

Даний винахід стосується галузі біотехнології рослин. Зокрема, винахід стосується мутантного гена ліпоксигенази-1 ячменю (*lox-1*), який кодує фермент із різко зниженою активністю утворення 9-гідропероксіоктадеканової кислоти. Винахід має відношення також до застосування гомозиготних для *lox-1* культурних сортів ячменю в процесах пивоваріння з метою зменшення утворення неприємного присмаку в таких продуктах пивоваріння, як пиво, під час їх зберігання.

Ліпоксигенази являють собою сімейство ферментів (ЕС 1.13.11.12), що каталізують подвійне окислювання вільних і етерифікованих поліненасичених жирних кислот, котрі мають конфігурацію 1(Z), 4(Z)-пентадієну. Тривалий час вважалося, що продукти каталізованих ліпоксигеназою реакцій є основними винуватцями появи затхлого запаху в зерні та насінні рослин і в харчових продуктах, отриманих із зерна та насіння [Robinson et al., 1995, Food Chem., 54: 33-43]. Ліпоксигенази були замішані у продукування летких гексанальдегідів, що утворюються при переробці соєвих бобів, і які мають неприємний запах, що обмежує застосування соєвих білків у харчовій промисловості. Вважається, що три ізоформи (ізоферменти) ліпоксигенази, що експресуються в насінні сої, роблять внесок в окислювання ліпідів і утворення гексаналей. З метою зменшення утворення гексаналей і підвищення стабільності смаку були створені мутанти сої, що не містили одного або більше цих ізоформів. Успіх цього підходу оцінюється в роботі [Hildebrand et al., 1990, J. Agric. Food Chem. 38: 1934-1936]. Мутанти, в яких немає ліпоксигенази-3 сої, утворюють гексаналі в більших кількостях, і це дозволяє припустити, що даний ізоформ перетворює 13-гідроксипероксіоктадеканойди, що генеруються при окислюванні ліпідів, на нелеткі продукти. Продуктивність три-нульових ліній сої, в яких відсутні всі три ліпоксигенази насіння, свідчить про те, що ці ферменти не є суттєвими для нормальних агротехнічних і посівних характеристик [Narvel et al., 1998, Crop Sci. 38: 926-928].

Ліпоксигенази є також причетними до появи неприємного присмаку в рисі, що може виникати при зберіганні зерна. Виділення вільних жирних кислот можна виявити в зернах при зберіганні, що є показником метаболізму запасів тригліцеридів. Знайдено, що різновид рису Daw Dam акумулює низькі рівні пентаналей і гексаналей, що надають більш високу смакову стабільність при зберіганні [Susuki et al., 1999, J. Agric. Food Chem., 47: 1119-1124]. Цей бажаний фенотип пояснюють відсутністю ліпоксигенази-3 рису, що окислює ненасичені ліпідні ацильні ланцюги з утворенням 9-гідроксипероксіоктадеканових позиційних ізомерів.

Загальновизнано, що метаболічний шлях ліпоксигенази є складним, із багатьма відгалуженнями, і його роль у численних аспектах росту рослин і фізіології не до кінця зрозуміла. Припускається, що модифікації метаболічного шляху ліпоксигенази, що змінюють активність 9-гідропероксилення в зернових культурах, регулюють їхню сприйнятливість до забруднення мікотоксином *Aspergillus* spp. [міжнародна заявка WO 9726364], що узгоджується з включенням цього метаболічного шляху в стійкість до рослинних патогенів, але не має відношення до цілей даного винаходу.

Серед багатьох ароматичних летких речовин, що роблять свій внесок у присмак (аромат) пива, є вищі ненасичені альдегіди, які містять в ланцюзі 6-12 атомів вуглецю і мають особливо низький поріг смакової чутливості [Meilgaard 1975, MBAA Tech. Quart. 12: 151-168]. Транс-2-ноненаль, котрий є членом цієї групи, має надзвичайно низький поріг смакової чутливості - 0,11 часток на мільярд - і надає пиву неприємний присмак, що нагадує солому або картон. Ця ознака - неприємний присмак від транс-2-ноненалю є загальною характеристикою пива, що зберігалася протягом 1-3 місяців або більше, і є особливо шкідливою для смаку і запаху світлого пива, яке варять із легким солодом і яке має ніжний смак і запах.

Давно відомо, що сульфід підвищує стабільність смакових якостей пива не тільки за рахунок зв'язування кисню й антиокисних властивостей, але також за рахунок утворення летких бісульфітних похідних альдегідів і кетонів, наявних у пиві. Двома основними джерелами сульфиту в пиві є сульфід, який виробляється дріжджами під час ферментації за рахунок метаболічного шляху засвоєння сірки, і сульфід, що додається до пива перед розфасуванням. Умови ферментації, що підвищують продукування і секрецію сульфиту під дією дріжджів, уможливають утворення сульфід-карбонільних адуктів (сульфітних похідних карбонільних сполук) із карбонільних сполук, наявних у суслі, і дозволяють запобігти подальшому перетворенню їх під дією дріжджів [Dufour 1991, Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Lisbon, pp. 209-216]. У такий спосіб карбонільні сполуки, такі як ацетальдегід і діацетил, можна перенести в пиво. Спроможність сульфиту запобігати появі карбонільної сполуки транс-2-ноненалю в процесі старіння пива демонструється готуванням пива зі штамом дріжджів, що блокує метаболічний шлях асиміляції сірки [Johannesen et al., 1999, Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Nice, pp. 655-662]. Після розливу по пляшках пиво піддавали примусовому старінню, витримуючи при 37°C протягом 7 днів, після чого, як було знайдено, рівні транс-2-ноненалю були набагато вищими порога смакової чутливості. Якщо до пива з низьким умістом сульфиту безпосередньо перед розливом у пляшки добавляли 10 часток на мільйон сульфиту, то утворення транс-2-ноненалю під час примусового старіння значно знижувалося. Реакція між сульфитом і карбонільними сполуками є оборотною і відбувається під термодинамічним і кінетичним контролем. Значення уявної константи рівноваги бісульфітних сполук складають від  $10^{-6}$ М для карбонільних сполук, таких як ацетальдегід, гексаналь і деканаль, до  $10^{-3}$  для діацетилю і піривату [Dufour, 1991, див. вище]. При зберіганні пива в нього за рахунок газообміну через упакування може надходити кисень. При цьому втрачається сульфід, у результаті чого слабкіші бісульфітні адукти дисоціюють, і в пиві з'являються вільні карбонільні сполуки. Хоча сульфід, безсумнівно, підвищує стійкість смакових властивостей пива, особливо на короткий час, його зберігання в упакованому пиві суттєво залежить від газообміну через упакування і від температури. У готовому пиві природні рівні сульфиту, що виробляється в процесі ферментації, змінюються, і додавання сульфиту перед розливом по пляшках не є загальноприйнятною практикою. З цих причин сам по собі сульфід не забезпечує надійного довгострокового підвищення стабільності смакових властивостей пива при різноманітних умовах його зберігання, застосовуваних у різних куточках земної кулі.

Загальновизнано, що транс-2-ноненаль, який виявляється у пиві, утворюється внаслідок окислювання поліненасичених жирних кислот, котрі утворюються з ліпідів ячмінного зерна і з котрих найбільш розповсюдженою є ліолева жирна кислота, що містить у ланцюзі 18 атомів вуглецю [вона класифікується як 18:2, n-6-поліненасичена жирна кислота (Broun, Gettner and Sommerville 1999, Annu. Rev. Nutr. 19: 197-216)]. Проте, з приводу механізму утворення транс-2-ноненалю згода в літературі відсутня. Було висловлене припущення про наявність ферментативних метаболічних шляхів, що ведуть до утворення транс-2-ноненалю з поліненасичених жирних кислот, але окремі ферментативні стадії не підтверджені

експериментально на ячмінному зерні або в процесі солодження [Gardner 1988, Adv. Cereal Sci. Technol. 9: 161-215]. Була висунута концепція використання технології протизмістового гена або гена косупресії для зниження рівнів ліпоксигенази-1 в зернах ячменю, і тим самим для контролю 9-гідроксиперокислення і зниження рівнів альдегіду і спирту в кінцевому ячмінному зерні, як спосіб контролю утворення неприємного присмаку, але результати такого підходу не повідомляються [McElroy and Jacobsen, 1995, Bio/Technology 13: 245-249].

Був розроблений примусовий тест як спосіб оцінки транс-2-ноненального потенціалу пива, де утворення транс-2-ноненалу в суслі або в пиві ініціювали, витримуючи зразки при підвищених температурах і зниженому pH (100°C, при pH 4,0 протягом 2 годин). Спроби корелювати потенціал транс-2-ноненалу в суслі й у готовому пиві з загальним рівнем ліпоксигеназної активності у висушеному солоді показують, що ліпоксигеназа може робити внесок у появу транс-2-ноненалу в старому пиві [Drost et al., 1990, J. Am. Soc. Brew. Chem. 48: 124-131]. Проте висновок, який можна було б зробити з цього дослідження, дуже обмежений тим фактом, що ліпоксигеназна активність у пивному солоді регулюється наприкінці процесу солодження ступенем інактивації ферменту під час сушіння в печі. Таким чином, досліджувався тільки вплив залишкової ліпоксигеназної активності солоду на потенціал транс-2-ноненалу в отриманому суслі і готовому пиві. У дослідженні не вдалося оцінити ліпоксигенази, що каталізують першу стадію ліпоксигеназного ферментативного метаболічного шляху в ячмінному зерні під час розвитку і солодження, і їхню роль як детермінант, що визначають рівні транс-2-ноненалу, який виявляють у пиві. Насправді, відсутність культурних рослин ячменю, дефектних за одним або більше ізоферментів ліпоксигенази, не дозволила надати переконливого доказу щодо ролі метаболічного шляху ліпоксигенази в ячмінному солоді при контролюванні утворення транс-2-ноненалу. Такі експерименти необхідні для оцінки внеску ферментативного метаболічного шляху у порівнянні із самоокисним і хімічним шляхами, в утворення транс-2-ноненалу в пиві. Процес пивоваріння включає високотемпературну стадію кипіння сусла, де, як припускають, йдуть ці неферментативні реакції [Noel et al., 1999, J. Agric. Food Chem. 47: 4323-4326].

Даним винаходом пропонується культурний сорт ячменю з різко зниженою ліпоксигеназною-1 активністю. В одному з варіантів здійснення винаходу запропоновані рослини ячменю містять мутантний ген *lox-1*, що експресує різко знижені рівні ізоферменту ліпоксигенази-1. В альтернативному варіанті здійснення винаходу рослини ячменю містять гетерологічну нуклеотидну послідовність, що експресує протизмістову послідовність у *lox-1* дикого типу, знижуючи тим самим активність ферменту.

Як показано в даному описі, солод і сусло, що утворюються з ячменю зі зниженою ліпоксигеназною активністю згідно з винаходом, наприклад, із культурних сортів ячменю, гомозиготних для мутантного гена *lox-1*, можуть використовуватися у виробленні пива зі значно підвищеною стабільністю смакових якостей і зі зниженими рівнями транс-2-ноненалу, зокрема, за умов, які, як відомо, сприяють появі T2N. Даний винахід демонструє кореляцію між активністю ліпоксигенази-1 ячмінного солоду для продукування 9-гідроксипероксиктадекадієнових кислот (9-HPOD) і присутністю транс-2-ноненалу в пиві. Винахід, крім того, показує, що використання ячменю, гомозиготного для мутантного гена *lox-1*, у процесі пивоваріння підвищує стабільність смакових властивостей пива як при звичайному зберіганні, так і за умов підвищених температур під час зберігання. Ці властивості підвищують якість пива і дозволяють збільшити термін його зберігання і зменшити потребу в охолодженні пива при транспортуванні і зберіганні.

Даним винаходом пропонуються рослини ячменю і їхні фрагменти зі зниженою ліпоксигеназною-1 активністю, включаючи сорти ячменю, що експресують мутантний LOX-1 білок згідно з даним описом, а також способи створення таких рослин ячменю, фрагментів рослин, продуктів рослин і, особливо, солоду і пива, які одержують з рослин ячменю згідно з винаходом.

На Фіг.1 поданий графік, що зображує вплив інгібітору нордигідрогваяретової кислоти (NDGA) на активність очищеної методом імуноафінної хроматографії ліпоксигенази-1 і 2 зародків на 3 день після того, як ячмінне зерно дало паростки.

На Фіг.2 поданий графік зміни маси сирої тканини зерна лінії G і cv Вінтаж (Vintage), що розвивається від 5 днів після цвітіння до повної зрілості (FM). Кожне значення являє собою середню вагу одного зерна з 6 колосків.

На Фіг.3 поданий графік зміни сухої ваги зерна лінії G і cv Вінтаж, що розвивається від 5 днів після цвітіння до повної зрілості (FM). Кожне значення являє собою середню вагу одного зерна з 3 зразків із 5 колосків.

На Фіг.4 поданий графік зміни загальної ліпоксигеназної активності зерна лінії G і cv Вінтаж, що розвиваються від 5 днів після цвітіння до повної зрілості (FM).

На Фіг.5 поданий графік утворення продуктів 9- і 13-HPOD окислювання лінолевої кислоти, обумовленого ліпоксигеназною активністю в зернах лінії G, що розвиваються.

На Фіг.6 поданий графік зміни загальної ліпоксигеназної активності зародка зерна лінії G і cv Вінтаж, що проростає, вираженої в мкмоль/хв./10 зародків (U/10 зародків).

На Фіг.7 поданий графік утворення продуктів 9-HPOD і 13-HPOD окислювання лінолевої кислоти, обумовленого ліпоксигеназною активністю, в зернах лінії G і cv Вінтаж, що проростають; показані рівні 9-HPOD і 13-HPOD.

На Фіг.8 наведені результати імунологічного аналізу за методом вестерн-блотінгу ліпоксигенази-1 у зародку зерна лінії G і cv Вінтаж, що розвивається від 5 днів після цвітіння до повної зрілості (FM).

На Фіг.9 наведені результати імунологічного аналізу за методом вестерн-блотінгу ліпоксигенази-1 у зародку зерна лінії G і cv Вінтаж [дикого типу] у період проростання від дня 0 до дня 6.

На Фіг.10 поданий нозерн-блотінг, одержаний при використанні 3'-нетранскрибованої ділянки кДНК *lox-1* як зонда; тут можна бачити транскрипти ліпоксигенази-1, що виявляються в зерні лінії G і cv Вінтаж [дикого типу], що розвивається від 5 днів після цвітіння до повної зрілості (FM).

На Фіг.11 поданий нозерн-блотінг, одержаний при використанні 3'-нетранскрибованої ділянки кДНК *lox-1* як зонда; тут можна бачити транскрипти ліпоксигенази-1, що виявляються в зародках зерна лінії G і cv Вінтаж [дикого типу] у період проростання від дня 0 до дня 6.

На Фіг.12A-12G представлено порівняння первинної структури нуклеотидної послідовності промотора і транскрибованої ділянки *lox-1* алеля дикого типу cv Вінтаж (WT) і алеля лінії G (LG) *lox-1*. Підкреслено сайт

початку транскрипції (+1), стартовий ATG-кодон (+69) і стоп-кодон трансляції (+4231) послідовності гена. Нуклеотидні мутації, що ідентифікуються в алелі лінії G, показані жирним курсивом і позначені зірочкою.

На Фіг.13 представлено схематичне зображення гена *lox-1* cv Вінтаж (дикого типу) і мутантного гена *lox-1* лінії G. Транскрипт від +1 до +4375 складається з 7 екзонів (заштриховані крапковим пунктиром) і 6 інтронів (не заштриховані). Позначено дві мутації в гені *lox-1*.

На Фіг.14 подано схематичне зображення генних касет тимчасової експресії кДНК *lox-1* дикого типу, гена *lox-1* і мутантного гена *lox-1* лінії G. Кодувальні послідовності ліпоксигенази були клоновані між конститутивним промотором убіхітину кукурудзи з інтроном 1 (*Ubj-1*) і термінатором *nos*.

На Фіг.15 зображена гістограма активності ліпоксигенази-1 у протопластах алейронів ячменю, що трансфікуються генними касетами, які містять кДНК *lox-1* дикого типу, мутантний ген *lox-1* лінії G, ген WT *lox-1*, ген-репортер контрольного GUS. Ліпоксигеназну активність в екстрактах трансфікованих протопластів аналізують у титраційних мікропланшетах окислюванням KI і кількісною спектрофотометрією. Ліпоксигеназну-1 активність виражають в одиницях (units) на мкг білка в екстракті і представляють як середнє значення трьох двократно виконаних вимірювань.

На Фіг.16 подані результати порівняльного аналізу первинної структури, які показують, що поліморфізм (довжини) рестрикційних фрагментів (RFLP: restriction fragment length polymorphism) гена *lox-1* дикого типу і мутантного гена *lox-1* викликаний точковою мутацією в положенні 2347 нуклеотиду, що створює додатковий сайт рестрикції AatII.

На Фіг.17 подано схематичне зображення одержаних шляхом полімеразно-ланцюгової реакції (PCR: polymerase chain reaction) фрагментів *lox-1*, ампліфікованих і розщеплених в PCR-CAPS-аналізі за методом ампліфікованого розщеплення поліморфного сайту (CAPS: cleavage amplified polymorphic site). Положення праймерів PCR позначені стрілками, а сайти AatII показані над геном (положення послідовності). Ділянки екзонів і інтронів усередині PCR-продукту виділені, відповідно, крапковим штрихуванням і білими боксами; подані розміри фрагментів розщеплення AatII.

На Фіг.18 показаний електрофоретичний агарозний гель із зображенням PCR фрагментів *lox-1* (652 п.о.), ампліфікованих на першій стадії PCR-CAPS-аналізу геномної ДНК лінії G і cv Вінтаж.

На Фіг.19 подано зображення електрофоретичного агарозного геля, де можна спостерігати RFLP-поліморфізм, що виявляється за допомогою PCR-CAPS-аналізу у гені дикого типу і мутантному гені *lox-1*. Фрагменти розщеплення AatII мутантного гена включають унікальний фрагмент рестрикції 313п.о., позначений зірочкою.

На Фіг.20 подана таблиця з програмою зворотного схрещування одиночної рецесивної генної пари II (ознака низької ліпоксигеназної активності) лінії G у cv Alexis. До генотипу LL належать рослини, що експресують ліпоксигеназну активність дикого типу (домінантний алель), а до генотипу ll належать рослини, що експресують низьку ліпоксигеназну активність (рецесивний алель). Ll являють собою гетерозиготні рослини, що містять як алель дикого типу, так і алель із низькою ліпоксигеназною активністю. Оскільки низька ліпоксигеназна активність є рецесивною рисою, рослини Ll виказують ліпоксигеназну активність дикого типу. Очікується, що після кожного циклу зворотного схрещування (включаючи самозапилення) ll-потомство складає 25% від усього потомства. Зазначено частоту низької ліпоксигеназної активності, що зустрічається. Обчислено відсотковий уміст генетичного середовища cv Alexis, що має алель із гомозиготною низькою ліпоксигеназною активністю, позначений як % Alexis.

На Фіг.21 подано зображення електрофоретичного агарозного геля з виявленням на ньому за допомогою PCR-CAPS-аналізу мутантним геном *lox-1* у потомстві ll програми зворотного схрещування Лінія G - Alexis. PCR-CAPS-аналіз на геномній ДНК лінії G (доріжка 2), cv Вінтаж (доріжка 3), ll-потомство 3-го (доріжка 4) і 4-го (доріжки 5-9) зворотного схрещування. Ієрархічні сходи ДНК (доріжка 1). Контроль - лінія зворотного схрещування з високою *lox*-активністю (доріжка 10).

На Фіг.22A-22B поданий порівняльний аналіз первинної структури амінокислотних послідовностей ліпоксигеназ LOX-1 (Gm1), LOX-2 (Gm2), LOX-3 (Gm3) сої і ліпоксигеназ LOX-1 (Hv1) і LOX-2 (Hv2) ячменю.

Предметом винаходу охоплюються рослинні матеріали, рослинні продукти і способи вироблення напою, такого як пиво, зі зниженим умістом траяс-2-ноненалю - сполуки, яка надає неприємного присмаку, що дозволяє підвищити у порівнянні з контрольним напоєм стабільність смаку напою, наприклад, пива, під час його звичайного зберігання і зберігання в умовах підвищених температур. Більш конкретно, даним винаходом пропонуються сорти ячменю, зерна яких, що розвиваються і проростають, продукують різко знижені рівні активності ферменту ліпоксигенази, позначеного як LOX-1, а при використанні в процесі пивоваріння дозволяють одержувати пиво зі зниженими рівнями транс-2-ноненалю порівняно з контрольним сортом ячменю.

Нижче описані способи, застосовувані для одержання, характеристики та оцінки сорту ячменю, що має значно знижену LOX-1 активність, і застосування цього виду ячменю у виробництві пива зі стійким смаком.

#### 1. Визначення

Нижче дано роз'яснення термінів, уживаних в даному описі.

Термін "частина (фрагмент) рослини" означає рослину або специфічну частину рослини, таку як стебло, листя, корені, квіти, насіння, зерна, плоди або бруньки.

Скорочення "LOX-1" позначає білок ліпоксигенази-1; "lox-1" позначає ген, що кодує LOX-1.

Термін "мутантний lox-1 ячменю" означає мутагенізований ген ячменю, що кодує мутантний поліпептид ліпоксигенази-1.

Термін "немутований контроль" означає рослину, нуклеїнову кислоту, ген, поліпептид, частину рослини або рослинний продукт, що містить ген або білок дикого типу.

Визначення "гетерологічний" означає ненативну послідовність, наприклад, послідовність з інших видів, або послідовність, отриману методом рекомбінантних ДНК, або синтетичну послідовність, що відрізняється від нативної послідовності.

Термін "рослинний продукт" означає продукт, що утворюється в результаті процесінгу рослини або частини рослини, і включає, наприклад, солод і сусло.

Термін "кисла амінокислота" означає аспарагінову або глутамінову кислоту.

Термін "основна амінокислота" означає гістидин, лізин або аргінін.

Термін "полярна амінокислота" означає треонін, серин, тирозин, триптофан, аспарагін або глутамін.

Термін "органолептичні властивості" означає нюхові або смакові властивості, що аналізуються, наприклад, дегустаційною комісією при перевірці смакових якостей продукту.

Термін "зварений продукт" означає продукт, приготований шляхом заварювання (солоду) окропом, кип'ятіння і ферментації, наприклад, пиво.

Вираз "знижений уміст транс-2-ноненалу" означає кількість його менше, ніж приблизно 50%, порівняно з умовами дикого типу (контроль).

## 2. Ліпоксигеназна активність

Ферменти ліпоксигеназного типу каталізують окислювання поліненасичених жирних кислот. У ячмені відомі ізоферменти LOX-1 і LOX-2. Ізофермент LOX-1, головним чином, каталізує 9-гідроксиперокислення, тоді як LOX-2, насамперед, каталізує 13-гідроксиперокислення поліненасичених октадеканових жирних кислот. Дані, наведені в нижчеописаних Прикладах, демонструють кореляцію 9-гідроксиперокислювальної активності LOX-1 ячменю з присутністю транс-2-ноненалу в пиві. Отже, ячмінь зі зниженою активністю LOX-1 застосовується у виробництві пива зі зниженим рівнем і/або потенціалом транс-2-ноненалу у порівнянні з контрольним зразком.

## 3. Одержання ячменю з низькою ліпоксигеназною активністю

Для одержання рослин згідно з винаходом, тобто, для зменшення рівня ліпоксигеназної-1 ферментативної активності, що стійко і зі спадкуванням цієї ознаки експресує у ячмені, можна використовувати декілька відомих генетичних підходів. Ці підходи або способи включають до свого числа, але не обмежуючись лише ними, технологію протизмістових послідовностей і мутагенез, наприклад, хімічний мутагенез і радіаційний мутагенез, а також сайт-спрямований мутагенез.

Трансформування ячменю. Ячмінь можна трансформувати за допомогою різноманітних нуклеотидних молекул, створених таким чином, щоб керувати експресією гена *lox-1* або змінювати його структуру. Для успішного введення нуклеїнових кислот у клітину ячменю, наприклад, у протопласт, каліус або в зародок, можна застосовувати різноманітні методи, наприклад, перенос, опосередковуваний *Agrobacterium tumefaciens* [Tingay et al., 1997, Plant J., 11: 1369-1376], бомбардування частками [Wan and Lemaux, 1994, Plant Physiol., 104: 37-48], або вбудовування ДНК, опосередковане поліетиленгліколем (ПЕГ) [Funatsuki and Kihara, 1995, Theor. Appl. Genet., 91: 707-712].

Для того, щоб стимулювати експресію потрібного нам гена, можна використовувати різноманітні промотори. Для експресії векторів, що містять *lox-1* і протизмістові послідовності, можна використовувати нативну промоторну ділянку *lox-1*. Промоторна послідовність *lox-1* міститься в нуклеотидах 2602 - 3511, що включають 5' UTR EMBL, номер доступу U83904. Альтернативно, можна використовувати промотори, що стимулюють експресію потрібного гена конститутивно, наприклад, промотор *Ubi. 1* убіхитину кукурудзи [Wan and Lemaux, див. вище; Kjaerulf et al., in P. Mathis, Ed., 1995, Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. II, 151-154]. Вектори експресії також можуть містити ділянку завершення транскрипції, наприклад, 3'-термінатор транскрипції гена нопалінсинтази (3'-nos) [Bevan, et al., 1983, Nucl. Acids Res., 11: 369-385] був злитий із генами, що експресують у трансгенному ячмені [Wan and Lemaux, див. вище; Funatsuki and Kihara, див. вище].

Вектори експресії можуть також містити ген, що уможливорює вибір трансформованих клітин, коли вектор успішно інтегрований у клітину. Ці гени можуть кодувати гени стійкості до антибіотиків або гербіцидів, наприклад, ген неоміцинфосфотрансферази (*npt*) або фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*). Будучи експресовані, такі гени стійкості уможливають ріст трансформованої клітини в середовищах, що містять неоміцин або біалафос, відповідно, наприклад, [Wan and Lemaux, див. вище; Funatsuki and Kihara, див. вище; Kjaerulf et al., in P. Mathis, див. вище].

Після трансформування клітини можна вирощувати у селективних середовищах протягом певного періоду часу, а потім культивувати, допускаючи утворення коренів, далі кореневих систем і далі паростків. Успішна методика трансформування культури ячменю розроблена Funatsuki and Kihara, (див. вище). Ця методика трансформування протопластів ячменя при використанні ПЕГ із векторами експресії, що містять неоміцинтрансферазу, і наступний добір у неоміцині дали змогу отримати родючі рослини, що містять трансген. Показано, що трансген вбудовується в геном, і більшість трансгенних рослин експресує білок, що кодується трансгеном. Ці трансгенні рослини також спроможні переносити і експресувати трансген після однократних схрещувань.

Зрозуміло, що для трансформування ячменю можуть застосовуватися численні відомі методи трансформування, вектори експресії, промотори, селективні маркери, і т.д.

Мутагенез ячменю. Ген *lox-1* може бути націлений (може бути мішенню) для сайт-специфічного мутагенезу із застосуванням химерних РНК/ДНК олігонуклеотидів. Показано, що ці химерні РНК/ДНК олігонуклеотиди успішно вводять мутації в рослинні клітини [Zhu et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8768-8773; and Beetham et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8774-8778] і клітини ссавців [Yoon et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:2071-2076] у потрібних положеннях. Химерні РНК/ДНК олігонуклеотиди можуть бути трансформовані в потрібні протопласти або в клітини ячменю за допомогою різноманітних методів, наприклад, описаних вище методів трансформування при використанні ПЕГ або бомбардування частками. Окремі протопласти або клітини можна потім регенерувати за допомогою тканинних культур у цілі родючі рослини, а подія мутації може бути підтверджена і продовжена, наприклад, за допомогою методу на базі PCR-реакції, як докладно описано нижче, у Прикладах.

Вищезазначений метод сайт-спрямованого мутагенезу можна застосувати для мутування специфічних залишків в гені *lox-1*. Ген *lox-1* може бути мутований в одному або більше положеннях нуклеотиду на ділянці промотора, щоб негативно модулювати або заборонити транскрипцію *lox-1*. Специфічний мутагенез можна також застосовувати для введення заміни у кодувальну ділянку *lox-1*, яка, наприклад, знижує активність ферменту. До таких мутацій належать, не обмежуючись лише ними, інсерції, делеції і заміни, що приводять до зсуву рамки зчитування, зрізання білка LOX-1 і/або до зміни нейтральної чи гідрофобної природи порожнини основи ферменту.

Протизмістова експресія. Зниження рівня експресії *lox-1* можна також здійснювати, використовуючи експресію протизмістової конструкції *lox-1* у клітинах ячменю. Повідомлялося про методи експресії



Клітини ячменю можна трансформувати при використанні конструкції експреси, що містить протизмістову нуклеотидну послідовність. Конструкція експресії продукує протизмістову молекулу РНК, спроможну специфічно зв'язуватися, щонайменше, з частиною мРНК, що продукується за допомогою гена *lox-1* дикого типу, через комплементарне спарювання основ, і спроможну розривати сплайсинг пре-мРНК або трансляцію цієї мРНК. Конститутивний або тканинний, тимчасовий специфічний промотор, наприклад, описаний вище *lox-1* промотор ячменю, може "запускати" експресію протизмістової нуклеотидної послідовності.

Як показано в нижченаведених Прикладах, зерна культурних сортів (cultivars, (cv)) ячменю Вінтаж і Карузо (Caruso) піддають обробці азидом натрію і розмножують самозапиленням аж до 3-го покоління (M3).

Ідентифікацію і селекцію рослин ячменю зі зниженою ізоферментативною ліпоксигеназною активністю в зернах можна здійснювати, наприклад, шляхом аналізу ліпоксигеназної активності. Ферментативні аналізи можна застосовувати для визначення активності двох основних ліпоксигеназ LOX-1 і LOX-2, наявних, як відомо, в спілому зерні або в зерні, що проростає. Такі аналізи повинні відрізняти активність LOX-1 від активності LOX-2.

Селекційний аналіз можна також здійснювати, використовуючи імунопреципітацію для селективного видалення LOX-1 або LOX-2 з аналітичної суміші. Специфічні, наприклад, моноклональні антитіла проти LOX-1 або проти LOX-2 можна одержувати з очищених LOX-1 або LOX-2, як описано в [Holtman et al., 1996, див. вище].

Втрату LOX-1 активності в уявних мутантах можна підтвердити аналізом ферментативної активності. Наприклад, можна інкубувати зернові екстракти з лінолевою кислотою, а продукти окислювання лінолевої кислоти аналізувати, наприклад, за допомогою зворотної-фазової рідинної хроматографії HPLC. Таким чином, відносні кількості 9-HPOD і 13-HPOD, що утворюються з лінолевої кислоти, як раз і будуть являти собою міру активності LOX-1, основним продуктом якої є 9-HPOD.

Насіння, отримане від ячменю Лінії G, було депоноване 4 січня 2001 року в Національній колекції промислових, харчових і морських бактерій (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB243RY, Scotland, UK, під номером NCIMB 41078 за умовами Будапештської угоди.

Точний опис генотипної зміни, що пояснює фенотип із низькою ліпоксигеназною активністю у рослин ячменю згідно з винаходом, може використовуватися для ідентифікації рослин, що мають цю генетичну зміну, і для введення шляхом схрещування цієї генетичної ознаки в інші культурні сорти ячменю відповідно до програми поліпшення сорту. Для визначення генетичних основ фенотипу з низькою ліпоксигеназною активністю можна використовувати цілу низку відомих молекулярних і біохімічних методів.

Зміни в послідовності гена рослини можна визначати шляхом ДНК-секвенування відомих відповідних частин геному, тоді як метод нозерн-блотінгу дає інструмент, що дозволяє контролювати стійкі рівні транскрипту в даній тканині рослини. Фермент, що експресує в тканині рослини, можна оцінювати, видобуваючи фермент із тканини і вимірюючи його ферментативну активність.

Порівняння нуклеотидних послідовностей гена *lox-1* Лінії G і дикого типу *sv* Вінтаж дозволяє виявити 2 нуклеотидні заміни в 2 екзонах, із яких один (у положенні + 2347) веде до неконсервативної заміни

амінокислот (Гліцин<sup>368</sup>→Аспартат) у білку, що експресує.

На Фіг.22 показано порівняння первинних структур ліпоксигеназ LOX1 (номер доступу P08170), LOX2 (номер доступу P08170), LOX3 (номер доступу AAB41272) сої (Gm: Glycine max L) і ліпоксигеназ LOX1 (номер доступу P29114) і LOX2 (номер доступу AAB70865.1) ячменю (hv: Hordeum vulgare). Збережені амінокислотні залишки і консервативні заміни заряджених залишків показані жирним шрифтом. Тут призначення вторинної структури для LOX3 Glycine max сої, де Н=альфа-спіралі, а Е=бета-нитки, показані над порівнюваними структурами, а залишки, що відповідають ферментативній функції (позначені зірочкою або темним колом), показані так, як описано в [Skrzypczak-Jankun et. al., 1997, Proteins 29:15-31].

До амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні не-гем заліза або мають істотне значення для каталізу(\*) у LOX3 сої, належать: Н<sub>518</sub>, Н<sub>523</sub>, Н<sub>709</sub>, [3 атома N]; Н<sub>713</sub>, І<sub>857</sub>. Еквівалентними залишками в LOX1 ячменю є Н<sub>517</sub>, Н<sub>522</sub>, Н<sub>708</sub>, Н<sub>712</sub> і І<sub>862</sub>. Залишками в LOX3 сої з прогнозованою роллю в каталізі (•) є такі: Н<sub>266</sub>, Н<sub>513</sub>, Н<sub>776</sub>, F<sub>264</sub>, F<sub>272</sub>, F<sub>714</sub>, W<sub>519</sub>, R<sub>552</sub>, R<sub>726</sub>, D<sub>766</sub>, D<sub>779</sub>, K<sub>278</sub>. Еквівалентними залишками в LOX1 ячменю є такі: Н<sub>261</sub>, Н<sub>512</sub>, Н<sub>775</sub>, F<sub>259</sub>, F<sub>267</sub>, F<sub>713</sub>, W<sub>518</sub>, R<sub>551</sub>, R<sub>725</sub>, D<sub>778</sub> і K<sub>273</sub>.

Залишки (+) проліну (P<sub>86</sub>, 109, 167, 171, 223, 234, 291, 311, 324, 343, 345, 371, 381, 382, 486, 541, 548, 600, 616, 627, 685, 726, 734, 788, 829, 833, 839, 857) і гліцину (G<sub>49</sub>, 67, 68, 70, 91, 107, 137, 187, 192, 210, 217, 218, 260, 306, 307, 336, 392, 409, 458, 474, 490, 569, 607, 674, 676, 720, 736, 783, 828, 850, 855), локалізовані в положеннях у петлях і у вигляді спіралі-"ковпачка" (кепінг) у вторинних структурах білків, можуть полегшити різкі витки і скручування пептидного остова.

Порівняння первинних структур ліпоксигеназ споріднених рослин показує, що гліцин-368 у LOX-1 ячменю є строго консервативним. Крім того, цей залишок, що відповідає гліцину-353 у LOX-1 сої, є одним із 35 висококонсервативних залишків із загального числа 58 залишків, котрі "покривають" порожнину II основи ферменту, як це з очевидністю впливає з його кристалічної структури. Дані консервативні залишки є чітко видними (бокси) при порівнянні первинних структур послідовностей ліпоксигеназ на Фіг.22 [Minor et. al., 1996, Biochemistry, 35: 10678-10701] і включають до свого числа такі залишки LOX-1 ячменю: Y<sub>224</sub>, L<sub>268</sub>, W<sub>355</sub>, E<sub>364</sub>, G<sub>368</sub>, V<sub>369</sub>, N<sub>370</sub>, I<sub>374</sub>, L<sub>424</sub>, L<sub>499</sub>, K<sub>501</sub>, A<sub>502</sub>, V<sub>504</sub>, D<sub>508</sub>, S<sub>509</sub>, H<sub>512</sub>, Q<sub>513</sub>, L<sub>514</sub>, H<sub>517</sub>, W<sub>518</sub>, H<sub>522</sub>, I<sub>556</sub>, L<sub>559</sub>, A<sub>560</sub>, L<sub>564</sub>, I<sub>565</sub>, I<sub>570</sub>, T<sub>574</sub>, S<sub>585</sub>, Q<sub>715</sub>, Y<sub>718</sub>, N<sub>724</sub>, R<sub>725</sub>, P<sub>726</sub>, T<sub>727</sub>, L<sub>772</sub> і І<sub>862</sub>. Усі, крім 7 із 35 консервативних залишків, є нейтральними або гідрофобними залишками. Заміна зарядженого залишку в положенні гліцин-368 у ячмені або в положенні іншого консервативного нейтрального або гідрофобного залишку, що вистилає порожнину II основи, очевидно, порушує структурні і функціональні властивості ферменту. Мутація G→D<sub>368</sub> у LOX1 Лінія G ячменю (•) розташована між альфа-спіраллю Н6 і бета-ниткою Е12.

Як показано на Фіг.22, ферменти сімейства ліпоксигеназ мають загальний високий ступінь консервативності послідовностей, що відбивається в їхній консервативній вторинній структурі, визначеній для декількох членів сімейства рослинних ліпоксигеназ, включаючи LOX1 і LOX3 сої [Skrzypczak-Jankun et. al., 1997, див. вище]. Послідовність LOX1 ячменю на 56,9% ідентична і на 67,8% подібна послідовності LOX3 сої. Декілька амінокислотних залишків в ізозими LOX3 сої ідентифіковані як ліганди для не-гем заліза або передбачається, що вони є істотними для його активності (позначено: \* •). У зв'язку з високою консервативністю послідовностей LOX1 ячменю і LOX3 сої можна прогнозувати, що залишки в послідовності LOX1 ячменю, гомологічні залишкам, що ідентифікуються як важливі для функції LOX3, можуть також бути істотними для ферментативної активності. Тобто, неконсервативні амінокислотні заміни у будь-якому з цих положень, включаючи заміни тих залишків у LOX1 ячменю, що відповідають 35 висококонсервативним залишкам LOX3 сої, котрі вкривають порожнину основи, і в інших положеннях, істотних для активності ферменту, очевидно, передбачаються для зменшення ліпоксигеназної активності.

Відомо, що амінокислотні залишки проліну і гліцину полегшують витки в пептидному остові, коли вони локалізовані між вторинними структурними елементами, що дозволяє білку набувати складеної третинної структури. Залишки проліну і гліцину також є звичайними в мотивах спіраль - кепінг ["ковпачок", Parker and Hefford, 1997, Protein Eng., 10: 487-496, <http://www.exPASy.ch>]. Одиночна неконсервативна заміна в LOX1 Лінії G, коли гліцин, локалізований між двома передбаченими структурними елементами, замінюють на аспартат, призводить до значної втрати ферментативної активності. Передбачається, що мутація в гені lox-1, що викликає неконсервативні амінокислотні заміни одного або більше залишків проліну або гліцину в LOX1 ячменю, локалізованих на ділянках поза структурними елементами, може аналогічним чином запобігати складанню нативного білка і, отже, знижувати активність ферменту, що кодується.

Таким чином, в одному з варіантів здійснення винаходу корисна мутантна рослина ячменю згідно з винаходом, що має знижену ліпоксигеназну-1 активність, містить мутовану нуклеотидну послідовність, що змінює нейтральну або гідрофобну природу порожнини основи ферменту шляхом інсерції однієї або більше кислот, основних або полярних амінокислот. Наприклад, корисна нуклеотидна послідовність [SEQ ID NO:11] кодує білок LOX-1 ячменю [SEQ ID NO:12], що містить заміну амінокислоти 368 - гліцину на Хаа, де Хаа являє собою кислоту, основну або полярну амінокислоту. Однією з конкретних амінокислотних послідовностей мутантного LOX-1 ячменю згідно з винаходом є така, у котрій Хаа позначає аспарагінову кислоту, наприклад, Лінія G.

Як показано в Прикладах, генотипні зміни в Лінії G не чинять помітного впливу на експресію гена lox-1, але активність LOX-1, що спостерігається в спілих зернах і зернах, що проростають, Лінії G, складає, приблизно, 9% активності, що спостерігається в зернах батьківської лінії cv Вінтаж. Щоб одержати безпосередній доказ того, що мутація амінокислоти в LOX-1 Лінії G є відповідальною за фенотип із низькою активністю LOX-1, кодувальну послідовність lox-1 Лінії G і кодувальну послідовність lox-1 cv Вінтаж транзиторно експресували у протопластах алейрону ячменю. При цьому було показано, що активність мутантного ферменту LOX-1 є значно зниженою порівняно з ферментом LOX-1 дикого типу.

#### 6. Перенесення між генеалогічними лініями

Виявлення змін генетичної ознаки в рослинах ячменю генотипу згідно з винаходом може застосовуватися для визначення наявності специфічної генетичної ознаки в лінії ячменю і для того, щоб полегшити перенесенню цієї ознаки між генеалогічними лініями в програмі виведення сортів. Для виявлення змін у геномній послідовності може застосовуватися низка молекулярних інструментів. До числа таких інструментів належать, але без обмеження, методи виявлення поліморфізму довжини фрагментів рестрикції [Gebhardt and Salamini 1992, Int. Rev. Cytology., 135: 201-237] і методи виявлення на основі

кількісної PCR, такі як ампліфікація з застосуванням флуоресцентних праймерів, наприклад, праймерних зондів TaqMan [Ibrahim et al., 1998, Anal. Chem. 70, 2013-2017]. Вибір методу виявлення залежить від специфічної генетичної ознаки, але вибраний метод повинний бути швидким і давати недвозначні результати.

Як показано в нижченаведених Прикладах, для виявлення мутантного гена ліпоксигенази-1 Лінії G запропоновано аналіз за методом поліморфного сайту, ампліфікованого PCR-розщепленням (PCR-CAPS). Нуклеотидна заміна в гені *lox-1* Лінії G в положенні +2347 уводить додатковий сайт розпізнавання рестриктазою AatII, що можна виявляти методом PCR-CAPS. Окрім цього, для виявлення *lox-1* можуть застосовуватися методи, що ґрунтуються на використанні зондів TaqMan, та ін.

Як показано також в нижченаведених Прикладах, PCR-CAPS-аналіз застосовується до 4 поколінь генеалогічного матеріалу з програми зворотного схрещування, де фенотип із низькою ліпоксигеназною активністю у Лінії G систематично піддавався зворотному схрещуванню із *cv* Alexis. Показано, що спадкування фенотипу з низькою ліпоксигеназною активністю йде за спадкуванням гена *lox-1*, а фенотип цей був визначений як рецесивний і спостерігався тільки в лініях, гомозиготних для гена *lox-1*.

Таким чином, рослинне потомство згідно з винаходом включає у себе лінії схрещування, наприклад, одержувані в програмі зворотного схрещування, що містять мутантний *lox-1* і експресують фенотип із низькою ліпоксигеназною активністю.

#### 7. Пивоваріння

Подані в даному описі рослини ячменю згідно з винаходом, включаючи частини рослин, потомство рослин, зерна і рослинні продукти, такі як солод і сусло, із низькою ліпоксигеназною-1 активністю, можуть застосовуватись у виробництві напою зі зниженими рівнями вільного транс-2-ноненалу протягом певного періоду часу або при зберіганні в умовах підвищених температур, у порівнянні з напоєм, виробленим із контрольного сорту ячменю дикого типу. З метою такого порівняння вміст сульфіту в пиві контролюють на рівні не вище  $5 \times 10^{-6}$  частин, оскільки загальновізнано, що більш високі рівні сульфіту в момент розливання у пляшки затримують на деякий час появу вільного транс-2-ноненалу. Наприклад, пиво, зварене із солоду, виробленого з мутованого ячменю Лінії G згідно з даним описом, має стабілізовані органолептичні властивості протягом певного періоду часу порівняно з пивом, звареним із солоду, виробленого з контрольного немутованого ячменю.

Проби звареного пива і оцінка розлитого по пляшках є кращим способом оцінки впливу різноманітних інгредієнтів на якість і стабільність готового пива. Для того, щоб перевірити вплив різноманітних ячмінних солодів, потрібна достатня кількість ячмінного зерна, щоб від дослідницьких робіт із солодження і варки пива перейти до пілотного і напівпромислового виробництва. Під час розмноження ячменю можна оцінювати продуктивність ячмінної лінії. Якість солодження ячмінної лінії можна оцінювати під час солодження в масштабах дослідного виробництва або в промислових масштабах, причому вони не повинні виходити за рекомендовані в країні межі якості солодження, наприклад, відповідно до рекомендацій Європейської Конвенції Пивоварів щодо якості солодження (Analytica-EBC/European Brewing Convention, 1998, Publ. Hans Carl Getranke - Fachverlag, Nurnberg, Germany). Після приготування пива в масштабах дослідного або напівпромислового виробництва пиво розливають у коричневі пляшки й охолоджують до 5°C для забезпечення оптимальних умов зберігання. На цій стадії свіже пиво може бути подане для аналізу на дегустаційних панелях досвідченими дегустаторами, спроможними виявити специфічний смак і запах пива, включаючи транс-2-ноненаль, сполуку з неприємним присмаком. Крім того, пиво аналізують хімічними методами на основні смакові компоненти, включаючи транс-2-ноненаль. Після цього такому самому аналізу якості пиво піддають після зберігання його в різноманітних умовах, що, як відомо, дозволяє виявити стабільність пива при тривалому зберіганні, наприклад, у режимі примусового старіння.

Як показано в подальших Прикладах, ячмінь Лінії G вирощували у польових умовах протягом декількох сезонів, для того, щоб одержати 10 тонн солоду цієї лінії в промисловій солодівні. Контрольні сорти ячменю *cv* Вінтаж і *cv* Невада, обидва фенотипу LOX-1 дикого типу, солодили в аналогічних умовах. Висушений солод Лінії G і контрольних культурних сортів ячменю відповідав технічним умовам, запропонованим для напівпромислових випробувань з пивоваріння.

Дослідне готування пива здійснювали у масштабі 30 гектолітрів, і оцінка пива, тільки що розлитого по пляшках, показала, що пиво, зварене із солоду як Лінії G, так і контрольних культурних сортів, містило транс-2-ноненаль у кількостях нижче смакового порогу і було визнане задовільним при дегустації смакових якостей. Для оцінки стабільності смакових якостей пива було застосовано два режими примусового старіння: зберігання при 37°C протягом 7 днів або зберігання при 30°C від 6 до 12 тижнів. Визначено, що стабільність смакових якостей пива, звареного із солоду Лінії G, є вищою за стабільність смакових якостей контрольного солоду як з боку оцінки смакових якостей, так і з боку рівня вільного транс-2-ноненалу, а досягнуте поліпшення є статистично значущим.

#### Приклади

Даний винахід далі пояснюється на прикладах його практичного здійснення. Слідую розуміти, що наведені Приклади, які описують лише кращі варіанти здійснення винаходу, подані виключно ілюстративно.

#### Приклад 1

Скринінг і добір мутантів ізоферменту ліпоксигенази з мутагенізованого ячменю

##### 1. Мутагенез ячменю

Зерна ячменю, *Hordeum vulgare cv* Вінтаж і *cv* Карузо, піддали мутагенезу під дією азиду натрію згідно з методикою, описаною в [Kleinhofs et al., 1978 Mutation Research 51: 29-35]. Мутагенез уводить точкові мутації в геномну ДНК, що, наприклад, може викликати амінокислотні заміни в кодованих білках. Мутовані зерна M1 розмножували у теплиці протягом двох поколінь, і для скринінгу добирали зерна M3. Частота зустрічі окремих генних мутантів із характерними ознаками в поколінні M2 згідно з Kleinhofs et al., 1978, див. вище, складала 1,0-2,7 мутантів на 10000 зерен із покоління M2. Оскільки більшість генних мутацій були рецесивними і виявлялися тільки в гомозиготному стані, скринінг мутагенізованої популяції проводили у поколінні M3, де очікувана частина гомозиготних мутантних зерен була вищою. У мутагенізованому матеріалі M3 очікується частота мутацій 0,9-2,3 на 10000 зерен.

##### 2. Недеструктивний аналіз ліпоксигеназної-1 (LOX-1) і ліпоксигеназної-2 (LOX-2) активності в

мутагенізованих зернах М3

Була розроблена методика швидкого скринінгу з метою виявлення мутантних зерен ячменю зі зниженим LOX-1 на основі таких критеріїв: дана методика скринінгу не повинна перешкоджати розмноженню зерен/розсади; рівні експресії ліпоксигеназної активності добраної тканини зерна/паростка повинні піддаватися кількісному визначенню; метод аналізу повинен відрізнити активність LOX-1 від активності LOX-2; методика аналізу повинна охоплювати безліч зразків.

Рівні загальної ліпоксигеназної активності в різноманітних тканинах зерна, що проростає, а саме у паростку, корені й у тканині скутелуму зародка, а також в ендоспермі, аналізували у такий спосіб. Екстракти тканини паростка готували, піддаючи тканини гомогенізації в охолоджену на льоду 20мМ Tris-HCl, pH 7,5, що містив 2мМ NaN<sub>3</sub> і 0,5мМ фенілметилсульфонілфториду (PMSF), із наступним видаленням нерозчинного матеріалу шляхом центрифугування з навантаженням 1000g протягом 10 хвилин. Ліпоксигеназну активність у 100мкл екстракту аналізували при 25°C, додаючи 2,9мл 20мМ основи лінолевої кислоти, одержуваної шляхом диспергування 35мкл лінолевої кислоти (вільна кислота, L-1376, Sigma, USA) у 5мл H<sub>2</sub>O, що містила 1% Tween 20. За реакцією стежили за допомогою спектрофотометра, перевіряючи, чи є пропорційною швидкість збільшення поглинання на 234нм (A<sub>234</sub> нм) внаслідок утворення спряженого дієну в продукт гідроперокислення наявній ферментативній активності. Одиницю ліпоксигеназної активності визначали як  $\Delta A_{234}=0,001$  за хвилину в реакції на 3мл, еквівалентній окислюванню 0,12мкмоль лінолевої кислоти.

Листяна тканина зерна, що проростало протягом 4 днів у темноті, мала найвищі рівні ліпоксигеназної активності [Holtman et al., 1996, Plant Physiology 111: 569-576]. Тому для не-деструктивного аналізу ліпоксигенази вибирали верхівки листя 4-денного паростка. Перевіряли оптимальне значення pH при загальній ліпоксигеназній активності ячменю в межах 4,5-9,0; було визначено, що оптимальним є pH 6,5. У зв'язку з цим для скринінгу був вибраний буфер 0,25мМ HEPES (pH 6,5), що містив 0,2М борної кислоти.

Оскільки обидва ферменти, LOX-1 і LOX-2, виявлялися за допомогою імунологічного аналізу в 4-денних паростках [Holtman et al., 1996, див. вище], застосовували специфічний аналіз LOX-1 і LOX-2. Було знайдено, що інгібітор ліпоксигенази, нордигідрогваяретова кислота (NDGA), ідентифікована в [Eskin et al., 1977, Crit. Rev. Food, Science and Nutrition 9: 1-40], є селективним інгібітором ліпоксигеназ ячменю. NDGA у кількості  $1 \times 10^{-5}$ М сильно інгібувала LOX-2-активність очищеного ячменю, тоді як LOX-1 зберігав 47% своєї активності (Фіг.1). Селективність цього інгібітору перевіряли аналізом верхівок листя, встановлюючи співвідношення 9-гідропероксіоктанойду (9-HPOD) до 13-гідропероксіоктанойду (13-HPOD), що утворюються при окислюванні лінолевої кислоти ферментами LOX-1 і LOX-2, відповідно. В аналізі ліпоксигенази у верхівках листя cv Вінтаж частина, що випадала на утворюваний 13-HPOD, знижувалася від 24,5% до 9,5% при додаванні  $1 \times 10^{-5}$ М NDGA.

Селективний аналіз на LOX-2-активність в екстрактах верхівок листя ґрунтується на застосуванні LOX-1-специфічного моноклонального антитіла (5D2) [Holtman et al., 1996, див. вище] для імунопреципітації LOX-1, наявного в екстрактах. Залишкова ліпоксигеназна активність, що виявляється в екстрактах після осадження LOX-1, є мірою LOX-2-активності. Ефективність цієї імунопреципітації (описаної нижче) оцінювали, визначаючи кількісно залишковий LOX-1 і LOX-2 у супернатанті екстракту методом ELISA із застосуванням специфічних моноклональних антитіл проти LOX-1 (позначено 5D2) і LOX-2 (позначено 5.8) [Holtman et al., 1996, див. вище]. Шляхом імунопреципітації LOX-1 з екстрактів верхівок листя cv Вінтаж видалалося 85% білка (LOX-1) і 15% білка LOX-2.

Імунопреципітацію здійснювали у 96-ямковому планшеті з V-подібними лунками, додаючи 5мкл гранул Dynabeads (Dynal), навантажених 5D2, і 75мкл буферу [20мл Tris-HCl pH 7,5, 1% (об/об) сироватки плоду корови (HyClone)] до 20мкл кожного екстракту верхівок листя. Планшети інкубували у планшетному шейкері (MTS4, IKA, Labor Technik) протягом 1 години при 4°C. Імунопреципітат збирали шляхом центрифугування при 4°C у центрифугі Sigma 302-K протягом 10хв. при 2000об/хв. Супернатант (70мкл) від кожного зразка аналізували на ліпксигеназну активність у 96-ямковому плоскодонному планшеті, як описано нижче, але з додаванням 100мкл буферу для аналізу (25мМ HEPES, 0,2М борної кислоти, pH 6,5).

Аналіз LOX-1 і LOX-2 пристосували до високопродуктивного скринінгу. Кінчики листя (1см) від восьми зерен із 4-денними паростками відокремлено гомогенізували у 150мкл охолодженого на льоду буферу (20мМ Tris-HCl, pH 7,5) протягом 2×30 секунд у багато-ямковому гомогенізаторі [Berg et al., 1992, Electrophoresis 13: 76-81]. Після 15хв. центрифугування зі швидкістю 3000об/хв 40мкл супернатанту кожного екстракту перенесли у плоскодонний 96-ямковий планшет. У кожну ямку додавали 170мкл буферу (25мМ HEPES, 0,2М борної кислоти pH 6,5,  $1 \times 10^{-5}$ М NDGA) і 10мкл основи (20мМ лінолевої кислоти), після чого проводили інкубування протягом 20 хвилин при 25°C. Реакцію припиняли, додаючи 20мкл насиченого розчину йодистого калію (KI), і далі інкубували ще 8 хвилин при 25°C. Окисно-відновна реакція між гідропероксидієнами і KI давала I<sub>2</sub>, що контролювався по максимуму екстинкції на 350нм у зчитувальному мікропланшеті (Multiskan MCC/340).

### 3. Ідентифікація можливих мутантів ліпоксигенази-1 у зернах М3 і М4 мутагенізованого ячменю

Зерна покоління М3 cv Вінтаж і cv Карузо зберігали при температурі 45°C протягом 6,5 днів для переривання стану спокою, що гарантує 95% схожість. Далі зерна М3 cv Вінтаж (9318) і cv Карузо (9633) пророщували і проводили їх скринінг за лініями, LOX-1-активність яких не перевищує 15% активності зерен дикого типу. Уявні мутантні лінії (50 ліній cv Вінтаж і 42 лінії cv Карузо) розмножували до покоління М4, збирали, і проросле зерно знову піддавали скринінгу. Мутантний фенотип LOX-1 підтверджувався в одній лінії cv Вінтаж і в шести лініях cv Карузо після визначення ліпоксигеназної активності в екстрактах 5 верхівок листя із кожної лінії. За результатами вивчення LOX-1- і LOX-2-активності у пророщуваних зародках цих 7 уявних мутантів тільки у мутанта cv Вінтаж (позначеного як Лінія G) спостерігалось основне зменшення LOX-1. У спільних зернах, що перебували в стані спокою, наявна у зародку ліпоксигеназна активність являла собою майже винятково LOX-1-активність внаслідок різноманітного характеру експресії двох ізоферментів [Schmitt and van Mechelen, 1997, Plant Sci. 128: 141-150]. Як показав спектрофотометричний аналіз ліпоксигенази, описаний у розділі 2 Прикладу 1, загальна ліпоксигеназна активність в екстрактах зародків спільних сухих зерен Лінії G (покоління М5) складала  $0,06 \pm 0,04$ У/мг білка.

Для порівняння в екстрактах зародків cv Вінтаж вона становила  $0,074 \pm 0,44 \text{ U/мг}$ . Було знайдено, що залишкова ліпоксигеназна активність у спілому зародку Лінії G як у поколінні 4, так і в поколінні 5 складала, приблизно, 9% від її значення в батьківській лінії.

#### Приклад 2

Лінія G є мутантом cv Вінтаж з фенотипом з низькою ліпоксигеназною активністю

Агрономічні властивості і мутантний фенотип Лінії G аналізували на матеріалі покоління M5. Для підтвердження того, що аналізований M5 матеріал є гомозиготним для мутантного фенотипу, були проведені початкові аналізи. Фенотип із низькою активністю LOX-1 в Лінії G, що виявляється в поколінні M3, міг виникнути в результаті домінантної або рецесивної мутації. Якщо Лінія G, котра вибирається в поколінні M3, є гетерозиготною для домінантної мутації, тоді в наступних поколіннях буде спостерігатися поділ за фенотипом. Була виміряна і порівняна із зародками cv Вінтаж дикого типу ліпоксигеназна активність у 26 окремих зародків зерен Лінії G покоління M5 у стані спокою. Ліпоксигеназна активність у всіх зародків Лінії G була дуже низькою і складала в середньому  $0,06 \pm 0,04 \text{ U}$  ліпоксигенази на мг білка, у порівнянні з  $0,074 \pm 0,44 \text{ U}$  ліпоксигенази на мг білка у зародків cv Вінтаж дикого типу. Ці дані підтверджують, що Лінія G в поколінні M5 є гомозиготною для риси низької ліпоксигеназної активності.

##### 1. Лінія G має фізіологію росту і розвиток зерна рослини дикого типу

Зерно Лінії G і cv Вінтаж пророщували і вирощували у камері штучного клімату в умовах 16-годинного світлового дня при температурі  $15^{\circ}\text{C}$  і 8 годин у темноті при температурі  $12^{\circ}\text{C}$  і відносній вологості 80%. Ознаки росту рослин Лінії G і cv Вінтаж аналогічні в тому, що стосується ваги рослини, числа паростків на рослину, початку цвітіння і числа зерен у колосі. Вага сирої тканини (Фіг.2) і суха вага (Фіг.3) зерна Лінії G і зерна дикого типу cv Вінтаж у період розвитку від 5 днів після цвітіння (DAF: days after flowering) до повної зрілості, приблизно, 90 DAF, дуже схожі.

##### 2. Зерна Лінії G мають фенотип із низькою ліпоксигеназною-1 активністю протягом усього періоду розвитку

Ліпоксигеназну активність визначають в екстрактах ячмінного зерна Лінії G, що розвивається (покоління M5), і дикого типу cv Вінтаж. Зерна гомогенізували в охолоджену на льоду буфері Tris-HCl pH 7,5, що містив 0,1% (об/об) Nonidet P-40, неіонного детергента, який підвищує екстракцію ліпоксигенази, і центрифугували при 15000g протягом 20 хвилин для видалення нерозчинних матеріалів. Ліпоксигеназну активність в екстрактах визначали полярографічним методом у 200мкл насиченого киснем буферу (0,2M борної кислоти, 25mM HEPES, pH 6,5), що містив 1,2mM лінолевої кислоти при  $25^{\circ}\text{C}$ , використовуючи електрод Кларка для вимірювання витрати кисню. Ліпоксигеназна активність підвищувалася протягом перших 20 днів розвитку зерна як Лінії G, так і дикого типу, але тільки в зерні Лінії G рівень активності падав в період дозрівання зерна (Фіг.4).

Відносні кількості 9-HPOD і 13-HPOD, що утворюються при окислюванні лінолевої кислоти, є мірою рівнів активності LOX-1 і LOX-2 у зернових екстрактах. У цьому випадку Nonidet P-40 не добавляли у буфер для екстрагування із зерен, щоб уникнути спільне екстрагування гідропероксид-споживаючих ферментів. Екстракти (100мкл), змішані з 10мл 50mM фосфатного буферу, pH 6,5, що містив 200mM лінолевої кислоти, інкубували протягом 20 хвилин. Реакцію припиняли, доводячи pH до 3,5, і добавляли внутрішній стандарт. Гідропероксида, що утворюється при аналізі, поміщали на колонку з октадецильною твердою фазою (Bakerbond, Baker) і елюювали метанолом. Після цього 9-HPOD і 13-HPOD розділяли за допомогою обернено-фазової ВЕЖХ на колонці C-18 ізократичним елююючим розчинником (тетрагідрофуран:метанол: $\text{H}_2\text{O}$ :оцтова кислота; 25:30:44,9:0,1 (об/об), pH суміші доводили до 5,5 за допомогою концентрованого розчину аміаку) при витраті розчинника 0,5мл/хв, як описано [Aarle et al., 1991, FEBS Letters 280: 159-162]. Гідропероксида виявляли на хвилі 234nm, і піки HPOD коректували відповідно до внутрішнього стандарту простагландином B2.

На Фіг.5 видно, що 13-HPOD був основним продуктом ліпоксигеназної активності, наявної у зерні протягом перших 20 DAF, тоді як 9-HPOD утворювався ліпоксигеназами, активними у період дозрівання зерна. Хоча зернові екстракти як Лінії G, так і дикого типу мали однаковий загальний профіль 13-HPOD синтетичної активності, у зерен Лінії G не спостерігається підвищення 9-HPOD синтетичної активності, що має місце у зерен дикого типу. Ці дані узгоджуються з утратою LOX-1 активності в ячмінних зернах Лінії G, що дозрівають.

##### 3. Зерна Лінії G мають фенотип із низькою ліпоксигеназною-1 активністю при проростанні

Загальну ліпоксигеназну активність в екстрактах зернових зародків, пророщених при  $15^{\circ}\text{C}$ , аналізували так, як описано в Прикладі 1. Ліпоксигеназна активність, наявна у зерні дикого типу, що перебуває в стані спокою, падає в перші 4 дні проростання, а потім збільшується (Фіг. 6). У лінії G ліпоксигеназна активність зерна у стані спокою є дуже низькою, але збільшується через 4 дні.

Аналіз HPOD, що утворюється внаслідок ліпоксигеназної активності в зародках, що проростають, показує, що 9-HPOD є основним продуктом ліпоксигеназ, наявних у зерні дикого типу, що перебуває у стані спокою (Фіг.7). Рівень утворення 9-HPOD падає з падінням ліпоксигеназної активності в екстрактах. Підвищення ліпоксигеназної активності через 4 дні супроводжується утворенням як 9-HPOD, так і 13-HPOD. Низька ліпоксигеназна активність зерна Лінії G у стані спокою пов'язана з відсутністю утворення HPOD, тоді як підвищення активності через 4 дні, головним чином, призводить до утворення 13-HPOD. Ці результати свідчать про те, що активність LOX-1, що призводить до утворення 9-HPOD, значно знижена в зародках ячмінного зерна Лінії G, що розвивається, перебуває в стані спокою і що проростає, тоді як активність LOX-2, що призводить до утворення 13-HPOD, в Лінії G не змінюється.

#### Приклад 3

Лінія G має мутантний ген ліпоксигенази-1 (lox-1), що викликає появу фенотипу з низькою ліпоксигеназною активністю

З метою одержати повний опис мутанта була вивчена молекулярна основа фенотипу з низькою активністю LOX-1 Лінії G. Для повної характеристики фенотипу проводять такі аналізи.

##### 1. Ліпоксигеназа-1 синтезується в зерні, що розвивається і проростає, Лінії G

Вестерн-блотінг екстрактів зародків ячмінних зерен, що розвиваються і проростають, проводили паралельно з визначенням ліпоксигеназної активності, як описано в Прикладі 2. Сирі екстракти розділяли за

допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) за методикою [Laemmli, 1970, Nature 227: 680-685]. Розділені білки перенесли на нітроцелюлозу, використовуючи напівсухий блотінг за методикою [Towbin et al., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354]. Блот гібридували зондом моноклонального антитіла, 5D2, специфічного до LOX-1, як описано в [Holtman et al., 1996, Plant Physiology 111: 569-576], при 500-кратному розбавленні із наступним інкубуванням з антитілом кози проти миші, зв'язаним із лужною фосфатазою, і виявляли за допомогою нітро-блакитного тетразолію і 5-бром-4-хлор-3-індолілфосфату - субстратів лужної фосфатази, як описано в [Holtman et al., 1996, Plant Physiol. 111: 569-576]. Аналіз методом вестерн-блотінгу показав, що білок LOX-1 виявляється в зародках cv Вінтаж зерна, що розвивається, від 10 DAF, і що рівень його підвищується під час дозрівання зерна (Фіг.8). Білок також є наявним у зародку зерна cv Вінтаж, що витримується в стані спокою, але повільно зменшується під час проростання (Фіг.9). Хоча LOX-1 розпізнається в екстрактах зародків Лінії G і мігрує в SDS-PAGE як білок розміру, аналогічного LOX-1 cv Вінтаж, визначені імунним аналізом рівні білка в Лінії G є трохи нижчими, ніж у cv Вінтаж.

## 2. Ген lox-1 експресує в зерні, що розвивається і проростає, Лінії G

Із зародка ячмінного зерна, що розвивається і проростає, за методикою [Hensgens and van Os-Ruygrok, 1989, Rice Genet. Newslett. 6: 163-168] виділяли всю РНК, виконуючи паралельно вимірювання ліпоксигеназної активності, описані у Прикладі 2. Зразки РНК (7,5мг) виділяли на агарозних гелях, що денатурують, і аналізували методом нозерн-блотінгу, як описано в лабораторному підручнику [Sambrook et al., 1989 in Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY]. Блоти гібридували <sup>32</sup>P-міченим зондом, отриманим із 3'-нетрансльованої ділянки ячменю, нуклеотиди 2659-2801 [SEQ ID NO:1], кДНК lox-1 (EMBL NO: L35931), як описано в [Holtman et al., 1996 Plant Physiol 111: 569-576], використовуючи набір випадкових праймерів Amersham Random Prime Kit.

Транскрипти lox-1, що кодуєть LOX-1, виявляли у зародках зрілих зерен cv Вінтаж і Лінії G від 30 DAF і зерен, що розвиваються (Фіг.10). Рівень транскриптів lox-1 підвищувався при проростанні як у зародках cv Вінтаж, так і Лінії G, що демонструє de novo експресію гена lox-1 (Фіг.11). Оскільки виявлені рівні транскриптів lox-1 були аналогічними в зародках Лінії G і cv Вінтаж, то ні знижена транскрипція, ні стійкість транскрипції lox-1 не можуть бути відповідальними за фенотип Лінії G з низькою ліпоксигеназною активністю.

## 3. Ген lox-1 Лінії G кодує мутантну форму ліпоксигенази-1

З метою визначення молекулярної основи фенотипу Лінії G з низьким рівнем LOX-1, що характеризується нормальною транскрипцією гена lox-1, але зниженими акумуляцією й активністю в експресуючому ферменті ліпоксигенази в зерні, були проведені аналіз і порівняння нуклеотидної послідовності гена lox-1 Лінії G і cv Вінтаж.

Геномну ДНК Лінії G і cv Вінтаж дикого типу виділяли із листяної тканини паростка за методом, описаним в [Pich and Schubert 1993, Nucleic Acids Res. 21: 3328]. Ген lox-1 у препаратах геномної ДНК ампліфікували полімеразно-ланцюговою реакцією (PCR), використовуючи праймери, які базувались на послідовності гена lox-1 ячменю [van Mechelen et al. 1995, BBA 1254: 221-225; Rouster et al., 1997, Plant J. 11: 513-523]. Положення і послідовності олігонуклеотидних праймерів, які використовувались для ампліфікації промотора lox-1 і кодування ділянок, зазначених на Фіг.12, є такими:

для PCR-ампліфікації домену промотора lox-1 (від -361 до +68) Лінії G і lox-1 cv Вінтаж застосовували прямий праймер 5'-GAA AAG CTT GGA GGT AGA CGC TGC- 3' [SEQ ID NO:2] і зворотний праймер 5'-TAT AGG ATC CTT GTT CTT GGC CTC CTC TCC TCG-3' [SEQ ID NO:3];

для PCR-ампліфікації кодувальної ділянки lox-1 Лінії G застосовували прямий праймер 5'-AGT GAA AM CAG TGT GCT GGT G-3' [SEQ ID NO:4] і зворотний праймер 5'-GGC TTA AAG AGC AAC TGC TGA-3' [SEQ ID NO:5];

для PCR-ампліфікації кодувальної ділянки lox-1 cv Вінтаж застосовували прямий праймер 5'-CAA GAT GCA TAT GCT GCT GGG AG-3' [SEQ ID NO:6] і зворотний праймер 5'-CGA TGG TTT AAA TTA GAT GGA GAT GCT GT-3' [SEQ ID NO:7].

PCR-реакції проводили з геномною ДНК у кількості 250нг в об'ємі 50мкл, що містив 50пмоль праймера і 2U Pfu ДНК полімерази (Promega), згідно з інструкціями виробника ферменту. PCR-ампліфікацію проводили у блоці Stratagene Robocycler за програмою: 1 хвилина при 94°C, 1 цикл; 1 хвилина при 94°C, 2 хвилини при 62°C і 5 хвилин при 72°C, 30 циклів; 10 хвилин при 72°C, 1 цикл. Продукти PCR розділяли на 1,2% агарозних гелях. Фрагменти ДНК, що відповідали по довжині ампліфікованій ділянці, очищали за допомогою набору для екстракції з гелю Qiax II (Qiagen) і клонували у плазмиду пкДНК2.1 (Invitrogen). Нуклеотидну послідовність обох ниток клонованої промоторної і кодувальної ділянок lox-1 визначали за допомогою реакції завершення дидезоксинуклеотидного ланцюга зі специфічними олігонуклеотидними праймерами й аналізували на генетичному аналізаторі ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems). Порівняння послідовностей здійснювали, застосовуючи пакет програм для аналізу послідовностей DNA STAR (DNA STAR Inc., USA).

Промоторна ділянка та інтрон-екзонна структура кодувальної ділянки lox-1 ячменю показані на Фіг.13. Вони були визначені шляхом порівняння нуклеотидних послідовностей геномної та кДНК lox-1 дикого типу (Фіг.12). Секвенована ділянка промоторної ділянки lox-1 від -363 до +68 (нумерація відносно певного сайту початку транскрипції; [van Mechelen et al., 1995, BBA 1254: 221-225]) є достатньою для того, щоб спрямовувати ембріоспецифічну і тимчасово регульовану генну експресію, характерну для нативного гена [Rouster et al., 1998, Plant J 15: 435-440]. Промоторна і транскрибована ділянка гена lox-1 дикого типу [SEQ ID NO:8] має довжину 4663 nt (нуклеотидів) і містить 6 інтронів між 82nt і 634nt по довжині, що є відсутніми у відповідній кДНК [SEQ ID NO:10] і, отже, повинні бути видалені при сплайсингу транскрипта РНК.

Порівняння нуклеотидної послідовності lox-1 Лінії G з нуклеотидною послідовністю дикого типу (Фіг.12) показує, що алель lox-1 Лінії G має дві точкові мутації. Одна мутація являє собою заміну, що мовчить, C→T в положенні 221 в екзоні 1, а друга являє собою заміну G→A у положенні 2347 в екзоні 3 (Фіг.13). Ген lox-1 ячменю дикого типу кодує білок із 862 амінокислотних залишків [SEQ ID NO:9], тоді як мутація в положенні 2347 алелю lox-1 Лінії G викликає амінокислотну заміну гліцину аспарагіною кислотою на залишку 368

білка, що кодується.

Порівняння первинних структур споріднених рослинних ліпоксигеназ показує, що гліцин-368 у LOX-1 ячменю є строго консервативним. Крім того, цей залишок, що відповідає гліцину-353 у LOX-1 сої, є одним із 51 нейтрального або гідрофобного залишку, що покривають порожнину основи ферменту, як це очевидно з кристалічної структури [Minor et al., 1996, Biochemistry 35: 10687-10701] і показано на Фіг.22. Отже, інсерція зарядженого амінокислотного залишку по цьому положенні, очевидно, порушує структурні і функціональні властивості ферменту.

4. Мутантний білок LOX-1, що кодується алелем lox-1 Лінії G, має низьку ферментативну активність і відповідає за фенотип з низькою ліпоксигеназною активністю Лінії G

Мутагенез зерен cv Вінтаж під дією азиду натрію, що індукував мутований алель lox-1 у Лінії G, можливо викликав додаткові мутації в геномі Лінії G. Для того, щоб продемонструвати, що за фенотип з низькою ліпоксигеназною активністю Лінії G відповідальним є її мутантний алель lox-1, а не інші мутації в геномі, були проведені два експерименти. Для того, щоб довести, що заміщення гліцин→аспарагінова кислота в мутантному ферменті зумовлює знижену стабільність і активність, була визначена ферментативна активність LOX-1, кодованого мутантним і дикого типу алелем lox-1. Виходячи з того, що рівень експресії ендогенної ліпоксигенази в клітинах алейрону повинен бути нижчим межі виявлення, у протопластах алейрону, виділених із набухлих спільних зерен, були тимчасово експресовані два гени lox-1. У тканині алейрону не було виявлено жодного із ідентифікованих генів ліпоксигенази ячменю, які експресуються у ячмені, що проростає, [van Mechelen et al., 1999, див. вище]. Для того, щоб спрямувати тимчасову експресію гена lox-1 у протопластах алейрону, їхні кодувальні ділянки трансляційно злипили із конститутивним промотором, про котрий відомо, що він є активним у цих протопластах.

Кодувальні ділянки мутанта (положення від +1 до +4350 послідовності) і гена lox-1 дикого типу (положення від +69 до +4230 послідовності), а також кДНК lox-1 дикого типу (положення від +69 до +2654 послідовності), усі клоновані в плазмідний кДНК2.1 (див. розділ 3), були експресовані сплавленням сайтів KpnI і EcoRV у полілінкері вектора. Кодувальні ділянки клонували у плазміді pUBARN [Jensen et al., 1998, Hereditas 129: 215-225] між конститутивно активним промотором Ubi убіхітину кукурудзи [як описано в патенті США №005510474A] і термінатором Nos замість гена bar, що кодує фосфінотрицин-ацетилтрансферазу (Фіг.14).

Протопласти були відділені від тканини алейрону набухлого *Hordeum vulgare* cv Himalaya (Гімалайя) відповідно до протоколу [Skriver et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7266-7270]. Аліквоти  $2 \cdot 10^5$  протопластів трансфікували при 0°C за допомогою ~100мкг плазмідної ДНК (еквімолярні кількості кожної плазміди) шляхом опосередкованого ПЕГ поглинання ДНК [Lee et al., 1997, Plant Mol. Biol. 13:21-29], а потім інкубували у культуральному середовищі протопластів алейрону при 25°C, як описано в [Skriver et al., 1991 див. вище]. Після 48 годин інкубування культуральне середовище обережно видаляли, і протопласти знову суспендували і гомогенізували у 300мкл буферу для аналізу ліпоксигенази (0,2мМ борної кислоти, 25мМ HEPES, pH 6,5). Гомогенати центрифугували при 15000g протягом 5 хвилин для осадження нерозчинного матеріалу, а супернатанти (10мкл) послідовно аналізували на загальну ліпоксигеназну активність, використовуючи метод швидкого скринінгу, описаний у Прикладі 1, розділ 1, але без інгібітору NDGA. Вміст білка в екстрактах протопластів визначали за Бредфордом [Bradford 1976, Anal. Biochem., 72: 248] методом забарвленого зв'язування, забезпеченим лабораторією Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA, а ліпоксигеназну активність виражали у мг білка в екстракті.

Протопласти, трансфіковані за допомогою контрольної плазміди pUBI-GUS, де промотор убіхітину-1 кукурудзи спрямовує експресію репортерного гена β-глюкуронідази, не показують помітної ліпоксигеназної активності. Тимчасова експресія гена і кДНК lox-1 дикого типу у протопластах в обох випадках давала високі рівні ліпоксигеназної активності в екстрактах протопластів (Фіг.15). Більш висока експресія кДНК lox-1 дикого типу порівняно з геномною послідовністю може бути викликана більш високою частотою трансфекції для меншої плазміди експресії кДНК lox-1 (4929п.о. проти 6505п.о. генної конструкції lox-1). Тимчасова експресія мутантного гена lox-1 дає низькі рівні ліпоксигеназної активності, ~10% від ліпоксигеназної активності дикого типу. Ці дані ясно показують, що мутантний ген lox-1 у Лінії G кодує ліпоксигеназу зі значно більш низькою активністю, що відповідає за низьколіпоксигеназний фенотип.

#### Приклад 4

Метод ампліфікованого PCR- розщеплення поліморфного сайту (PCR-CAPS) у застосуванні для ідентифікації мутантного гена lox-1

Аналітичний метод, що дозволяє ідентифікувати мутантний ген lox-1 Лінії G в будь-якому генетичному середовищі, розроблений на основі PCR-CAPS-аналізу. Даний аналіз включає у себе PCR-ампліфікацію фрагментів геномної ДНК із наступним розщепленням ампліфікованих послідовностей за допомогою специфічної рестриктази для виявлення поліморфізму фрагментів рестрикції за довжиною (RFLP).

Кодувальна послідовність мутантного гена lox-1 "приховує" дві точкові мутації (див. Приклад 3), де мутація в положенні 2347 (Фіг.12) вводить додатковий сайт розщеплення рестриктазою AatII, не виявлений у гені lox-1 дикого типу (Фіг.16). Показано, що розглянутий нижче PCR-CAPS-аналіз, оснований на поліморфізмі, викликаному наявністю цього сайту рестрикції в гені lox-1, дозволяє розрізнити ген lox-1 дикого типу і мутований ген lox-1.

Геномну ДНК виділяли із молодого листя M6 паростків *Hordeum vulgare*, Лінії cv Вінтаж і Лінії G відповідно до протоколу [Pich and Schubert, 1993, див. вище]. Послідовність ДНК, що включала у себе положення 2347 (сайт мутації гена lox-1 Лінії G), ампліфікували за допомогою PCR, використовуючи праймери, специфічні для гена lox-1 [SEQ ID NO:8]. Фрагменти ДНК, ампліфіковані при використанні вибраних праймерів 5'-CGCTACGACGTCTACAACGA-3' [SEQ ID NO:13] і зворотного праймера 5'-CAGACTACTTTTGGCGGGA-3' [SEQ ID NO:14], показані на Фіг.17. PCR-реакції проводили з 250нг геномної ДНК в об'ємі 50мкл, що містив 50пмоль кожного праймера і 1 одиницю Taq ДНК-полімерази (Promega), згідно з інструкціями виробника. PCR-ампліфікацію проводили у блоці Stratagene Robocycler за такою програмою: 1 хвилина при 94°C, 1 цикл; 1 хвилина при 94°C, 1,5 хвилини при 60°C і 2 хвилини при 72°C, 30 циклів; 10 хвилин при 72°C, 1 цикл. Ампліфіковані фрагменти гена lox-1 мутантного і дикого типу мали

~650п.о. (Фіг.18), що відповідало очікуваному розміру (Фіг.17). PCR продукти, очищені на обертовій колонці (Qiagen), розщеплювали за допомогою 25 одиниць рестриктази AatW протягом 24 годин при 37°C і аналізували на 1,2% агарозному гелі.

Перетравлення PCR-продукту lox-1 дикого типу давало фрагменти ДНК завдовжки 10, 179 і 462п.о., а фрагменти PCR-продукту мутантного lox-1 мали довжину 10, 149, 179, і 313п.о., де додаткові фрагменти ДНК виникали завдяки частковому перетравленню PCR-продукту lox-1 (Фіг.19). Фрагментарний малюнок відповідав очікуваному від цієї мутації RFLP-поліморфізму, де фрагмент 313п.о. є унікальним для мутантного lox-1. Розглянутий PCR-CAPS-метод являє собою репродуктивний і специфічний інструмент для ідентифікації алелю lox-1 у ячмені і, отже, може використовуватися в програмах поліпшення сортів ячменю, спрямованих на введення даного гена в нові сорти цієї культури.

#### Приклад 5

Зворотне схрещування фенотипу з низькою ліпоксигеназною активністю Лінії G із cv Алексіс демонструє генетичне зчеплення з мутантним геном lox-1

Для переносу фенотипу з низькою ліпоксигеназною активністю від лінії G у рекурентну батьківську форму (у даному випадку cv Алексіс) використовували багаторазове зворотне схрещування. Показана на Фіг.20 програма зворотного схрещування, об'єднана із селекцією на одержання фенотипу з низькою ліпоксигеназною активністю, поступово заміщує геном Лінії G рекурентним батьківським геномом. Крім того, виключаються інші мутації в геномі Лінії G під час мутагенезу під дією азиду натрію. У першому зворотному схрещуванні гомозиготної Лінії G з низькою ліпоксигеназною активністю (позначеної як генотип II) з cv Алексіс (позначеної як генотип LL) лінії нащадка є гетерозиготними (позначені як генотип LI). Фенотип з низькою ліпоксигеназною активністю внаслідок рецесивної мутації не виявляється в лініях, гетерозиготних для мутації. Потомство є самозапильним і дає популяцію з нормальною менделівською сегрегацією, тобто 1LL: 2 LI: 1 II. Гомозиготний генотип II із низьким lox, одержаний в результаті першого зворотного схрещування, має 50% генетичного середовища cv Алексіс. Після десятих циклів зворотного схрещування рекурентне батьківське середовище складає приблизно 99,9%.

*Hordeum vulgare*, L cv Алексіс і Лінія G розмножувалися у теплиці за програмою зворотного схрещування. Зерна потомства зворотного схрещування пророщували у чашках Петрі на фільтрувальному папері, просоченому 4мл H<sub>2</sub>O, протягом 3 днів при температурі 22°C у темряві. Низьколіпоксигеназні лінії піддавали скринінгу, вимірюючи загальну ліпоксигеназну активність в екстрактах колеоптилю (верхівка 7 мм) із паростків, як описано в Прикладі 1. Потомство 3-го і 4-го зворотних схрещувань також аналізували на спадкування мутантного гена lox-1 методом PCR-CAPS, описаним у Прикладі 4.

Очікувана частота низьколіпоксигеназного фенотипу при розщепленні потомства чотирьох поколінь зворотного схрещування складала 25% для рецесивної мутації. Одержана частота низьколіпоксигеназної активності в потомстві (24 зерна) чотирьох поколінь зворотного схрещування узгоджується з очікуваною частотою (Фіг.20). PCR-CAPS-аналіз 3-го і 4-го поколінь потомства зворотного схрещування з низьколіпоксигеназним гомозиготним II генотипом з низьким lox показав, що усі вони мали діагностичний фрагмент 313п.о., тоді як у потомства з низькою ліпоксигеназною активністю дикого типу цього фрагмента не було (Фіг.21).

Програма зворотного схрещування показує, що мутантний алель lox-1 можна переносити у нове генетичне середовище і що він успадковується рецесивним монофакторним чином відповідно до менделівського розщеплення. Оскільки в потомстві 4-го зворотного схрещування рекурентне батьківське середовище складає 93,8%, спільне спадкування мутантного гена lox-1 і низьколіпоксигеназного фенотипу підтверджує їхнє генетичне зчеплення.

#### Приклад 6

Пиво, зварене з ячмінного солоду Лінії G, накопичує під час зберігання менше п-транс-2-ноненалу, що надає йому підвищеної смакової стабільності

*Hordeum vulgare*, L cv Вінтаж і Лінію G розмножували у польових умовах протягом декількох сезонів, щоб одержати достатньо зерна для солодження в промислових масштабах. Нижчеописані спроби здійснення солодження і пивоваріння в промислових масштабах, а також аналізи готового пива проводять для того, щоб продемонструвати цінність ячменю Лінії G з низькою ліпоксигеназною активністю для підвищення смакової стабільності продукту.

##### 1. Промислове солодження і сушіння ячменю Лінії G і cv Вінтаж

Було проведено два пробних солодження у кількості 10 тонн у промисловій солодовні.

##### Спроба 1. Ячмінне зерно Лінії G (врожай 1996 року)

Умови замочування: 8 годин вологе; 14 годин сухе; 8 годин вологе; 10 годин сухе; 4 години вологе при температурі води для замочування 16°C. Умови солодження: 12 годин при 18°C; 24 години при 16°C; 24 години при 14°C; 60 годин при 12°C. Умови сушіння: 12 годин при 60°C; 3 години при 68°C; 4 години при 74°C; 3 години при 80°C.

##### Спроба 2. Ячмінне зерно cv Вінтаж і Лінії G (врожай 1996/1997 року)

Умови замочування: 8 годин вологе; 10 годин сухе; 6 годин вологе; 15 годин сухе; 4 години вологе при температурі води для замочування 15°C. Умови солодження: 5 днів при температурі повітря усередині 15°C і при обприскуванні для підтримки рівня вологості. Умови сушіння: 10 годин при 50°C; 2 години при 60°C; 2,5 години при 80°C.

Порівняння аналізу солодження 2 зразків солоду Лінії G Спроби 1 із контрольним солодом cv Невада (Таблиця 1), а зі Спроби 2 - із cv Вінтаж (Таблиця 2) підтверджує, що солод Лінії G був задовільним для пробного пивоваріння.

Таблиця 1

Спроба 1 солодження				
Сорт ячменю		cv Невада	Лінія G	Лінія G
Рік врожаю		1996	1996	1996



Аналізи солоду				
Вміст вологи	%	4,7	4,3	4,4
Тонка фракція екстракту (без обробки: б/о)	% (б/о)	76,9	76,1	75,3
Тонка фракція екстракту в сухому солоді (d.m.)	% dm	81,4	79,5	78,7
Час оцукрювання	Хвилини	<10	<10	<10
Діастатична потужність	% WK	252	373	365
Колір	EBC	2,8	4,4	3,8
РН		6,16	5,97	5,99
Каламутність	EBC	9,0	2,5	2,4
Загальний вміст білка d.m		10,35	10,74	12,03
Розчинний азот	мг/л	647	787	765
Розчинний білок % у солоді d.m.	% dm.	3,7	4,4	4,3
Число Колбаха		35,3	40,8	35,4
Вільний азот	мг/л	97	125	118
Крихкість	%	89,5	85,6	89,5
Цілком немодифіковане зерно	%	1,1	0,6	0,5
Частково немодифіковане зерно	%	2,3	1,0	0,6
β-глюкан у суслі	мг/мл	114	66	36
β-глюкан у солоді	% (мас.)	0,24	0,11	0,05
S-метилметіонін/ОМЗ екв.	мкг/г	2,4	6,4	8,4
Вільний DMS	мкг/г	1,0	6,6	4,7
NDMA	мкг/кг	н. о.	0,3/0,6	0,3/0,3

Таблиця 2

Спроба 2 солодження				
Сорт ячменя		Вінтаж	Лінія G	Лінія G
Рік врожаю		1996	1996	1997
Вміст вологи	%	4,1	4,1	4,3
Тонка фракція екстракту (без обробки: б/о)	% (б/о)	77,0	75,6	77,5
Тонка фракція екстракту в сухому солоді (d.m.)	% (d.m.)	80,3	78,8	80,9
Різниця тонка/груба фракції	% (d.m.)	0,7	1,6	1,7
Час оцукрювання	Хвилини	-	-	<10
Діастатична потужність	% WK	343	342	268
Колір	EBC	2,5	2,8	3,4
РН		6,05	6,01	6,12
Каламутність	EBC	1,5	1,3	2,5
Загальний вміст білка d.m.		10,98	12,22	9,82
Розчинний азот	Мг/л	696	741	610
Розчин, білок % у солоді d.m.	% d.m.	3,9	4,1	3,4
Число Колбаха		35,2	33,7	34,6
Вільний азот	мг/л	110	117	100
Крихкість	%	91,3	81,8	89,5
Цілком немодифіковане зерно	%	0,7	1,1	1,3
Частково немодифіковане зерно	%	1,0	2,7	2,7
β-глюкан у суслі	мг/мл	97	172	117
β-глюкан у солоді	% (мас.)	-	-	0,3
S-метилметіонін/BMS екв.	мкг/г	-	-	-
Вільний DMS	мкг/г	-	-	-

## 2. Промислове пивоваріння із солоду Лінії G, cv Вінтаж і контрольного солоду cv Невада

Було проведено дві спроби виробництва пива, використовуючи сусло, приготовлене із солоду Лінії G і контрольного солоду cv Невада у Спробі 1 і із солоду Лінії G і контрольного солоду cv Вінтаж у Спробі 2.

Пиво варили у промисловому масштабі 30л із 475кг солоду по такій схемі. Затирання при 50°C; 30 хвилин при 50°C; 30 хвилин нагрівання від 50°C до 70°C. Частину сусла нагрівали протягом 20 хвилин від 70°C до 100°C і 5 хвилин при 100°C, у той час, як основний затор витримували при 70°C ще протягом 25 хвилин, а потім обидва затори об'єднували і витримували при 76°C протягом 10 хвилин. Стадії пивоваріння - кип'ятіння сусла, відділення відпрацьованого зерна у вірпулі, охолодження, бродіння, освітлення і розливання в коричневі скляні пляшки - здійснювали у відповідності зі стандартною практикою пивоваріння.

3. Смакова стабільність і вміст T2N у пиві, звареному із солоду Лінії G, солоду cv Вінтаж і контрольного солоду cv Невада

Свіжоприготоване і розлите по пляшках пиво зберігали при температурі 5°C і аналізували протягом 2 місяців з моменту його вироблення. Смакову стабільність свіжого пива і пива після зберігання, оцінювали у двох незалежних лабораторіях після зберігання пива в двох різних умовах. У лабораторії А пиво піддавали примусовому старінню при 37°C протягом 7 днів, тоді як у лабораторії В пиво зберігали при 30°C протягом 6 і 12 тижнів. Рівні транс-2-ноненалу у пиві визначали за допомогою газової хроматографії та мас-спектрометрії після дериватизації карбонільних груп під дією O-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гідроксиламіну в цілому так, як описано в [Gronquist et al., 1993 Proceedings of the 24<sup>th</sup> EBC Congress, Oslo, 421-428]. Досвідчена дегустаційна комісія дала повну оцінку пива, що включала виявлення "присмаку картону", який

вказує на наявність у пиві вільного транс-2-ноненалю.

Лабораторія А. Стійкість до примусового старіння

Порівняння пива, звареного із солоду Лінії G і контрольного солоду, cv Невада, у першій спробі пивоваріння (Таблиця 3) показало, що пиво з ячменю Лінії G має більш високу смакову стабільність і більш низький вміст транс-2-ноненалю після примусового старіння порівняно з контролним продуктом. Друга спроба пивоваріння, в котрій порівнювали пиво, зварене із солоду Лінії G, із пивом, звареним із солоду cv Вінтаж, батьківського сорту даної культури, підтвердила результати першої спроби (Таблиця 4).

Таблиця 3

Спроба 1 пивоваріння		
Ячмінний солод	cv Невада	Лінія G
Вміст SO <sub>2</sub> (мг/мл)	1	1
T2N** (×10 <sup>-9</sup> частин) - свіже пиво	0,009	0,005
T2N** (×10 <sup>-9</sup> частин) - старе пиво (37°C/7 днів)	0,117	0,025
Смак і запах* - свіже пиво	5,9	5,3
Смак і запах* - старе пиво (37°C/7 днів)	1,3	5,1

\*Шкала оцінки смаку і запаху пива від 1 до 10 по мірі підвищення якості

\*\*Транс-2-ноненаль

Таблиця 4

Спроба 2 пивоваріння		
Ячмінний солод	cv Вінтаж	Лінія G
Вміст SO <sub>2</sub> (мг/мл.)	2	2,5
T2N** (×10 <sup>-9</sup> частин) - свіже пиво	0,023	0,019
T2N** (×10 <sup>-9</sup> частин) - старе пиво (37°C/7 днів)	0,078	0,035
Смак і запах* - свіже пиво	5,5	6,1
Смак і запах* - старе пиво (37°C/7 днів)	2,9	5,9

\*Шкала оцінки смаку і запаху пива від 1 до 10 по мірі підвищення якості

\*\*Транс-2-ноненаль

Лабораторія В. Стійкість при зберіганні при 30°C

Пиво, зварене із солоду Лінії G, має нижчі рівні транс-2-ноненалю після 6-і 12-тижневого зберігання при підвищеній температурі 30°C порівняно з пивом, звареним із будь-якого еталонного солоду (Табл. 5 і 6), і має за оцінкою дегустаційної комісії більш високу смакову стабільність. Смаковий поріг для транс-2-ноненалю в аналізованих зразках пива складав приблизно 0,08×10<sup>-9</sup> частин.

Таблиця 5

Спроба 1 пивоваріння		
Ячмінний солод	cv Невада	Лінія G
Гранс-2-ноненаль (×10 <sup>-9</sup> частин) - свіже пиво	0,050	0,044
Гранс-2-ноненаль (×10 <sup>-9</sup> частин) - 30°C/6 тижнів	0,072	0,037
Гранс-2-ноненаль (×10 <sup>-9</sup> частин) - 30°C/12 тижнів	0,095	0,046
Присмак транс-2-ноненалю* - свіже пиво	0,6	0,3
Присмак транс-2-ноненалю* - 30°C/6 тижнів	3,7	1,4
Присмак транс-2-ноненалю* - 30°C/12 тижнів	2,5	0,6

\*Оцінка наявності транс-2-ноненалю за шкалою 1-10

Таблиця 6

Спроба 2 пивоваріння		
Ячмінний солод	cv Вінтаж	Лінія G
Гранс-2-ноненаль (×10 <sup>-9</sup> частин) - свіже пиво	0,070	0,062
Гранс-2-ноненаль (×10 <sup>-9</sup> частин) - 30°C/6 тижнів	0,093	0,070
Гранс-2-ноненаль (×10 <sup>-9</sup> частин) - 30°C/12 тижнів	0,133	0,080
Присмак транс-2-ноненалю* - свіже пиво	0,3	0,9
Присмак транс-2-ноненалю* - 30°C/6 тижнів	2,5	1,7
Присмак транс-2-ноненалю* - 30°C/12 тижнів	2,2	1,3

\* Оцінка наявності транс-2-ноненалю за шкалою 1-10

Можна бачити, що підвищена смакова стабільність пива, звареного із солоду Лінії G, як показали вимірювання рівней транс-2-ноненалю після зберігання пива при 30°C, за об'єднаними даними спроб пивоваріння є статистично значимою (Табл. 7).

Транс-2-ноненаль у пиві, що зберігалось

свіже	Середнє значення	Стандартне відхилення	Різниця	2-хвістова величина p	Значний (p<0,05)
еталон	0,060	0,012	0,007	0,34	ні
лінія G	0,053	0,011			

6 тижнів, 30°C	Середнє значення	Стандартне відхилення	Різниця	2-хвістова величина p	Значний (p<0,05)
еталон	0,083	0,013	0,029	0,031	так
лінія G	0,054	0,021			!

12 тижнів, 30°C	Середнє значення	Стандартне відхилення	Різниця	2-хвістова величина p	Значний (p<0,05)
еталон	0,114	0,023	0,051	0,003	так
лінія G	0,063	0,020			

Оскільки природні рівні сульфїту є низькими в обох спробах пивоваріння, рівні вільного транс-2-ноненалу в старому пиві повинні точно відбивати потенціал транс-2-ноненалу в різноманітних зразках пива, а саме, рівень адуктів транс-2-ноненалу, наявних у пиві. Додавання сульфїту може тимчасово затримувати процес старіння за рахунок утворення комплексних сполук з вільним транс-2-ноненалем доти, поки рівні сульфїту не зменшаться внаслідок окислювання завдяки газообміну через упакування.

Описані спроби пивоваріння з ячмінним солодом із низьким LOX-1 дають перший безсумнівний доказ того, що активність LOX-1 у ячмені в період солодження і процесу готування пива є головним чинником, що визначає появу сполуки з неприємним присмаком, транс-2-ноненалу, у старому пиві.

У даному описі наведені посилання на численні публікації. Кожна публікація включена в даний опис в усій її повноті і для всіх цілей шляхом посилання.

# ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Douma, Anneke  
 Doderer, Albert  
 Cameron-Mills, Verena  
 Skadhauge, Birgitte  
 Bech, Lena

<120> Низьколіпоксигеназний-1 ячмінь

<130> 11225.12W001

<160> 18

<170> Патент у версії 3.0

<210> 1

<211> 143

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

<400> 1	
стаагссатс ggcaaccatg gatgaataaa gggcgttcgc cacgtacgaa acttgctgag	60
agattggtgt agtggtgtc tgtgacagta ctatgtcagc agttgctctt taagccgaat	120
aaataaagca gatttgcttc caa	143

<210> 2

<211> 24

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

<400> 2	
gaaaagcttg gaggtagacg ctgc	24

<210>	3	
<211>	33	
<212>	ДНК	
<213>	Hordeum vulgare	
<400>	3	
tataggatcc ttgttcttgg cctcctctcc tcg		33
<210>	4	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Hordeum vulgare	
<400>	4	
agtgaaaac agtgtgctgg tg		22
<210>	5	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Hordeum vulgare	
<400>	5	
ggcttaaaga gcaactgctg a		21
<210>	6	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Hordeum vulgare	
<400>	6	
caagatgcat atgctgctgg gag		23
<210>	7	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Hordeum vulgare	

<400> 7  
cgatggttta aattagatgg agatgctgt

29

<210> 8

<211> 4663

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

<400> 8  
cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60  
atgggcatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgca aagcacgagg agggcacgctc 120  
accgtccgcg cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180  
gcgccacacc accgggaccg gaccgggacc ggctataaa ttgcccgga cgaagtgcga 240  
gcagctcttc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300  
tgtgctgggt ccattgggtg gagcagtga agcgaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360  
tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccg ctcaaggcca 420  
cgggtggtgt catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480  
acggcatcgg cgagttcttc ggcaaggcg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccg 540  
tcgaccaagg taactactac cctctccg ccttctcttc tgtttacaag atatagtatt 600  
tctttcgtgt gggccggcgg ccattggatg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660  
aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcatatgcc atcgaaaaaa 720  
gagacaacag catgcatgca tgggtgcgca accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780  
gacaaagcaa cacaacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840  
cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaagagca agcacacaat 900  
cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960  
gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020  
agggtagctg gcatgtatag ttcttgaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtagc 1080  
tgggtggtga gacaacggcg gtcgaggga ggtgggcgca gaggcggagc tggagcagtg 1140  
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg 1200  
ggagggtggg aagctcgggg tgccgggccc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga 1260  
gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcgga acctcacctt 1320  
cgtcgcaac tcatggatct accccggcgc caactaccga tacagccgca tcttcttcgc 1380  
caacgacgtg cgtggatttt cctctacttt cctctctttt cattttcacc gccttcgtca 1440

ttcatggtcg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca	1500
cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga	1560
tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat	1620
aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt	1680
ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaaācgatt aaattaagca	1740
taaaaagaaa aggaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt	1800
agatatgcaa tatttatctt acatctaaac ctttcttcat tcttaaatat aagacatttg	1860
taagatttca ctatggacaa catacgaaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt	1920
atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatattt gcaacggagg gagtaaaaca	1980
taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga	2040
tgccggcgcc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgctg ggcgacgacc	2100
agcagggccc gtaccaggag caccgaccga tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg	2160
gcgagggccc ccccatctc ggcggcaact ccgaccacc ttaccgcgc gcgggccgca	2220
cggagcgcaa gcccacgcc agcgaccga gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc	2280
agatctactg gccgcgggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct	2340
actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca	2400
ccccggcgca gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcatcaagc	2460
tgcccaaggt ggccgccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg	2520
acctcctccc cgtcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg	2580
agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgcacg ggagggtgctc gccggcgcta	2640
acccggtcat gatcacgct ctcacggtga gtcagcgatt atttgttcat tgtgtgtgta	2700
tggtgtccat ggtgagaaag tgcagatctt gatctgcgtt gggtcgcagc cacgcagct	2760
gcatgcatgc aggagtcccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac	2820
accagcacca tcacggcgga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag	2880
gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta	2940
gataatttgg cttcgttgca attaatgtga tgctggccga tcaagtgatc gtattgggtt	3000
tgaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc	3060
atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc cagcaggacc	3120
ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcagagccc	3180
atcatccagg gcggccttac caccggccaag agcaagggtt acacgccggt gccagcggc	3240
tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg	3300
tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacgtt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga	3360

tgcacaacaa ctgatcgaat tatgattgat tgaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420  
 gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cgtgacacaa 3480  
 gctgctgagc ccgactacc gcgacacat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540  
 catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccg ggcaagtccg cgttggggat 3600  
 gtcggccggt gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgcccg acgatctcat 3660  
 caagaggtag gtacctggt aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca 3720  
 ctgacaggaa cgtgtgtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggaccg gtcgagcccg 3780  
 tacaaggtag ggtgtctggt gtcggactac ccgtacgcgc cggacgggct ggcgatctgg 3840  
 cacgccattg agcagtacgt gagcgagtag ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900  
 ctgacgggag atacggaggt gcaggcgtgg tggaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960  
 gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020  
 tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgc cagtcaactt cgggcagtag 4080  
 ccctacgcgc ggttctctcc gaaccggcgc acggtgagcc ggcgcgcgcat gccggagccc 4140  
 ggcacggagg agtagcggga gctggagcgc gacccggagc gggccttcat ccacaccatc 4200  
 acgagccaga tccagacat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260  
 tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgccggagt ggacctcgga cccaaaggcc 4320  
 ctggagggtg tcaagcgggt cagcgaccgc ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc 4380  
 atgaaccatg acccgagct caagaaccgc aacggcccg ctaagtttcc ctacatgctg 4440  
 ctctacccca acacctcca ccacaagggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc 4500  
 cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560  
 gccacgtacg aaactgtcg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca 4620  
 gcagttgctc tttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc 4663

<210> 9

<211> 862

<212> Блок

<213> Hordeum vulgare

<400> 9

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp  
 20 25 30



Leu Asn Asp Phe Gly Ala Thr Ile Ile Asp Gly Ile Gly Glu Phe Leu  
 35 40 45  
 Gly Lys Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Ala Val Asp Gln  
 50 55 60  
 Asp Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Trp Val Thr Ser Leu Pro Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ser Lys Phe Gly  
 85 90 95  
 Leu Thr Phe Asp Trp Glu Val Glu Lys Leu Gly Val Pro Gly Ala Ile  
 100 105 110  
 Val Val Asn Asn Tyr His Ser Ser Glu Phe Leu Leu Lys Thr Ile Thr  
 115 120 125  
 Leu His Asp Val Pro Gly Arg Ser Gly Asn Leu Thr Phe Val Ala Asn  
 130 135 140  
 Ser Trp Ile Tyr Pro Ala Ala Asn Tyr Arg Tyr Ser Arg Val Phe Phe  
 145 150 155 160  
 Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro Ser Gln Met Pro Ala Ala Leu Lys Pro  
 165 170 175  
 Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln Gln Gly  
 180 185 190  
 Pro Tyr Gln Glu His Asp Arg Ile Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr Asn Asp  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu Gly Arg Pro Ile Leu Gly Gly Asn Ser Asp His Pro Tyr  
 210 215 220  
 Pro Arg Arg Gly Arg Thr Glu Arg Lys Pro Asn Ala Ser Asp Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Val Pro Arg Asp  
 245 250 255  
 Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile  
 260 265 270  
 Lys Ala Ile Thr Gln Gly Ile Leu Pro Ala Val Arg Thr Tyr Val Asp  
 275 280 285  
 Thr Thr Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Ile Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300  
 Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Lys Val Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Lys Gln Phe Pro Leu Gln Leu Ile Lys Asp Leu Leu Pro Val Gly Gly  
 325 330 335  
 Asp Ser Leu Leu Lys Leu Pro Val Pro His Ile Ile Gln Glu Asn Lys  
 340 345 350  
 Gln Ala Trp Arg Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Val Leu Ala Gly  
 355 360 365  
 Val Asn Pro Val Met Ile Thr Arg Leu Thr Glu Phe Pro Pro Lys Ser

370					375					380					
Ser 385	Leu	Asp	Pro	Ser	Lys 390	Phe	Gly	Asp	His	Thr 395	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala 400
Glu	His	Ile	Glu	Lys 405	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu 410	Thr	Val	Gln	Gln	Ala 415	Leu
Glu	Ser	Asn	Arg 420	Leu	Tyr	Ile	Leu	Asp 425	His	His	Asp	Arg	Phe 430	Met	Pro
Phe	Leu	Ile 435	Asp	Val	Asn	Asn	Leu 440	Pro	Gly	Asn	Phe	Ile 445	Tyr	Ala	Thr
Arg	Thr 450	Leu	Phe	Phe	Leu	Arg 455	Gly	Asp	Gly	Arg	Leu 460	Thr	Pro	Leu	Ala
Ile 465	Glu	Leu	Ser	Glu	Pro 470	Ile	Ile	Gln	Gly	Gly 475	Leu	Thr	Thr	Ala	Lys 480
Ser	Lys	Val	Tyr	Thr 485	Pro	Val	Pro	Ser	Gly 490	Ser	Val	Glu	Gly	Trp 495	Val
Trp	Glu	Leu	Ala 500	Lys	Ala	Tyr	Val	Ala 505	Val	Asn	Asp	Ser	Gly 510	Trp	His
Gln	Leu	Val 515	Ser	His	Trp	Leu	Asn 520	Thr	His	Ala	Val	Met 525	Glu	Pro	Phe
Val	Ile 530	Ser	Thr	Asn	Arg	His 535	Leu	Ser	Val	Thr	His 540	Pro	Val	His	Lys
Leu 545	Leu	Ser	Pro	His	Tyr 550	Arg	Asp	Thr	Met	Thr 555	Ile	Asn	Ala	Leu	Ala 560
Arg	Gln	Thr	Leu	Ile 565	Asn	Ala	Gly	Gly	Ile 570	Phe	Glu	Met	Thr	Val 575	Phe
Pro	Gly	Lys	Phe 580	Ala	Leu	Gly	Met	Ser 585	Ala	Val	Val	Tyr	Lys 590	Asp	Trp
Lys	Phe	Thr 595	Glu	Gln	Gly	Leu	Pro 600	Asp	Asp	Leu	Ile	Lys 605	Arg	Gly	Met
Ala	Val 610	Glu	Asp	Pro	Ser	Ser 615	Pro	Tyr	Lys	Val	Arg 620	Leu	Leu	Val	Ser
Asp 625	Tyr	Pro	Tyr	Ala	Ala 630	Asp	Gly	Leu	Ala	Ile 635	Trp	His	Ala	Ile	Glu 640
Gln	Tyr	Val	Ser	Glu 645	Tyr	Leu	Ala	Ile	Tyr 650	Tyr	Pro	Asn	Asp	Gly 655	Val
Leu	Gln	Gly	Asp 660	Thr	Glu	Val	Gln	Ala 665	Trp	Trp	Lys	Glu	Thr 670	Arg	Glu
Val	Gly	His 675	Gly	Asp	Leu	Lys	Asp 680	Ala	Pro	Trp	Trp	Pro 685	Lys	Met	Gln
Ser	Val 690	Pro	Glu	Leu	Ala	Lys 695	Ala	Cys	Thr	Thr	Ile 700	Ile	Trp	Ile	Gly
Ser 705	Ala	Leu	His	Ala	Ala 710	Val	Asn	Phe	Gly	Gln 715	Tyr	Pro	Tyr	Ala	Gly 720

Phe Leu Pro Asn Arg Pro Thr Val Ser Arg Arg Arg Met Pro Glu Pro  
 725 730 735  
 Gly Thr Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Arg Ala Phe  
 740 745 750  
 Ile His Thr Ile Thr Ser Gln Ile Gln Thr Ile Ile Gly Val Ser Leu  
 755 760 765  
 Leu Glu Val Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Leu Tyr Leu Gly Gln  
 770 775 780  
 Arg Asp Thr Pro Glu Trp Thr Ser Asp Pro Lys Ala Leu Glu Val Phe  
 785 790 795 800  
 Lys Arg Phe Ser Asp Arg Leu Val Glu Ile Glu Ser Lys Val Val Gly  
 805 810 815  
 Met Asn His Asp Pro Glu Leu Lys Asn Arg Asn Gly Pro Ala Lys Phe  
 820 825 830  
 Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Lys Gly Ala Ala  
 835 840 845  
 Ala Gly Leu Thr Ala Lys Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile  
 850 855 860

<210> 10

<211> 2818

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

<400> 10

agtgaaaaac agtggtgctgg tgccattggt tggagcagtg aaagcgagga gaggaggcca	60
agaacaagat gctgctggga gggctgatcg acaccctcac gggggcgaac aagagcgccc	120
ggctcaaggg cacggtggtg ctcatgcgca agaactgtct ggacctcaac gacttcggcg	180
ccaccatcat cgacggcatc ggcgagttcc tcggcaaggg cgtcacctgc cagcttatca	240
gctccaccgc cgtcgaccaa gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggcgcg gaggcggagc	300
tggagcagtg ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca	360
ccttcgactg ggaggtggag aagctcgggg tgccgggccc catcgtcgtc aacaactacc	420
acagctccga gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcgga	480
acctcacctt cgtcgccaac tcatggatct accccgccgc caactaccga tacagccgcg	540
tcttcttcgc caacgacacg tacctgccga gccagatgcc ggcggcgctg aagccgtacc	600
gcgacgacga gctccggaac ctgctgggac acgaccagca gggcccgtac caggagcacg	660
accgcatcta ccgctacgac gtctacaacg acctcggcga gggccgcccc atcctcggcg	720
gcaactccga ccacccttac ccgcccgcg gccgcacgga gcgcaagccc aacgccagcg	780

acccgagcct ggagagccgg ctgtcgctgc tggagcagat ctacgtgccg cgggacgaga	840
agttcgcca cctcaagacg tccgacttcc tgggctactc catcaaggcc atcacgcagg	900
gcatcctgcc ggccgtgcgc acctacgtgg acaccacccc cggcgagtgc gactccttcc	960
aggacatcat caacctctat gagggcggca tcaagctgcc caaggctggc gccctggagg	1020
agctccgtaa gcagttcccg ctccagctca tcaaggacct cctccccgtc ggcggcgact	1080
ccctgcttaa gctccccgtg ccccatcatca tccaggagaa caagcaggcg tggaggaccg	1140
acgaggagtt cgcacgggag gtgctcgccg gcgtcaaccc ggtcatgatc acgcgtctca	1200
cggagttccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac accagacca	1260
tcacggcgga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag gcgctggaaa	1320
gcaacaggct gtacatcctt gatcaccatg accggttcat gccgttcctg atcgacgtca	1380
acaacctgcc cggcaacttc atctacgcca cgaggacctt cttcttcctg cgcggcgacg	1440
gcaggctcac gccgctcgcc atcgagctga gcgagcccat catccagggc ggccttacca	1500
cggccaagag caagggtttac acgccggtgc ccagcggctc cgtcgaaggc tgggtgtggg	1560
agctcgccaa ggcctacgtc gccgtcaatg actccgggtg gcaccagctc gtcagccact	1620
ggctgaacac tcacgcggtg atggagccgt tcgtgatctc gacgaaccgg caccttagcg	1680
tgacgcaccc ggtgcacaag ctgctgagcc cgcactaccg cgacaccatg accatcaacg	1740
cgtggtcgcg gcagacgctc atcaacgccg gcggcatctt cgagatgacg gtgttcccgg	1800
gcaagttcgc gttggggatg tcggccgtgg tgtacaagga ctggaagttc accgagcagg	1860
gactgccgga cgatctcatc aagaggggca tggcgggtga ggacccgtcg agcccgtaca	1920
aggtgcggtt gctggtgtcg gactaccgt acgcggcgga cgggctggcg atctggcacg	1980
ccattgagca gtacgtgagc gagtacctgg ccatctacta cccgaacgac ggcgtgctgc	2040
agggcgatac ggaggtgcag gcgtggtgga aggagacgcg cgaggtcggg cacggcgacc	2100
tcaaggacgc cccatggtgg cccaagatgc aaagtgtgcc ggagctggcc aaggcgtgca	2160
ccaccatcat ctggatcggg tcggcgctgc atgcggcagt caacttcggg cagtaccctt	2220
acgcggggtt cctcccgaac cggccgacgg tgagccggcg ccgcatgccg gagcccggca	2280
cggaggagta cgcggagctg gagcgcgacc cggagcgggc cttcatccac accatcacga	2340
gccagatcca gaccatcatc ggcgtgtcgc tgctggaggt gctgtcgaag cactcctccg	2400
acgagctgta cctcgggcag cgggacacgc cggagtggac ctcggaacca aaggccctgg	2460
aggtgttcaa gcggttcagc gaccggctgg tggagatcga gagcaagggt gtgggcatga	2520
accatgaccc ggagctcaag aaccgcaacg gcccggctaa gtttccctac atgctgctct	2580
acccaacac ctccgaccac aagggcgccc ctgcccggct taccgccaag ggcaccccca	2640
acagcatctc catctaactt aagccatcgg caaccatgga tgaataaagg gcgttcgcca	2700

cgtacgaaac ttgtcgagag attggtgtag tgtgtgtctg tgacagtact atgtcagcag 2760  
 ttgtctttta agccgaataa ataaagcaga ttgtcttcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2818

<210> 11  
 <211> 4663  
 <212> ДНК  
 <213> *Hordeum vulgare*

<220>  
 <221> Варіація  
 <222> (2346)..(2348)  
 <223> «п» є а, с, t або g при кодуванні кислої, основної або полярної амінокислоти

<400> 11  
 cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60  
 atgggcgatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgca aagcacgagg agggcacgtc 120  
 accgtccgag cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180  
 gcgccacacc accgggaccg gacccggacc ggcctataaa ttgcccgga ctagctgcaa 240  
 gcagctcttc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300  
 tgtgtggtg ccattggtg gagcagtga agcaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360  
 tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccg ctcaaggga 420  
 cgggtggtgt catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480  
 acggcatcgg cgagtctctc ggcaagggtg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccg 540  
 tcgaccaagg taactactac cctcctccgg ccttctctc tgtttacaag atatagtatt 600  
 tctttcgtgt gggccggcg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660  
 aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcatatgcc atcgaaaaaa 720  
 gagacaacag catgcatgca tggtcgcgc accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780  
 gacaaagcaa cacacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840  
 cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaaagca agcacacaat 900  
 cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960  
 gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020  
 agggtagctg gcatgtatag ttcttgaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtagc 1080

tggtggtgca gacaacggcg gtcgctgggaa ggtgggctcg gaggcggagc tggagcagtg	1140
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg	1200
ggagggtggag aagctcgggg tgccgggctc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga	1260
gttcctgctt aaaacatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt	1320
cgtcgccaac tcatggatct acccgcgcgc caactaccga tacagccgcg tcttcttcgc	1380
caacgacgtg cgtggatttt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca	1440
ttcatggctg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca	1500
cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga	1560
tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat	1620
aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt	1680
ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaacgatt aaattaagca	1740
taaaaagaaa aggaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt	1800
agatatgcaa tatttatctt acatctaaac ctttcttcat tcttaaatat aagacatttg	1860
taagatttca ctatggacaa catacgaaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt	1920
atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca	1980
taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga	2040
tgccggcggc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgctg ggcgacgacc	2100
agcagggccc gtaccaggag cacgaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg	2160
gcgagggccc ccccatctc ggcggcaact ccgaccaccc ttaccgcgcg cgcggccgca	2220
cggagcgcaa gcccaacgcc agcgaaccga gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc	2280
agatctactg gccgcgggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct	2340
actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca	2400
ccccggcgca gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcatcaagc	2460
tgcccaaggt ggccgccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg	2520
acctcctccc cgtcggcggc gactcccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg	2580
agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgcacg ggagggtgctc gccnnngtca	2640
acccggtcat gatcacgctg ctcacggtga gtcagcgatt attgttcat tgtgtgtgta	2700
tggtgtccat ggtgagaaag tgagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct	2760
gcatgcatgc aggagtccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac	2820
accgacacca tcacggcgga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag	2880
gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta	2940
gataatttgg cttcgttgca attaatgtga tgctggccga tcaagtgatc gtattgggtt	3000

tgaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc	3060
atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc caccaggacc	3120
ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc	3180
atcatccagg gcggccttac caccggccaag agcaaggttt acacgccggt gccagcggc	3240
tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg	3300
tggcaccagc tcgtcagcca ctgggtacgt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga	3360
tgcaacaaca ctgatcgaat tatgattgat tgaaacgcgc aggtcgaaca ctacgcgggt	3420
gatggagccc ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cggcgcacaa	3480
gctgctgagc ccgcaactacc gcgacaccat gacctcaac gcgctggcgc ggcagacgct	3540
catcaacgcc ggcgcatct tgcagatgac ggtgttcccg ggcaagtctg cgttggggat	3600
gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat	3660
caagaggtag gtacctggtg aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca	3720
ctgacaggaa cgtgtgtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggaccg gtcgagcccg	3780
tacaaggtag ggttgcctgg gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg	3840
cacgccattg agcagtagct gagcagtagc ctggccatct actacccgaa cgacggcgtg	3900
ctgcaggggc atacggagggt gcaggcgtgg tggaaggaga cgcgcgagggt cgggcacggc	3960
gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg	4020
tgaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtac	4080
ccctacgcgg ggttctctcc gaaccggcgg acggtgagcc ggccgcgcgt gccggagccc	4140
ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gacccggagc gggccttcat ccacaccatc	4200
acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc	4260
tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgccggagt ggacctcgga cccaaaggcc	4320
ctggagggtg tcaagcgggt cagcgaccgg ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc	4380
atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggcccgg ctaagtttcc ctacatgctg	4440
ctctacccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc	4500
cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgctc	4560
gccacgtacg aaacttgtcg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca	4620
gcagttgctc ttttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc	4663

<210> 12

<211> 862

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> Варіація .

<222> (368)..(368)

<223> «хаа» є кисла, основна або полярна амінокислота

<400> 12

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser  
1 5 10 15  
Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp  
20 25 30  
Leu Asn Asp Phe Gly Ala Thr Ile Ile Asp Gly Ile Gly Glu Phe Leu  
35 40 45  
Gly Lys Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Ala Val Asp Gln  
50 55 60  
Asp Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Glu Gln  
65 70 75 80  
Trp Val Thr Ser Leu Pro Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ser Lys Phe Gly  
85 90 95  
Leu Thr Phe Asp Trp Glu Val Glu Lys Leu Gly Val Pro Gly Ala Ile  
100 105 110  
Val Val Asn Asn Tyr His Ser Ser Glu Phe Leu Leu Lys Thr Ile Thr  
115 120 125  
Leu His Asp Val Pro Gly Arg Ser Gly Asn Leu Thr Phe Val Ala Asn  
130 135 140  
Ser Trp Ile Tyr Pro Ala Ala Asn Tyr Arg Tyr Ser Arg Val Phe Phe  
145 150 155 160  
Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro Ser Gln Met Pro Ala Ala Leu Lys Pro  
165 170 175  
Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln Gln Gly  
180 185 190  
Pro Tyr Gln Glu His Asp Arg Ile Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr Asn Asp  
195 200 205  
Leu Gly Glu Gly Arg Pro Ile Leu Gly Gly Asn Ser Asp His Pro Tyr  
210 215 220  
Pro Arg Arg Gly Arg Thr Glu Arg Lys Pro Asn Ala Ser Asp Pro Ser  
225 230 235 240  
Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Val Pro Arg Asp  
245 250 255  
Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile



260					265					270					
Lys	Ala	Ile	Thr	Gln	Gly	Ile	Leu	Pro	Ala	Val	Arg	Thr	Tyr	Val	Asp
		275					280					285			
Thr	Thr	Pro	Gly	Glu	Phe	Asp	Ser	Phe	Gln	Asp	Ile	Ile	Asn	Leu	Tyr
	290					295					300				
Glu	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Pro	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg
305					310					315					320
Lys	Gln	Phe	Pro	Leu	Gln	Leu	Ile	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Val	Gly	Gly
				325					330					335	
Asp	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	His	Ile	Ile	Gln	Glu	Asn	Lys
		340						345					350		
Gln	Ala	Trp	Arg	Thr	Asp	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Glu	Val	Leu	Ala	Xaa
		355				360						365			
Val	Asn	Pro	Val	Met	Ile	Thr	Arg	Leu	Thr	Glu	Phe	Pro	Pro	Lys	Ser
	370					375					380				
Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Lys	Phe	Gly	Asp	His	Thr	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala
385					390					395					400
Glu	His	Ile	Glu	Lys	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Val	Gln	Gln	Ala	Leu
				405					410					415	
Glu	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr	Ile	Leu	Asp	His	His	Asp	Arg	Phe	Met	Pro
			420					425					430		
Phe	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Asn	Leu	Pro	Gly	Asn	Phe	Ile	Tyr	Ala	Thr
		435					440					445			
Arg	Thr	Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Asp	Gly	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Ala
		450				455					460				
Ile	Glu	Leu	Ser	Glu	Pro	Ile	Ile	Gln	Gly	Gly	Leu	Thr	Thr	Ala	Lys
465					470					475					480
Ser	Lys	Val	Tyr	Thr	Pro	Val	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Glu	Gly	Trp	Val
			485						490					495	
Trp	Glu	Leu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Val	Ala	Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Trp	His
			500					505					510		
Gln	Leu	Val	Ser	His	Trp	Leu	Asn	Thr	His	Ala	Val	Met	Glu	Pro	Phe
		515					520					525			
Val	Ile	Ser	Thr	Asn	Arg	His	Leu	Ser	Val	Thr	His	Pro	Val	His	Lys
	530					535					540				
Leu	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Arg	Asp	Thr	Met	Thr	Ile	Asn	Ala	Leu	Ala
545					550					555					560
Arg	Gln	Thr	Leu	Ile	Asn	Ala	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Val	Phe
				565					570					575	
Pro	Gly	Lys	Phe	Ala	Leu	Gly	Met	Ser	Ala	Val	Val	Tyr	Lys	Asp	Trp
			580					585					590		
Lys	Phe	Thr	Glu	Gln	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Leu	Ile	Lys	Arg	Gly	Met
		595					600					605			

Ala Val Glu Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser  
 610 615 620  
 Asp Tyr Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu  
 625 630 635 640  
 Gln Tyr Val Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val  
 645 650 655  
 Leu Gln Gly Asp Thr Glu Val Gln Ala Trp Trp Lys Glu Thr Arg Glu  
 660 665 670  
 Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Pro Trp Trp Pro Lys Met Gln  
 675 680 685  
 Ser Val Pro Glu Leu Ala Lys Ala Cys Thr Thr Ile Ile Trp Ile Gly  
 690 695 700  
 Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly  
 705 710 715 720  
 Phe Leu Pro Asn Arg Pro Thr Val Ser Arg Arg Arg Met Pro Glu Pro  
 725 730 735  
 Gly Thr Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Arg Ala Phe  
 740 745 750  
 Ile His Thr Ile Thr Ser Gln Ile Gln Thr Ile Ile Gly Val Ser Leu  
 755 760 765  
 Leu Glu Val Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Leu Tyr Leu Gly Gln  
 770 775 780  
 Arg Asp Thr Pro Glu Trp Thr Ser Asp Pro Lys Ala Leu Glu Val Phe  
 785 790 795 800  
 Lys Arg Phe Ser Asp Arg Leu Val Glu Ile Glu Ser Lys Val Val Gly  
 805 810 815  
 Met Asn His Asp Pro Glu Leu Lys Asn Arg Asn Gly Pro Ala Lys Phe  
 820 825 830  
 Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Lys Gly Ala Ala  
 835 840 845  
 Ala Gly Leu Thr Ala Lys Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile  
 850 855 860

<210> 13

<211> 20

<212> ДНК

<213> hordeum vulgare

<400> 13

cgctacgacg tctacaacga

20

<210> 14

<211> 20

<212> ДНК

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 14

cagactactt ttggcgggga

20

<210> 15

<211> 839

<212> Білок

<213> Гліцин макс.

<400> 15

Met Phe Ser Ala Gly His Lys Ile Lys Gly Thr Val Val Leu Met Pro  
1 5 10 15  
Lys Asn Glu Leu Glu Val Asn Pro Asp Gly Ser Ala Val Asp Asn Leu  
20 25 30  
Asn Ala Phe Leu Gly Arg Ser Val Ser Leu Gln Leu Ile Ser Ala Thr  
35 40 45  
Lys Ala Asp Ala His Gly Lys Gly Lys Val Gly Lys Asp Thr Phe Leu  
50 55 60  
Glu Gly Ile Asn Thr Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Glu Ser Ala  
65 70 75 80  
Phe Asn Ile His Phe Glu Trp Asp Gly Ser Met Gly Ile Pro Gly Ala  
85 90 95  
Phe Tyr Ile Lys Asn Tyr Met Gln Val Glu Phe Phe Leu Lys Ser Leu  
100 105 110  
Thr Leu Glu Ala Ile Ser Asn Gln Gly Thr Ile Arg Phe Val Cys Asn  
115 120 125  
Ser Trp Val Tyr Asn Thr Lys Leu Tyr Lys Ser Val Arg Ile Phe Phe  
130 135 140  
Ala Asn His Thr Tyr Val Pro Ser Glu Thr Pro Ala Pro Leu Val Ser  
145 150 155 160  
Tyr Arg Glu Glu Glu Leu Lys Ser Leu Arg Gly Asn Gly Thr Gly Glu  
165 170 175  
Arg Lys Glu Tyr Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn Asp Leu  
180 185 190  
Gly Asn Pro Asp Lys Ser Glu Lys Leu Ala Arg Pro Val Leu Gly Gly  
195 200 205

Ser Ser Thr Phe Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Pro  
 210 215 220  
 Thr Val Thr Asp Pro Asn Thr Glu Lys Gln Gly Glu Val Phe Tyr Val  
 225 230 235 240  
 Pro Arg Asp Glu Asn Leu Gly His Leu Lys Ser Lys Asp Ala Leu Glu  
 245 250 255  
 Ile Gly Thr Lys Ser Leu Ser Gln Ile Val Gln Pro Ala Phe Glu Ser  
 260 265 270  
 Ala Phe Asp Leu Lys Ser Thr Pro Ile Glu Phe His Ser Phe Gln Asp  
 275 280 285  
 Val His Asp Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Arg Asp Val Ile  
 290 295 300  
 Ser Thr Ile Ile Pro Leu Pro Val Ile Lys Glu Leu Tyr Arg Thr Asp  
 305 310 315 320  
 Gly Gln His Ile Leu Lys Phe Pro Gln Pro His Val Val Gln Val Ser  
 325 330 335  
 Gln Ser Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met Ile Ala  
 340 345 350  
 Gly Val Asn Pro Cys Val Ile Arg Gly Leu Glu Glu Phe Pro Pro Lys  
 355 360 365  
 Ser Asn Leu Asp Pro Ala Ile Tyr Gly Asp Gln Ser Ser Lys Ile Thr  
 370 375 380  
 Ala Asp Ser Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Thr Met Asp Glu Ala Leu Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Arg Arg Leu Phe Met Leu Asp Tyr His Asp Ile Phe Met Pro Tyr  
 405 410 415  
 Val Arg Gln Ile Asn Gln Leu Asn Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Thr Arg  
 420 425 430  
 Thr Ile Leu Phe Leu Arg Glu Asp Gly Thr Leu Lys Pro Val Ala Ile  
 435 440 445  
 Glu Leu Ser Leu Pro His Ser Ala Gly Asp Leu Ser Ala Ala Val Ser  
 450 455 460  
 Gln Val Val Leu Pro Ala Lys Glu Gly Val Glu Ser Thr Ile Trp Leu  
 465 470 475 480  
 Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ile Val Asn Asp Ser Cys Tyr His Gln Leu  
 485 490 495  
 Met Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Ala Met Glu Pro Phe Val Ile  
 500 505 510  
 Ala Thr His Arg His Leu Ser Val Leu His Pro Ile Tyr Lys Leu Leu  
 515 520 525  
 Thr Pro His Tyr Arg Asn Asn Met Asn Ile Asn Ala Leu Ala Arg Gln  
 530 535 540  
 Ser Leu Ile Asn Ala Asn Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Leu Pro Ser

545                      550                      555                      560  
 Lys Tyr Ser Val Glu Met Ser Ser Ala Val Tyr Lys Asn Trp Val Phe  
                                  565                                   570                                   575  
 Thr Asp Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly Val Ala Ile  
                                  580                                   585                                   590  
 Lys Asp Pro Ser Thr Pro His Gly Val Arg Leu Leu Ile Glu Asp Tyr  
                                  595                                   600                                   605  
 Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Glu Ile Trp Ala Ala Ile Lys Thr Trp  
                                  610                                   615                                   620  
 Val Gln Glu Tyr Val Pro Leu Tyr Tyr Ala Arg Asp Asp Asp Val Lys  
                                  625                                   630                                   635                                   640  
 Asn Asp Ser Glu Leu Gln His Trp Trp Lys Glu Ala Val Glu Lys Gly  
                                  645                                   650                                   655  
 His Gly Asp Leu Lys Asp Lys Pro Trp Trp Pro Lys Leu Gln Thr Leu  
                                  660                                   665                                   670  
 Glu Asp Leu Val Glu Val Cys Leu Ile Ile Ile Trp Ile Ala Ser Ala  
                                  675                                   680                                   685  
 Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Gly Gly Leu Ile  
                                  690                                   695                                   700  
 Met Asn Arg Pro Thr Ala Ser Arg Arg Leu Leu Pro Glu Lys Gly Thr  
                                  705                                   710                                   715                                   720  
 Pro Glu Tyr Glu Glu Met Ile Asn Asn His Glu Lys Ala Tyr Leu Arg  
                                  725                                   730                                   735  
 Thr Ile Thr Ser Lys Leu Pro Thr Leu Ile Ser Leu Ser Val Ile Glu  
                                  740                                   745                                   750  
 Ile Leu Ser Thr His Ala Ser Asp Glu Val Tyr Leu Gly Gln Arg Asp  
                                  755                                   760                                   765  
 Asn Pro His Trp Thr Ser Asp Ser Lys Ala Leu Gln Ala Phe Gln Lys  
                                  770                                   775                                   780  
 Phe Gly Asn Lys Leu Lys Glu Ile Glu Glu Lys Leu Val Arg Arg Asn  
                                  785                                   790                                   795                                   800  
 Asn Asp Pro Ser Leu Gln Gly Asn Arg Leu Gly Pro Val Gln Leu Pro  
                                  805                                   810                                   815  
 Tyr Thr Leu Leu Tyr Pro Ser Ser Glu Glu Gly Leu Thr Phe Arg Gly  
                                  820                                   825                                   830  
 Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile  
                                  835

<210> 16

<211> 865

<212> Білок

<213> Гліцин макс.

<400> 16

Met Phe Ser Val Pro Gly Val Ser Gly Ile Leu Asn Arg Gly Gly Gly  
1 5 10 15  
His Lys Ile Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp  
20 25 30  
Phe Asn Ser Val Ala Asp Leu Thr Lys Gly Asn Val Gly Gly Leu Ile  
35 40 45  
Gly Thr Gly Leu Asn Val Val Gly Ser Thr Leu Asp Asn Leu Thr Ala  
50 55 60  
Phe Leu Gly Arg Ser Val Ala Leu Gln Leu Ile Ser Ala Thr Lys Pro  
65 70 75 80  
Leu Ala Asn Gly Lys Gly Lys Val Gly Lys Asp Thr Phe Leu Glu Gly  
85 90 95  
Ile Ile Val Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Glu Ser Ala Phe Asn  
100 105 110  
Ile Gln Phe Glu Trp Asp Glu Ser Met Gly Ile Pro Gly Ala Phe Tyr  
115 120 125  
Ile Lys Asn Tyr Met Gln Val Glu Phe Tyr Leu Lys Ser Leu Thr Leu  
130 135 140  
Glu Asp Val Pro Asn Gln Gly Thr Ile Arg Phe Val Cys Asn Ser Trp  
145 150 155 160  
Val Tyr Asn Thr Lys Leu Tyr Lys Ser Val Arg Ile Phe Phe Ala Asn  
165 170 175  
His Thr Tyr Val Pro Ser Glu Thr Pro Ala Ala Leu Val Gly Tyr Arg  
180 185 190  
Glu Glu Glu Leu Lys Asn Leu Arg Gly Asp Gly Lys Gly Glu Arg Lys  
195 200 205  
Glu His Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn Asp Leu Gly Asn  
210 215 220  
Pro Asp His Gly Glu Asn Phe Ala Arg Pro Ile Leu Gly Gly Ser Ser  
225 230 235 240  
Thr His Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Tyr Pro Thr Arg  
245 250 255  
Lys Asp Gln Asn Ser Glu Lys Pro Gly Glu Val Tyr Val Pro Arg Asp  
260 265 270  
Glu Asn Phe Gly His Leu Lys Ser Ser Asp Phe Leu Ala Tyr Gly Ile  
275 280 285  
Lys Ser Leu Ser Gln Tyr Val Leu Pro Ala Phe Glu Ser Val Phe Asp  
290 295 300  
Leu Asn Phe Thr Pro Asn Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Val Arg Asp  
305 310 315 320

Leu His Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Thr Glu Val Ile Ser Thr Ile  
 325 330 335  
 Met Pro Leu Pro Val Val Lys Glu Leu Phe Arg Thr Asp Gly Glu Gln  
 340 345 350  
 Val Leu Lys Phe Pro Pro Pro His Val Ile Gln Val Ser Lys Ser Ala  
 355 360 365  
 Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met Val Ala Gly Val Asn  
 370 375 380  
 Pro Cys Val Ile Arg Gly Glu Gln Glu Phe Pro Pro Lys Ser Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Pro Thr Ile Tyr Gly Glu Gln Thr Ser Lys Ile Thr Ala Asp Ala  
 405 410 415  
 Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Ser Arg Arg  
 420 425 430  
 Leu Phe Met Leu Asp Tyr His Asp Val Phe Met Pro Tyr Ile Arg Arg  
 435 440 445  
 Ile Asn Gln Thr Tyr Ala Lys Ala Tyr Ala Thr Arg Thr Ile Leu Phe  
 450 455 460  
 Leu Arg Glu Asn Gly Thr Leu Lys Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Leu  
 465 470 475 480  
 Pro His Pro Ala Gly Asp Leu Ser Gly Ala Val Ser Gln Val Ile Leu  
 485 490 495  
 Pro Ala Lys Glu Gly Val Glu Ser Thr Ile Trp Leu Leu Ala Lys Ala  
 500 505 510  
 Tyr Val Val Val Asn Asp Ser Cys Tyr His Gln Leu Met Ser His Trp  
 515 520 525  
 Leu Asn Thr His Ala Val Ile Glu Pro Phe Ile Ile Ala Thr Asn Arg  
 530 535 540  
 His Leu Ser Ala Leu His Pro Ile Tyr Lys Leu Leu Thr Pro His Tyr  
 545 550 555 560  
 Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala Leu Ala Arg Gln Ser Leu Ile Asn  
 565 570 575  
 Ala Asp Gly Ile Ile Glu Lys Ser Phe Leu Pro Ser Lys His Ser Val  
 580 585 590  
 Glu Met Ser Ser Ala Val Tyr Lys Asn Trp Val Phe Thr Asp Gln Ala  
 595 600 605  
 Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly Val Ala Ile Lys Asp Pro Ser  
 610 615 620  
 Ala Pro His Gly Leu Arg Leu Leu Ile Glu Asp Tyr Pro Tyr Ala Val  
 625 630 635 640  
 Asp Gly Leu Glu Ile Trp Ala Ala Ile Lys Thr Trp Val Gln Glu Tyr  
 645 650 655  
 Val Ser Leu Tyr Tyr Ala Arg Asp Asp Asp Val Lys Pro Asp Ser Glu





Ala Thr Lys Ala Asp Ala Asn Gly Lys Gly Lys Leu Gly Lys Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Glu Gly Ile Ile Thr Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Gln  
 85 90 95  
 Ser Ala Phe Lys Ile Asn Phe Glu Trp Asp Asp Gly Ser Gly Ile Pro  
 100 105 110  
 Gly Ala Phe Tyr Ile Lys Asn Phe Met Gln Thr Glu Phe Phe Leu Val  
 115 120 125  
 Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ile Pro Asn His Gly Ser Ile His Phe Val  
 130 135 140  
 Cys Asn Ser Trp Ile Tyr Asn Ala Lys Leu Phe Lys Ser Asp Arg Ile  
 145 150 155 160  
 Phe Phe Ala Asn Gln Thr Tyr Leu Pro Ser Glu Thr Pro Ala Pro Leu  
 165 170 175  
 Val Lys Tyr Arg Glu Glu Glu Leu His Asn Leu Arg Gly Asp Gly Thr  
 180 185 190  
 Gly Glu Arg Lys Glu Trp Glu Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn  
 195 200 205  
 Asp Leu Gly Asp Pro Asp Lys Gly Glu Asn His Ala Arg Pro Val Leu  
 210 215 220  
 Gly Gly Asn Asp Thr Phe Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg  
 225 230 235 240  
 Lys Pro Thr Arg Lys Asp Pro Asn Ser Glu Ser Arg Ser Asn Asp Val  
 245 250 255  
 Tyr Leu Pro Arg Asp Glu Ala Phe Gly His Leu Lys Ser Ser Asp Phe  
 260 265 270  
 Leu Thr Tyr Gly Leu Lys Ser Val Ser Gln Asn Val Leu Pro Leu Leu  
 275 280 285  
 Gln Ser Ala Phe Asp Leu Asn Phe Thr Pro Arg Glu Phe Asp Ser Phe  
 290 295 300  
 Asp Glu Val His Gly Leu Tyr Ser Gly Gly Ile Lys Leu Pro Thr Asp  
 305 310 315 320  
 Ile Ile Ser Lys Ile Ser Pro Leu Pro Val Leu Lys Glu Ile Phe Arg  
 325 330 335  
 Thr Asp Gly Glu Gln Ala Leu Lys Phe Pro Pro Pro Lys Val Ile Gln  
 340 345 350  
 Val Ser Lys Ser Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met  
 355 360 365  
 Leu Ala Gly Val Asn Pro Asn Leu Ile Arg Cys Leu Lys Asp Phe Pro  
 370 375 380  
 Pro Arg Ser Lys Leu Asp Ser Gln Val Tyr Gly Asp His Thr Ser Gln  
 385 390 395 400

Ile Thr Lys Glu His Leu Glu Pro Asn Leu Gly Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Glu Ala Ile Gln Asn Lys Arg Leu Phe Leu Leu Asp His His Asp Pro  
 420 425 430  
 Ile Met Pro Tyr Leu Arg Arg Ile Asn Ala Thr Ser Thr Lys Ala Tyr  
 435 440 445  
 Ala Thr Arg Thr Ile Leu Phe Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Arg Pro  
 450 455 460  
 Leu Ala Ile Glu Leu Ser Leu Pro His Pro Gln Gly Asp Gln Ser Gly  
 465 470 475 480  
 Ala Phe Ser Gln Val Phe Leu Pro Ala Asp Glu Gly Val Glu Ser Ser  
 485 490 495  
 Ile Trp Leu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Val Val Asn Asp Ser Cys Tyr  
 500 505 510  
 His Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Val Glu Pro  
 515 520 525  
 Phe Ile Ile Ala Thr Asn Arg His Leu Ser Val Val His Pro Ile Tyr  
 530 535 540  
 Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Gly Leu  
 545 550 555 560  
 Ala Arg Leu Ser Leu Val Asn Asp Gly Gly Val Ile Glu Gln Thr Phe  
 565 570 575  
 Leu Trp Gly Arg Tyr Ser Val Glu Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp  
 580 585 590  
 Trp Val Phe Thr Asp Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly  
 595 600 605  
 Met Ala Ile Glu Asp Pro Ser Cys Pro His Gly Ile Arg Leu Val Ile  
 610 615 620  
 Glu Asp Tyr Pro Tyr Thr Val Asp Gly Leu Glu Ile Trp Asp Ala Ile  
 625 630 635 640  
 Lys Thr Trp Val His Glu Tyr Val Phe Leu Tyr Tyr Lys Ser Asp Asp  
 645 650 655  
 Thr Leu Arg Glu Asp Pro Glu Leu Gln Ala Cys Trp Lys Glu Leu Val  
 660 665 670  
 Glu Val Gly His Gly Asp Lys Lys Asn Glu Pro Trp Trp Pro Lys Met  
 675 680 685  
 Gln Thr Arg Glu Glu Leu Val Glu Ala Cys Ala Ile Ile Ile Trp Thr  
 690 695 700  
 Ala Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Gly  
 705 710 715 720  
 Gly Leu Ile Leu Asn Arg Pro Thr Leu Ser Arg Arg Phe Met Pro Glu  
 725 730 735  
 Lys Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Leu Arg Lys Asn Pro Gln Lys Ala

740	745	750
Tyr Leu Lys Thr Ile Thr Pro Lys Phe Gln Thr Leu Ile Asp Leu Ser		
755	760	765
Val Ile Glu Ile Leu Ser Arg His Ala Ser Asp Glu Val Tyr Leu Gly		
770	775	780
Glu Arg Asp Asn Pro Asn Trp Thr Ser Asp Thr Arg Ala Leu Glu Ala		
785	790	800
Phe Lys Arg Phe Gly Asn Lys Leu Ala Gln Ile Glu Asn Lys Leu Ser		
805	810	815
Glu Arg Asn Asn Asp Glu Lys Leu Arg Asn Arg Cys Gly Pro Val Gln		
820	825	830
Met Pro Tyr Thr Leu Leu Leu Pro Ser Ser Lys Glu Gly Leu Thr Phe		
835	840	845
Arg Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile		
850	855	

<210> 18

<211> 864

<212> Binok

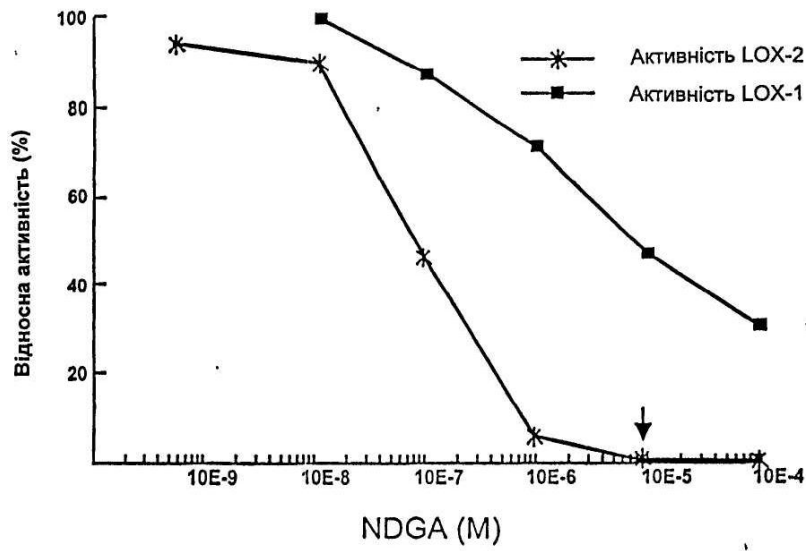
<213> Hordeum vulgare

<400> 18

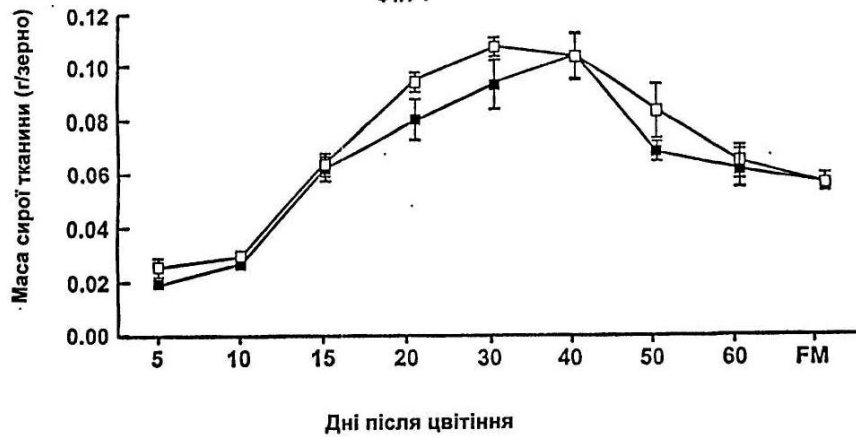
Met Leu Gly Val Gly Gly Ile Val Ser Asp Leu Thr Gly Gly Ile Arg	
1 5 10 15	
Gly Ala His Leu Lys Gly Ser Val Val Leu Met Arg Lys Asn Ala Leu	
20 25 30	
Asp Phe Asn Asp Phe Gly Ala His Val Met Asp Gly Val Thr Glu Leu	
35 40 45	
Leu Gly Arg Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Asn Val Asp	
50 55 60	
His Asn Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Asn Leu Glu	
65 70 75 80	
Gln Trp Leu Leu Pro Thr Asn Leu Pro Phe Ile Thr Thr Gly Glu Asn	
85 90 95	
Lys Phe Ala Val Thr Phe Asp Trp Ser Val Asp Lys Leu Gly Val Pro	
100 105 110	
Gly Ala Ile Ile Val Lys Asn Asn His Ala Ser Glu Phe Phe Leu Lys	
115 120 125	
Thr Ile Thr Leu Asp Asn Val Pro Gly Arg Gly Thr Ile Val Phe Val	
130 135 140	
Ala Asn Ser Trp Val Tyr Pro Gln Ala Lys Tyr Arg Tyr Asn Arg Val	
145 150 155 160	

Phe Phe Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro His Gln Met Pro Ala Ala Leu  
 165 170 175  
 Lys Pro Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln  
 180 185 190  
 Gln Gly Pro Tyr Leu Asp His Asp Arg Val Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr  
 195 200 205  
 Asn Asp Leu Gly Asp Ser Arg Asp Val Leu Gly Gly Ser Lys Asp Leu  
 210 215 220  
 Pro Tyr Pro Arg Arg Cys Arg Thr Gly Arg Lys Pro Ser Asp Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Pro Asp His Glu Ser Arg Leu Leu Leu Val Gln Asn Val Tyr Val  
 245 250 255  
 Leu Arg Asp Glu Leu Phe Gly His Leu Lys Gln Ser Asp Leu Leu Gly  
 260 265 270  
 Tyr Thr Leu Lys Gly Trp Leu Asp Gly Ile Ile Leu Ala Ile Arg Thr  
 275 280 285  
 Tyr Val Asp Leu Ser Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Ala Asp Ile Leu  
 290 295 300  
 Lys Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Asn Ile Pro Ala Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Val Arg Lys Arg Phe Pro Leu Gln Leu Val Lys Asp Leu Ile Pro  
 325 330 335  
 Lys Gly Gly Asp Phe Leu Leu Lys Leu Pro Lys Pro Glu Ile Ile Lys  
 340 345 350  
 Val Asp Gln Lys Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met  
 355 360 365  
 Leu Ala Gly Val Asn Pro Met Met Ile Lys Arg Leu Thr Glu Phe Pro  
 370 375 380  
 Pro Lys Ser Thr Leu Asp Pro Ser Lys Tyr Gly Asp His Thr Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Met Thr Glu Glu His Val Ala Lys Ser Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln  
 405 410 415  
 Gln Ala Leu Ala Gly Asn Arg Leu Tyr Ile Val Asp Gln His Asp Asn  
 420 425 430  
 Leu Met Pro Phe Leu Ile Asp Ile Asn Asn Leu Asp Ala Ser Phe Val  
 435 440 445  
 Tyr Ala Thr Arg Thr Leu Leu Phe Leu Arg Gly Asp Gly Thr Leu Ala  
 450 455 460  
 Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Ser Pro Leu Ile Gln Gly Glu Leu Thr  
 465 470 475 480  
 Thr Ala Lys Ser Ala Val Tyr Thr Pro Gln His Ala Gly Val Glu Gly  
 485 490 495

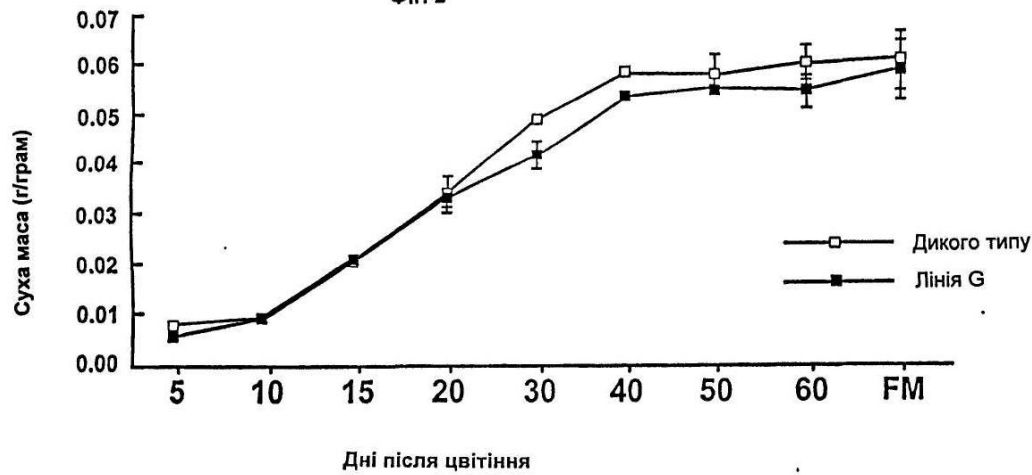
Trp Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Ala Ser Val Asn Asp Tyr Gly  
 500 505 510  
 Trp His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu  
 515 520 525  
 Pro Phe Val Ile Ala Thr Asn Arg Gln Leu Ser Val Thr His Pro Val  
 530 535 540  
 Tyr Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala  
 545 550 555 560  
 Arg Ala Arg Gly Leu Leu Ile Asn Ala Gly Gly Val Ile Glu Met Thr  
 565 570 575  
 Val Phe Pro His Lys His Ala Met Pro Met Ser Ser Met Val Tyr Lys  
 580 585 590  
 His Trp Asn Phe Thr Glu Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg  
 595 600 605  
 Gly Met Ala Val Glu Asp Ala Ser Ser Pro His Lys Val Arg Leu Leu  
 610 615 620  
 Ile Lys Asp Tyr Pro Tyr Ala Thr Asp Gly Leu Ala Val Trp Asp Ala  
 625 630 635 640  
 Ile Glu Gln Trp Val Ser Asp Tyr Leu Thr Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp  
 645 650 655  
 Gly Val Leu Gln Gly Asp Val Glu Leu Gln Ala Trp Trp Lys Glu Val  
 660 665 670  
 Arg Glu Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Ala Trp Trp Pro Lys  
 675 680 685  
 Met Gln Thr Val Ala Glu Leu Ile Lys Ala Cys Ala Thr Ile Ile Trp  
 690 695 700  
 Thr Gly Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr  
 705 710 715 720  
 Ser Gly Tyr His Pro Asn Lys Pro Ser Ala Ser Arg Arg Pro Met Pro  
 725 730 735  
 Val Gln Gly Ser Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Lys  
 740 745 750  
 Ala Phe Ile Arg Thr Ile Thr Ser Gln Phe His Ala Leu Val Gly Ile  
 755 760 765  
 Ser Leu Met Glu Ile Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Val Tyr Leu  
 770 775 780  
 Gly Gln His Asp Thr Pro Ala Trp Thr Ser Asp Ala Lys Ala Leu Glu  
 785 790 795 800  
 Ala Phe Lys Arg Phe Gly Ala Lys Leu Glu Gly Ile Glu Lys Gln Val  
 805 810 815  
 Val Ala Met Asn Ser Asp Pro Gln Leu Lys Asn Arg Thr Gly Pro Ala  
 820 825 830  
 Lys Phe Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Thr Gly  
 835 840 845  
 Gln Ala Glu Gly Leu Thr Ala Arg Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile  
 850 855 860



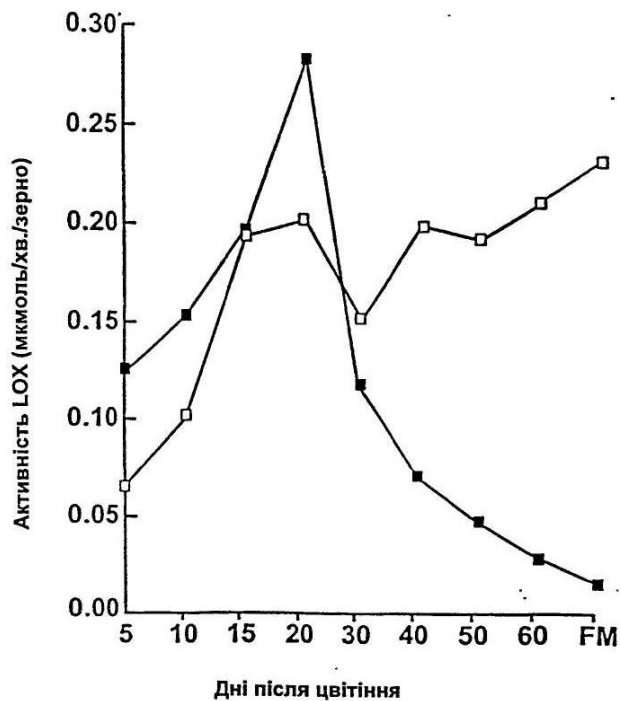
Фіг. 1



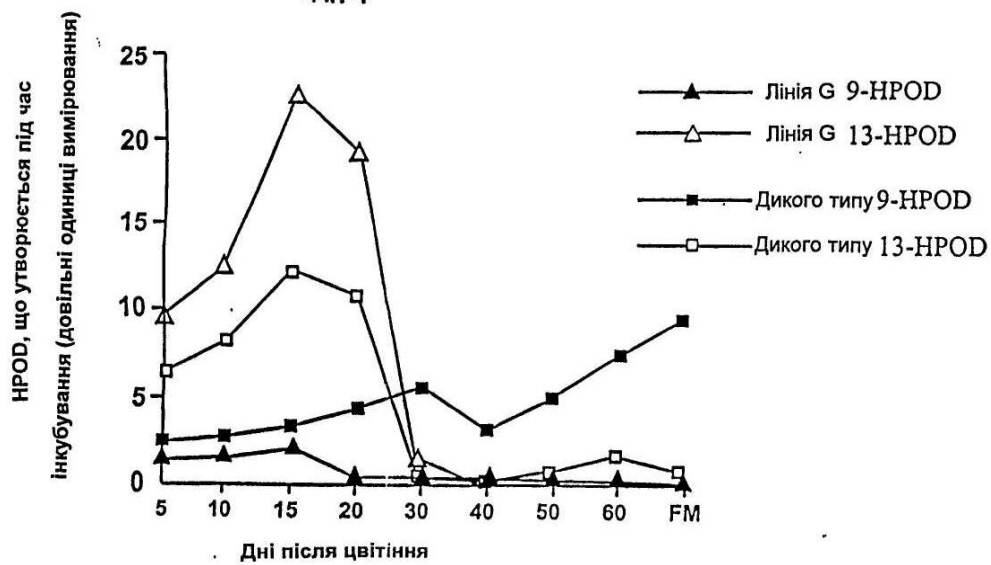
Фіг. 2



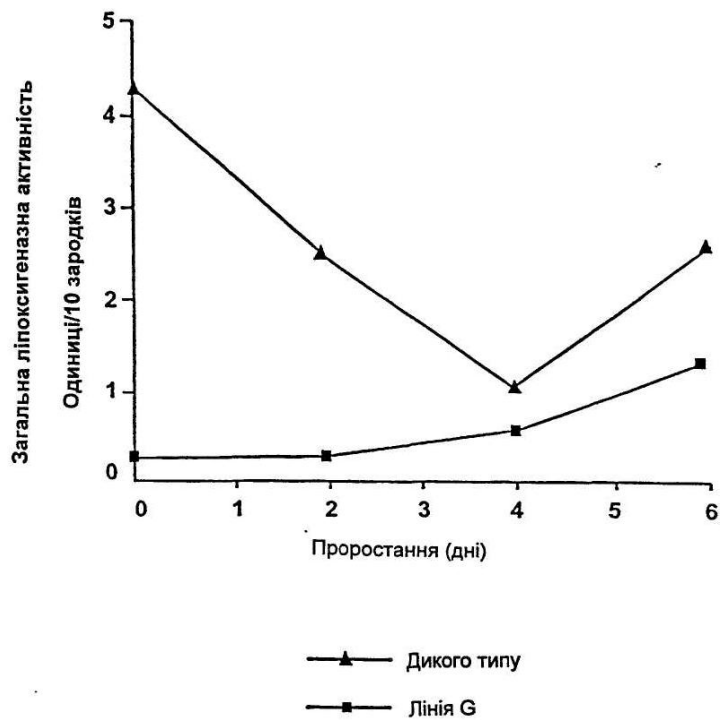
Фіг. 3



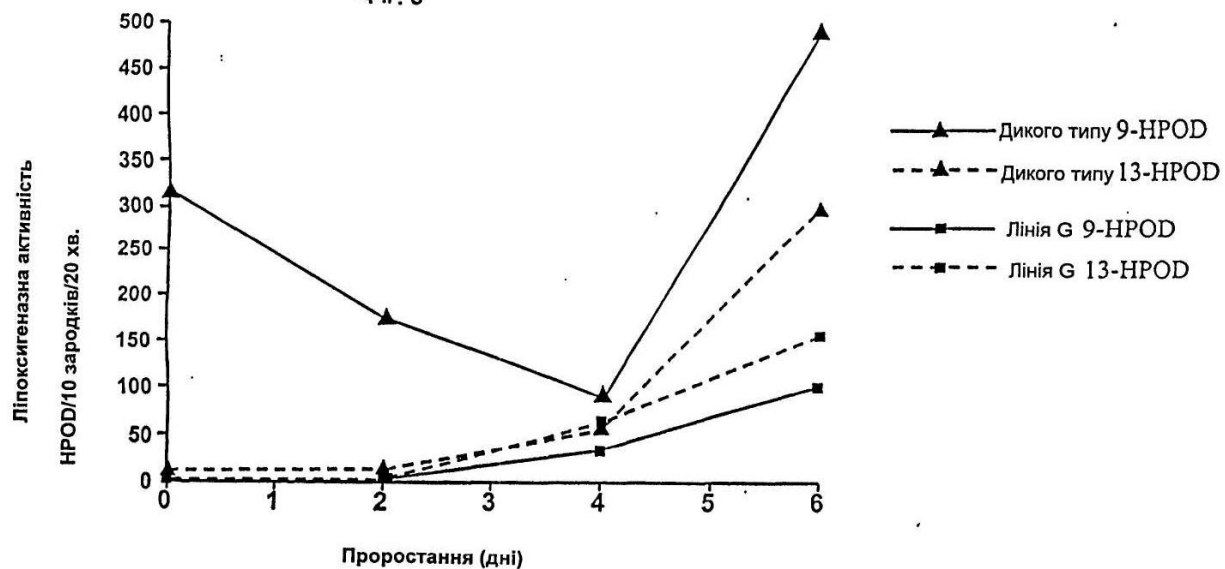
Фіг. 4



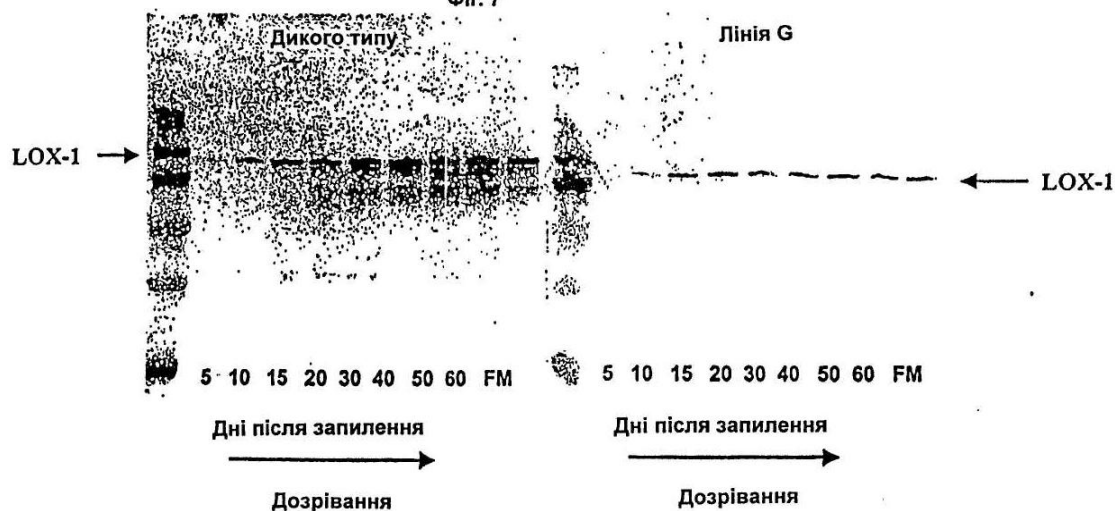
Фіг. 5



Фіг. 6

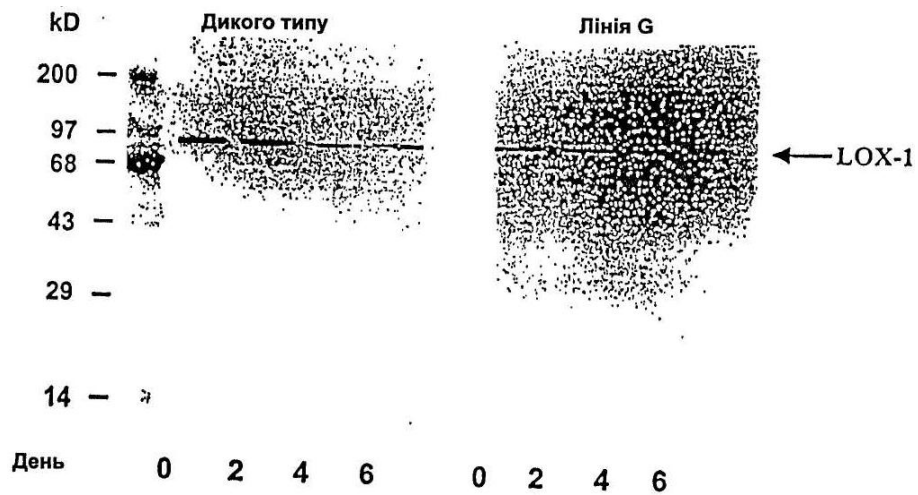


Фіг. 7

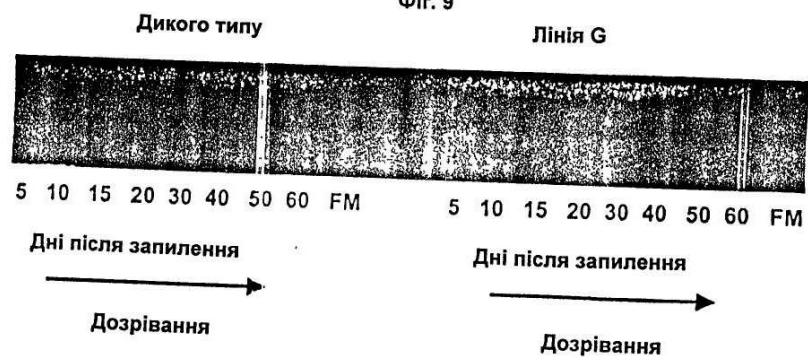


Фіг. 8

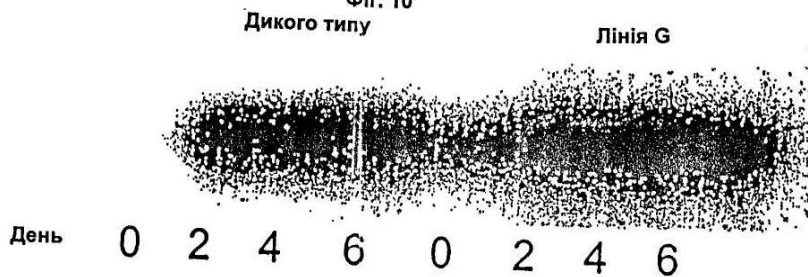




Фіг. 9



Фіг. 10



Фіг. 11

Фіг. 12А

(-288) Промотор

LG CAGCCCCATGCATGCACATGCACATGCACATGCAGTGCAGCCAAGCACCGCTCGATGGGCGATCACCCGTCACG -208  
WT CAGCCCCATGCATGCACATGCACATGCACATGCAGTGCAGCCAAGCACCGCTCGATGGGCGATCACCCGTCACG

LG GGACCGGAGCGCGCCATGCGAAGCACGAGGAGGGCACGTACCCTCCGCGCGCAGCACGTGGAGAGCACGTGCGCGTCCG -128  
WT GGACCGGAGCGCGCCATGCGAAGCACGAGGAGGGCACGTACCCTCCGCGCGCAGCACGTGGAGAGCACGTGCGCGTCCG

LG ATCCATCTCTCCAAAGCCGAGCGCCACACCACCGGGACCGGACCCGGACCGGCCTATAAATTGCCCGGACCGAGCTGCAA -48  
WT ATCCATCTCTCCAAAGCCGAGCGCCACACCACCGGGACCGGACCCGGACCGGCCTATAAATTGCCCGGACCGAGCTGCAA

Сайт ініціації транскрипції (+1)

LG GCAGCTCCTCAGCAGCACTCAGCAACACATCCATCTTCACTGAAAAGTGAAAAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG 32  
WT GCAGCTCCTCAGCAGCACTCAGCAACACATCCATCTTCACTGAAAAGTGAAAAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG

Сайт ініціації трансляції (+69) →

LG GAGCAGTGAAGCGAGGAGAGGAGGCCAAGAACAAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTACGGGGGCGAACA 112  
WT GAGCAGTGAAGCGAGGAGAGGAGGCCAAGAACAAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTACGGGGGCGAACA

LG GAGCGCCCGGCTCAAGGGCACGGTGGTGCTCATGCGCAAGAAGTGTGCTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG 192  
WT GAGCGCCCGGCTCAAGGGCACGGTGGTGCTCATGCGCAAGAAGTGTGCTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG

(Мутація, що мовчить) \*

LG ACGGCATCGGCGAGTTCTCTCGGCAAGGGGTGTCACTGCCAGCTTATCAGCTCCACCGCGCTCGACCAAGGTAATCACTAC 272  
WT ACGGCATCGGCGAGTTCTCTCGGCAAGGGGTGTCACTGCCAGCTTATCAGCTCCACCGCGCTCGACCAAGGTAATCACTAC

LG CCTCTCCGGCCTTCTCTCTGTGTTTACAAGATATAGTATTTCTTTCGTGTGGGCCGGCGGCCATGGATGGATGGATGTGT 352  
WT CCTCTCCGGCCTTCTCTCTGTGTTTACAAGATATAGTATTTCTTTCGTGTGGGCCGGCGGCCATGGATGGATGGATGTGT

Фіг. 12В

LG CTGGATCGGCTAAAGAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCTGCTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCATCGAAAAA 432  
WT CTGGATCGGCTAAAGAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCTGCTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCATCGAAAAA

LG GAGACAACAGCATGCATGCATGGTGCAGCAGCAGACCGGATGCTCGAGACAAAGCAACACAACAAGC 512  
WT GAGACAACAGCATGCATGCATGGTGCAGCAGCAGACCGGATGCTCGAGACAAAGCAACACAACAAGC

LG AAGGACGACACGTCAAAAGCAACACAACAAGCAAGGACGGCAGCTCAAAAGCAACACAACCTAAACTAAAGCACAAGA 592  
WT AAGGACGACACGTCAAAAGCAACACAACAAGCAAGGACGGCAGCTCAAAAGCAACACAACCTAAACTAAAGCACAAGA

LG CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTCTATCAAAAAACAACGCTGGAAGAGAGAGAGAAGGAAGGAA 672  
WT CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTCTATCAAAAAACAACGCTGGAAGAGAGAGAGAAGGAAGGAA

LG GTAGTAGCCATGAAAAATTAATCACCAGGGCGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGGTACGTGGCATGTATAG 752  
WT GTAGTAGCCATGAAAAATTAATCACCAGGGCGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGGTACGTGGCATGTATAG

LG TTCTTGTAAGTAACTAAGCATGTGATATGAGAAAGTACGTGGTGGTGACAGACAACGGCGGTGCGGGGAAGGTGGGCGCG 832  
WT TTCTTGTAAGTAACTAAGCATGTGATATGAGAAAGTACGTGGTGGTGACAGACAACGGCGGTGCGGGGAAGGTGGGCGCG

LG GAGGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGCTGACGACGGGGGAGTCCAAGTTCGGCCTCACCTTCGACTG 912  
WT GAGGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGCTGACGACGGGGGAGTCCAAGTTCGGCCTCACCTTCGACTG

LG GGAGGTGGAGAAGCTCGGGGTGCCGGGCGCCATCGTCGTCAACAACCTACCACAGCTCCGAGTTCCTGCTTAAACCATCA 992  
WT GGAGGTGGAGAAGCTCGGGGTGCCGGGCGCCATCGTCGTCAACAACCTACCACAGCTCCGAGTTCCTGCTTAAACCATCA

LG CCCTCCACGACGTCCCGGCGCAGCGGCAACCTCACCTTCGTCGCCAATCATGGATCTACCCCGCGCCAACTACCGA 1072  
WT CCCTCCACGACGTCCCGGCGCAGCGGCAACCTCACCTTCGTCGCCAATCATGGATCTACCCCGCGCCAACTACCGA

Фир. 12C

LG TACAGCCGCGTCTTCTTCGCCAACGACGTGCGTGGATTTTCTCTACTTTCTCTCCTTTTCATTTTCACCGCCTTCGTCA 1152  
WT TACAGCCGCGTCTTCTTCGCCAACGACGTGCGTGGATTTTCTCTACTTTCTCTCCTTTTCATTTTCACCGCCTTCGTCA

LG TTCATGGTCGATCATTAAGTCTTGCCAGGACAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACTTAGCAGTACGTACATTAT 1232  
WT TTCATGGTCGATCATTAAGTCTTGCCAGGACAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACTTAGCAGTACGTACATTAT

LG TTATTCGGTGTGGTAGAAAAGGATATGGTTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAGTTGCACCGTGGCACCCTG 1312  
WT TTATTCGGTGTGGTAGAAAAGGATATGGTTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAGTTGCACCGTGGCACCCTG

LG GCAGCGTGGTAGGTGAAAATAACTGTTGCACGGATCCACCCACATGATTGTTTTCATGAATAAACTTTTAAAGGATGTGT 1392  
WT GCAGCGTGGTAGGTGAAAATAACTGTTGCACGGATCCACCCACATGATTGTTTTCATGAATAAACTTTTAAAGGATGTGT

LG CTAGCCACATCTAGATGCATGTCACATAATTATTGCATACCAAAACGATTAAATTAAGCATAAAAAGAAAAGGAAAAAA 1472  
WT CTAGCCACATCTAGATGCATGTCACATAATTATTGCATACCAAAACGATTAAATTAAGCATAAAAAGAAAAGGAAAAAA

LG TACTCACATATCTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTCAT 1552  
WT TACTCACATATCTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTCAT

LG TCTTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTCACTATGGACAACATACGAAACAAAATCAGTGGATCTCTCTATGCATTTCATT 1632  
WT TCTTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTCACTATGGACAACATACGAAACAAAATCAGTGGATCTCTCTATGCATTTCATT

LG ATGTAGTCTATAATAAAATCTTTAAAGATCGTATATTTTGCAACGGAGGGAGTAAACATAACTTTTTAATAGTAATGT 1712  
WT ATGTAGTCTATAATAAAATCTTTAAAGATCGTATATTTTGCAACGGAGGGAGTAAACATAACTTTTTAATAGTAATGT

Фир. 12D

LG TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACCTGCCGAGCCAGATGCCGGCGGCGCTGAAGCCGTACCGCGACGACGAGCTCCG 1792  
WT TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACCTGCCGAGCCAGATGCCGGCGGCGCTGAAGCCGTACCGCGACGACGAGCTCCG

LG GAACCTGCGTGGCGACGACCGAGCGGGCCCGTACCAGGAGCAGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCG 1872  
WT GAACCTGCGTGGCGACGACCGAGCGGGCCCGTACCAGGAGCAGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCG

LG GCGAGGGCGCCCCATCCTCGGCGGCAACTCCGACCACCTTACCCGCGCGCGGCGCGCACGGAGCGCAAGCCCAACGCC 1952  
WT GCGAGGGCGCCCCATCCTCGGCGGCAACTCCGACCACCTTACCCGCGCGCGGCGCGCACGGAGCGCAAGCCCAACGCC

LG AGCGACCCGAGCCTGGAGAGCCGGCTGTCGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCGCGGGACGAGAAGTTCGGCCACCTCAA 2032  
WT AGCGACCCGAGCCTGGAGAGCCGGCTGTCGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCGCGGGACGAGAAGTTCGGCCACCTCAA

LG GACGTCCGACTTCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCACGCAGGGCATCCTGCCGGCCGTGCGCACCTACGTGGACACCA 2112  
WT GACGTCCGACTTCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCACGCAGGGCATCCTGCCGGCCGTGCGCACCTACGTGGACACCA

LG CCCCCGCGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCAAGGTGGCCGCCCTG 2192  
WT CCCCCGCGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCAAGGTGGCCGCCCTG

LG GAGGAGCTCCGTAAGCAGTTCCTCGCTCCAGCTCA:CAAGGACCTCCTCCCGTCGGCGGCGACTCCCTGCTTAAGCTCCC 2272  
WT GAGGAGCTCCGTAAGCAGTTCCTCGCTCCAGCTCA:CAAGGACCTCCTCCCGTCGGCGGCGACTCCCTGCTTAAGCTCCC

( Мутантний сайт ) \*

LG CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACAGCAGGCGTGGAGGACCGACGAGGAGTTCGCACGGGAGGTGCTCGCCGA CGTCA 2352  
WT CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACAGCAGGCGTGGAGGACCGACGAGGAGTTCGCACGGGAGGTGCTCGCCGCGCTCA

Фиг. 12Е

LG ACCCGGTCATGATCACGCGTCTCACGGTGAGTCAGCGATTATTTGTTTCATTGTGTGTATGGTGTCCATGGTGAGAAAG 2432  
 WT ACCCGGTCATGATCACGCGTCTCACGGTGAGTCAGCGATTATTTGTTTCATTGTGTGTATGGTGTCCATGGTGAGAAAG

LG TGCAGATCTTGATTGCGTTGGGTGCGATGCACGCATGCTGCATGCATGCAGGAGTCCCCGCCAAAAGTAGTCTGGACC 2512  
 WT TGCAGATCTTGATTGCGTTGGGTGCGATGCACGCATGCTGCATGCATGCAGGAGTCCCCGCCAAAAGTAGTCTGGACC

LG CTAGCAAGTTTGGTGACCACACCAGCACCATCACGGCGGAGCACATAGAGAAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTGCAGCAG 2592  
 WT CTAGCAAGTTTGGTGACCACACCAGCACCATCACGGCGGAGCACATAGAGAAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTGCAGCAG

LG GTAATTGGTCCAAGCCATCGACATCAACTATGATTTACCTAGGAGTAATTGGTAGCTGTAGATAATTTGGCTTCGTTGCA 2672  
 WT GTAATTGGTCCAAGCCATCGACATCAACTATGATTTACCTAGGAGTAATTGGTAGCTGTAGATAATTTGGCTTCGTTGCA

LG ATTAATTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAATTTGCAGGCGCTGGAAAGCAACAGGCTGTACATCC 2752  
 WT ATTAATTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAATTTGCAGGCGCTGGAAAGCAACAGGCTGTACATCC

LG TTGATCACCATGACCGGTTTCATGCCGTTCTTGATCGACGTCAACAACCTGCCCGGCAACTTCATCTACGCCACGAGGACC 2832  
 WT TTGATCACCATGACCGGTTTCATGCCGTTCTTGATCGACGTCAACAACCTGCCCGGCAACTTCATCTACGCCACGAGGACC

LG CTCTTCTCTCGCGCGGCGACGGCAGGCTCACGCCTGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGCGGCCTTAC 2912  
 WT CTCTTCTCTCGCGCGGCGACGGCAGGCTCACGCCTGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGCGGCCTTAC

LG CACGGCCAAGAGCAAGGTTTACACGCCGGTGCCAGCGGCTCCGTCGAAGGCTGGGTGTGGGAGCTCGCCAAGGCCTACG 2992  
 WT CACGGCCAAGAGCAAGGTTTACACGCCGGTGCCAGCGGCTCCGTCGAAGGCTGGGTGTGGGAGCTCGCCAAGGCCTACG

LG TCGCCGTCAATGACTCCGGGTGGCACCAGCTCGTCAGCCACTGGTACGTTCTCCACGGTCGATGTGATTTCAGTCAGTCGA 3072  
 WT TCGCCGTCAATGACTCCGGGTGGCACCAGCTCGTCAGCCACTGGTACGTTCTCCACGGTCGATGTGATTTCAGTCAGTCGA

Фиг. 12F

LG TGCACAACAACGATCGAAATATGATTGATTGAAACGCGCAGGCTGAACACTCACGCGGTGATGGAGCCGTTTCGTGATCT 3152  
 WT TGCACAACAACGATCGAAATATGATTGATTGAAACGCGCAGGCTGAACACTCACGCGGTGATGGAGCCGTTTCGTGATCT

LG CGACGAACCGGACCTTAGCGTGACGACCCGGTGACAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCATGACCATCAAC 3232  
 WT CGACGAACCGGACCTTAGCGTGACGACCCGGTGACAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCATGACCATCAAC

LG GCGCTGGCGCGGACAGGCTCATCAACGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCGGGGCAAGTTCGCGTTGGGGAT 3312  
 WT GCGCTGGCGCGGACAGGCTCATCAACGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCGGGGCAAGTTCGCGTTGGGGAT

LG GTCGGCCGTGGTGTACAAGGACTGGAAGTTCACCGAGCAGGGACTGCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA 3392  
 WT GTCGGCCGTGGTGTACAAGGACTGGAAGTTCACCGAGCAGGGACTGCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA

LG AATGTTATGAATGTGTAAAACAAATTGGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAATGCAGGGGCATGGCGG 3472  
 WT AATGTTATGAATGTGTAAAACAAATTGGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAATGCAGGGGCATGGCGG

LG TGGAGGACCCGTCGAGCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTGTGCGACTACCCGTACGCGGCGGACGGGCTGGCGATCTGG 3552  
 WT TGGAGGACCCGTCGAGCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTGTGCGACTACCCGTACGCGGCGGACGGGCTGGCGATCTGG

LG CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGTGTCAGGGCGATACGGAGGT 3632  
 WT CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGTGTCAGGGCGATACGGAGGT

LG GCAGGCGTGGTGAAGGAGACGCGGAGGTGCGGCACGGCGACCTCAAGGACGCCCCATGGTGGCCCAAGATGCAAAGTG 3712  
 WT GCAGGCGTGGTGAAGGAGACGCGGAGGTGCGGCACGGCGACCTCAAGGACGCCCCATGGTGGCCCAAGATGCAAAGTG

Фіг. 12G

LG TGCCGGAGCTGGCCAAGGCGTGACACCACCATCATCTGGATCGGGTCGGCGCTGCATGCGGCAGTCAACTTCGGGCAGTAC 3792  
 WT TGCCGGAGCTGGCCAAGGCGTGACACCACCATCATCTGGATCGGGTCGGCGCTGCATGCGGCAGTCAACTTCGGGCAGTAC

LG CCCTACGCGGGGTTCTCCCGAACCGGCCGACGGTGAGCCGGCGCCGCATGCCGGAGCCCGGCACGGAGGAGTACGCGGA 3872  
 WT CCCTACGCGGGGTTCTCCCGAACCGGCCGACGGTGAGCCGGCGCCGCATGCCGGAGCCCGGCACGGAGGAGTACGCGGA

LG GCTGGAGCGCGACCCGGAGCGGGCCTTCATCCACACCATCACGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCGTGTCTGCTGCTGG 3952  
 WT GCTGGAGCGCGACCCGGAGCGGGCCTTCATCCACACCATCACGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCGTGTCTGCTGCTGG

LG AGGTGCTGTGGAAGCACTCTCCGACGAGCTGTACCTCGGGCAGCGGGACACGCCGGAGTGGACCTCGGACCCAAAGGCC 4032  
 WT AGGTGCTGTGGAAGCACTCTCCGACGAGCTGTACCTCGGGCAGCGGGACACGCCGGAGTGGACCTCGGACCCAAAGGCC

LG CTGGAGGTGTTCAAGCGGTTCAAGCGACCCGGCTGGTGGAGATCGAGAGCAAGGTGGTGGGCATGAACCATGACCCGGAGCT 4112  
 WT CTGGAGGTGTTCAAGCGGTTCAAGCGACCCGGCTGGTGGAGATCGAGAGCAAGGTGGTGGGCATGAACCATGACCCGGAGCT

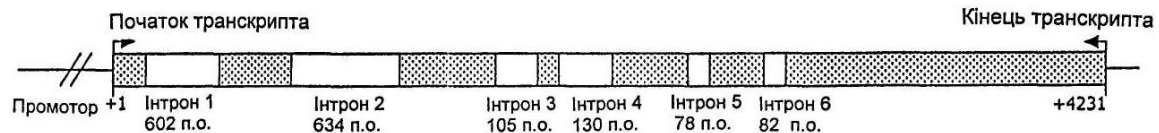
LG CAAGAACCGBAACGGCCCGGCTAAGTTTCCCTACATGCTGCTCTACCCCAACACCTCCGACCACAAGGGCGCCGCTGCCG 4192  
 WT CAAGAACCGBAACGGCCCGGCTAAGTTTCCCTACATGCTGCTCTACCCCAACACCTCCGACCACAAGGGCGCCGCTGCCG  
 Сайт завершення трансляції (4229)

LG GGCTTACGCCCAAGGGCATCCCCAACAGCATCTCTCATCTAATCTAAGCCATCGGCAACCATGGATGAATAAAGGGCGTTC 4272  
 WT GGCTTACGCCCAAGGGCATCCCCAACAGCATCTCTCATCTAATCTAAGCCATCGGCAACCATGGATGAATAAAGGGCGTTC

LG GCCACGTACGAAACTGTGCGAGAGATTGGTGTAGTGTGTGTCTGTGACAGTACTATGTCAGCAGTTGCTCTTTAAGCCGA 4352  
 WT GCCACGTACGAAACTGTGCGAGAGATTGGTGTAGTGTGTGTCTGTGACAGTACTATGTCAGCAGTTGCTCTTTAAGCCGA

LG ATAAATAAAGCAGATTGCTTCC 4375  
 WT ATAAATAAAGCAGATTGCTTCC

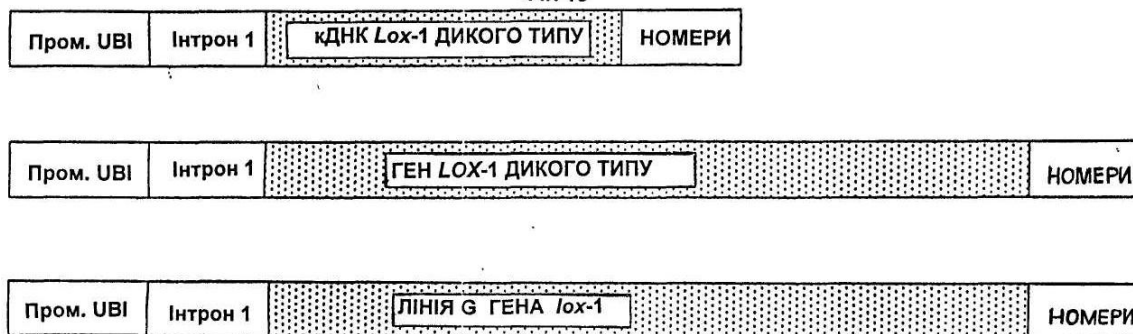
Структура гена *LOX-1* дикого типу:



Структура гена *lox-1* Лінії G:

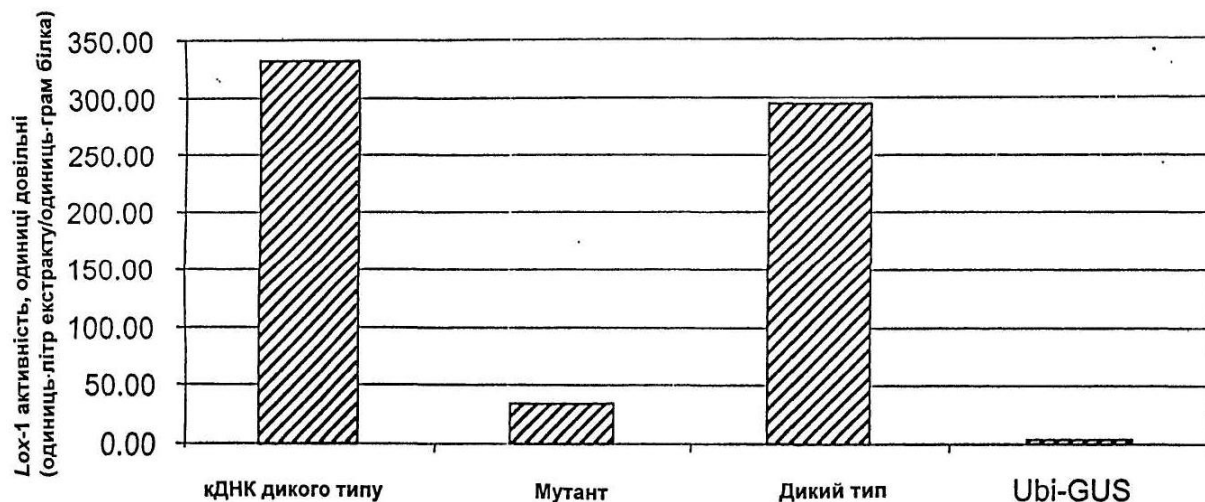


Фіг. 13



pTZ18R

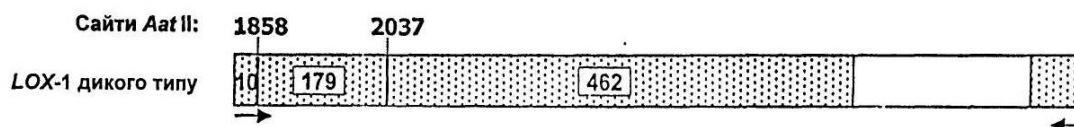
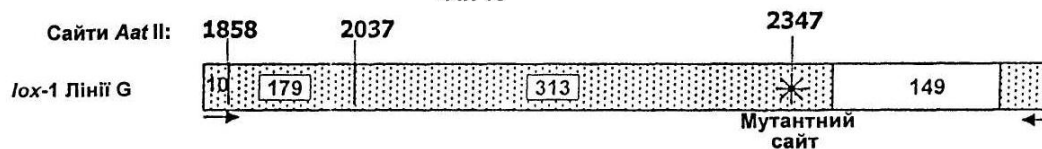
Фіг. 14



Фіг. 15

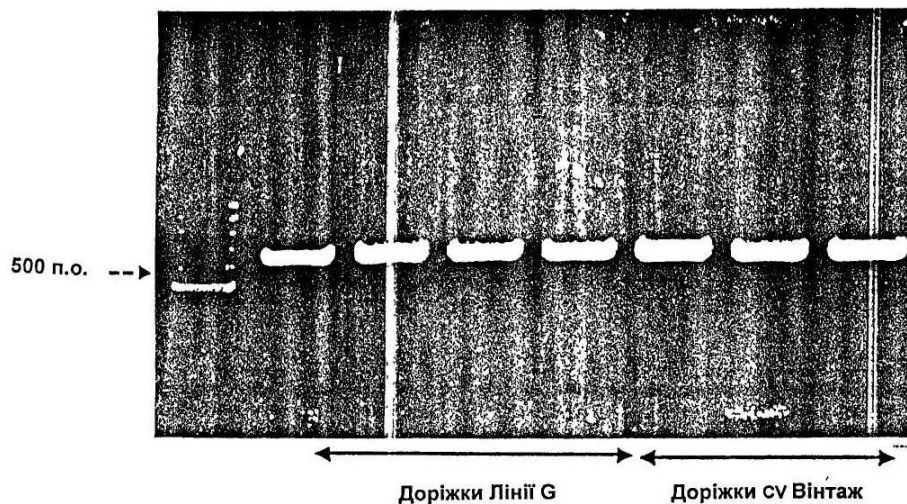


Фіг. 16

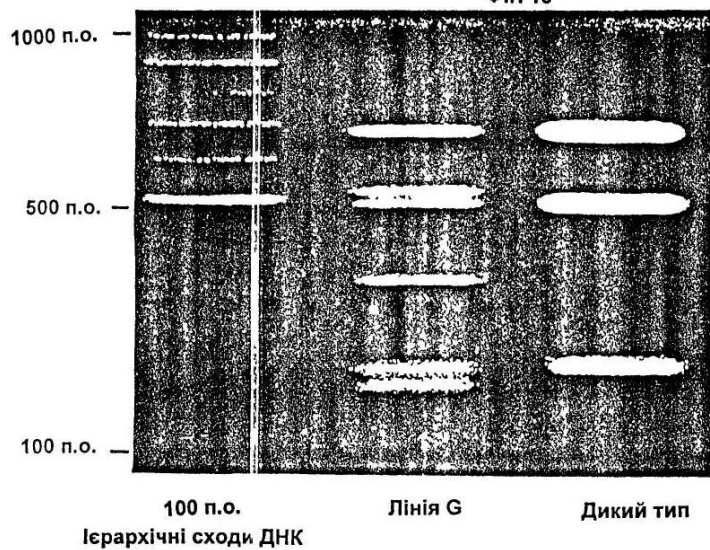


Фіг. 17



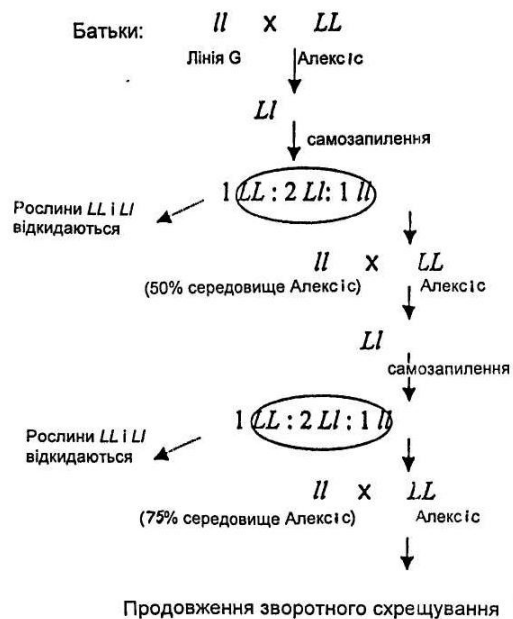


Фіг. 18



Фіг. 19

Програма зворотного схрещування Лінії G із sv Алексіс



	Очікуваний % Алексіс у $ll$	Очікувана частота $ll$	Виміряна частота $ll$
Батьки	0%		
Зворот. схрещ. 1	50%	25%	5/24~21%
Зворот. схрещ. 2	75%	25%	6/24~25%
Зворот. схрещ. 3	87,5%	25%	6/24~25%
Зворот. схрещ. 4	93,8%	25%	5/24~21%
Зворот. схрещ. 10	99,9%	25%	

Фіг. 20





Фир. 22 B

```

E14 + E15 + E16 + + H9 540
Gm1 TILFLRENGTLKPVAIELSLPHSAGDLSAAVSQVILPAKEG.VESTIWLAKAYMIVVND
Gm2 TILFLRENGTLKPVAIELSLPHSAGDLSGAVSQVILPAKEG.VESTIWLAKAYMIVVND
Gm3 TILFLKNGDGLRPLAIELSLPHSAGDLSGAVSQVILPAKEG.VESSIWLAKAYMIVVND
Hv2 TLLFLRGDGLAPVAIELSSPLIQGELTTAKSAVYTPQHAG.VEGWIWOLAKAYASVNDY
Hv1 TLFLFLRGDGLRPLAIELSEPIIQGGLTTAKSKVYTPVPSGVEGWVWELAKAYMIVVND
541 • • • H9 + H10 + • H11 + 600+
Gm1 CYHQLMSHMLNTHAAAMEPFVIAIATNRHLSVLHPIYKLLTPHYRNMNINALARQSLINAG
Gm2 CYHQLMSHMLNTHAAVIEPFIATNRHLSALHPIYKLLTPHYRDTMNTINALARQSLINADG
Gm3 CYHQLMSHMLNTHAAVIEPFIATNRHLSVHPIYKLLTPHYRDTMNTINALARQSLINADGG
Hv2 GWHQLMSHMLNTHAAVIEPFIATNRQLSVTHPVYKLLTPHYRDTMNTINARARGILINAGG
Hv1 GWHQLMSHMLNTHAAVIEPFIATNRHLSVTHPVHKLSPHYRDTMNTINARQTLINAGG
601 H12 H13 + H14 + E + E + 660
Gm1 IIEETFLPSKYSVEMSSAVYKQWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSTPHGVRLIEDYPYA
Gm2 IIEKSLPSKHSVEMSSAVYKQWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSTPHGVRLIEDYPYA
Gm3 IIEQTLPSKYSVEMSSAVYKQWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSTPHGVRLIEDYPYT
Hv2 IIEETFLPSKYSVEMSSAVYKQWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSTPHGVRLIEDYPYA
Hv1 IIEETFLPSKYSVEMSSAVYKQWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSTPHGVRLIEDYPYA
661 H15 H16 H17 + + + 720
Gm1 ADGLEIWAIAIKTWQYEVPLYYARDDDVKNDSELQHWKKEAVEKGHGDLKDKPWWPKLQT
Gm2 VDGLEIWAIAIKTWQYEVPLYYARDDDVKNDSELQHWKKEAVEKGHGDLKDKPWWPKLQT
Gm3 VDGLEIWAIAIKTWQYEVPLYYARDDDVKNDSELQHWKKEAVEKGHGDLKDKPWWPKLQT
Hv2 TDGLEIWAIAIKTWQYEVPLYYARDDDVKNDSELQHWKKEAVEKGHGDLKDKPWWPKLQT
Hv1 ADGLEIWAIAIKTWQYEVPLYYARDDDVKNDSELQHWKKEAVEKGHGDLKDKPWWPKLQT
721 H18 • • • + • + H19 780
Gm1 LEDLVEVCLIIIIWIASALHAANFGQYHYGGLIMNRPTASRRLLPEKGTPEYEEMINNHE
Gm2 IEELVEICTIIIIWIASALHAANFGQYHYGGLIMNRPTASRRLLPEKGTPEYEEMINNHE
Gm3 REELVEACAIIIIIWIASALHAANFGQYHYGGLIMNRPTASRRLLPEKGTPEYEEMINNHE
Hv2 VAEELIKACATIIIIWIASALHAANFGQYHYGGLIMNRPTASRRLLPEKGTPEYEEMINNHE
Hv1 VPELAKACTIIIIWIASALHAANFGQYHYGGLIMNRPTASRRLLPEKGTPEYEEMINNHE
781 H20 H21 • • • + + H22 840
Gm1 KAYLRTITSKLPTLISLSVIEILSRHASDEVYLGQRDNPHWTSKALQAFQKFGNKLKE
Gm2 KAYLRTITSKLPTLISLSVIEILSRHASDEVYLGQRDNPHWTSKALQAFQKFGNKLKE
Gm3 KAYLRTITSKLPTLISLSVIEILSRHASDEVYLGQRDNPHWTSKALQAFQKFGNKLKE
Hv2 KAFIRITITSQFHALVIGISLMEILSKHSSDEVYLGQRDNPHWTSKALQAFQKFGNKLKE
Hv1 RAFIRITITSQFHALVIGISLMEILSKHSSDEVYLGQRDNPHWTSKALQAFQKFGNKLKE
841 ++ + + + 895*
Gm1 IEKLVRRNNDPSLQGNRLGPVQLPYTLLPSSEE.....GLTFRGIPNSIST
Gm2 IEKLVRRNNDPSLQGNRLGPVQLPYTLLPSSEE.....GLTFRGIPNSIST
Gm3 IEKLVRRNNDPSLQGNRLGPVQLPYTLLPSSEE.....GLTFRGIPNSIST
Hv2 IEKLVRRNNDPSLQGNRLGPVQLPYTLLPSSEE.....GLTFRGIPNSIST
Hv1 IEKLVRRNNDPSLQGNRLGPVQLPYTLLPSSEE.....GLTFRGIPNSIST

```

Gm1 SEQ ID NO:15  
Gm2 SEQ ID NO:16  
Gm3 SEQ ID NO:17  
Hv2 SEQ ID NO:18  
Hv1 SEQ ID NO:9

\*Система нумерації, показана над порівнювальними послідовностями, не відповідає дійсній кількості амінокислот будь-якої ліпоксигеназної послідовності в наведеному порівняльному аналізі.