

Ця заявка заявляє пріоритет попередньої заявки США №60/311,282, поданої 9 серпня 2001р.

Даний винахід у цілому стосується рослин, які мають підвищену резистентність до імідазолінових гербіцидів. Тобто даний винахід стосується пшеничних культур, одержаних шляхом мутагенезу та кросбридингу і перетворення, які мають підвищену резистентність до імідазолінових гербіцидів.

Синтаза ацетогідроксіоцтової кислоти (AHAS; EC 4.1.3.18) є першим ферментом, який каталізує біохімічний синтез амінокислот з розгалуженими ланцюгами валіну, лейцину та ізолейцину [Singh B. K., 1999 Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine in: Singh B. K. (Ed) Plant amino acids. Marcel Dekker Inc. New York, New York. Pg 227-247]. AHAS є місцем дії чотирьох різних за структурою груп гербіцидів, включаючи сульфонілсечовини [LaRossa RA and Falco SC, 1984 Trends Biotechnol 2:158-161], імідазолінони [Shaner et al., 1984 Plant Physiol 76:545-546], триазолопіримідини [Subramanian and Gerwick, 1989 Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines in (ed) Whitaker JR, Sonnet PE Biocatalysis in agricultural biotechnology. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C. Pg 277-288] та піримідилоксибензоати [Subramanian et al., 1990 Plant Physiol 94: 239-244]. Імідазолінові та сульфонілсечовинні гербіциди широко застосовують у сучасному сільському господарстві завдяки їхній ефективності при дуже низьких нормах внесення та відносній нетоксичності для тварин. Шляхом інгібування активності AHAS ці групи гербіцидів перешкоджають ростові та розвиткові чутливих до них рослин, включаючи багато видів бур'янів. Прикладами імідазолінових гербіцидів серійного виробництва є PURSUIT® (імазетаніп), SCEPTER® (імазахін) та ARSENAL® (імазаніп). Приклади сульфонілсечовинних гербіцидів є хлорсульфурон, метсульфурон-метил, сульфометурон-метил, хлоримурон-етил, трифенсульфурон-метил, трибенурон-метил, бенсульфурон-метил, нікосульфурон, етаметсульфурон-метил, римсульфурон, трифлусульфурон-метил, триасульфурон, примісульфурон-метил, циносульфурон, амідосульфурон, флузасульфурон, імазосульфурон, піразосульфурон-етил та галосульфурон.

Завдяки їх високій ефективності та низькій токсичності, імідазоліновим гербіцидам віддають перевагу, коли йдеться про нанесення шляхом розпилення над широкими площами рослинних культур. Можливість розпилення гербіциду над великими площами рослинних культур знижує витрати, пов'язані зі створенням плантацій та доглядом за ними і зменшує потребу в підготуванні місця до застосування таких хімікатів. Розпилення над потрібними толерантними видами в результаті також забезпечує можливість досягнення максимального врожаю потрібних культур завдяки відсутності конкуруючих видів. Однак, можливість застосування таких способів розпилення залежить від наявності резистентних до імідазолінону видів потрібних рослин на площі розпилення.

Серед основних сільськогосподарських культур деякі види зернобобових, такі як соя, мають природну резистентність до імідазолінових гербіцидів завдяки їх здатності до швидкого засвоєння гербіцидних сполук [Shaner and Robinson, 1985 Weed Sci. 33:469-471]. Інші культури, такі як кукурудза [Newhouse et al., 1992 Plant Physiol. 100:882-886] та рис [Barrette et al., 1989 Crop Safeners for Herbicides, Academic Press New York, pp. 195-220], певною мірою є чутливими до імідазолінових гербіцидів. Розбіжності в чутливості до імідазолінових гербіцидів залежать від хімічної природи конкретного гербіциду та характеру метаболізму сполуки від токсичної до нетоксичної форми в кожній рослині [Shaner et al., 1984 Plant Physiol. 76:545-546; Brown et al., 1987 Pestic. Biochem. Physiol. 27:24-29]. Інші фізіологічні розбіжності рослин, такі як абсорбція та транслокація, також відіграють важливу роль у чутливості [Shaner and Robinson, 1985 Weed Sci. 33:469-471].

Культурні сорти, резистентні до імідазолінонів, сульфонілсечовин та триазолопіримідинів, успішно виводилися з застосуванням насіння, мікроспор, пилку та мутагенезу калюсу в *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Glycine max*, and *Nicotiana tabacum* [Sebastian et al., 1989 Crop Sci. 29:1403-1408; Swanson et al., 1989 Theor. Appl. Genet. 78:525-530; Newhouse et al., 1991 Theor. Appl. Genet. 83:65-70; Sathasivan et al., 1991 Plant Physiol. 97:1044-1050; Mourand et al., 1993 J. Heredity 84: 91-96]. В усіх випадках резистентність забезпечував єдиний, частково домінуючий ядерний ген. Раніше також були виведені чотири резистентні до імідазолінону пшеничні культури після мутагенезу насіння *Triticum aestivum* L. cv Fidel [Newhouse et al., 1992 Plant Physiol. 100:882-886]. Дослідження успадкування підтвердили, що єдиний, частково домінуючий ген забезпечував резистентність. На основі алельних досліджень автори дійшли висновку, що мутації в чотирьох ідентифікованих лініях містилися в одному місці. Один з генів резистентності культури Fidel було позначено як FS-4 [Newhouse et al., 1992 Plant Physiol. 100:882-886].

Комп'ютерне моделювання тривимірної конформації комплексу AHAS-інгібітора передбачає кілька амінокислот у запропонованій кишені зв'язування інгібітора як місця, де викликані мутації можуть забезпечувати вибірку резистентності до імідазолінонів [Ott et al., 1996 J. Mol. Biol. 263:359-368]. Пшеничні культури, одержані за допомогою деяких із цих раціонально спланованих мутацій у запропонованих місцях зв'язування ферменту AHAS, фактично інгібували специфічну резистентність до єдиного класу гербіцидів [Ott et al., 1996 J. Mol. Biol. 263:359-368].

Про резистентність рослин до імідазолінових гербіцидів також повідомлялося в багатьох патентах. У патентах США №№ 4,761,373, 5,331,107, 5,304,732, 6,211,438, 6,211,439 та 6,222,100 у загальних описах описано застосування зміненого гена AHAS для викликання резистентності до гербіцидів у рослинах і докладно описано деякі резистентні до імідазолінону лінії кукурудзи. У патенті США №5,013,659 описано рослини, які виявляють резистентність до гербіцидів і мають мутації у принаймні одній амінокислоті в одній або кількох збережених ділянках. Описані в ньому мутації кодують або перевернуто резистентність до імідазолінонів та сульфонілсечовин або специфічну до сульфонілсечовини резистентність, але специфічна до імідазолінону резистентність не описується. Крім того, в патенті США №5,731,180 та патенті США №5,767,361 обговорюється виділений ген, який має єдине амінокислотне заміщення в амінокислотній послідовності AHAS однодольних дикого типу, яка в результаті забезпечує специфічну до імідазолінону резистентність.

До цього часу в роботах існуючого рівня техніки не було описано резистентних до імідазолінону пшеничних культур, які містять більше одного зміненого гена AHAS. Так само в роботах існуючого рівня техніки не було описано резистентних до імідазолінону пшеничних культур, які містять мутації в геномах, крім геному, від якого походить ген FS-4. Таким чином, дана галузь потребує ідентифікації генів резистентності до імідазолінону з додаткових геномів. Дана галузь також потребує пшеничних культур, які

мають підвищену резистентність до гербіцидів, таких як імідазолінон, і містять більше одного зміненого гена AHAS. Потрібні також способи контролю над ростом бур'янів поблизу від таких пшеничних культур. Ці композиції та способи дозволяють застосовувати технології розпилення при нанесенні гербіцидів на площі з пшеничними культурами.

Даний винахід забезпечує пшеничні культури, які включають IMI нуклеїнові кислоти, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінонового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу. Пшеничні культури можуть містити одну, дві, три або більше IMI нуклеїнових кислот. В одному варіанті втілення пшенична культура включає кілька IMI нуклеїнових кислот, які містяться в різних геномах. В оптимальному варіанті IMI нуклеїнові кислоти кодують білки, які включають мутацію в консервативній амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з Домену А, Домену В, Домену С, Домену D та Домену Е. У ще кращому варіанті мутація міститься в консервативному Домені Е або консервативному Домені С. Забезпечуються також частини рослин та насіння рослин, отримані від описаних авторами пшеничних культур. В іншому варіанті втілення пшенична культура включає IMI нуклеїнову кислоту, яка не є Imi1 нуклеїновою кислотою. IMI нуклеїнова кислота може бути, наприклад, Imi2 або Imi3 нуклеїновою кислотою.

IMI нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть включати нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка складається з: полінуклеотиду SEQ ID NO:1; полінуклеотиду SEQ ID NO:3; полінуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид SEQ ID NO:2; полінуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид SEQ ID NO:4; полінуклеотиду, який включає принаймні 60 послідовних нуклеотидів будь-якого з вищезгаданих полінуклеотидів; та полінуклеотиду, комплементарного будь-якому з вищезгаданих полінуклеотидів.

Рослини даного винаходу можуть бути трансгенними або нетрансгенними. Прикладами нетрансгенних пшеничних культур з підвищеною резистентністю до імідазолінонових гербіцидів є пшенична культура, яка має Номер патентного депонування ATCC PTA-3953 або PTA-3955; або мутантна, рекомбінантна або піддана генній інженерії похідна рослини з номером патентного депонування ATCC PTA-3953 або PTA-3955; або будь-якого потомства рослини з номером патентного депонування ATCC PTA-3953 або PTA-3955; або рослина, яка є потомством будь-якої з цих рослин.

Крім композицій даного винаходу, забезпечується кілька способів. Авторами описано способи зміни толерантності рослини до імідазолінонового гербіциду, які включають зміну експресії IMI нуклеїнової кислоти в рослині. Описано також способи одержання трансгенної рослини, яка має підвищену толерантність до імідазолінонового гербіциду, які включають перетворення рослинної клітини вектором експресії, що включає одну або кілька IMI нуклеїнових кислот, та вирощування рослини з рослинної клітини. Винахід також охоплює спосіб контролю над бур'янами в оточенні пшеничної культури, який включає нанесення імідазолінонового гербіциду на бур'яни та пшеничну культуру, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінонового гербіциду порівняно з сортом пшеничної культури дикого типу, і рослина містить одну або кілька IMI нуклеїнових кислот. У деяких оптимальних варіантах втілення цих способів рослини включають множинні IMI нуклеїнові кислоти, які містяться в різних геномах пшениці.

Фігура 1 є таблицею, на якій показано результати оцінки резистентності однієї рослини до імазамоксу в популяціях батьківської рослини та покоління F₁, одержаного в результаті взаємного схрещування між резистентними лініями та CDC Teal. Цифри означають кількість рослин, занесених до кожного фенотипічного класу. Батьківські лінії позначено жирним шрифтом. Кількість батьківських ліній включає лінії, зараховані до популяцій F₂.

Фігура 2 є таблицею, на якій показано реакцію на імазамокс у популяціях F₂ та BCF₁, одержаних у результаті схрещування між резистентними лініями та CDC Teal, і результати тестів Chi-square однолокусних та дволокусних моделей (15A×Teal) для контролю резистентності. Символи, використані на Фігурі 2, означають: a - значення P Chi-square (1 df) представляє ймовірність того, що відхилення від випробуваного співвідношення зумовлюються лише випадком. Значення P Chi-squares, більші за 0,05, вказують на те, що значення, які спостерігалися, не мали значних відмінностей від очікуваних значень; b - значення P Chi-square, яке представляє ймовірність того, що відхилення між популяціями F₂, одержаними в результаті взаємного схрещування між CDC Teal та резистентними лініями, зумовлюються лише випадком. Значення Chi-square, більші за 0,05, вказують на те, що взаємні популяції F₂ були гомогенними, і дані між двома взаємними популяціями були об'єднані; c - CDC Teal використовували як повторну батьківську рослину; d - випробувані співвідношення ґрунтувалися на результатах покоління F₂; і e - значення P Chi-square (1 df) для співвідношення BCF₁.

Фігура 3 є таблицею, на якій показано результати оцінки резистентності до імазамоксу в групах F_{2:3} у результаті схрещування між резистентними лініями та CDC Teal, і результати тестів Chi-square однолокусних та двофокусних моделей (15A×Teal) для контролю резистентності. Символи, використані на Фігурі 3, означають: a - випробувані співвідношення сегрегації в групі ґрунтувалися на результатах популяцій F₂ та BCF₁; b - значення P Chi-square (2 df), яке представляє ймовірність того, що відхилення від випробуваного співвідношення зумовлюються лише випадком. Значення P Chi-squares, більші за 0,05, вказують на те, що значення, які спостерігалися, не мали значних відмінностей від очікуваних значень.

Фігура 4 є таблицею, на якій показано результати оцінки резистентності однієї рослини до імазамоксу в популяціях F₂ у результаті взаємного схрещування між резистентними лініями. Співвідношення згідно з тестом Chi-square ґрунтувалися на результатах у групах F₂ та F_{2:3}, одержаних від схрещування між резистентними лініями та CDC Teal. Випробуване співвідношення 15:1 стосується дволокусної моделі, а випробуване співвідношення 63:1 стосується трилокусної моделі. Символ "a", використаний на Фігурі 4, означає: значення P Chi-square (1 df), яке представляє ймовірність того, що відхилення від випробуваного співвідношення зумовлюються лише випадком. Значення P Chi-squares, більші за 0,05, вказують на те, що значення, які спостерігалися, не мали значних відмінностей від очікуваних значень.

Фігура 5 є таблицею, на якій показано результати оцінки імазамоксу резистентність у групах F_{2:3} у результаті сегрегуючого взаємного схрещування між резистентними лініями. Символи, використані на Фігурі 5, означають: a - випробувані співвідношення сегрегації в групі ґрунтувалися на результатах досліджених

популяцій F_2 ; b - значення P Chi-square (2 df), яке представляє ймовірність того, що відхилення від випробуваного співвідношення зумовлюються лише випадком. Значення P Chi-squares, більші за 0,05, вказують на те, що значення, які спостерігалися, не мали значних відмінностей від очікуваних значень.

Фігура 6 є таблицею з порівнянням відсотка неінгібованої *in vitro* активності AHAS у чотирьох лініях пшениці у присутності зростаючих концентрацій імідазолінового гербіциду імазамокс. Teal є лінією дикого типу без толерантності до імідазолінових гербіцидів, тоді як BW755 містить FS4 мутантний ген.

Фігура 7 є таблицею з порівнянням витримування ураження трьома генотипами пшениці, обробленими імазамоксом у кількості 10X або 30X. Норма 1X становить 20г/га. BW755 містить FS4 мутантний ген. 15A/11A є основною кількістю змішаного потомства від схрещування Teal11A та Teal15A. Популяція ще не була гомозиготною в усіх трьох неалельних локусах.

Фігура 8 показує лінійне розташування послідовності ДНК часткових генів пшениці Als1 та Imi1, ампліфікованих із геномної ДНК: CDC Teal (рядок 2; SEQ ID NO:15 і SEQ ID NO:16), BW755 (рядок 3; SEQ ID NO:17 і SEQ ID NO:18), TealIMI 10A (рядок 4; SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:20), TealIMI 11A (рядок 5; SEQ ID NO:21 і SEQ ID NO:22) і TealIMI 15A (рядок 6; SEQ ID NO:23 і SEQ ID NO:24). Часткові послідовності сумішали з повною послідовністю гена рису ALS (рядок 1; SEQ ID NO:13 і SEQ ID NO:14), отриманого з банку генів (інвентарний номер ABO49822) і переносили на білкові послідовності (представлені над послідовностями ДНК). П'ять висококонсервативних амінокислотних доменів, що містять мутації, які забезпечують резистентність до інгібіторів AHAS, позначено жирним шрифтом. Заміщення гуанідину аденіном у BW755, TealIMI 10A та TealIMI 15A ведуть до заміщення серину аспарагіном (серин627 у рисі) в домені IPSSG (Домен E) Als1 гена. Відповідно, гени резистентності, присутні у рослинах BW755, TealIMI 10A та TealIMI 15A, були вказані як частина мі1 класу. Ці гени резистентності Teal вказуються авторами як TealIMI1 10A та TealIMI1 15A.

Фігура 9 показує лінійне розташування послідовності ДНК часткових генів пшениці Als2 та Imi2, ампліфікованих із геномної ДНК: CDC Teal (рядок 2; SEQ ID NO:25 і SEQ ID NO:26), BW755 (рядок 3; SEQ ID NO:27 і SEQ ID NO:28), TealIMI 10A (рядок 4; SEQ ID NO:29 і SEQ ID NO:30), TealIMI 11A (рядок 5; SEQ ID NO:31 і SEQ ID NO:32) і TealIMI 15A (рядок 6; SEQ ID NO:33 і SEQ ID NO:34). Часткові послідовності AHAS сумішали з повною послідовністю AHAS рису (рядок 1; SEQ ID NO:13 і SEQ ID NO:14), отриманою з банку генів (інвентарний номер ABO49822) і переносили в білкові послідовності (представлені над послідовностями ДНК). П'ять висококонсервативних амінокислотних доменів, що містять мутації, які забезпечують резистентність до інгібіторів AHAS, позначено жирним шрифтом. Заміщення гуанідину аденіном у TealIMI 11A в результаті веде до заміщення серину аспарагіном (серин627 у рисі) в домені IPSSG Als2 гена. Відповідно, ген резистентності, присутній у рослині TealIMI 11A, було вказано як частину класу Iti2 нуклеїнових кислот. Цей ген резистентності Teal вказано авторами як TealIMI2 11A.

Фігура 10 показує часткову послідовність ДНК TealIMI1 15A (SEQ ID NO:1) та виведену з неї амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:2).

Фігура 11 показує часткову послідовність ДНК TealIMI2 11A (SEQ ID NO:3) та виведену з неї амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:4).

Фігура 12 показує нуклеїновокислотну послідовність Teal ALS1 ORF дикого типу (SEQ ID NO:5), Teal ALS2 ORF (SEQ ID NO:6) Teal ALS3 ORF (SEQ ID NO:7).

Фігура 13 є схематичним зображенням консервативних амінокислотних послідовностей в AHAS генах, пов'язаних із резистентністю до різних інгібіторів AHAS. Конкретну амінокислотну ділянку, яка відповідає за резистентність, позначено підкресленням. [Modified from Devine, M. D. and Eberlein, C V., 1997 Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites in Herbicide Activity: Toxicity, Biochemistry, and Molecular Biology, IOS Press Amsterdam, p. 159-185].

Даний винахід стосується пшеничних культур, частин пшеничних культур та клітин пшеничних культур з підвищеною резистентністю до імідазолінових гербіцидів. Даний винахід також охоплює насіння, вироблене описаними авторами пшеничними культурами, та способи контролю над бур'янами в оточенні описаних авторами пшеничних культур. Слід розуміти, що вжита в описі та формулі форма однини може означати як одиницю, так і множину, залежно від контексту, в якому її вжито. Так, наприклад, посилання на "клітину" може означати використання принаймні однієї клітини.

Вжитий авторами термін "пшенична культура" стосується рослини, яка належить до роду *Triticum*. Пшеничні культури даного винаходу можуть належати до роду *Triticum*, включаючи, крім інших, *T. aestivum*, *T. turgidum*, *T. timopheevii*, *T. monosocum*, *T. zhukovskiy* та *T. urartu* і їх гібриди. Прикладами підвиду *T. aestivum*, які охоплюються даним винаходом, є *aestivum* (пшениця звичайна), *compactum* (карликова пшениця), *macha* (пшениця маха), *vavilovi* (пшениця Вавілова), *spelta* та *sphaerococcum* (пшениця спельта). Прикладами підвиду *T. turgidum*, які охоплюються даним винаходом, є *turgidum*, *carthlicum*, *dicoccon*, *durum*, *paleocolchicum*, *polonicum*, *turanicum* та *dicoccoides*. Прикладами підвиду *T. monosocums*, які охоплюються даним винаходом, є *monosocum* (*einkorn*) та *aegilopoides*. В одному варіанті втілення даного винаходу пшенична культура належить до виду *Triticum aestivum* species, точніше, сорту CDC Teal.

Термін "пшенична культура" охоплює пшеничні культури на будь-якій стадії стиглості або розвитку, а також будь-які тканини або органи (частини рослин), взяті або одержані від будь-якої подібної рослини, якщо в контексті прямо не вказано іншого. До частин рослин належать, крім інших, стебла, коріння, квітки, насінні зачатки, тичинки, листя, зародки, ділянки меристеми, тканина калюсу, культури пиляка, гаметофіти, спорофіти, пилки, мікроспори, протопласти та ін. Даний винахід також охоплює насіння, вироблене пшеничними культурами даного винаходу. В одному варіанті втілення насіння одержують шляхом розведення гомозигот для підвищеної резистентності до імідазолінового гербіциду порівняно з насінням сорту пшеничної культури дикого типу.

У даному винаході описано пшеничну культуру, яка включає одну або кілька IMI нуклеїнових кислот, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу. Вжитий авторами термін "IMI нуклеїнова кислота" стосується нуклеїнової кислоти, яка є мутованою від нуклеїнової кислоти AHAS у пшеничній культурі дикого типу, і яка надає підвищеної резистентності до імідазолінону рослині, в якій вона транскрибується. Нуклеїнові кислоти AHAS Teal дикого типу показано в SEQ ID NO:5 (Teal ALS1 ORF), SEQ ID NO:6 (Teal ALS2 ORF) і SEQ ID NO:7

(Teal ALS3 ORF). В одному варіанті втілення пшенична культура включає множинні IMI нуклеїнові кислоти. Вжитий в описі IMI нуклеїнових кислот термін "множинні" стосується IMI нуклеїнових кислот, які мають різні нуклеотидні послідовності і не стосується простого збільшення кількості однієї IMI нуклеїнової кислоти. Наприклад, IMI нуклеїнові кислоти можуть бути різними через те, що вони походять із різних геномів або містяться в різних геномах пшениці.

Пшеничні культури даного винаходу можуть мати множинні IMI нуклеїнові кислоти з різних геномів, оскільки ці рослини можуть містити більше одного геному. Наприклад, пшенична культура *Triticum aestivum* містить три геноми, які іноді називають геномами A, B та D. Оскільки AHAS є потрібним метаболічним ферментом, то вважається, що геном має принаймні один ген, який кодує фермент AHAS, який зазвичай спостерігається з іншими метаболічними ферментами в гексаплоїдній пшениці, підданій картуванню. Нуклеїнова кислота AHAS у кожному геномі може відрізнятися і зазвичай відрізняється своєю нуклеотидною послідовністю від нуклеїнової кислоти AHAS в іншому геномі. Спеціаліст у даній галузі може визначити геном походження кожної нуклеїнової кислоти AHAS, застосовуючи генетичний кросинг та/або інші способи секвенування або гідроліз екзонуклеази, які відомі спеціалістам, а також описані нижче у Прикладі 2. З точки зору цього винаходу, IMI нуклеїнові кислоти, які походять із одного з геномів A, B або D, розпізнають і позначають як нуклеїнові кислоти lmi1, lmi2 або lmi3.

Автори не стверджують, що будь-який конкретний клас IMI нуклеїнової кислоти співвідноситься з будь-яким конкретним геномом A, B або D. Наприклад, автори не стверджують, що lmi1 нуклеїнові кислоти співвідносяться з нуклеїновими кислотами геному A, що lmi2 нуклеїнові кислоти співвідносяться з нуклеїновими кислотами геному B і т. д. Позначення lmi1, lmi2 та lmi3 лише вказують, що IMI нуклеїнові кислоти в межах кожного такого класу не виділяються незалежно, тоді як дві IMI нуклеїнові кислоти різних класів виділяються незалежно і, таким чином, можуть походити з різних геномів пшениці. Клас lmi1 нуклеїнових кислот включає FS-4 ген, як описано в роботі Newhouse et al. [1992 Plant Physiol. 100:882-886], та ген TealIMI1 15A, детальніше описаний нижче. Клас lmi2 нуклеїнових кислот включає ген TealIMI2 11A, описаний нижче. Кожен lmi клас може включати члени інших видів пшениці. Отже, кожен lmi клас включає IMI нуклеїнові кислоти, які відрізняються за своєю нуклеотидною послідовністю, але, незважаючи на це, позначаються як такі, що походять або містяться в одному геномі пшениці, на основі дослідження успадкування, як описано нижче у Прикладах і відомо спеціалістам у даній галузі.

Відповідно, даний винахід охоплює пшеничну культуру, яка включає одну або кілька IMI нуклеїнових кислот, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу, і одну або кілька IMI нуклеїнових кислот вибирають із групи, яка складається з нуклеїнової кислоти lmi1, lmi2 та lmi3. В одному варіанті втілення рослина містить lmi1 нуклеїнову кислоту та lmi3 нуклеїнову кислоту. В оптимальному варіанті втілення lmi1 нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність, показану в SEQ ID NO:1. В іншому варіанті втілення рослина містить lmi2 нуклеїнову кислоту. В оптимальному варіанті втілення lmi2 нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність, показану в SEQ ID NO:3.

Вжитий авторами по відношенню до нуклеїнових кислот термін "із" стосується нуклеїнової кислоти, яка "міститься у" або "походить із" конкретного геному. Термін "міститься у" стосується нуклеїнової кислоти, яка міститься в межах конкретного геному. Також вжитий авторами по відношенню до геному термін "походить із" стосується нуклеїнової кислоти, видаленої або виділеної з цього геному. Термін "виділений" детальніше визначено нижче.

В іншому варіанті втілення пшенична культура включає IMI нуклеїнову кислоту, причому ця нуклеїнова кислота не є lmi1 нуклеїновою кислотою. Термін "не lmi1" стосується IMI нуклеїнової кислоти, яка не належить до lmi1 класу, як описано вище. Приклади нуклеїнових кислот lmi1 класу показано в рядках 3, 4 та 5 на Фігурі 8. Один приклад не lmi1 нуклеїнової кислоти показано в рядку 5 на Фігурі 8. Відповідно, в оптимальному варіанті втілення пшенична культура містить IMI нуклеїнову кислоту, яка включає полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид SEQ ID NO:4. Полінуклеотидна послідовність може включати послідовність, показану в SEQ ID NO:3.

Даний винахід включає пшеничні культури, які містять одну, дві, три або більше IMI нуклеїнових кислот, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу. IMI нуклеїнові кислоти можуть включати нуклеотидну послідовність вибрану з групи, яка складається з полінуклеотиду SEQ ID NO:1; полінуклеотиду SEQ ID NO:3; полінуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид SEQ ED NO:2; полінуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид SEQ ID NO:4, полінуклеотиду, який включає принаймні 60 послідовних нуклеотидів будь-якого з вищезгаданих полінуклеотидів; та полінуклеотиду, комплементарного будь-якому з вищезгаданих полінуклеотидів.

Імідазоліновий гербіцид може бути вибраний, крім інших, з-поміж, PURSUIT® (імазетаніп), CADRE® (імазапіку), RAPTOR® (імазамокс), SCEPTER® (імазахін), ASSERT® (імазетабензу), ARSENAL® (імазапір), похідної будь-якого з вищезгаданих гербіцидів або суміші двох або більшої кількості вищезгаданих гербіцидів, наприклад, імазапіру/імазамоксу (ODYSSEY®). Точніше, імідазоліновий гербіцид може бути вибраний, крім інших, з-поміж, 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-нікотинової кислоти, 2-(4-ізопропіл)-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-3-хінолінкарбонової кислоти, 5-етил-2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-нікотинової кислоти, 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-5-(метоксиметил)-нікотинової кислоти, 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-5-метилнікотинової кислоти, та суміші метил 6-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-(ті-толуату і метил 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-m-толуату. Перевагу віддають застосуванню 5-етил-2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-нікотинової кислоти та 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-5-(метоксиметил)-нікотинової кислоти. Особливу перевагу віддають застосуванню 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-5-(метоксиметил)-нікотинової кислоти.

В одному варіанті втілення пшенична культура містить дві IMI нуклеїнові кислоти, причому нуклеїнові кислоти походять із або містяться в різних геномах пшениці. В оптимальному варіанті однією з двох нуклеїнових кислот є lmi1 нуклеїнова кислота, краще - якщо вона включає полінуклеотидну послідовність

SEQ ID NO:1. В іншому варіанті втілення пшенична культура містить одну ІМІ нуклеїнову кислоту, причому нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3. У ще одному варіанті втілення пшенична культура містить три або більше ІМІ нуклеїнових кислот, причому кожна нуклеїнова кислота походить із свого геному. В оптимальному варіанті принаймні одна з трьох ІМІ нуклеїнових кислот включає полінуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:3.

В оптимальному варіанті втілення даного винаходу одна або кілька ІМІ нуклеїнових кислот, які містяться в рослині, кодують амінокислотну послідовність, яка включає мутацію в домені, збереженому серед кількох білків AHAS. Ці консервативні домени вказуються авторами як Домен А, Домен В, Домен С, Домен D та Домен Е. Фігура 13 показує загальне розташування кожного домену в білку AHAS. Вжитий авторами термін Домен А містить амінокислотну послідовність AITGQVPRRMIGT (SEQ ID NO:8); Домен В містить амінокислотну послідовність QWED (SEQ ID NO:9); Домен С містить амінокислотну послідовність VFAYPGGASMEIHQALTRS (SEQ ID NO:10); Домен D містить амінокислотну послідовність AFQETP (SEQ ID NO:11); Домен Е містить амінокислотну послідовність IPSGG (SEQ ID NO:12). Даний винахід також передбачає можливість незначних відхилень у консервативних доменах, наприклад, у куколі сериновий залишок у Домені Е замінено аланіновим залишком.

Відповідно, даний винахід охоплює пшеничну культуру, яка включає ІМІ нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка має мутацію в консервативному Домені, вибраному з групи, яка складається з Домену А, Домену В, Домену С, Домену D та Домену Е. В одному варіанті втілення пшенична культура містить ІМІ нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка має мутацію в Домені Е. В інших оптимальних варіантах втілення мутації в консервативних доменах трапляються в місцях, позначених таким підкресленням: AITGQVPRRMIGT (SEQ ID NO:8); QWED (SEQ ID NO:9); VFAYPGGASMEIHQALTRS (SEQ ID NO:10); AFQETP (SEQ ID NO:11) та IPSGG (SEQ ID NO:12). Оптимальним заміщенням є аспарагін замість серину в Домені Е (SEQ ID NO:12).

Описані авторами пшеничні культури можуть бути або трансгенними пшеничними культурами, або нетрансгенними пшеничними культурами. Вжитий авторами термін "трансгенний" стосується будь-якої рослини, рослинної клітини, калюсу, рослинної тканини або частини рослини, що містить, повністю або частково, принаймні один рекомбінантний полінуклеотид. У багатьох випадках рекомбінантний полінуклеотид, частково або повністю, є стабільно включеним у хромосому або стійкий позахромосомний елемент таким чином, що він передається наступним поколінням. З точки зору винаходу термін "рекомбінантний полінуклеотид" стосується полінуклеотиду, який було змінено, перебудовано або модифіковано шляхом генної інженерії. Прикладами є будь-який клонований полінуклеотид або полінуклеотиди, які є зв'язаними або приєднаними до гетерологічних послідовностей. Термін "рекомбінантний" не стосується змін полінуклеотидів, які є результатом природних подій, таких як спонтанні мутації, або неспонтанного мутагенезу з наступною селекцією. Рослини, які містять мутації, що виникають внаслідок неспонтанного мутагенезу та селекції, вказуються авторами як нетрансгенні рослини і охоплюються даним винаходом. У варіантах втілення, в яких пшенична культура є трансгенною і містить множинні ІМІ нуклеїнові кислоти, нуклеїнові кислоти можуть походити з різних геномів або одного геному. Або ж у варіантах втілення, в яких пшенична культура є нетрансгенною і містить множинні ІМІ нуклеїнові кислоти, нуклеїнові кислоти містяться в різних геномах.

Прикладом нетрансгенного сорту пшеничної культури, що містить одну ІМІ нуклеїнову кислоту, є сорт рослини, депонований в ATCC під номером патентного депонування РТА-3953 і вказаний авторами як сорт пшениці TealIMI 11A. Сорт пшениці TealIMI 11A містить Імі2 нуклеїнову кислоту. Часткову нуклеотидну та виведену амінокислотну послідовності, які відповідають генів TealIMI2 11A, показано в SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:4, відповідно. Єдиним типом послідовностей, не включених до SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:4, є послідовності, які кодують і відповідають сигнальній послідовності, яка відщеплюється від зрілого білка TealIMI2 11A. Відповідно, SEQ ID NO:4 являє собою повну виведену послідовність зрілого білка TealIMI2 11A.

Прикладом сорту пшеничної культури, який містить дві ІМІ нуклеїнові кислоти в різних геномах, є сорт рослини, депонований в ATCC під номером патентного депонування РТА-3955 і вказаний авторами як сорт пшениці TealIMI 15A. Сорт пшениці TealIMI 15A містить Імі1 та Імі3 нуклеїнові кислоти Імі1 нуклеїнова кислота включає мутацію, яка веде до заміни серину на аспарагін у кодованому нею ІМІ білку. Мutowані гени AHAS позначено авторами як TealIMM 15A та TealIMI3 15A. Часткову нуклеотидну та виведену амінокислотну послідовності, які відповідають генів TealIMI1 15A, показано в SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:2, відповідно. Єдиним типом послідовностей, не включених до SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:2, є послідовності, які кодують і відповідають приблизно 100-150 парам основ на 5' кінці і приблизно 5 парам основ на 3' кінці кодуєної ділянки.

Окремі депонування 2500 зразків насіння сортів пшениці TealIMI 11A та TealIMI 15A було зроблено в Американському зібранні типових культур, Манассас, Вірджинія, 3 січня 2002р. Ці депонування було зроблено згідно з умовами Будапештської угоди стосовно депонування мікроорганізмів. Депонування було зроблено на термін не менше тридцяти років і не менше п'яти років після отримання ATCC останнього запиту про надання депонованого зразка. Депоновані зразки насіння отримали номери патентного депонування РТА-3953 (TealIMI 11A) та РТА-3955 (TealIMI 15A).

Даний охоплює пшеничну культуру, яка має номер патентного депонування РТА-3953 або РТА-3955; мутантну, рекомбінантну або піддану генній інженерії похідну рослини з номером патентного депонування РТА-3953 або РТА-3955; будь-яке потомство з номером патентного депонування РТА-3953 або РТА-3955; та рослину, яке є потомством будь-якої з цих рослин. В оптимальному варіанті втілення пшенична культура даного винаходу додатково має характеристики резистентності до гербіцидів, як у рослини з номером патентного депонування РТА-3953 або РТА-3955.

Даний винахід також охоплює описані авторами гібриди сортів пшениці TealIMI 11A та TealIMI 15A. Приклад 5 демонструє TealIMI11A/TealIMI15A гібриди з підвищеною резистентністю до імідазолінонового гербіциду. Даний винахід також охоплює гібриди сортів пшениці TealIMI 11A або TealIMI 15As та іншого сорту пшениці. До інших сортів пшениці належить, крім інших, T. aestivum L. cv Fidel та будь-який сорт

пшениці, який містить мутантний ген FS-1, FS-2, FS-3 або FS-4. [див. патент США №6,339,184 та патентну заявку США №08/474,832]. В оптимальному варіанті втілення пшенична культура є гібридом між сортом TeallMI 11A та сортом Fidel FS-4. Гібриди TeallMI 11A/FS-4 містять Imi1 нуклеїнову кислоту та Imi2 нуклеїнову кислоту. Гібрид TeallMI 11A та сорту Fidel, який містить FS-4 ген, охоплюється даним винаходом і є депонованим в Американському зібранні типових культур, Манассас, Вірджинія, 3 січня 2002р. Це депонування було зроблено згідно з умовами Будапештської угоди стосовно депонування мікроорганізмів. Депонування було здійснено на термін не менше тридцяти років і не менше п'яти років після отримання ATCC останнього запиту про надання депонованого зразка. Депоноване насіння отримало номер патентного депонування PTA-3954.

Терміни "сорт" та "різновид" стосуються групи рослин у межах виду, які мають певну кількість спільних характеристик або особливостей, які спеціалістами вважаються достатніми для відрізнення одного сорту або різновиду від іншого сорту або різновиду. Жоден з термінів не передбачає, що всі рослини будь-якого даного сорту або різновиду є генетично ідентичними на рівні повного гена або на молекулярному рівні, або що будь-яка дана рослина є гомозиготною в усіх локусах. Сорт або різновид вважають "розведенням гомозигот" для конкретної особливості, якщо в разі, коли гомозиготний сорт або різновид є самозапилюваним, усе потомство має цю особливість. У даному винаході особливість виникає внаслідок мутації в гені ANAS пшеничної культури або насіння.

Слід розуміти, може включати дикий або немутований ген ANAS додатково до IMI гена. Як описано у Прикладі 4, передбачається, що сорт пшениці TeallMI 11A містить мутацію лише в одному з множинних ANAS ізоферментів, і що сорт пшениці TeallMI 15A містить мутацію лише у двох із множинних ANAS ізоферментів. Отже, даний винахід охоплює пшеничну культуру, яка включає одну або кілька IMI нуклеїнових кислот додатково до однієї або кількох диких або немутованих нуклеїнових кислот ANAS.

Крім пшеничних культур, даний винахід охоплює виділені IMI білки та нуклеїнові кислоти. Нуклеїнові кислоти включають полінуклеотид, вибраний з групи, яка складається з полінуклеотиду SEQ ID NO:1; полінуклеотиду SEQ ID NO:3; полінуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид SEQ ID NO:2; а полінуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид SEQ ID NO:4, полінуклеотиду, який включає принаймні 60 послідовних нуклеотидів будь-якого з вищезгаданих полінуклеотидів; та полінуклеотиду, комплементарного будь-якому з вищезгаданих полінуклеотидів. В оптимальному варіанті втілення IMI нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4. В іншому оптимальному варіанті втілення IMI нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3.

Термін "білок ANAS" стосується білка синтази ацетогідроксіоцтової кислоти, а термін "IMI білок" стосується будь-якого білка ANAS, який є мутованим від білка ANAS дикого типу і який надає більшої резистентності до імідазолінону рослині, рослинній клітині, частині рослини, насінню рослини або рослинній тканині, якщо він у них експресується. В оптимальному варіанті втілення IMI білок включає поліпептид SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4. також вжиті авторами терміни "нуклеїнова кислота" та "полінуклеотид" стосуються РНК або ДНК, яка є лінійною або розгалуженою, одно- або дволанцюговою, або їх гібриду. Термін також охоплює гібриди РНК/ДНК. Ці терміни також охоплюють нетранскльовану послідовність, розміщену на 3' та 5' кінцях кодуючої ділянки гена: принаймні близько 1000 нуклеотидів послідовності перед 5' кінцем кодуючої ділянки, і принаймні близько 200 нуклеотидів послідовності після 3' кінця кодуючої ділянки гена. Менш поширені основи, такі як інозин, 5-метилцитозин, 6-метиладенін, піпксантин та інші, також можуть бути використані для антисмислового, dsРНК- та рибозимного спарювання. Наприклад, було виявлено, що полінуклеотиди, які містять С-5 пропінові аналоги уридину та цитидину, зв'язуються з РНК з високою спорідненістю і є сильними антисмисловими інгібіторами експресії генів. Також здійснюють інші модифікації, наприклад, модифікацію фосфодіестерного основного ланцюга або 2'-гідрокси у групі рибози РНК. Антисмислові полінуклеотиди та рибозими можуть складатися повністю з рибонуклеотидів, або можуть містити змішані рибонуклеотиди та деоксирибонуклеотиди. Полінуклеотиди винаходу одержують будь-якими способами, включаючи одержання геномних препаратів, кДНК-препаратів, *in vitro* синтез, RT-ПЛР та *in vitro* або *in vivo* транскрипцію.

"Виділеною" молекулою нуклеїнової кислоти є молекула, яка є практично відокремленою від інших молекул нуклеїнових кислот, присутніх у природному джерелі нуклеїнової кислоти (тобто послідовностей, які кодують інші поліпептиди). В оптимальному варіанті "виділена" нуклеїнова кислота є вільною від деяких із послідовностей, які у природі є фланкуючими на нуклеїновій кислоті (тобто послідовностей, розміщених на 5' та 3' кінцях нуклеїнової кислоти) в її природному репліконі. Наприклад, клоновану нуклеїнову кислоту вважають виділеною. У різних варіантах втілення виділена молекула IMI нуклеїнової кислоти може містити менше, ніж приблизно 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1kb, 0,5kb або 0,1kb нуклеотидних послідовностей, які у природі є фланкуючими на молекулі нуклеїнової кислоти в геномній ДНК клітини, з якої походить нуклеїнова кислота (наприклад, клітини *Triticum aestivum*). Нуклеїнову кислоту також вважають виділеною, якщо її було змінено через втручання людини або поміщено в локус або місце, яке не є її природним місцем, або якщо її було введено у клітину шляхом агроінфекції або біолістики. Крім того, "виділена" молекула нуклеїнової кислоти, така як молекула кДНК, може бути вільною від деякого іншого клітинного матеріалу, з яким вона пов'язана у природі, або культурального середовища, якщо її одержують рекомбінантними способами, або хімічних попередників або інших хімічних речовин, якщо її синтезують хімічним шляхом.

Прямо виключаються з визначення "виділені нуклеїнові кислоти": природні хромосоми (такі як розтягнуті хромосоми), бібліотеки штучних хромосом, геномні бібліотеки та бібліотеки кДНК, які існують або як *in vitro* препарат нуклеїнової кислоти, або як препарат трансформованої/трансформованої клітини-хазіяїна, причому клітини-хазіяї є або *in vitro* гетерогенним препаратом, або вирощеними на пластині як гетерогенна популяція окремих колоній. Також прямо виключаються вищезгадані бібліотеки, в яких зазначена нуклеїнова кислота складає менше 5% від кількості нуклеїнових кислотних вставок у векторних молекулах. Також прямо виключаються геномні ДНК цілих клітин або препарати РНК цілих клітин (включаючи препарати цілих клітин, які є механічно зрізаними або підданими ферментативному гідролізові). Крім того, прямо виключаються препарати цілих клітин, які існують або як *in vitro* препарат, або як гетерогенна суміш, відокремлена шляхом електрофорезу, в якій нуклеїнову кислоту згідно з винаходом не було піддано

подальшому відокремленню від гетерологічних нуклеїнових кислот у середовищі електрофорезу (наприклад, подальшому відокремленню шляхом вирізання однієї смуги з гетерогенної сукупності смуг в агарозному гелі або шляхом блотування на нейлон).

Молекулу нуклеїнової кислоти даного винаходу, наприклад, молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1, SEQ ED NO:3 або її частину, виділяють, застосовуючи стандартні способи молекулярної біології та представлену авторами інформацію про послідовність. Наприклад, IMI кДНК *T. aestivum* виділяють з бібліотеки *T. aestivum*, застосовуючи, повністю або частково, послідовність SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3. Крім того, молекула нуклеїнової кислоти, яка включає, повністю або частково, SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3, може бути виділена шляхом полімеразної ланцюгової реакції з застосуванням олігонуклеотидних праймерів, побудованих на основі цієї послідовності. Наприклад, мРНК виділяють із рослинних клітин [наприклад, шляхом процедури виділення гуанідин тіоціанату, описаної в роботі Chirgwin et al., 1979 *Biochemistry* 18:5294-5299], а кДНК одержують, застосовуючи зворотну транскриптазу (наприклад, Moloney MLV зворотну транскриптазу, яку отримують від Gibco/BRL, Bethesda, MD; або AMV зворотну транскриптазу, яку отримують від Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Синтетичні олігонуклеотидні праймери для ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції можуть бути побудовані на основі нуклеотидної послідовності, показаної в SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3. Молекула нуклеїнової кислоти винаходу може бути ампліфікована з застосуванням кДНК або, в альтернативному варіанті, геномної ДНК як матриці та відповідних олігонуклеотидних праймерів згідно зі стандартними способами ампліфікації ПЛР. Ампліфіковану таким чином молекулу нуклеїнової кислоти клонують у відповідний вектор і характеризують шляхом аналізу послідовності ДНК. Крім того, олігонуклеотиди, які відповідають нуклеотидній послідовності IMI, можуть бути одержані стандартними способами синтезу, наприклад, із застосуванням автоматизованого синтезатора ДНК.

IMI нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть включати послідовності, які кодують IMI білок (тобто "кодуючі ділянки"), а також 5' нетрансльовані послідовності та 3' нетрансльовані послідовності. В альтернативному варіанті молекули нуклеїнових кислот даного винаходу можуть включати лише кодуючі ділянки IMI гена, або можуть містити повні геномні фрагменти, виділені з геномної ДНК. Кодуючу ділянку цих послідовностей позначають як "ORF-позицію". Крім того, молекула нуклеїнової кислоти винаходу може включати частину кодуючої ділянки IMI гена, наприклад, фрагмент, який може бути використаний як зонд або праймер. Нуклеотидні послідовності, визначені за клонуванням IMI гена з *T. Aestivum*, дозволяють утворювати зонди та праймери, призначені для застосування в розпізнанні та/або клонуванні IMI гомологів в інших типах клітин та організмів, а також IMI гомологів з інших пшеничних культур та споріднених видів. Частина кодуючої ділянки також може кодувати біологічно активний фрагмент IMI білка.

Вжитий авторами термін "біологічно активна частина" IMI білка охоплює частину, наприклад, домен/мотив IMI білка, який у разі вироблення в рослині підвищує резистентність рослини до імідазолінонового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу. Способи кількісного визначення підвищеної резистентності до імідазолінонових гербіцидів представлено нижче у Прикладах. Біологічно активні частини IMI білка включають пептиди, кодовані полінуклеотидними послідовностями, які включають SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3, які включають менше амінокислот, ніж IMI білок повної довжини, і надають підвищеної резистентності до імідазолінонового гербіциду після експресії в рослині. Як правило, біологічно активні частини (наприклад, пептиди, які мають у довжину, наприклад, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 або більше амінокислот) включають домен або мотив з принаймні однією активністю IMI білка. Крім того, інші біологічно активні частини, в яких делетовано інші ділянки поліпептиду, одержують рекомбінантними способами і оцінюють на наявність описаних авторами однієї або кількох активностей. В оптимальному варіанті біологічно активні частини IMI білка включають один або кілька консервативних доменів, вибраних з групи, яка складається з Домену А, Домену В, Домену С, Домену D та Домену Е, причому консервативний домен містить мутацію.

Винахід також забезпечує химерні або злиті IMI поліпептиди. Вжитий авторами термін IMI "химерний поліпептид" або "злитий поліпептид" охоплює IMI поліпептид, функціонально зв'язаний з не-IMI поліпептидом. Термін "не-IMI поліпептид" стосується поліпептиду, який має амінокислотну послідовність, яка не має значної ідентичності IMI поліпептидові, наприклад, поліпептиду, який не є IMI ізоферментом, причому цей пептид виконує відмінну від IMI поліпептиду функцію. По відношенню до злитого поліпептиду термін "функціонально зв'язаний" означає, що IMI поліпептид та не-IMI поліпептид є злитими один з одним таким чином, що обидві послідовності виконують передбачену функцію, характерну для даної послідовності. Не-IMI поліпептид може бути злитий з N-кінцем або C-кінцем IMI поліпептиду. Наприклад, в одному варіанті втілення злитий поліпептид є GST-IMI злитим поліпептидом, у якому IMI послідовність є злиною з C-кінцем GST послідовності. Такі злиті поліпептиди можуть сприяти очищенню рекомбінантних IMI поліпептидів. В іншому варіанті втілення злитий поліпептид є IMI поліпептидом, який містить гетерологічну сигнальну послідовність на своєму N-кінці. У деяких клітинах-хазяях (наприклад, клітинах-хазяях ссавців) експресія та/або секреція IMI поліпептиду може бути посилена завдяки застосуванню гетерологічної сигнальної послідовності.

Виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує IMI поліпептид, що має послідовність, ідентичну поліпептидові, який кодується полінуклеотидною послідовністю SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3, може бути створена шляхом введення одного або кількох нуклеотидних заміщень, додавань або делецій у нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3 таким чином, щоб одне або кілька амінокислотних заміщень, додавань або делецій були введені в кодований поліпептид. Мутації вводять у послідовність SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3 стандартними способами, такими як сайт-специфічний мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез. В оптимальному варіанті консервативні амінокислотні заміщення здійснюють в одному або кількох прогнозованих замісних амінокислотних залишках.

"Консервативне амінокислотне заміщення" є таким, при якому амінокислотний залишок заміщується амінокислотним залишком, який має подібний боковий ланцюг. Спеціалістами було визначено групи амінокислотних залишків, які мають подібні бокові ланцюги. До цих груп належать амінокислоти з основними боковими ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними боковими ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними боковими ланцюгами

(наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними боковими ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бетарозгалуженими боковими ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними боковими ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Таким чином, прогнозований замісний амінокислотний залишок в IMI поліпептиді оптимально замінюється іншим амінокислотним залишком з тієї самої групи бокових ланцюгів. В альтернативному варіанті втілення мутації вводять випадково по всій IMI кодуєчій послідовності або її частині, наприклад, шляхом насиченого мутагенезу, і одержані в результаті мутанти відбирають на наявність описаної авторами IMI активності для розпізнання мутантів, які зберігають IMI активність. Після мутагенезу послідовності SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3, кодований поліпептид може бути експресований рекомбінантно, і активність поліпептиду може бути визначена шляхом аналізу резистентності до імідазолінону в рослині, яка експресує поліпептид, як описано нижче у Прикладах.

Для визначення відсотка ідентичності послідовності двох амінокислотних послідовностей (наприклад, SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4 та їх мутантної форми) послідовності суміщують для оптимального порівняння (наприклад, у послідовність одного поліпептиду вставляють розриви для оптимального суміщення з іншим поліпептидом). Після цього порівнюють амінокислотні залишки у відповідних позиціях амінокислот. Якщо позиція в одній послідовності (наприклад, SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4) займається тим самим амінокислотним залишком, що й відповідна позиція в іншій послідовності (наприклад, мутантній формі SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4), то молекули в цій позиції є ідентичними. Таке саме порівняння здійснюють між двома послідовностями нуклеїнових кислот. Відсоток ідентичності послідовності між двома послідовностями залежить від кількості ідентичних позицій, спільних для цих послідовностей (тобто відсоток ідентичності послідовностей = кількість ідентичних позицій/загальна кількість позицій×100). З точки зору винаходу відсоток ідентичності послідовностей між двома нуклеїновими кислотами або поліпептидними послідовностями визначають, застосовуючи пакет програм Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, 7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814). Для визначення відсотка ідентичності двох нуклеїнових кислот виставляють показник "gap opening penalty" 15 і показник "gap extension penalty" 6,66. Для визначення відсотка ідентичності двох поліпептидів виставляють показник "gap opening penalty" 10 і показник "gap extension penalty" 0,1. Усі інші параметри встановлено за умовчанням. Слід розуміти, що для визначення ідентичності послідовності, якщо порівнюють послідовність ДНК з послідовністю РНК, тимідиновий нуклеотид є еквівалентом урацилового нуклеотиду. В оптимальному варіанті виділені IMI поліпептиди, які охоплюються даним винаходом, є принаймні приблизно на 50-60%, краще - принаймні приблизно на 60-70%, ще краще - принаймні приблизно на 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90% або 90-95%, найкраще - принаймні приблизно на 96%, 97%, 98%, 99% або більше ідентичними повній амінокислотній послідовності, кодованій полінуклеотидною послідовністю, показаною в SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3. В іншому варіанті втілення виділені IMI поліпептиди, які охоплюються даним винаходом, є принаймні приблизно на 50-60%, краще - принаймні приблизно на 60-70%, ще краще - принаймні приблизно на 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90% або 90-95%, найкраще - принаймні приблизно на 96%, 97%, 98%, 99% або більше ідентичними повній амінокислотній послідовності, показаній у SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4.

Крім того, можуть бути створені оптимізовані IMI нуклеїнові кислоти. В оптимальному варіанті оптимізована IMI нуклеїнова кислота кодує IMI поліпептид, який модулює толерантність рослини до імідазолінонових гербіцидів, ще краще - якщо підвищує толерантність рослини до імідазолінонового гербіциду після його переекспресії в рослині. Вжитий авторами термін "оптимізований" стосується нуклеїнової кислоти, підданої генній інженерії для посилення її експресії в даній рослині або тварині. Для забезпечення оптимізованих для рослини IMI нуклеїнових кислот послідовність ДНК гена модифікують, щоб вона 1) включала кодони, оптимальні для вискоекспресованих рослинних генів; 2) включала A+T, який практично відповідає за складом нуклеотидної основи тому, що міститься в рослинах; 3) утворювала ініціюючу послідовність рослини, 4) не містила послідовностей які викликають дестабілізацію, неналежне поліаденілювання, деградацію та термінацію РНК, або які утворюють шпильки вторинної структури або місця сплайсингу РНК. Посилення експресії IMI нуклеїнових кислот у рослинах досягають шляхом застосування частоти розподілу використання кодонів у рослинах взагалі або в конкретній рослині. Способи оптимізації експресії нуклеїнових кислот у рослинах описано в [EPA 0359472; EPA 0385962; заявці PCT № WO 91/16432; патенті США №5,380,831; патенті США №5,436,391; роботах Perlack et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; та Murray et al., 1989 Nucleic Acids Res. 17:477-498].

Вжитий авторами термін "частота переважного використання кодонів" стосується переваги, яку віддає конкретна клітина-хазяїн при використанні нуклеотидних кодонів для визначення даної амінокислоти. Для визначення частоти використання конкретного кодону в гені кількість випадків цього кодону в гені ділять на загальну кількість випадків усіх кодонів, які вказують на ту саму амінокислоту в гені. Так само частота переважного використання кодонів, яку виявляє клітина-хазяїн, може бути розрахована через середнє значення частоти переважного використання кодонів у великій кількості генів, експресованих клітиною-хазяїном. В оптимальному варіанті цей аналіз обмежують генами, які сильно експресуються клітиною-хазяїном. Відсоток відхилення частоти переважного використання кодонів для синтетичного гена від частоти використання клітиною-хазяїном розраховують спочатку шляхом визначення відсотка відхилення частоти використання одного кодону від частоти використання клітиною-хазяїном з наступним одержанням середнього показника відхилення по всіх кодонах. Як визначено авторами, цей розрахунок включає унікальні кодони (тобто ATG і TGG). Тобто загальне середнє відхилення використання кодонів оптимізованого гена від показника клітина-хазяїна розраховують, користуючись рівнянням $1A = \frac{1}{n} \sum (X_n - Y_n) X_n$ разів 100 Z, де X_n = частота використання для кодону n у клітині-хазяїні; Y_n = частота використання для кодону n у синтетичному гені, n представляє окремі кодони, який визначає амінокислоту, і загальна кількість кодонів дорівнює Z. Загальне відхилення частоти використання кодонів, A, для всіх амінокислот в оптимальному варіанті становить менше, ніж приблизно 25%, краще - менше, ніж приблизно 10%.

Таким чином, IMI нуклеїнова кислота може бути оптимізована таким чином, щоб її частота розподілу використання кодонів відхилялася в оптимальному варіанті не більше, ніж на 25% від частоти вискоекспресованих рослинних генів, у ще кращому варіанті - не більше, ніж приблизно на 10%. Крім того, враховують відсотковий вміст G+C виродженої третьої основи (однодолі підтримують G+C у цій позиції,

на відміну від дводольних). Визнано також, що ХСГ (де Х є А, Т, С, або G) нуклеотид є найменшим оптимальним кодоном у дводольних, тоді як ХТА кодону уникають як одностольні, так і дводольні. Оптимізовані ІМІ нуклеїнові кислоти цього винаходу також бажано мати індекси уникнення дублетів CG і ТА, наближені до індексів вибраної рослини-хазяїна (тобто *Triticum aestivum*). Краще, якщо ці індекси відхиляються від індексу хазяїна не більше, ніж приблизно 10-15%.

Крім молекул нуклеїнових кислот, які кодують описані вище ІМІ поліпептиди, інший аспект винаходу стосується виділених молекул нуклеїнових кислот, які є антисмисловими до них. Вважається, що антисмислові полінуклеотиди інгібують генну експресію полінуклеотиду-мішені шляхом специфічного зв'язування з полінуклеотидом-мішенню і впливу на транскрипцію, сплайсинг, перенесення, трансляцію та/або стійкість полінуклеотиду-мішені. В існуючому рівні техніки описано способи спрямування антисмислового полінуклеотиду на хромосомну ДНК, на первинний транскрипт РНК або на процесовану мРНК. В оптимальному варіанті ділянки-мішені включають місця сплайсингу, кодони ініціації трансляції, кодони термінації трансляції та інші послідовності в межах відкритої рамки читування.

Термін "антисмислова" з точки зору винаходу стосується нуклеїнової кислоти, яка включає полінуклеотид, який є достатньо комплементарним, повністю або частково, генів, первинному транскриптові або процесованій мРНК, щоб впливати на експресію ендегенного гена. "Комплементарними" полінуклеотидами є ті, які здатні до спарювання основ згідно зі стандартними правилами комплементарності Вотсона-Кріка. Зокрема, пурини створюють пари основ з піримідинами для утворення комбінації гуаніну, спареного з цитозином (G:C) та аденіну, спареного або з тиміном (A:T) у разі ДНК, або аденіну, спареного з урацилом (A:U) у разі РНК. Слід розуміти, що два полінуклеотиди можуть гібридизуватися один з одним, навіть якщо вони не є повністю комплементарними один одному, якщо кожен має принаймні одну ділянку, практично комплементарну іншій. Термін "антисмислова нуклеїнова кислота" охоплює експресійні касети одностольної РНК, а також двостольної ДНК, які можуть бути транскрибовані для утворення антисмислової РНК. "Активними" антисмисловими нуклеїновими кислотами є молекули антисмислової РНК, здатні селективно гібридизуватися з первинним транскриптом або мРНК, що кодує поліпептид, який має принаймні 80% ідентичність послідовності з поліпептидом, кодованим полінуклеотидною послідовністю SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3.

Крім вищеописаних ІМІ нуклеїнових кислот та поліпептидів, даний винахід охоплює ці нуклеїнові кислоти та поліпептиди, приєднані до компонента. До цих компонентів, крім інших, належать компоненти виявлення, компоненти гібридизації, компоненти очищення, компоненти доставлення, компоненти реакції, компоненти зв'язування та ін. Типовою групою нуклеїнових кислот, які мають приєднані компоненти, є зонди та праймери. Зонди та праймери, як правило, включають практично ізольований олігонуклеотид. Олігонуклеотид, як правило, включає ділянку нуклеотидної послідовності, яка гібридується за жорстких умов з принаймні приблизно 12, краще - приблизно 25, ще краще - приблизно 40, 50 або 75 послідовними нуклеотидами смислового ланцюга послідовності, вказаної в SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3, антисмисловою послідовністю послідовності, вказаної в SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3, або їх природними мутантами. Праймери на основі нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3 застосовують у ПЛР для клонування ІМІ гомологів. Зонди на основі ІМІ нуклеотидних послідовностей "застосовують для виявлення транскриптів або геномних послідовностей, які кодують ті ж самі або гомологічні поліпептиди. В оптимальних варіантах втілення зонд також включає приєднану до нього мітку, наприклад, мітку, яка може бути радіоізотопом, флуоресцентною сполукою, ферментом або кофактором ферменту. Такі зонди застосовують як частину випробувального комплексу геномного маркера для розпізнання клітин, які експресують ІМІ поліпептид, наприклад, шляхом вимірювання рівня ІМІ-кодуючої нуклеїнової кислоти, у зразку клітин, наприклад, виявлення рівня ІМІ мРНК або визначення, чи був геномний ІМІ ген мутованим чи видаленим.

Винахід також забезпечує виділений рекомбінантний вектор експресії, який включає ІМІ нуклеїнову кислоту, як описано вище, причому вектор експресії у клітині-хазяїні в результаті забезпечує підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з різновидом клітини-хазяїна дикого типу. Вжитий авторами термін "вектор" стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою її було з'єднано. Одним типом вектора є "плазміда", яка означає кільцеву двостольову петлю ДНК, у яку можуть бути ліговані додаткові сегменти ДНК. Іншим типом вектора є вірусний вектор, у якому додаткові сегменти ДНК можуть бути ліговані у вірусний геном. Деякі вектори здатні до самостійної реплікації у клітині-хазяїні, в яку вони є введеними (наприклад, бактеріальні вектори, які мають бактеріальне походження реплікації, та епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) вводять у геном клітини-хазяїна після введення у клітину-хазяїн, а отже, реплікують разом з геномом хазяїна. Крім того, деякі вектори здатні спрямовувати експресію генів, з якими вони є функціонально зв'язаними. Такі вектори названо авторами "векторами експресії". Взагалі, вектори експресії, які застосовують у технологіях рекомбінантних ДНК, часто мають форму плазмід. У даному описі терміни "плазміда" та "вектор" можуть вживатися поперемінно, оскільки плазміда є найпоширенішою формою вектора. Однак, винахід охоплює й інші форми векторів експресії, такі як вірусні вектори (наприклад, ретровіруси з недостатньою реплікацією, аденовіруси та аденоасоційовані віруси), які виконують рівноцінні функції.

Рекомбінантні вектори експресії згідно з винаходом включають нуклеїнову кислоту винаходу у формі придатної для експресії нуклеїнової кислоти у клітині-хазяїні, що означає, що рекомбінантні вектори експресії включають одну або кілька регуляторних послідовностей, вибраних на основі клітин-хазяїв, які мають бути застосовані для експресії, які є функціонально зв'язаними з нуклеїновикислотною послідовністю, яка підлягає експресії. По відношенню до рекомбінантного вектора експресії "функціонально зв'язаний" означає, що дана нуклеотидна послідовність є зв'язаною з регуляторною(ими) послідовністю(ями) таким чином, що це дозволяє експресію нуклеотидної послідовності (наприклад, в *in vitro* транскрипційній/трансляційній системі або у клітині-хазяїні, коли вектор є введеним у клітину-хазяїн). Термін "регуляторна послідовність" охоплює промотори, енхансери та інші елементи контролю експресії (наприклад, сигнали поліаденілювання). Такі регуляторні послідовності описано, наприклад, у роботі [Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990),

або в роботі Gruber and Crosby, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, eds. Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, включаючи посилання, які в них містяться]. До регуляторних послідовностей належать ті, які спрямовують конститутивну експресію нуклеотидної послідовності в багатьох типах клітин-хазяїв, та ті, які спрямовують експресію нуклеотидної послідовності лише в деяких клітинах-хазяїв або за певних умов. Спеціалістам стане зрозуміло, що побудова вектора експресії може залежати від таких чинників, як вибір клітини-хазяїна, яка підлягає трансформації, рівень експресії потрібного поліпептиду і т. д. Вектори експресії згідно з винаходом вводять у клітини-хазяї для утворення поліпептидів або пептидів, включаючи злиті поліпептиди або пептиди, кодовані нуклеїновими кислотами, як описано авторами (наприклад, IMI поліпептиди, злиті поліпептиди і т. д.).

В оптимальному варіанті втілення даного винаходу IMI поліпептиди експресуються в рослинах та рослинних клітинах, таких як клітини одноклітинних рослин (наприклад, водоростей) [див. Falcatore et al., 1999 *Marine Biotechnology* 1(3):239-251, та посилання, що містяться в цій роботі] та клітини вищих рослин (наприклад, сперматофітів, таких як хлібні злаки). IMI поліпептид може бути "введений" у рослинну клітину будь-яким способом, включаючи трансфекцію, трансформацію або трансдукцію, електропорацію, бомбардування частинками, агроінфекцію, біолисту і т. ін. Одним з відомих спеціалістам способів трансформації є занурення рослини під час цвітіння в розчин *Agrobacteria*, в якому *Agrobacteria* містить IMI нуклеїнову кислоту, з наступним розведенням трансформованих гамет.

Інші відомості про придатні способи трансформації або трансфекції клітин-хазяїв, включаючи рослинні клітини, можна знайти в [Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) та інших лабораторних посібниках, таких як *Methods in Molecular Biology*, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium protocols*, ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey]. Оскільки підвищена резистентність до імідазолінових гербіцидів є загальною особливістю, успадкування якої є бажаним для багатьох видів рослин, таких як кукурудза, пшениця, жито, овес, тритикале, рис, ячмінь, соя, арахіс, бавовна, рапс та канولا, маніот, перець, соняшник та чорнобривці, пасльонові рослини, такі як картопля, тютюн, баклажан та томати, види віки, горох, люцерна, чагарникові рослини (кава, какао, чай), види верби, дерева (олійна пальма, кокос), багаторічні трави та фуражні культури, ці хлібні злаки також є оптимальними рослинами, які можуть бути об'єктами генної інженерії як ще один варіант втілення даного винаходу. До фуражних культур належать, крім інших, пирій, *Phalaris arundinacea*, *Bromopsis inermis*, дике жито, *Bluegrass*, *Dactylis glomerata* L., люцерна, *Sainfoin*, *Lotus corniculatus* L., шведська конюшина, червона конюшина та буркун.

В одному варіанті втілення даного винаходу трансформації IMI поліпептиду в рослину досягають шляхом *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення гена. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин здійснюють, застосовуючи, наприклад, GV3101(pMP90) [Koncz and Schell, 1986 *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396] або LBA4404 (Clontech) штам *Agrobacterium tumefaciens*. Трансформацію здійснюють стандартними способами трансформації та регенерації [Deblaere et al., 1994 *Nucl. Acids. Res.* 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. and Schiiperoort, Robert A, *Plant Molecular Biology Manual*, 2nd Ed. - Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. and Thompson, John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton : CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2]. Наприклад, рапс трансформують шляхом трансформації сім'ядолі або гіпокотилія [Moloney et al., 1989 *Plant cell Report* 8:238-242; De Block et al., 1989 *Plant Physiol.* 91:694-701]. Застосування антибіотиків для вибору *Agrobacterium* та рослини залежить від бінарного вектора та штаму *Agrobacterium*, який застосовують для трансформації. Вибір рапсу зазвичай здійснюють, застосовуючи канаміцин як маркер для селекції рослин. *Agrobacterium*-опосередковане перенесення генів у льон здійснюють, застосовуючи, наприклад, спосіб, описаний у роботі [Mlynarova et al., 1994 *Plant Cell Report* 13:282-285]. Крім того, трансформацію сої здійснюють, застосовуючи, наприклад, спосіб, описаний у європейському патенті №0424047, патенті США №5,322,783, європейському патенті №0397 687, патенті США №5,376,543 або патенті США №5,169,770. Трансформації кукурудзи досягають шляхом бомбардування частинками, опосередкованого поліетиленгліколем поглинання ДНК або за допомогою волокон карбіду кремнію. [Див., наприклад, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7]. Конкретний приклад трансформації кукурудзи міститься в патенті США №5,990,387, а конкретний приклад трансформації пшениці міститься в заявці PCT № WO 93/07256.

Згідно з даним винаходом, введений IMI поліпептид може стійко утримуватись у рослинній клітині, якщо його введено в нехромосомний автономний реплікон або введено у хромосоми рослин. В альтернативному варіанті введений IMI поліпептид може бути присутній на позахромосомному невідтворюваному векторі і може бути короткочасно експресованим або короткочасно активним. В одному варіанті втілення може бути створений гомологічний рекомбінантний мікроорганізм, у якому IMI поліпептид є введеним у хромосому, створюється вектор, який містить принаймні частину гена ANAS, у який введено делецію, додавання або заміщення для того, щоб змінити, наприклад, функціонально розірвати, ендегенний ген ANAS і створити IMI ген. Для створення точкової мутації через гомологічну рекомбінацію, використовують ДНК-РНК гібриди, застосовуючи спосіб, відомий як химерапластія [Cole-Strauss et al., 1999 *Nucleic Acids Research* 27(5): 1323-1330 and Kmiec, 1999 *Gene therapy American Scientist* 87(3):240-247]. Спеціалістам також добре відомі інші процедури гомологічної рекомбінації у виді *Triticum*, можливість застосування яких авторами передбачається.

У векторі гомологічної рекомбінації до IMI гена на його 5' та 3' кінцях може приєднуватися додаткова молекула нуклеїнової кислоти гена ANAS, що дозволяє здійснення гомологічної рекомбінації між екзогенним IMI геном, що міститься у векторі, та ендегенним геном ANAS у мікроорганізмі або рослині. Додаткова молекула фланкуючої нуклеїнової кислоти ANAS має достатню довжину для успішної гомологічної рекомбінації ендегенним геном. Як правило, вектор включає від кількох сотень пар основ до тисяч основ фланкуючих ДНК (як на 5', так і на 3' кінцях) [див., наприклад, Thomas, K. R., and Caracci, M. R., 1987 *Cell* 51:503, де описано вектори гомологічної рекомбінації, або Strepp et al., 1998 *PNAS*, 95(8):4368-4373, де описано рекомбінацію на основі кДНК у *Physcomitrella patens*]. Однак, оскільки IMI ген зазвичай відрізняється від гена ANAS у дуже небагатьох амінокислотах, у фланкуючій послідовності не завжди є необхідність. Вектор гомологічної рекомбінації вводять у мікроорганізм або рослинну клітину (наприклад,

через поліетиленгліколь-опосередковану ДНК) і відбирають клітини, в яких введений ІМІ ген було гомологічно рекомбіновано ендогенним геном АНАС, застосовуючи відомі спеціалістам способи.

В іншому варіанті втілення одержують рекомбінантні мікроорганізми, які містять вибрані системи, що дозволяють здійснювати регульовану експресію введеного гена. Наприклад, включення ІМІ гена у вектор з поміщенням його під контроль Іас-операона дозволяє експресію ІМІ гена лише у присутності ІРТГ. Такі регуляторні системи добре відомі спеціалістам.

Чи є він присутнім у позахромосомному невідтворюваному векторі, чи у векторі, введеному у хромосому, ІМІ полінуклеотид в оптимальному варіанті містяться в експресійній касеті рослини. Експресійна касета рослини в оптимальному варіанті містить регуляторні послідовності, здатні викликати експресію гена в рослинних клітинах, які є функціонально зв'язаними таким чином, що кожна послідовність може виконувати свою функцію, наприклад, термінацію транскрипції сигналами поліаденілювання. Оптимальними сигналами поліаденілювання є ті, що походять із т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*, такі як ген 3, відомий як октопін синтаза Ті-плазмиди рТІАСНS [Gielen et al., 1984 EMBO J. 3:835] або їх функціональні еквіваленти, але придатними є також усі інші термінатори, функціонально активні в рослинах. Оскільки експресія рослинних генів дуже часто не обмежується на транскрипційних рівнях, експресійна касета рослини в оптимальному варіанті містить інші функціонально зв'язані послідовності, такі як перехідні енхансери, наприклад, надлишкова послідовність (overdrive sequence), яка містить 5'-нетрансльовану лідерну послідовність вірусу тютюнової мозаїки, що збільшує пропорцію поліпептиду в РНК [Gallic et al., 1987 Nucl. Acids Research 15:8693-8711]. Прикладами рослинних векторів експресії можуть бути ті, які детально описано в роботах [Becker, D. et al., 1992 New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; Bevan, M.W., 1984 Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, Nucl. Acid. Res. 12:8711-8721; and Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38].

Експресія рослинного гена має бути функціонально пов'язана з відповідним промотором, який забезпечує вчасну, клітинно- або тканинспецифічну експресію гена. До промоторів, застосовуваних в експресійних касетах згідно з винаходом, може належати будь-який промотор, здатний ініціювати транскрипцію в рослинній клітині. До таких промоторів належать, крім інших, ті, які можуть бути одержані з рослин, рослинних вірусів та бактерій, які містять гени, що експресуються в рослинах, таких як *Agrobacterium* та *Rhizobium*.

Промотор може бути конститутивним, індукцибельним, специфічним до стадії розвитку, специфічним до типу клітин, тканинспецифічним або органоспецифічним. Конститутивні промотори є активними за більшості умов. Прикладами конститутивних промоторів є CaMV 19S та 35 S промотори [Odell et al. 1985 Nature 313:810-812], sX CaMV 35S промотор [Kay et al. 1987 Science 236:1299-1302] Sep1 промотор, промотор актину рису [McElroy et al. 1990 Plant Cell 2:163-171], промотор актину *Arabidopsis*, промотор убіхітану [Christensen et al. 1989 Plant Molec Biol. 18:675-689]; pEmu [Last et al. 1991 Theor Appl Genet. 81:581-588], 35S промотор вірусу мозаїки ранника, Smas промотор [Velten et al. 1984 EMBO J. 3:2723-2730], GRP1-8 промотор, промотор дегідрогенази цинамілового спирту [Патент США №5,683,439], промотори з Т-ДНК *Agrobacterium*, такі як манопін синтаза, нопалін синтаза та октопін синтаза, промотор малої субодиниці рибулоса біфосфат карбоксилази (ssuRUBISCO) промотор та ін.

Індукцибельні промотори є активними за певних навколишніх умов, таких як наявність або відсутність поживної речовини або метаболіту, тепло або холод, світло, напад патогенів, анаеробні умови та ін. Наприклад, hsp80 промотор із *Brassica* індукується термічним ударом, PPDК промотор індукується світлом, PR-1 промотор з тютюну, *Arabidopsis* та кукурудзи індукуються інфекцією патогену, а Adh1 промотор індукується гіпоксією та впливом холоду. Експресії рослинного гена також може сприяти індукцибельний промотор [див. Gatz, 1997 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108]. Хімічно індукцибельні промотори є особливо придатними, якщо потрібна специфічна до часу експресія гена. Прикладами таких промоторів є індукований саліциловою кислотою промотор [Заявка РСТ № WO 95/19443], індукований тетрацикліном промотор [Gatz et al., 1992 Plant J. 2:397-404] та індукований етанолом промотор [Заявка РСТ № WO 93/21334].

Специфічні до стадії розвитку промотори в оптимальному варіанті експресуються на певних стадіях розвитку. До тканино- та органоспецифічних промоторів належать ті, які в оптимальному варіанті експресуються в певних тканинах або органах, таких як листя, коріння, насіння або ксилема. Прикладами тканинспецифічних та органоспецифічних промоторів є, крім інших, специфічні до плодів, специфічні до насінних зачатків, специфічні до чоловічих тканин, специфічні до насіння, специфічні до шкірки, специфічні до бульб, специфічні до стебел, специфічні до оплодня та специфічні до листя, специфічні до приймочок, специфічні до пилку, специфічні до пиляка, специфічні до пелюсток, специфічні до чашолистка, специфічні до квітконіжки, специфічні до стручка, специфічні до суплідь, специфічні до коріння промотори та інші. Специфічні до насіння промотори в оптимальному варіанті експресуються під час розвитку насіння або проростання. Наприклад, специфічні до насіння промотори можуть бути специфічними до ембріонів, специфічними до ендосперму та специфічними до оболонки насіння. [Див. Thompson et al. 1989 BioEssays 10:108]. Прикладами специфічних до насіння промоторів є, крім інших, целюлоза-синтаза (celA), Cim1, гамма-зеїн, глобулін-1, зеїн кукурудзи 19kD (cZ19BI) та інші.

До інших придатних тканинспецифічних або органоспецифічних промоторів належать промотор напін-гена з рапсу [Патент США №5,608,152], USP-промотор із *Vicia faba* [Baeumlein et al., 1991 Mol Gen Genet. 225(3):459-67], олеозин-промотор із *Arabidopsis* [Заявка РСТ № WO 98/45461], фазеолін-промотор із *Phaseolus vulgaris* [Патент США №5,504,200], Все4-промотор із *Brassica* [Заявка РСТ № WO 91/13980] або легумін В4 промотор [LeB4; Baeumlein et al., 1992 Plant Journal, 2(2):233-9], а також промотори, які забезпечують специфічну до насіння експресію в однодольних рослинах, таких як кукурудза, ячмінь, пшениця, жито, рис і т. д. Придатними промоторами є промотор 1pt2 або 1pt1-гена з ячменю [Заявка РСХ № WO 95/15389 та Заявка РСХ № WO 95/23230] або описані в заявці РСХ № WO 99/16890 (промотори з гордеїн-гена ячменю, глютелін-гена рису, оризин-гена рису, проламін-гена рису, гліадин-гена пшениці, глютенін-гена пшениці, глютенін-гена вівса, касирин-гена сорго та секалін-гена жита).

До інших промоторів, які застосовують в експресійних касетах винаходу, належать, крім інших, головний

промотор a/b-зв'язувального білка хлорофілу, промотори гістону, Ap3 промотор, промотор конгліцину, промотор напіну, промотор соєвого лектину, промотор зеїну кукурудзи 15kD, промотор зеїну 22kD, промотор зеїну 27kD, промотор g-зеїну, промотори waxu, shrunken 1, shrunken 2 та bronze, Zm13 промотор [Патент США №5,086,169], промотори полігалактуронози кукурудзи (PG) [Патенти США №№ 5,412,085 та 5,545,546] і SGB6 промотор [Патент США №5,470,359], а також синтетичні або інші природні промотори.

Додаткової гнучкості в контролюванні експресії гетерологічного гена в рослинах досягають шляхом застосування доменів зв'язування ДНК та елементів відповіді з гетерологічних джерел (тобто доменів зв'язування ДНК з нерослинних джерел). Прикладом такого гетерологічного домену зв'язування є домен зв'язування ДНК LexA [Brent and Ptashne, Cell 43:729-736 (1985)].

Інший аспект винаходу стосується клітин-хазяїв, у які було введено рекомбінантний вектор експресії згідно з винаходом. Терміни "клітина-хазяїн" та "рекомбінантна клітина-хазяїн" вживаються авторами поперемінно. Слід розуміти, що такі терміни стосуються не лише конкретної клітини, але вони також стосуються потомства або можливого потомства такої клітини. Оскільки в наступних поколіннях можуть траплятися певні зміни через мутації або вплив навколишнього середовища, таке потомство фактично не може бути ідентичним батьківській клітині, але все одно охоплюється вжитим авторами терміном. Клітина-хазяїн може бути будь-якою прокаріотною або еукаріотною клітиною. Наприклад, IMI полінуклеотид може бути експресований у бактеріальних клітинах, таких як *C. glutamicum*, клітини комах, грибові клітини або клітини ссавців (такі як клітини яєчника китайського хом'яка (CHO) або клітини COS), водорості, війчасті, рослинні клітини, грибки або інші мікроорганізми, такі як *C. glutamicum*. Інші придатні клітини-хазяї є відомими спеціалістам.

Клітину-хазяїн згідно з винаходом, таку як прокаріотна або еукаріотна клітина-хазяїн у культурі, використовують для вироблення (тобто експресії) IMI полінуклеотиду. Відповідно, винахід також забезпечує способи вироблення IMI поліпептидів з використанням клітин-хазяїв згідно з винаходом. В одному варіанті втілення способу включає культивування клітини-хазяїна згідно з винаходом (у яку було введено рекомбінантний вектор експресії, який кодує IMI поліпептид, або в геном якої було введено ген, який кодує поліпептид дикого типу або IMI поліпептид) у придатному середовищі до вироблення IMI поліпептиду. В іншому варіанті втілення спосіб також включає виділення IMI поліпептидів із середовища або клітини-хазяїна. Інший аспект винаходу стосується виділених IMI поліпептидів та їх біологічно активних частин. "Виділений" або "очищений" поліпептид або його біологічно активна частина є вільними від деякого клітинного матеріалу, якщо одержуються способами рекомбінантних ДНК, або хімічних попередників або інших хімічних речовин, якщо хімічно синтезуються. Вираз "практично вільний від клітинного матеріалу" охоплює препарати IMI поліпептиду, в яких поліпептид є відокремленим від деяких із клітинних компонентів клітин, у яких він природним або рекомбінантним шляхом виробляється. В одному варіанті втілення вираз "практично вільний від клітинного матеріалу" охоплює препарати IMI поліпептиду, що мають менше, ніж приблизно 30% (сухої маси) відмінного від IMI матеріалу (який також вказується авторами як "забруднюючий поліпептид"), краще - менше, ніж приблизно 20% відмінного від IMI матеріалу, ще краще - менше, ніж приблизно 10% відмінного від IMI матеріалу, найкраще - менше, ніж приблизно 5% відмінного від IMI матеріалу.

Якщо IMI поліпептид або його біологічно активна частина виробляється рекомбінантно, вони також в оптимальному варіанті є практично вільними від культурального середовища, тобто культуральне середовище складає менше, ніж приблизно 20%, краще - менше, ніж приблизно 10%, найкраще - менше, ніж приблизно 5% об'єму препарату поліпептиду. Вираз "практично вільний від хімічних попередників або інших хімічних речовин" охоплює препарати IMI поліпептиду, в яких поліпептид є відокремленим від хімічних попередників або інших хімічних речовин, які беруть участь у синтезі поліпептиду. В одному варіанті втілення вираз "практично вільний від хімічних попередників або інших хімічних речовин" охоплює препарати IMI поліпептиду, що мають менше, ніж приблизно 30% (сухої маси) хімічних попередників або відмінних від IMI хімічних речовин, краще - менше, ніж приблизно 20% хімічних попередників або відмінних від IMI хімічних речовин, ще краще - менше, ніж приблизно 10% хімічних попередників або відмінних від IMI хімічних речовин, найкраще - менше, ніж приблизно 5% хімічних попередників або відмінних від IMI хімічних речовин. В оптимальних варіантах втілення виділені поліпептиди або їх біологічно активні частини не містять забруднюючих поліпептидів з того організму, з якого походить IMI поліпептид. Як правило, такі поліпептиди одержують шляхом рекомбінантної експресії, наприклад, IMI поліпептиду *Triticum aestivum* у рослинах, які не є *Triticum aestivum*, або мікроорганізмах, таких як *C. glutamicum*, війчасті, водорості або грибки.

Послідовності IMI полінуклеотиду та поліпептиду згідно з винаходом мають різне застосування. Нуклеїновокислотні та амінокислотні послідовності даного винаходу застосовують для трансформації рослин, таким чином, модулюючи резистентність рослин до імідазолінонових гербіцидів. Відповідно, винахід забезпечує спосіб одержання трансгенної рослини, яка має підвищену толерантність до імідазолінонового гербіциду, включаючи (а) трансформацію рослинної клітини одним або кількома векторами експресії, які включають одну або кілька IMI нуклеїнових кислот, і (б) вирощування з рослинної клітини трансгенної рослини з підвищеною резистентністю до імідазолінонового гербіциду порівняно з сортом рослини дикого типу. В одному варіанті втілення множинні IMI нуклеїнові кислоти походять із різних геномів. Даний винахід також охоплює способи одержання трансгенної рослини, яка має підвищену толерантність до імідазолінонового гербіциду, включаючи (а) трансформацію рослинної клітини вектором експресії, який включає IMI нуклеїнову кислоту, причому нуклеїнова кислота не є Imi1 нуклеїновою кислотою, і (б) вирощування з рослинної клітини трансгенної рослини з підвищеною резистентністю до імідазолінонового гербіциду порівняно з сортом рослини дикого типу.

Даний винахід включає способи зміни толерантності рослини до імідазолінонового гербіциду, які включають зміну експресії однієї або кількох IMI нуклеїнових кислот. В оптимальному варіанті нуклеїнові кислоти містяться в різних геномах або походять із різних геномів. Резистентність рослини до імідазолінонового гербіциду може бути підвищена або знижена, що досягається посиленням або послабленням експресії IMI полінуклеотиду, відповідно. В оптимальному варіанті резистентність рослини до імідазолінонового гербіциду підвищують шляхом посилення експресії IMI полінуклеотиду. Експресія IMI

полінуклеотиду може змінюватися будь-якими відомими спеціалістам способами. Застосовують способи посилення експресії ІМІ полінуклеотидів, у яких рослина є або трансгенною, або нетрансгенною. У випадках, коли рослина є трансгенною, рослина може бути трансформована вектором, який містить будь-яку з вищеписаних ІМІ кодуючих нуклеїнових кислот, або ж, рослина може бути трансформована промотором, який спрямовує експресію ендегенних ІМІ полінуклеотидів у рослині. Винахід передбачає, що такий промотор може бути тканинспецифічним або регульованим розвитком. В альтернативному варіанті нетрансгенні рослини можуть мати експресію ендегенного ІМІ полінуклеотиду, яка змінюється включенням природного промотора. Експресія полінуклеотидів, які включають SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:3 у заданих рослинах може здійснюватися, крім іншого, за допомогою: (а) конститутивного промотора, (б) хімічно індукованого промотора та (в) переекспресії підданого інженерії промотора, наприклад, похідними від цинкових пальців факторами транскрипції [Greisman and Pabo, 1997 Science 275:657].

В оптимальному варіанті втілення транскрипцію ІМІ полінуклеотиду модулюють, застосовуючи похідні від цинкових пальців фактори транскрипції (ZFP), які описано у [Greisman and Pabo, 1997 Science 275:657], і які виробляються Sangamo Biosciences, Inc. Ці ZFP включають як домен розпізнання ДНК, так і функціональний домен, який викликає активацію або пригнічення заданої нуклеїнової кислоти, такої як ІМІ нуклеїнова кислота. Отже, створюють активуючі і пригнічувальні ZFP, які специфічно розпізнають промотори ІМІ полінуклеотиду, які було описано вище і які застосовують для посилення або послаблення експресії ІМІ полінуклеотиду в рослині, таким чином, модулюючи резистентність рослини до гербіцидів.

Як було детальніше описано вище, рослини, які одержують способами даного винаходу, можуть бути однодольними або дводольними. Рослини вибирають, наприклад, з-поміж кукурудзи, пшениці, жита, вівса, тритикале, рису, ячменю, сої, арахісу, бавовни, рапсу, канולי, маніхоту, перцю, соняшника, чорнобривців, пасльонових рослин, картоплі, тютюну, баклажану, томатів, видів віки, гороху, люцерни, кави, какао, чаю, видів верби, олійної пальми, кокосу, багаторічних трав та фуражних культур. До фуражних культур належать, крім інших, пирій, *Phalaris arundinacea*, *Bromopsis inermis*, ди́ке жито, *Bluegrass*, *Dactylis glomerata* L., люцерна, *Salfoin*, *Lotus corniculatus* L., шведська конюшина, червона конюшина та буркун. В оптимальному варіанті втілення рослиною є пшенична культура. У кожному з вищеписаних способів рослинна клітина включає, крім іншого, протопласт, гаметопродукуючу клітину та клітину, яка регенерується в цілу рослину. Вжитий авторами термін "трансгенний" стосується будь-якої рослини, рослинної клітини, калюсу, рослинної тканини або частини рослини, що містить, повністю або частково, принаймні один рекомбінантний полінуклеотид. У багатьох випадках рекомбінантний полінуклеотид, частково або повністю, є стабільно включеним у хромосому або стійкий позахромосомний елемент таким чином, що він передається наступним поколінням.

Як описано вище, даний винахід пропонує композиції та способи підвищення резистентності до імідазолінону у пшеничної культури або насіння порівняно з різновидами рослини або насінням дикого типу. В оптимальному варіанті втілення резистентність до імідазолінону у пшеничної культури або насіння підвищується таким чином, що рослина/або насіння може витримувати нанесення імідазолінонового гербіциду в кількості приблизно $10\text{--}400\text{г ai/га}^{-1}$, краще - $20\text{--}160\text{г ai/га}^{-1}$, найкраще - $40\text{--}80\text{г ai/га}^{-1}$. Вжитий авторами термін "витримувати" нанесення імідазолінонового гербіциду означає, що рослина не знищується або не зазнає ураження від такого нанесення.

Крім того, авторами пропонується спосіб контролю над бур'янами в оточенні пшеничної культури, який включає нанесення імідазолінонового гербіциду на бур'яни та пшеничну культуру, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінонового гербіциду порівняно з сортом пшеничної культури дикого типу, і рослина містить одну або кілька ІМІ нуклеїнових кислот. В одному варіанті втілення рослина містить множинні ІМІ нуклеїнові кислоти, які містяться в різних геномах або походять із різних геномів. В іншому варіанті втілення рослина містить відмінну від It1 нуклеїнову кислоту. Завдяки забезпеченню пшеничних культур з підвищеною резистентністю до імідазолінону, існує широкий вибір придатних до застосування композицій для захисту пшеничних культур від бур'янів з метою активізації росту рослин та зниження конкурентної боротьби за поживні речовини. Імідазоліноновий гербіцид застосовують окремо для досходового, післясходового, передпосівного та посівного контролю над бур'янами на площах, які оточують описані авторами пшеничні культури, або ж застосовують композицію імідазолінонового гербіциду, яка містить інші добавки. Імідазоліноновий гербіцид також застосовують для обробки насіння. До додатків, які містяться в композиції імідазолінонового гербіциду, належать інші гербіциди, детергенти, ад'юванти, засоби розсіювання, засоби прилипання, стабілізатори або інші подібні агенти. Композиція імідазолінонового гербіциду може бути рідкою або сухою композицією і може включати, крім іншого, сипкі порошки, емульговані концентрати та рідкі концентрати. Імідазоліноновий гербіцид та гербіцидні композиції наносять традиційними способами, наприклад, шляхом розпилення, поливання, зрошування або іншими подібними способами.

У заявці містяться посилання на різні публікації. Описи всіх цих публікацій та посилання, наведені в цих публікаціях у їх повному обсязі, включено авторами шляхом посилання в цю заявку для більш повного опису рівня техніки, якого стосується цей винахід.

Слід також розуміти, що вищенаведене стосується оптимальних варіантів втілення даного винаходу, і що існує можливість внесення численних змін без відхилення від обсягу винаходу. Винахід далі пояснюється на представлених нижче прикладах, які не повинні розглядатись як такі, що якимось чином обмежують його обсяг. Навпаки, слід чітко розуміти, що існує можливість звернення до різних інших варіантів його втілення, модифікацій та еквівалентів, які, по ознайомленню з представленим описом, стануть зрозумілими спеціалістам без відхилення від сутності даного винаходу та/або обсягу формули винаходу, що додається.

Приклади

Приклад 1

Мутагенез та відбір резистентних ліній пшениці

Приблизно 40000 зразків насіння *Triticum aestivum* L. cv CDC Teal [Hughes and Hucl, 1993 Can. J. Plant Sci. 73:193-197] піддавали мутагенезові, застосовуючи змінені процедури, описані в роботі [Washington and Sears (1970)]. Насіння попередньо вимочували в дистильованій воді протягом чотирьох годин, після чого

обробляли 0,3% EMS протягом шести годин. Насіння постійно промивали водопровідною водою протягом семи годин і залишали висихати протягом приблизно чотирьох годин перед висіванням у полі. Рослини M_1 змішували і насіння збирали в загальну масу. Приблизно 2×10^6 рослин M_2 вирощували в полі наступного року і обприскували на стадії двох листків імазамоксу при нормі 40 г ai/га^{-1} в об'ємі аерозолі 100 л га^{-1} . До розчину аерозолі додавали допоміжну речовину для злиття 0,05% (об'єм/об'єм). Відбирали шість ліній, резистентних до імазамоксу, які позначали як лінії 1A, 9A, 10A, 11A, 15A та 16A. Покоління M_3 та M_4 вирощували в камері для вирощування і відбирали рослини, резистентні до імазамоксу при нормі 20 г ai/га^{-1} . Резистентні рослини відбирали в поколінні M_5 після нанесення 40 г ai/га^{-1} в полі. Насіння M_5 було гомозиготним за характеристиками, оскільки випробування потомства не виявляло сегрегації щодо резистентності до імазамоксу.

Приклад 2

Способи, які застосовують для визначення успадкування та алелізму IMI генів

Для визначення генетичного контролю резистентності до імазамоксу в шести лініях пшениці здійснювали взаємне схрещування між шістьма гомозиготними резистентними M_6 лініями та CDC Teal (чутливим до імазамоксу). Випадково відібрані рослини F_1 від кожного схрещування піддавали зворотному схрещуванню з CDC Teal для утворення зворотного схрещення (BC) F_1 популяцій. Для дослідження алелізму здійснювали всі можливі взаємні схрещування між шістьма мутантами та SWP965001 (Grandin/3*Fidel-FS-4). SWP965001 є лінією ярової пшениці, яка є гомозиготною для FS-4 алелі. Батьківські генотипи вирощували в камері для вирощування з 16-годинним фотоперіодом і 24°C денним та 16°C нічним температурним режимом. Колоски, які з'являлися на $\frac{3}{4}$, піддавали емаскуляції, а потім запилювали через 2-3 дні після емаскуляції. Випадково відібрані рослини F_2 з усіх сегрегуючих гібридів змішували для одержання груп $F_{2:3}$. Батьківські рослини, F_1 , BCF $_1$, F_2 та групи $F_{2:3}$ випробували на реакцію на імазамокс. Усі експерименти здійснювали в камері для вирощування з 16-годинним фотоперіодом і 23°C денним та 16°C нічним температурним режимом. Усі експерименти здійснювали на повністю випадковій основі. В експериментах із залученням груп $F_{2:3}$ намагалися забезпечити рандомізацію як у межах групи, так і між групами. Популяції F_1 та F_2 відбирали в такому самому експерименті разом з батьківськими генотипами та CDC Teal як контрольними зразками. Обидві популяції, BCF $_1$ та $F_{2:3}$, відбирали у двох окремих експериментах разом з відповідними батьківськими генотипами як контрольними зразками.

Обробку гербіцидами застосовували до рослин, які вирощували на платформах з комірками 8×16 , на стадії двох листків, використовуючи шланговий розпилювач, калібрований таким чином, щоб розпилювати 100 л га^{-1} . Імазамокс наносили на рослини при нормі 20 г ai/га^{-1} , застосовуючи насадку 8001 EVS під тиском 275 кПа . До розчину гербіциду перед нанесенням додавали поверхнево-активну речовину для злиття (0,05% (об'єм/об'єм)). Через п'ятнадцять днів після нанесення гербіциду рослини розбивали по групах на основі первинної реакції і поділяли на резистентні, проміжні або чутливі. Резистентні рослини після гербіцидної обробки були фенотипічно неушкодженими, тоді як проміжні рослини характеризувалися затримкою росту перших двох листків, потемнінням (темно-зеленим забарвленням) листя та появою колеоптильних відростків. Чутливі рослини характеризувалися відсутністю розвитку нових листків, широким хлорозом листя і, зрештою, загибеллю рослини. Для менделівського аналізу сегрегуючих популяцій рослини поділяли на резистентні та чутливі категорії і випробували на адекватність різним 1-генним, 2-генним та 3-генним моделям аналізу χ^2 . Для даних по рослинах F_2 та BCF $_1$ проміжні реакції було включено до категорії резистентної реакції. Для регулювання значення χ^2 застосовували корекцію за Yates для безперервності, коли в аналізі χ^2 користувалися лише одним ступенем свободи [Steele and Torrie 1980 Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York, New York, pp. 633].

Приклад 3

Результати, що стосуються успадкування IMI генів

Усі резистентні батьківські рослини давали однаковий фенотип при розпилюванні 20 г ai/га^{-1} імазамоксу. (Фігура 1). Взаємне схрещування між резистентними лініями та чутливими батьківськими рослинами (CDC Teal) у результаті давало рослини F_1 , які витримували нанесення імазамоксу (Фігура 1), що вказувало на те, що резистентність до імазамоксу є ядерною, а не цитоплазматичною характеристикою. За винятком гібриду 15A \times Teal, рослини F_1 , одержані в результаті схрещування кожної з резистентних ліній з CDC Teal, виявляли проміжну реакцію (Фігура 1). Оскільки рослини F_1 були фенотипічно проміжними між двома батьківськими рослинами, було зроблено висновок, що резистентність до імазамоксу в цих лініях була частково домінантною характеристикою (Фігура 1). Генетичний аналіз резистентності до імідазолінону та сульфонілсечовини в *Arabidopsis thaliana* [Haughn and Somerville, 1986 Mol. Gen. Genet. 204:430-434] та *leamays* [Newhouse et al., 1991 Theor. Appl. Genet. 83:65-70], *Brassica napus* [Swanson et al., 1989 Theor. Appl. Gen. 78:525-530] та *Glycine max* [Sebastian et al., 1989 Crop Sci. 29:1403-1408] також вказував на присутність єдиного, частково домінантного ядерного гена.

Чотирнадцять рослин F_1 , одержаних у результаті схрещування 15A \times Teal, зараховували до резистентних (Фігура 1). Оцінка популяцій F_2 від цього схрещування показала, що два незалежно сегреговані локуси були пов'язані з забезпеченням резистентності в цьому генотипі (Фігура 2). Оскільки ai/га^{-1} має нести два гетерозиготні резистентні локуси, можна очікувати, що спостерігатиметься резистентна реакція. Якщо кожен з цих локусів окремо забезпечує часткове домінування, то в сумі два гетерозиготні локуси мають забезпечувати резистентну реакцію. Swanson et al. (1989) комбінували дві напівдомінантні алелі резистентності до імідазолінону з *Brassica napus*, які представляють два роз'єднані гени, для одержання гібриду F_1 , який переважав у резистентності до імідазолінону будь-яку з окремих гетерозиготних ліній. Автори дійшли висновку, що механізми резистентності є сукупними, і вищий рівень резистентності спостерігають у лініях, які несуть більше однієї алелі резистентності.

Аналіз цитоплазматичної спадковості здійснювали в поколінні F_2 шляхом випробування рівномірності відхилення від співвідношення сегрегації між двома взаємними популяціями F_2 . Аналіз χ^2 не виявив значного відхилення між взаємними популяціями, підтвердивши відсутність цитоплазматичної спадковості (Фігура 2). Оскільки цитоплазматична спадковість була відсутня, дані двох взаємних популяцій комбінували і розраховували загальний показник χ^2 по об'єднаних даних F_2 (Фігура 2).

За винятком Teal×15A, усі популяції F_2 , одержані в результаті схрещувань резистентних та чутливих рослин, відповідали співвідношенню 3:1 резистентності до чутливості, вказуючи на сегрегацію єдиного головного гена резистентності до імазамоксу (Фігура 2). Коли рослини F_1 схрещували з чутливими батьківськими рослинами, одержані в результаті популяції BCF_1 відповідали співвідношенню 1:1 резистентності:чутливості, підтверджуючи однолокусну гіпотезу (Фігура 2). Дані щодо популяції F_2 від схрещування 15A×Teal відповідають співвідношенню 15:1 резистентності:чутливості ($P=0,08$), вказуючи на сегрегацію двох незалежних, комплементарних генів (Фігура 2). Популяція BCF_1 відповідала співвідношенню 3:1 резистентності:чутливості зі значенням P Chi-square 0,35, підтверджуючи результати для F_2 (Фігура 2).

Оскільки на основі даних для F_2 було висловлено припущення, що резистентність у лініях 1A, 9A, 10A, 11A та 16A контролюється одним головним геном, групи $F_{2:3}$ мають сегрегуватися і відповідати співвідношенню 1:2:1 груп гомозиготної резистентності: сегрегації: гомозиготної чутливості. Оцінка груп $F_{2:3}$ показала, що гібриди Teal×1A, Teal×9A, Teal×10A, Teal×11A та Teal×16A усі відповідають співвідношенню групи $F_{2:3}$ 1:2:1 резистентності: сегрегації: чутливості зі значеннями P Chi-squares 0,64, 0,66, 0,52, 0,40 та 0,94, відповідно (Фігура 3). Ці результати підтверджують результати даних для F_2 та BCF_1 , за якими резистентність у лініях 1A, 10A, 9A, 11A та резистентність у 16A контролюється одним головним геном. Ця модель спадковості узгоджується з іншими даними, які свідчили про генетичний контроль резистентності до інгібіторів АНАС гербіцидів. На даний час майже всі мутації рослин, які забезпечують резистентність до імідазолінів, демонструють, що єдиний, частково домінуючий ген контролює характеристику резистентності. У *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana* та *Nicotiana tabacum* резистентність до інгібіторів АНАС успадковується як єдиний частково домінуючий ядерний ген [Newhouse et al. 1991; Newhouse et al. 1992; Chaleff and Ray, 1984 Science 223:1148-1151; Sathasivan et al., 1991 Plant Physiol. 97:1044-1050]. Резистентність рослин до інгібіторів АНАС гербіцидів відбувається здебільшого через одиночну мутацію в гені, що кодує фермент АНАС [Harms et al. 1992, Mol. Gen. Genet. 233:427-435; Winder and Spalding, 1988 Mol. Gen. Genet. 238:394-399].

Дані для популяції F_2 , одержаної в результаті схрещування Teal×15A, відповідали співвідношенню 15:1 резистентності:чутливості, вказуючи на сегрегацію двох незалежно сегрегованих локусів (Фігура 2). Якщо це так, то групи $F_{2:3}$ мають сегрегуватися і відповідати співвідношенню групи $F_{2:3}$ 7:8:1 резистентності:сегрегації:чутливості. Групи $F_{2:3}$ від схрещування 15A×Teal не відповідали очікуваному співвідношенню 7:8:1 (Фігура 3), підтверджуючи результати для популяцій F_2 та BCF_1 , які свідчили про те, що резистентність у 15A забезпечується двома незалежними локусами. Наскільки відомо винахідникові, це перший повідомлений випадок, коли дві незалежно сегреговані резистентні до імідазоліну алелі були ідентифіковані в одній лінії після мутагенезу насіння.

Приклад 4

Результати, що стосуються алелізму ІМІ генів

Для визначення алельних взаємозв'язків генів резистентності досліджували всі можливі схрещування між резистентними лініями. Не спостерігали чутливих рослин у популяціях F_2 , одержаних у результаті взаємного схрещування між лініями SWP965001, 1A, 9A, 10A, 15A та 16A (Фігура 4). Оскільки ці популяції не сегрегувалися, гени резистентності в цих лініях є або алелями в локусі FS-4, або є дуже щільно зв'язаними. Оскільки ці популяції не сегрегувалися в поколінні F_2 , групи $F_{2:3}$ від цих схрещувань не досліджували.

Усі схрещування за участю лінії 11A сегрегувалися в поколінні F_2 , вказуючи на присутність унікального гена резистентності у 11A (Фігура 4). У разі присутності двох незалежно сегрегованих генів резистентності в результаті схрещування двох ліній, кожна з яких несе один ген резистентності, слід очікувати співвідношення 15:1 резистентності: чутливості в поколінні F_2 . У поколінні F_2 , гібриди SWP965001×11A, 1A×11A, 10A×11A та 16A×11A відповідають очікуваному співвідношенню 15:1 резистентності:чутливості, вказуючи на незалежну сегрегацію двох головних генів резистентності (Фігура 4). Співвідношення у групі $F_{2:3}$ від цих схрещувань також відповідали співвідношенням 7:8:1 резистентності: сегрегації: чутливості, підтверджуючи результати, отримані для покоління F_2 (Фігура 5). Гібрид 11A×9A давав сегреговану популяцію F_2 , але співвідношення не відповідало показникові сегрегації 15:1 через надлишок чутливих сегрегантів. Випробували різні інші дводенні гіпотези, але всі виявилися високо значущими (дані не показано). Однак, оцінка груп $F_{2:3}$ від цього схрещування відповідала показникові сегрегації 7:8:1, вказуючи на сегрегацію двох незалежних генів (Фігура 5). Ці результати підтверджують, що ген резистентності у 11A є відмінним від генів у лініях SWP96001, 1A, 9A, 10A та 16A.

Гібрид 11A×15A не давав сегрегованої популяції F_2 . Оскільки 15A несе два гени резистентності, один алель ний до FS-4, сегрегована популяція F_2 у гібриді 11A×15A має вказувати на присутність трьох сегрегованих генів. Сегреговані покоління, одержані в результаті схрещування 15A×11A, було випробувано на сегрегацію трьох незалежних локусів. Рослини F_2 відповідали очікуваному співвідношенню 63:1 резистентності:чутливості, вказуючи на сегрегацію трьох незалежних локусів (Фігура 4). Ці результати вказують на те, що друга мутація у 15A не є алельною генів резистентності у 11A. Групи $F_{2:3}$ не піддавали відборі, оскільки довелося б відбирати понад 330 рослин у кожній групі, щоб забезпечити достатню потужність критерію [Hanson, 1959 Agron. J. 51:711-716].

Було ідентифіковано три незалежні локуси резистентності, кожен з яких мав алель, яка забезпечує резистентність до імазамоксу. Опубліковано рекомендовані правила генного локусу та символізації алелей [McIntosh et al., 1998 Catalogue of Gene Symbols. Volume 5, Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium. Saskatoon, Saskatchewan]. Неалельні генні локуси ферменту, які каналізують одну реакцію, мають позначатися однаковим символом, який відповідає традиційній назві ферменту. Традиційною назвою для АНАС є ALS. За відсутності даних для призначення локусів для конкретних хромосом та геномів вони позначаються послідовною серією. Позначення фенотипу, який спостерігають у разі змін у гені, в результаті чого виникає нова алель, має відображати цей фенотип. Таким чином, пропонується, щоб алель резистентності до імідазоліну FS-4 позначалася як Imi1, а її локус - позначався як Als1. Imi1 означає резистентність до імідазоліну. Це позначення вказує, що ген є домінуючим характеристикою, і він є першою ідентифікованою алеллю. Дані для сегрегованих популяцій F_2 та $F_{2:3}$

вказують, що 15A та 11A несуть дві нові незалежні алелі резистентності в різних локусах (Фігури 2 та 3). Позначеннями для цих алелей є lmi2 для мутації 11A в локусі Als2 і lmi3 для другої мутації 15A в локусі Als3.

Авторами було ідентифіковано три незалежно сегреговані алелі, які забезпечують резистентність до імазамоксу, а саме, lmi1 (1A, 9A, 10A, 15A та 16A), lmi2 (11A) та lmi3 (15A). Пропонується, щоб кожна з трьох ідентифікованих алелей пов'язувалася зі своїм структурним геном, який кодує нечутливі до гербіциду форми AHAS. Оскільки пшениця є гексаплоїдною, слід очікувати багато локусів AHAS. Було виявлено, що інші поліплоїдні види мають більше однієї копії AHAS. У *Nicotiana tabacum*, алотетраплоїді, було ідентифіковано і охарактеризовано два гени AHAS [Mazur et al. 1987]. Chaleff and Ray (1984) ідентифікували два незалежно сегреговані алелі резистентності до сульфонілсечовини в *Nicotiana tabacum*, кожна з яких кодує змінену форму AHAS. *Zea mays* має два конститутивно експресовані ідентичні гени AHAS [Fang et al., 1992 Plant Mol. Biol. 18:1185-1187]. В алотетраплоїді *Brassica napus* та *Gossypium hirsutum* присутня багатогенна група AHAS, яка складається з п'яти та шести членів, відповідно [Rutledge et al., 1991 Mol Gen. Genet. 229:31-40; Grula et al., 1995 Plant Mol. Biol. 28:837-846]. Вищий рівень резистентності до гербіцидів спостерігали в поліплоїдних видах у разі присутності багатьох алелей резистентності. Swanson et al. [1989 Theor. Appl. Gen. 78:525-530] комбінували дві унікальні алелі резистентності до імідазолінону з двох гомозиготних ліній *Brassica napus*, в результаті чого одержували потомство з вищим рівнем резистентності, ніж у кожної з цих гомозиготних ліній окремо. Creason and Chaleff [1988 Theor. Appl. Genet. 76:177-182] ідентифікували рослини *Nicotiana tabacum*, гомозиготні для двох мутацій, які забезпечували резистентність до сульфонілсечовини. Рослини, гомозиготні для обох мутацій, були в п'ять разів більш резистентними до нанесення на листя хлорсульфурону, ніж рослини, гомозиготні для кожної окремої мутації. Даний винахід пропонує вироблення вищого рівня резистентності до імідазолінонового гербіциду у пшениці шляхом комбінування будь-яких двох або всіх трьох алелей резистентності.

Приклад 5

Толерантність до імідазолінонових гербіцидів у Teal11A, Teal15A та гібрид Teal11A/15A

Підвищена толерантність, яку демонструють Teal11A та Teal15A до 20 грамів на гектар імазамоксу, підтверджувалася в наведених вище прикладах можливістю відрізнення толерантних від чутливих батьківських та сегрегованих рослин у дослідженні успадкування. Було виявлено, що Teal11A забезпечує такий самий рівень толерантності до імідазолінонових гербіцидів, як і той, що забезпечується мутацією FS4 у Fidel у різних оранжерейних та польових порівняннях. Подібність толерантності також відбивається в порівнянні *in vitro* активності AHAS, видобутої з толерантних рослин. Це є можливим, оскільки толерантність у Teal11A, Teal15A та FS4 зумовлюється мутаціями у ферменті AHAS, що забезпечує резистентність до інгібування імідазоліновими гербіцидами. Фігура 6 вказує, що активність ферменту AHAS, видобутого з Teal11A та BW755, лінії, що містить FS4, змінює подібність зі збільшенням норми імазамоксу, й обидва мають вищий відсоток активного (резистентного) ферменту при найвищій концентрації імазамоксу, ніж у контрольної рослини Teal дикого типу.

Присутність двох IMI нуклеїнових кислот у Teal15A забезпечує підвищену толерантність до імідазолінонових гербіцидів порівняно з такою лінією, як BW755, що має лише одну IMI нуклеїнову кислоту. Ця підвищена толерантність відбивається й у меншому ураженні при більш високих нормах гербіциду, й у більшій неінгібованій активності AHAS ферменту. Фігура 7 пояснює, що при 10x нормі імазамоксу (200г/га) усі оброблені однокленні рослини зазнавали ураження, тоді як жодна з двокленних рослин не була ураженою. При всіх концентраціях імазамоксу в *in vitro* аналізі активності AHAS (Фігура 6), але особливо - при найвищих концентраціях, рослина Teal15A мала вищий відсоток активного (резистентного) ферменту, ніж у будь-якої з моногенних ліній, Teal11A та BW755.

Комбінування трьох неалельних генів, кожен з яких забезпечує толерантність до імідазолінонових гербіцидів, у результаті дає більшу толерантність, ніж у разі лише двох неалельних генів (Фігура 7). При нормі 30X або 600г/га імазамоксу більше половини рослин не витримали уражень у ще сегрегованій змішаній популяції Teal15A, схрещеній з Teal11A, тоді як усі рослини гомозиготної популяції Teal15A витримали ураження.

Фігура 1

Гібрид	Резист (R)	Проміжн (I)	Чутлив (S)	Загалом відібрано F ₁		
				R	I	S
Teal	0	0	334			
1A	59	0	0			
Teal x 1A	0	5	0	0	10	0
1A x Teal	0	5	0			
9A	66	0	0			
Teal x 9A	0	5	0	0	10	0
9A x Teal	0	5	0			
10A	66	0	0			
Teal x 10A	0	5	0	0	11	0
10A x Teal	0	6	0			
11A	53	0	0			
Teal x 11A	0	7	0	0	15	0
11A x Teal	0	8	0			
15A	48	0	0			
Teal x 15A	7	0	0	14	0	0
15A x Teal	7	0	0			
16A	66	0	0			
Teal x 16A	0	7	0	0	14	0
16A x Teal	0	7	0			

Фігура 2

покоління F ₂						Покоління BCF ₁ ^e			
Гібрид	Резист. (R)	Чутлив (S)	Випроб. співвідн. (R:S)	Знач. P ^a	Рівномірн взаємних схрещув ^b	Випробуване співвідношення P			
						R	S	(R:S) ^d	Знач ^e
Teal x 1A	635	201	3:1	0,55	0,49	33	27	1:1	0,52
Teal x 9A	492	141	3:1	0,12	0,66	42	34	1:1	0,39
Teal x 10A	701	231	3:1	0,91	0,87	27	20	1:1	0,38
Teal x 11A	505	189	3:1	0,19	0,32	54	30	1:1	0,71
Teal x 15A	893	74	15:1	0,08	0,39	45	20	3:1	0,35
Teal x 16A	587	168	3:1	0,09	0,33	26	23	1:1	0,78

Фігура 3

Гібрид	Резист. (R)	Сергер. (Seg)	Чутлив (S)	Випр. співвідн. (R:Seg:S) ^a	Знач. P ^b	Заг кількість груп
Teal x 1A	12	28	10	1:2:1	0,64	50
Teal x 9A	15	22	12	1:2:1	0,66	50
Teal x 10A	9	27	14	1:2:1	0,52	50
Teal x 11A	14	26	8	1:2:1	0,40	48
Teal x 15A	36	55	9	7:8:1	0,21	100
Teal x 16A	12	25	11	1:2:1	0,94	48

Фігура 4

Гібрид	Резистентн (R)	Чутлив. (S)	Випробуване співвідношення (R:S)	Знач. P ^a
1A x 9A	506	0	-	-
1A x 10A	567	0	-	-
1A x 15A	501	0	-	-
1A x 16A	814	0	-	-
1A x SWP965001	309	0	-	-
9A x 10A	603	0	-	-
9A x 15A	424	0	-	-
9A x 16A	336	0	-	-
9A x SWP965001	407	0	-	-
10A x 15A	547	0	-	-
10A x 16A	409	0	-	-
10A x SWP965001	686	0	-	-
15A x 16A	298	0	-	-
15A x SWP965001	410	0	-	-
16A x SWP965001	509	0	-	-
SWP965001 x 11A	688	47	15:1	0,93
1A x 11A	735	56	15:1	0,37
11A x 9A	446	42	15:1	0,00
11A x 10A	557	46	15:1	0,19
11A x 15A	600	14	63:1	0,20
11A x 16A	390	34	15:1	0,16

Фігура 5

Гібрид	Резист. (R)	Сегрег. (Seg)	Чутлив. (S)	Випробув. співвідн. (R:Seg:S) ^a	Знач. р ^b	Заг. кільк. груп
SWP965001 x 11A	32	42	7	7:8:1	0,57	81
1A x 11A	33	58	9	7:8:1	0,07	100
11A x 9A	36	49	5	7:8:1	0,77	90
11A x 10A	34	59	7	7:8:1	0,14	100
11A x 16A	45	47	7	7:8:1	0,86	99

Фігура 6

Конц. імазамоксу (мкМ)	% неінгібованої активності AHAS			
	Teal	11A	BW755	15A
0,8	71,1	84,8	90,0	92,6
1,6	55,2	71,2	76,9	88,4
3,1	41,8	59,7	65,7	84,3
6,3	30,9	50,3	56,6	80,3
12,5	22,3	42,9	49,6	76,3
25,0	16,2	37,6	44,5	72,5
50,0	12,6	34,3	41,4	68,8
100,0	11,4	33,1	40,4	65,2

Фігура 7

Генотип	10X		30X	
	% уражено	% без уражень	% уражено	% без уражень
BW755 (одногоенний)	100	0	100	0
Teal 15A (двогенний)	0	100	100	0
15A/11A (тригенний)	33	67	48	52



Фігура 8, продовження

170

180

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAC GCC TTC CAG GAG ACG CCC ATA GTC GAG GTC ACC
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAC GCC TTC CAG GAG ACG CCC ATA GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAC GCC TTC CAG GAG ACG CCC ATA GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAC GCC TTC CAG GAG ACG CCC ATA GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAC GCC TTC CAG GAG ACG CCC ATA GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAC GCC TTC CAG GAG ACG CCC ATA GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAC GCC TTC CAG GAG ACG CCC ATA GTG GAG GTC ACG

```

190

200

210

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAT TAC CTT GTC CTT GAT GTG GAG GAC ATC CCC CGC GTC ATA CAG GAA GCC TTC TTC CTC GCG
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTT GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTT GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTT GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTT GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTT GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTT GCA

```

Фігура 8, продовження

220

230

240

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCG GGC CGT CCT GGC CCG GTG CTG GTC GAC ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCC GTG CCG GTC TGG GAC ACC
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTA GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCC GTC TGG GAC ACT
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTA GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCC GTC TGG GAC ACT
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTA GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCC GTC TGG GAC ACT
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTA GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCC GTC TGG GAC ACT
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTA GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCC GTC TGG GAC ACT

```

250

260

270

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S  M  N  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  A  T  E  L  L  E  Q  V  L  R  L  V
TCG ATG AAT CTA CCA GGG TAC ATC GCA CGC CTG CCC AAG CCA CCC GCG ACA GAA TTG CTT GAG CAG GTC TTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCA ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCA ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCA ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCA ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCA ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT

```

Фігура 8, продовження

280

290

```

-----+-----+-----
G E S R R P I L Y V G G G C S A S G D E L R W F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCG ATT CTC TAT GTC GGT GGT GGC TGC TCT GCA TCT GGT GAC GAA TTG CGC TGG TTT GTT GAG CTG
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCG TCT GGC GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTT
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCG TCT GGC GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTT
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCG TCT GGC GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTT
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCG TCT GGC GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTT
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCG TCT GGC GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTT

```

300

310

320

```

-----+-----+-----
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGT ATC CCA GTT ACA ACC ACT CTG ATG GGC CTC GGC AAT TTC CCC AGT GAC GAC CCG TTG TCC CTG CGC ATG CTT GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGG ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTG ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGC GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTT GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGG ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTG ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGC GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTT GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGG ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTG ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGC GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTT GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGG ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTG ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGC GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTT GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGG ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTG ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGC GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTT GGG

```

Фігура 8, продовження

330

340

350

```

-----+-----+-----
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACG GTG TAC GCA AAT TAT GCC GTG GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTT GCG TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTC GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
ATG NNT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTC GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTC GCA TTT GNT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L I T F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCX GAC CTG TTG NTC NCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L I A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG NTC GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT

```

360

370

```

-----+-----+-----
V T G K I E A F A S R A K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACA GGG AAA ATT GAG GCT TTT GCA AGC AGG GCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAT CCA GCA GAG ATT GGA AAG AAC
V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACT GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACT GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACT GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAN AAC
V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACT GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
V T G K I E A F A S R S K I E H I D I D P A E I G K N
GTG ACT GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GNG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC

```

400

430

Фігура 8, продовження

450

480

+ + + + +																										
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	A	G	L	G	A
GGG	CAG	CAC	CAG	ATG	TGG	GCG	GCA	CAA	TAT	TAC	ACC	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCG	GCT	GGT	CTG	GGC	GCA
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A
GGG	CAG	CAC	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCG	TCT	GGT	TTG	GGG	GCA
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A
GGG	CAG	CAC	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCG	TCT	GGT	TTG	GGG	GCA
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A
GGG	CAG	CAC	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCG	TCT	GGT	TTG	GGG	GCA
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A
GGG	CAG	CAC	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCG	TCT	GGT	TTG	GGG	GCA
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A
GGG	CAG	CAC	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCG	TCT	GGT	TTG	GGG	GCA
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A
GGG	CAG	CAC	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCG	TCT	GGT	TTG	GGG	GCA

Фігура 8, продовження

490 500 510

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M   G   F   G   L   P   A   A   A   G   A   S   V   A   N   P   G   V   T   V   V   D   I   D   G   D   G
ATG GGA TTT GGG CTG CCT GCT GCA GCT GGT GCT TCT GTG GCT AAC CCA GGT GTC ACA GTT GTT GAT ATT GAT GGG GAT GGT
M   G   F   G   L   P   A   A   A   G   A   A   V   A   N   P   G   V   T   V   V   D   I   D   G   D   G
ATG GGA TTT GGG TTA CCA GCT GCA GCT GGC GCT GCT GTG GCC AAC CCA GGT GTT ACA GTT GTT GAC ATT GAT GGT GAT GGT
M   G   F   G   L   P   A   A   A   G   A   A   V   A   N   P   G   V   T   V   V   D   I   D   G   D   G
ATG GGA TTT GGG TTA CCA GCT GCA GCT GGC GCT GCT GTG GCC AAC CCA GGT GTT ACA GTT GTT GAC ATT GAT GGT GAT GGT
M   G   F   G   L   P   A   A   A   G   A   A   V   A   N   P   G   V   T   V   V   D   I   D   G   D   G
ATG GGA TTT GGG TTA CCA GCT GCA GCT GGC GCT GCT GTG GCC AAC CCA GGT GTT ACA GTT GTT GAC ATT GAT GGT GAT GGT
M   G   F   G   L   P   A   A   A   G   A   A   V   A   N   P   G   V   T   V   V   D   I   D   G   D   G
ATG GGA TTT GGG TTA CCA GCT GCA GCT GGC GCT GCT GTG GCC AAC CCA GGT GTT ACA GTT GTT GAC ATT GAT GGT GAT GGT
M   G   F   G   L   P   A   A   A   G   A   A   V   A   N   P   G   V   T   V   V   D   I   D   G   D   G
ATG GGA TTT GGG TTA CCA GCT GCA GCT GGC GCT GCT GTG GCC AAC CCA GGT GTT ACA GTT GTT GAC ATT GAT GGT GAT GGT

```

520 530 540

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S   F   L   M   N   I   Q   E   L   A   L   I   R   I   E   N   L   P   V   K   V   M   V   L   N   N   Q
AGC TTC CTC ATG AAC ATT CAG GAG CTG GCA TTG ATC CGC ATT GAG AAC CTC CCT GTG AAG GTG ATG GTG TTG AAC AAC CAA
S   F   L   M   N   I   Q   E   L   A   L   I   R   I   E   N   L   P   V   K   V   M   I   L   N   N   Q
AGT TTC CTC ATG AAC ATT CAG GAG TTG GCG TTG ATC CGC ATT GAG AAC CTC CCA GTG AAG GTG ATG ATA TTG AAC AAC CAG
S   F   L   M   N   I   Q   E   L   A   L   I   R   I   E   N   L   P   V   K   V   M   I   L   N   N   Q
AGT TTC CTC ATG AAC ATT CAG GAG TTG GCG TTG ATC CGC ATT GAG AAC CTC CCA GTG AAG GTG ATG ATA TTG AAC AAC CAG
S   F   L   M   N   I   Q   E   L   A   L   I   R   I   E   N   L   P   V   K   V   M   I   L   N   N   Q
AGT TTC CTC ATG AAC ATT CAG GAG TTG GCG TTG ATC CGC ATT GAG AAC CTC CCA GTG AAG GTG ATG ATA TTG AAC AAC CAG
S   F   L   M   N   I   Q   E   L   A   L   I   R   I   E   N   L   P   V   K   V   M   I   L   N   N   Q
AGT TTC CTC ATG AAC ATT CAG GAG TTG GCG TTG ATC CGC ATT GAG AAC CTC CCA GTG AAG GTG ATG ATA TTG AAC AAC CAG
S   F   L   M   N   I   Q   E   L   A   L   I   R   I   E   N   L   P   V   K   V   M   I   L   N   N   Q
AGT TTC CTC ATG AAC ATT CAG GAG TTG GCG TTG ATC CGC ATT GAG AAC CTC CCA GTG AAG GTG ATG ATA TTG AAC AAC CAG

```

Фігура 8, продовження

550 560

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
H   L   G   M   V   V   Q   W   E   D   R   F   Y   K   A   N   R   A   H   T   Y   L   G   N   P   E   C
CAT TTG GOT ATG GTG GTG CAA TGG GAG GAT AGG TTT TAC AAG GCG AAT AGG GCG CAT ACA TAC TTG GGC AAC CCG GAA TGT
H   L   G   M   V   V   Q   W   E   D   R   F   Y   K   A   N   R   A   H   T   Y   L   G   N   P   E   N
CAT CTG GGA ATG GTG GTG CAG TGG GAG GAT AGG TTT TAC AAG GCC AAT CGG GCG CAC ACA TAC CTT GGC AAC CCA GAA AAT
H   L   G   M   V   V   Q   W   E   D   R   F   Y   K   A   N   R   A   H   T   Y   L   G   N   P   E   N
CAT CTG GGA ATG GTG GTG CAG TGG GAG GAT AGG TTT TAC AAG GCC AAT CGG GCG CAC ACA TAC CTT GGC AAC CCA GAA AAT
H   L   G   M   V   V   Q   W   E   D   R   F   Y   K   A   N   R   A   H   T   Y   L   G   N   P   E   N
CAT CTG GGA ATG GTG GTG CAG TGG GAG GAT AGG TTT TAC AAG GCC AAT CGG GCG CAC ACA TAC CTT GGC AAC CCA GAA AAT
H   L   G   M   V   V   Q   W   E   D   R   F   Y   K   A   N   R   A   H   T   Y   L   G   N   P   E   N
CAT CTG GGA ATG GTG GTG CAG TGG GAG GAT AGG TTT TAC AAG GCC AAT CGG GCG CAC ACA TAC CTT GGC AAC CCA GAA AAT
H   L   G   M   V   V   Q   W   E   D   R   F   Y   K   A   N   R   A   H   T   Y   L   G   N   P   E   N
CAT CTG GGA ATG GTG GTG CAG TGG GAG GAT AGG TTT TAC AAG GCC AAT CGG GCG CAC ACA TAC CTT GGC AAC CCA GAA AAT

```

570 580 590

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E   S   E   I   Y   P   D   F   V   T   I   A   K   G   F   N   I   P   A   V   R   V   T   K   K   S   E
GAG AGC GAG ATA TAT CCA GAT TTT GTG ACT ATT GCT AAG GGG TTC AAT ATT CCT GCA GTC CGT GTA ACA AAG AAG AGT GAA
E   S   E   I   Y   P   D   F   V   T   I   A   K   G   F   N   V   P   A   V   R   V   T   K   K   S   E
GAG AGT GAG ATA TAT CCA GAT TTT GTG ACG ATT GCT AAA GGA TTC AAC GTT CCA GCA GTT CGA GTG ACG AAG AAG AGC GAA
E   S   E   I   Y   P   D   F   V   T   I   A   K   G   F   N   V   P   A   V   R   V   T   K   K   S   E
GAG AGT GAG ATA TAT CCA GAT TTT GTG ACG ATT GCT AAA GGA TTC AAC GTT CCA GCA GTT CGA GTG ACG AAG AAG AGC GAA
E   S   E   I   Y   P   D   F   V   T   I   A   K   G   F   N   V   P   A   V   R   V   T   K   K   S   E
GAG AGT GAG ATA TAT CCA GAT TTT GTG ACG ATT GCT AAA GGA TTC AAC GTT CCA GCA GTT CGA GTG ACG AAG AAG AGC GAA
E   S   E   I   Y   P   D   F   V   T   I   A   K   G   F   N   V   P   A   V   R   V   T   K   K   S   E
GAG AGT GAG ATA TAT CCA GAT TTT GTG ACG ATT GCT AAA GGA TTC AAC GTT CCA GCA GTT CGA GTG ACG AAG AAG AGC GAA
E   S   E   I   Y   P   D   F   V   T   I   A   K   G   F   N   V   P   A   V   R   V   T   K   K   S   E
GAG AGT GAG ATA TAT CCA GAT TTT GTG ACG ATT GCT AAA GGA TTC AAC GTT CCA GCA GTT CGA GTG ACG AAG AAG AGC GAA

```

620

640

Фігура 9

50

[illegible]

Фігура 9, продовження

170

180

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC GAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAC GCC TTC GAG GAG ACG CCC ATA GTC GAG GTC ACC
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC GAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAT GCG TTC CAG GAG ACG CCC ATC GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAT GCG TTC CAG GAG ACG CCC ATC GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAT GCG TTC CAG GAG ACG CCC ATC GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAT GCG TTC CAG GAG ACG CCC ATC GTG GAG GTC ACG
M  V  A  I  T  G  Q  V  P  R  R  M  I  G  T  D  A  F  Q  E  T  P  I  V  E  V  T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACC GAT GCG TTC CAG GAG ACG CCC ATC GTG GAG GTC ACG

```

190

200

210

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAT TAC CTT GTC CTT GAT GTG GAG GAC ATC CCC CGC GTC ATA CAG GAA GCC TTC TTC CTC GCG
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTC GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTC GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTC GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTC GCA
R  S  I  T  K  H  N  Y  L  V  L  D  V  E  D  I  P  R  V  I  Q  E  A  F  F  L  A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTO GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTC GCA

```

Фігура 9, продовження

220

230

240

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCG GGC CGT CCT GGC CCG GTG CTG GTC GAG ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCC GTG CCG GTC TGG GAC ACC
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTG GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCT GTC TGG GAC ACG
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTG GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCT GTC TGG GAC ACG
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTG GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCT GTC TGG GAC ACG
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTG GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCT GTC TGG GAC ACG
S  S  G  R  P  G  P  V  L  V  D  I  P  K  D  I  Q  Q  Q  M  A  V  P  V  W  D  T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTG GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCT GTC TGG GAC ACG

```

250

260

270

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S  M  N  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  A  T  E  L  L  E  Q  V  L  R  L  V
TCG ATG AAT CTA CCA GGG TAC ATC GCA CGC CTG CCC AAG CCA CCC GCG ACA GAA TTG CTT GAG CAG GTC TTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCG ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCG ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCG ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCG ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
P  M  S  L  P  G  Y  I  A  R  L  P  K  P  P  S  T  E  S  L  E  Q  V  L  R  L  V
CCG ATG AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT

```

Фігура 9, продовження

280 290

G E S R R P I L Y V G G G C S A S G D E L R W F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCG ATT CTC TAT GTC GGT GGT GGC TGC TCT GCA TCT GGT GAG GAA TTG CGC TGG TTT GTT GAG CTC
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCA TCT GGT GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTC
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCA TCT GGT GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTC
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCA TCT GGT GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTC
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCA TCT GGT GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTC
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCA TCT GGT GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTC

300 310 320

T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGT ATC CCA GTT ACA ACC ACT CTG ATG GGC CTC GGC AAT TTC CCC AGT GAC GAC CCG TTG TCC CTG CGC ATG CTT GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGT ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTT ATG GGC CTT GGC AAC TTC CC AGT GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTG GGG
T G I X V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGT ATT C A GTT ACA ACT ACT CTT ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGT GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTG GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGT ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTT ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGT GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTG GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGT ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTT ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGT GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTG GGG
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGT ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTT ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGT GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTG GGG

330 340 350

M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACG GTG TAC GCA AAT TAT GCC GTG GAT AAG GOT GAC CTG TTG CTT GCG TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L I A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG NTT GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTT GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V Q V D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTT GCA TTT GGT GTG CNG GTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTT GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
ATG CAT GGN ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTT GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT

360 370

V T G K I E A F A S R A K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACA GGG AAA ATT GAG GCT TTT GCA AGC AGG GCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAA CCA GCA GAG ATT GGA AAG AAC
V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACC GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACC GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
V N G K I E A F A S R S K I E H I D I D P A E I G K N
GTG ANC GGG AAA ATC GAN GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GNG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACC GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
GTG ACC GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC

Фігура 9, продовження

380										390										400									
K	Q	P	H	V	S	I	C	A	D	V	K	L	A	L	Q	G	L	N	A	L	L	Q	Q	S	T	T			
AAG	CAA	CCA	CAT	GTG	TCA	ATT	TGC	GCA	GAT	GTT	AAG	CTT	GCT	TTA	CAG	GGC	TTG	AAT	GCT	CTG	CTA	CAA	CAG	AGC	ACA	ACA			
K	Q	P	H	V	S	I	C	A	D	V	K	L	A	L	Q	G	L	N	A	L	L	N	G	S	K	A			
AAG	CAG	CCA	CAT	GTC	TCC	ATT	TGT	GCA	GAT	GTT	AAG	CTT	GCT	TTA	CAG	GGG	TTG	AAT	GCT	CTA	TTA	AAT	GGG	AGC	AAA	GCA			
K	Q	P	H	V	S	I	C	A	D	V	K	L	A	L	Q	G	L	N	A	L	L	N	G	S	K	A			
AAG	CAG	CCA	CAT	GTC	TCC	ATT	TGT	GCA	GAT	GTT	AAG	CTT	GCT	TTA	CAG	GGG	TTG	AAT	GCT	CTA	TTA	AAT	GGG	AGC	AAA	GCA			
K	Q	P	H	V	S	I	C	A	D	V	K	L	A	L	Q	G	L	N	A	L	L	N	G	S	K	A			
AAG	CAG	CCA	CNT	GTC	TCC	ATT	TGT	GCA	GAT	GTT	AAN	CTT	GCT	TTA	CAG	GGG	TTG	AAT	GCN	CTA	TTA	AAT	GGG	AGC	AAA	GCA			
K	Q	P	H	V	S	I	C	A	D	V	K	L	A	L	Q	G	L	N	A	L	L	N	G	S	K	A			
AAG	CAG	CCA	CAT	GTC	TCC	ATT	TGT	GCA	GAT	GTT	AAG	CTT	GCT	TTA	CAG	GGG	TTG	AAT	GCT	CTA	TTA	AAT	GGG	AGC	AAA	GCA			
K	Q	P	H	V	S	I	C	A	D	V	K	L	A	L	Q	G	L	N	A	L	L	N	G	S	K	A			
AAG	CAG	CCA	CAT	GTC	TCC	ATT	TGT	GCA	GAT	GTT	AAG	CTT	GCT	TTA	CAG	GGG	TTG	AAT	GCT	CTA	TTA	AAT	GGG	AGC	AAA	GCA			
410										420										430									
K	T	S	S	D	F	S	A	W	H	N	E	L	D	Q	Q	K	R	E	F	P	L	G	Y	K	T	F			
AAG	ACA	AGT	TCT	GAT	TTT	AGT	GCA	TGG	CAC	AAT	GAG	TTG	GAC	CAG	CAG	AAG	AGG	GAG	TTT	CCT	CTG	GGG	TAC	AAA	ACT	TTT			
Q	Q	G	L	D	F	G	P	W	H	K	E	L	D	Q	Q	K	R	E	F	P	L	G	F	K	T	F			
CAA	CAG	GGT	CTG	GAT	TTT	GGT	CCA	TGG	CAC	AAG	GAG	TTG	GAT	CAG	CAG	AAG	AGG	GAG	TTT	CCT	CTA	GGA	TTC	AAG	ACT	TTT			
Q	Q	G	L	D	F	G	P	W	H	K	E	L	D	Q	Q	K	R	E	F	P	L	G	F	K	T	F			
CAA	CAG	GGT	CTG	GAT	TTT	GGT	CCA	TGG	CAC	AAG	GAG	TTG	GAT	CAG	CAG	AAG	AGG	GAG	TTT	CCT	CTA	GGA	TTC	AAG	ACT	TTT			
Q	Q	G	L	D	F	G	P	W	H	K	E	L	D	Q	Q	K	R	E	F	P	L	G	F	K	T	F			
CAA	CAG	GGN	CTG	GAT	TTT	GGT	CCA	TGG	CNC	AAG	GAG	TTG	GAT	CAG	CAA	AAG	ANG	GAG	TTT	CCT	CTA	GGA	TTC	AAN	ACT	TTT			
Q	Q	G	L	D	F	G	P	W	H	K	E	L	D	Q	Q	K	R	E	F	P	L	G	F	K	T	F			
CAA	CAG	GGT	CTG	GAT	TTT	GGT	CCA	TGG	CAC	AAG	GAG	TTG	GAT	CAG	CAG	AAG	AGG	GAG	TTT	CCT	CTA	GGA	TTC	AAG	ACT	TTT			
Q	Q	G	L	D	F	G	P	W	H	K	E	L	D	Q	Q	K	R	E	F	P	L	G	F	K	T	F			
CAA	CAG	GGT	CTG	GAT	TTT	GGT	CCA	TGG	CAC	AAG	GAG	TTG	GAT	CAG	CAG	AAG	AGG	GAG	TTT	CCT	CTA	GGA	TTC	AAG	ACT	TTT			
440										450										460									
G	E	E	I	P	P	Q	Y	A	I	Q	V	L	D	E	L	T	K	G	E	A	I	I	A	T	G	V			
GGT	GAA	GAG	ATC	CCA	CCG	CAA	TAT	GCC	ATT	CAG	GTG	CTG	GAT	GAG	CTG	ACG	AAA	GGT	GAG	GCA	ATC	ATC	GCT	ACT	GGT	GTT			
G	E	A	I	P	P	Q	Y	A	I	Q	V	L	D	E	L	T	K	G	E	A	I	I	A	T	G	V			
GCT	GAG	GCC	ATC	CCG	CCG	CAA	TAT	GCT	ATC	CAG	GTA	CTG	GAT	GAG	CTG	ACA	AAA	GGG	GAG	GCG	ATC	ATT	GCC	ACC	GGT	GTT			
G	E	A	I	P	P	Q	Y	A	I	Q	V	L	D	E	L	T	K	G	E	A	I	I	A	T	G	V			
GGT	GAG	GCC	ATC	CCG	CCG	CAA	TAT	GCT	ATC	CAG	GTA	CTG	GAT	GAG	CTG	ACA	AAA	GGG	GAG	GCG	ATC	ATT	GCC	ACC	GGT	GTT			
G	E	A	I	P	P	P	Y	A	I	Q	V	L	D	E	L	T	K	G	E	A	I	I	A	T	G	V			
GGN	GAN	GCC	ATC	CCG	CCG	CCA	TAT	GCT	ATC	CAG	GTA	CTG	GAT	GAG	CTG	ACA	AAA	GGG	GAG	GCG	ATC	ATT	GCC	ACC	GGN	GTT			
G	E	A	I	P	P	Q	Y	A	I	Q	V	L	D	E	L	T	K	G	E	A	I	I	A	T	G	V			
GGT	GAG	GCC	ATC	CCG	CCG	CAA	TAT	GCT	ATC	CAG	GTA	CTG	GAT	GAG	CTG	ACA	AAA	GGG	GAG	GCG	ATC	ATT	GCC	ACC	GGT	GTT			
G	E	A	I	P	P	Q	Y	A	I	Q	V	L	D	E	L	T	K	G	E	A	I	I	A	T	G	V			
GGT	GAG	GCC	ATC	CCG	CCG	CAA	TAT	GCT	ATC	CAG	GTA	CTG	GAT	GAG	CTG	ACN	AAA	GGG	GAG	GCG	ATC	ATT	GCC	ACC	GGT	GTT			
470										480										490									
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	A	G	L	G	A			
GGG	CAG	CAC	CAG	ATG	TGG	GCG	GCA	CAA	TAT	TAC	ACC	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCG	GCT	GGT	CTG	GGC	GCA			
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A			
GGG	CAG	CAT	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCA	TCC	GGT	TTG	GGT	GCA			
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A			
GGG	CAG	CAT	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCA	TCC	GGT	TTG	GGT	GCA			
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A			
GGG	CAG	CAT	CAN	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCN	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCA	TCC	GGT	TTG	GGT	GCA			
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A			
GGG	CAG	CAT	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCA	TCC	GGT	TTG	GGT	GCA			
G	Q	H	Q	M	W	A	A	Q	Y	Y	T	Y	K	R	P	R	Q	W	L	S	S	S	G	L	G	A			
GGG	CAG	CAT	CAG	ATG	TGG	GCG	GCT	CAG	TAT	TAC	ACT	TAC	AAG	CGG	CCA	CGG	CAG	TGG	CTG	TCT	TCA	TCC	GGT	TTG	GGT	GCA			

Фігура 9, продовження

490										500										510										
+																														
M	G	F	G	L	P	A	A	A	G	A	S	V	A	N	P	G	V	T	V	V	D	I	D	G	D	G				
ATG	GGA	TTT	GGG	CTG	CCT	GCT	GCA	GCT	GGT	GCT	TCT	GTG	GCT	AAC	CCA	GGT	GTC	ACA	GTT	GTT	GAT	ATT	GAT	GGG	GAT	GGT				
M	G	F	G	L	P	A	A	A	G	A	A	V	A	N	P	G	V	T	V	V	D	I	D	G	D	G				
ATG	GGA	TTT	GGG	TTG	CCA	GCT	GCA	GCT	GGC	GCT	GCT	GTG	GCC	AAC	CCA	GGT	GTT	ACA	GTT	GTT	GAC	ATT	GAT	GGG	GAT	GGT				
M	G	F	G	L	P	A	A	A	G	A	A	V	A	N	P	G	V	T	V	V	D	I	D	G	D	G				
ATG	GGA	TTT	GGG	TTG	CCA	GCT	GCA	GCT	GGC	GCT	GCT	GTG	GCC	AAC	CCA	GGT	GTT	ACA	GTT	GTT	GAC	ATT	GAT	GGG	GAT	GGT				
M	G	F	G	L	P	A	A	A	G	A	X	V	A	N	P	G	V	T	V	V	D	I	D	G	D	G				
ATG	GGA	TTT	GGG	TTG	CCA	GCT	GCA	GCT	GGC	GGC	CT	GTG	GCC	AAC	CCA	GGT	GTT	ACA	GTT	GTT	GAC	ATT	GAT	GGG	GAT	GGT				
M	G	F	G	L	P	A	A	A	G	A	A	V	A	N	P	G	V	T	V	V	D	I	D	G	D	G				
ATG	GGA	TTT	GGG	TTG	CCA	GCT	GCA	GCT	GGC	GCT	GCT	GTG	GCC	AAC	CCA	GGT	GTT	ACA	GTT	GTT	GAC	ATT	GAT	GGG	GAT	GGT				
M	G	F	G	L	P	A	A	A	G	A	A	V	A	N	P	G	V	T	V	V	D	I	D	G	D	G				
ATG	GGA	TTT	GGG	TTG	CCA	GCT	GCA	GCT	GGC	GCT	GCT	GTG	GCC	AAC	CCA	GGT	GTT	ACA	GTT	GTT	GAC	ATT	GAT	GGG	GAT	GGT				
520										530										540										
+																														
S	F	L	M	N	I	Q	E	L	A	L	I	R	I	E	N	L	P	V	K	V	M	V	L	N	N	Q				
AGC	TTC	CTC	ATG	AAC	ATT	CAG	GAG	CTG	GCA	TTG	ATC	CGC	ATT	GAG	AAC	CTC	CCT	GTG	AAG	GTG	ATG	GTG	TTG	AAC	AAC	CAA				
S	F	L	M	N	I	Q	E	L	A	L	I	R	I	E	N	L	P	V	K	V	M	I	L	N	N	Q				
AGT	TTC	CTC	ATG	AAC	ATT	CAG	GAG	TTG	GCG	TTG	ATC	CGT	ATT	GAG	AAC	CTC	CCA	GTG	AAG	GTG	ATG	ATA	TTG	AAC	AAC	CAG				
S	F	L	M	N	I	Q	E	L	A	L	I	R	I	E	N	L	P	V	K	V	M	I	L	N	N	Q				
AGT	TTC	CTC	ATG	AAC	ATT	CAG	GAG	TTG	GCG	TTG	ATC	CGT	ATT	GAG	AAC	CTC	CCA	GTG	AAG	GTG	ATG	ATA	TTG	AAC	AAC	CAG				
S	F	L	M	N	I	Q	E	L	A	L	I	R	I	E	N	L	P	V	K	V	M	I	L	N	N	Q				
AGT	TTC	CTC	ATG	AAC	ATT	CAG	GAG	TTG	GCG	TTG	ATC	CGT	ATT	GAG	AAC	CTC	CCA	GTG	AAG	GTG	ATG	ATA	TTG	AAC	AAC	CAG				
S	F	L	M	N	I	Q	E	L	A	L	I	R	I	E	N	L	P	V	K	V	M	I	L	N	N	Q				
AGT	TTC	CTC	ATG	AAC	ATT	CAG	GAG	TTG	GCG	TTG	ATC	CGT	ATT	GAG	AAC	CTC	CCA	GTG	AAG	GTG	ATG	ATA	TTG	AAC	AAC	CAG				
S	F	L	M	N	I	Q	E	L	A	L	I	R	I	E	N	L	P	V	K	V	M	I	L	N	N	Q				
AGT	TTC	CTC	ATG	AAC	ATT	CAG	GAG	TTG	GCG	TTG	ATC	CGT	ATT	GAG	AAC	CTC	CCA	GTG	AAG	GTG	ATG	ATA	TTG	AAC	AAC	CAG				
550										560										570										
+																														
H	L	G	M	V	V	Q	W	E	D	R	F	Y	K	A	N	R	A	H	T	Y	L	G	N	P	E	C				
CAT	TTG	GGT	ATG	GTG	GTG	CAA	TGG	GAG	GAT	AGG	TTT	TAC	AAG	GCG	AAT	AGG	GCG	CAT	ACA	TAC	TTG	GGC	AAC	CCG	GAA	TGT				
H	L	G	M	V	V	Q	W	E	D	R	F	Y	K	A	N	R	A	H	T	Y	L	G	N	P	E	N				
CAT	CTG	GGA	ATG	GTG	GTG	CAG	TGG	GAG	GAT	AGG	TTT	TAC	AAO	GCC	AAC	CGG	GCG	CAC	ACA	TAC	CTT	GGC	AAC	CCA	GAA	AAT				
H	L	G	M	V	V	Q	W	E	D	R	F	Y	K	A	N	R	A	H	T	Y	L	G	N	P	E	N				
CAT	CTG	GGA	ATG	GTG	GTG	CAG	TGG	GAG	GAT	AGG	TTT	TAC	AAG	GCC	AAC	CGG	GCG	CAC	ACA	TAC	CTT	GGC	AAC	CCA	GAA	AAT				
H	L	G	M	V	V	Q	W	E	D	R	F	Y	K	A	N	R	A	H	T	Y	L	G	N	P	E	N				
CAT	CTG	GGA	ATG	GTG	GTG	CAG	TGG	GAG	GAT	AGG	TTT	TAC	AAG	GCC	AAC	CGG	GCG	CAC	ACA	TAC	CTT	GGC	AAC	CCA	GAA	AAT				
H	L	G	M	V	V	Q	W	E	D	R	F	Y	K	A	N	R	A	H	T	Y	L	G	N	P	E	N				
CAT	CTG	GGA	ATG	GTG	GTG	CAG	TGG	GAG	GAT	AGG	TTT	TAC	AAG	GCC	AAC	CGG	GCG	CAC	ACA	TAC	CTT	GGC	AAC	CCA	GAA	AAT				
H	L	G	M	V	V	Q	W	E	D	R	F	Y	K	A	N	R	A	H	T	Y	L	G	N	P	E	N				
CAT	CTG	GGA	ATG	GTG	GTG	CAG	TGG	GAG	GAT	AGG	TTT	TAC	AAG	GCC	AAC	CGG	GCG	CAC	ACA	TAC	CTT	GGC	AAC	CCA	GAA	AAT				
580										590										600										
+																														
E	S	E	I	Y	P	D	F	V	T	I	A	K	G	F	N	I	P	A	V	R	V	T	K	K	S	E				
GAG	AGC	GAG	ATA	TAT	CCA	GAT	TTT	GTG	ACT	ATT	GCT	AAG	GGG	TTC	AAT	ATT	CCT	GCA	GTC	CGT	GTA	ACA	AAG	AAG	AGT	GAA				
E	S	E	I	Y	P	D	F	V	T	I	A	K	G	F	N	V	P	A	V	R	V	T	K	K	S	E				
GAG	AGT	GAG	ATA	TAT	CCA	GAT	TTT	GTG	ACG	ATT	GCT	AAA	GGA	TTC	AAC	GTT	CCG	GCA	GTT	CGT	GTG	ACG	AAG	AAG	AGC	GAA				
E	S	E	I	Y	P	D	F	V	T	I	A	K	G	F	N	V	P	A	V	R	V	T	K	K	S	E				
GAG	AGT	GAG	ATA	TAT	CCA	GAT	TTT	GTG	ACG	ATT	GCT	AAA	GGA	TTC	AAC	GTT	CCG	GCA	GTT	CGT	GTG	ACG	AAG	AAG	AGC	GAA				
E	S	E	I	Y	P	D	F	V	T	I	A	K	G	F	N	V	P	A	V	R	V	T	K	K	S	E				
GAG	AGT	GAG	ATA	TAT	CCA	GAT	TTT	GTG	ACG	ATT	GCT	AAA	GGA	TTC	AAC	GTT	CCG	GCA	GTT	CGT	GTG	ACG	AAG	AAG	AGC	GAA				
E	S	E	I	Y	P	D	F	V	T	I	A	K	G	F	N	V	P	A	V	R	V	T	K	K	S	E				
GAG	AGT	GAG	ATA	TAT	CCA	GAT	TTT	GTG	ACG	ATT	GCT	AAA	GGA	TTC	AAC	GTT	CCG	GCA	GTT	CGT	GTG	ACG	AAG	AAG	AGC	GAA				
590										600										610										
+																														
E	S	E	I	Y	P	D	F	V	T	I	A	K	G	F	N	V	P	A	V	R	V	T	K	K	S	E				
GAG	AGT	GAG	ATA	TAT	CCA	GAT	TTT	GTG	ACG	ATT	GCT	AAA	GGA	TTC	AAC	GTT	CCG	GCA	GTT	CGT	GTG	ACG	AAG	AAG	AGC	GAA				

Фігура 9, продовження

600												610												620											
+												+												+											
V	R	A	A	I	K	K	M	L	E	T	P	G	P	Y	L	L	D	I	I	V	P	H	Q	E	H	V									
GTC	CGT	GCC	GCC	ATC	AAG	AAG	ATG	CTC	GAG	ACT	CCA	GGG	CCA	TAC	TTG	TTG	GAT	ATC	ATC	GTC	CCG	CAC	CAG	GAG	CAT	GTG									
V	T	A	A	I	K	K	M	L	E	T	P	G	P	Y	L	L	D	I	I	V	P	H	Q	E	H	V									
GTC	ACT	GCA	GCA	ATC	AAG	AAG	ATG	CTT	GAG	ACC	CCA	GGG	CCA	TAC	TTG	TTG	GAT	ATC	ATT	GTC	CCG	CAT	CAG	GAG	CAC	GTG									
V	T	A	A	I	K	K	M	L	E	T	P	G	P	Y	L	L	D	I	I	V	P	H	Q	E	H	V									
GTC	ACT	GCA	GCA	ATC	AAG	AAG	ATG	CTT	GAG	ACC	CCA	GGG	CCA	TAC	TTG	TTG	GAT	ATC	ATT	GTC	CCG	CAT	CAG	GAG	CAC	GTG									
V	T	A	A	I	K	K	M	L	E	T	P	G	P	Y	L	L	D	I	I	V	P	H	Q	E	H	V									
GTC	ACT	GCA	GCA	ATC	AAG	AAG	ATG	CTT	GAG	ACC	CCA	GGG	CCA	TAC	TTG	TTG	GAT	ATC	ATT	GTC	CCG	CAT	CAG	GAG	CAC	GTG									
V	T	A	A	I	K	K	M	L	E	T	P	G	P	Y	L	L	D	I	I	V	P	H	Q	E	H	V									
GTC	ACT	GCA	GCA	ATC	AAG	AAG	ATG	CTT	GAG	ACC	CCA	GGG	CCA	TAC	TTG	TTG	GAT	ATC	ATT	GTC	CCG	CAT	CAG	GAG	CAC	GTG									
V	T	A	A	I	K	K	M	L	E	T	P	G	P	Y	L	L	D	I	I	V	P	H	Q	E	H	V									
GTC	ACT	GCA	GCA	ATC	AAG	AAG	ATG	CTT	GAG	ACC	CCA	GGG	CCA	TAC	TTG	TTG	GAT	ATC	ATT	GTC	CCG	CAT	CAG	GAG	CAC	GTG									

630														640									
+														+									
L	P	M	I	P	S	G	G	A	F	K	D	M	I	L	D	G	D	G	R	T	V	Y	
CTG	CCT	ATG	ATC	CCA	AGT	GGG	GGC	GCA	TTC	AAG	GAC	ATG	ATC	CTG	GAT	GGT	GAT	GGC	AGG	ACT	GTG	TAT	TAA
L	P	M	I	P	S	G	G	A	F	K	D	M	I	M	E	G	D	G	R	T	S		
CTG	CCT	ATG	ATC	CCA	AGC	GGT	GGT	GCT	TTT	AAG	GAC	ATG	ATC	ATG	GAG	GGT	GAT	GGC	AGG	ACC	TCG	TAC	
L	P	M	I	P	S	G	G	A	F	K	D	M	I	M	E	G	D	G	R	T	S		
CTG	CCT	ATG	ATC	CCA	AGC	GGT	GGT	GCT	TTT	AAG	GAC	ATG	ATC	ATG	GAG	GGT	GAT	GGC	AGG	ACC	TCG	TAC	
L	P	M	I	P	S	G	G	A	F	K	D	M	I	M	E	G	D	G	R	T	S		
CTG	CCT	ATG	ATC	CCA	AGC	GGT	GGT	GCT	TTT	AAG	GAC	ATG	ATC	ATG	GAG	GGT	GAT	GGC	AGG	ACC	TCG	TAC	
L	P	M	I	P	N	G	G	A	F	K	D	M	I	M	E	G	D	G	R	T	S		
CTG	CCT	ATG	ATC	CCA	AAC	GGT	GGT	GCT	TTT	AAG	GAC	ATG	ATC	ATG	GAG	GGT	GAT	GGC	AGG	ACC	TCG	TAC	
L	P	M	I	P	S	G	G	A	F	K	D	M	I	M	E	G	D	G	R	T	S		
CTG	CCT	ATG	ATC	CCA	AGC	GGT	GGT	GCT	TTT	AAG	GAC	ATG	ATC	ATG	GAG	GGT	GAT	GGC	AGG	ACC	TCG	TAC	

Фігура 10

Часткова послідовність ДНК і виведена амінокислотна послідовність TealIM1 15A

SEQ ID NO 2	D	V	F	A	Y	P	G	G	A	S	M	E	I	H	Q	A	L	T	R	S	P	
SEQ ID NO 1	C	GAC	GTC	TTC	GCC	TAC	CCC	GGC	GGC	GCC	TCC	ATG	GAG	ATC	CAC	CAG	GCG	CTG	ACG	CGC	TCG	CCC
V I T N H L F R H E Q G E A F A A S G Y A R A S G R V																						
GTC ATC ACC AAC CAC CTC TTC CGC CAC GAG CAG GGG GAG GCG TTC GCG GCG TCC GGC TAC GCC CGC GCG TCC GGC CGC GTC																						
G V C V A T S G P G A T N L V S A L A D A L L D S I P																						
GGC GTC TGC GTC GCC ACC TCC GGC CCG GGG GCC ACC AAC CTC GTC TCC GCG CTC GCC GAC GCC CTC CTC GAC TCC ATC CCC																						
M V A I T G Q V P R R M I G T D A F Q E T P I V E V T																						
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACG GAC GCG TTC CAG GAG ACG CCC ATA GTG GAG GTC ACG																						
R S I T K H N Y L V L D V E D I P R V I Q E A F F L A																						
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTT GCA																						
S S G R P G P V L V D I P K D I Q Q Q M A V P V W D T																						
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTA GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCC GTC TGG GAC ACT																						
P M S L P G Y I A R L P K P P S T E S L E Q V L R L V																						
CCA ATG AGT TTG CCA GGG TAG ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT																						
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L																						
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCG TCT GGC GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTT																						
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G																						
ACT GGG ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTG ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGC GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTT GGC																						

Фігура 10, продовження

```

M H G T V Y A N Y A V D K A D L L I A F G V R F D D R
ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG NTC GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
V T G K I E A F A S R S K I E H I D I D P A E I G K N
GTG ACT GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GNG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
K Q P H V S I C A D V K L A L Q G L N D L L N G S K A
AAG CAG CCA CAT GTC TCC ATT TGT GCA GAT GTT AAN CTT GCT TTA GAG GGG TTG AAT GAT CTA TTA AAT GGG AGC AAA GCA
Q Q G L D F G P W H K E L D Q Q K R E F P L G F K T F
CAA CAG GGT CTG GAT TTT GGT CCA TGG CAC AAG GAG TTG GAT CAQ CAN AAN AGG GAG TTT CCT CTA GGA TTC AAG ACT TTT
G E A I P P Q Y A I Q V L D E L T K G E A I I A T G V
GGC GAG GCC ATC CCG CCG CAA TAT GCT ATC CAG GTA CTG GAT GAG CTG ACA AAA GGG GAG GCG ATC ATT GCC ACT GGT GTT
G Q H Q M W A A Q Y Y T Y K R P R Q W L S S S G L G A
GGG CAG CAC CAG ATG TGG GCG GCT CAG TAT TAC ACT TAC AAG CGG CCA CGG CAG TGG CTG TCT TCG TCT GGT TTG GGG GCA
M G F G L P A A A G A A V A N P G V T V V D I D G D G
ATG GGA TTT GGG TTA CCA GCT GCA GCT GGC GCT GCT GTG GCC AAC CCA GGT GTT ACA GTT GTT GAC ATT GAT GGT GAT GGT
S F L M N I Q E L A L I R I E N L P V K V M I L N N Q
ACT TTC CTC ATG AAC ATT CAG GAG TTG GCG TTG ATC CGC ATT GAG AAC CTC CCA GTG AAG GTG ATG ATA TTG AAC AAC CAG
H L G M V V Q W E D R F Y K A N R A H T Y L G N P E N
CAT CTG GGA ATG GTG GTG CAG TGG GAG GAT AGG TTT TAC AAG GCC AAT CGG GCG CAC ACA TAC CTT GGC AAC CCA GAA AAT
E S E I Y P D F V T I A K G F N V P A V R V T K K S E
GAG AGT GAG ATA TAT CCA GAT TTT GTG ACG ATT GCT AAA GGA TTC AAC GTT CCA GCA GTT CGA GTG AAG AAG AGC GAA

```

Фігура 10, продовження

```

V T A A I K K M L E T P G P Y L L D I I V P H Q E H V
GTC ACT GCA GCA ATC AAG AAG ATG CTT GAG ACC CCA GGG CCA TAC TTG TTG GAT ATC ATA GTC CCG CAT GAG GAG CAC GTG
L P M I P N G G A F K D M I M E G D G R T S Y
CTG CCT ATG ATC CCA AAC GGT GGT GCT TTC AAG GAC ATG ATC ATG GAG GGT GAT GGC AGG ACC TCG TAC TGA

```

Фігура 11

Часткова послідовність ДНК і виведена амінокислотна послідовність TealIM2 11A

```

SEQ ID NO 4          D V F A Y P G G A S M E I H Q A L T R S P
SEQ ID NO 3          C GAC GTC TTC GCC TAC CCT GGC GGC GCG TCC ATG GAG ATC CAC CAG GCG CTG ACG CGC TCG CCA
V I T N H L F R H E Q G E A F A A S G Y A R A S G R V
GTC ATC ACC AAC CAC CTC TTC CGC CAC GAG CAG GGG GAG GCG TTC GCG GCG TCC GGG TAC GCC CGC GCG TCC GGC CGC GTC
G V C V A T S G P G A T N L V S A L A D A L L D S I P
GGC GTC TGC GTC GCC ACC TCC GGC CCG GGG GCC ACC AAC CTC GTC TCC GCG CTC GCC GAC GCT CTC CTC GAC TCC ATC CCC
M V A I T G Q V P R R M I G T D A F Q E T P I V E V T
ATG GTC GCC ATC ACG GGC CAG GTC CCC CGC CGC ATG ATC GGC ACG GAT GCG TTC CAG GAG ACG CCC ATC GTG GAG GTC ACG
R S I T K H N Y L V L D V E D I P R V I Q E A F F L A
CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTT GAC GTG GAG GAT ATC CCC CGC GTC ATC CAG GAA GCC TTC TTC CTC GCA
S S G R P G P V L V D I P K D I Q Q Q M A V P V W D T
TCC TCT GGC CGC CCG GGG CCG GTG CTG GTT GAT ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCT GTG CCT GTC TGG GAC ACG
P M S L P G Y I A R L P K P P S T E S L E Q V L R L V
CCG ATC AGT TTG CCA GGG TAC ATC GCC CGC CTG CCC AAG CCA CCA TCT ACT GAA TCG CTT GAG CAG GTC CTG CGT CTG GTT
G E S R R P I L Y V G G G C A A S G E E L R R F V E L
GGC GAG TCA CGG CGC CCA ATT CTG TAT GTT GGT GGT GGC TGC GCT GCA TCT GGT GAG GAG TTG CGC CGC TTT GTT GAG CTC
T G I P V T T T L M G L G N F P S D D P L S L R M L G
ACT GGG ATT CCA GTT ACA ACT ACT CTT ATG GGC CTT GGC AAC TTC CCC AGT GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTG GGG

```

Фігура 11, продовження

M H G T V Y A N Y A V D K A D L L L A F G V R F D D R
 ATG CAT GGC ACT GTG TAT GCA AAT TAT GCA GTA GAT AAG GCT GAC CTG TTG CTT GCA TTT GGT GTG CGG TTT GAT GAT CGT
 V T G K I E A F A S R S K I V H I D I D P A E I G K N
 GTG ACC GGG AAA ATC GAG GCT TTT GCA AGC AGG TCC AAG ATT GTG CAC ATT GAC ATT GAC CCA GCT GAG ATT GGC AAG AAC
 K Q P H V S I C A D V K L A L Q G L N A L L N G S K A
 AAG CAG CCA CAT GTC TCC ATT TGT GCA GAT GTT AAG CTT GCT TTA CAG GGG TTG AAT GCT CTA TTA AAT GGG AGC AAA GCA
 Q Q G L D F G P W H K E L D Q Q K R E F P L G F K T F
 CAA CAG GGT CTG GAT TTT GGT CCA TGG CAC AAG GAG TTG GAT CAG CAG AAG AGG GAG TTT CCT CTA GGA TTC AAG ACT TTT
 G E A I P P Q Y A I Q V L D E L T K G E A I I A T G V
 GGT GAG GCC ATC CCG CCG CAA TAT GCT ATC CAG GTA CTG GAT GAG CTG ACA AAA GGG GAG GCG ATC ATT GCC ACC GGT GTT
 G Q H Q M W A A Q Y Y T Y K R P R Q W L S S S G L G A
 GGG CAG CAT CAG ATG TGG GCG GCT CAG TAT TAC ACT TAC AAG CGG CCA CGG CAG TGG CTG TCT TCA TCC GGT TTG GGT GCA
 M G F G L P A A A G A A V A N P G V T V V D I D G D G
 ATG GGA TTT GGG TTG CCA GCT GCA GCT GGC GCT GCT GTG GCC AAC CCA GGT GTT ACA GTT GTT GAC ATT GAT GGG GAT GGT
 S F L M N I Q E L A L I R I E N L P V K V M I L N N Q
 AGT TTC CTC ATG AAC ATT CAG GAG TTG GCG TTG ATC CGT ATT GAG AAC CTC CCA GTG AAG GTG ATG ATA TTG AAC AAC CAG
 H L G M V V Q W E D R F Y K A N R A H T Y L G N F E N
 CAT CTG GGA ATG GTG GTG CAG TGG GAG GAT AGG TTT TAC AAG GCC AAC CGG GCG CAC ACA TAC CTT GGC AAC CCA GAA AAT
 E S E I Y P D F V T I A K G F N V P A V R V T K K S E
 GAG AGT GAG ATA TAT CCA GAT TTT GTG ACG ATT GCT AAA GGA TTC AAC GTT CCG GCA GTT CGT GTG ACG AAG AAG AGC GAA

Фігура 11, продовження

V T A A I K K M L E T P G P Y L L D I I V P H Q E H V
 GTC ACT GCA GCA ATC AAG AAG ATG CTT GAG ACC CCA GGG CCA TAC IIG TTG GAT ATC ATT GTC CCG CAT CAG GAG CAC GTG
 L P M I P N G G A F K D M I M E G D G R T S
 CTG CCT ATG ATC CCA AAC GGT GGT GCT TTT AAG GAC ATG ATC ATG GAG GGT GAT GGC AGG ACC TCG TAC

Фігура 12

Als1_ORF_Teal (SEQ ID NO:5)	(1) GTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCGGGGGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCT
Als2_ORF_Teal (SEQ ID NO:6)	(1) GTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCGGGGGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCT
Als3_ORF_Teal (SEQ ID NO:7)	(1) GTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCGGGGGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCT
Узагальн. тип.	(1) GTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCGGGGGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCT
	51 100
Als1_ORF_Teal	(51) CGCCGACGCCCTCCTCGACTCCATCCCCATGGTCGCCATCACGGGCCAGG
Als2_ORF_Teal	(51) CGCCGACGCTCTCCTCGACTCCATCCCCATGGTCGCCATCACGGGCCAGG
Als3_ORF_Teal	(51) CGCTGACGCCCTCCTCGACTCCATCCCCATGGTCGCCATCACGGGCCAGG
Узагальн. тип.	(51) CGCCGACGCCCTCCTCGACTCCATCCCCATGGTCGCCATCACGGGCCAGG
	101 150
Als1_ORF_Teal	(101) TCCCCCGCCGCATGATCGGCACGGACGCGTTCCAGGAGACGCCCATAGTG
Als2_ORF_Teal	(101) TCCCCCGCCGCATGATCGGCACGGATGCGTTCCAGGAGACGCCCATCGTG
Als3_ORF_Teal	(101) TCCCCCGCCGCATGATCGGCACGGACGCGTTCCAGGAGACGCCCATAGTG
Узагальн. тип.	(101) TCCCCCGCCGCATGATCGGCACGGACGCGTTCCAGGAGACGCCCATAGTG
	151 200
Als1_ORF_Teal	(151) GAGGTCACGCGCTCCATCACCAGCACAACTACCTGGTCCTTGACGTGGA
Als2_ORF_Teal	(151) GAGGTCACGCGCTCCATCACCAGCACAACTACCTGGTCCTTGACGTGGA
Als3_ORF_Teal	(151) GAGGTCACGCGCTCCATCACCAGCACAACTACCTGGTCCTTGACGTGGA
Узагальн. тип.	(151) GAGGTCACGCGCTCCATCACCAGCACAACTACCTGGTCCTTGACGTGGA
	201 250
Als1_ORF_Teal	(201) GGATATCCCCCGCGTCATCCAGGAAGCCTTCTTCCTTGCATCCTCTGGCC
Als2_ORF_Teal	(201) GGATATCCCCCGCGTCATCCAGGAAGCCTTCTTCCTTGCATCCTCTGGCC
Als3_ORF_Teal	(201) GGATATCCCCCGCGTCATCCAGGAAGCCTTCTTCCTTGCATCCTCTGGCC
Узагальн. тип.	(201) GGATATCCCCCGCGTCATCCAGGAAGCCTTCTTCCTTGCATCCTCTGGCC
	251 300
Als1_ORF_Teal	(251) GCCCCGGGGCCGGTGCTAGTTGATATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATG
Als2_ORF_Teal	(251) GCCCCGGGGCCGGTGCTAGTTGATATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATG
Als3_ORF_Teal	(251) GCCCCGGGGCCGGTGCTAGTTGATATCCCCAAGGATATCCAGCAGCAGATG
Узагальн. тип.	(251) GCCCCGGGGCCGGTGCTAGTTGATATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATG

Фігура 12, продовження

	301	350
Als1_ORF_Teal	(301) GCTGTGCCCGTCTGGGACACTCCAATGAGTTTGCCAGGGTACATCGCCCG	
Als2_ORF_Teal	(301) GCTGTGCCTGTCTGGGACACGCCGATGAGTTTGCCAGGGTACATCGCCCG	
Als3_ORF_Teal	(301) GCCGTGCCCTATCTGGGACACGCCGATGAGTTTGCCAGGGTACATCGCCCG	
Узагальн. тип	(301) GCTGTGCCTGTCTGGGACACGCCGATGAGTTTGCCAGGGTACATCGCCCG	
	351	400
Als1_ORF_Teal	(351) CCTGCCCCAAGCCACCATCTACTGAATCGCTTGAGCAGGTCCTGCGTCTGG	
Als2_ORF_Teal	(351) CCTGCCCCAAGCCACCATCTACTGAATCGCTTGAGCAGGTCCTGCGTCTGG	
Als3_ORF_Teal	(351) CCTGCCCCAAGCCACCATCTACTGAATCGCTTGAGCAGGTCCTGCGTCTGG	
Узагальн. тип	(351) CCTGCCCCAAGCCACCATCTACTGAATCGCTTGAGCAGGTCCTGCGTCTGG	
	401	450
Als1_ORF_Teal	(401) TTGGCGAGTCACGGCGCCCAATCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGCG	
Als2_ORF_Teal	(401) TTGGCGAGTCACGGCGCCCAATCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGCA	
Als3_ORF_Teal	(401) TTGGCGAGTCACGGCGCCCAATCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGCA	
Узагальн. тип	(401) TTGGCGAGTCACGGCGCCCAATCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGCA	
	451	500
Als1_ORF_Teal	(451) TCTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTTGAGCTTACTGGGATCCAGTTAC	
Als2_ORF_Teal	(451) TCTGGTGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTTGAGCTTACTGGGATCCAGTTAC	
Als3_ORF_Teal	(451) TCCGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTTGAGCTTACTGGGATCCAGTTAC	
Узагальн. тип	(451) TCTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTTGAGCTTACTGGGATCCAGTTAC	
	501	550
Als1_ORF_Teal	(501) AACTACTCTGATGGGCCTTGGCAACTTCCCCAGCGACGACCCACTGTCTC	
Als2_ORF_Teal	(501) AACTACTCTTATGGGCCTTGGCAACTTCCCCAGTGACGACCCACTGTCTC	
Als3_ORF_Teal	(501) AACTACTCTGATGGGCCTTGGCAACTTCCCCAGCGACGACCCACTGTCTC	
Узагальн. тип	(501) AACTACTCTGATGGGCCTTGGCAACTTCCCCAGCGACGACCCACTGTCTC	
	551	600
Als1_ORF_Teal	(551) TGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACTGTGTATGCAAATTATGCAGTAGAT	
Als2_ORF_Teal	(551) TGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACTGTGTATGCAAATTATGCAGTAGAT	
Als3_ORF_Teal	(551) TGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACTGTGTATGCAAATTATGCAGTCGAT	
Узагальн. тип	(551) TGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACTGTGTATGCAAATTATGCAGTAGAT	

Фігура 12, продовження

	601	650
Als1_ORF_Teal	(601) AAGGCTGACCTGTTGCTCGCATTGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGAC	
Als2_ORF_Teal	(601) AAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGAC	
Als3_ORF_Teal	(601) AAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGAC	
Узагальн. тип	(601) AAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGAC	
	651	700
Als1_ORF_Teal	(651) TGGGAAAATCGAGGCTTTTGCAAGCAGGTCCAAGATTGTGCACATTGACA	
Als2_ORF_Teal	(651) CGGGAAAATCGAGGCTTTTGCAAGCAGGTCCAAGATTGTGCACATTGACA	
Als3_ORF_Teal	(651) TGGGAAAATCGAGGCTTTTGCAAGCAGGTCCAAGATTGTGCACATTGACA	
Узагальн. тип	(651) TGGGAAAATCGAGGCTTTTGCAAGCAGGTCCAAGATTGTGCACATTGACA	
	701	750
Als1_ORF_Teal	(701) TTGACCCAGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTCTCCATTTGT	
Als2_ORF_Teal	(701) TTGACCCAGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTCTCCATTTGT	
Als3_ORF_Teal	(701) TTGACCCAGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTCTCCATTTGT	
Узагальн. тип	(701) TTGACCCAGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTCTCCATTTGT	
	751	800
Als1_ORF_Teal	(751) GCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGGTTGAATGATCTATTAAATGGGAG	
Als2_ORF_Teal	(751) GCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGGTTGAATGCTCTATTAAATGGGAG	
Als3_ORF_Teal	(751) GCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGGTTGAATGCTCTATTAAATGGGAG	
Узагальн. тип	(751) GCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGGTTGAATGCTCTATTAAATGGGAG	
	801	850
Als1_ORF_Teal	(801) CAAAGCACACAGGGTCTGGATTTGGTCCATGGCACAAAGAGTTGGATC	
Als2_ORF_Teal	(801) CAAAGCACACAGGGTCTGGATTTGGTCCATGGCACAAAGAGTTGGATC	
Als3_ORF_Teal	(801) CAAAGCACACAGGGTCTGGATTTGGTCCATGGCACAAAGAGTTGGATC	
Узагальн. тип	(801) CAAAGCACACAGGGTCTGGATTTGGTCCATGGCACAAAGAGTTGGATC	
	851	900
Als1_ORF_Teal	(851) AGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTAGGATTCAGACTTTTGGCGAGGCCATC	
Als2_ORF_Teal	(851) AGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTAGGATTCAGACTTTTGGTGAGGCCATC	
Als3_ORF_Teal	(851) AGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTAGGATTCAGACTTTTGGCGAGGCCATC	
Узагальн. тип	(851) AGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTAGGATTCAGACTTTTGGCGAGGCCATC	

Фігура 12, продовження

	901	950
Als1_ORF_Teal	(901) CCGCCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGC	
Als2_ORF_Teal	(901) CCGCCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGC	
Als3_ORF_Teal	(901) CCGCCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGC	
Узагальн. тип.	(901) CCGCCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGC	
	951	1000
Als1_ORF_Teal	(951) GATCATTGCCACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGTGGCGGCTCAGTATT	
Als2_ORF_Teal	(951) GATCATTGCCACCGGTGTGGGCAGCATCAGATGTGGCGGCTCAGTATT	
Als3_ORF_Teal	(951) GATCATTGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGTGGCGGCTCAGTATT	
Узагальн. тип.	(951) GATCATTGCCACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGTGGCGGCTCAGTATT	
	1001	1050
Als1_ORF_Teal	(1001) ACACCTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCA	
Als2_ORF_Teal	(1001) ACACCTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCA	
Als3_ORF_Teal	(1001) ACACCTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCA	
Узагальн. тип.	(1001) ACACCTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCA	
	1051	1100
Als1_ORF_Teal	(1051) ATGGGATTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGG	
Als2_ORF_Teal	(1051) ATGGGATTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGG	
Als3_ORF_Teal	(1051) ATGGGATTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGG	
Узагальн. тип.	(1051) ATGGGATTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGG	
	1101	1150
Als1_ORF_Teal	(1101) TGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTC	
Als2_ORF_Teal	(1101) TGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTC	
Als3_ORF_Teal	(1101) TGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTC	
Узагальн. тип.	(1101) TGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTC	
	1151	1200
Als1_ORF_Teal	(1151) AGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAGAACCTCCCAAGTGAAGGTGATGATA	
Als2_ORF_Teal	(1151) AGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCTCCCAAGTGAAGGTGATGATA	
Als3_ORF_Teal	(1151) AGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGATA	
Узагальн. тип.	(1151) AGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCTCCCAAGTGAAGGTGATGATA	

Фігура 9, продовження

	1201	1250
Als1_ORF_Teal	(1201) TTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAAGTGGGAGGATAGGTTTTTA	
Als2_ORF_Teal	(1201) TTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAAGTGGGAGGATAGGTTTTTA	
Als3_ORF_Teal	(1201) TTGAACAACCAGCACTGGGAATGGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTTA	
Узагальн. тип.	(1201) TTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAAGTGGGAGGATAGGTTTTTA	
	1251	1300
Als1_ORF_Teal	(1251) CAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTG	
Als2_ORF_Teal	(1251) CAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTG	
Als3_ORF_Teal	(1251) CAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTG	
Узагальн. тип.	(1251) CAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTG	
	1301	1350
Als1_ORF_Teal	(1301) AGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCAGCA	
Als2_ORF_Teal	(1301) AGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCGGCA	
Als3_ORF_Teal	(1301) AGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCGGCA	
Узагальн. тип.	(1301) AGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCGGCA	
	1351	1400
Als1_ORF_Teal	(1351) GTTCGATGTACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCT	
Als2_ORF_Teal	(1351) GTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCT	
Als3_ORF_Teal	(1351) GTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCT	
Узагальн. тип.	(1351) GTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCT	
	1401	1450
Als1_ORF_Teal	(1401) TGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGC	
Als2_ORF_Teal	(1401) TGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATGTCCCGCATCAGGAGC	
Als3_ORF_Teal	(1401) TGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGC	
Узагальн. тип.	(1401) TGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATGTCCCGCATCAGGAGC	
	1451	1500
Als1_ORF_Teal	(1451) ACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGACATGATCATG	
Als2_ORF_Teal	(1451) ACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGACATGATCATG	
Als3_ORF_Teal	(1451) ACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGACATGATCATG	
Узагальн. тип.	(1451) ACGTGCTGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGACATGATCATG	

Фігура 12, продовження

	1501	1524
Als1_ORF_Teal	(1501)	GAGGGTGATGGCAGGACCTCGTAC
Als2_ORF_Teal	(1501)	GAGGGTGATGGCAGGACCTCGTAC
Als3_ORF_Teal	(1501)	GAGGGTGATGGCAGGACCTCGTAC
Узагальн. тип	(1501)	GAGGGTGATGGCAGGACCTCGTAC

Фігура 13

