

Фітофтороз, що викликається патогеном *Phytophthora infestans*, який відноситься до класу ооміцетів, є поширеною у всьому світі найбільш деструктивною хворобою для культивування картоплі. Ця хвороба є також загрозою культурі томата. Настійність отримання стійких сортів (культivarів) інтенсифікувалася у міру швидкого виникнення вірулентних, спеціалізованих по відношенню до певних культур і стійких до пестицидів штамів цього патогену.

Способом попередження неврожаїв або зменшених урожаїв є застосування фунгіцидів, які запобігають або виликають інфекцію *P. infestans*. Однак, вважається, що застосування цих захищаючих посів агентів є навантаженням для навколишнього середовища. Так, в декількох західних країнах законодавство стає більш обмежувальним і частково забороняє застосування специфічних фунгіцидів, роблячи більш важкою хімічну боротьбу з даною хворобою. Альтернативним підходом є застосування сортів, які несуть часткову або повну стійкість до фітофторозу. Два типи стійкості до фітофторозу були описані і використані в селекції картоплі. Один тип додається декількома основними домінуючими генами, які роблять хазяїна несумісним зі специфічними расами цього патогену (раса-специфічна стійкість). Одинадцять таких R-генів (R1-R11) були ідентифіковані, і вважається, що вони походять з дикого виду картоплі *Solanum demissum*, який є природним в Мексиці, де виявлена найбільша генетична мінливість цього патогену. Деякі з цих R-генів були картовані на генетичній карті картоплі (огляд Gebhardt and Valkonen, 2001 *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 79-102). R1 і R2 локалізовані на хромосомах 5 і 4, відповідно. R3, R6 і R7 локалізовані на хромосомі 11. Невідомі R-гени, що додають раса-специфічної стійкості до фітофторозу, були описані також в *S. tuberosum ssp. andigena* і *S. berthaultii* (Ewing et al., 2000 *Mol. Breeding* 6: 25-36). Внаслідок високого рівня стійкості і легкості перенесення багато які сорти містять стійкість, що походить з *S. demissum*. На жаль, раса-специфічна стійкість, яка походить з *S. demissum* хоч і є майже повною, не є тривалою. Як тільки наново виведені сорти вирощують у великому масштабі в комерційних полях, виникають нові вірулентності в *P. infestans*, які роблять цей патоген здатним долати придбану інтрогресію стійкість. Другий тип стійкості, який називається польовою стійкістю і часто зустрічається в природі, вважається не специфічним відносно раси і більш тривалим. Польова стійкість до фітофторозу може бути виявлена в деяких видах *Solanum* в Мексиці і Середній і Південній Америці (Rossi et al., 1986 *PNAS* 95: 9750-9754).

Диплоїдний *S. bulbocastanum* з Мексики і Гватемали є одним з маючих бульби видів, який відомий через його високі рівні польової стійкості до фітофторозу (Niederhauser and Mills, 1953 *Phytopathology* 43: 456-457). Незважаючи на відмінності в балансових числах в ендоспермі інтрогресія ознаки стійкості *S. bulbocastanum* була успішною. Маніпуляції з плоідністю і ряд трудомістких bridge-схрещувань привели до отриманої з *S. bulbocastanum*, *P. infestans*-стійкій зародкової плазми (Hermesen and Ramanna, 1969 *Euphytica* 18: 27-35; 1973 *Euphytica* 22: 457-466; Ramanna and Hermesen, 1971 *Euphytica* 20: 470-481; Hermesen and De Boer, 1971 *Euphytica* 20: 171-180). Однак, через майже 40 років після отримання перших гібридів і інтенсивної і безперервної селекційної роботи селекціонерів, що займаються селекцією картоплі в Нідерландах з цією зародковою плазмою, стійкі до фітофторозу сорти все ще не були виведені на ринок. Успішне отримання соматичних гібридів *S. bulbocastanum* і *S. tuberosum* також повідомлялося (Thieme et al., 1997 *Euphytica* 97 (2): 189-200; Helgeson et al., 1988 *Theor. Appl. Genet.* 96: 738-742). Було виявлено, що деякі з цих гібридів і отримана зворотним схрещуванням зародкова плазма є високостійкими до фітофторозу, навіть при екстремальному навантаженні цієї хвороби. Незважаючи на повідомлення про супресію рекомбінації стійкості в отриманому зворотним схрещуванням матеріалі знаходиться, мабуть, на хромосомі 8 в інтервалі приблизно 6cM між маркерами RFLP CP53 і CT64 (Naess et al., 2000 *Theor. Appl. Genet.* 101: 697-704). Маркер CAPS, отриманий з RFLP-зонда CT88 томатів, співрозщеплюється з стійкістю. Супресія рекомбінації між хромосомами *S. bulbocastanum* і *S. tuberosum* утворює потенційну перешкоду для успішного відновлення зародкової плазми картоплі, що повторно культивується до рівня, який міг би задовольняти стандартам для нових селекціонованих сортів картоплі. Виділення генів, які кодують стійкість, виявлену в *S. bulbocastanum*, і подальша трансформація існуючих сортів цими генами були б набагато більш прямим і більш швидким підходом в порівнянні з селекцією, що використовує інтрогресію.

Клонування і молекулярна характеристика численних генів R рослин, що додають стійкості до хвороб, які викликаються бактеріями, грибами, вірусами, нематодами і комахами, ідентифікували декілька структурних ознак, характерних для генів R рослин (огляд Dangl and Jones, 2001 *Nature* 411, 826-833). Більшість з них є членами тісно пов'язаних мультигенних сімейств, і всі гени R, охарактеризовані досі, за винятком Pto, кодують багаті лейцином повтори (LRR), структури, які, як було показано, беруть участь в міжбілкових взаємодіях. LRR-утримуючі гени R можуть бути поділені на два класи на основі присутності нуклеотидзв'язувального сайту (NBS), що можливо складається з трьох частин. Гени R класу NBS-LRR містять мотиви, які є спільними з регуляторними білками апоптозу тварин (van der Biezen et al., 1998 *Curr. Biol.* 8, 226-227; Aravind et al., 1999 *Trends Biochem. Sci.* 24, 47-53) і можуть бути поділені на дві підгрупи на основі N-кінцевого домену, який або виявляє схожість послідовності з білком Toll *Drosophila* і доменом рецептора інтерлейкіну-1 ссавця (TIR-NBS-LRR), або містить потенційну лейциновий зіпер або домен скрученої спіралі (CC-NBS-LRR; Pan et al., 2000 *Genetics*, 155: 309-22). Гени LRR-R без NBS кодують трансмембранні білки, позаклітинний N-кінцевий район яких складається з LRR (Jones et al., 1994 *Adv. Bot. Res.* 24, 89-167). Ці гени можуть бути поділені на дві підгрупи на основі присутності цитозольного домену серин/треонінкінази (Song et al., 1995 *Science*, 270, 1804-1806). У цей час були клоновані чотири гени R з картоплі. Всі чотири, в тому числі отриманий з *S. demissum* генів R1, що додає раса-специфічної стійкості до фітофторозу, належать до класу CC-NBS-LRR генів R рослин (Bendahmane et al., 1999 *Plant Cell* 11, 781-791; Bendahmane et al., 2000 *Plant J.* 21, 73-81; van der Vossen et al., 2000 *Plant Journal* 23, 567-576; Ballvora et al., 2002 *Plant Journal* 30, 361-371).

Даний винахід забезпечує виділену або рекомбінантну нуклеїнову кислоту, яка містить нуклеїнову кислоту, що кодує амінокислотну послідовність Фіг.8, або її функціональний фрагмент або гомолог. Білок з вказаною амінокислотою був виявлений як член сімейства білків, що кодується кластером генів, які ідентифікуються аналізом філогенетичного дерева, яке досі складається з білків, що кодуються Rpi-blb, RGC1-blb, RGC3-blb і RGC4-blb (які далі називаються кластером генів Rpi-blb) Фіг.9.

Аналіз філогенетичного дерева проводять таким чином. Спочатку виконують зіставлення множинних послідовностей послідовностей нуклеїнових кислот і/або переважно розшифрованих амінокислотних послідовностей генів, які повинні бути аналізовані, з використанням програми CLUSTALW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>), яка рутинно використовується в даній галузі. ClustalW дає .dnd file, який може бути прочитаний з використанням програми TREEVIEW <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>). Філогенетичне дерево, зображене на Фіг.9А, є філограмою.

Філогенетичні дослідження розшифрованих амінокислотних послідовностей Rpi-blb, RGC1-blb, RGC3-blb і RGC4-blb і послідовностей більшості схожих генів з даної ділянки (визначених з використанням BLASTX), отриманих з відмінних видів, з використанням способу Neighbour-Joining Saitou and Nei (1987 Molecular Biology and Evolution 4, 406-425), показує, що відповідні гени або їх функціональні фрагменти кластера генів Rpi-blb можуть бути вміщені в окрему гілку (Фіг.9А).

Порівняння послідовностей між чотирма членами кластера генів Rpi-blb, ідентифікованими на ВАС-клони 8005-8 SPB-4, показує, що гомологія послідовностей в кластері генів Rpi-blb варіюється між 70% і 81% на рівні послідовностей амінокислот. Розшифрована амінокислотна послідовність Rpi-blb має найвищу спільну гомологію з RGC3-blb (81% ідентичність амінокислотної послідовності; таблиця 4). При порівнянні різних доменів видно, що ефекторні домени, присутні в N-кінцевих половинах цих білків (домени скручених спіралей і NBS-ARC), мають більш високу міру гомології (91% ідентичність послідовності), ніж С-кінцеві половини цих білків, які, як вважається, містять домени пізнання (LRR; 71% ідентичність послідовності). Порівняння всіх чотирьох амінокислотних послідовностей виявило в цілому 104 Rpi-blb-специфічних амінокислотних залишків (Фіг.10). Більшість з них локалізовані в LRR-районі (80/104). У цьому останньому районі ці специфічні залишки сконцентровані в LRR-субдомени xxLxLxxxx. Відносна частота цих специфічних амінокислотних залишків в цьому LRR-субдомени є більш ніж в 2 рази, більш високою (28,3%), ніж частота, що спостерігається в іншій частині LRR-домени (12,3%). Вважається, що залишки, розташовані біля цих двох консервативних залишків лейцину в консенсусі xxLxLxxxx, експоновані (оголені) розчинником і, отже, беруть участь, мабуть, в створенні/підтримці специфічності пізнання цього білка стійкості.

Послідовності додаткових членів кластера генів Rpi-blb можуть бути отримані скринінгом бібліотек геномної ДНК або інсертів, наприклад, ВАС-бібліотек, праймерами на основі сигнатурних послідовностей гена Rpi-blb. Скринінг різних ВАС-бібліотек Solarium наборами праймерів А і/або В (таблиця 2 і Фіг.7) ідентифікував численні гомологи Rpi-blb, отримані з різних видів Solarium. Зіставлення цих додаткових послідовностей з послідовностями, поданими на Фіг.10, допоможе ідентифікувати додаткові члени кластера генів Rpi-blb і специфічні амінокислотні залишки в їх білках, відповідальні за специфічність стійкості до *P. infestans*. Крім того, випробування додаткових послідовностей в описаних вище аналізах філогенетичного дерева, наприклад, з використанням способу Neighbour-Joining Saitou and Nei (1987 Molecular Biology and Evolution 4, 406-425), забезпечує додаткову ідентифікацію генів, що належать до кластера генів Rpi-blb.

Даний винахід забезпечує розвиток інтраспецифічного картування популяції *S. bulbocastanum*, яка розщеплюється відносно раса-неспецифічної стійкості до фітофторозу. Ця стійкість картована на хромосомі 8, в районі, локалізованому на відстані 0,3сМ від СТ88. Завдяки раса-неспецифічному характеру цієї стійкості, завжди вважалося, що стійкість до фітофторозу *S. bulbocastanum* є незалежною від гена R. Однак, в даному винаході автори демонструють вперше, що раса-неспецифічна стійкість *S. bulbocastanum* надається фактично геном, що має схожість з геном R NBS-LRR-типу.

Далі, даний винахід забезпечує молекулярний аналіз цього геномного району і виділення з використанням клонування на основі карти ДНК-фрагменту стійкого батька, який несе ген R, позначений Rpi-blb. Цей ДНК-фрагмент був субклонований з клону бактерійної штучної хромосоми (ВАС) довжиною приблизно 80т.п.н., яка містила чотири повних R-ген-подібних послідовностей в кластерподібному розміщенні. Трансформація чутливого сорту картоплі *Agrobacterium tumefaciens* виявила, що одна з цих чотирьох R-генподібних послідовностей відповідає Rpi-blb, яка забезпечує раса-неспецифічну стійкість до фітофторозу. Характеристика цього гена Rpi-blb показала, що він є членом класу NBS-LRR R-генів рослин. Найближчими функціонально охарактеризованими послідовностями попереднього рівня є члени сімейства генів стійкості 12 в томатах. Ці послідовності мають спільну ідентичність амінокислотної послідовності приблизно 32% з послідовністю Rpi-blb.

Таким чином, в першому варіанті здійснення даний винахід забезпечує виділену або рекомбінантну нуклеїнову кислоту, причому вказана нуклеїнова кислота кодує генний продукт, що має послідовність Rpi-blb, або її функціональний фрагмент, який здатний забезпечувати член сімейства Solanaceae раса-неспецифічною стійкістю проти патогену з класу ооміцетів.

Забезпечене даним винаходом виділення гена, який кодує бажану ознаку стійкості проти фітофторозу, і подальша трансформація існуючих сортів картоплі і томата цим геном забезпечує тепер набагато більш прямий і більш швидкий підхід в порівнянні з селекцією, яка використовує інтрогресію. Забезпечені тут результати надають можливості подальшого дослідження молекулярної основи взаємодії рослина-патоген, екологічної ролі R-генів у дикому виді Мексиканської картоплі і є застосовними для розвитку стійких сортів картоплі і томата з використанням генетичної модифікації.

На відміну від R-генів, клонованих і описаних до цього часу, ген, описаний тут авторами даного винаходу, є першим виділеним R-геном з виду Solarium, який забезпечує раса-неспецифічну стійкість проти патогену з класу ооміцетів. Примітно, що даний винахід забезпечує тут нуклеїнову кислоту, яка забезпечує бажану стійкість видам Solarium, серед яких знаходиться *S. tuberosum*. Зокрема, цей ген є першим геном, який був виділений з філогенетично відмінного родинного культивованого виду картоплі *S. bulbocastanum*, для якого було показано з використанням аналізів на комплементарію, що він є функціональним в *S. tuberosum*. Ці дані передбачають, що ген Rpi-blb може бути легко використаний в отриманні картоплі без необхідності селекції з використанням інтрогресії, що забирає багато часу і є трудомісткою.

Для термінів, що використовуються в описі і прикладах, даються наступні визначення.

Нуклеїнова кислота: двохланцюжкова або одноланцюжкова молекула ДНК або РНК.

Олігонуклеотид: коротка одноланцюжкова молекула нуклеїнової кислоти.

Праймер: термін праймер відноситься до олігонуклеотиду, який може праймувати (служити затравкою) синтез нуклеїнової кислоти.

Гомологія: гомологія є терміном, що використовується відносно схожості або ідентичності біологічної інформації послідовності. Гомологія може бути виявлена на рівні нуклеотидної послідовності і/або на рівні амінокислотної послідовності, що кодується. Для розрахунку процентної ідентичності може бути використаний алгоритм BLAST (Altschul et al., 1997 Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402), що використовує параметри за умовчанням, або, альтернативно, алгоритм GAP (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48: 443-453), що використовує параметри за умовчанням, які включені в пакет програм Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, USA. BLAST-пошуки передбачають, що білки можуть моделюватися у вигляді випадкових послідовностей. Однак, багато які реальні білки містять райони невідповідних послідовностей, які можуть бути гомополімерними ділянками, короткими періодичними повторами або районами, збагаченими однією або декількома амінокислотами. Такі райони низької складності можуть бути зіставлені між неродичними білками навіть в тому випадку, коли інші райони даного білка є повністю несхожими. Ряд програм-фільтрів низької складності можуть бути використані для зменшення таких зіставлень низької складності. Наприклад, фільтри низької складності SEG (Wooten and Federhen, 1993 Comput. Chem. 17: 149-163) і XNU (Claverie and States, 1993 Comput. Chem. 17: 191-201) можуть використовуватися окремо або в комбінації.

У застосуванні тут, терміни "ідентичність послідовності" або "ідентичність" в контексті двох білкових послідовностей (або нуклеотидних послідовностей) включають в себе посилення на залишки в двох послідовностях, які є однаковими при зіставленні на максимальну відповідність протягом вказаного вікна порівняння. При використанні терміну процент ідентичності послідовності відносно білків вважається, що положення залишків, які є неідентичними, часто розрізняються консервативними амінокислотними замінами, де амінокислоти замінені іншими амінокислотними залишками зі схожими хімічними властивостями (наприклад, зарядом або гідрофобністю) і, отже, не змінюють функціональні властивості даної молекули. Коли послідовності відрізняються по консервативних замінах, процентна ідентичність послідовності може коректуватися у бік підвищення для корекції на консервативний характер цих заміन. Про послідовності, які відрізняються такими консервативними замінами, кажуть, що вони мають "схожість послідовності" або "схожість". Способи виконання подібних корекцій добре відомі особам з кваліфікацією в даній галузі. Звичайно вони включають в себе оцінку в балах (очках) консервативної заміни як часткового, а не повного помилкового спарування, що збільшує процентну ідентичність послідовності. Так, наприклад, якщо ідентичний амінокислотний дається оцінка 1, а неконсервативний заміні дається оцінка 0, консервативній заміні дається оцінка між 0 і 1. Оцінку в балах консервативних замін розраховують, наприклад, відповідно до алгоритму Meyers and Miller (Computer Applic. Biol. Sci. 4: 11-17, 1988).

У застосуванні тут, "процентна ідентичність послідовності" означає величину, визначену порівнянням двох оптимально зіставлених послідовностей протягом вікна порівняння, де частина амінокислотної послідовності або нуклеотидної послідовності у вікні порівняння може містити додатки або делеції (тобто гепи) в порівнянні з посилювальною послідовністю, для оптимального зіставлення цих двох послідовностей. Процент розраховують визначенням числа положень, в яких ідентичні залишки амінокислот або нуклеотидів зустрічаються в обох послідовностях, з отриманням числа відповідних (правильно спарених) положень, розподілом числа правильно спарених положень на загальне число положень у вікні порівняння і множенням результату на 100 для отримання процентної ідентичності послідовності. Переважно, амінокислотна послідовність білка даного винаходу має щонайменше 82% або більш високу гомологію з послідовністю, зображеною на Фіг.8. Як показано в таблиці 4, найближча функціонально охарактеризована послідовність попереднього рівня (члени кластера генів 12 *Fusarium* в томаті) має набагато більш низький рівень ідентичності амінокислотної послідовності, ніж вказаний рівень (32% відносно Rpi-blb). Гомологія в кластері генів даного винаходу варіюється між 70% і 81% на рівні амінокислотної послідовності.

Гомологічні послідовності нуклеїнових кислот є послідовностями нуклеїнових кислот, які кодують визначений вище гомологічний білок. Одним прикладом такої нуклеїнової кислоти є послідовність, приведена на Фіг.6А. Однак, є численні послідовності, які кодують білок, що є на 100% ідентичним білку, зображеному на Фіг.8. Це зумовлене "гойдалками" в триплетах нуклеотидів, де одну і ту ж амінокислоту може кодувати не один триплет, а декілька ("гіпотеза гойдалок", тобто несупорядкованої відповідності в третьому положенні триплету). Таким чином, навіть без впливу на амінокислотну послідовність білка нуклеотидна послідовність, що кодує цей білок, може істотно варіюватися. Загальновизнаним є те, що нуклеотидні послідовності, які кодують амінокислотні послідовності, які не є на 100% ідентичними вказаному білку, можуть містити навіть ще більше варіацій. Таким чином, процентна ідентичність на рівні послідовностей нуклеїнових кислот може варіюватися в більш широких межах, без відхилення від даного винаходу.

Промотор: термін "промотор" означає коротку ДНК-послідовність, з якою зв'язуються РНК-полімераза і/або інші фактори ініціації транскрипції перед транскрипцією ДНК, з якою функціонально сполучений цей промотор, дозволяючи мати місце транскрипції (тобто запускаючи транскрипцію). Промотор звичайно розташований зліва (5') від кодувальної послідовності. У більш широкому значенні, термін "промотор" включає в себе сайт зв'язування РНК-полімери, а також регуляторні елементи послідовності, локалізовані в декількох сотнях нуклеотидів, іноді навіть більш далеко розташовані від стартового сайту транскрипції. Такими регуляторними послідовностями є, наприклад послідовності, які беруть участь в зв'язуванні білкових факторів, регулюючих ефективність ініціації транскрипції у відповідь на фізіологічні умови. Район промотору повинен бути функціональним в клітині-хазяїні і переважно відповідає району природного промотору гена стійкості Rpi-blb. Однак може бути використаний будь-який гетерологічний промоторний район, поки він є функціональним в клітині-хазяїні, в якій експресія є бажаною. Гетерологічний промотор може бути або конститутивним, або регульованим, тканеспецифічним, або не специфічним відносно конкретної тканини. Конститутивний промотор, такий як промотор CaMV 35S або промотор Т-ДНК, добре відомі фахівцям з кваліфікацією в даній

галузі, є промотором, який по суті не зазнає регуляції, такої як індукція або репресія, але робить можливою постійну і по суті незмінну транскрипцію ДНК-послідовності, з якою він функціонально пов'язаний у всіх активних клітинах організму, за умови, що інші вимоги для того, щоб транскрипція мала місце, є задоволеними. Можна використати тканеспецифічний промотор, який запускає експресію в тих частинах рослини, які мають тенденцію до зараження патогеном. У випадку *Phytophthora* може бути використаний промотор, який запускає експресію в листі, наприклад, промотор фередоксину. Регульованим промотором є промотор, функція якого регулюється одним або декількома факторами. Ці фактори можуть бути або такими, які своєю присутністю гарантують експресію релевантної ДНК-послідовності, або можуть, альтернативно, бути такими, які придушують експресію цієї ДНК-послідовності, так що їх відсутність примушує експресуватися дану ДНК-послідовність. Таким чином, промотор і необов'язково пов'язана з ним регуляторна послідовність можуть активуватися присутністю або відсутністю одного або декількох факторів для впливу на транскрипцію ДНК-послідовностей генетичної конструкції даного винаходу. Відповідні промоторні послідовності і способи отримання збільшеної транскрипції і експресії відомі фахівцям з кваліфікацією в даній галузі.

Термінатор: термінатор транскрипції служить для термінації транскрипції ДНК в РНК і переважно вибраний з групи, що складається з термінаторних послідовностей транскрипції рослин, термінаторних послідовностей транскрипції бактерій і термінаторних послідовностей вірусів рослин, відомих фахівцям з кваліфікацією в даній галузі.

Ген: термін "ген" використовується для зазначення ДНК-послідовності, яка бере участь в отриманні поліпептидного ланцюга і яка включає в себе райони, попередні кодуєчому району і наступні за кодуєчим районом (розташовані 5' - (зліва) і 3' (праворуч) від кодуєчого району послідовності), а також проміжні послідовності, так звані інтрони, які розташовані між окремими кодуєчими сегментами (так званими екзонами) або в 5'- або 3'-районі. 5'-район (вище по ходу транскрипції) може містити регуляторну послідовність, яка регулює експресію гена, звичайно промотор. 3'-район (нижче по ходу транскрипції) може містити послідовності, які беруть участь в термінації транскрипції гена, і не обов'язково послідовності, відповідальні за поліаденілювання транскрипту, і 3'-нетрансльований район. Термін "ген стійкості" означає виділену нуклеїнову кислоту даного винаходу, причому вказана нуклеїнова кислота кодує генний продукт, який здатний забезпечувати стійкість рослини проти патогену, причому більш конкретно, вказана рослина є членом сімейства Solanaceae (сімейства пасльонових), більш конкретно, картоплею або томатом, причому вказаний патоген є, більш конкретно, патогеном з класу ооміцетів, більш конкретно *Phytophthora*, ще більш конкретно *Phytophthora infestans*, і вказана нуклеїнова кислота переважно містить послідовність, зображену на Фіг.8, або її частину, або гомологічну послідовність, що має по суті однакові функціональні і структурні характеристики. Функціонально еквівалентний фрагмент такого гена або нуклеїнової кислоти стійкості, забезпечений даним винаходом, кодує фрагмент поліпептиду, який має амінокислотну послідовність, зображену на Фіг.8, або її частину, або гомологічний і/або функціонально еквівалентний поліпептид, причому вказаний фрагмент виявляє властивість забезпечення щонайменше часткової стійкості до інфекції ооміцетів, такої як інфекція, що викликається *P. infestans*, при включенні і експресії в рослині або клітині рослини.

Продукт гена стійкості: означає поліпептид, який має амінокислотну послідовність, зображену на Фіг.8, або її частину, або гомологічний і/або функціонально еквівалентний поліпептид, що виявляє властивість забезпечення щонайменше часткової стійкості до інфекції ооміцетів, такої як інфекція, що викликається *P. infestans*, при включенні і експресії в рослині або клітині рослини.

Функціональними еквівалентами білка даного винаходу є білки, які є гомологічними білку, зображеному на Фіг.8, або отриманими з білка, зображеного на Фіг.8, заміною, доданням і/або делецією однієї або більше амінокислот, але що все ще зберігають їх активність в приданні стійкості до патогену. Такі еквіваленти можуть бути легко отримані конструюванням білка *in vivo*, наприклад, зміною відкритої рамки прочитання, здатної кодувати цей білок, таким чином, що при цьому відбувається дія на цю амінокислотну послідовність. Поки ці зміни в амінокислотних послідовностях не знищують повністю цю активність даного білка, такі еквіваленти включені в даний винахід. Далі, повинно бути зрозуміло, що еквіваленти повинні бути такими, що отримуються з білка, зображеного на Фіг.8, при збереженні біологічної активності, тобто всі або велика частина проміжних продуктів між еквівалентним білком і білком, зображеним на Фіг.8, повинна мати активність стійкості до патогену. Велика частина означає 30% або більше проміжних продуктів, переважно 40% або більше, більш переважно 50% або більше, ще більш переважно 60% або більше, більш переважно 70% або більше, більш переважно 80% або більше, більш переважно 90% або більше, більш переважно 95% або більше, ще більш переважно 99% або більше.

Переважними еквівалентами є еквіваленти, в яких багатий лейцинами район, що повторюється, є високогомологічним з LRR-районом, показаним на Фіг.8. Іншими переважними еквівалентами є еквіваленти, в яких N-кінцевий ефекторний домен є по суті однаковим з ефекторним доменом Rpi-blb.

Білок даного винаходу містить особливий N-кінцевий ефекторний домен і багатий лейцином домен, що повторюється. Автори вважають, що консервативність цих районів є істотною для функції цього білка, хоча допустима деяка мінливість. Однак, інші частини цього білка є менш важливими для цієї функції і можуть бути більш сприйнятливими до зміни.

Для забезпечення швидкого і простого випробування, чи здатні модифіковані білки і/або генні конструкції до експресії вказаних модифікованих білків, описані тут, або чи можуть будь-які нові конструкції, які є очевидними для осіб з кваліфікацією в даній галузі після прочитання цієї заявки, приводити до реакції стійкості, фахівець в даній галузі може виконати швидкий тест транзитornoї експресії, відомий під назвою АТТА (тест транзитornoї експресії з використанням *Agrobacterium tumefaciens*). У цьому аналізі (докладний опис якого може бути знайдений в Van den Ackerveken, G., et al., Cell 87, 1307-1316, 1996) нуклеотидну послідовність, що кодує модифікований білок, який повинен бути перевірений, вміщують під контроль промотору CaMV 35S і вводять в штам *Agrobacterium*, який використовують також в протоколах для стабільної трансформації. Після інкубування цих бактерій з ацетосирингоном або будь-якою іншою фенольною сполукою, про яку відомо, що вона посилює перенесення Т-ДНК *Agrobacterium*, 1мл культури *Agrobacterium* інфільтрують

в лист рослини *in situ* (наприклад, з рослини тютюну або картоплі) ін'єкцією, після чого ці рослини вміщують в оранжерею і інфікують патогеном, переважно *P. infestans*. Через 2-5 днів листя оцінюють на появу симптомів стійкості.

У даному винаході автори ідентифікували і виділили ген стійкості *Rpi-blb*, який додає раса-неспецифічної стійкості до *P. infestans*. Цей ген клонували з генотипу *Solanum bulbocastanum*, який є стійким до *P. infestans*. Цей виділений ген стійкості даного винаходу може бути перенесений в чутливу рослину-хазяїн з використанням опосередкованої *Agrobacterium* трансформації або будь-яким відомим способом трансформації, і він може брати участь в приданні цій рослині-хазяїну стійкості до патогенів рослин, зокрема, до *P. infestans*. Рослиною-хазяїном може бути картопля, томат або будь-яка інша рослина, зокрема член сімейства *Solanaceae*, яка може бути інфікована таким патогеном рослини. Даний винахід забезпечує також послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує цей білок або його функціональний еквівалент, що переважно містить ген *Rpi-blb*, який зображений на Фіг.6.

З використанням білка стійкості *Rpi-blb* або його функціонально еквівалентного фрагмента даного винаходу фахівець має ефективний засіб боротьби проти патогенів рослин, оскільки ген, що кодує цей білок, може бути використаний для трансформації чутливих генотипів рослин з отриманням таким чином генетично трансформованих рослин, що мають зменшену чутливість або переважно є стійкими до патогену рослини. Зокрема, рослина, генетично трансформована геном стійкості *Rpi-blb* даного винаходу, мала зменшену чутливість до *P. infestans*.

У переважному варіанті ген стійкості *Rpi-blb* містить кодуючу послідовність, приведену на Фіг.6А, або будь-яку гомологічну послідовність або її частину, перед якою знаходиться промоторний район і/або за якою йде термінаторний район. Цей промоторний район повинен бути функціональним в клітинах рослин і переважно відповідати природному промоторному району гена *Rpi-blb*. Однак може бути також використаний промоторний район, який є функціональним в клітинах-рослинах, разом з кодуючими послідовностями.

Крім того, даний винахід відноситься також до білка стійкості *Rpi-blb*, який кодується геном *Rpi-blb* даного винаходу і який має амінокислотну послідовність, приведену на Фіг.8, або її функціональний варіант.

Сигнал, який запускає експресію гена стійкості, в *S. bulbocastanum* дикого типу або в трансгенних рослинах даного винаходу, зумовлений, можливо, присутністю патогену, більш конкретно, патогену *P. infestans*. Такі системи відомі для інших взаємодій патоген-рослина (Klement, Z., In: *Phytopathogenic Prokaryotes*, Vol.2, eds.: Mount, M.S. and Lacy, G.H., New York, Academic Press, 1982, pp.149-177), і ця система може бути використана для збільшення застосовності білка стійкості з отриманням стійкості до більшого числа патогенів (див. EP 474857). Ця система дозволяє використати сполуку-"еліситор", отриману з патогену, відповідний ген стійкості, причому цей ген стійкості при активації в присутності еліситора міг би приводити до локальної смерті клітин (реакція гіперчутливості). У випадку гена стійкості даного винаходу відповідний еліситорний компонент ще не був виявлений, але автори вважають, що це може бути досягнуто фахівцем в даній галузі. Після виділення цього еліситорного компонента можна буде трансформувати ген, що кодує вказаний еліситор, разом з геном, що кодує білок стійкості, в рослину, за допомогою чого один з цих генів знаходиться під контролем промотору, що індукується патогеном. Ці промотори добре відомі в даній галузі (наприклад, *prp1*, *Fisl*, *Bet v 1*, *VstI*, *gstA1* і промотор сесквітерпенциклази, але може бути використаний будь-який промотор, що індукується патогеном, який включається після інфікування патогеном). Якщо трансгенна рослина містить таку систему, то атака патогену, яка може запустити промотор, що індукується патогеном, буде спричиняти продукування компонента, який знаходиться під контролем вказаного промотору, і це, разом з іншим компонентом, що експресується конститутивно, буде спричиняти виникнення реакції стійкості.

Можна також мутувати білок стійкості, примушуючи його знаходитися в активованому стані (див. EP 1060257). Оскільки це могло б перманентно приводити до виникнення реакції стійкості, яка зрештою веде до локальної смерті клітин, потрібно піклуватися про те, щоб не сталася конститутивна експресія білка стійкості. Це може виконуватися приміщенням мутованого білка стійкості під контроль промотору, що індукується патогеном, який буде не тільки дозволяти експресію активного білка стійкості тільки в моменти атаки патогену, але зробить можливим також більш широкий спектр патогенів для індукції гіперчутливої реакції. Мутація залишків треоніну і серину в залишки аспарагінової кислоти і глютамінової кислоти часто приводить до активації, як показана у випадку багатьох білків, активність яких модулюється фосфорилуванням, наприклад, у випадку MAPK-активованого білка (Engel et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 27213-27221) і у випадку MAP-кіназного білка (Huang et al., 1995 *Mol. Biol. Cell* 6, 237-245). C- і N-кінцеві, а також внутрішні делеційні мутанти цих білків можуть бути також перевірені на відповідні мутанти.

Більш непрямий шлях ідентифікації мутантів, що представляють інтерес, конститутивна активність яких є індукованою, використовує розмноження ДНК, що кодує цей білок, в так званих "мутаторних" штаммах *E. coli*.

Швидким способом тестування всіх отриманих мутантів на їх придатність для індукції гіперчутливої реакції є використання так званого ATTA-аналізу (Van den Ackerveken, G., et al., *Cell* 87, 1307-1316, 1996). Численні мутанти можуть бути піддані скринінгу без значних зусиль для ідентифікації мутантів, які будуть індукувати HR після експресії.

Даний винахід забезпечує також вектор, що містить нуклеїнову кислоту, описану тут, причому вказана нуклеїнова кислота кодує генний продукт, який здатний забезпечувати член сімейства *Solanaceae* стійкістю проти патогену з класу ооміцетів, або функціонально еквівалентну виділену або рекомбінантну нуклеїнову кислоту, зокрема, коли вказаний член включає в себе *S. tuberosum* або *Lycopersicon esculentum*.

Даний винахід забезпечує також клітину-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту або вектор даного винаходу. Приклад вказаної клітини-хазяїна забезпечений тут в докладному описі. У конкретному варіанті вказана клітина-хазяїн містить клітину рослини. Як клітина-рослина переважно є клітина, отримана з члена сімейства *Solanaceae*, зокрема, коли вказаний член включає в себе *S. tuberosum* або *Lycopersicon esculentum*. З такої клітини або протопласта, може виникати трансгенна рослина, така як трансгенна рослина картоплі або рослина томата, з стійкістю проти інфекції ооміцетів. Таким чином, даний винахід забезпечує також рослину або бульбоподібний корінь, плід або насіння або частину або потомство, отриману з них, що містить клітину

відповідно до даного винаходу.

Крім того, даний винахід забезпечує білкову речовину, що виявляє властивість забезпечення щонайменше часткової стійкості до інфекції ооміцетів, наприклад, що викликається *P. infestans*, при включенні і експресії в рослині або клітині-рослини. Зокрема, забезпечена така білкова речовина, яка кодується нуклеїновою кислотою даного винаходу. У переважному варіанті даний винахід забезпечує білкову речовину, що містить амінокислотну послідовність, зображену на Фіг.8, або її функціональний компонент. Переважно, такий функціональний компонент буде містити одну або більше з послідовностей, які є відносно унікальними відносно Rpi-blb в порівнянні з RGC3-blb, RGC-blb і RGC4-blb. Такі послідовності можуть бути виявлені в зіставленні (див. Фіг.10A) і є послідовностями RPLLGE, AKMEKEKLIS, KHSYTHMM, FFYTLPPLEKFI, GDSTFNK, NLYGSGMRS, LQYCTKLC, GSQSLTCM, NNFGPHI, TSLKIYGFGRIN, IIECPFLTLS, RICYNKVA і KYLTISRCN. Автори вважають, що одна або декілька з цих послідовностей забезпечує функціональні властивості білка Rpi-blb.

Крім того, даний винахід забезпечує зв'язуючу молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту даного винаходу. Наприклад, ген Rpi-blb може бути використаний для конструювання олігонуклеотидів, комплементарних одного ланцюга ДНК-послідовності, зображеного на Фіг.7 і в таблиці 2. Такі олігонуклеотиди, забезпечені тут, застосовні як зонди для скринінгу бібліотек, гібридизаційних зондів для аналізу по Саузерну/Нозерн-аналізу, праймерів для ПЛР, для застосування в діагностичному наборі для детектування стійкості до хвороби і т.д. Такі олігонуклеотиди є цінними фрагментами виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти, забезпеченої тут, причому вказана нуклеїнова кислота кодує генний продукт, який здатний забезпечувати член сімейства Solanaceae стійкістю проти гриба з класу ооміцетів, або функціонально еквівалентної виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти, зокрема, коли вказаний член включає в себе *S. tuberosum* або *Lycopersicon esculentum*. Вони можуть бути легко вибрані з послідовності, зображеної на Фіг.6, або її частини. Конкретна точка впізнання містить домен LRR, ідентифікований тут. Таку пов'язану молекулу даного винаходу використовують як зонд або праймер, наприклад, забезпечений міткою, зокрема, коли вказана мітка містить частину, що збуджується, яка робить її застосовною в детектуванні присутності вказаної зв'язувальної молекули.

Крім того, даний винахід забезпечує спосіб для відбору рослини або рослинного матеріалу або його потомства на його чутливість або стійкість до інфекції ооміцетів, що передбачає тестування, щонайменше частини вказаної рослини або рослинного матеріалу або його потомства на присутність або відсутність нуклеїнової кислоти, причому вказана нуклеїнова кислота кодує генний продукт, який здатний забезпечувати член сімейства Solanaceae стійкістю проти гриба з класу ооміцетів, або на присутність вказаного генного продукту, причому вказаний спосіб переважно передбачає контактування щонайменше частини вказаної рослини або рослинного матеріалу або його потомства зі зв'язувальною молекулою даного винаходу і визначення скріплення вказаної молекули з вказаною частиною. Вказаний спосіб особливо застосовний, коли вказаний ооміцет включає в себе *P. infestans*, що дозволяє відбирати рослини або рослинний матеріал на стійкість проти фітофторозу, наприклад, коли вказана рослина або матеріал включає в себе *S. tuberosum*. Автори вважають, що за допомогою аналізу філогенетичного дерева, що обговорюється вище, білки, які є високоомологічними відносно Rpi-blb і які могли б додавати стійкості проти патогенів рослин, можуть бути легко ідентифіковані. Прикладом цього є детектування трьох високоомологічних білків RGC1-blb, RGC3-blb і RGC4-blb, відносно яких ще не було показано, що вони додають стійкості до *P. infestans*, але проте вважається, що вони беруть участь в стійкості до патогенів в рослинах.

Даний винахід забезпечує також застосування нуклеїнової кислоти або вектора або клітини або речовини або зв'язувальної молекули даного винаходу в способі забезпечення рослини або його потомства щонайменше частковою стійкістю проти інфекції ооміцетів, зокрема, коли вказаний ооміцет включає в себе *P. infestans*, особливо, коли вказана рослина включає в себе *S. tuberosum*, причому вказаний спосіб забезпечує рослину або її потомство щонайменше частковою стійкістю проти інфекції ооміцетів, що передбачає забезпечення вказаної рослини або її частини геном, що кодує білок стійкості, або його функціональним фрагментом, що містить нуклеїнову кислоту, причому вказаний білок стійкості здатний забезпечувати член сімейства Solanaceae стійкістю проти гриба з класу ооміцетів, або забезпечення вказаної рослини або її частини нуклеїновою кислотою або вектором або клітиною або речовиною даного винаходу.

Крім того, даний винахід забезпечує виділений *S. bulbocastanum* або його частину, таку як бульба або насіння, чутливі до інфекції ооміцетів, що викликається *P. infestans*.

Далі даний винахід представлений у вигляді докладного опису нижче.

Фіг.1. Географічна карта Мексики, яка вказує походження надходжень *S. bulbocastanum*, що використовуються для виділення гена Rpi-blb. Букви a, b і c вказують відносно географічне походження використовуваних надходжень *S. bulbocastanum*.

Фіг.2. Генетичні карти зчеплення локусу Rpi-blb на хромосомі 8 *S. bulbocastanum*. Горизонтальні лінії вказують відносні положення маркерів, пов'язаних з стійкістю до фітофторозу. Відстані між маркерами показані в сантиморганах. А. Генетичне положення локусу Rpi-blb відносно маркерів TG513, CT88 і CT64 (n=508 генотипів). В. Генетична карта зчеплення високої щільності локусу Rpi-blb (n=2109 генотипів).

Фіг.3. Фізична карта локусу Rpi-blb. А. Генетична і фізична карта геномного району *S. bulbocastanum*, що містить Rpi-blb. Вертикальні стрілки вказують відносні положення маркерів, зчеплених зі стійкістю. Числа вище горизонтальної лінії вказують число рекомбінантів, ідентифікованих між фланкуючими маркерами в 2109 рослинах-нащадках. Прямокутники являють собою клони бактерійної штучної хромосоми (BAC). В. Відносні положення кандидатних генів для стійкості до фітофторозу на BAC SPB4. С. Схематичне представлення структури гена Rpi-blb. Горизонтальні лінії вказують екзони. Білі (відкриті) блоки являють собою кодуєчу послідовність. Лінії, що йдуть під кутом вниз, вказують положення інтронної послідовності довжиною 678 нуклеотидів.

Фіг.4. Саузерн-блот-аналіз BAC-контига, що охоплює локус Rpi-blb. Назви над кожною доріжкою являють собою назви BAC-клонів. Показані назви рестрикційних ферментів, що використовуються для розщеплення

ВАС-ДНК перед блоттингом по Саузерну.

Фіг.5. Аналізи хвороби на окремих листах. А. Стійкий (лівий), проміжний (центральный) і чутливий (правий) фенотипи, виявлені в картуванні популяції В 8 *S. bulbocastanum* через 6 днів після інюкуляції (d.p.i.) краплинками спорангіоспор *P. infestans*. В. Генетична відносно стійкості до фітофторозу в картоплі. Характерні фенотипи хвороби листя, отриманого з трансгенних рослин картоплі, що несуть RGC1-blb, RGC2-blb, RGC3-blb або RGC4-blb через 6 днів після інюкуляції (d.p.i.) краплинками спорангіоспор *P. infestans*. Генетичні конструкції, що несуть RGC, переносили в чутливий сорт Impala опосередкованою *Agrobacterium* трансформацією. С. Генетична комплементация для стійкості до фітофторозу в томаті. Характерний фенотип хвороби листя, отриманого з трансгенних рослин томата, що несуть Rpi-blb, опісля 6 днів після інюкуляції (d.p.i.) краплинками спорангіоспор *P. Infestans* (ліва панель). Генетичну конструкцію, яка несе Rpi-blb, перенесли в чутливий сорт томата Moneymaker опосередкованою *Agrobacterium* трансформацією.

Фіг.6. Послідовності нуклеїнових кислот членів кластера генів Rpi-blb. А. Кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти гена Rpi-blb. В. Кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти гена Rpi-blb, що включає в себе інтронну послідовність (положення 428-1106). С. Послідовність ВАС SPB4 геномного ДНК-фрагменту Scal 5,2т.п.н., генетичної конструкції, що використовується для генетичної комплементации відносно стійкості до фітофторозу. Цей геномний фрагмент несе ген Rpi-blb, що включає в себе природні регуляторні елементи, необхідні для правильної експресії цього гена. Ініціюючий кодон (положення ATC 1191-1193) і термінуючий кодон (положення TAA 4781-4783) підкреслені. D. Кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти RGC1-blb, що включає в себе інтронну послідовність (положення 428-708). E. Кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти RGC3-blb, що включає в себе інтронну послідовність (положення 428-1458). F. Кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти RGC4-blb, що включає в себе інтронні послідовності (положення 434-510, 543-618 і 743-1365).

Фіг.7. Відносні положення праймерів. Горизонтальна межа являє собою кодуючу послідовність гена Rpi-blb. Числа являють собою положення нуклеотидів. Горизонтальні стрілки вказують відносні положення і орієнтації праймерів. GSP1 і GSP2 являють собою вмонтовані ген-специфічні праймери, що використовуються для 3'-RACE-eKcnerHMeHriB. GSP3 і GSP4 являють собою вмонтовані ген-специфічні праймери, що використовуються для 5'-RACE-eKcnerHMeHtiB. A(F), A(R), B(F) і B (R) є праймерами, що використовуються для ампліфікації гомологів Rpi-blb. Вказане положення сайту рестрикції NsiI, що використовується для отримання обмінів доменами між гомологами Rpi-blb.

Фіг.8. Розшифрована послідовність білка Rpi-blb. Ця амінокислотна послідовність, розшифрована з ДНК-послідовності Rpi-blb, розділена на три домени (AC), як описано в прикладі 6. Гідрофобні залишки в домені А, які утворюють перший і четвертий залишки гептадних повторів потенційних скручених спіральних доменів. Консервативні мотиви в білках R написані малими буквами і курсивними буквами в домені В. Залишки, відповідні консенсусу цитоплазматичного LRR, показані жирним шрифтом в домені С. Точки в цій послідовності були введені для зіставлення цієї послідовності з консенсусною LRR-послідовністю цитоплазматичних LRR.

Фіг.9. Аналіз філогенетичного дерева. А. Філогенетичне дерево послідовностей існуючого рівня знань, які мають деяку міру гомології з розшифрованою амінокислотною послідовністю Rpi-blb і членів кластера її генів RGC1-blb, RGC3-blb і RGC4-blb. Це дерево було отримане за способом Nieghbour-Joining Saitou and Nei (1987 Molecular Biology and Evolution 4, 406-425). Зірочка вказує, що цей ген був приписаний функції. Кластер генів Rpi-blb показаний у вигляді блока. В. Філогенетичне дерево послідовностей існуючого рівня знань, які мають деяку міру гомології з розшифрованою амінокислотною послідовністю Rpi-blb. У цей аналіз включені Rpi-blb-гомологічні послідовності B149-blb, SH10-tub, SH20-tub і T118-tar, послідовності, ідентифіковані ПЛП-ампліфікацією з використанням праймерів, специфічних для кластера генів Rpi-blb. С. Відносні положення ДНК-послідовностей існуючого рівня знань, які виявляють істотну гомологію з частинами послідовності гена Rpi-blb. Горизонтальні лінії представляють відносні положення гомологічних послідовностей. Міра гомології показана праворуч від кожної лінії. Довжина гомологічної послідовності вказана над кожною лінією.

Фіг.10. Зіставлення передбаченого продукту гена Rpi-blb з передбаченими білковими послідовностями гомологів Rpi-blb. А. Зіставлення розшифрованих білкових продуктів, що кодуються Rpi-blb, RGC1-blb, RGC3-blb і RGC4-blb. Показана повна амінокислотна послідовність Rpi-blb і амінокислотні залишки з RGC1-blb, RGC3-blb і RGC4-blb, які відрізняються від відповідного амінокислотного залишку в Rpi-blb. Пунктири вказують гепи, вставлені для збереження оптимального зіставлення. Амінокислотні залишки, які є специфічними для Rpi-blb при порівнянні із залишками у відповідних положеннях в RGC1-blb, RGC3-blb і RGC4-blb, виділені жирним шрифтом. Райони LRR, які відповідають L..L..L..C/N/S..a..aP, підкреслені. Консервативні мотиви в NBS-домени показані малими буквами. В. Зіставлення розшифрованих білкових продуктів, що кодуються Rpi-blb, RGC1-blb, RGC3-blb, RGC4-blb, B149-blb, SH10-tub, SH20-tub і T118-tar.

Фіг.11. Схематичний огляд обмінів доменами, виконаних між Rpi-blb і гомологами RGC1-blb і RGC3-blb. Вертикальна лінія у вигляді точок вказує положення сайту NsiI, що використовується для виконання цих обмінів. R і S вказують, чи є трансгенні рослини, несучі специфічні химерні конструкції, стійкими або чутливими до фітофторозного зараження, відповідно.

Експериментальна частина

Для картування гена стійкості була створена популяція для інтраспецифічного картування *S. bulbocastanum*. Вирішальною стадією в цьому процесі була ідентифікація чутливих генотипів *S. bulbocastanum*. Для цієї мети декілька надходжень *S. bulbocastanum*, що походять з різних кластерів/зон в Мексиці, аналізували на стійкість або чутливість до *P. infestans* в аналізі на окремих листах (таблиця 1 і Фіг.1). Піддані скринінгу надходження BGRC 8008 і BGRC 7999 не містили чутливих генотипів. Однак, в надходженнях BGRC 8005, BGRC 8006 і BGRC 7997 була виявлена чутливість в 9%, 7% і 14% аналізованих проростків, відповідно. Потім був відібраний чутливий до *P. infestans* клон надходження BGRC 8006 і схрещений з стійким клоном надходження BGRC 8005. Отриману популяцію F1 використали для картування локусу Rpi-blb і в подальшому описі її називають популяцією B8.

Первинний скринінг 42 генотипів B8 на стійкість до *P. infestans* в аналізі на окремих листах дозволив

передбачити, що стійкість до *P. infestans* в надходженні *S. bulbocastanum* 8005 могла бути зумовлена єдиним домінантним геном R або тісно зчепленим кластером генів. З 42 перевірених генотипів 22 оцінювали як стійкі і 16 як чутливі в повторюваному експерименті. Фенотипи стійкості інших 4 проростків залишаються неясними. Для визначення хромосомного положення цієї стійкості *S. bulbocastanum* генотипи В 8 з фенотипом, що не викликає сумнівів, використали для маркерного аналізу. Було виявлено, що специфічний маркер TG330 хромосоми 8 (таблиця 2) є зчепленим в фазі відштовхування з стійким фенотипом, оскільки тільки один рекомбінант був отриманий між цим маркером і геном стійкості в 12 генотипах В8. Крім того, було виявлено, що маркер CT88 хромосоми 8 (таблиця 2) був повністю зчепленим в фазі відштовхування з стійкістю, що вказувало на те, що локус, відповідальний за стійкість, що позначається як Rpi-blb, був локалізований в цьому районі хромосоми 8. З цієї причини специфічні для хромосоми 8 маркери томата, які картуються проксимально і дистально відносно CT88 (TG513 і CT64; Tanksley et al, 1992 Genetics 132: 1141-1160; таблиця 2) робили маркерами CAPS і випробовували в 512 генотипах В8 з відомими фенотипами стійкості. У цьому скринінгу ідентифікували загалом п'ять CT64-CT88-рекомбінантних генотипів і 41 CT88-TC513-рекомбінантний генотип (Фіг.2А). Локус стійкості Rpi-blb був картований 1 подією рекомбінації, дистально відносно маркера CT88 (Фіг.2А).

Картування високої якості локусу Rpi-blb проводили з маркерами CAPS, отриманими з лівою (L) і правою (R) приграничними послідовностями BAC-клонів, виділених з BAC-бібліотеки, отриманої з стійкого генотипу *S. bulbocastanum* BGRC 8005-8. BAC-бібліотеку спочатку піддавали скринінгу з використанням маркерів CT88 і CT64. BAC-клони, ідентифіковані з використанням цих маркерів, використали як затравкові BAC для подальшої прогулянки по хромосомі до локусу Rpi-blb. У цілому 2109 генотипів В8 піддавали скринінгу на рекомбінацію між маркерами TG513 і CT64. Потім всі рекомбінантні генотипи (219 з 2109) піддавали скринінгу з використанням всіх доступних маркерів в генетичному інтервалі CT88-CT64. Ці дані разом з даними по стійкості до хвороби кожного рекомбінанту, отриманими за допомогою аналізів на окремому листі, позиціонували локус Rpi-blb між маркерами SPB33L і B149R, в генетичному інтервалі 0,1cM (4 з 2109 рекомбінантів), що фізично охоплюється BAC-клонами SPB4, які перекриваються, і B49 (Фіг.2b і 3). У межах цього інтервалу стійкість співрозщеплювалася з маркером SPB42L кінця BAC, послідовність якого була високогомологічною частковим NBS-фрагментам з томата (наприклад, Q194, Q137, Q152, Q153; Pan et al., 2000 Genetics 155: 309-322). Аналізи по Саузерну BAC-клонів, що охоплюють інтервал SP33L-B149R, з використанням ³²P-мічених ПЛР-фрагментів маркера SPB42L як зонд виявили присутність щонайменше 4 копій цієї подібної гену R послідовності в Rpi-blb-інтервалі (Фіг.4). Крім того, всі з цих копій були присутніми на BAC SPB4. Секвенування і анотування повного інсерта цього BAC-клона фактично ідентифікували чотири повних кандидати гена R (RGC1-blb, RGC2-blb, RGC3-blb і RGC4-blb) класу NBS-LRR генів R рослин. ПЛР-маркер, який був локалізований між RGC1-blb і RGC4-blb, виявив рекомбінацію між стійкістю до *P. infestans* і RGC4-blb, що виключає можливість того, що RGC4-blb є Rpi-blb. Незважаючи на це відкриття, всі чотири RGC були відібрані для аналізу на комплементацию.

Геномні фрагменти приблизно 10т.п.н., що несуть RGC1-blb, RGC2-blb, RGC3-blb або RGC4-blb, субклону вали з BAC SPB4 в бінарний трансформуючий вектор pBINPLUS (van Engelen et al., 1995 Trans. Res. 4, 288-290) і переносили в чутливий сорт картоплі за допомогою стандартних способів трансформації. Первинні трансформанти випробовували на стійкість до *P. infestans*, як описано в прикладі 1. Тільки генетична конструкція, що несе RGC2-blb, була здатна комплементувати чутливий фенотип; 86% первинних трансформантів, що несуть RGC2-blb, були стійкими (таблиця 3), тоді як первинні трансформанти, що містять RGC1-blb, RGC3-blb і RGC4-blb, були повністю чутливими до *P. infestans*. Стійкі трансформанти, які містять RGC2-blb, виявили схожі фенотипи стійкості з стійким батьком *S. bulbocastanum* (Фіг.5). Таким чином, RGC2-blb був названий геном Rpi-blb, ДНК якого приведена на Фіг.6.

Приклад 1: Аналіз хвороби

Фенотип *S. bulbocastanum* і трансгенні генотипи *S. tuberosum* випробовували на стійкість до *P. infestans* за допомогою аналізів на відділеному листі. Листя з рослин, що вирощуються протягом 6-12 тижнів в оранжереї, вміщували в шматочках насиченою водою піни, що застосовується флористами, приблизно 35×4×4см, і вміщували в лоток (ширина 40см, довжина 60см і висота 6см) з перфорованим дном. Кожний лист інокулювали двома або більше крапельками (кожна 25мкл) розчину спорангіоспор на абаксальній стороні. Потім цей лоток вміщували в пластиковому мішку на верхню частину лотка, в який вміщували насичений водою фільтрувальний папір, і інкубували в кліматичній камері при 17°C з фотоперіодом день/ніч 16год./8год. з флуоресцентним світлом (Philips TLD50W/84HF). Через 6 днів це листя оцінювали на розвиток симптомів хвороби, що викликається *P. infestans*. Рослини з листям, що показало явно споруючі пошкодження через 6 днів після інокуляції, вважали рослинами, що мають чутливий фенотип, тоді як рослини з листям, що не виявляє видимих симптомів або некрозу на стороні інокуляції за відсутності явної споруючії, вважали стійкими. Цей аналіз виконували з комплексним ізолятом 655-2A *P. infestans* (раса 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11), який отримували з Plant Research International BV (Wageningen, The Netherlands).

Приклад 2: Картування локусу стійкості Rpi-blb

Рослинний матеріал

Для отримання популяції інтраспецифічного картування, яка розщеплювалася відносно гена стійкості до *P. infestans*, присутнього в надходженні BGRC 8005 *S. bulbocastanum* (CGN 17692, PI 275193), був потрібен чутливий генотип *S. bulbocastanum*. Декілька надходжень *S. bulbocastanum*, що походять з різних кластерів/зон в Мексиці, аналізували на стійкість або чутливість до *P. infestans* в аналізі на відділеному листі (таблиця 1 і Фіг.1). У надходженні BGRC 8008 і BGRC 7999 не виявляли чутливості. У надходженні BGRC 8005, BGRC 8006 і BGRC 7997 чутливість була присутньою тільки в 9%, 7% і 14% аналізованих проростків, відповідно. Таким чином, було отримане тільки невелике число чутливих генотипів *S. bulbocastanum*.

Популяцію інтраспецифічного картування *S. bulbocastanum* (В8) отримували схрещуванням чутливого клону надходження BGRC 8006 з стійким клоном надходження BGRC 8005. ДНК з 2109 рослин-нащадків екстрагували з молодого листа згідно з Doyle and Doyle (1989 Focus 12, 13-15).

Аналіз з маркерами CAPS

Для ПЛР-аналізу готували реакційні суміші по 15мкл, що містять 0,5мкг ДНК, 15нг кожного з праймерів, 0,2мМ кожного з dNTP, 0,6 одиниць Taq-полімерази (15E/мкл, SphaeroQ, Leiden, The Netherlands), 10мМ Трис-НCl pH 9, 1,5мМ MgCl₂, 50мМ KCl, 0,1% Тритон X-100 і 0,01% (мас/об.) желатин. ПЛР виконували з використанням наступного профілю циклів: 25-секундна денатурація ДНК при 94°C, 30-секундний відпал (див. таблицю 1) і 40-секундне подовження при 72°C. Як перша стадія в ПЛР-ампліфікації ДНК денатурували протягом 5 хвилин при 94°C і закінчували додатковою 5-хвилинною стадією елонгації при 72°C. Реакції ампліфікації проводили в термоциклері Biometra® T-Gradient або Biometra® Uno-II (Westburg, Leusden, The Netherlands). У залежності від маркера, ПЛР-продукт розщеплювали відповідною рестриктазою. Огляд маркерів, а також праймерних послідовностей, температур відпалу і рестриктаз, приведений в таблиці 2. Потім (розщеплені) ПЛР-продукти аналізували електрофорезом в агарозному або акриламідному гелі. Для аналізу в акриламідному гелі використали набір для аналізу ДНК CleanGel DNA Analysis, kit і набір для фарбування ДНК сріблом DNA Silver Staining kit (Amersham Pharmacia Biotech Benelux, Roosendaal, the Netherlands).

Генетичне картування локусу Rpi-blb

Спочатку невелику групу з 42 рослин-нащадків популяції В8 піддавали скринінгу на стійкість до *P. infestans* в аналізі на відділеному листі. Рослини з листям, що показало явно споруюче пошкодження через 6 днів після інюкуляції, вважали рослинами, що мають чутливий фенотип, тоді як рослини з листям, що не виявляє видимих симптомів або некрозу на стороні інюкуляції за відсутності явної споруючості, вважали стійкими. З цих 42 проростків 22 були оцінені як стійкі і 16 як чутливі. Фенотип інших 4 проростків залишався неясним в цій початковій фазі. Ці дані показали, що стійкість могла бути зумовлена єдиним домінантним геном або тісно зчепленим кластером генів. Для визначення хромосомного положення проростки з фенотипом, що не викликає побоювань, використали для маркерного аналізу. Було виявлено, що маркер TG330 хромосоми 8 є зчепленим в фазі відштовхування з стійким фенотипом, оскільки тільки один рекомбінант був отриманий між цим маркером і геном стійкості в 12 проростках В8. Крім того, було виявлено, що маркер СТ88 хромосоми 8 був повністю зчепленим в фазі відштовхування з стійкістю, що вказувало на те, що ген стійкості був локалізований на хромосомі 8.

Потім специфічні маркери хромосоми 8, які були картовані проксимально і дистально відносно СТ88 (Tanksley et al., 1992 Genetics 132: 1141-1160), були розроблені в маркери CAPS. Для більш точного картування цих маркерів інші 512 індивідуумів В8-популяції піддавали скринінгу на стійкість до фітофторозу за допомогою аналізу на відділеному листі. Одночасно рослини оцінювали на маркери СТ64, СТ88 і TG513. Для 5 проростків виявляли рекомбінацію між маркерами СТ64 і СТ88, тоді як 41 проросток були рекомбінантами між маркерами СТ88 і TG513 (Фіг.2А). Ген стійкості Rpi-blb був картований між маркерами СТ64 і СТ88. На цій стадії позиціонування СТ88 проксимально відносно Rpi-blb було основане тільки на результаті для одного рекомбінованого проростка.

Для більш точного визначення положення Rpi-blb відносно цих доступних маркерів вирощували інші 1555 проростків В8-популяції і аналізували на рекомбінацію між маркерами TG513 і СТ64. Таким чином, всього 2109 індивідуальних клонів потомства В8-популяції були піддані скринінгу. Рекомбінацію між маркерами TG513 і СТ64 виявляли в 219 з цих проростків (10,4сМ). Всі ці рекомбінанти піддавали скринінгу з маркером СТ88 і фенотипували на ознаку стійкості з використанням аналізу на відділеному листі. Відповідно до більш ранніх результатів, ген Rpi-blb був картований між маркерами СТ88 і СТ64 (Фіг.2В).

Приклад 3: Конструювання ВАС-бібліотеки *S. bulbocastanum* і конструювання безперервного ВАС-континга, що охоплює локус Rpi-blb

Конструювання ВАС-бібліотеки

Стійкий клон надходження BGRC 8005 *S. bulbocastanum* (bib) (CGN 17692, PI 275193), гетерозиготний у відношенні локусу Rpi-blb, використали як джерело ДНК для конструювання геномної ВАС-бібліотеки, яка далі називається ВАС-бібліотекою 8005-8. Отримання високомолекулярної ДНК і конструювання ВАС-бібліотеки проводили, як описано в Rouppe van der Voort et al. (1999 MPMI 12:197-206). Зрештою, отримали 130000 клонів із середнім розміром інсрта 100т.п.н., що відповідає 15 геномним еквівалентам. Загалом приблизно 83000 індивідуальних клонів зберігали в 216 384-ямкових мікротитраційних планшетах (Invitrogen, The Netherlands), що містять LB-буфер для заморожування (36мМ K₂HPO₄, 13,2мМ KH₂PO₄, 1,7мМ цитрат, 0,4мМ MgSO₄, 6,8мМ (NH₄)₂SO₄, 4,4% (об./об.) гліцерин, 12,5мкг/мл хлорамфеніколу в середовищі LB), при -80°C. Інші 50000 клонів зберігали у вигляді бактерійних пулів, що містять ~1000 білих колоній. Їх отримували зіскрібанням колоній з чашок з агаром в LB-середовищі, що містить 18% гліцерин і 12,5 мкг/мл хлорамфеніколу, за допомогою стерильного скляного спредера. Ці так звані суперпули також зберігали при -80°C.

Скринінг ВАС-бібліотеки і конструювання фізичної карти локусу Rpi-blb

ВАС-бібліотеку 8005-8 спочатку піддавали скринінгу з використанням маркерів CAPS СТ88 і СТ64. Це виконували таким чином. Для першої частини цієї бібліотеки з приблизно 83000 клонів, що зберігаються в 384-ямкових мікротитраційних планшетах, виділяли плазмідну ДНК з використанням стандартного протоколу лужного лізису (Sambrook et al., 1989 in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York) з пулів бактерій кожного планшета з отриманням 216 планшетних пулів. Для ідентифікації індивідуальних ВАС-клонів, що несуть маркери CAPS, ці планшетні пули піддавали скринінгу за допомогою ПЛР. Після ідентифікації індивідуального планшетного пулу як позитивного відносно конкретного маркера CAPS позитивний ряд і позитивний стовпець в планшеті ідентифікували з використанням двовимірної ПЛР-скринінгу. Для цієї мети "материнський" 384-ямковий планшет реплікували двічі на LB-середовищі, що містить хлорамфенікол (12,5мкг/мл). Після вирощування колоній протягом 16 годин при 37°C один планшет використали для вишкрібання 24 колоній з кожного ряду разом, а інший планшет для вишкрібання 16 колоній з кожного стовпця разом. Бактерії кожного ряду або стовпця ресуспендували в 200мкл ТЕ-буфера. Потім проводили аналіз на маркери CAPS на 5мкл цих бактерійних суспензій, що приводило до

ідентифікації окремих позитивних ВАС-клонів. Для другої частини цієї бібліотеки, що зберігає у вигляді 50 пулів приблизно 1000 клонів, плазмідну ДНК виділяли з кожного пулу клонів з використанням стандартного протоколу лужного лізису і проводили ПЛР для ідентифікації позитивних пулів. Бактерії, відповідні позитивним пулам, розщеплювали і висівали на чашки з LB-агаром, що містить хлорамфенікол (12,5мкг/мл). Потім індивідуальні білі колонії вишкрібали в 384-ямковий планшет і потім окремі позитивні ВАС-клони ідентифікували, як описано вище. Назви ВАС-клонів, виділених з цих суперпулів, несуть префікс SP (наприклад, SPB33).

Розміри інсертів ВАС-клонів приблизно визначали таким чином. Позитивні ВАС-клони аналізували виділенням плазмідної ДНК з 2мл нічних культур (LB-середовище, доповнене 12,5мг/мл хлорамфеніколу) з використанням мініпреп-протоколу стандартного лужного лізису і ресуспендували в 20мкл ТЕ. Плазмідну ДНК (10мкл) розщеплювали 5 E NotI протягом 3 годин при 37°C для відділення геномної ДНК від вектора pBeoBAC11. Розщеплену ДНК розділяли електрофорезом CHEF в 1% агарозному гелі в 0,5× TBE при 4°C з використанням системи BIORAD CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, USA) при 150 вольт з часом постійного імпульсу 14 сек. протягом 16 годин.

Скринінг ВАС-бібліотеки 8005-8 маркером CT88 ідентифікував два позитивних ВАС-клони: B139 і B180, з інсертми ДНК картоплі 130 і 120т.п.н., відповідно (Фіг.3А). Розщеплення ПЛР-продукту CT88, отриманого з цих ВАС-клонів і декількох стійких і чутливих рослин-нащадків популяції В 8 для картування, рестриктазою MboI, виявило, що ВАС139 ніс алель CT88, який був зчеплений in cis з стійкістю. Для ідентифікації відносного положення в геномі ВАС139, конструювали пари ПЛР-праймерів на основі послідовності правого (R) і лівого (L) кінців цього інсрта. Секвенування ВАС-кінців проводили, як описано в прикладі 4, з використанням 0,5мкг ДНК ВАС як матриці. Були створені поліморфні CAPS-маркери розщепленням ПЛР-продуктів двох початкових генотипів популяції В 8 і двох стійких і двох чутливих генотипів-нащадків з декількома відрізняючими 4 основи рестриктазами (таблиця 2). Скринінг 37 CT88-CT164-рекомбінантних генотипів В8 картирував 5 з 7 CT88-Rpi-blb-рекомбінантів між CT88 і B139R, що свідчить про те, що маркер B139R був відносно більш близьким до локусу Rpi-blb, ніж маркер CT88. Скринінг 216 планшетних пулів з використанням B139R не приводив до ідентифікації позитивні ВАС-клони SPB33 і SPB42 з ДНК-інсертми 85 і 75т.п.н., відповідно (Фіг.3А). Скринінг повної ВАС-бібліотеки з використанням SPB33L ідентифікував позитивні ВАС-клони B149 і SPB4. ВАС-клон SPB4 містив алель SPB33L, який був зчеплений in cis з стійкістю, тоді як ВАС-клон B149 не містив цей алель. Однак скринінг панелі CT88-CT64-рекомбінантів з використанням B149R виявив, що ця ВАС включала в себе локус Rpi-blb. B149R відділяли від локусу Rpi-blb двома подіями рекомбінації (Фіг.3А). Скринінг ВАС-бібліотеки 8005-8 з використанням B149R ідентифікував ВАС-клон B49 як такий, що має алель B149R, який був зчеплений in cis з стійкістю. Таким чином, цей ВАС-клон разом з ВАС-клоном SPB4 утворювали ВАС-контиг, який включав в себе локус Rpi-blb (Фіг.3).

Приклад 4: Аналіз послідовності ВАС SPB4 і ідентифікація кандидатів генів стійкості в локусі Rpi-blb

У межах інтервалу SPB33L-B149R стійкість співрозщеплювалася з маркером SPB42L кінця ВАС, послідовність якого була високогомологічна частковим NBS-фрагментам з томата (наприклад, Q194, Q137, Q97, Q152, Q153; Pan et al., 2000 Genetics 155: 309-322). Аналізи по Саузерну ВАС-клонів, що охоплюють інтервал SP33L-B149R, з використанням ³²P-міченого ПЛР-фрагменту маркера SPB42L як зонда виявили присутність щонайменше 4 копій цієї подібної до гену R послідовності в Rpi-blb-інтервалі (Фіг.4). Крім того, всі з цих копій були присутніми на ВАС SPB4. Таким чином, ДНК-послідовність ВАС-клона SPB4 визначали аналізом послідовності за способом дробовика. Готували ряд випадкових клонів із середнім розміром інсрту 1,5т.п.н. 10мкг очищеної за допомогою CsCl ДНК піддавали зрізувальному зусиллю протягом 6 секунд на льоду при 6 мікронах амплітуди в 200мкл ТЕ з використанням ультразвукового дезінтегратора MSE soniprep 150. Після осадження етанолом і ресуспендування в 20мкл ТЕ кінці цього ДНК-фрагменту репарували за допомогою інкубування з ДНК-полімеразою T4 при 11°C протягом 25 хвилин в 50мкл реакційній суміші, що містить їх буфер для ДНК-полімерази T4 (New England BioLabs, USA), 1мМ ДТТ, 100мкМ всіх 4 dNTP і 25 Е ДНК-полімерази T4 (New England BioLabs, USA), з подальшим інкубуванням при 65°C протягом 15 хвилин. Потім оброблену зрізувальним зусиллям ДНК розділяли електрофорезом на 1% агарозному гелі SeaPlaque LMP (FMC). Фракцію з розміром 1,5-2,5т.п.н. вирізали з гелю і діалізували проти 50мл ТЕ протягом 2 годин при 4°C. Діалізовані зрізи агарози переносили потім в пробірку Епендорфа на 1,5мл, розплавляли при 70°C протягом 5 хвилин, розщеплювали 1 одиницею GELASE (Epicentre Technologies, USA) на 100мг агарозного гелю протягом 1 години при 45°C і потім осаджували ДНК. Фрагменти 1,5-2,5т.п.н. лігували при 16°C в розщеплений EcoRV і дефосфорильований вектор pBlueScript SK⁺ (Stratagene Inc.). Потім цю суміш для лігування використовували для трансформації ElectroMAX компетентних клітин E. coli DH10B (Life Technologies, UK) електропорацією з використанням BioRad Gene Pulser. Установки на BioRad Gene Pulser були такими, як ті, що рекомендуються для E. coli виробником. Клітини висівали розподілом на чашках з агаром на бульйоні Луриа-Бертані (LB), що містить ампіцилін (100мкг/мл), 5-бром-4-хлор-3-індоліл-β-D-галактозид (Xgal) (64мкг/мл) і ізопропіл-1-тіо-β-D-галактозид (IPTG) (32мкг/мл). Чашки інкубували при 37°C протягом 24 годин. Окремі білі колонії вирощували в 96-ямкових плоскодонних блоках (1,5мл середовища Terrific Broth, що містить 100мкг/мл ампіциліну).

Плазмідну ДНК виділяли з використанням мініпреп-системи QIAprep 96 Turbo разом з BioRobot™ 9600 (QIAGEN) відповідно до інструкцій виробника. Реакції секвенування виконували з використанням набору для секвенування ABI PRISM BigDye™ Terminator cycle (Stratagene) відповідно до інструкцій виробника. Всі клони секвенували двонаправлено з використанням універсальних праймерів. Продукти секвенування розділяли капілярним електрофорезом на аналізаторі ДНК Perkin Elmer ABI 3700.

Автоматичне збирання зчитувань (ДНК-фрагментів), отриманих за способом "дробовика", проводили з використанням програм Phred-Phrap (Ewing and Green, 1998 Genome Research 8, 186-194; Ewing et al, 1998 Genome Research 8, 175-185). Загальне число 835 зчитувань забезпечувало повне охоплення ВАС-послідовності, що дорівнює 5×. Гепи між контигами закривали праймерною прогулянкою або з використанням підходу комбінаторної ПЛР. Нарешті, цю послідовність редагували при якості Phred 40 (1 помилка на кожні

10000нт) мануальним обстеженням збирання з використанням редактора Gap4-contig editor і повторно секвенували всі райони низької якості. Повна послідовність інсерту BAC SPB4 складалася з 77283 нуклеотидів.

Аналіз безперервної послідовності BAC SPB4 з використанням комп'ютерної програми. GENSCAN (Burge and Karlin, 1997 J. Mol. Biol. 268, 78-94), GENEMARK (Lukashin and Borodovsky, 1998 NAR 26, 1107-1115) і BLASTX (Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 215, 403-410) ідентифікував чотири повні кандидатні послідовності генів R (RGC1-blb, RGC2-blb, RGC3-blb і RGC4-blb), що належать до класу NBS-LRR генів R рослин. Маркер CAPS, сконструйований між RGC1-blb і RGC4-blb, маркер RGC4-blb, виявив рекомбінацію між стійкістю до *P. infestans* і RGC1-4, що виключає можливість того, що RGC4-blb є Rpi-blb (Fig.3A і B). Незважаючи на це відкриття, всі чотири RGC були відібрані для аналізу на комплементарність.

Приклад 5: Аналіз на комплементарність

Субклонування кандидатних генів і трансформації в *Agrobacterium tumefaciens*

Геномні фрагменти приблизно 10т.п.н., що несуть RGC1-blb, RGC2-blb, RGC3-blb або RGC4-blb, субклонували з BAC-клону SPB4 в бінарний трансформуючий вектор pBINPLUS (van Engelen et al., 1995 Trans. Res. 4, 288-290) і подальший відбір по розміру проводили таким чином. Аліквоти ~ 1мкг ДНК розщеплювали 1Е, 0,1Е або 0,01Е рестриктази SauBAI протягом 30 хвилин. Цю частково розщеплену BAC-ДНК піддавали СНЕФ-електрофорезу при 4°C в 0,5×TBE з використанням часу імпульсу 1-10 секунд, що лінійно збільшується, і сили поля 6 В/см протягом 16 годин. Після електрофорезу агарозний гель забарвлювали бромідом етидію для локалізації району гелю, що містить ДНК-фрагменти з розміром приблизно 10т.п.н. Цей район вирізали з гелю з використанням покривного скла і діалізували проти 50мл ТЕ протягом 2 годин при 4°C. Потім діалізовані зрізи агарози переносили в пробірку Елендорфа на 1,5мл, розплавляли при 70°C протягом 5 хвилин і розщеплювали 1 одиницею GELASE (Epicentre Technologies, USA) на 100мг агарозного гелю протягом 1 години при 45°C. Лігування відібраної по розміру ДНК з розщепленої BamHI і дефосфорильованою плазмідною pBINPLUS і подальшу трансформацію ElectroMAX компетентних клітин *E. coli* DH10B (Life Technologies, UK) цієї, лігваної ДНК проводили, як описано в прикладі 5, з використанням для електропорації BioRad Gene Pulser. Клітини висівали розподілом на чашках з агаром на бульйоні Лурия-Бертані (LB), що містить канаміцин (50мкг/мл), Xgal (64мкг/мл) і IPTG (32мкг/мл). Чашки інкубували при 37°C протягом 24 годин. Окремі білі колонії вирощували в 96-ямкових планшетах (100мкл LB-середовища, що містить 50мкг/мл канаміцину). У цілому 480 клонів піддавали ПЛР-скринінгу на присутність RGC з використанням праймерів SPB42LF і SPB42LR або RGC4F і RGC4R (таблиця 2). Позитивні клони відбирали для виділення плазмід і додаткової характеристики. Ідентифікацію клонів, що несуть RGC1-blb, RGC2-blb, RGC3-blb або RGC4-blb, проводили секвенуванням ПЛР-фрагментів SPB42L, отриманих з позитивних клонів. Відносно положення цих RGC в субклоні визначали секвенуванням кінців цього клону і подальшим порівнянням цих послідовностей з повною послідовністю BAC-інсерту. Зрештою відібрали чотири бінарних плазмиди, pRGC1-blb, pRGC2-blb, pRGC3-blb і pRGC4-blb і їх переносили в штами *Agrobacterium tumefaciens* AGLO (Lazo et al., 1991 Bio/Technology 9, 963-967), LBA4404 (Hoekema et al., 1983 Nature 303: 179-180) або UIA143 (Farrand et al., 1989 J. of Bacteriology 171, 5314-5321) або електропорацією з використанням BioRad Gene Pulser, або кон'югацією. Установки на BioRad Gene Pulser були такими, як ті, що рекомендуються для *A. tumefaciens* виробником. Кон'югацію проводили, як описано Simon et al. (1983 Bio/Tech. 1, 784-791). Клітини розподіляли на чашках з агаром на бульйоні Лурия-Бертані (LB), що містить канаміцин (100мг/л) і рифампіцин (50мг/л).

Чашки інкубували при 28°C протягом 48 годин. Культури невеликого масштабу з відібраних колоній вирощували в середовищі LB, що містить канаміцин (100мг/л) і рифампіцин (50мг/л). Плазмідну ДНК виділяли, як описано вище, і цілісність плазмід підтверджували рестрикційним аналізом після повторного виділення з *A. tumefaciens* і подальшої трансформації в *E. coli*. Культури *A. tumefaciens*, що несуть плазмиду з правильним розподілом ДНК, використали для трансформації чутливого генотипу картоплі.

Трансформація чутливого сорту картоплі

Штами *A. tumefaciens* вирощували протягом 2 днів при 28°C в 20мл LB-середовища, доповненого 50мг/л рифампіцину і 25мг/л канаміцину. Потім, 0,2мл культури *A. tumefaciens* розбавляли в 10мл LB-середовища, що містить ті ж самі антибіотики, і вирощували протягом ночі (28°C). Нічну культуру центрифугували (30 хвилин, 2647×g) і осад ресуспендували в 50мл MS-середовища (Murashige and Skoog, 1962 Physiol. Plant. 15, 473-497), доповненого 30г/л сахарози (MS30).

Сертифіковану насінневу картоплю сорту Impala очищали і поверхню стерилізували протягом 30 хвилин в 1% розчині гіпохлориту натрію, що містить 0,1% Твін-20. Потім бульби промивали інтенсивно великими об'ємами стерильної дистильованої води (4 рази, 10 хвилин). Диски з товщиною приблизно 2мм і діаметром 7мм нарізували з циліндрів тканини бульб, отриманих з використанням свердла для пробок. Диски бульб переносили в рідке середовище MS30, що містить *A. tumefaciens*, і інкубували протягом 15 хвилин. Після видалення розчину *A. tumefaciens* диски бульб переносили на регенераційне середовище, що містить MS30, 0,9% мг/л IAA, 3,6мг/л зеатинрибозиду і 8г/л агару (Hoekema et al., 1989 Bio/Technology 7, 273-278). Чашки інкубували при 24°C, при довжині дня 16 годин (Philips TLD50W/84HF). Після 48 годин співкультивування диски бульб промивали протягом 5 хвилин в рідкому середовищі MS30, що містить антибіотики, 200мг/л ванкоміцину, 250мг/л цефотаксиму і 75мг/л канаміцину, і переносили на регенераційне середовище, доповнене тими ж самими антибіотиками. Чашки інкубували при 24°C, при довжині дня 16 годин (Philips TLD50W/84HF). Кожні три тижні диски бульб переносили на свіже середовище. Укорінені проростки розмножували *in vitro* і тестували на відсутність клітин *A. tumefaciens* інкубуванням зрізу стебла в 3мл LB-середовища (3 тижні, 37°C, 400об./хв.). Одну рослину кожного трансформованого регенеранту переносили в оранжерею.

Комплементарність чутливого фенотипу в картоплі

Первинні трансформанти випробовували на стійкість до *P. infestans*, як описано в прикладі 1. Тільки генетична конструкція, що несе RGC2-blb, була здатна комплементувати чутливий фенотип; 15 з 18 утримуючих RGC2-blb первинних трансформантів були стійкими (таблиця 3), тоді як всі утримуючі RGC1-blb,

RGC3-blb і RGC4-blb первинні трансформанти були повністю чутливими до *P. infestans*. Стійкі трансформанти RGC2-blb показали схожі фенотипи стійкості з стійким батьком *S. bulbocastanum* (Фіг.5). Таким чином, RGC2-blb був названий геном Rpi-blb, ДНК-послідовність якого подана на Фіг.6.

Трансформація чутливого томата

Насіння чутливої лінії томата Moneymaker промивали в 70% етанолі до розчинення оболонки насіння і промивали стерильною водою. Потім це насіння поверхнево стерилізували в 1,5% гіпохлориті натрію протягом 15 хвилин, промивали три рази в стерильній воді і вміщували в контейнери, що містять 140мл MS-середовища pH 6,0 (Murashige and Skoog, 1962 Physiol. Plant. 15, 473-497), доповненого 10г/л сахарози (MS 10) і 160мл вермикуліту. Насіння залишали для проростання на 8 днів при 25°C і освітленні 0,5В/м².

Восьмиденні експлантати сім'ядолей заздалегідь культивували протягом 24 годин в чашках Петрі, що містять двотижневі шари-фідери клітин суспензії тютюну, посіяних на середовища для співкультивування (MS30 pH 5,8, доповнену вітамінами Nitsch (Duchefa Biochemie BV, Haarlem, The Netherlands), 0,5г/л MES-буфера і 8г/л агару Daichin).

Нічні культури *A. tumefaciens* центрифугували і осад ресуспендували в середовищі для суспензії клітин (MS30 pH 5,8, доповненої вітамінами Nitsch, 0,5г/л MES-буфера, pH 5,8), що містить 200мкМ ацетосирингон до кінцевої O.D.₆₀₀ 0,25. Потім ці експлантати інфікували розбавленою нічною культурою штаму *A. tumefaciens* UIA143 (Farrand et al., 1989 J. of Bacteriology 171, 5314-5321), утримуючого хелперну плазмиду pCH32 (Hamilton et al., 1996 PNAS 93, 9975-9979) і pRGC2-blb, протягом 25 хвилин, блотували (промокали) досуха на стерильному фільтрувальному папері і співкультивували протягом 48 годин на початкових чашках з шарами-фідерами. Умови культивування були такими, як описані вище.

Після співкультивування експлантати сім'ядолей переносили на чашки Петрі з селективним індукуючим паростки середовищем (MS30 pH 5,8, доповненим 10г/л глюкози, що включає в себе вітаміни Nitsch, 0,5г/л MES-буфера, 5г/л агарового гелю, 2мг/л зеатинрибозиду, 400мг/л карбеніциліну, 100мг/л канаміцину, 0,1мг/л IAA) і культивували при 25°C з освітленням 3-5В/м². Експлантати субкультивували кожні 3 тижні на свіжому середовищі. Паростки, що з'являються, вирізали з лежачого нижче калусу і переносили в контейнери з селективним індукуючим коріння середовищем (MS 10 pH 5,8, доповненого вітамінами Nitsch, 0,5г/л MES-буфера, 5г/л агарового гелю, 0,25мг/л IBA, 200мг/л карбеніциліну і 100мг/л канаміцину).

Комплементация чутливого фенотипу в томаті

Для дослідження, чи може Rpi-blb комплементувати чутливий фенотип в томаті, первинні трансформанти Moneymaker, що несуть конструкцію гена Rpi-blb, спочатку заражали отриманими з картоплі ізолятами *P. infestans* IP0655-2A і IP0428. Сім з дев'яти первинних трансформантів були стійкими (таблиця 3). У зв'язку з спостереженням, що перевірені ізоляти *P. infestans* картоплі були менш вірулентні на томаті, ніж на картоплі, ці первинні трансформанти випробовували також з використанням ізоляту *P. infestans*, зібраного з чутливих рослин томата присадібного саду. Навіть хоч цей ізолят був значно більш вірулентний на Moneymaker, ніж перевірені раніше ізоляти, всі 7 первинних трансформантів залишалися стійкими. Ці результати ілюструють потенційну ефективність гена Rpi-blb не тільки проти комплексних ізолятів, отриманих з картоплі, але також проти ізолятів, спеціалізованих відносно томата.

Молекулярний аналіз первинних трансформантів

ОТ-ПЛР-аналіз

Для отримання кДНК суміш з 19мкл, що містить 1мкг тотальної або поліА-РНК, 0,25мМ кожні з dNTP, 50мМ Трис-НСІ pH 8,3, 75мМ KCl, 3мМ MgCl₂, 10мМ ДТТ і 530нг оліго d(T)-праймера, GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG (T)₁₈, денатурували (1хв. 83°C). Потім цю суміш вміщували при 42°C і додавали 1мкл зворотної транскриптази (М-MLV, Promega Benelux b.v., Leiden, The Netherlands). Через 60 хвилин суміш нагрівали протягом 1 хвилини при 99°C і переносили на лід. 2мкл кДНК використали для стандартної ПЛР.

Швидка ампліфікація кінців кДНК

5'- і 3'-кінці кДНК Rpi-blb визначали швидкою ампліфікацією кінців кДНК (RACE) з використанням набору GeneRacer™ (Invitrogen™, The Netherlands). 3'-RACE проводили з праймерами GSP1 (5'-GAGGAATCCATCTCCCAGAG) і GSP2 (5'-GTGCTTGAAGAGATGATAATTACAGAG) в комбінації з 3'-праймером GeneRacer™ і 3'-вмонтованим праймером GeneRacer™. 5'- RACE проводили на кДНК, синтезований з праймером GSP3 (5'-GTCCATCTCACCAAGTAGTGG), з використанням праймерів GSP4 (5'-GAAATGCTCAGTAACCTCTCTGG) і GSP5 (5'-GGAGGACTGAAAGGTGTTGG) в комбінації з 5'-праймером GeneRacer™ і 5'-вмонтованим праймером GeneRacer™ (Фіг.7).

Приклад 6: Структура гена Rpi-blb і відповідного білка

Розмір і структуру гена Rpi-blb визначали порівнянням геномних послідовностей, отриманих з інсера pRGC2-blb, з кДНК-фрагментами, отриманими 5'- і 3'-швидкою ампліфікацією кінців кДНК. RACE ідентифікувала 5'-і 3'-Rpi-blb-специфічні кДНК-фрагменти єдиного виду, відповідно, що передбачає, що цей геномний клон кодує єдиний Rpi-blb-специфічний транскрипт. Кодуюча послідовність транскрипту Rpi-blb рівна 2913 нуклеотидів. Приблизно визначено, що можливий Rpi-blb-транскрипт має 3138 нуклеотидів (нт) і містить 5'- і 3'-нетрансльований район (UTR) довжиною 44 і 181нт, відповідно. Ген Rpi-blb містить єдиний інтрон 678нт, що починається при 428нт після стартового кодона трансляції АТС цього гена (Фіг.3С).

Розшифрована відкрита рамка зчитування гена Rpi-blb кодує передбачений поліпептид з 970 амінокислот з молекулярною масою, що приблизно оцінюється 110,3кД (Фіг.8). Декілька функціональних мотивів, присутніх в генах R класу NBS-LRR генів R рослин, є очевидними в цьому білку, що кодується, які можуть бути поділені на 3 домени (A, B і C; Фіг.8). N-кінцева частина цього білка містить потенційні скручені спіральні домени, гептадні повтори, в яких перший і четвертий залишки є звичайно гідрофобними (домен A). Домен B несе NBS і інші мотиви, які складають домен NB-ARC (ARC означає Araf-1, R-білок, і CED-4) білків R і регуляторів смерті клітин в тваринах (van der Biezen and Jones, 1998). Цей домен включає в себе мотиви Ар-АТФази, присутні в білках еукаріотичного і прокаріотичного походження (Aravind et al., 1999 Trends Biochem. Sci. 24, 47-53). C-кінцева половина Rpi-blb містить групу з 19-20 нерівномірних LRR (домен C). Ці LRR можуть бути вистроєні

відповідно до консенсусної послідовності LxxLxxLxxC/N/SxxLxxLPxxa, де x означає будь-який залишок, а "a" означає положення аліфатичних амінокислот, з подальшим районом довжини, що варіюється. Цей формат повторів наближається до консенсусу для цитоплазматичних LRR (Jones and Jones, 1997 Adv. Bot. Res. 24, 89-167).

Приклад 7: Природні гомологи і синтетичні варіанти гена ГЕНА Rpi-blb

Природні гомологи

Пошуки гомології з використанням алгоритму BLASTN з кодуючою ДНК-послідовністю гена Rpi-blb ідентифікували ряд послідовностей зі значною гомологією відносно коротких сегментів гена Rpi-blb (Фіг.9C). Нуклеотиди 549-1245 кодуючої послідовності гена Rpi-blb мають 81-90% ідентичність послідовності з частковими NBS-фрагментами з томата (наприклад, Q194, Q137, Q198 і Q199; (Pan et al., 2000 Genetics, 155: 309-22). Ці гомологічні послідовності варіюються по їх довжині між 525 і 708 нуклеотидами і є ПЛР-фрагментами, які були ідентифіковані системним скануванням геному томата з використанням (вироджених) пар праймерів на основі повсюдних NBS-мотивів (Pan et al., 2000 Genetics, 155: 309-22; Leister et al., 1996 Nat Genet. 14: 421-429). Інший район гена Rpi-blb, який має значну гомологію з послідовністю існуючого рівня знань, містить нуклеотиди 76-805 цієї кодуючої послідовності. Ця послідовність довжиною 729 нт має 91% ідентичність послідовності з EST з картоплі (номер по каталогу надходжень бази даних EMBL BG890602; Фіг.9C). Послідовність гена Rpi-blb праворуч від нуклеотиду 1245, що містить район LRR, не має значущої гомології з жодною з штучних послідовностей. Пошуки гомології BLASTX з кодуючою послідовністю гена Rpi-blb виявили, що гомологія амінокислотної послідовності з різними штучними генами не перевищує 36% ідентичності послідовності (таблиця 4). Найкраща оцінка BLASTX була отримана з геном NBS-LRR, отриманим з *Oryza sativa* (36,5% ідентичність амінокислотної послідовності). Гени NBS-LRR, що мають спільну гомологію послідовності (27-36% ідентичність амінокислотної послідовності) з Rpi-blb, можуть бути виявлені, серед інших, в *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris*, *Lycopersicon esculentum* (кластер генів 12 Fusarium; Ori et al., 1997 Plant Cell, 9, 521-532; Simons et al., 1998 Plant Cell 10, 1055-1068), *Zea mays*, *Hordeum vulgare* і *Lactuca sativa*. Філогенетичні дослідження розшифрованих амінокислотних послідовностей Rpi-blb, RGC1-blb, RGC3-blb, RGC4-blb і послідовностей гомологічних генів існуючого рівня знань (визначених BLASTX), отриманих з відмінних видів, з використанням способу Neighbour-Joining Saitou and Nei (1987 Molecular Biology and Evolution 4, 406-425), показують, що члени кластера генів Rpi-blb можуть бути вміщені в окрему гілку (Фіг.9).

Порівняння послідовностей чотирьох RGC кластера генів Rpi-blb, ідентифікованих на ВАС-клоні 8005-8 SPB-4, показують, що гомологія послідовностей в кластері генів Rpi-blb варіюється між 70% і 81% на рівні послідовностей амінокислот. Розшифрована амінокислотна послідовність Rpi-blb має найвищу загальну гомологію з RGC3-blb (81% ідентичність амінокислотної послідовності; таблиця 4). При порівнянні різних доменів ясно, що N-кінцеві половини цих білків (домени скручених спіралей і NB-ARC), мають більш високу міру гомології (91% ідентичність амінокислотної послідовності), ніж C-кінцеві половини цих білків (LRR; 71% ідентичність амінокислотної послідовності). Текінець білків NBS-LRR впливає на вимогу сигнальних компонентів, що знаходяться праворуч (нижче по ходу транскрипції), і, отже, вважається, що він є можливим ефекторним доменом (Feys and Parker, 2000 Trends Genet 16:449-55). C-кінцевий LRR-район бере участь, відповідно до генетичних досліджень, в специфічності впізнання еліситору (Ellis et al., 2000 Trends Plant Sci. 5:373-379; Dodds et al., 2001 Plant Cell 13:163-78).

Порівняння всіх чотирьох амінокислотних послідовностей виявило в цілому 104 Rpi-blb-специфічних амінокислотних залишків (Фіг.10A). Більшість з них локалізовані в LRR-районі (80/104). У цьому останньому районі ці специфічні залишки сконцентровані в LRR-субдомени xLxLxxxx. Відносна частота цих специфічних амінокислотних залишків в цьому LRR-субдомени є більш ніж в 2 рази більш високою (28,3%), ніж частота, що спостерігається в іншій частині LRR-домену (12,3%). Вважається, що залишки, розташовані біля цих двох консервативних залишків лейцину в консенсусі xLxLxxxx, експоновані (оголені) розчинником і, отже, беруть участь, мабуть, в створенні/підтримці специфічності пізнання цього білка стійкості.

Послідовності додаткових гомологів гена Rpi-blb можуть бути отримані скринінгом бібліотек геномної ДНК або інсертів, наприклад, ВАС-бібліотек, праймерами на основі сигнатурних послідовностей гена Rpi-blb. Скринінг різних ВАС-бібліотек *Solanum* наборами праймерів A і/або B (таблиця 2 і Фіг.7) ідентифікував інші гомологи Rpi-blb, отримані з різних видів *S. bulbocastanum* (B149-blb), *S. tuberosum* (SH10-tub і SH20-tub) і *S. tarijense* (T118-tar). Порівняння всіх 8 білкових послідовностей зменшує число специфічних амінокислотних залишків Rpi-blb до 51 (51/970; 5,25%) (Фіг.10B). Більшість з них локалізовані в LRR-районі (42/51; 82%). Відносна частота цих специфічних амінокислотних залишків в субдомени LRR xLxLxxxx в 3,3 рази вище, ніж частота, що спостерігається в іншому домені LRR (18,8% проти 5,7%, відповідно). Ці дані ясно передбачають, що еволюція специфічності стійкості до *P. infestans* в кластері генів Rpi-blb відбувається в основному за допомогою зміщень в LRR-специфічних залишках Rpi-blb.

Включення цих додаткових гомологів Rpi-blb в описані вище аналізи філогенетичного дерева, з використанням способу Neighbour-Joining Saitou and Nei (1987 Molecular Biology and Evolution 4, 406-425), додатково виправдовує аналіз філогенетичного дерева як спосіб для визначення гомологічних послідовностей Rpi-blb (Фіг.9B). Будь-який функціональний продукт R-гена, який має щонайменше 70% ідентичність послідовності на рівні амінокислот, буде попадати в ту ж саму гілку, що і генні продукти кластера генів Rpi-blb, і, отже, може бути визначений як гомолог Rpi-blb.

Синтетичні варіанти

Для визначення ролі різних послідовностей в стійкості до *P. infestans* можуть проводитися обміни доменами між різними гомологами. Наприклад, рестриктаза NsiI, яка впізнає ДНК-послідовність ATGCAT, присутню в консервативному мотиві MHD, може бути використана для обміну повного LRR-домену Rpi-blb з доменом RGC1-blb або RGC3-blb з використанням способів, відомих фахівцям з кваліфікацією в даній галузі. Отримували химерні варіанти гена Rpi-blb, які кодуєть N-кінцеву половину Rpi-blb і C-кінцеву половину RGC1-blb або RGC3-blb і навпаки, тобто N-кінцеву половину RGC1-blb або RGC3-blb і C-кінцеву половину Rpi-blb (фіг. 11). Ці варіанти трансформували в чутливий генотип картоплі Impala і випробовували на стійкість до *P.*

infestans. Химерні гени RGC3-blb, що містять LRR-домен Rpi-blb, були стійкими до *P. infestans*, що свідчить про те, що специфічність гена Rpi-blb кодується цією частиною даного гена.

Таблиця 1

Огляд чутливості до *P. infestans* в різних надходженнях *S. bulbocastanum*

Надходження <i>S. bulbocastanum</i>			Число рослин	Число R	Число V	5% чутливості	Кластер ^a
CGN	BGRC	PI					
17692	8005	275193	11	10	1	9	A
	8006	275194	16	15	1	6	A
17693	8008	275198	19	18		0	B
17687	7997	243505	35	25	4	14	B
17688	7999	255518	19	19	0	0	C

^a Літери A, B і C представляють відносне географічне походження, зображене на Фіг. 1

Таблиця 2

Огляд маркерів, що використовуються для картування Rpi-blb

Маркер	Орі ^a	Послідовність ¹³	Температура Рестрик-відпалу (°C) таза	
TG513	F	CGTAAACGCACCAAAAGCAG	58	a.s. ^c
	R	GATTCAAGCCAGGAACCGAG		
TG330	F	CAGCTGCCACAGCTCAAGC	56	TaqI
	R	TACCTACATGTACAGTACTGC		
CT88	F	GGCAGAAGAGCTAGGAAGAG	57	Mbol
	R	ATGGCGTGATACAATCCGAG		
	F	TTCAAGAGCTTGAAGACATAACA	60	a.s.
	R	ATGGCGTGATACAATCCGAG		
CT64	F	ACTAGAGGATAGATTCTTGG	56	CfoI
	R	CTGGATGCCTTTCTCTATGT		
B139R	F	GATCAGAAAGTGCCTTGAACC	56	TaqI
	R	CAAGGAGCTTGGTCAGCAG		
SPB33L	F	ATTGCACAGGAGCAGATCTG	59	HinfI
	R	TGTAAGAGAGCAAGAGGCAC		
SPB42L	F	AGAGCAGTCTTGAAGGTTGG	58	CfoI
	R	GATGGTAACTAAGCCTCAGG		
B149R	F	GACAGATTTCTCATAAACCTGC	58	MseI/XbaI
	R	AATCGTGCACTACTAGAGCG		
RGC1-4	F	TGTGGAGTAAGAGAGGAAGG	62	SspI/MseI
	R	TCAGCTGAGCAGTGTGTGG		
A	F	ATGGCTGAAGCTTTTCATTCAAGTTCTG	60	
	R	TCACACCGCTTGATCAGTTGTGGAC		
Y	F	TRCATGAYCTMATCCATGATTTGC	60	
	R	GMAATTTGTGCCAGTCTTCTCC		

^a Орієнтація праймера, F: прямий, R: зворотний

^b послідовності праймерів відповідно до IUB-кодів

^c a.s.: алельспецифічний

Таблиця 3

Комплементация чутливості до фітофторозу в картоплі і томаті

Генотип ^a	RGA-вмісні рослини/трансформанти	R-рослини/RGA-вмісні рослини
IMP(RGC1-blb)	15/17 ^b	0/15
	8/9 ^d	0/8
IMP(RGC2-blb)	6/31 ^e	6/6
	12/14 ^d	9/12
IMP(RGC3-blb)	0/6 ^c	-
	5/5 ^d	0/5
IMP(RGC4-blb)	18/19 ^b	0/18
	1/12 ^c	0/1

IMP (вектор)	8/8 ^b 9/10 ^d	0/8 0/9
MM(RGC2-blb)	9/11 ^d	7/9

^a Первинні трансформанти, отримані з трансформації чутливих генотипів картоплі і томата, Impala (IMP) і Moneymaker (MM), відповідно, конструкціями Т-ДНК, що містять кандидати генів Rpi-blb RGC1-blb, RGC2-blb, RGC3-blb або RGC4-blb. Для трансформації використали штами *Agrobacterium tumefaciens* AGL0^b, LBA4404^c або UIA143^d. Стійкість випробовували в аналізах на відділеному листі з використанням комплексних ізолятів IP0655-2A і IP0428-2

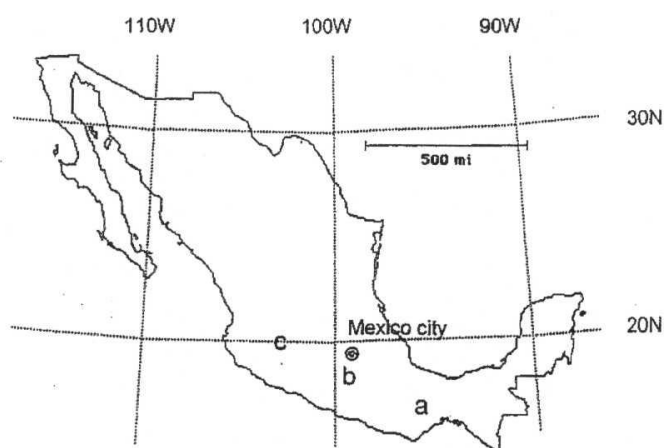
Таблиця 4

Порівняння гомології нуклеотидних і амінокислотних послідовностей

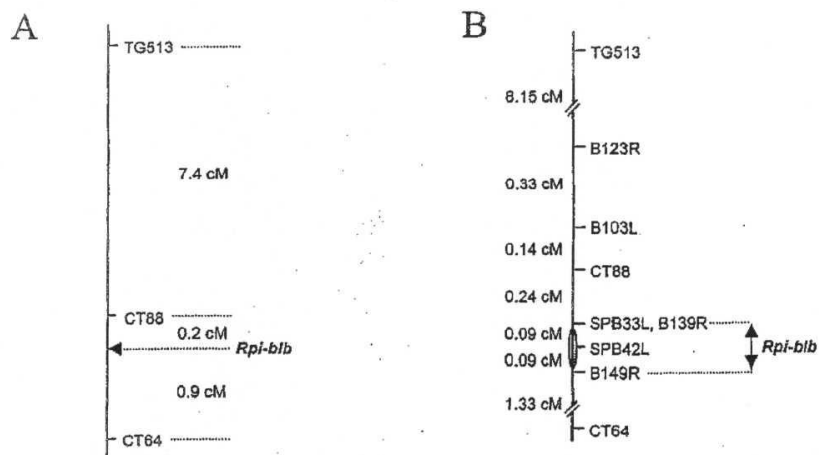
		8005-8 BAC SPB4			RGC рису	Arabidopsis RGC	I2C-1 томата
		RGC3-blb	RGC1-blb	RGC4-blb			
Rpi-blb	нт ^a	88	84	81	-	-	-
	aa ^a	81	76	70	36	32	32
		N ^b 91 C ^b 71	N 79 C 72	N 75 C 66			

^a Процентна ідентичність нуклеотидної (нт) і амінокислотної (aa) послідовностей.

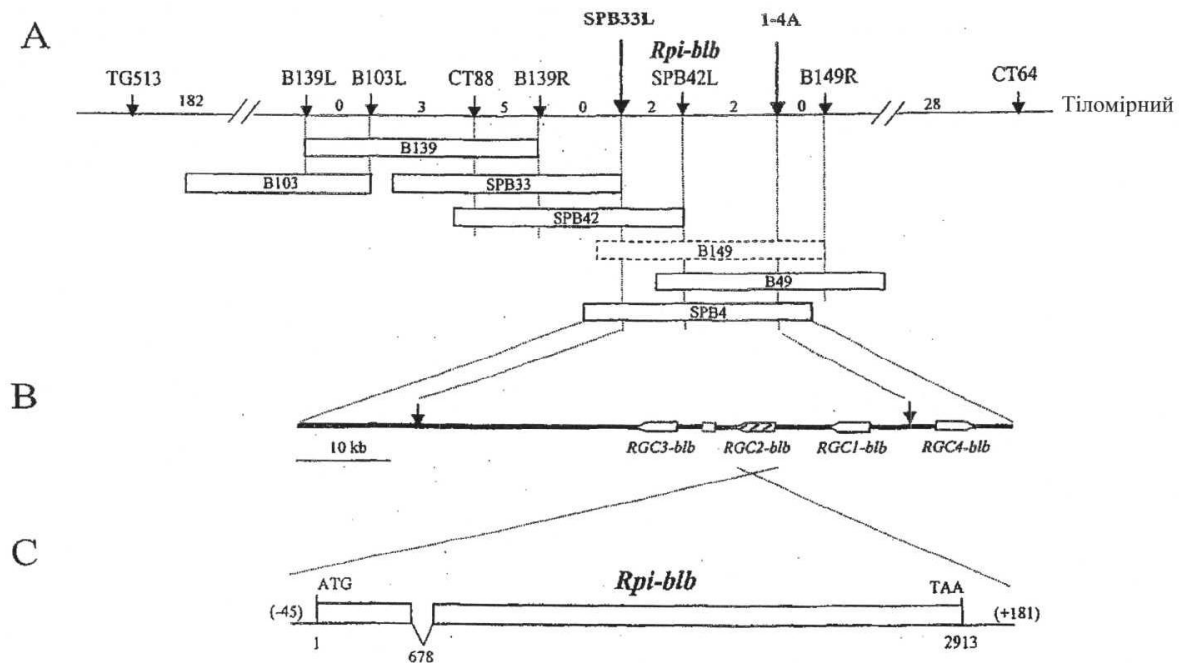
^b Окремі порівняння виконували для N-кінцевої (N) і C-кінцевої (C) половин білкових послідовностей. Межею між цими двома половинами є консервативний сайт рестрикції NsiI в ДНК-послідовності (положення 1417 кодує послідовності гена Rpi-blb)



Фіг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

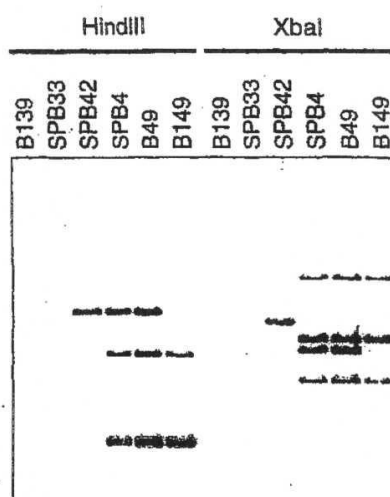


Fig. 4

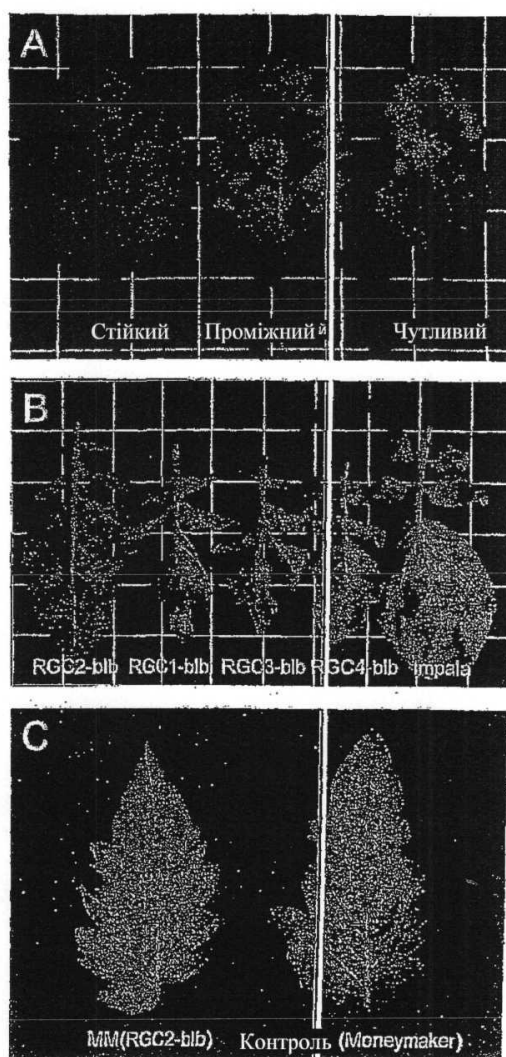


Fig. 5

1 ATGGCTGAAGCTTTCATTCAAGTTCTGCTAGACAATCTCACTTCTTTCCT
51 CAAAGGGGAAGTTGTATTGCTTTTCGGTTTTCAAGATGAGTTCCAAAGGC
101 TTTCAAGCATGTTTTCTACAATTCAAGCCGTCCTTGAAGATGCTCAGGAG
151 AAGCAACTCAACAACAAGCCTCTAGAAAATTGGTTGCAAAAAGTCAATGC
201 TGCTACATATGAAGTCGATGACATCTTGGATGAATATAAAACCAAGGCCA
251 CAAGATTCTCCAGTCTGAATATGGCCGTTATCATCCAAAGGTTATCCCT
301 TTCGTCACAAGGTCGGGAAAAGGATGGACCAAGTATGAAAAAGTAAA
351 GGCAATTGCTGAGGAAAGAAAGAAATTTTCATTGTCACGAAAAAATTGTAG
401 AGAGACAAGCTGTTAGACGGGAAACAGGTTCTGTATTAACCGAACCGCAG
451 GTTTATGGAAGAGACAAAGAGAAAGATGAGATAGTGAATCCTAATAAA
501 CAATGTTAGTATGATGCCCCAACCTTTCAGTCTCCCAATACTTGGTATGG
551 GGGGATTAGGAAAAACGACTCTTGCCCAAATGGTCTTCAATGACCAGAGA
601 GTTACTGAGCATTTCCATTCCAAAATATGGATTTGTGTCTCGGAAGATT
651 TGATGAGAAGAGGTTAATAAAGGCAATTGTAGAATCTATTGAAGGAAGGC
701 CACTACTTGGTGAGATGGACTTGGCTCCACTTCAAAGAAGCTTCAGGAG
751 TTGCTGAATGGAAAAAGATACTTGCTTGTCTTAGATGATGTTTGAATGA
801 AGATCAACAGAAGTGGGCTAATTTAAGAGCAGTCTTGAAGGTTGGAGCAA
851 GTGGTGCTTCTGTTCTAACCCTACTCGTCTTGAAAAGGTTGGATCAATT
901 ATGGGAACATTGCAACCATATGAACTGTCAAATCTGTCTCAAGAAGATTG
951 TTGTTGTTGTTTCATGCAACGTGCATTTGGACACCAAGAAGAAATAAATC
1001 CAAACCTTGTGGCAATCGGAAAGGAGATTGTGAAAAAAGTGGTGGTGTG

Фиг. 6А

1051 CCTCTAGCAGCCAAAACCTCTTGAGGTATTTTGTGCTTCAAGAGAGAAGA
1101 AAGAGCATGGGAACATGTGAGAGACAGTCCGATTGGAATTGCCTCAAG
1151 ATGAAAGTTCTATTCTGCCTGCCCTGAGGCTTAGTTACCATCAACTTCCA
1201 CTTGATTTGAAACAATGCTTTGCGTATTGTGCGGTGTTCCCAAAGGATGC
1251 CAAAATGGAAGAAAGAAAGCTAATCTCTCTCTGGATGGCGCATGGTTTTTC
1301 TTTTATCAAAGGAAACATGGAGCTAGAGGATGTGGCGATGAAGTATGG
1351 AAAGAATTATACTTGAGGTCTTTTTTCCAAGAGATTGAAGTTAAAGATGG
1401 TAAACTTATTTCAAGATGCATGATCTCATCCATGATTTGGCAACATCTC
1451 TGTTTTCAGCAAACACATCAAGCAGCAATATCCGTGAAATAAATAAACAC
1501 AGTTACACACATATGATGTCCATTGGTTTCGCCGAAGTGGTGTTTTTTTA
1551 CACTCTTCCCCCTTGGAAGTTTATCTCGTTAAGAGTGCTTAATCTAG
1601 GTGATTCGACATTTAATAAGTTACCATCTCCATTGGAGATCTAGTACAT
1651 TTAAGATACTTGAACCTGTATGGCAGTGGCATGCGTAGTCTTCCAAAGCA
1701 GTTATGCAAGCTTCAAATCTGCAAACCTTGATCTACAATATTGCACCA
1751 AGCTTTGTGTTTGCCAAAAGAAACAAGTAACTTGGTAGTCTCCGAAAT
1801 CTTTTACTTGATGGTAGCCAGTCATTGACTTGTATGCCACCAAGGATAGG
1851 ATCATTGACATGCCCTTAAGACTCTAGGTCAATTTGTGTTGGAAGGAAGA
1901 AAGGTTATCAACTTGGTGAAGTAGGAAACCTAAATCTCTATGGCTCAATT
1951 AAAATCTCGCATCTTGAGAGAGTGAAGAATGATAAGGACGCAAAAGAAGC
2001 CAATTTATCTGCAAAAGGGAATCTGCATTCTTTAAGCATGAGTTGGAATA
2051 ACTTTGGACCACATATATATGAATCAGAAGAAGTTAAAGTGCTTGAAGCC
2101 CTCAAACCACACTCCAATCTGACTTCTTTAAAATCTATGGCTTCAGAGG
2151 AATCCATCTCCCAGAGTGGATGAATCACTCAGTATTGAAAAATATTGTCT
2201 CTATTCTAATTAGCAACTTCAGAAACTGCTCATGCTTACCACCCTTTGGT
2251 GATCTGCCTTGTCTAGAAAGTCTAGAGTTACACTGGGGGTCTGCGGATGT
2301 GGAGTATGTTGAAGAAGTGGATATTGATGTTCAATCTGGATTCCCCACAA
2351 GAATAAGGTTTCCATCCTTGAGGAACTTGATATATGGGACTTTGGTAGT
2401 CTGAAAGGATTGCTGAAAAAGGAAGGAGAAGAGCAATTCCTGTGCTTGA
2451 AGAGATGATAATTACAGAGTGCCCTTTTCTGACCCTTTCTTCTAATCTTA
2501 GGGCTCTTACTTCCCTCAGAATTTGCTATAATAAAGTAGCTACTTCATTC
2551 CCAGAAGAGATGTTCAAAAACCTTGCAAATCTCAAATACTTGACAATCTC
2601 TCGGTGCAATAATCTCAAAGAGCTGCCTACCAGCTTGGCTAGTCTGAATG
2651 CTTTGAAAAGTCTAAAAATCAATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCT
2701 GAGGAAGGGCTGGAAGGTTTATCTTCACTCACAGAGTTATTTGTTGAACA
2751 CTGTAACATGCTAAAATGTTTACCAGAGGGATTGCAGCACCTAACCAACC
2801 TCACAAGTTTAAAAATCGGGGATGTCCACAAGTCAAGCGGTGTGAG
2851 AAGGGAATAGGAGAAGACTGGCACAAAATTTCTCACATTCCCTAATGTGAA
2901 TATATATATTTAA

1 ATGGCTGAAGCTTTCATTCAAGTTCTGCTAGACAATCTCACTTCTTTTCCT
51 CAAAGGGGAAC TTGTATTGCTTTTCGGTTTTCAAGATGAGTTCCAAAGGC
101 TTTCAAGCATGTTTTCTACAATTCAAGCCGCTCTGAAGATGCTCAGGAG
151 AAGCAACTCAACAACAAGCCTCTAGAAAATTGGTTGCAAAACTCAATGC
201 TGCTACATATGAAGTCGATGACATCTTGGATGAATATAAAACCAAGGCCA
251 CAAGATTCTCCAGTCTGAATATGGCCGTTATCATCCAAAGGTTATCCCT
301 TTCCGTCACAAGGTCGGGAAAAGGATGGACCAAGTGATGAAAAACTAAA
351 GGCAATTGCTGAGGAAAGAAAGAATTTTCATTTCACGAAAAAATTGTAG
401 AGAGACAAGCTGTAGACGGGAAACAGGTACTCATCTTAAATTAGTATTA
451 CAACAAC TAAGTTTATATTCAATTTTTTGGCAATTATCAAATTCAGAAAA
501 GGGTAAATATACTCATGTCCTATCGTAAATAGTGTATATACCTCTCG
551 TTGTACTTTCGATCTGAATATACTTGTCAAATCTGGCAAGCTCAGAATCA
601 AATTATCCACCCCAACTTTTAAATACTCGATATCTTTAGAAATCCACCTG
651 TCTAACTCATCCACTACCCATTCCCTTTGCTTTGAATTCTTTTCTTTACC
701 TATAA ACTTGGAACTCGATCCGTTTGGCTTTCTTAAACAAAGCAGCTC
751 AGAGAAAAGAGGTTTTCTTCTATTCTGTTTCTCTGTGTGCTGCACTTGGG
801 TCCTTAATCCCATTA AAAACAGGGCATGTTAATCCCAACGACGGTAGCCT
851 TTCCTGACAGCTGACTGTAAATTTTGTCTAACAAGAAAAAAGATTA
901 GACATGTTTTTCTTGTCAATTGATTAGGCTGGATTTCTTTCAGAGTGGAA
951 CATAGGGGATATATTGGACCAAAGTAGAATGGGTATATATTTAAAGTAT
1001 TTCTGATAGAACAGGATATATTGTGCGAAATATCCTCTATTTTCTGTT
1051 GTCTCCTAATGAGTTTGAATGTAATAATATTCTCATGTGGACATTGCTTG
1101 CACCAGTTCTGTATTAAACCGAACCGAGGTTTATGGAAGAGACAAAGAG
1151 AAAGATGAGATAGTGAATCCTAATAACAATGTTAGTGATGCCCAACA
1201 CCTTTCAGTCTCCCAATACTTGGTATGGGGGGATTAGGAAAAACGACTC
1251 TTGCCCCAATGGTCTTCAATGACCAGAGGTTACTGAGCATTTCCATTCC
1301 AAAATATGGATTGTGTCTCGGAAGATTTTGATGAGAAGAGGTTAATAAA
1351 GGCAATTGTAGAATCTATTGAAGGAAGGCCACTACTTGGTGAGATGGACT
1401 TGGCTCCACTTCAAAGAAGCTTCAGGAGTTGCTGAATGAAAAAGATAC

Фиг. 6B

1451 TTGCTTGTCTTAGATGATGTTTGGAAATGAAGATCAACAGAAAGTGGGCTAA
1501 TTTAAGAGCAGTCTTGAAGGTTGGAGCAAGTGGTGCTTCTGTTCTAACCA
1551 CTACTCGTCTTGAAAAGGTTGGATCAATTATGGGAACATTGCAACCATAT
1601 GAACTGTCAAATCTGTCTCAAGAAGATTGTTGGTTGTTGTTTCATGCAACG
1651 TGCATTTGGACACCAAGAAGAAATAAATCCAAACCTTGTGGCAATCGGAA
1701 AGGAGATTGTGAAAAAAGTGGTGGTGTGCCTCTAGCAGCCAAAACCTT
1751 GGAGGTATTTTGTGCTTCAAGAGAGAAGAAAGAGCATGGGAACATGTGAG
1801 AGACAGTCCGATTTGGAAATTGCTCTAAGATGAAAGTTCTATTCTGCCTG
1851 CCCTGAGGCTTAGTTACCATCAACTTCCACTTGATTGTGAAACAATGCTTT
1901 GCSTATTGTGCGGTGTTCCCAAAGGATGCCAAAATGAAAAAGAAAAGCT
1951 AATCTCTCTCTGGATGGCGCATGTTTTCTTTTATCAAAAGGAAACATGG
2001 AGCTAGAGGATGTGGGCGATGAAGTATGGAAGAATTATCTTGAGGTCT
2051 TTTTTCGAAGAGATTGAAGTTAAAGATGGTAAAACCTATTTCGAAGTGCA
2101 TGATCTCATCCATGATTGGCAACATCTCTGTTTTTCAGCAAACACATCAA
2151 GCAGCAATATCCGTGAAATAAATAAACACAGTTACACACATATGATGTCC
2201 ATTGGTTTCGCCGAAGTGGTGTTTTTTACACTCTTCCCCCTTGGAAAA
2251 GTTTATCTCGTTAAGAGTGCTTAATCTAGGTGATTCGACATTTAATAAGT
2301 TACCATCTTCCATTGGAGATCTAGTACATTTAAGATACTTGAACCTGTAT
2351 GGCAGTGGCATGCGTAGTCTTCCAAAGCAGTTATGCAAGCTTCAAATCT
2401 GCAAACCTCTTGATCTACAATATTGCACCAAGCTTTGTTGTTTGCCAAAAG
2451 AAACAAGTAAACTTGGTAGTCTCCGAAATCTTTACTTGATGGTAGCCAG
2501 TCATTGACTTGATATGCCACCAAGGATAGGATCATTGACATGCCTTAAGAC
2551 TCTAGGTCAATTTGTTGTTGGAAGGAAGAAAGGTTATCAACTTGGTGAAC
2601 TAGGAAACCTAAATCTCTATGGCTCAATTAATCTCGCATCTTGAGAGA
2651 GTGAAGAATGATAAGGACGCAAAAGAAGCCAATTTATCTGCAAAAGGGAA
2701 TCTGCATTCTTTAAGCATGAGTTGGAATAACTTTGGACCACATATATATG
2751 AATCAGAAGAAGTTAAGTGCTTGAAGCCCTCAAACCACACTCCAATCTG
2801 ACTTCTTTAAAAATCTATGGCTTCAGAGGAATCCATCTCCAGAGTGGAT
2851 GAATCACTCAGTATTGAAAAATATTGTCTCTATTCTAATTAGCAACTTCA
2901 GAAACTGCTCATGCTTACCACCCTTTGGTGATCTGCCTTGTCTAGAAAGT
2951 CTAGAGTTACACTGGGGGTCTGCGGATGTGGAGTATGTTGAAGAAGTGGAA
3001 TATTGATGTTCAATCTGGATTCCCCACAAGAATAAGGTTTCCATCCTTGA

3051 GGAACCTTGATATATGGGACTTTGGTAGTCTGAAAGGATTGCTGAAAAAG
3101 GAAGGAGAAGAGCAATTCCCTGTGCTTGAAGAGATGATAATTCAGAGTG
3151 CCCTTTTCTGACCCTTTCTTCTAATCTTAGGGCTCTTACTTCCCTCAGAA
3201 TTTGCTATAATAAAGTAGTACTTCTATTCCCAGAAGAGATGTTCAAAAAC
3251 CTTGCAAACTCTCAAACTTGACAATCTCTCGGTGCAATAATCTCAAAGA
3301 GCTGCCTACCAGCTTGGCTAGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTC
3351 AATTGTGTTGCGCACTAGAGAGTCTCCCTGAGGAAGGGCTGGAAGGTTTA
3401 TCTTCACTCACAGAGTTATTTGTTGAACACTGTAACATGCTAAAAATGTTT
3451 ACCAGAGGGATTGCAGCACCTAACAACCCCTCACAAGTTTAAAAATTCGGG
3501 GATGTCCACAACCTGATCAAGCGGTGTGAGAAGGGAATAGGAGAAGACTGG
3551 CACAAAATTTCTCAGATTCCCTAATGTGAATATATATATTTAA

```

1   AGTACTCCATCCGTTCACTTTGATTGTGCATGTTGCACTTTTCGAAAGTC
51  AATTTGACTAATTTTAAAGCTAAATTAGATTACACTAATTCATATTTT
101 AAACAGAAAAATTAGATATTCAAAACTATACAAAAATATTATACATTG
151 CAATTTTTTGCATATCAATATGATAAAAAATATATCGTAAATATTAGT
201 CAAATTTTTTATAATTTGACTCAATCATGAAAAGTATAATAATTAATAG
251 TGGACGGAGGAAGTATTGTCTTCCAGATTGTGGCCATTTTGGTCCAA
301 GGGCCATTAGCAGTTCTCTTCATTTTCTACTTCTGTCTCATATTAGATGG
351 GCATCTTACTAAAAATATTTGTCTCATATTACTTGATTATTTATTAAATC
401 AAAAAGAATTAATTAATTTTTTCTCATTTTACCCCTACAATTAATATAGT
451 TTTAAAAGTTTTAAACAAATTTGAAGAATCAAAATTTCTTTGCAAGAG
501 ACTTATTATATAAAACAAAGGATAAAATAATAAAGCTGTCAATTATTG
551 ACCATCACTTAATAATATATAAAATACAACTGCTGATCTAATATGAGAC
601 GGACAAAATATATTCTAAAATATTTTCGGACAGATATGTGATATTCTAAC
651 CATTCACTACACTATATTATGCATTTTATCCGCCAATGACTTATTTCAGC
701 TTTAATTAATTAGGAAAGAGGAACTGCCAATGAGGAAGAGTAGGGCGT
751 AGTTGCTGTCGACGAAAAAAGATAATACTCACTCTTTTCGATTTTATT
801 TTTATTATCACTTTTAACCTATCATGTAAAAAGATAATTATTTTTTCA
851 TGCTTTATCCTTAGTATTAAACAATTAATAGGATTATTTTGTAATAA
901 TTTATATGAATAATTGTTTTCGTAATGAATTTGTCGGTCAAACAATGAT
951 AAATAAAATGAATGAAGAGAGTAGAAAACAAAACAAAAGAACAGTTGA
1001 CAACTTGAGAGATTAAAAGGTCCTCAAAACGCCTTGGATTTTGAGATTCCA
1051 TATGTGAAATTTCCATGAATAATTGAATTTGTATTATTACAAGTCAAAC
1101 TTTCCATTTCAFTCCAACTAGCCATCTTGGTTTCAAAATTACACATTCAT
1151 TCATTACAGATCTAATATTCTTAATAGTGATTCCACATATGGCTGAAG
1201 CTTTCATTCAAGTTCTGCTAGACAATCTCACTTCTTTCCTCAAAGGGGAA
1251 CTTGTATTGCTTTTCGGTTTTCAAGATGAGTTCCAAAGGCTTCAAGCAT
1301 GTTTTCTACAATTCAAGCCGTCCTTGAAGATGCTCAGGAGAAGCAACTCA
1351 ACAACAAGCCTCTAGAAAATTGGTTGCAAAAACCAATGCTGCTACATAT
1401 GAAGTCGATGACATCTTGGATGAATATAAAACCAAGGCCACAAGATTCTC

```

Fig. 6C

1451 CCAGTCTGAATATGGCCGTTATCATCCAAAGGTTATCCCTTTCGTCACA
1501 AGGTCGGGAAAAGGATGGACCAAGTGATGAAAAAACTAAAGGCAATTGCT
1551 GAGGAAAGAAAAGAATTTTCATTGCGACGAAAAAATTGTAGAGAGACAAGC
1601 TGTTAGACGGGAAACAGGTACTCATCTTAAATTAGTATTACAACAATAA
1651 GTTTATATTCATTTTTTTGGCAATTATCAAATTCAGAAAAGGGTTAAATA
1701 TACTCATGTCCTATCGTAAATAGTGATATATACCTCTCGTTGTACTTTC
1751 GATCTGAATATACTTGTCAAATCTGGCAAGCTCAGAATCAAATTATCCAC
1801 CCCAACTTTTAAATACTCGATATCTTTAGAAATCCACCTGTCTAACTCAT
1851 CCACTACCCATTCCCTTTGCTTTGAATTCTTTCTTTACGTATAAACTTG
1901 GAACACTCGATCCGTTTGTCTTTCTTAACAAAGCAGCTCAGAGAAAAGA
1951 GGTTTTCTTCTATTCTGTTTCTGTGTGCTGCAC'TGGGTCCTTAATCC
2001 CATTA AAAACAGGGCATGTTAATCCCAACGACGGTAGCCTTTCCTGACAG
2051 CTGACTGTAAATTTTGTCTAACAAGAAAAAAAAGATTAGACATGTTTT
2101 TCCTTGTCAATGATTAGGCTGGATTCTTTCAGAGTGGAACATAGGGGAT
2151 ATATTGGACCAAAAGTAGAATGGGTATATATTAAAGTATTTCTGATAGA
2201 ACAGGAGTATATTGTGCGAAATATCCTCTATTTTCTGTTGTCTCCTAAT
2251 GAGTTTGAATGTAATAATATCTCATGTGGACATTGCTTGCACCAGGTTTC
2301 TGTATTAACCGAACCAGGTTTATGGAAGAGACAAAGAGAAAGATGAGA
2351 TAGTGAAAATCCTAATAAACAATGTTAGTGATGCCCAACACCTTTCAGTC
2401 CTCCTAATACTTGGTATGGGGGATTAGGAAAAACGACTCTTGCCCAAAT
2451 GGTCTTCAATGACCAGAGAGTTACTGAGCATTTCATTCCAAAATATGGA
2501 TTTGTGTCTCGGAAGATTTTGATGAGAAGAGGTTAATAAAGGCAATTGTA
2551 GAATCTATTGAAGGAAGGCCACTACTTGGTGAGATGGACTTGGCTCCACT
2601 TCAAAAGAAGCTTCAGGAGTTGCTGAATGGAAAAAGATACTTGCTTGTCT
2651 TAGATGATGTTTGGAAATGAAGATCAACAGAACTGGGCTAATTTAAGAGCA
2701 GTCTTGAAGGTTGGAGCAAGTGGTGCTTCTGTTCTAACCCTACTCGTCT
2751 TGAAAAGGTTGGATCAATTATGGGAACATTGCAACCATATGAACTGTCAA
2801 ATCTGTCTCAAGAAGATTGTTGGTTGTTGTTTCATGCAACGTGCATTGGA
2851 CACCAAGAAGAAATAAATCCAAACCTTGTGGCAATCGGAAAGGAGATTGT
2901 GAAAAAAGTGGTGGTGTGCCTCTAGCAGCCAAAACCTCTGGAGGTATTT
2951 TGTGCTTCAAGAGAGAAGAAAGAGCATGGGAACATGTGAGAGACAGTCCG
3001 ATTTGGAATTTGCCTCAAGATGAAAGTTCTATTCTGCCTGCCCTGAGGCT

3051 TAGTTACCATCAACTTCCACTTGATTTGAAACAATGCTTTGCGTATTGTG
3101 CGGTGTTCCCAAAGGATGCCAAAATGGAAAAAGAAAGCTAATCTCTCTC
3151 TGGATGGCGCATGGTTTTCTTTTATCAAAGGAAACATGGAGCTAGAGGA
3201 TGTGGGCGATGAAGTATGGAAGAATTATACTTGAGGTCTTTTTCCAAG
3251 AGATTGAAGTTAAAGATGGTAAACTTATTTCAAGATGCATGATCTCATC
3301 CATGATTTGGCAACATCTCTGTTTTAGCAAAACACATCAAGCAGCAATAT
3351 CCGTGAAATAAATAAACACAGTTACACACATATGATGTCCATTGGTTTCG
3401 CCGAAGTGGTGTTTTTTACACTCTTCCCCCTTGGAAAAGTTTATCTCG
3451 TTAAGAGTGCCTAATCTAGGTGATTGACATTTAATAAGTTACCATCTTC
3501 CATTGGAGATCTAGTACATTTAAGATACTTGAACCTGTATGGCAGTGGCA
3551 TGCAGTAGTCTTCCAAAGCAGTTATGCAAGCTTCAAAATCTGCAAACTCTT
3601 GATCTACAATATTGCACCAAGCTTTGTTGTTTGCCAAAAGAAACAAGTAA
3651 ACTTGGTAGTCTCCGAAATCTTTACTTGATGGTAGCCAGTCATTGACTT
3701 GTATGCCACCAAGGATAGGATCATTGACATGCCTTAAGACTCTAGGTCAA
3751 TTTGTTGTTGGAAGGAAGAAAGGTTATCAACTTGGTGAAGTAGGAAACCT
3801 AAATCTCTATGGCTCAATTAATCTCGCATCTTGAGAGAGTGAAGAATG
3851 ATAAGGACGCAAAAGAAGCCAATTTATCTGCAAAAGGGAATCTGCATTCT
3901 TTAAGCATGAGTTGGAATAACTTTGGACCACATATATGAATCAGAAGA
3951 AGTTAAAGTGCTTGAAGCCCTCAAACCACACTCCAATCTGACTTCTTTAA
4001 AAATCTATGGCTTCAGAGGAATCCATCTCCAGAGTGGATGAATCACTCA
4051 GTATTGAAAAATATTGTCTCTATTCTAATTAGCAACTTCAGAACTGCTC
4101 ATGCTTACCACCTTTGGTGATCTGCCCTTGCTAGAAAGTCTAGAGTTAC
4151 ACTGGGGGTCTGCGGATGTGGAGTATGTTGAAGAAGTGGATATTGATGTT
4201 CATTCTGGATTCCCCACAAGAATAAGGTTCCATCCTTGAGGAACTTGA
4251 TATATGGGACTTTGGTAGTCTGAAAGGATTGCTGAAAAGGAAGGAGAAG
4301 AGCAATTCCCTGTGCTTGAAGAGATGATAATTCACGAGTGCCCTTTCTG
4351 ACCCTTCTCTAATCTTAGGGCTCTTACTTCCCTCAGAATTTGCTATAA
4401 TAAAGTAGCTACTTCATTCCAGAAGAGATGTTCAAAAACCTTGCAAAATC
4451 TCAAATACTTGACAATCTCTCGGTGCAATAATCTCAAAGAGCTGCCTACC
4501 AGCTTGCTAGTCTGAATGCTTTGAAAAGTCTAAAAATTCAATTGTGTTG
4551 CGCACTAGAGAGTCTCCCTGAGGAAGGGCTGGAAGGTTTATCTTCACTCA
4601 CAGAGTTATTGTTGAACACTGTAAACATGCTAAAAATGTTTACCAGAGGGA

4651 TTGCAGCACCTAACAACCTCACAAAGTTTAAAAATTCGGGGATGTCCACA
4701 ACTGATCAAGCGGTGTGAGAAGGGAATAGGAGAAGACTGGCACAAAATTT
4751 CTCACATTCCCTAATGTGAATATATATATTTAAGTTATTGCTATTGTTTC
4801 TTTGTTGTGAGTCTTTTGGTTCCTGCCATTGTGATTGCATGTAATTTT
4851 TTTCTAGGGTGTCTTTTATGAGTCTCTCTCATTGGATGTAATTTTC
4901 TTTTGGAAACAAATCTGTCAATTGATTTGTATTATACGCTTTCAGAACTC
4951 ATTACTTATTGTAAATTGTTCTTTGTTGTAAATTGTGAGTATCTTATT
5001 TTATGGAATTTCTGATTTATTTTGAACAAATCAATGATTGTGAAGA
5051 TCCATCTGTATTATACTCCCTTCGTCTCATTTTATGTGTCACCTGTGGA
5101 TTTGAGATTCAAACAAATCTATCTTTGATCGTAAATTTTAATAGATCT
5151 TTTAAACATTTGAATTATCAATTATTGTGACTTTAGTACT


```

1      ATGGCTGAAGCTTTCCTTCAAGTCTCTGCTAGATAATCTCACTTTTTCAT
51     CCAAGGGGAAC TTGGATTGGTTTTTGGTTTCGAGAAGGAGTTAAAAAAC
101    TTTCAAGTATGTTTTTCAATGATCCAAGCTGTGCTAGAAGATGCTCAAGAG
151    AAGCAACTGAAGTACAAGSCAATAAAGAACTGGTTACAGAAACTCAATGT
201    TGCTGCATATGAAGTTGATGACATCTTGGATGACTGTAAACTGAGGCAG
251    CAAGATTCAAGCAGGCTGTATTGGGGCGTTATCATCCACGGACCATCACT
301    TTCTGTTACAAGGTGGGAAAAAGAATGAAAGAAATGATGGAAAACTAGA
351    TGCAATTGCAGAGGAACGGAGGAATTTTCATTTAGATGAAAGGATATAG
401    AGAGACAAGCTGCTAGACGGCAAACAGGTGCTCATCTTAATTTTATTTTA
451    AAACAATTAAGTATTACAAATTGCAGAGAAACGAAGGAATTATATTCAT
501    TTTTATTTTGGCAATTATCAAAGTCATTGTGTTTTTTAAGCTGGGGGA
551    AGTTTCAAATATTTCTCTAGTCTTAATGTTTGTCTCACTCACTCAGCAT
601    GATTTTCTCAATCCTTCACTTCAACTCCCCCTACTGTGCAATATCTTC
651    TCTATTTTCTGTTGACTCCTAATGAGCTTGAATGTAACAACATTCCTGTT
701    TGGAGCAGGTTTTGTTTTAACTGAGCCAAAAGTTTATGGAAGGGAAAAAG
751    AGGAGGATGAGATAGTGAATCTTTGATAAACAATGTTAGTTATTCGAA
801    GAAGTTCCAGTACTCCCAATACTTGGTATGGGGGGACTAGGAAAGACGAC
851    TCTAGCCCAAATGGTCTTCAATGATCAAAGAATTACTGAGCATTTCATC
901    TAAAGATATGGGTTTGTGTCTCAGATGATTTTGATGAGAAGAGGTTGATT
951    AAGGCAATTGTAGAATCTATTGAAGGAAAGTCACTGGGTGACATGGACTT
1001   GGCTCCCCCTCCAGAAAAGCTTCAGGAGTTGTTGAATGGAAGGATACT
1051   TTCTTGTTTTGGATGATGTTTGAATGAAGATCAAGAAAAGTGGGATAAT
1101   CTTAGAGCAGTATTGAAGATTGGAGCTAGTGGTGCTTCAATTCTAATTAC
1151   TACTCGTCTTGAAAAAATTGGATCAATTATGGGAACTTTGCAACTATATC
1201   AGTTATCAAATTTGTCTCAAGAAGATTGTTGGTTGTTGTTCAAGCAACGT
1251   GCATTTTGCCACCAAACCGAAACAAGTCCTAAACTTATGGAAATCGGAAA
1301   GGAGATTGTGAAGAAATGTGGGGTGTGCCTCTAGCAGCCAAACTCTTG
1351   GAGGCCTTTACGCTTCAAGAGGGAAGAAAGTGAATGGGAACATGTGAGA
1401   GATAGTGAGATTTGGAATTTACCTCAAGATGAAAATTCTGTTTTGCCTGC

```

Fig. 6D

1451 CCTGAGGCTGAGTTATCATCATCTTCCACTTGATTTGAGACAATGTTTGG
1501 CATATTGCGCAGTATTTCCAAAGGACACCAAAATAGAAAAGGAATATCTC
1551 ATCGCTCTCTGGATGGCACACAGTTTCTTTTATCAAAAGGAAACATGGA
1601 GCTAGAGGATGTGGGCAATGAAGTATGGAATGAATTATACTTGAGGTCTT
1651 TTTTCCAAGAGATTGAAGTTAAATCTGGTAAACTTATTTCAAGATGCAT
1701 GATCTCATCCATGATTTGGCTACATCTATGTTTTCAGCAAGCGCATCAAG
1751 CAGAAGTATACGCCAAATAAATGTAAAAGATGATGAAGATATGATGTTCA
1801 TTGTAACAAATTATAAAGATATGATGTCCATTGGTTTCTCCGAAAGTGGTG
1851 TCTTCTTACTCTCCTTCGCTCTTTAAAAGGTTTGTCTCGTTAAGGGTGCT
1901 TAATCTAAGTAACCTCAGAATTTGAACAGTTACCGTCTTCCGTTGGAGATC
1951 TAGTACATTTAAGATACCTTGACCTGTCTGGTAATAAAATTTGTAGTCTT
2001 CCAAGAGGTTGTGCAAGCTTCAAAATCTGCAGACTCTTGATCTATATAA
2051 TTGCCAGTTCACTTTCTTGTTTGCCGAAACAACAAGTAAGCTTTGTAGTC
2101 TCCGGAATCTTGTACTTGATCACTGTCCATTGACTTCTATGCCACCAAGA
2151 ATAGGATTGTTGACATGCCTTAAGACACTAGGTTACTTTGTTGTAGGCGA
2201 GAGGAAAGGTTATCAACTTGGTGAACTACGAAATTTAAACCTCCGTGGTG
2251 CAATTTCAATCACACATCTTGAGAGAGTGAAAAATGATATGGAGGCCAAA
2301 GAAGCCAATTTATCTGCAAAAGCAAACTACACTCTTTAAGCATGAGTTG
2351 GGATAGACCAAAACAGATATGAATCCGAAGAAGTTAAAGTGCTTGAAGCCC
2401 TCAAAACCACATCCCAATCTGAAATATTTAGAAATCATTGACTTCTGTGGA
2451 TTCTGTCTCCCTGACTGGATGAATCACTCAGTTTGTGAAAATGTTGTCTC
2501 TATTCTAATTAGCGGTTGTGAAAACCTGCTCGTGCTTACCACCCTTTGGTG
2551 AGCTGCCCTGTCTAGAAAGTCTGGAGTTACAAGACGGGTCTGTGGAGGTG
2601 GAGTATGTTGAAGATTCTGGATTCCCTGACAAGAAGAAGATTTCCATCCCT
2651 GAGAAAACCTCATATAGGTGGCTTTTGTAATCTGAAAGGATTGCAGAGAA
2701 TGAAAGGAGCAGAGCAATTTCCCGTGCTTGAAGAGATGAAGATTTCGGAT
2751 TGCCCTATGTTTGTTTTCCGACCCCTTTCTTCTGTCAAGAAATAGAAAT
2801 TTGGGGGGAGGCAGATGCAGGAGGTTTGAGCTCCATATCTAATCTCAGCA
2851 CTCTTACATCCCTCAAGATTTTCAGTAACCACACAGTGACTTCACTACTG
2901 GAAGAGATGTTCAAAAACCTTGAAAATCTCATATACTTGAGTGTCTCTTT
2951 CTTGGAGAATCTCAAAGAGCTGCCTACCAGCCTGGCTAGTCTCAACAATT
3001 TGAAGTGCTGGATATTCGTTATGTTACGCACTAGAGAGTCTCCCCGAG
3051 GAAGGGCTGGAAGGTTTATCTTCACTCACAGAGTTATTTGTTGAACACTG
3101 TAACATGCTAAAAATGTTTACCAGAGGGATTGCAGCACCTAACAACCTCA
3151 CAAGTTTAAAAATTCGGGGATGTCCACAACCTGATCAAGCGGTGTGAGAAG
3201 GGAATAGGAGAAGACTGGCACAAAATTTCTCACATTCTAATGTGAATAT
3251 ATATATTTAA

1 ATGGCTGAAGCTTTCATTCAAGTTGTGCTAGACAATCTCACTTCTTTCCCT
 51 CAAAGGGGAACCTGTATTGCTTTTCGGTTTTCAGATGAGTTCCAAAGGC
 101 TTTCAAGCATGTTTCTACAATCCAAGCCGTCCTTGAAGATGCTCAAGAG
 151 AAGCAACTCAACGACAAGCCTCTAGAAAATTGGTTGCAAAAACCTCAATGC
 201 TGCTACATATGAAGTCGATGACATCTTGGATGAATATAAACTAAGGCCA
 251 CAAGATTCTTGCAGTCTGAATATGGCCGTTATCATCCAAGGTTATCCCT
 301 TTCCGTCACAAGGTTGGGAAAAGGATGGACCAAGTGATGAAAAAAGTGAA
 351 TGCAATTGCTGAGGAACGAAAGAATTTTCATTGCAAGAAAAGATTATAG
 401 AGAGACAAGCTGCTACACGGGAAAACAGGTACTCATCTTAAATTAGTATTA
 451 CAACTTAGTATTATATTCATTGTTTGGGCAATGATCAAATTATGTAAAG
 501 GTCAAAATATACTCATGTACTACTGAAAATAGTTTAAATATACCTCTAGTT
 551 ATACTATTAGTACGAACATACTCCTCCCATATACTTTGGAACAAAATATTC
 601 CCTTAACGAAATAAGACACGTCGAAAAGTTCAGATTCAAATTATCCACCCT
 651 CAATTTTAAGATCTGATTTCTTTAGGAAACCACTCATCTCCTCCGTTTGG
 701 AGTTCTTAACGAAGCAGCTCAGAGAAAAGAGGTTTCTCTGTTCTGTTT
 751 CTGCTGCATTTGTGTCTTAATCCAATAACAAACAATACAAATTAATATTA
 801 TGTTCACGATGAGGGTAGTCTTCTAGCTAGACATGAAGTGAAGTAAAT
 851 TTTGTTTTAAGGAAGAAAAGAAATGATTAGGCTGGATTCTTTCAGAGT
 901 GGAATATAGGGGGATAAAGTTGGAGCATAGAGTTCCATCGTTTATTTCTT
 951 TCCTTAAAGTAACAAGTTCAACAAAATGATATCAAGGTACGGAATGGAA
 1001 AATTATTAGACACGCTCTAAACTACAAAAATGGAATAGAACTTAAATAT
 1051 CAGTGACAAATATCATCCTTTAATAAAGCTACCAAATTTAAATCATGATAC
 1101 AGAGAAGAAACCAAAAAATTAGGGGTGAATTATTTGATTCTATGCTTAT
 1151 CACATGCTTCCCATCAACATCAAAGGAAAAATTGTGCCAAAGTATAAAC
 1201 GGTGCGGTATATTTGGATTGAAAGTAAACAGGAGGATACATTGGACTA
 1251 AAAGTATAACAATAAGTATATTTGATCATTTTATGTATCAAATTCATGTG
 1301 GTTTTTGGGGAGAAGGGAAGTTTCAATGTTTTCAATCTGCTCCTCATCTC
 1351 ATCCATATCTCTTTATTGTGCAAAACCTTCTCTATTTAACTATTTCTG
 1401 CCGACTCCTAATGAGCTTGAATGTAACAATATCTCATCTGGACATTGCT

Fig. 6D

1451 TGCACCAGGTTCTGTGTTAACTGAACCACAAAGTTTATGGAAGGACAAAG
1501 AAAAAGATGAGATAGTGAAAATCCTAATAACAATGTTAGTGATGCCCAA
1551 AAACCTCTCAGTCCCTCCCAATACTTGGTATGGGGGACTAGGAAAGACAAAC
1601 TCTTTCCCAAATGGTCTTCAATGATCAGAGAGTAAC TGAGCGTTTCTATC
1651 CCAAAATATGGATTTCGCTCTCGGATGATTTTGATGAGAAGAGGTTGATA
1701 AAGGCAATAGTAGAATCTATTGAAGGGAAGTCCCTCAGTGACATGGACTT
1751 GGCCTCCACTTCAAAGAAGCTTCAAGAGTTGCTGAATGGAAAAAGATACT
1801 TCCTTGCTTTAGATGATGTTTGGAATGAAGATCAACATAAGTGGGCTAAT
1851 TTAAGAGCAGTCTTGAAGTTGGAGCAAGTGGTGCAATTTGTTCTAACTAC
1901 TACTCGTCTTGAAAAGGTTGGATCAATTATGGGAACATTGCAACCATATG
1951 AATGTGCAAACTCTGTCTCCAGAGGATTTGTTGGTTTGTTCATGCAGCGT
2001 GCATTGGACACCAAGAAGAAATAAATCCAAACCTTGTGGCAATCGGAAA
2051 GGAGATTGTGAAAAATGTGGTGGTGTGCCTCTAGCAGCCAAGACTCTTG
2101 GAGGTATTTTGCGCTTCAAGAGAGAAGAAAGAGAATGGGAACATGTGAGA
2151 GACAGTCCGATTGGGAATTTGCCTCAAGATGAAAGTTCTATTCTGCCTGC
2201 CCTGAGGCTTAGTTACCATCATCTTCCACTTGATTGAGACAATGCTTTG
2251 TGTATTGTGCGGTATTCCTCAAAGGACACCAAAATGGCAAAGGAAAACTT
2301 ATCGCTTTTGGATGGCACATGGTTTCTTTTATCGAAAGGAAATTTGGA
2351 GCTAGAGGATGTAGGTAATGAAGTATGGAATGAATATACTTGAGGTCTT
2401 TCTTCCAAGAGATTGAAGTTGAATCTGGTAAACTTATTTCAAGATGCAT
2451 GACCTCATCCATGATTTGGCTACATCTCTGTTTTCAGCAAACACATCAAG
2501 CAGCAATATTCTGTGAAATAAATGCTAATTATGATGGATATATGATGTCGA
2551 TTGGTTTGTGCTGAAGTGGTATCTTCTTACTCTCCTTCACTCTTGCAAAAAG
2601 TTTGTCTCATTAAAGGTGCTTAATCTAAGAACTCGAACCTAAATCAATT
2651 ACCATCTTCCATTGGAGATCTAGTACATTTAAGATACCTGGACTTGTCTG
2701 GCAATTTTAGAATTTCGTAATCTTCCAAAGAGATTATGCAGGCTTCAAAT
2751 CTGCAGACTCTTGATCTACATTATTGCGACTCTCTTCTGTTTGCCAAA
2801 ACAAACAAGTAAACTTGGTAGTCTCCGAAATCTTTTACTTGATGGCTGTT
2851 CATTTGACGTCAACGCCACCAAGGATAGGATTGTTGACATGCCTTAAGTCT
2901 CTAAGTTGCTTTGTTATTGGCAAGAGAAAAGGTTATCAACTTGGTGAACT
2951 AAAAAACCTAAATCTCTATGGCTCAATTTCAATCACA AAACTTGACAGAG
3001 TGAAGAAGATAGCGATGCAAAAGAAGCTAATTTATCTGCTAAAGCAAAT

3051 CTGCACCTCTTTATGCCTGAGTTGGGACCTTGATGGAAAACATAGATATGA
3101 TTCAGAAGTTCTTGAAGCCCTCAAACCACACTCCAATCTGAAATATTTAG
3151 AAATCAATGGCTTCGGAGGAATCCGTCTCCAGATTGGATGAATCAATCA
3201 GTTTTGAAAAATGTTGCTCTATTAGAATTAGAGGTTGTGAAAAC TGCTC
3251 ATGCTTACCACCTTTGGTGAGCTGCCTTGTCTAGAAAAGCTAGAGTTAC
3301 ACACCGGGTCAGCAGATGTGAGTATGTTGAAGATAATGTTTCATCCTGGA
3351 AGGTTTCCATCCTTGAGGAACTTGTATATGGGACTTTAGTAATCTAAA
3401 AGGATTGCTGAAAAAGGAAGGAGAAAAAGCAATTCCTGTGCTTGAAGAGA
3451 TGACATTTTACTGGTGCCCTATGTTTGTATTCCGACCTTTCTTCTGTC
3501 AAGACATTGAAAGTTATTGCGACAGATGCAACAGTTTGTAGGTCCATATC
3551 TAATCTTAGGGCTCTTACTTCCCTTGACATTAGCAATAACGTAGAAGCTA
3601 CTTCACTCCCAGAAGAGATGTTCAAAGCCTTGCAAACTCAAAATACTTG
3651 AATATCTCTTTCTTTAGGAATCTCAAAGAGTTGCCCTACCAGCCTGGCTAG
3701 TCTCAATGCTTTGAAGAGTCTCAAATTTGAATTTGTAAACGCACTAGAGA
3751 GTCCTCCAGAGGAAGGGGTGAAAGGTTTAAC TCACTCACCGAGTTGTCT
3801 GTCAGTAACTGTATGATGCTAAAATGTTTACCGAGGGATTGCAGCACCT
3851 AACAGCCCTCACAACTTTAACAATTACTCAATGTCCAATAGTATTC AAGC
3901 GGTGTGAGAGAGGAATAGGAGAAGACTGGCACA AAATTGCTCACATTTCCA
3951 TATTTGACTCTATATGAGTGA

1 ATGGCGGAAGCTTTTCTTCAAGTTCTGCTAGAAAAATCTCACTTCTTTTCAT
51 CGGAGATAAACTTGTATTGATTTTCGGTTTCGAAAAGGAATGTGAAAAGC
101 TGTGAGTGTGTTTTCCACAATTCAAGCTGTGCTTCAAGATGCTCAGGAG
151 AAGCAATTGAAGGACAAGGCAATTGAGAATTGGTTGCAGAACTCAATTC
201 TGCTGCCATGAAGTTGATGATATATTGGGCGAATGTAAAAATGAGGCAA
251 TAAGATTTGAGCAGTCTCGATTAGGGTTTTATCACCAGGGATTATCAAT
301 TTCCGTCACAAAATPGGGAGAAGGATGAAAGAGATAATGGAGAACTAGA
351 TGCAATATCTGAGGAAAGAAGGAAGTTTCATTTCCTTGAAAAAATTACAG
401 AGAGACAAGCTGCCGCTGCTACGCGTGAAACAGGTTGTGAGTACTGAGTAA
451 TTGTAGCTTAGTTAATATTCATTTGTACCACATCATGTGTTCCACCGTG
501 ATCTCTACAGTAGGATGGCAATGGGGCTGGGCGAGGTTGGAGGTGTGCAG
551 GTGTGTGGCGCAACCCCACTTTGAGTCTACATAAGTAGGTACTTAAATT
601 TGTATAGAGTTGAACAAGTACAAACGCCCTCCTACTTGGTGTCTTATGCG
651 TATTATGTCACCTAGGATGCAATGTGTCTACTTGTTCAACTTTATATGAGT
701 TTAAGTTCTACTTGTGCACACCCAAAGTTGGAGCGCGTAGATGTCAGTTG
751 ATACCAAGTTAAAAAGGCATATTTATGAATTATGCCCTTTAAATTATGATT
801 CAATTTTGTATCAGTCTGTCCAAATATGTTCTAGTGAAAGTGTTAAACT
851 TAGTCTGGATCTGCTATTGAAAGTGAATTTTGTGGCACTAAACAATGCA
901 ATGGGTCTGGATTCAATTTTGCATTAACTTTGTTTAGACGATTTTCTTT
951 ATCGAATTTTACTGTCTAAATGGAAAAAGCAGAAATAAGAAGTATAC
1001 AGAGGCTGACTTCTTCATAGTATCTATCATATAAAAAAAGCATTGATTA
1051 CTAGGATATGGGTTCCTTTAAATTACAAATTTGTGAGTTAAACAGTTCT
1101 GTTGGGAAGGATTTAGATACCGTGGATAGTATCTAGAAGTTTTTTAAAT
1151 AAAAAATTAGCAATTTATGCGGGCTGGGGCGGGTTGAAAACAGCAAACTT
1201 TGCAAGGCTTGGCGGGTCGAAATCTTGCAAGTTTGTGTGGGTTTGCCCT
1251 GCACCACCCAATCTGCCATTCTGTCTAAATGTTTGTTTGTCTATAATT
1301 CTTGCTGACTCATTTCTAATGAGCTCAATTGTAACAAATTCCTTGTGTCCA
1351 CACTACTTGGAACAGGTTTTGTGTTAACTGAACCAAAAGTCTACGGAAGG
1401 GACAAAGAGGAGGATGAGATAGTGAATAATCTGATAAACAATGTAAATGT

Фир. 6F

1451 TGCCGAAGAACTTCCAGTCTTCCCTATAATTGGTATGGGGGGACTAGGAA
1501 AGACGACACTTGCCCAAATGATCTTCAACGATGAGAGAGTAAGCAT
1551 TTCAATCCCAAAATATGGGTTTGTGTCTCAGATGATTTTGATGAGAAGAG
1601 GTTAATTAAAGACAATTATAGGAAATATTGAAAGAAGTTCTCCTCATGTTG
1651 AGGACTTGGCTTCATTTCAGAAGAAGCTCCAGGAGTTATTGAATGGAAAA
1701 CGATACTTGCTTGTCTTAGATGATGTTTGAATGATGATCTAGAAAAGTG
1751 GGCTAAGTTAAGAGCAGTCTTAACGTGTTGGAGCAAGAGGTGCTTCTATTC
1801 TAGCTACTACTCGTCTTGAAAAGGTGGATCAATTATGGGAACGTTGCAA
1851 CCATATCATTTGTCAAATTTGTCTCCACATGATAGTTTACTTTTGTATTAT
1901 GCAACGCGCATTTGGGCAACAAAAGAAGCAAATCCTAATCTAGTGGCCA
1951 TTGGAAAGGAGATGTGGAAGAAATGTGGTGGTGTGCCCTTTAGCAGCCAAG
2001 ACTCTTGGTGGTCTTTTACGCTTCAAGAGAGAAGAGAGTGAATGGGAACA
2051 TGTGAGAGATAATGAGATTTGGAGTCTGCCCTCAAGATGAAAGTTCTATTT
2101 TGCCTGCTCTAAGACTGAGTTATCATCACCTTCCACTTGATTTGAGACAA
2151 TGCTTTCGCTATTGTGCAATTTCCCAAGGACACCAAATGATAAAGGA
2201 AAATCTCATTACTCTCTGGATGGCGCATGGTTTTCTTTTATCAAAGGGAA
2251 ACTTGGAGCTAGAGGATGTGGGTAAATGAAGTATGGAATGAATTATACTTG
2301 AGGTCTTTCTTCCAAGAAATGAAGCTAAATCGGGTAATACTTATTTCAA
2351 GATACATGATCTAATCCATGATTTGGCTACATCTCTGTTTTCGGCAAGCG
2401 CATCATGCGGCAATATCCGCGAAATAAATGTCAAAGATTATAAGCATACA
2451 GTGTCCATTGGTTTCGCTGCAAGTGGTGTCTTCTTACTCTCCTTCGCTCTT
2501 GAAAAAGTTTGTCTCGTTAAGGGTGTCTTAATCTAAGTTACTCAAACTTG
2551 AGCAATTACCGTCTTCCATTGGAGATCTATTACATTTAAGATACCTGGAC
2601 CTGTCTTGCAATAAATTCCTAGTCTTCCAGAGAGGTTGTGCAAGCTTCA
2651 AAATCTTCAGACTCTTGATGTACATAATTGCTACTCACTTAATGTTTGC
2701 CAAAAACAAGTAAACTTAGTAGTCTCCGACATCTGTGTGTGATGGC
2751 TGTCCATTGACTTCTACTCCACCAAGGATAGGATGTTTGACATGCCTTAA
2801 GACTCTAGGTTTCTTTATTGTGGGAAGCAAGAAAGGTTATCAACTTGGTG
2851 AACTGAAAAACCTAAATCTCTGCGGCTCAATTTCAATCACACACCTTGAG
2901 AGAGTGAAGAACGATACGGATGCAGAAGCCAATTTATCTGCAAAAGCAAA
2951 TCTGCAATCTTTAAGCATGAGTTGGGATAACGATGGACCAACAGATATG
3001 AATCCAAAGAAGTTAAAGTGCTTGAAGCACTCAAACACACCCCAATCTG

3051 AAATATTTAGAGATCATTGCCTTCGGAGGATTCGTTTTCCTCAAGCTGGAT
3101 AAATCACTCAGTTTTTGGAGAAGGTCACTCTGTAGAAATTAAGCTGCA
3151 AAAACTGCTTGTGCTTACCACCTTTGGGGAGCTTCCTTGTCTAGAAAAT
3201 CTAGAGTTACAAAACGGATCTGCGGAGGTGGAGTATGTTGAAGAGGATGA
3251 TGTCATTCTAGATTCTCCACAAGAAGAAGCTTTCCATCCCTGAAAAAAC
3301 TTCTGTATATGTTCTTTTCGAGTTTGAAGGGCTGATGAAAGAGGAAGGA
3351 GAAGAGAAATPCCCATGCTTGAAGAGATGGCGATTTTATATGCCCCTCT
3401 GTTTGTTTTTCCAACCTTTCTCTGTCAAGAAATAGAAGTTCACGGCA
3451 ACACAAACACTAGAGGTTGAGCTCCATATCTAATCTTAGCACTCTTACT
3501 TCCCTCCGATTTGGTGCTAATACAGAGCGACTTCACTCCAGAAGAGAT
3551 GTTCACAAGTCTTACAAATCTCGAATCTTGAGTTCTTTGACTTCAAGA
3601 ATCTCAAAGATCTGCCTACCAGCCTGACTAGTCTCAATGCTTTGAAGCGT
3651 CTCCAAATGAAAGTTGTGACTCACTAGAGAGTTTCCCTGAACAAGGGCT
3701 AGAAGGTTAACTTCACTCACAGTTGTTTGTAAATACTGTAAGATGC
3751 TAAAAATGTTTACCGAGGGATTGCAGCACCTAACAGCCCTCACAAATTTA
3801 GGAGTTTCTGGTTGTCAGAAGTGGAAAAGCGCTGTGATAAGGAAATAGG
3851 AGAAGACTGGCACAAAATGCTCACATTCCAAATCTGGATATTCATTAG

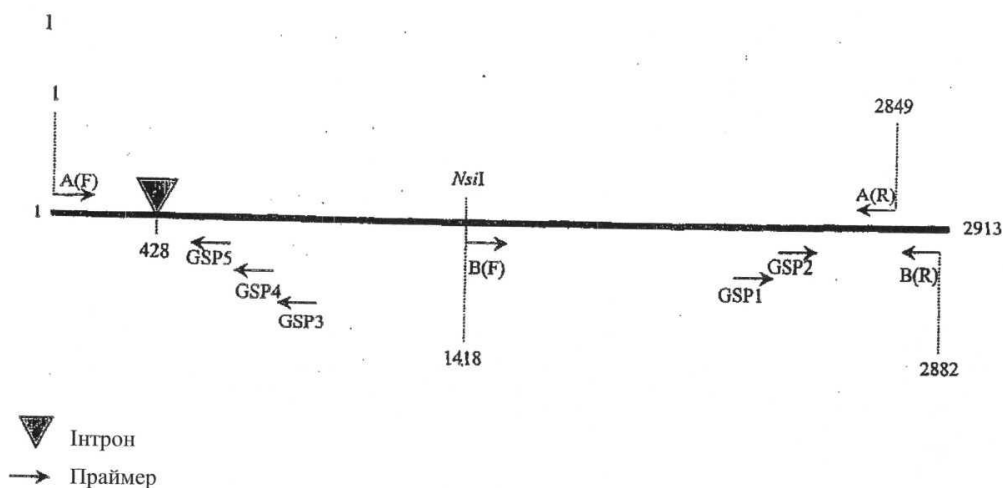


Fig. 7

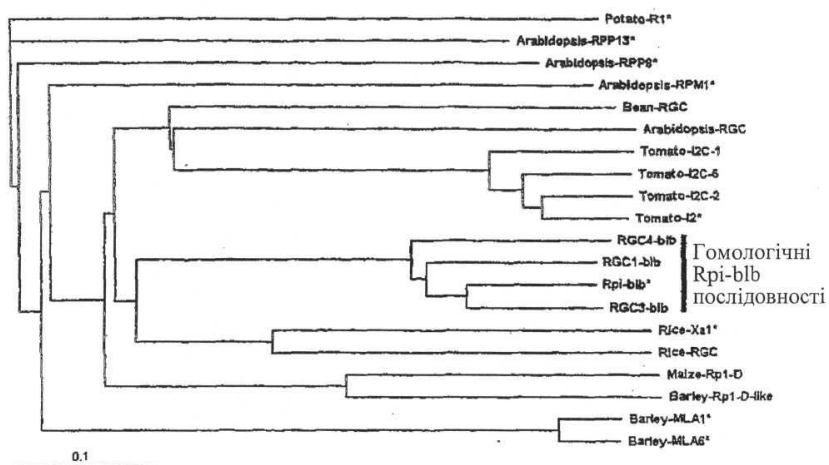
A	MAEAFIQVLLDNLTSTFLKGEVLVLLFGFQDEFQRLSSMESTIQAVLEDAQEKQLNN	55
	KPLENWLQKLNAATYEVDDILDYKTKATRFSSQSEYGRYHPKVI PFRHKVGKRM	110
	QVMKKLKAIAEERKNFHLHEKIVERQAVRRETGSVLTEPQVYGRDKEKDEIVKIL	165
B	INNVSDAQHLSVLpilgmgglgkttlaQMVFNDQRVTEHFHSKIWICVSEDFDEK	220
	RLIKAIVESIEGRPLLGEMLAPLQKKLQELLNGkrylividdvwnEDQKQWANL	275
	RAVLKVGASGASvltttrLEKVGSTMGTLQPYELSNLSQEDCWLLFMQRAFGHQE	330
C	EINPNLVAIGKEIVKSGGVPLAATLGGILCFKREERAWEHVRDSPINNLPQDE	385
	SSILPALRLSYHQLPLDLKQCFAYCAVFPKDAKMEKELISLWMAHGFLSKGNM	440
	ELEDVGDEVWKELYLRSFFQEIEVKDGKTYFKmhdlihdlatSLFSANTSSSNIR	495
D	EINKHS	501
	YTHMMSIGFAEVVFFYTLPPLEK	524
	FISLRVLNLGDST.FNKLPSIGD	547
E	LVLHRYNLNGSG.MRSLPKQLCK	570
	LQNLQTLDLQYCTKLCCLPKETS	594
	LGSLRNLLDGSQSLTCMPRIGS	618
F	LTCLKTIGQFVVGRKKGYQ	637
	LGELGNLNLGSIKISHLERVKNKDAKEANLSA	671
	KGNLHSLMSWNNFGPHIYESEEVKVLKALP	703
G	HSNLTSLKIYGFGRGIH.LPEWNNHVS	728
	LKNIVSILISNFRNCCLPPFGD	751
	LPCLESLELHWGSAD	766
H	VEYVEVDIDVHSGFPTRIR	786
	FPSLRKLDIWDGSLKGLLKEGEEQ	812
	FPVLEEMIHECPFLT.LSSN	832
I	LRALTSLRICYNKVATSFPEEMFKN	857
	LANLKYLTISSRCNNKELPTSLAS	881
	LNALKSLKIQLCCALESLEPEGLEG	906
J	LSSLTELFVEHCNMLKCLPEGLQH	930
	LTTLTSLKIRGCPQLIKRCEKGIGEDWHK	959
	ISHIPNVNIYI	970

L..L..L.L..C..a..aP.. LAR Консенсус

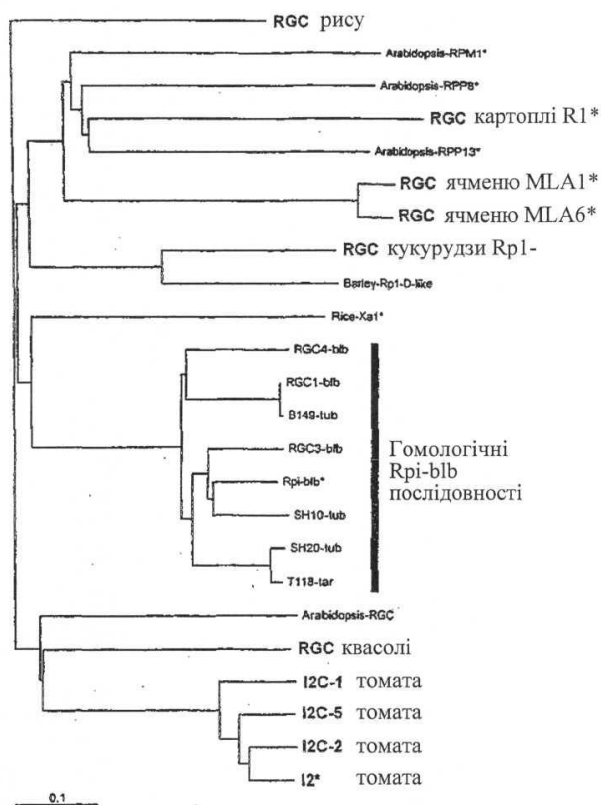
N

S

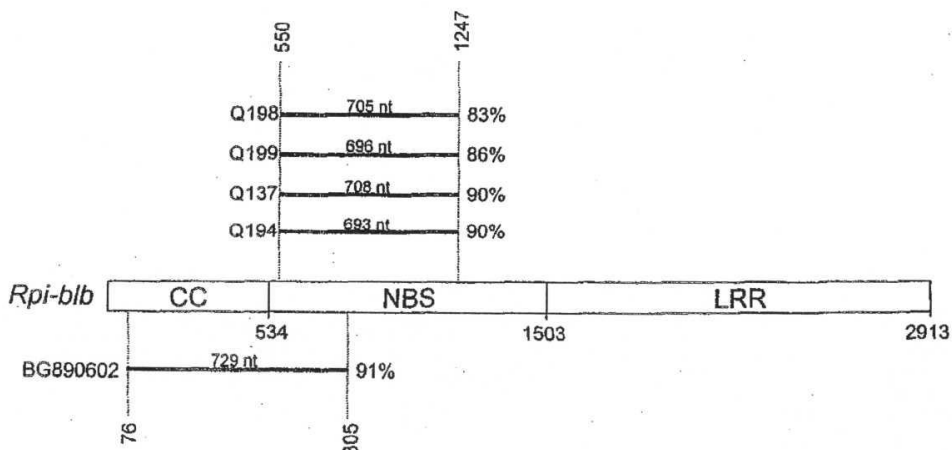
Fig. 8



Фіг. 9А



Фіг. 9В



Dir. 9C

Rpi-blb	MAEAFIQVLLDNLTSLKGLVLLFGFQDEFQRLSSMFSTIQAVLEDAQEKQLNNKPLEN	60
RGC3-blb	V D	60
RGC1-blb	L F I Q G V E K K K M K Y A I K	60
RGC4-blb	L E I G D K I E K C E K V Q K D A I	60
Rpi-blb	WLQKLNAAITYEVDLDEYKTKATRFSSQSEYGRYHFKVIFPRHKVGRKMDQVMKKLKAIA	120
RGC3-blb	L N	120
RGC1-blb	V A D C E A K A V L R T T C Y K E M E D	120
RGC4-blb	S A G C N E I E R L F G I N I R K E I E D S	120
Rpi-blb	EEKKNPHLHEKIVERQAVR--RETG-----	143
RGC3-blb	Q I A T--	143
RGC1-blb	R D R I A -- Q	143
RGC4-blb	R K F L T A A A T V G W Q W G A R L E Y K R L L G V L M R I M S L R M H V S T C S T L	180
Rpi-blb	-----SVLTEPQVYGRDKEKDEIVKILINNVSDAQHLSVLpilgmgg1	186
RGC3-blb	-----K	186
RGC1-blb	-----F K E E YSEEV	186
RGC4-blb	YEFKFLCTPKVGARCP K E N V E E P F I	240
Rpi-blb	gkttlaQMVFNDQVRTEHFHSKIWICVSEDFDEKRLIKAIVESIEGRPLLGEMDLAPLQK	246
RGC3-blb	S R Y P D K S S-D	245
RGC1-blb	I I N L V D K S G-D	245
RGC4-blb	I E K N P V D T I G N - S S P H V E S F	299
Rpi-blb	KLQELLNGkryllvlddvNEDQKQKMANLRAVLKVGASGAsvltttrLEKVGSGIMGTLP	306
RGC3-blb	F H F	305
RGC1-blb	F E D I I I I L	305
RGC4-blb	D L E K T R I A	359
Rpi-blb	YELSNLSQEDCWLFLMQRAFGHQEEINPNLVAIGKEIVKKSQgvp1aaktlggILCFKRE	366
RGC3-blb	F F	365
RGC1-blb	Q K C T T S K M E C L R	365
RGC4-blb	H P H S L Q K A C L R	419
Rpi-blb	ERAWEHVRDPSPIWNLPQDESSILPALRLSYHOLPLDLQCFAYCAVFPKDKMEKEKLIS	426
RGC3-blb	E H R V T A N A	425
RGC1-blb	SE E N V H R T I Y A	425
RGC4-blb	SE N E S H R T I N T	479
Rpi-blb	LWMANGFLLSKGNMELEDVGDEVWKNELYLRSPFQIEVKDGKTYFKmbdlhldlatsLFS	486
RGC3-blb	F L N N E S	485
RGC1-blb	S N N N S	485
RGC4-blb	L N N A S N I	539
Rpi-blb	ANTSSSNIRBINKH-----SYTHMMSIGFAEVVFFYTLPPLEKFIISLRVLNLGDS	536
RGC3-blb	AN-----YDGY SS SPSL Q V RN	535
RGC1-blb	SA RS Q VKDDEDMFIVTN KD S SS SPSLFKR V SN	545
RGC4-blb	SA CG VK-----D K T V A SS SPSL K V SY	589
Rpi-blb	TFNKLFPSSIGDLVHLRYLNLVG-SGMRSLPKQLCKLQNLQTLQYCTKLCCLPKETSKL	595
RGC3-blb	NL Q D S N F R I N R H D S S Q	595
RGC1-blb	E EQ V D S -N K I C R Y N Q S S Q	604
RGC4-blb	KLEQ L D S C -N N F E R V H N Y S N Q	648
Rpi-blb	GSRLNLLDQSSSLTCHPFRIGSLTCLKTGQFVVGKKGQYQLGELGNLNLGYSIKISHL	655
RGC3-blb	-C ST L S S C I K R K S T K	654
RGC1-blb	C V H -C P S L Y E R R R A S T	663
RGC4-blb	S H V V -C P S T L F I S K C S T	707
Rpi-blb	ERVKNDKDAKEANLSAKGNLSLSMSWNNFGPHIYESEEVKLEALKPHSNLTSLSKIYGF	715
RGC3-blb	D K S A C L D L D K R D ---E K Y E N	711
RGC1-blb	ME A D -R N R P K Y E I D	721
RGC4-blb	T - A Q D D N R K P K Y E I A	766

Rpi-b1b	RGHLPFWNNHSLVKNIVSILISNFRNCSCLPFGOLPCLESLELHWGSADVEYVEEVDI	775
RG3-b1b	G R D Q V R RGCE E T DN--	769
RG1-b1b	C FC D V GCE E QD VE DS--	779
RG4-b1b	G FRF S I ERVI VR KSCK L E N QN E D--	824
Rpi-b1b	DVHSGFFTRIRFPSLRKLDIWDGSLKGLKEGEEQFVLEEMIIHECPFLTL-----	830
RG3-b1b	- P ----- V SN K TFIW MFVPTLSSV	823
RG1-b1b	--- L R H GG CN QRMK A K SD MFVPTLSSV	835
RG4-b1b	R S RS K R FR M E K M A LY LFVPTLSSV	884
Rpi-b1b	-----SNLRALTSLRICYNKATSFEEMFKNLANKVLTISRCNNLK	873
RG3-b1b	KTILKVI-ATDATVLRSI D SN VE L S N FFR	882
RG1-b1b	KKLEIWGEADAGGLSSI ST K FS HTV LL E I SV FLE	895
RG4-b1b	KKLEVHGNTNTRGLSSI ST GA YR L TS T EF SFFDFK	944
Rpi-b1b	ELPTSLASLNALKSLKIQLCALESIPEEGLEGLSSLTFLVEMHMLKCLPEGLQHLTT	933
RG3-b1b	PEF N VK T S SN M A	942
RG1-b1b	N C D RY Y	955
RG4-b1b	D T R Q ES DS F Q T Q KY K A	1004
Rpi-b1b	LTSLKIRGCPQLIKRCEGIGEDWHKISHIPNVNIYI	970
RG3-b1b	T T TQ IVF R A YLTLE	979
RG1-b1b		992
RG4-b1b	N GVS EVE O E A LD H-	1040

Dir. 10A

Rpi-b1b	NAAFTQVLLNLSFLKSELVLLFGQDEFQRLSSMFSTIQAVLEDAQEKQLNKKPLEN	60
RG3-b1b	V D	60
SH10-tub	I N	60
RG1-b1b	L F IQ GV EK KK H KY AIK	60
B149-b1b	F IQ GV EK KK H KY AIK	60
SH20-tub	E I IQ G L END ENI R KD AIK	60
T118-tar	E I IQ G L EN ENI R KD AIK	60
RG4-b1b	L E IGDK I EK CER V Q KD AIE	60
Rpi-b1b	WLQKLNAATYEDDOILOYKTKATFSQSEYGRYHFKVIFPRKVGKFMDDQVMKKLKAIA	120
RG3-b1b	L N	120
SH10-tub	AY N	120
RG1-b1b	V A DC E A K AVL RT T CY KEM E D	120
B149-b1b	V A DC E A K AVL RT T CY KEM E D	120
SH20-tub	V K L C -- A LE RL CH A V I IKEM E D	118
T118-tar	A K L C -- A LE RL H A V I IKEM E D	118
RG4-b1b	S A G C NE I E RL F GI W I R KEI E D S	120
Rpi-b1b	EERKNFHLHEKIVERQAVR--RETG-----	143
RG3-b1b	Q I AT--	143
SH10-tub	I A -- Q	143
RG1-b1b	R D R I A -- Q	143
B149-b1b	R D R I A -- Q	143
SH20-tub	K TD I VA --P	141
T118-tar	K TD I VA --P	141
RG4-b1b	RK FL T AAAT VGMQMGWALEYKRLLLGLVHRMSLRHMHVSTCTL	180
Rpi-b1b	-----SVLTPQVIGRDEIKVILINNVSDAQHLSVLpilgmgl	186
RG3-b1b	K	186
SH10-tub	E	186
RG1-b1b	-----F K E E YSEVP	186
B149-b1b	-----F K E E YSEVP	186
SH20-tub	-----F E N E	184
T118-tar	-----P E N LE	184
RG4-b1b	YEFKYLCTPKVGARRCF K E NV EE P F I	240
Rpi-b1b	gkttlaQWVFNDQVTERFHSKINICVSEDQDEKRLIKAIVESIEGRPLLGEMLDAPLQK	246
RG3-b1b	S R YP D KS S-D	245
SH10-tub	I L I KS G-D	246
RG1-b1b	I NL V D KS G-D	245
B149-b1b	I NL V D KS G-D	245
SH20-tub	YD D EN IGN - SS DVK SF	243
T118-tar	YD D ET IGN - SS DVK SF	243
RG4-b1b	I E K NP V D T IGN - SSPHVE SF	299
Rpi-b1b	KIQELLNGKryllvlddwvREDQQENANLRAVLKVGASGASvlttLEKVGSIJMTLQP	306
RG3-b1b	F H F	305
SH10-tub	F F A	305
RG1-b1b	F E D I I I I L	305
B149-b1b	F E D I I I I L	305
SH20-tub	Q D V	303
T118-tub	Q D A	303
RG4-b1b	Q D L E K T R I A	359
Rpi-b1b	YELSMLSQEDCNLLFMORAFGHOSHINPLVAIGKEIVKSSGgvplekttlggILCFKRE	366
RG3-b1b	P F C R	365
SH10-tub	I C C R	366
RG1-b1b	Q K C T TS K ME C L R	365
B149-b1b	Q K C T TS K ME C L R	365
SH20-tub	Q D I R S L R	363
T118-tar	Q D I YR S L R	363
RG4-b1b	H PH SL Q K A C L R	419
Rpi-b1b	ERANEHVRDSPIINWLPQDESSILPALALSYHQLPLDLKqcfaycavfPKDAKMEKELIS	426
RG3-b1b	S E R H A V T A N A	425
SH10-tub	S E NV H R T I Y A	425
RG1-b1b	SE E NV H R T I Y A	425
B149-b1b	SE E NV H R T I Y A	425
SH20-tub	KE E M H A R T K V	423
T118-tar	KE E M V H R T K V	423
RG4-b1b	SE NE S H R T I N T	479
Rpi-b1b	LWMAHGFLSKGNMELEDVGDEVKELYLRFFQELEVKDGKTYFQmldlhdJATSLS	486
RG3-b1b	F L N ES	485
SH10-tub	LE KLQF N S C A C H	486
RG1-b1b	S S N S S H	485

BI49-blb	S		N	H		G	S		M	485
SH20-tub		RR L	RR G	W			RY N			487
TI18-tar		RR L	N	H			RY N			483
RG44-blb		L	N	H		A	S N	I		539
Rpi-blb	ANTSSNIREINKH-----SYTHMMSIGFAEVVPPYTLFPLEKFIISLEVLMAOS									536
RG43-blb		AN-----	YGOY			SS	SPSL Q	V	RN	535
SH10-tub	S		VK-----	G	K	T	SS	SPSLQ	V	SNL
RG41-blb	SA	RS	Q	VKDDENMFIVTH	XD	S	SS	SPSLFKR	V	SN
SH19-blb	SA	RS	Q	VKDDENMFIVTH	XD	S	SS	SPSLFKR	V	SN
SH20-tub			VE-----			S	SS	SPSL Q	V	SY
TI18-tar			VE-----			S	SS	SPSL Q	V	SY
RG44-blb	SA	CG	VK-----	D	K	TV	A	SS	SPSL K	V
Rpi-blb	TPMKLSSIGDLVHLRYLNLTY-SQWRSLPKQCKLQNLQTLQLQYCTLCCLPKMETSXL									595
RG43-blb	RL Q			D	S	WFI	N	R	R	H
SH10-tub	H	ES	S		W	C	D	SEN	I	HN
RG41-blb	E	EQ	V		D	S	-NKIC	R		YN
SH19-blb	E	EQ	V		D	S	-NKIC	R		YN
SH20-tub	K	EE			MD	SNIEI				R
TI18-tar	K	EE			MD	SNIEI				R
RG44-blb	KLEQ		L		D	SC-NMF	ER		VHN	YS
Rpi-blb	GSLRLLLDGSSSLTCMPFRIGSLTCLKTLOQPVVGRKGYQLGELQNLNLYGSIKISHL									655
RG43-blb			-C	ST	L	S	SC	I	TR	K
SH10-tub			PFH	COE	MS	L	F	KWIC	I	K
RG41-blb	C		V	H-CP	S	L		Y	ER	R
SH19-blb	C		V	DH	CP	S	L		Y	ER
SH20-tub			H	CHR	RT			S	K	S
TI18-tar			H	CHR	RT			S		S
RG44-blb	S	H	VV	-CP	ST	L		F	I	S
Rpi-blb	ERVNDKDAKRAANLSAKGNLHLSHNSWNNFPGPHIYESSEVKVLEALKPHSNLTSKIXGP									715
RG43-blb	D	K	S		A	CL	DLD	K	R	D
SH10-tub		VM				I	N	SRKG		R
RG41-blb		ME		A		D	-R	NR		P
SH19-blb		ME		A		D	-R	NR		P
SH20-tub		E		E		K	DDDE	R	E	C
TI18-tar		E		E		K	DDDE	R	E	C
RG44-blb		T		A	Q	D	D	NR	K	P
Rpi-blb	RGINLPENMNSHVLKNIVSILISWFFNCSCPLPPGDLPCLESLELWGSADVEYVEEVDI									775
RG43-blb	G	R	D	Q		V	E	R	GCE	E
SH10-tub		FRF		V	E	GCK		E	KR	OK
RG41-blb	C	FC	D		V	GCE		E	QD	VE
SH19-blb	C	FC	D		V	GCE		E	QD	VE
SH20-tub		R	D		L	E	GCK		YR	--
TI18-tar		R	D		L	E	GCK		Q	YR
RG44-blb	G	FRF	S	I		EKVL	VR	KSCK	L	E
Rpi-blb	OVMSOPFTRIRFPFLAKLDIHWFGSLKGLLKEGEQFVLEEMIMHCPTLTL-----									830
RG43-blb		F	-----	V	SN			K		TFW
SH10-tub			R		F	GE	PN			R
RG41-blb			L	R		H	GG	CN	QRMK	S
SH19-blb			L	R		H	GG	CN	QRMK	A
SH20-tub			D		L	C	CK	DN	G	E
TI18-tar			D		L	C	CK	DN	V	G
RG44-blb			R	S	RS	K	R	F	R	M
Rpi-blb	-----SNLRALTSRLICTNKVATSPPEMFKNLANKYLTISRCNNLR									873
RG43-blb		NTLKVI	-ATDATVLR	SI		D	SN	VE	L	S
SH10-tub			-----	F		H	SH	NE	L	I
RG41-blb			KKLEIWGEADAGGLSSI	ST		K	FS	HTV	LL	E
SH19-blb			KKLEIWGEADAGGLSSI	ST		K	FS	HTV	LL	E
SH20-tub			-----P	K		N	SD	E	S	N
TI18-tar			-----	K		N	SD	E	KS	N
RG44-blb			KKLEVHGNINTRGLSSI	ST		GA	YR	L	T	S
Rpi-blb	ELPTSILASNALSKLKIQLCCALESPEEGLEGSLSTELFVHKQNMKCLPEGLQHLTT									933
RG43-blb			-----	F	EP	N		VK	T	S
SH10-tub		S	C		T	E	HS	S		VK
RG41-blb				N	C	D	RY	Y		YD
SH19-blb				N	C	D	RY	Y		E
SH20-tub						W	MI	K	VK	T
TI18-tar						W	I	VK	T	I
RG44-blb	D	T		R	Q	ES	DS	F	Q	T
Rpi-blb	LTSKIRGCPQLIKRCKEIGEDMHKISHIPNVIYI									970
RG43-blb			TY	TQ	IVP		R	A	YLTL	E
SH10-tub			L	R						
RG41-blb										
SH19-blb										
SH20-tub										
TI18-tar										
RG44-blb										

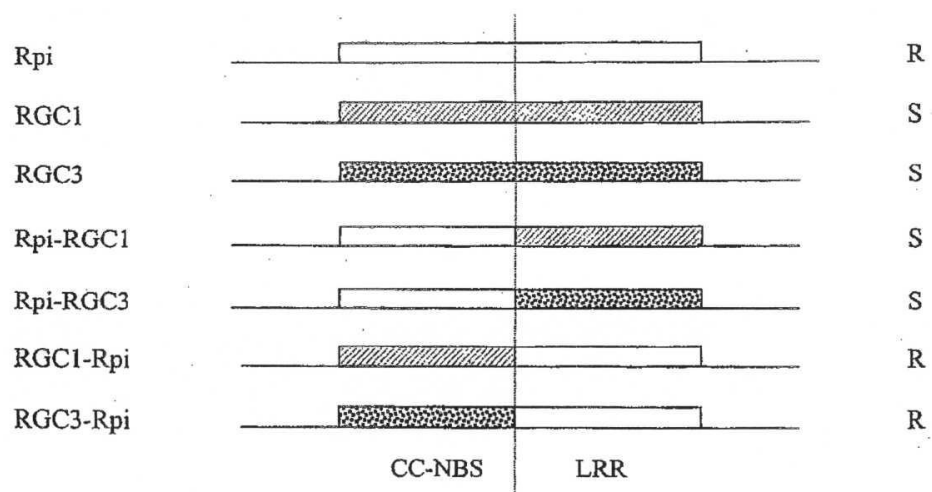


Fig. 11