCAGCTGCCTCAT	SEQ ID NO:8
ALS1R	GCGAGGCCAGAGACCAA	SEQ ID NO:9
ALS2F	AGGGAGGTGTCTTCGCTG	SEQ ID NO:10
ALS2R	CCTCCAGCTTACCCGTCA	SEQ ID NO:11
ALS3F	GCTGGGTATGCATGGGAC	SEQ ID NO:12
ALS3R	TTGTCACACGAGCTGCAG	SEQ ID NO:13
ALS4F	CAGCACTTGGGTATGGTTGT	SEQ ID NO:14
ALS4R	TTCGAGTGGGATGTGCC	SEQ ID NO:15

Определение мутантной аллельной конфигурации

Для определения аллельной конфигурации мутации *SiALS* на основе температур плавления dsДНК был разработан протокол плавления высокого разрешения (HRM). По одному мкл прямого (CAGGTTCCCCGTCGTATG, SEQ ID NO:5) и обратного (TCCTGACAACCCGAGGA, SEQ ID NO:6) праймеров, предназначенных для амплификации сегментов ДНК, содержащих SNP, смешивали с 2 мкл геномной ДНК (20 нг/мкл), 4 мкл смеси HRM (HOT FIREPol EvaGreen HRM Mix, Solis BioDyne, Тарту, Эстония) и 13 мкл ddH₂O. Каждую смесь переносили в отдельную лунку внутри планшета (96-луночный планшет Piko PCR, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) и помещали в систему ПЦР в реальном времени (PikoReal 96, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). Параметры реакции (т.е. циклы, температура и продолжительность) определялись в соответствии с прилагаемым протоколом.

Анализ определения зависимости «доза-эффект» гербицидов

Семена WT и SiRM высевали в горшок размером 9×9×10 см с глинистой почвой (57% глины, 23% ила, 20% песка) с исследовательской станции Newe Yaar. На стадии двух

истинных листьев растения подвергали возрастающим дозам (0, 1/8X, 1/4X, 1/2X, X, 2X, 4X, 8X) репрезентативных гербицидов всех подгрупп ALS (Таблица 2). Гербициды распыляли на растения с помощью гусеничного опрыскивателя Generation 4 Research (DeVries Manufacturing, Inc., США) с объемом распыления 200 л/га⁻¹. Высоту растений измеряли через шестнадцать дней после обработки (DAT), а надземный материал собирали и сушили в печи (при 80°C в течение 48 часов) для получения сухой массы побегов (DW).

Таблица 2: Перечень используемых гербицидов.

Гербицид	Торговое наименование	Химическое семейство	Производитель	Диапазон дозы (г АИ га ⁻¹)
Имазамокс	Pulsar	Имидазолинон	BASF Corporation	3 - 384
Имазапик	Cadre	Имидазолинон	BASF Corporation	6-768
Имазетапир	Pursuit	Имидазолинон	BASF Corporation	1,25 - 160
Трифлорисульфурон	Envoke	Сульфонилмочевина	Syngenta	1,5 - 96
Формсульфурон	Equip	Сульфонилмочевина	Bayer CropScience	11,25 - 180
Пиритиобак-натрия	Staple	Пиримидинилтиобензоат	Dupont	8,5 - 1088
Пропоксикарбазон	Olimpus	Сульфониламино-карбонилтриазолинон	Bayer CropScience	6 - 384
Флорасулам	Darbuka	Сульфонид-триазолопиримидин	Agan-Adama	0,5 - 64

Физиологическая характеристика гибридных растений F₁

Скрещивание SiRM (♂) и WT (♀) осуществляли для получения семян F₁. Однородные семена F₁ высевали в горшок размером 9×9×10 см с глинистой почвой рядом с двумя родительскими линиями (WT и SiRM). Горшки помещали в камеру выращивания в условиях длинного дня (16/8 свет/темнота и 32/25°C). На стадии двух истинных листьев половину растений опрыскивали Имазамоксом (48 г АИ га⁻¹). Растения ежедневно оценивали на предмет покрытия пологом (программное обеспечение Canoreo, Университет штата Оклахома, США; Patrignani and Ochsner, 2015. *Agronomy Journal*, 107:2312-2320) газообмена (IRGA 6800; Li-Cor, Линкольн, штат Небраска, США) в течение следующих 11 дней. В конце эксперимента, 21 DAT, надземный материал

собирали, сушили в печи (80°C, 48 часов) и взвешивали для получения DW побегов.

Полевые эксперименты

Послевсходовый эксперимент с Имазамоксом

Эксперимент проводили на Экспериментальной ферме Еврейского университета в Иерусалиме в Реховоте, Израиль (34°47' N, 31°54' E; 54 м над уровнем моря). Почва на этом участке представляет собой коричнево-красную, деградирующую, песчаную почву (Rhodoxeralf), состоящую на 76% из песка, на 8% из ила и на 16% из глины. Экспериментальную схему с парными образцами применяли с двумя генотипами (WT и SiRM) и двумя обработками: необработанный контроль (UTC) и применение Имазамокса (40 г АИ га⁻¹). Каждый участок состоял из 5-метрового ряда с плотностью посева 7 растений на м⁻¹ (n=6). В конце сезона анализировали приживаемость (количество растений на участок) и собирали урожай растений на участке. Образцы обмолачивали с помощью лабораторной молотилки (Wintersteiger AG LD 350, Австрия) и после просеивания взвешивали семена для определения урожайности семян.

Для проверки эффективности Имазамокса в борьбе с сорняками в качестве модели использовали *Amaranthus palmeri*. Семена *A. palmeri* высевали (20 семян на м⁻¹) в качестве конкурирующих сорняков рядом с двумя линиями кунжута, описанными выше. В качестве отрицательного контроля использовали необработанные участки. В конце эксперимента подсчитывали количество растений *A. palmeri* на участок.

Довсходовый эксперимент с Имазапиком

Семена WT и SiRM, а также два вида сорняков, *A. palmeri* и *Euphorbia heterophylla* высевали в горшки (9×9×10 см) с глинистой почвой (Исследовательская станция Newe Yaar), по 5 семян на горшок, за исключением *A. palmeri* с 20 семенами. Пять горшков с каждым видом растений опрыскивали Имазапиком (144 г АИ га⁻¹). За применением гербицидов следовало орошение, эквивалентное 200 мм га⁻¹. Горшки помещали в камеру выращивания в условиях длинного дня (16/8 свет/темнота и 32/25°C) и измеряли покрытие пологом (Сапорео) на 14 DAT.

Дополнительный полевой эксперимент был проведен летом 2021 года на Экспериментальной ферме Еврейского университета в Иерусалиме, Реховот, Израиль. Использовали рандомизированный блочный дизайн разделенного участка с шестью повторениями. Обработки включали: участки, свободные от сорняков (т.е. ручная

прополка), необработанный контроль (т.е. обработка без гербицидов) и применение Имазапика (48 г АИ га⁻¹) перед прорастанием. Размер участка составлял 3,6х0,8м (10 см между растениями) с двумя рядами на участок. Для оценки эффективности борьбы с сорняками на линиях посева кунжута высевали два сорняка (*Amaranthus Palmeri* – 500 семян на участок и *Abutilon Theophrastus*, – 70 семян на участок). Фенологическую характеристику проводили в течение вегетационного периода по дате цветения, количеству ветвей на растении и высоте до первой капсулы. В конце вегетационного периода подсчитывали количество сорняков на участке и собирали сорняки для измерения сухой массы. Растения кунжута собирали на расстоянии 1 м от середины участка; образцы обмолачивали с помощью лабораторной молотилки (Wintersteiger AG LD 350, Австрия) и после просеивания взвешивали семена для определения урожайности семян.

Характеризация развития корней при увеличении дозы Имазапика.

Три семени SiRM высевали в пластиковые колбы (длиной 30 см), заполненные песчаной почвой (состоящей из 76% песка, 8% ила и 16% глины) ($n=5$) и опрыскивали возрастающими дозами Имазапика (24, 48, 96 и 192 г АИ га⁻¹). За внесением гербицида следовало орошение, эквивалентное 200 мм/га⁻¹, и помещение в камеру выращивания в условиях длинного дня (16/8 свет/темнота и 32/25°C). На четырнадцатый день DAT корни промывали и сканировали с помощью планшетного сканера (Epson 12000XL, Seiko EPSON, Япония), а архитектуру корня анализировали с помощью программного обеспечения WinRHIZO Pro (Regent Instruments Ltd., Онтарио, Канада).

Статистические анализы

Для всех статистических анализов использовали статистический пакет JMP[®] (версия 15) (SAS Institute Inc., Кэри, штат Северная Каролина, США). Описательная статистика представлена графически в виде ящичковой диаграммы: медианное значение (короткая горизонтальная линия), диапазон квартилей (25 и 75%) и диапазон данных (длинная вертикальная линия). Кривые зависимости «доза-эффект» получали путем построения данных DW побегов 16 DAT от различных образцов в процентах от необработанного контроля (UTC). Модель нелинейной кривой (экспонента с двумя параметрами) была скорректирована для анализа эффектов тестируемых гербицидов в различных экспериментах.

$$Y = a \times \text{Exp}(b \times d);$$

где Y представляет собой DW побега, a = масштаб, b = скорость роста, a d

представляет собой дозу гербицида. Соотношение устойчивость/восприимчивость ED_{50} рассчитывали для определения индекса устойчивости (RI) устойчивых растений по сравнению с индексом восприимчивых растений.

Пример 1: Индуцированная мутация в гене *SiALS* обеспечивает высокую устойчивость к Имазамоксу

Для выявления возможной мутации (мутаций) в гене, кодирующем ALS, в полевых условиях проскринировали более 4 000 000 растений M_2 . Визуальная характеристика растений после двух последовательных применений Имазамокса (48 г АИ га^{-1}) привела к получению единственного растения-кандидата без каких-либо визуальных симптомов (т. е. без видимого снижения роста и повреждения меристемы). Семена этого растения-кандидата собирали и растения M_3 опрыскивали аналогичной дозой Имазамокса. Через семь дней после опрыскивания, растения WT (S-416) продемонстрировали снижение роста и повреждения меристемы, в то время как мутантные растения (SiRM) не проявляли никаких визуальных симптомов. Стоит отметить, что растения SiRM демонстрировали более высокую жизнеспособность при обработке Имазамоksom по сравнению с необработанным контролем (Фиг. 1D). Для проверки возможности мутации целевого сайта в гене *SiALS*, сегменты гена были секвенированы и была идентифицирована единственная точечная мутация в положении 563. Эта мутация привела к замене цитозина на тимин (C → T) и замене аминокислоты в положении 188 фермента ALS с аланина на валин (Фиг. 1A). С целью обеспечения быстрого скрининга этой мутации, был разработан маркер плавления высокого разрешения (HRM). Этот новый маркер привел к четкому разделению между WT, SiRM и гибридом F_1 (Фиг. 1B). Для оценки уровня устойчивости был проведен анализ «доза-эффект» от сублетальной (3 г АИ га^{-1}) до 16-кратной полевой дозы (т. е. 364 г АИ га^{-1}). Растения WT демонстрировали визуальные симптомы и снижение DW побегов уже при низкой дозе 6 г АИ га^{-1} и достигали ED^{50} (т.е. снижения сухого веса побегов на 50%) при дозе 18 г АИ га^{-1} . Напротив, растения SiRM не проявляли никаких визуальных симптомов при дозе, превышающей рекомендованную в 8 раз (192 г АИ га^{-1}). Следовательно, расчетное значение ED_{50} мутантной линии находилось на высоком уровне - 823 г АИ га^{-1} (что выше тестируемых показателей) (Фиг. 1C-D). Примечательно, что при низких дозах 3, 6 и до половины рекомендуемой полевой дозы 12 г АИ га^{-1} , растения SiRM продемонстрировали увеличение DW побегов на 50% по сравнению с соответствующими необработанными контрольными растениями.

Пример 2: Промежуточный ответ гибридных растений выявил изменения в архитектуре растений и газообмене.

Для проверки генетического наследования мутантного гена ALS был проведен анализ временного ответа на ALS-ингибиторы гибридных (F₁) растений и их родительских линий (WT и SiRM). В целом, если растения SiRM (гомозиготы) не отличались от растений UTC и сохраняли нормальный характер роста, то у растений WT и гибридов наблюдалось значительное снижение роста в течение первых 4 DAT. Гибридные растения смогли восстановиться и уже после 7 DAT стали выглядеть как растения SiRM. К четырнадцати дням DAT гибридные растения изменили характер своего роста от удлинения стебля к образованию большего количества меристем боковых ветвей, что выразилось в более короткой высоте растений. В конце эксперимента растения WT были полностью уничтожены, тогда как растения SiRM не проявили эффекта от обработки Имазамоксом (Фиг. 2F и 3A). Гибридные растения продемонстрировали промежуточный ответ, выраженный в уменьшении высоты растения на ~40% и DW побега на ~35% (Фиг. 3D). Морфологическая характеристика гибридных растений показала, что прямостоячий морфологический фенотип был ассоциирован с большим количеством узлов на первом цветке (11,4 *против* 5,6 узлов для обработанных и UTC соответственно), но с более короткими узлами (2,4 *против* 8,0 см), что, соответственно, привело к более низко расположенной первой цветочной почке (27,6 *против* 44,6 см) (Фиг. 3B-C).

Хотя все три линии демонстрировали сходную тенденцию к снижению ассимиляции и транспирации в течение первых 48 часов после обработки, выраженность ответа была значительно сильнее у растений WT, а гибридные растения демонстрировали промежуточный ответ. Через 48 ч показатель ассимиляции растений WT составлял менее 20%, а растения SiRM полностью восстанавливались и не отличались от растений UTC. Гибридные растения восстанавливались медленнее, хотя через шесть дней они полностью восстановились (Фиг. 2E).

Пример 3: Валидация в полевых условиях подтвердила высокую устойчивость и повышенную урожайность

Чтобы оценить уровень устойчивости в полевых условиях и эффективность обработки Имазамоксом в борьбе с сорняками кунжута, был проведен полевой эксперимент с двумя линиями (WT и SiRM) при заражении *Amaranthus palmeri* и применении Имазамокса (40 г АИ га⁻¹) (Фиг. 5A). В целом, обработка Имазамоксом была очень эффективной в борьбе с *A. palmeri* (~0 растений *A. palmeri* на метр участка) по

сравнению с полевыми условиями (необработанный контроль) (~12 растений *A. palmeri* на м^{-1}) (Фиг. 5C). Внесение Имазамокса привело к значительному снижению численности кунжута WT (75%, $P < 0,0001$) из-за сильной гибели растений (Фиг. 5B). В противоположность этому, Имазамокс не оказывал существенного влияния на состояние участков с SiRM. В конце эксперимента участки были обработаны Имазамоксом, а на свободных от сорняков участках (контроль) был убран урожай. В то время как у растений WT наблюдалось значительное снижение урожайности (0,93 *против* 3,6 г на растение для Имазамокса и контроля без сорняков соответственно, $P=0,0015$), для растений SiRM наблюдалась противоположная тенденция. Мутантные растения при обработке Имазамоксом имели двойную урожайность с растения по сравнению с растениями, выращенными на свободных от сорняков участках, где сорняки уничтожались вручную (6,05 *против* 2,88 г на растение соответственно, $P=0,011$). Примечательно, что различия в состоянии участков могли повлиять на полученные результаты. Поэтому для исключения этого фактора был также проведен анализ урожайности на участок, и на уровне участков была получена аналогичная картина (Фиг. 5D). Участки WT, обработанные Имазамоксом, продемонстрировали значительное снижение урожайности по сравнению с участками, свободными от сорняков (контрольными) (1,6 *против* 19 г соответственно, $P=0,0002$). Удивительно, но на мутантных участках урожайность при обработке Имазамоксом была значительно выше по сравнению с контролем (31,5 и 16,7 г, соответственно, $P=0,02$) (Фиг. 5D).

Пример 4: Мутация придает высокую устойчивость к гербициду имидазолинонового ряда

Для проверки того, способствует ли точечная мутация в гене *SiALS* развитию устойчивости и к другим гербицидам того же класса имидазолинонов, применяли Имазапик и Имзетапир. Выбор данных гербицидов обусловлен их широким применением в полевых культурах. Анализ зависимости «доза-ответ» показал аналогичную тенденцию с четкими различиями между линиями. При применении Имазапика растения WT демонстрировали значительное снижение роста уже при дозе 6 г АИ га^{-1} (18%, $P=0,0055$), которое визуально становилось более выраженным по мере увеличения дозы Имазапика. Растения SiRM не реагировали на воздействие дозы, превышающей рекомендованную в два раза (96 г АИ га^{-1}), и симптомы серьезного повреждения проявлялись у них только при высокой дозе, превышающей рекомендованную в 16 раз (768 г АИ га^{-1} ; Фиг. 4A-B). Такая же тенденция наблюдалась и

после применения Имазетапира. Все дозы, примененные к растениям WT, вызывали значительное снижение DW побегов, а рекомендованная в полевых условиях доза (20 г АИ га⁻¹) была смертельной для растений. С другой стороны, растения SiRM не пострадали при дозе, превышающей рекомендованную в 4 раза (80 г АИ га⁻¹), и даже при самой высокой дозе в 160 г АИ га⁻¹ растения были жизнеспособны и полностью восстановились (Фиг. 4C-D). Результаты полевых наблюдений за WT по сравнению с SiRM после применения рекомендованной дозы Имазапира (48 г АИ га⁻¹) имели четкие различия. В то время как все растения WT (и сорняки) погибли уже на 10 DAT, растения SiRM пострадали незначительно и показали пятидневную задержку в развитии побегов и сроках цветения.

Пример 5: Растения SiRM проявляли слабую устойчивость к различным классам ALS

Чтобы проверить, влияет ли точечная мутация в гене SiALS на ответ растений кунжута на другие гербициды класса ALS, был проведен анализ зависимости «доза-ответ» для дополнительных классов. В целом, для всех применяемых гербицидов растения SiRM показали лучшие результаты по сравнению с растениями WT, что отражается в их более высоком значении ED₅₀, и более высокой скорости роста на уровне полевых доз (Таблица 3). Применение двух сульфонилмочевинных гербицидов (SU), форамсульфурана и трифлорисульфурона, выявило слабую устойчивость растений SiRM по сравнению с растениями WT. При использовании рекомендуемой дозы у растений WT по сравнению с SiRM наблюдалось значительное снижение DW побегов (63% против 18% и 25% против 8% для трифлорисульфурона и форамсульфурана, соответственно) и длины побегов (74% против 7% и 64% против 58%) (Фиг. 7A-B). Применение возрастающих доз пропоксикарбазона приводило к тяжелой реакции растений WT уже на низкую дозу 1/8X, тогда как растения SiRM были способны поддерживать рост (и развивать цветущие почки) вплоть до рекомендуемой дозы (Фиг. 7C). Применение флорасулама (класс триазолопиримидинов) показало сходный ответ обеих линий при низких дозах с небольшим преимуществом линии SiRM при более высоких дозах, что также отражалось в показателе RI = 2 (Таблица 3; Фиг. 7D). Внесение пиритиобака натрия оказалось летальным для обеих линий, при этом мутантное растение смогло выжить вплоть до применения рекомендуемой дозы (однако с резким снижением длины побегов на 66%) (Таблица 3; Фиг. 7E).

Таблица 3: Влияние применения различных ингибиторов ALS на параметры растений дикого типа (S-416) и SiRM в условиях поля

Гербицид	ED ₅₀		DW побегов в условиях поля (% контроля)		Длина побегов в условиях поля (% контроля)		RI
	WT	SiRM	WT	SiRM	WT	SiRM	
Имазамокс	18	823	0,28	1,02	0,33	1,01	45
Имазапик	236	563	0,74	0,75	0,35	0,94	2,4
Имазетапир	3,7	161	0,17	0,78	0,27	0,87	48
Форамсульфурон	41	165	0,37	0,82	0,26	0,93	3,95
Флорасулам	31	62	0,81	0,71	0,60	0,83	2
Пиритиобак натрий	9,8	202	0,26	0,65	0,17	0,34	20,5
Пропоксикарбазон	12	96	0,42	0,50	0,30	0,80	8
Трифлорисульфурон	33	69	0,75	1,05	0,36	0,42	2

Таблица 3: Представлены сухая масса (СВ) и длина побегов в процентах к необработанному контролю (UTC) и значения ED₅₀ (доза гербицида, снижающая рост растений на 50%). Значения представляют собой средние величины ($n=5$).

Пример 6: Растения SiRM проявили высокую устойчивость к довсходовому применению Имазапика

Для оценки ответа растений SiRM на довсходовое применение Имазапика был проведен анализ реакции при возрастающих дозах (48, 96 и 144 г АИ га⁻¹). В целом, при всех тестируемых дозах растения SiRM демонстрировали нормальный рост и развитие (выживаемость 100%; Фиг. 6А). Для проверки возможностей применения Имазапика в довсходовый период сравнивали растения WT и SiRM, а также два вида сорняков *A. palmeri* и *Euphorbia heterophylla*, в максимальной дозе (144 г АИ га⁻¹) с использованием визуального подхода и феномического подхода на основе изображений (Фиг. 6В). В то время как растения WT находились под полным контролем и не развивались дальше роста семядолей, растения SiRM развивались нормально, без каких-либо визуальных отличий по сравнению с необработанным контролем. Эти различия были также выражены под землей, когда у растений WT не развивались корни (82 против 5 мм при контролируемой

обработке и обработке Имазапиком соответственно), в то время как растение SiRM сохраняло аналогичную длину корней (72 *против* 85 мм соответственно, $P=0,106$) (Фиг. 6B). Покрытие пологом растений WT через 14 дней после посева показало значительное снижение (2,23 *против* 0,27 % покрытия, $P=0,0008$), в то время как растения SiRM сохранили аналогичные значения (Фиг. 6C).

Известно, что гербициды ALS оказывают сильное влияние на развитие корней за счет их флоэмного транспорта к меристемам (органам аккумуляции), что также было обнаружено и в этом случае (Фиг. 6B) Большая длина корней, обнаруженная у обработанных семян SiRM, заставляет нас исследовать возможность реакции гормезиса корней. Однако дозозависимое внесение Имазапика в возрастающих дозах не выявило существенных различий в объеме корней (Фиг. 6C).

Пример 7: Влияние мутации конфигурации ALS

На Фиг. 8 показано, что замена аланина на валин изменяет конформацию белка в месте связывания гербицида и снижает сродство гербицида к ферменту ALS.

Пример 8: Полевые испытания 2021 г.: влияние Имазапика на борьбу с сорняками и урожайность кунжута

При контрольной обработке (без гербицидов) растение *A. Palmeri* было доминирующим сорняком (98 растений на участок), и никакие другие сорняки или растения кунжута не могли развиваться, что отображено визуально (Фиг. 9 A-C). Предварительное внесение Имазапика привело к освобождению участков от сорняков. Растения *A. Palmeri* не взошли (полный контроль), а появившиеся растения *Abutilon* не развились за пределы семядолей. Как ясно видно из Фиг. 9D-E, предварительное применение Имазапика не оказало вредного воздействия на устойчивые растения по настоящему изобретению, демонстрируя рост, аналогичный росту, полученному в контроле без сорняков. Предварительное применение Имазапика также привело к уменьшению высоты до первой капсулы, что указывает на уменьшение доминирования апикальной меристемы (Фиг. 9E-G).

Вышеприведенное описание конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения настолько полно раскрывает общий характер изобретения, что другие могут, применяя современные знания, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные варианты осуществления без излишних экспериментов и

без отхода от общей концепции, и, следовательно, такие адаптации и модификации должны быть предназначены и являются предназначенными для понимания в рамках значения и диапазона эквивалентов описанных вариантов осуществления. Следует понимать, что применяемые в настоящем документе фразеология и терминология предназначены только в целях описания и не должны восприниматься как имеющие ограничительный характер. Средства, материалы и этапы выполнения различных описанных функций могут принимать различные альтернативные формы, не выходя за рамки изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение кунжута (*Sesamum indicum* L.) или его часть, содержащая по меньшей мере одну клетку, содержащую мутантный полинуклеотид, кодирующий ацетолактатсинтазу (*mALS*), при этом *mALS* кодирует мутантный белок ацетолактатсинтазы (*mALS*), имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ацетолактатсинтазу (*ALS*), по сравнению с белком *ALS S. indicum* (*SiALS*) дикого типа, и при этом указанное растение устойчиво к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему *ALS*.

2. Растение кунжута по п. 1, отличающееся тем, что мутантный белок *ALS* (*mALS*) содержит аминокислоту, отличную от аланина, в положении 188 белка, имеющего по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1.

3. Растение кунжута по п. 2, отличающееся тем, что аланин заменен валином (*Ala188Val*).

4. Растение кунжута по п. 3, отличающееся тем, что белок *mALS* содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3.

5. Растение кунжута по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что белок *mALS* кодируется полинуклеотидом, содержащим замещенный кодон, кодирующий аминокислоту, отличную от аланина, в положениях 562-564, при этом полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере 90 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

6. Растение кунжута по п. 5, отличающееся тем, что замещенный кодон кодирует аминокислоту валин.

7. Растение кунжута по п. 6, отличающееся тем, что полинуклеотид содержит нуклеотид тимин (Т) в положении 563 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

8. Растение кунжута по п. 7, отличающееся тем, что полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:4.

9. Растение кунжута по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что *SiALS* дикого типа кодируется полинуклеотидом, имеющим последовательность

нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 2, и содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

10. Растение кунжута по любому из пп. 1-9, отличающееся тем, что дает более высокий урожай семян при выращивании в условиях отсутствия сорняков, полученных путем применения гербицида, ингибирующего ALS, по сравнению с выращиванием в условиях отсутствия сорняков, полученных альтернативными способами борьбы с сорняками, при этом указанный гербицид применяется после всходов.

11. Растение кунжута по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что полинуклеотид, кодирующий mALS, представляет собой мутант указанного эндогенного гена растения, кодирующего ALS.

12. Растение кунжута по п. 11, отличающееся тем, что является нетрансгенным растением.

13. Растение кунжута по любому из пп. 11-12, отличающееся тем, что его получают путем создания сайт-специфической мутации в указанном гене растения, кодирующем ALS.

14. Растение кунжута по п. 13, отличающееся тем, что сайт-специфическая мутация вставлена методом редактирования гена с использованием по меньшей мере одной искусственно сконструированной нуклеазы.

15. Растение кунжута по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что полинуклеотид, кодирующий mALS, представляет собой экзогенный полинуклеотид.

16. Растение кунжута по п. 15, отличающееся тем, что представляет собой трансгенное растение, трансформированное экзогенным полинуклеотидом, кодирующим mALS.

17. Растение кунжута по любому из пп. 1-16, отличающееся тем, что является гомозиготным по отношению к полинуклеотиду mALS.

18. Растение кунжута по любому из пп. 1-16, отличающееся тем, что является гетерозиготным по отношению к полинуклеотиду mALS.

19. Растение кунжута по любому из пп. 1-18, отличающееся тем, что гербицид, ингибирующий ALS, относится к типу, выбранному из группы, состоящей из гербицидно эффективных имидазолинонов (IMI), сульфонилмочевин (SU), пиримидинилтиобензоатов (PTB), триазолопиримидинов (TP) и сульфониламинокарбонилтриазолинона (SCT).

20. Растение кунжута по п. 19, отличающееся тем, что имидазолиноновый гербицид выбран из группы, состоящей из Имазамокса, Имазапика, Имазетапира, Имазапира, Имазаметабенза, Имазаметабенз метила, Имазахина и Имазосульфурона.

21. Растение кунжута по п. 19, отличающееся тем, что сульфонилмочевинный гербицид выбран из группы, состоящей из форамсульфуруна и трифлорсульфуруна.

22. Растение кунжута по п. 19, отличающееся тем, что гербицид пиридинилтиобензоат выбран из группы, состоящей из Флорасулама и Пиритиобак натрия.

23. Растение кунжута по п. 19, отличающееся тем, что Сульфониламинокарбонилтриазолинон представляет собой метил 2-[(4-метил-5-оксо-3-пропокси-1,2,4-триазол-1-карбонил)сульфамоил]бензоат (Пропоксикарбазон).

24. Растение кунжута по любому из пп. 1-23, отличающееся тем, что часть растения выбрана из группы, состоящей из семян, пыльцы, семянпочек, листьев, зародышей, корней, кончиков корней, пыльников, цветков, плодов, стеблей и побегов.

25. Семя кунжута по любому из пп. 1-24, отличающееся тем, что растение кунжута, выращенное из семени, содержит по меньшей мере одну клетку, содержащую мутантный ген, кодирующий mALS, при этом mALS кодирует mALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с SiALS дикого типа, и при этом указанное растение устойчиво к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

26. Выделенная культура клеток или ткани растения кунжута или его части по любому из пп. 1-24, отличающиеся тем, что растение кунжута, регенерированное из культуры клеток или ткани, содержит по меньшей мере одну клетку, содержащую mALS, при этом mALS кодирует mALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с SiALS дикого типа, и при этом указанное растение устойчиво к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

27. Способ получения растения кунжута, обладающего толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, включающий введение по меньшей мере одной мутации в по меньшей мере один аллель эндогенного гена, кодирующего эндогенный белок ALS растения, при этом по меньшей мере одна мутация приводит к тому, что кодируемый белок ALS имеет пониженное

сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с белком ALS, кодируемым немутантным геном, тем самым продуцируя растение кунжута, имеющее толерантность и/или устойчивость к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что кодируемый мутантный белок ALS содержит аминокислоту, отличную от аланина, в положении 188 белка, имеющего по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что аланин заменен валином (Ala188Val).

30. Выделенный полинуклеотид, кодирующий ALS, имеющий пониженное сродство к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по сравнению с белком ALS *S. indicum* дикого типа.

31. Выделенный полинуклеотид по п. 30, отличающийся тем, что кодируемый мутантный белок ALS содержит аминокислоту, отличную от аланина, в положении 188 белка, имеющего по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1.

32. Выделенный полинуклеотид по п. 31, отличающийся тем, что кодируемый белок содержит аминокислоту валин в положении 188.

33. Выделенный полинуклеотид по п. 32, отличающийся тем, что кодируемый белок содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3.

34. Выделенный полинуклеотид по п. 32, отличающийся тем, что содержит кодон, кодирующий валин, в положениях 562-564 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:2.

35. Выделенный полинуклеотид по п. 34, отличающийся тем, что содержит нуклеотид тимин (Т) в положении 563 последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:2.

36. Выделенный полинуклеотид по п. 35, отличающийся тем, что содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:4.

37. Конструкция ДНК, содержащая выделенный полинуклеотид по любому из пп. 30-36.

38. Конструкция ДНК по п. 37, отличающаяся тем, что содержит по меньшей мере один регуляторный элемент.

39. Вектор экспрессии, совместимый с растительными клетками, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из пп. 30-36 или конструкцию ДНК по любому из пп. 37-38.

40. Клетка-хозяин растения-кунжута, содержащая выделенный полинуклеотид по любому из пп. 30-36, конструкцию ДНК по любому из пп. 37-38 или вектор экспрессии по п. 39.

41. Трансгенное растение кунжута, содержащее по меньшей мере одну клетку, содержащую выделенный полинуклеотид по любому из пп. 30-36, конструкцию ДНК по любому из пп. 37-38 или вектор экспрессии по п. 39, при этом указанное трансгенное растение кунжута является толерантным и/или устойчивым к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

42. Способ получения растения кунжута, обладающего толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, при этом указанный способ включает введение в по меньшей мере одну клетку растения кунжута, чувствительного к гербициду, ингибирующему ALS, по меньшей мере одного полинуклеотида по любому из пп. 30-36, конструкции ДНК по любому из пп. 37-38 или вектора экспрессии по п. 39, тем самым продуцируя растение кунжута, обладающее толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS.

43. Трансгенное растение кунжута, полученное способом по п. 42.

44. Способ идентификации растения кунжута, обладающего повышенной толерантностью и/или устойчивостью к по меньшей мере одному типу гербицида, ингибирующего ALS, при этом указанный способ включает обнаружение в генетическом материале, полученном из растения, присутствия маркера нуклеиновой кислоты, амплифицированного парой праймеров, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что амплифицированный маркер содержит последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO:7.

46. Способ борьбы с сорняками вблизи по меньшей мере одного растения кунжута, устойчивого к по меньшей мере одному гербициду, ингибирующему ALS, по

любому из пп. 1-24, включающий применение по меньшей мере одного гербицида, ингибирующего ALS, к сорнякам и указанному по меньшей мере одному растению кунжута в количестве, достаточном для ингибирования роста сорняков.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что количество гербицида, ингибирующего ALS, существенно не ингибирует рост указанного по меньшей мере одного растения кунжута.

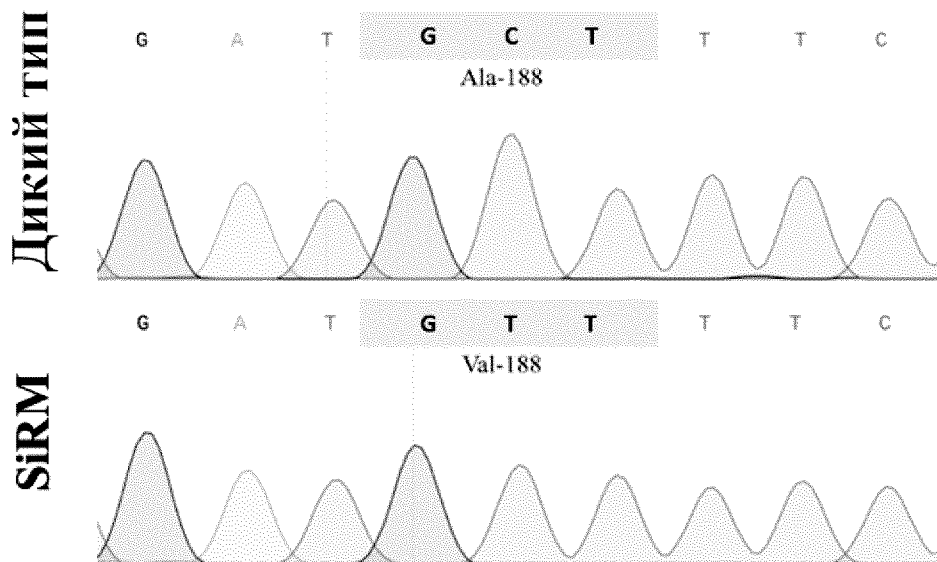
48. Способ по любому из пп. 46-47, отличающийся тем, что количество гербицида, ингибирующего ALS, ингибирует рост соответствующего растения кунжута, восприимчивого к такому гербициду.

49. Способ по любому из пп. 46-48, отличающийся тем, что количество гербицида, ингибирующего ALS, приводит к увеличению урожая семян растения кунжута, устойчивого к гербициду, по сравнению с урожайностью соответствующего растения кунжута, устойчивого к указанному гербициду, выращенного в среде, свободной от сорняков, полученной с помощью альтернативных способов борьбы с сорняками, при котором гербицид, ингибирующий ALS, применяется после всходов.

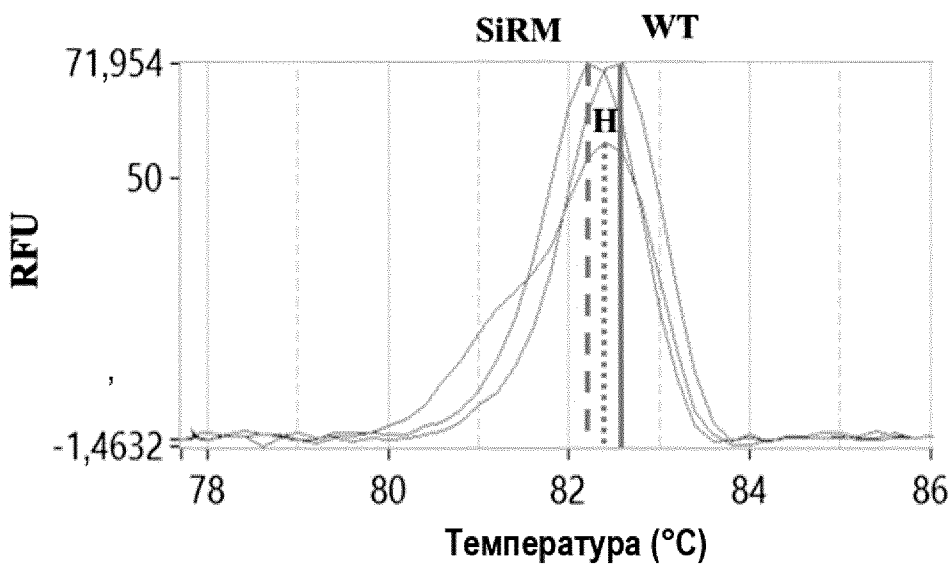
50. Способ по любому из пп. 46-49, отличающийся тем, что гербицид, ингибирующий ALS, относится к типу, выбранному из группы, состоящей из гербицидно эффективных имидазолинонов (IMI), сульфонилмочевин (SU), пиримидинилтиобензоатов (PTB), триазолопиримидинов (TP) и сульфониламинокарбонилтриазолинона (SCT).

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

1/21



Фиг. 1А



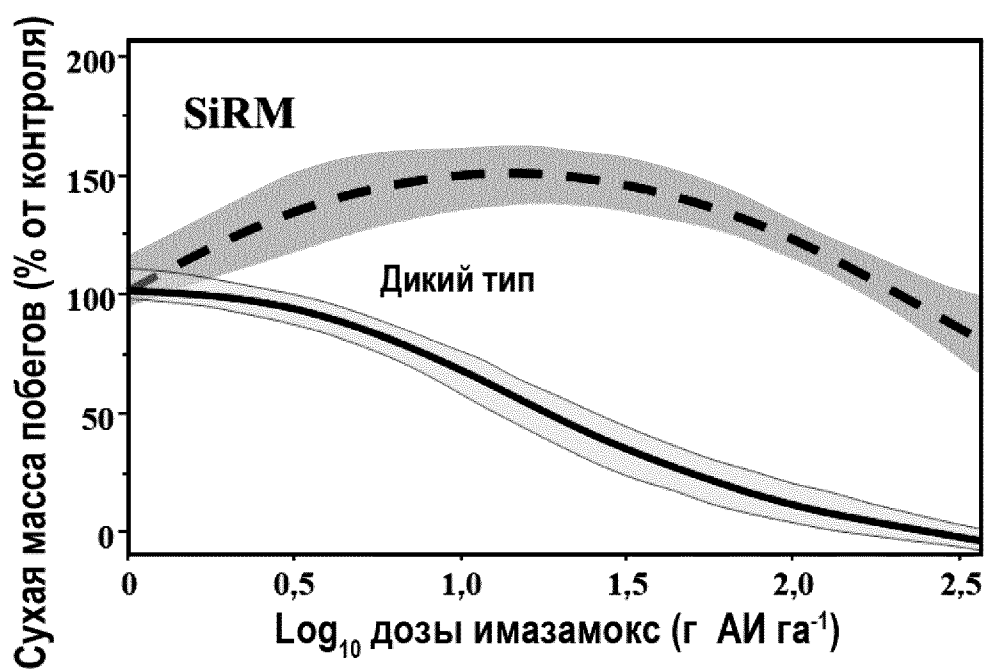
Фиг. 1В

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

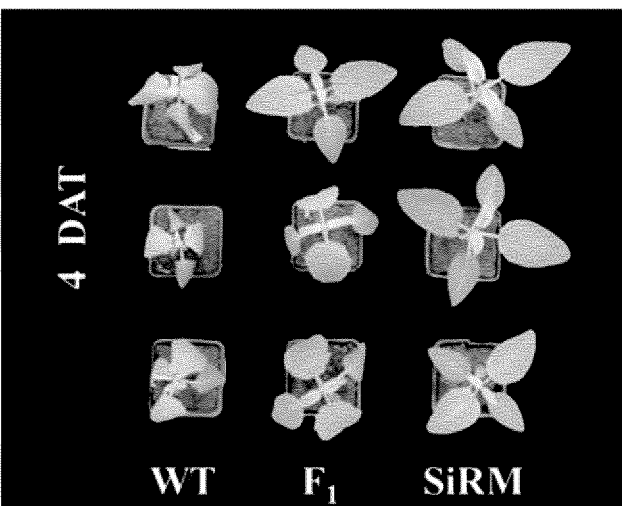
2/21



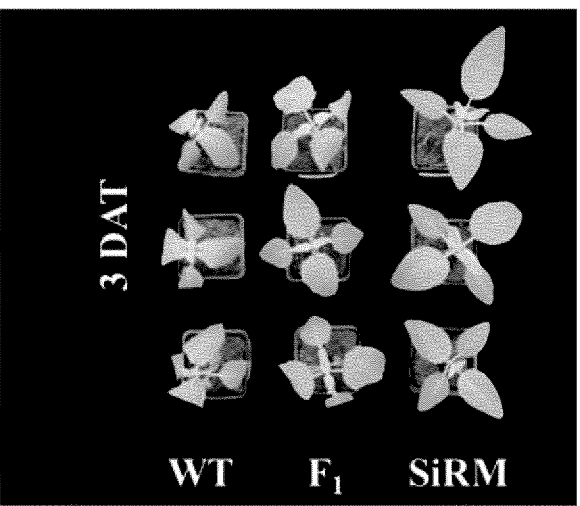
Фиг. 1С



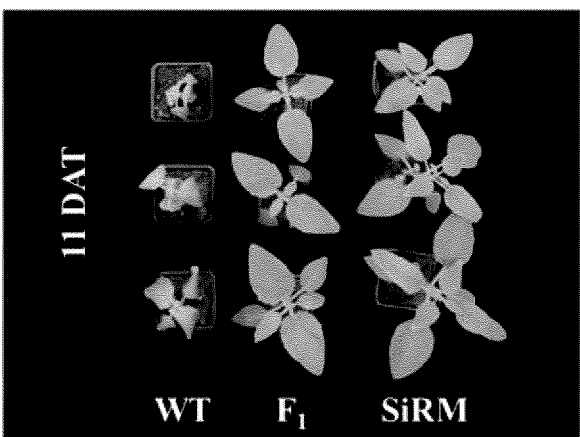
Фиг. 1D



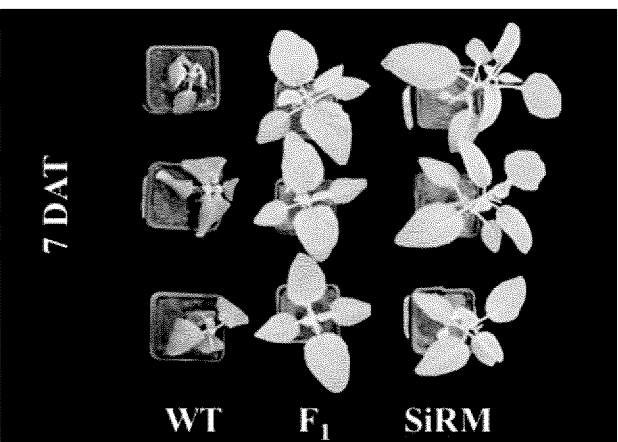
Фиг. 2В



Фиг. 2А



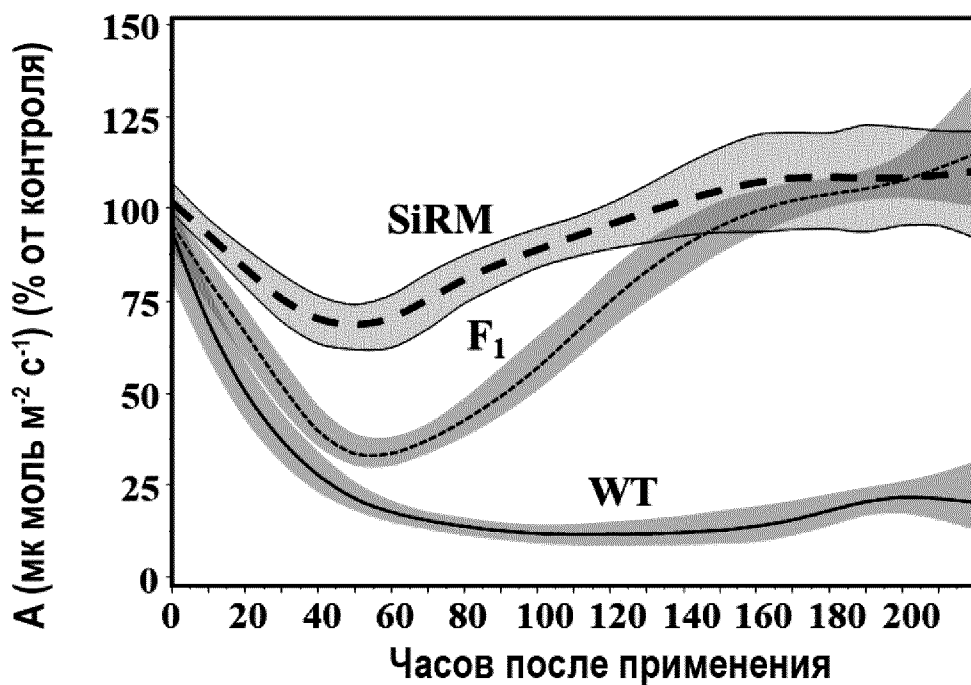
Фиг. 2D



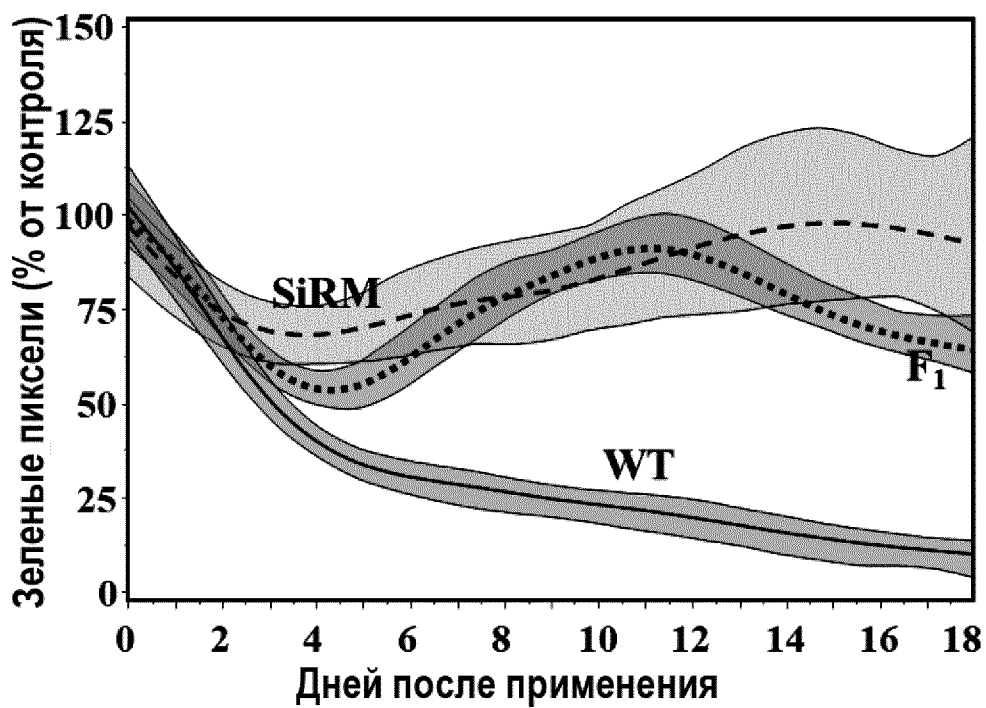
Фиг. 2С

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

4/21



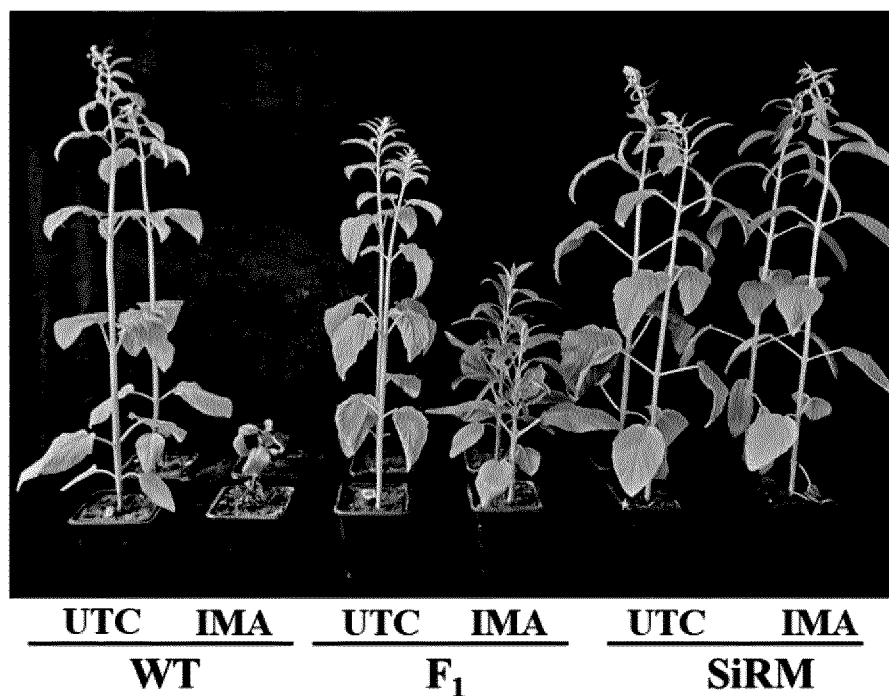
Фиг. 2Е



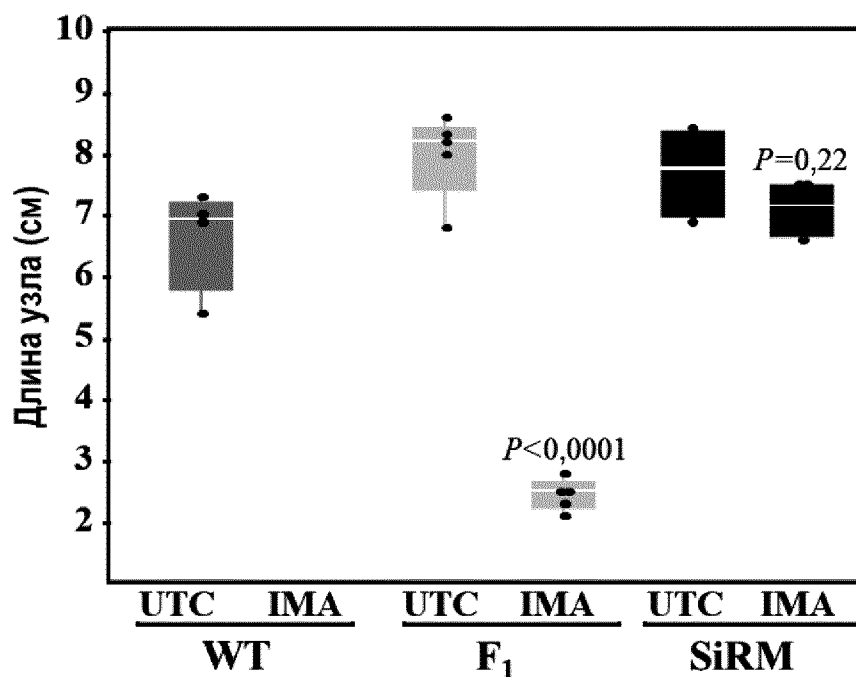
Фиг. 2F

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

5/21



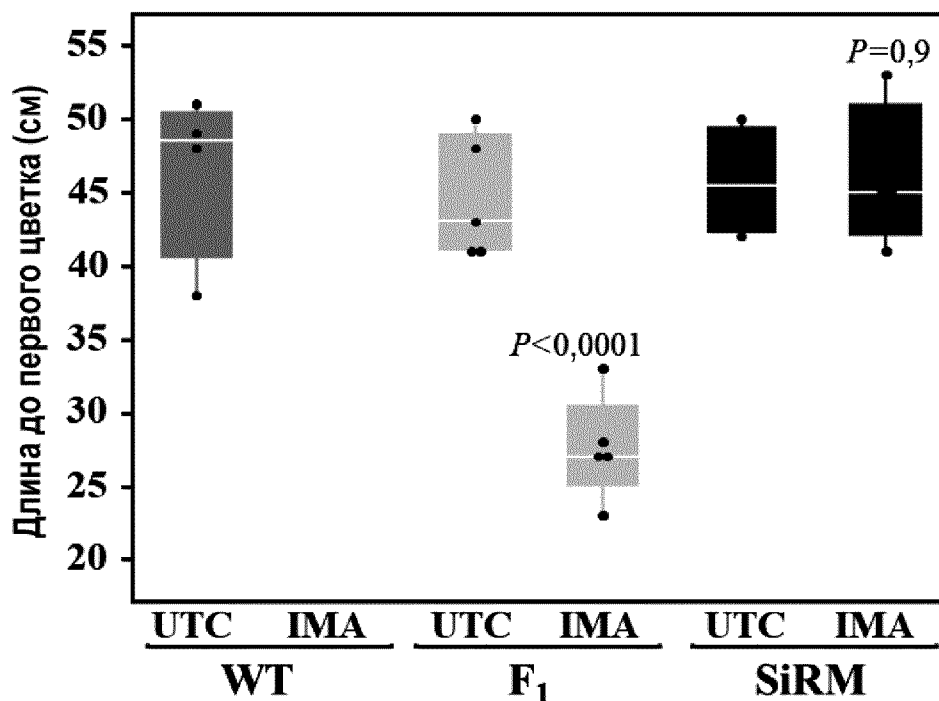
Фиг. 3А



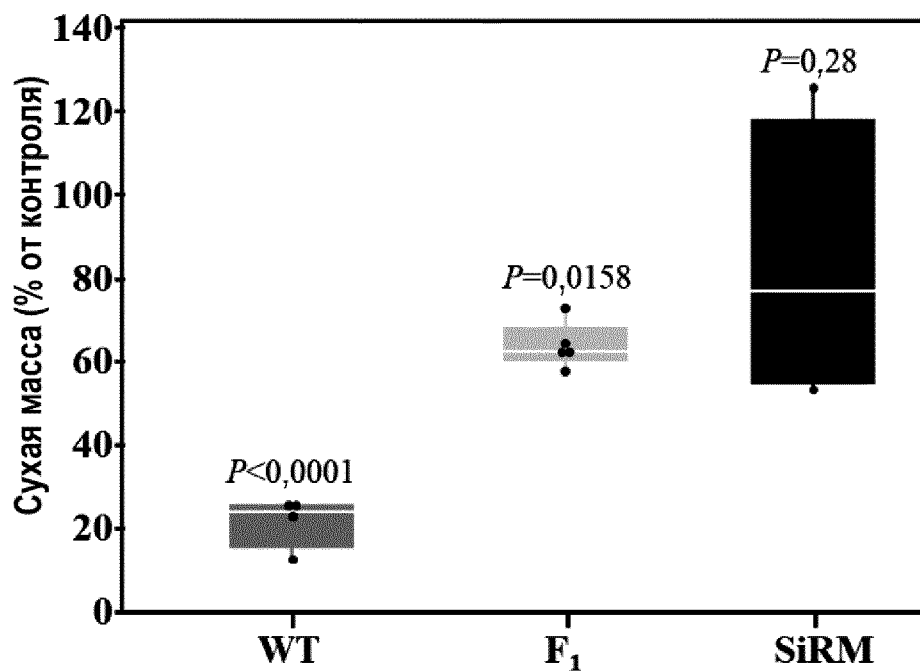
Фиг. 3В

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

6/21



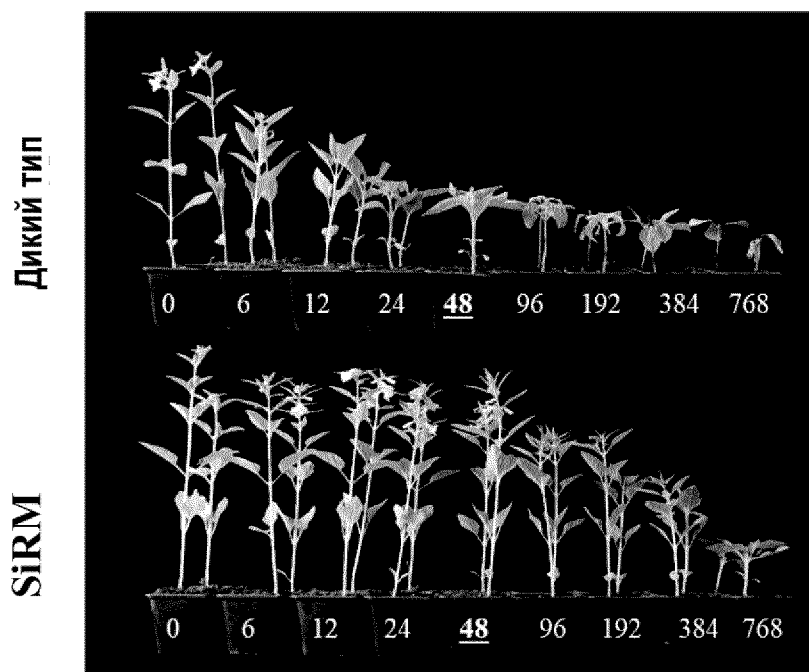
Фиг. 3С



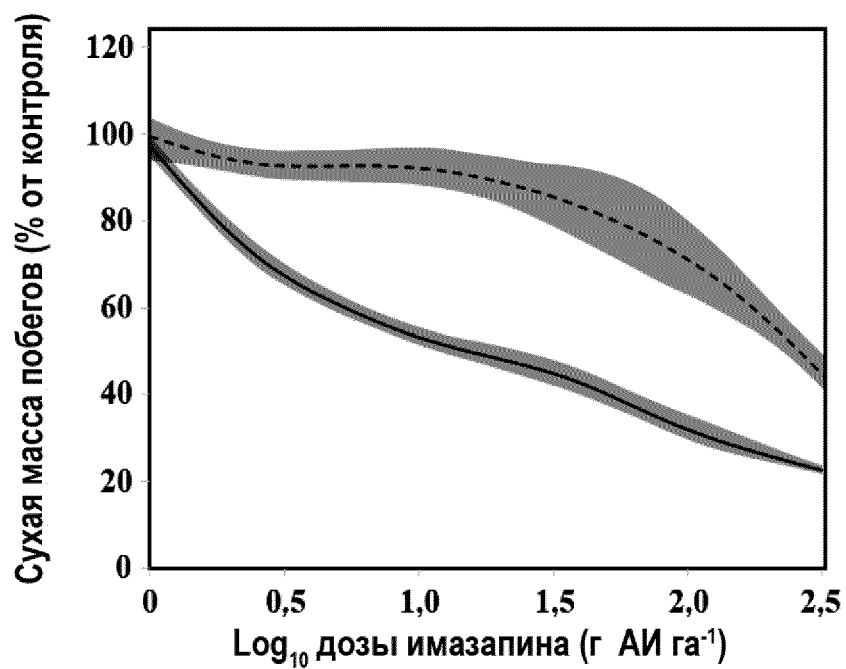
Фиг. 3D

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

7/21



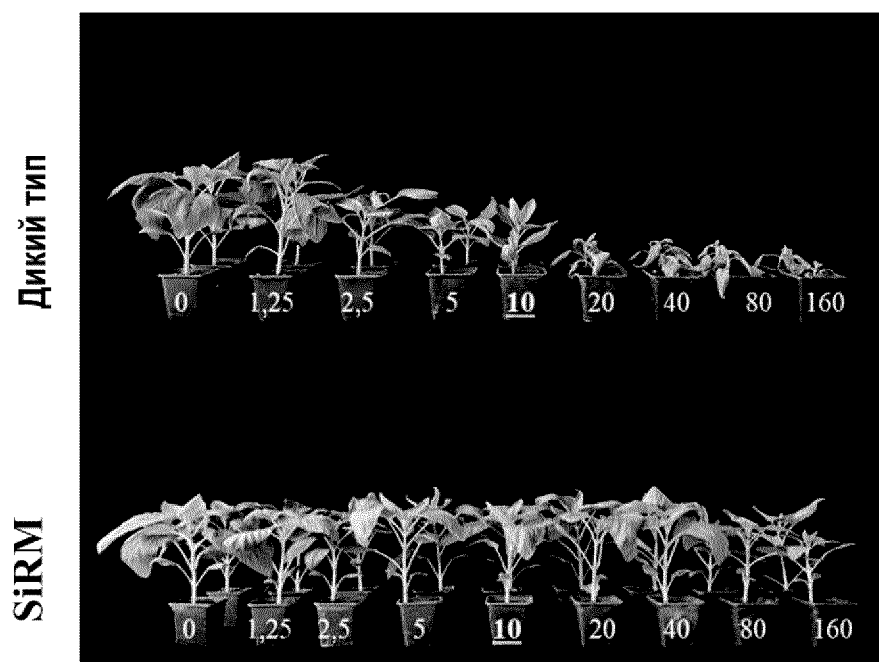
Фиг. 4А



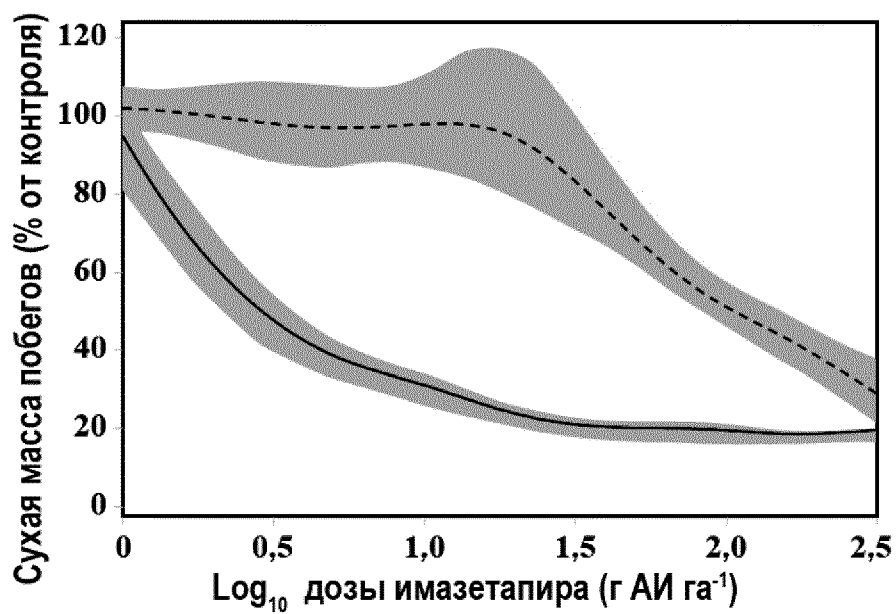
Фиг. 4В

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

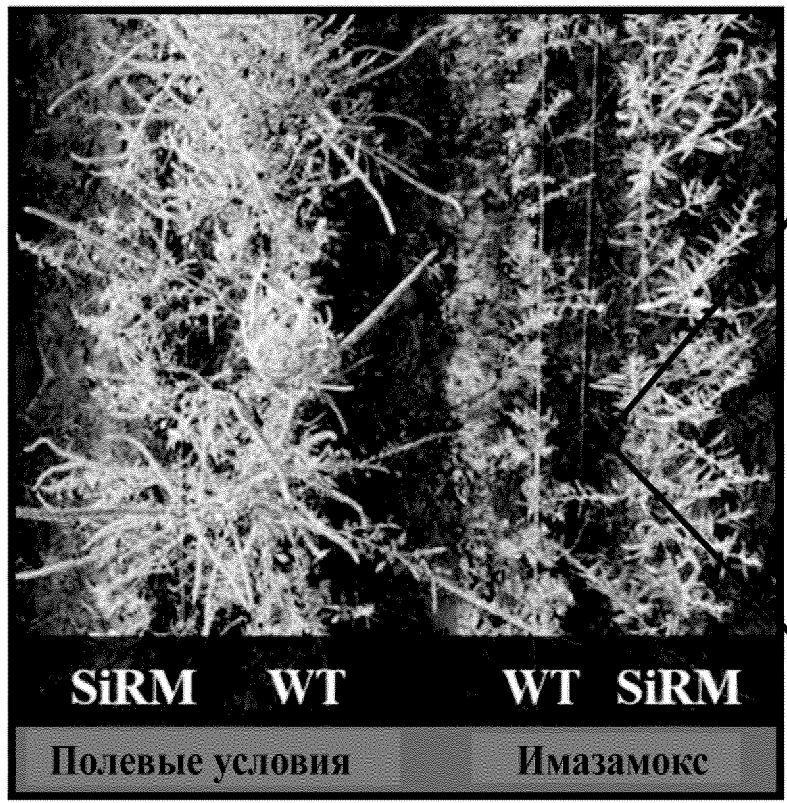
8/21



Фиг. 4С



Фиг. 4D

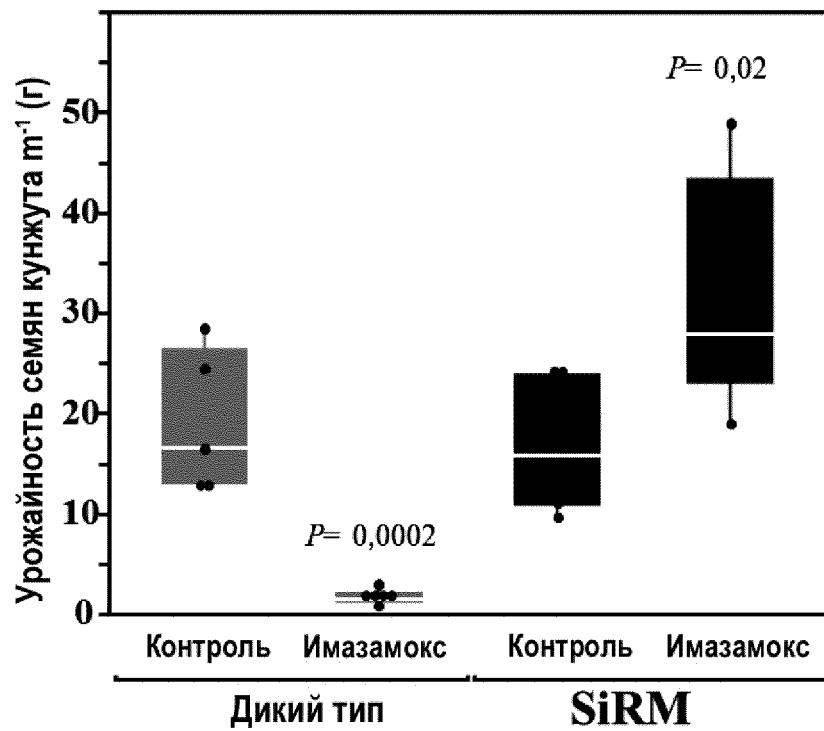


Фиг. 5А

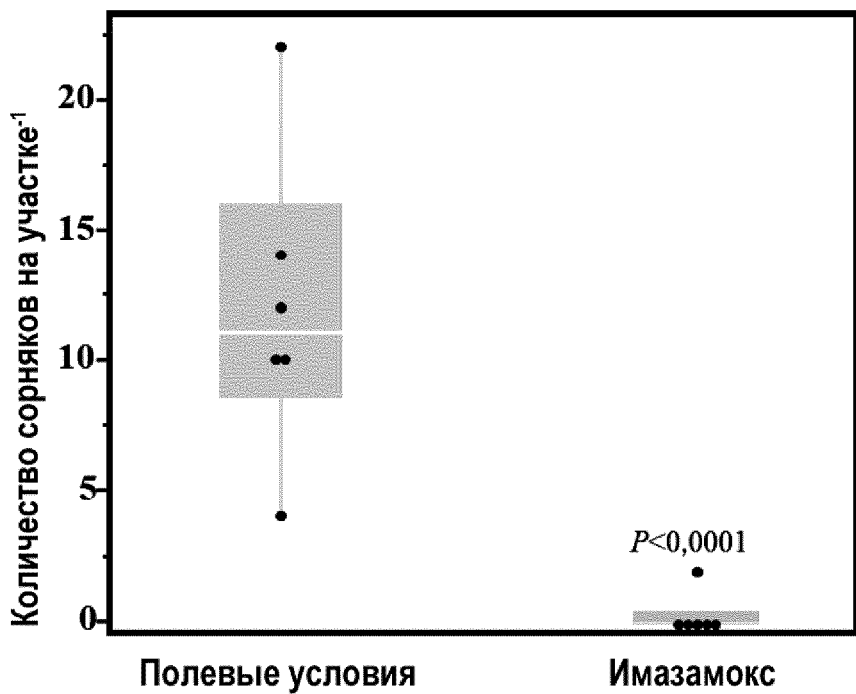


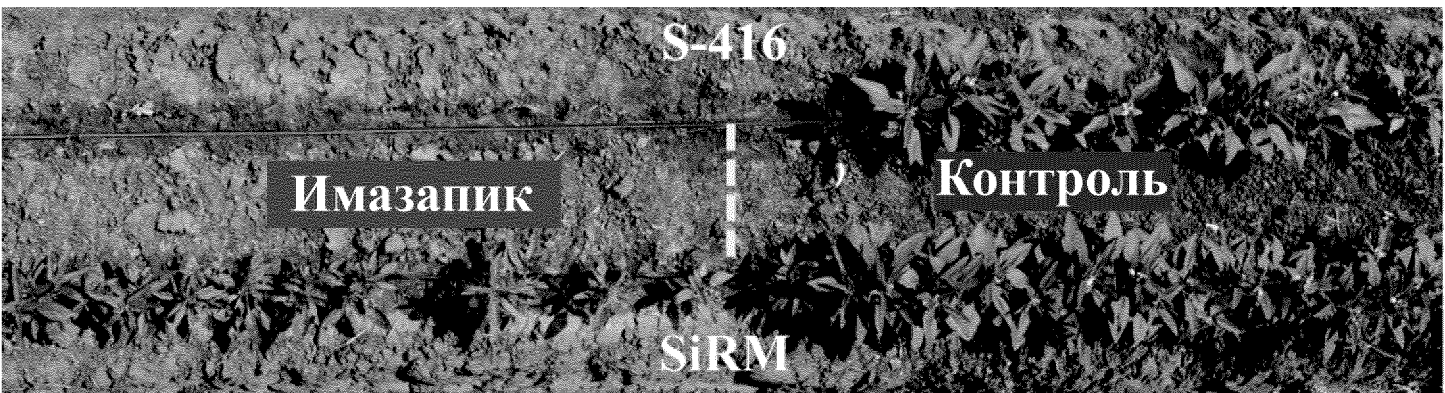
Фиг. 5В

Фиг. 5D



Фиг. 5C

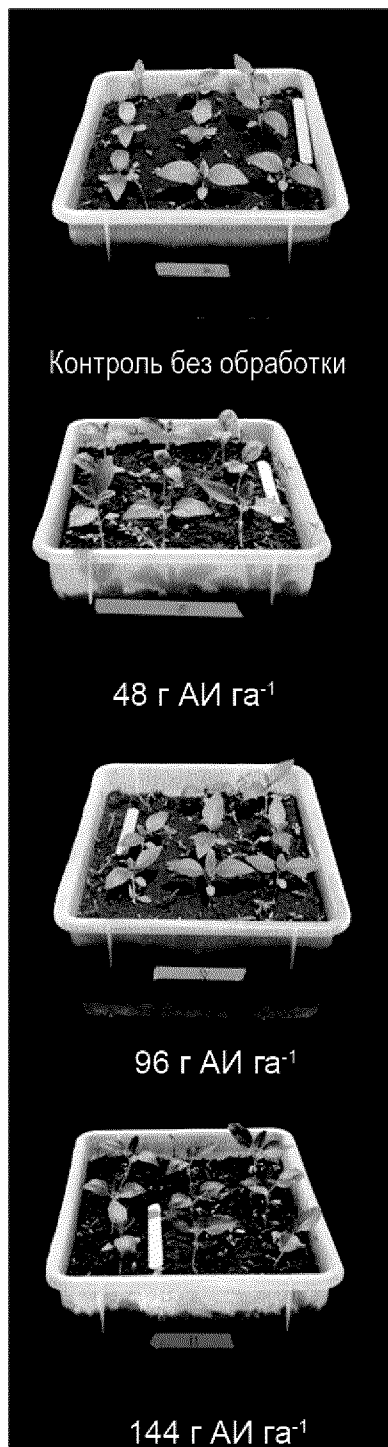




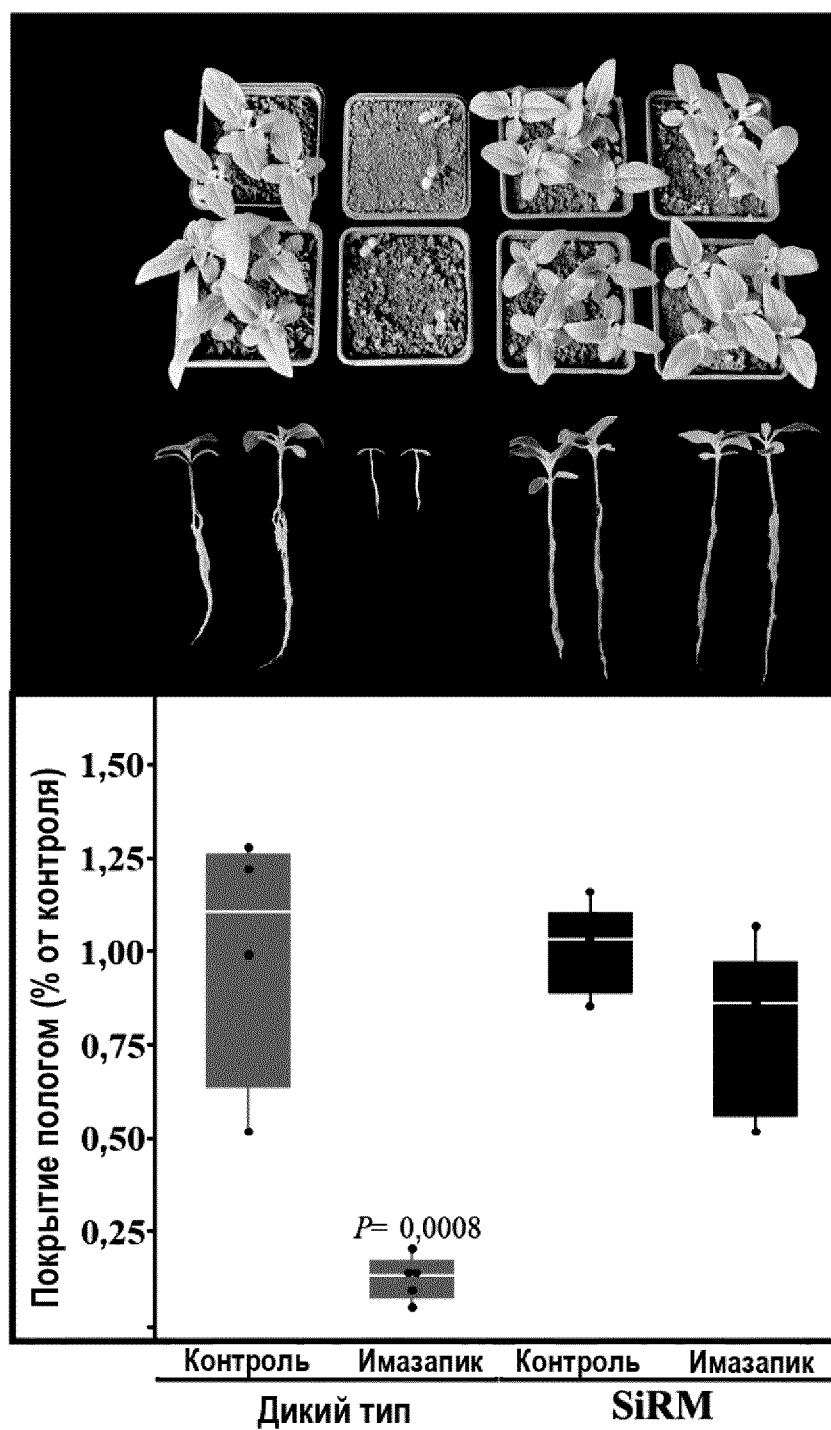
Фиг. 5Е

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

12/21



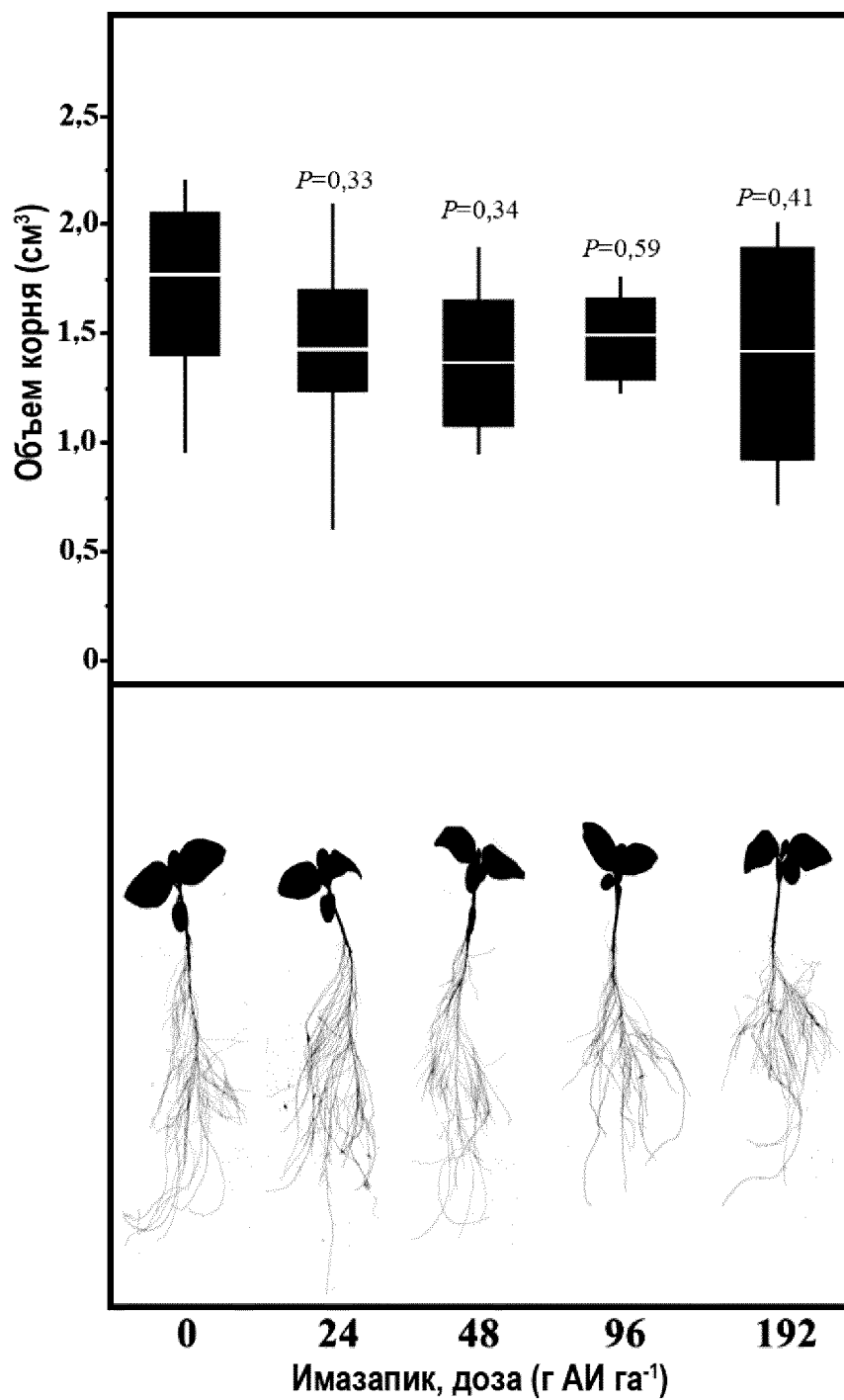
Фиг. 6А



Фиг. 6В

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

13/21

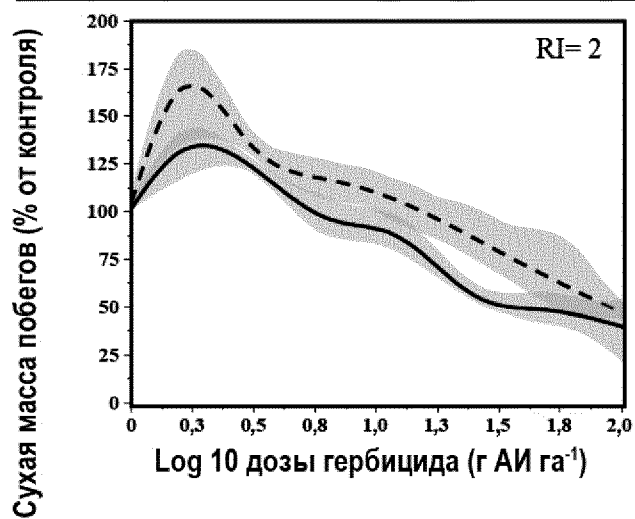
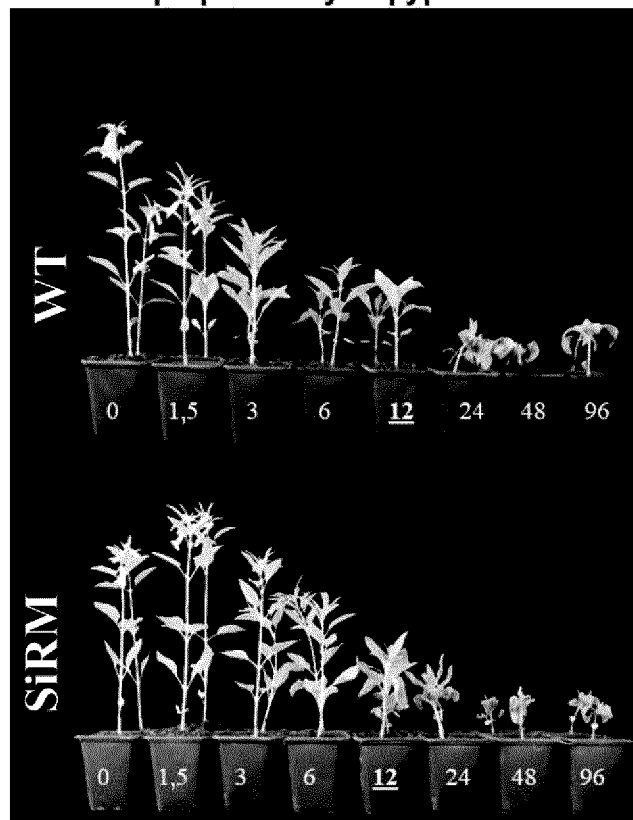


Фиг. 6С

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

14/21

Трифлорисульфурон

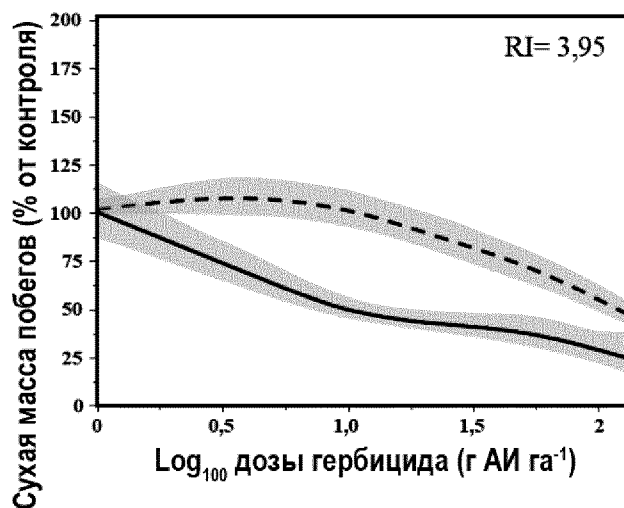
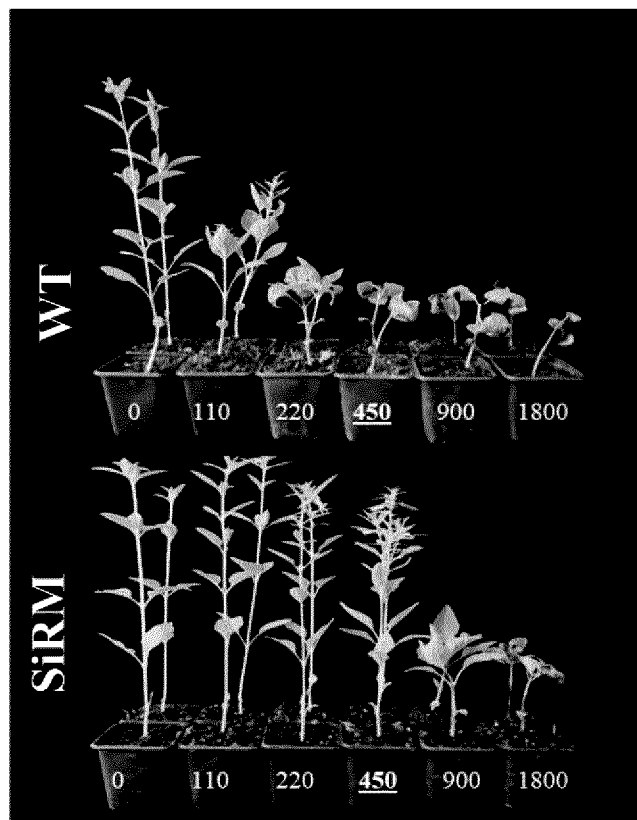


Фиг. 7А

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

15/21

Форамсульфурон

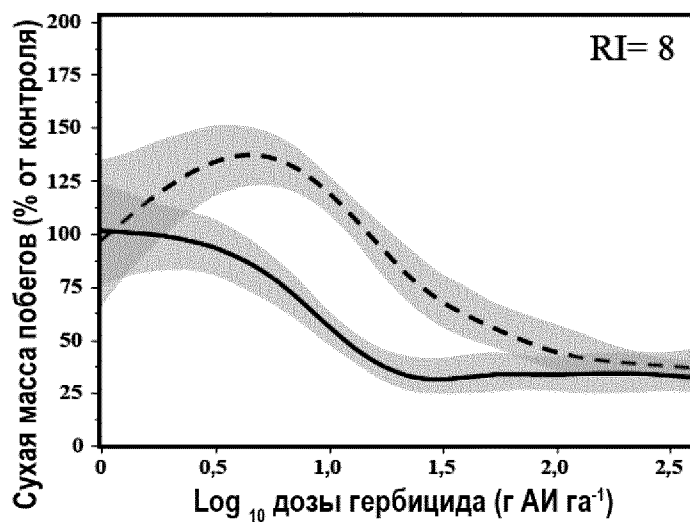


Фиг. 7В

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

16/21

Пропоксикарбазон

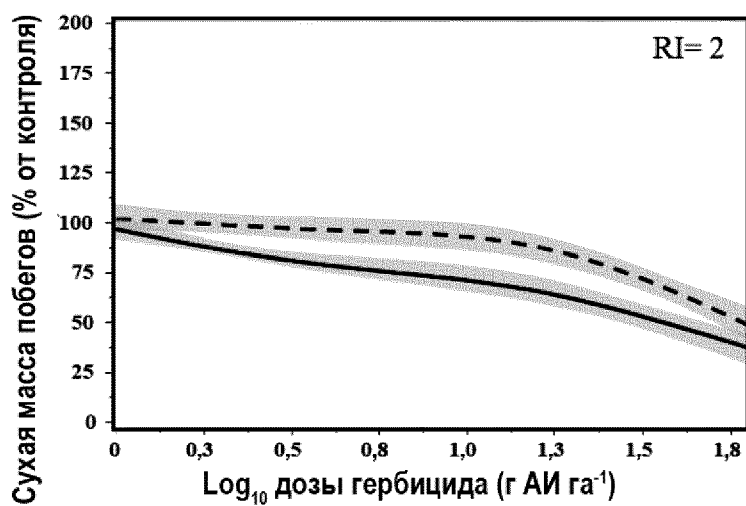
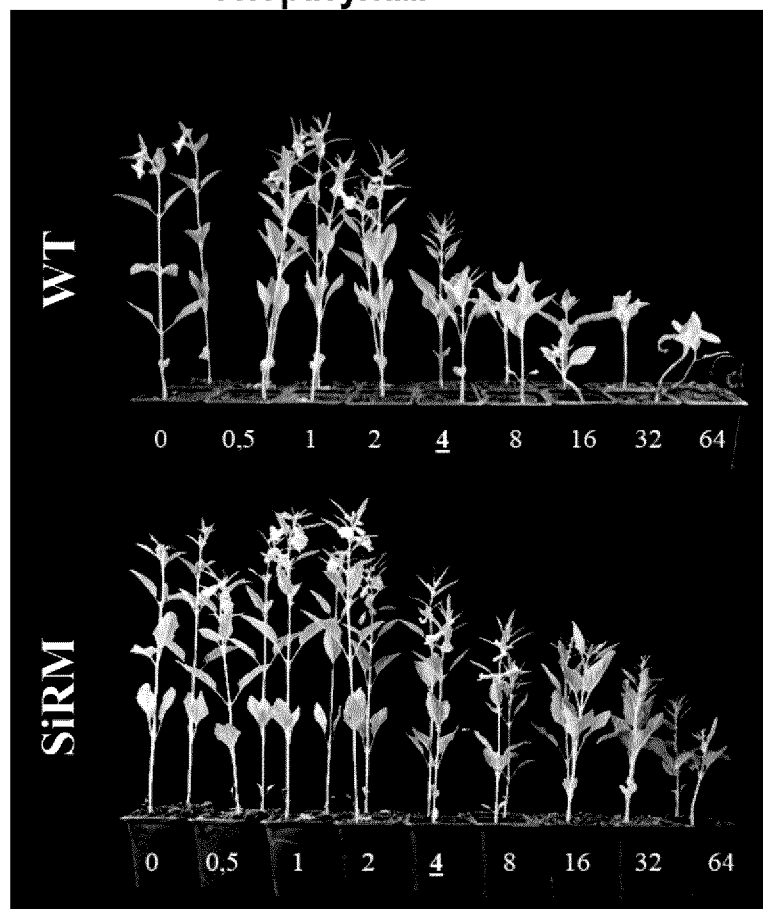


Фиг. 7С

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

17/21

Флорасулам

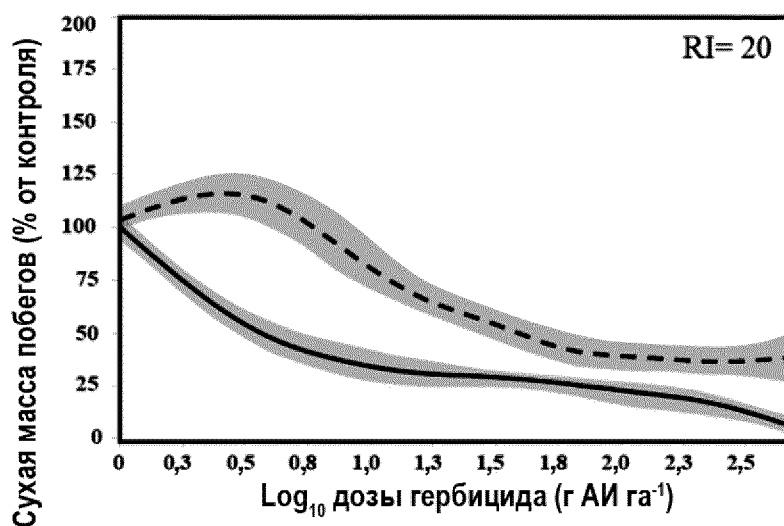
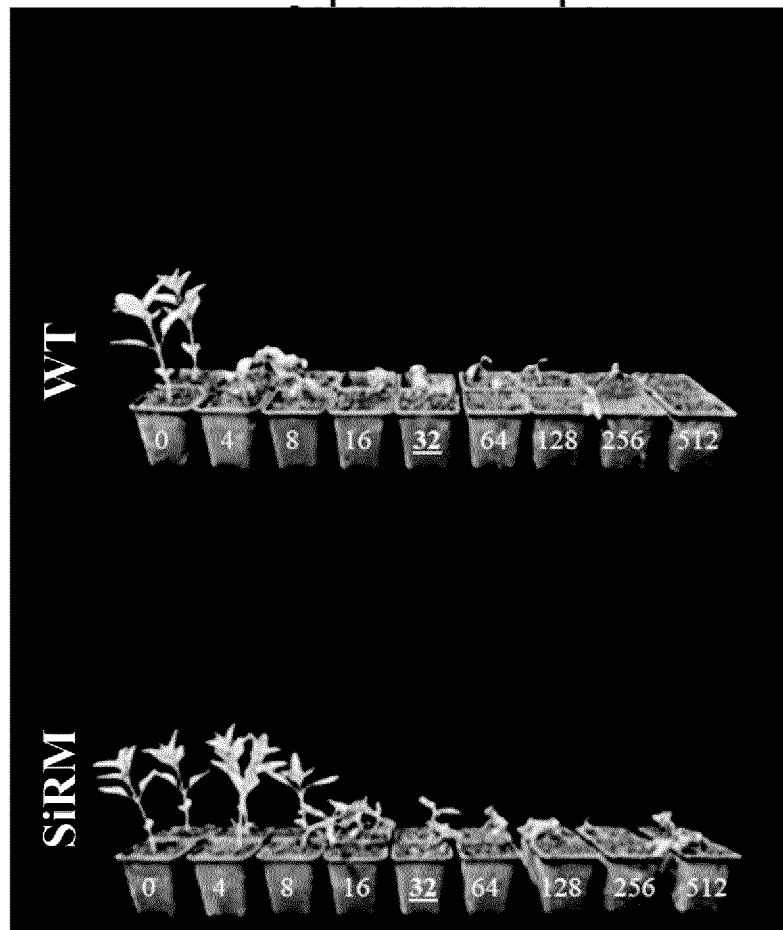


Фиг. 7D

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

18/21

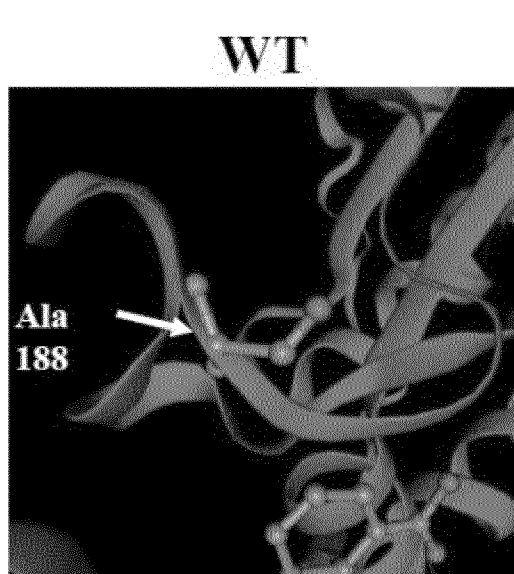
Пиритиобак натрия



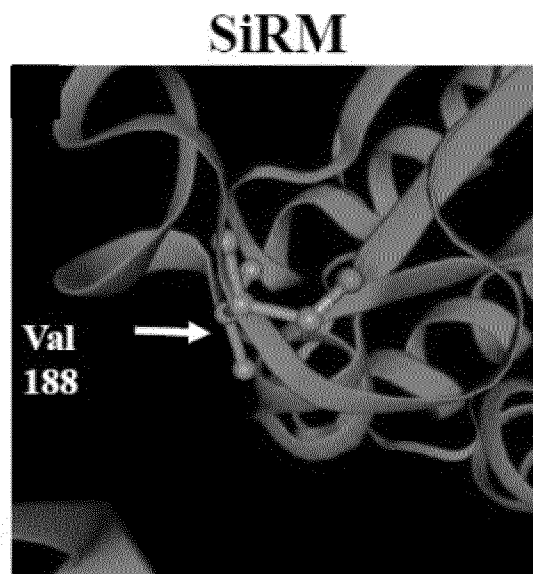
Фиг. 7Е

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

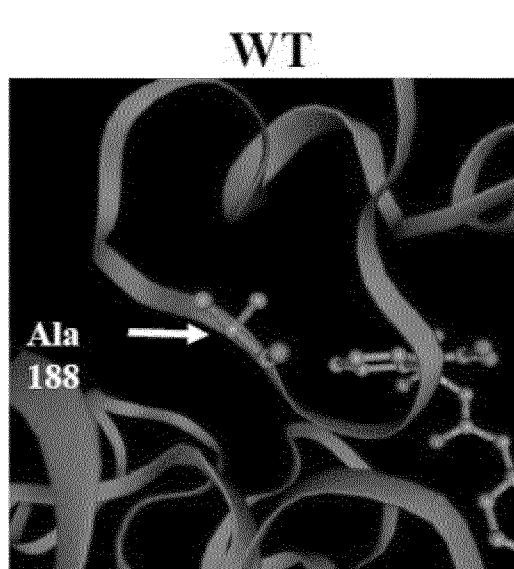
19/21



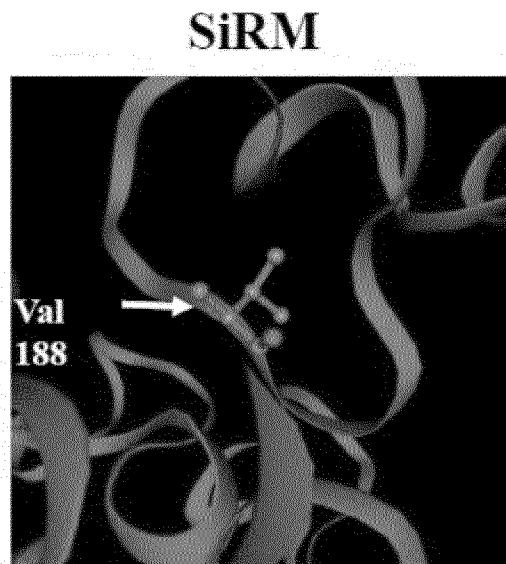
Фиг. 8А



Фиг. 8С



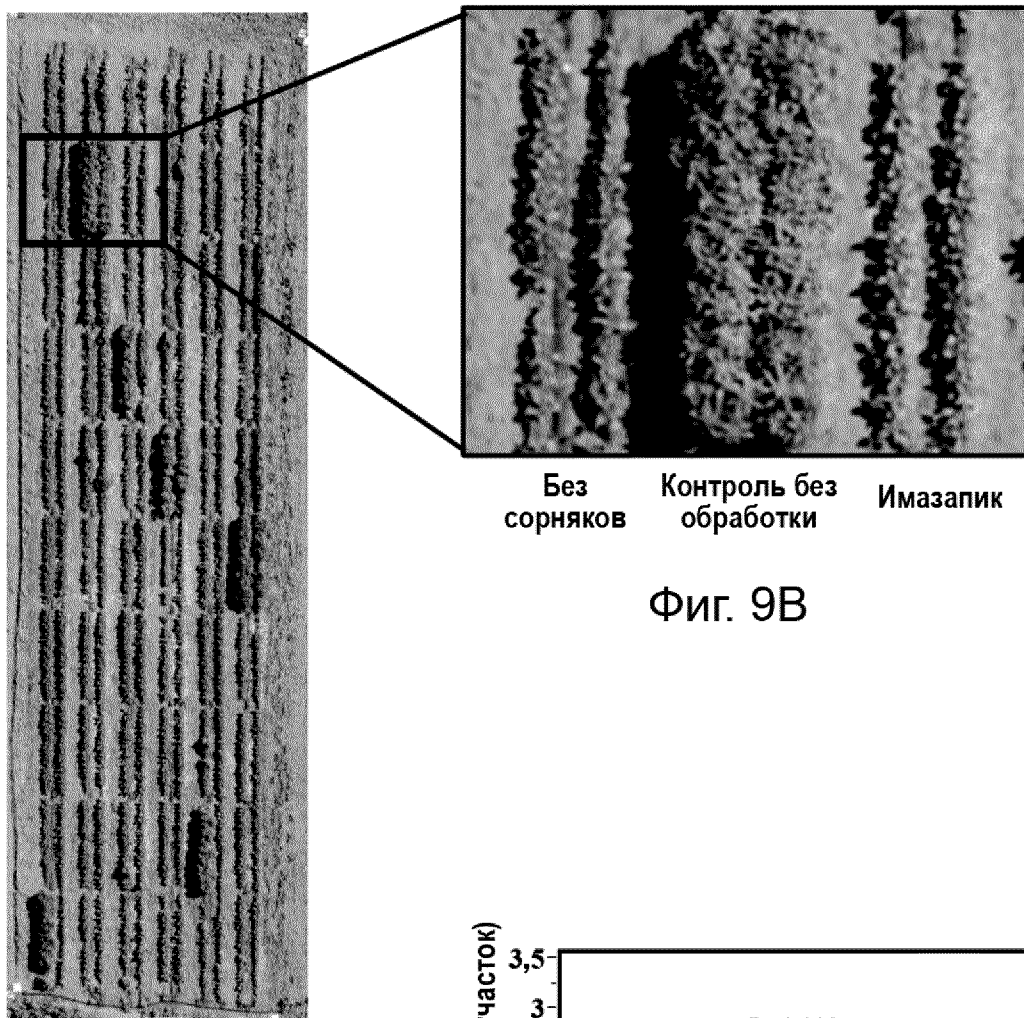
Фиг. 8В



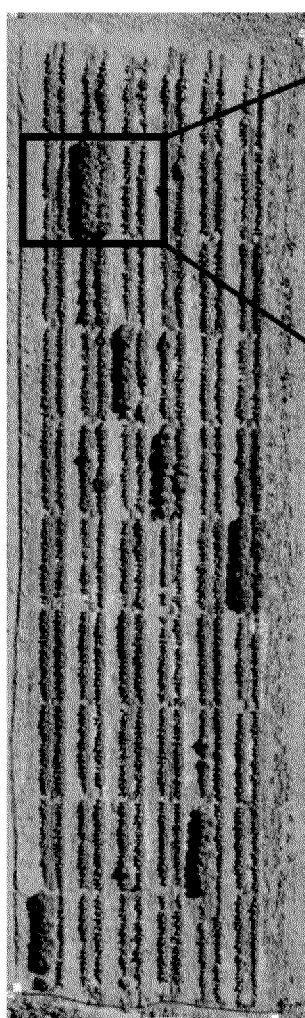
Фиг. 8D

РАСТЕНИЯ КУНЖУТА, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ, ИНГИБИРУЮЩИМ
АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗУ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

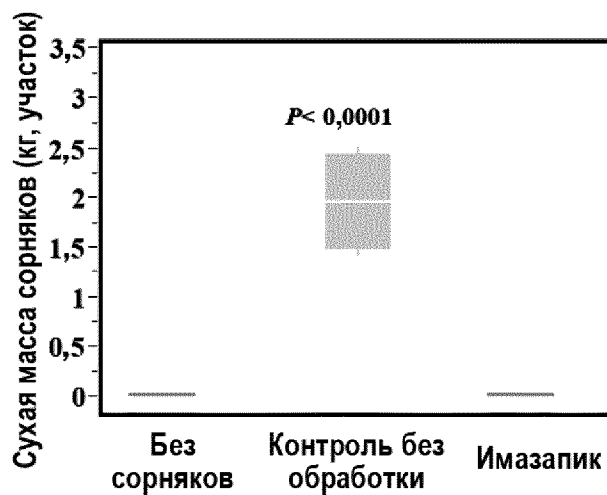
20/21



Фиг. 9В

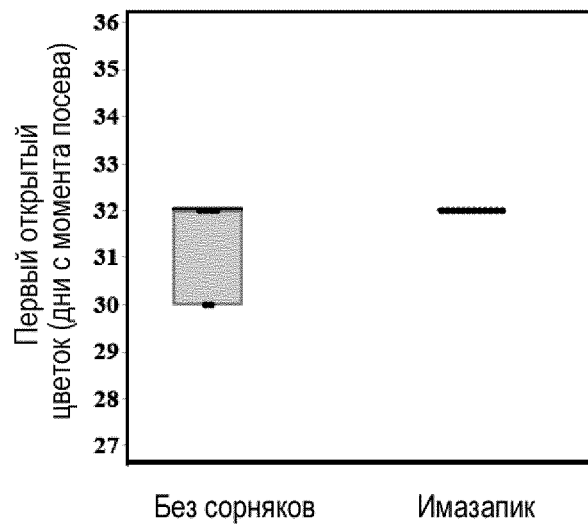


Фиг. 9А

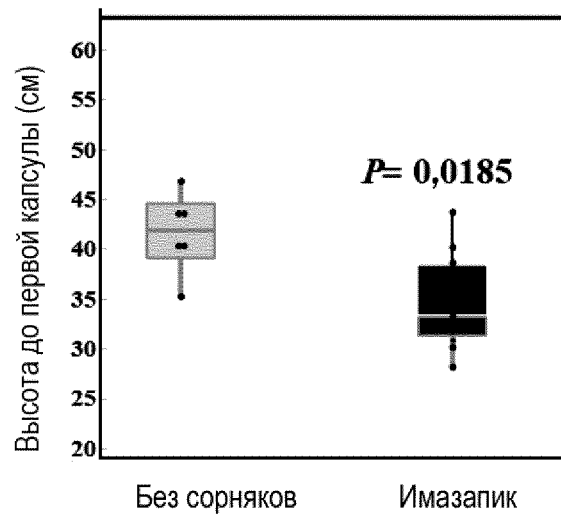
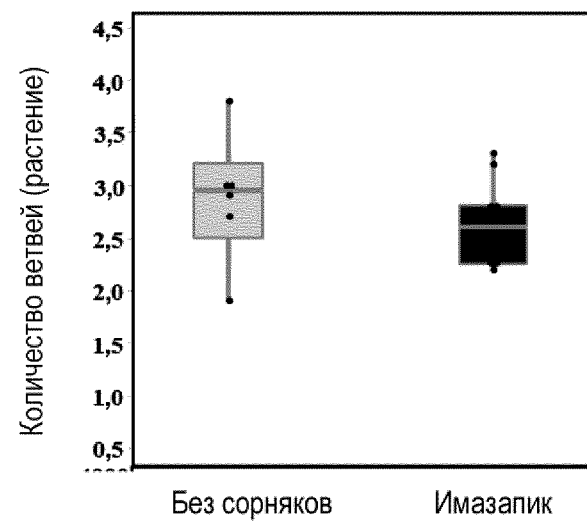


Фиг. 9С

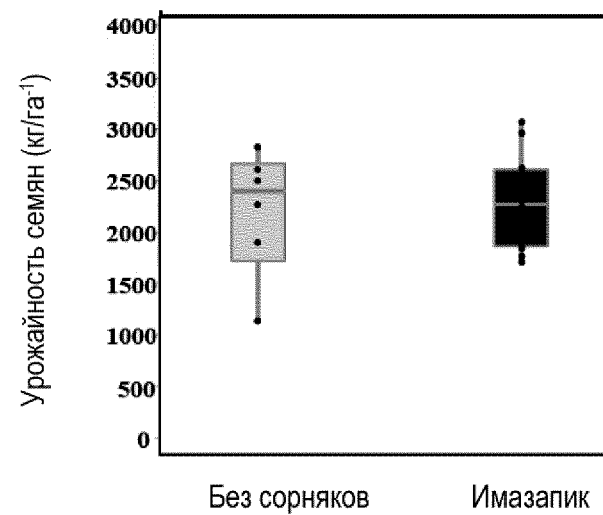
Фиг. 9D



Фиг. 9F



Фиг. 9E



Фиг. 9G