



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119742** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

A01H 5/00

C12N 15/29 (2006.01)

A01H 1/02 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

A23L 7/10 (2016.01)

C07K 14/415 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 02663</p> <p>(22) Дата подання заявки: 22.08.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.08.2019</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2012903673</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 24.08.2012</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: AU</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.08.2015, Бюл.№ 16</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.08.2019, Бюл.№ 15</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/AU2013/000942, 22.08.2013</p>	<p>(72) Винахідник(и): Чендлер Пітер Майкл (AU), Хардінг Керол Енн (AU)</p> <p>(73) Власник(и): КОММОНВЕЛТ САЙНТІФІК ЕНД ІНДАСТРІЕЛ РІСЕРЧ ОРГАНІЗЕЙШН, Limestone Avenue, Campbell, Australian Capital Territory 2612, Australia (AU), ГРЕЙНЗ РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КОРПОРЕЙШН, Level 4, 4 National Circuit, Barton, ACT 2600, Australia (AU)</p> <p>(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WU J. et al. Dominant and pleiotropic effects of a GAI gene in wheat results from a lack of Interaction between DELLA and GID1. Plant physiology, 2011, Vol. 157, no. 4, P. 2120 – 2130 AIXIA LI et al. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene, -, and development of an allele-specific PCR marker. Molecular breeding, Kluwer academic publishers, DO, 2012, Vol. 30, no. 3, P. 1443 – 1451 GOODING M.J. et al. Reduced height alleles () and Hagberg falling number of wheat. Journal of cereal science, Academic press LTD, GB, 2012, Vol. 55, no. 3, P. 305 – 311 PEARCE S. et al. Molecular characterization of Rht-1 dwarfing genes in hexaploid wheat. Plant physiology, 2011, Vol. 157, P. 1820 – 1831 CHANDLER P.M. et al. "Overgrowth" mutants in barley and wheat: new alleles and phenotypes of the "green revolution" DELLA gene. Journal of experimental botany, 2013, Vol. 64, no. 6, P. 1603 – 1613</p>
---	---

(54) РОСЛИНА ПШЕНИЦІ З НОВИМИ АЛЕЛЯМИ Rht-B1

(57) Реферат:

Винахід стосується рослини пшениці або зерна пшениці, що несуть алель Rht-B1, кодуєчий поліпептид Rht-B1, причому поліпептид містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, у якому амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO: 5, яка додатково містить щонайменше вставку

UA 119742 C2

амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 14 або її варіанту між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO: 5, де варіант послідовності відрізняється від SEQ ID NO: 14 амінокислотними замінами, вставками або делеціями з не більше ніж 5 амінокислот, і (ii) одну або декілька замін амінокислот в С-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO: 5.

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід стосується мутантів пшениці з посиленням росту, що несуть змінений алель Rht-B1c. Додатково даний винахід стосується зерна таких рослин і продуктів, одержуваних з такого зерна.

5 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ, ЩО ПЕРЕДУЄ ВІНАХОДУ

Рослини реагують на стимули розвитку, фізіологічні стимули і зовнішні стимули зміною швидкості росту своїх частин або у цілому. Описана множина механізмів, що включають зміни вмісту класів рослинних гормонів гіберелінів (GA) (розглянуто в Yamaguchi, 2008) або сигнальних компонентів, що включають GA, таких як білки GID1 і DELLA (розглянуто у Sun, 10 2010). Це приводить до динамічної регуляції передачі сигналу GA так, що ріст скоординований з передачею сигналу від інших гормональних регуляторних шляхів і з факторами навколишнього середовища, такими як світло, температура і доступність води (Hartweck, 2008; Achard and Genschik, 2009; Kurpusamy et al., 2009). Для пояснення добових відмінностей у швидкості росту була передбачена синхронізація передачі сигналу GA циркадними годинником (Arana et al., 15 2011).

У рослин охарактеризований ряд мутантів по гіберелінах (GA), мимовільних по походженню або ідентифікованих після мутагенезу. Вони включають чітко виражені карликові і подовжені ("потоншені", "slender") фенотипи, які, як правило, є результатом змін вмісту GA або передачі сигналу GA. Ідентифікація залучених генів і аналіз білків, які вони кодують, сприяли досягненню розуміння регуляції росту за допомогою GA, зокрема у модельних видів рису і Arabidopsis. Біоактивні GA зв'язуються з білком-рецептором GA ("GID1", Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008) і формують комплекс, який потім зв'язується білками DELLA, які ідентифіковані як підродина сімейства факторів транскрипції GRAS (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007; Hirano et al., 2010), що функціонує як інгібітори росту. В одному з випадків факти 20 дозволяють передбачати, що зв'язування DELLA з факторами транскрипції PIF запобігає стимуляції ними експресії генів, необхідних для посиленого росту (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008).

Особливий інтерес представляють мутанти Della ячменю і рису, оскільки вони включають два суттєво відмінні фенотипи: сильно подовжені "потоншені" типи і "нечутливі до GA" карликові форми. Перша ознака є рецесивною і характеризується екстремальною відповіддю на GA, тоді як остання ознака є домінантною або напівдомінантною. До цих зовсім різних фенотипів ("подовжений потоншений" або "карликовий потоншений", Ikeda et al., 2001; Chandler et al., 2002; Asano et al., 2009) приводять різні одонуклеотидні заміни в гені Slender1, кодуючому DELLA. Перший з фенотипів включає мутації, що усувають здатність DELLA репресувати ріст, а 35 останній виявляється внаслідок накопичення DELLA через нездатність зв'язуватися з комплексом GA-GID1.

Як правило, пшениця є гексаплоїдною, і DELLA кодують три гомологічних гени (Rht-A1, Rht-B1, Rht-D1) у хромосомах 4AL, 4BS і 4DS геномів пшениці A, B і D, відповідно, де "L" означає довге плече хромосоми, а "S" означає коротке плече хромосоми. Це робило вивчення мутантів пшениці більш складним, і, таким чином, відносно пшениці відомо менше в порівнянні з рисом і ячменем. Для геномів B і D описані "нечутливі до GA" алелі напівкарликовості (Peng et al., 1999; Pearce et al., 2011). Один із прикладів алеля екстремальної карликовості є алель Rht-B1c у геномі B, що є результатом вставки елемента ДНК. Теоретично розраховано, що більшість цих вставок у транскрипті гена піддається сплайсингу, але залишаються 90 нуклеотидів, і це 45 приводить до очікуваної вставки в рамку зчитування DELLA 30 амінокислот (Pearce et al., 2011; Wu et al., 2011).

Гени напівкарликовості були помічені при розведенні пшениці і рису з часу сільськогосподарської революції через їх позитивний вплив на врожайність. Помірне (10-20 %) зменшення висоти напівкарликів відбувається внаслідок дефіциту стимуляції росту ендегенним GA. У рису це відбувається в результаті такої мутації в гені біосинтезу GA, що присутньо менше 50 активного GA (Monna et al., 2002; Sasaki et al., 2002; Spielmeier et al., 2002). На відміну від цього, у пшениці мутації карликовості в гені Della приводять до росту, що відносно "нечутливий" до GA (Peng et al., 1999). Вихідні мутації напівкарликовості за походженням були спонтанними, і їх агротехнічне значення очевидне через їх тривале широке використання в сучасних сортах 55 через 50 років після першого застосування. Однак існуючі алелі Rht мають декілька недоліків.

Таким чином, залишається необхідність у поліпшених сортах напівкарликової пшениці.

СУТЬ ВІНАХОДУ

У першому аспекті даний винахід стосується рослини пшениці, що несе алель Rht-B1, кодуючий поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, де 60 амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична

амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у С-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5.

5 У другому аспекті даний винахід стосується рослини пшениці, що несе алель Rht-B1, кодуючий поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше вставкою однієї або
10 декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5, і де нуклеотидна послідовність алеля Rht-B1 відрізняється від нуклеотидної послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:1, щонайменше присутністю мутації ділянки сплайсингу інтрона.

У третьому аспекті даний винахід стосується зерна пшениці, що несе алель Rht-B1, кодуючий поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де
15 амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у С-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5.

20 У четвертому аспекті даний винахід стосується зерна пшениці, що несе алель Rht-B1, кодуючий поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше вставкою однієї або
25 декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5, і де нуклеотидна послідовність алеля Rht-B1 відрізняється від нуклеотидної послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:1, щонайменше присутністю мутації ділянки сплайсингу інтрона.

У п'ятому аспекті даний винахід стосується клітини пшениці, що несе алель Rht-B1, кодуючий поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де
30 амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у С-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5. У переважному варіанті здійснення клітина пшениці являє собою клітину ендосперму пшениці. Такі клітини ендосперму пшениці не здатні до регенерації в рослину пшениці.

У шостому аспекті даний винахід стосується клітини пшениці, що несе алель Rht-B1, кодуючий поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де
40 амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5, і де нуклеотидна послідовність алеля Rht-B1 відрізняється від нуклеотидної послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:1, щонайменше присутністю мутації ділянки сплайсингу інтрона. У переважному варіанті
45 здійснення клітина пшениці являє собою клітину ендосперму пшениці. Такі клітини ендосперму пшениці не здатні до регенерації в рослину пшениці.

У сьомому аспекті даний винахід стосується молекули нуклеїнової кислоти, кодуючої поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична
50 амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у С-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5. Такі молекули нуклеїнової кислоти не зустрічаються в природі. Молекула нуклеїнової кислоти може
55 бути виділена або знаходитися як трансген в трансгенній рослині.

У восьмому аспекті даний винахід стосується молекули нуклеїнової кислоти, кодуючої поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична
60 амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше вставкою однієї або

декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5, і де нуклеотидна послідовність алеля Rht-B1 відрізняється від нуклеотидної послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:1, щонайменше присутністю мутації ділянки сплайсингу інтрона. Такі молекули нуклеїнової кислоти не зустрічаються в природі. Молекула нуклеїнової кислоти може бути виділена або знаходитися як трансген в трансгенній рослині.

У дев'ятому аспекті даний винахід стосується поліпептиду Rht-B1, що містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у C-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5.

У десятому аспекті даний винахід стосується виділеного олігонуклеотиду, що містить щонайменше 19 суміжних нуклеотидів полінуклеотиду за сьомим або восьмим аспектом даного винаходу, де 19 суміжних нуклеотидів містять щонайменше одну з заміни нуклеотидів, вибраних із групи, що складається з G2715A, G2726A, G2747A, G2829A, G2831A, G2849A, C2865T, C2966T, C2972T, G3065A, C3117T, G3477A, C3507T, C3519T, G3624A, G2792A, CC2108TA, G3047A, G2864A, G3671A, G148A, G148T, G147A, G2084A і G2083A, відносно SEQ ID NO:1 або повністю комплементарні йому.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1. Приклад виділення мутантів пшениці з посиленням ростом за допомогою скринінгу в лотках. Один з мутантних паростків, що характеризується збільшеною швидкістю росту, зазначений стрілкою.

Фігура 2. Мутанти пшениці з посиленням ростом, вирощувані в контрольованих умовах, у порівнянні з батьківськими (карликовими) рослинами і рослинами дикого типу (високорослими). Зліва направо: похідні Maringa, що несуть Rht-B1c (карликовість), Rht-B1a (високорослість) або три різні похідні Rht-B1c з посиленням ростом. Три похідні з посиленням ростом відрізняються по їх кінцевій висоті, і стрілки вказують на верхівку кожної лінії. Два з похідних є напівкарликовими, третє є високорослим як дикий тип.

Фігура 3. Схематичне зображення ділянок заміни амінокислот у мутантів ячменю з посиленням ростом (верхні стрілки) і пшениці (нижні стрілки) у C-кінцевому домені GRAS поліпептидів DELLA. Зазначені консервативні амінокислотні області.

Фігура 4. Паростки ячменю одного і того ж віку (зліва направо) Himalaya (WT), M463 (grd2b), TR261 (grd2b, sln1m), M240 (sln1m), M640 (Sln1d), TR107 (Sln1d.10), TR60 (Sln1d.8).

Фігура 5. Змінена морфологія в деяких мутантних лініях пшениці. Приклад нормальної (зліва) і аномальної (справа) морфології, де останній випадок характеризується вузькими листами, тонкими стеблами, слабо розвиненою кореневою системою і, у деяких випадках, колоссям з зернами, меншими ніж нормальні.

Фігура 6. Аналіз ПЛР дуплексів ДНК (від l до r): контрольних rht-1 Maringá, Rht-B1c Maringá; двох ліній з посиленням ростом з аномальною морфологією; двох ліній з посиленням ростом з нормальною морфологією; контролю без матричної ДНК. Зліва представлені маркери розміру. Верхня смуга являє собою ампліфікацію фрагмента алеля Rht-B1c, а нижня смуга являє собою продукт гена Rht-D1.

Фігура 7. Вирівнювання ClustalW амінокислотних послідовностей, кодованих Rht-A1a (JF930277), Rht-B1 (JF930278) і Rht-D1a (JF930281) у пшениці.

Фігура 8. Вирівнювання поліпептиду Rht-B1a пшениці (SEQ ID NO:5, верхня послідовність) і білка GAI Arabidopsis thaliana (номер доступу CAA75492, нижня послідовність) за допомогою Blastp. Зірочки вказують амінокислоти, що є ідентичними (консервативними) у двох поліпептидах, а символи "+" означають подібні, але не ідентичні амінокислоти.

Примітки до списку послідовностей

SEQ ID NO:1 демонструє нуклеотидну послідовність довжиною 3892 нуклеотидів гена Rht-B1c Maringa/Rht-B1c, починаючи від ATG кодуєчої області білка до TGA на кінці кодуєчої області. Вставка ретротранспозона довжиною 2026 нуклеотидів у ген Rht-B1 з одержанням Rht-B1c знаходиться безпосередньо після перших 147 нуклеотидів.

SEQ ID NO:2 демонструє нуклеотидну послідовність кДНК довжиною 1956 нуклеотидів, що відповідає алелю Rht-B1c у пшениці Maringa/Rht-B1c. Послідовність майже ідентична нуклеотидній послідовності, наданій під номером доступу GeneBank JN857971 (Wu et al., 2011), відрізняючись тільки по 2 нуклеотидах у положеннях 813 і 1851. Вставка 90 нуклеотидів у кДНК відносно кДНК алеля Rht-B1a відповідає нуклеотидам 148-237 SEQ ID NO:2.

SEQ ID NO:3 демонструє амінокислотну послідовність поліпептиду довжиною 651 амінокислот, кодованого алелем Rht-B1c, тобто кодованого геном з нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO:1 і кДНК SEQ ID NO:2. Вставка довжиною 30 амінокислот у поліпептид відносно поліпептиду Rht-B1a являє собою амінокислоти 50-79 SEQ ID NO:3.

5 SEQ ID NO:4 демонструє нуклеотидну послідовність кДНК, що відповідає алелю Rht-B1a (дикого типу), починаючи з кодону старту трансляції ATG (Pearce et al., 2011) (номер доступу GeneBank JF930278).

SEQ ID NO:5 демонструє амінокислотну послідовність поліпептиду Rht-B1a (дикого типу) (номер доступу Genbank JF930278), 621 амінокислота.

10 SEQ ID NO:6 демонструє нуклеотидну послідовність довжиною 7057 нуклеотидів гена Rht1-B1b *Triticum aestivum* для (номер доступу GeneBank FN649763) з культивуру Xiaoyan54. Нуклеотиди 1-2136 відповідають промотору і 5'-UTR Rht-B1b, нуклеотиди 2137-4002 відповідають кодуючій області білка, що переривається нуклеотидною заміною з С на Т у положенні 2326 відносно дикого типу, і нуклеотиди 4003-7057 відповідають 3'-UTR Rht-B1b і 3'-області гена.

15 SEQ ID NO:7 демонструє послідовність поліпептиду довжиною 555 амінокислот, кодованого Rht-B1b, що являє собою укорочений на N-кінці білок Rht-B1, з видаленими першими 66 амінокислотами відносно Rht-B1a дикого типу. Трансляція реініціюється з амінокислоти 67.

20 SEQ ID NO:8 демонструє нуклеотидну послідовність гена Rht-A1a *Triticum aestivum* (Rht-A1 дикого типу) довжиною 3463 нуклеотидів (номер доступу GeneBank JF930277). Нуклеотиди 1-1600 відповідають промотору і 5'-UTR Rht-A1a, а нуклеотиди 1601-3463 відповідають кодуючій області білка, Rht-A1a. Кодуюча область білка на 96 % ідентична кодуючій області Rht-B1a.

SEQ ID NO:9 демонструє послідовність поліпептиду Rht-A1a (дикого типу) довжиною 620 амінокислот.

25 SEQ ID NO:10 демонструє послідовність довжиною 1872 нуклеотиди кДНК, що відповідає гену Rht-D1a (номер доступу Genbank AJ242531).

SEQ ID NO:11 демонструє послідовність поліпептиду Rht-D1 довжиною 623 амінокислоти (номер доступу JF930281).

30 SEQ ID NO:12 демонструє послідовність гена ячменю *Sln1* довжиною 618 амінокислот (номер доступу AK372064).

SEQ ID NO:13 демонструє послідовність поліпептиду *GAI Arabidopsis thaliana* (номер доступу CAA75492).

SEQ ID NO:14 демонструє амінокислотну послідовність вставки 30 амінокислот у поліпептид Rht-B1c.

35 SEQ ID NO:15 демонструє послідовність довжиною 11 амінокислот мотиву "Della" у поліпептиді Rht-B1a дикого типу пшениці, що переривається в поліпептиді Rht-B1c.

SEQ ID NO:16 демонструє нуклеотидну послідовність гена Rht-B1c (номер доступу JN857970, Wu et al., 2011). кДНК відповідає нуклеотидам 206-352, об'єднаним з 2289-4097.

SEQ ID NO:17-30 демонструють нуклеотидні послідовності олігонуклеотидних праймерів.

40 ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Рослини

Даний винахід стосується рослин пшениці, їх частин, таких як зерно пшениці, продуктів, одержуваних з цих рослин і зерна, таких як харчові інгредієнти і харчові продукти, і способів їх одержання і використання. Як використовують у даному документі, термін "пшениця" означає рослину, частину рослини, зерно або одержуваний з них продукт, що належать до видів *Triticum aestivum* L. або *Triticum turgidum* підвиду *durum* або тритикале. *Triticum aestivum* L., також відома як хлібопекарська пшениця, являє собою гексаплоїдну пшеницю з організацією геному AABBDD, що містить 42 хромосоми. Субгеноми "A", "B" і "D" *Triticum aestivum* L. часто позначають як "геноми". *Triticum turgidum* підвиду *durum*, часто позначуваний як пшениця твердих сортів, являє собою тетраплоїдну пшеницю з організацією геному AABB, що містить 28 хромосом. Диплоїдні предки гексаплоїдної або тетраплоїдної пшениці включають вид *Triticum*, такий як *T. urartu*, *T. monococcum* або *T. boeoticum* для геному A, *Aegilops speltoides* для геному B і *T. tauschii* (також відома як *Aegilops squarrosa* або *Aegilops tauschii*) для геному D, але вони не включені в "пшеницю", як її використовують у даному документі. Однак рослини, які одержують загальноприйнятими способами з використанням *Triticum aestivum* L. як батька в статевому схрещуванні з видом *Secale cereale* (жито), що не є *Triticum*, де це гібридне потомство позначають у даному документі як тритикале, включені в "пшеницю", як її використовують у даному документі. Переважно, для комерційного одержання зерна придатна така рослина пшениці, як комерційні сорти хлібопекарської пшениці або пшениці твердих сортів із придатними агрономічними характеристиками, що відомі фахівцям у даній галузі.

У першому аспекті даний винахід стосується рослини пшениці, що несе алель Rht-B1, кодуючий варіант (не є диким типом) поліпептиду Rht-B1, переважно гомозиготної по алелю Rht-B1. У варіантах здійснення рослина пшениці несе алель Rht-B1, вибраний із групи, що складається з Rht-B1c.1, Rht-B1c.2, Rht-B1c.3, Rht-B1c.4, Rht-B1c.5, Rht-B1c.6, Rht-B1c.7, Rht-B1c.8, Rht-B1c.9, Rht-B1c.10, Rht-B1c.12, Rht-B1c.15, Rht-B1c.16, Rht-B1c.17, Rht-B1c.18, Rht-B1c.21, Rht-B1c.22, Rht-B1c.23, Rht-B1c.24, Rht-B1c.26, Rht-B1c.27, Rht-B1c.28, Rht-B1c.29, Rht-B1c.30 і Rht-B1c.32, і переважно гомозиготна по цьому алелю. У переважних варіантах здійснення рослина пшениці несе алель Rht-B1, вибраний із групи, що складається з Rht-B1c.22, Rht-B1c.23, Rht-B1c.24 і Rht-B1c.26, і переважно гомозиготна по цьому алелю. В одному з варіантів здійснення поліпептид Rht-B1 містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у C-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5. У SEQ ID NO:5 зазначена амінокислотна послідовність білка пшениці Rht-B1a дикого типу з довжиною в 621 амінокислоту, який у пшениці кодує алель Rht-B1a дикого типу і який використовують у даному документі як вихідну послідовність поліпептиду Rht-B1 дикого типу.

Альтернативно, амінокислотна послідовність варіанта поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше вставкою однієї або декількох амінокислот приблизно між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5, а нуклеотидна послідовність алеля Rht-B1, кодуюча варіант поліпептиду Rht-B1, відрізняється від нуклеотидної послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:1, щонайменше присутністю мутації в ділянці сплайсингу інтрона або поруч з нею так, що зачіпає інтрон-сплайсинг транскрипту РНК алеля Rht-B1. Як використовують у даному документі, "ділянка сплайсингу інтрона" означає 4 нуклеотиди, що складають екзон-інтронне зчленування, а саме 2 нуклеотиди з 5'-кінця і 2 нуклеотиди з 3'-кінця від екзон-інтронного зчленування. Як використовують у даному документі, "прилеглі до ділянки сплайсингу інтрона" означає 3 нуклеотиди з 5'-кінця і 3 нуклеотиди з 3'-кінця від ділянки сплайсингу інтрона. У SEQ ID NO:1 зазначена нуклеотидна послідовність кодуючої області білка алеля Rht-B1c, одержана на генетичній основі сорту пшениці Maringa, починаючи з кодону ініціації трансляції ATG до кодону термінації трансляції TGA. SEQ ID NO:1 містить ретротранспозонну вставку довжиною 2026 нуклеотидів (нуклеотиди 148-2173), що вставлена в ген Rht-B1 з формуванням алеля Rht-B1c (Wu et al., 2011). У цьому варіанті здійснення амінокислотна послідовність поліпептиду, кодованого алелем Rht-B1, може бути ідентична SEQ ID NO:3 або вона може відрізнятися. Алель Rht-B1 може містити мутацію сплайсингу інтронів і кодувати поліпептид з відмінностями (i) і (ii), описаними в попередньому абзаці, або, у переважному варіанті здійснення, поліпептид містить відмінності (i) і (ii), описані вище, і не містить ніякої мутації ділянки сплайсингу інтрона.

Як використовують у даному документі, "поліпептид Rht-B1" означає поліпептид, який в пшениці кодує алель Rht-B1. Як правило, поліпептид Rht-B1 містить N-кінцевий домен, зв'язаний з C-кінцевим доменом приблизно з 572 амінокислот, що щонайменше на 98 % ідентичний по амінокислотній послідовності з амінокислотами 50-621 SEQ ID NO:5. C-кінцевий домен містить те, що звичайно позначають як домен GRAS. В одному з варіантів здійснення довжина N-кінцевого домену складає приблизно від 49 до приблизно 79 амінокислот. У переважному варіанті здійснення довжина N-кінцевого домену складає приблизно 79 амінокислот з послідовністю, як, наприклад, амінокислоти 1-79 SEQ ID NO:3 або варіант з 1-5 замінами амінокислот відносно амінокислот 1-79 SEQ ID NO:3. У альтернативному варіанті здійснення поліпептид Rht-B1 одержаний з поліпептиду Rht-B1 дикого типу за допомогою укорочення на N-кінці, наприклад, як поліпептид Rht-B1b (SEQ ID NO:7), кодований алелем Rht-B1b, також відомим як ген Rht1. В одному з варіантів здійснення алель Rht-B1 кодує поліпептид Rht-B1, амінокислотна послідовність якого щонайменше на 98 % ідентична SEQ ID NO:3.

В одному з варіантів здійснення амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 не ідентична SEQ ID NO:5 і не ідентична SEQ ID NO:7, хоча вона може містити SEQ ID NO:7. В одному з варіантів здійснення, якщо амінокислотна послідовність поліпептиду ідентична SEQ ID NO:3, тоді алель Rht-B1 не містить нуклеотидної послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:1; замість цього він кодує варіант послідовності SEQ ID NO:1 з мутацією в ділянці сплайсингу інтрона або поруч з нею відносно SEQ ID NO:1. У переважному варіанті здійснення амінокислотна послідовність поліпептиду не ідентична SEQ ID NO:3. Таким чином, поліпептид відрізняється по послідовності від кожного з поліпептиду Rht-B1a (дикого типу), поліпептиду Rht-B1b і поліпептиду Rht-B1c. В одному з варіантів здійснення амінокислотна послідовність

поліпептиду відрізняється від амінокислотної послідовності Rht-B1a, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот в області поліпептиду, що відповідає амінокислотам 200-621 SEQ ID NO:5. Ця область поліпептиду Rht-B1a відповідає домену GRAS поліпептиду.

У переважному варіанті здійснення вставка однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 відносно поліпептиду Rht-B1a ((i) вище) являє собою вставку приблизно 30 амінокислот, послідовність яких переважно являє собою DSATPPDAPLVAAAGLAANETTHIKISANK (SEQ ID NO:14; відповідна амінокислотам 50-79 SEQ ID NO:3), або її варіант, де послідовність варіанта відрізняється від SEQ ID NO:14 замінами, вставками або видаленнями не більше 5 амінокислот, переважно 1 або 2 замінами амінокислот. Послідовність DSATPPDAPLVAAAGLAANETTHIKISANK (SEQ ID NO:14) являє собою послідовність вставки в поліпептид Rht-B1c відносно поліпептиду Rht-B1a. Ця вставка 30 амінокислот є результатом вставки в ген Rht-B1, яка формує алель Rht-B1c. Ця вставка знаходиться в межах так називаного мотиву DELLA (DELLAALGYKV; SEQ ID NO:15) поліпептиду Rht-B1, який передбачувано необхідний для взаємодії з рецепторним білком GA, GID1, так, що поліпептид із вставкою більше не зв'язує GID1. За допомогою мутагенезу можна одержувати варіанти цієї вставленої послідовності, і вважають, що заміни, вставки або делеції 1-5 амінокислот не впливають на втрату взаємодії поліпептиду з GID1.

В одному з варіантів здійснення поліпептид рослини пшениці додатково містить одну або декілька заміни амінокислот, переважно консервативні заміни амінокислот, в області поліпептиду, що відповідає амінокислотам 1-200 SEQ ID NO:5, також позначуваний як домен DELLA поліпептиду Rht-B1 дикого типу, оскільки вона містить амінокислотну послідовність DELLAALGYKV (SEQ ID NO:15), також позначувану як мотив DELLA. Однак переважно амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 за винаходом ідентична SEQ ID NO:3 у мутантному домені DELLA, тобто містить амінокислоти 1-230 SEQ ID NO:3.

У додаткових переважних варіантах здійснення проводять одну або декілька заміни амінокислот у С-кінцевому домені в області поліпептиду, що відповідає амінокислотам 200-621 SEQ ID NO:5. У переважному варіанті здійснення одна або декілька заміни амінокислот включають заміну амінокислоти, вибрану з групи, що складається з G260, V264, A271, G298, A299, A305, A310, P344, L346, G377, P394, R514, T524, S528, G563, V286, D371, A310, E579, S493, R283, R271, G274, A280, V234, R484, V285, G230, S488 і C240 відносно SEQ ID NO:3. Переважно заміна вибрана з групи, що складається з G260E, V264M, A271T, G298D, A299T, A305T, A310V, P344S, L346F, G377R, P394L, R514H, T524I, S528F, G563D, V286M, D371N, A310T, E579K, S493F, R283H, R271H, G274D, A280T, V234M, R484H, V285F, G230E, S488F і C240Y. У більш переважному варіанті здійснення алель Rht-B1 рослини пшениці містить варіант послідовності відносно SEQ ID NO:1, де варіант послідовності вибраний із групи, що складається з G2715A, G2726A, G2747A, G2829A, G2831A, G2849A, C2865T, C2966T, C2972T, G3065A, C3117T, G3477A, C3507T, C3519T, G3624A, G2792A, CC2108TA, G3047A, G2864A, G3671A, G148A, G148T, G147A, G2084A і G2083A. Ці варіанти послідовності відповідають замінам амінокислот, перерахованим безпосередньо вище, див. таблицю 3.

Переважно рослини пшениці за винаходом мають збільшену висоту рослини відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c, і знижену висоту відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a, коли рослини вирощують в однакових умовах. Таким чином, рослину пшениці за винаходом позначають як "напівкарликова". У переважному варіанті здійснення висота рослини пшениці за винаходом приблизно складає від 70 % до приблизно 94 % від висоти контрольної рослини, гомозиготної по алелю Rht-B1a ("високорослий фенотип"), більш переважно приблизно від 75 % до приблизно 90 % від висоти рослини, гомозиготної по алелю Rht-B1a. Для порівняння висота рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c ("карликова рослина"), складає приблизно 42 % від висоти рослини, гомозиготної по алелю Rht-B1a. Висота рослини пшениці за винаходом може бути приблизно такою ж або по суті такою ж, як висота рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1b, що складає приблизно 80-81 % від висоти високорослих рослин, або може бути менше висоти рослини Rht-B1b або більше висоти рослини Rht-B1b. Як використовують у даному документі, "висота рослини" означає висоту зрілої рослини від рівня ґрунту до верху найбільш високого стебла, тобто до основи колоса. Рослини, які гомозиготні по алелях Rht-B1c, Rht-B1a або Rht-B1b і які використовують як контролю при порівнянні, переважно мають по суті одну і ту ж генетичну основу, більш переважно є майже ізогенними лініями відносно рослини пшениці за винаходом; таким чином їх позначають "відповідна рослина пшениці, гомозиготна по алелю Rht-B1c (або Rht-B1a, або Rht-B1b)". Фахівці в даній галузі можуть легко вибрати відповідну рослину пшениці, яка придатна

для порівняння. Для проведення порівняння рослину за винаходом і контрольну рослину вирощують по суті в однакових часових умовах і умовах навколишнього середовища, наприклад у повторних польових випробуваннях, включаючи однакові температурний режим, умови освітлення, подачу живильних речовин і води і характеристики ґрунту. Переважно висоту

рослини вимірюють у вирощуваних у польових умовах рослин, хоча для порівняння також можна використовувати рослини, вирощувані в теплицях і зростаючі відповідно до польових випробувань, як відомо в даній галузі. Висоту рослин можна вимірювати в будь-який момент циклу росту, але переважно її вимірюють при дозріванні рослин.

Крім того рослина пшениці переважно має підвищену фертильність і/або продукує збільшену кількість зерна відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c, і/або має збільшену довжину колеоптилю відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c, і/або здатна продукувати зерно з більш тривалим станом спокою відносно зерна, одержуваного з рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a. Переважно, кількість зерна, продукованого рослиною, є по суті такою ж або більшою, ніж у відповідної рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1b. Як використовують у даному документі, "фертильність" визначають як кількість зерен у колосі, а "кількість зерен" або "вихід зерна, продукованого рослиною", означає масу зрілого зерна, яку можна зібрати з рослини. Як правило, вміст вологи кожного зерна складає приблизно від 10 % до приблизно 15 % мас. Рослини пшениці за даним винаходом також переважно мають збільшену довжину колеоптилю відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c. Переважно довжина колеоптилю рослини пшениці за даним винаходом складає від 70 % до 120 %, переважно від 80 % до 100 %, від довжини колеоптилю рослини, гомозиготної по алелю Rht-B1a. Іншою переважною ознакою рослин пшениці за даним винаходом є стан спокою зерна, одержуваного з рослини. Переважно, рослини мають більш тривалий стан спокою зерна відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a. Переважно, рослина пшениці має від 50 % до 100 %, переважно 60 % до 100 %, від рівня стану спокою рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c. В одному з варіантів здійснення частка проростання зерна, одержуваного з рослини пшениці за винаходом, є проміжною між часткою проростання зерна рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a, і зерна рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c. Частку проростання можна оцінювати, як описано в прикладі 1. Наприклад, можна оцінювати час, необхідний популяціям зерен для досягнення 50 % проростання. У переважному варіанті здійснення зерну рослини пшениці за винаходом для досягнення 50 % частки проростання відносно зерна відповідної рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a, необхідно на 1-8 тижнів більше, переважно на 2-5 тижнів більше, зберігання при кімнатній температурі ("періоду дозрівання").

Як можна зрозуміти, коли проводять порівняння між рослинами або зерном за даним винаходом і рослинами або зерном, гомозиготними по алелю Rht-B1c або гомозиготними по алелю Rht-B1a, порівняння проводять з рослинами, вирощуваними по суті з ідентичними умовами росту, часом вирощування, температурою, подачею води і живильних речовин і т. п. і для зерна, одержуваного у таких рослин.

Зерно. В другому аспекті винахід стосується зерна пшениці, яке одержують або яке можна одержувати у рослин пшениці за винаходом або яке є частиною рослин пшениці за винаходом. Як використовують у даному документі, "зерно" означає зерно, яке звичайно збирають хлібороби у зрілих рослин пшениці, вирощуваних у полі, включаючи зерно, використовуване для виробництва харчових продуктів або у харчових продуктах, і проросле зерно після висівання, але до появи паростків. Зерно також включає зерно, яке оброблене для виробництва харчових продуктів або є інгредієнтом у харчовому продукті. Як правило, вміст вологи зібраного зерна пшениці за винаходом складає приблизно від 10 % до приблизно 15 % мас. В одному з варіантів здійснення зерно пшениці несе алель Rht-B1, кодуючий варіант (не є диким типом) поліпептиду Rht-B1, де переважно зерно гомозиготне по цьому алелю. В одному з варіантів здійснення поліпептид Rht-B1 містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у C-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5. У варіантах здійснення зерно пшениці несе алель Rht-B1, вибраний із групи, що складається з Rht-B1c.1, Rht-B1c.2, Rht-B1c.3, Rht-B1c.4, Rht-B1c.5, Rht-B1c.6, Rht-B1c.7, Rht-B1c.8, Rht-B1c.9, Rht-B1c.10, Rht-B1c.12, Rht-B1c.15, Rht-B1c.16, Rht-B1c.17, Rht-B1c.18, Rht-B1c.21, Rht-B1c.22, Rht-B1c.23, Rht-B1c.24, Rht-B1c.26, Rht-B1c.27, Rht-B1c.28, Rht-B1c.29, Rht-B1c.30 і Rht-B1c.32, і переважно гомозиготне по цьому алелю. У переважних варіантах здійснення зерно пшениці несе алель Rht-B1, вибраний

із групи, що складається з Rht-B1c.22, Rht-B1c.23, Rht-B1c.24 і Rht-B1c.26, і переважно гомозиготне по цьому алелю.

Альтернативно, амінокислотна послідовність варіанта поліпептиду Rht-B1 зерна відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5, а нуклеотидна послідовність алеля Rht-B1, кодуюча варіант поліпептиду Rht-B1, відрізняється від нуклеотидної послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:1, щонайменше присутністю мутації в ділянці сплайсингу інтрона або поруч з нею так, що зачіпає інтрон-сплайсинг транскрипту РНК алеля Rht-B1. У цьому варіанті здійснення амінокислотна послідовність поліпептиду, кодованого алелем Rht-B1, може бути ідентична SEQ ID NO:3 або вона може відрізнятися. Алель Rht-B1 може містити мутацію сплайсингу інтронів і кодувати поліпептид з відмінностями (i) і (ii), описаними в попередньому абзаці, або, у переважному варіанті здійснення, поліпептид містить відмінності (i) і (ii), описані вище, і не містить ніякої мутації ділянки сплайсингу інтрона відносно SEQ ID NO:1.

Варіант поліпептиду Rht-B1 зерна й алель Rht-B1, кодуючий його, можна додатково визначати, як описано в абзацах вище відносно рослини пшениці. У переважному варіанті здійснення зерно має більш тривалий стан спокою відносно зерна, одержуваного з рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a. В одному з варіантів здійснення частка проростання зерна за винаходом є проміжною між часткою проростання зерна рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a, і зерна рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c. Частку проростання можна оцінювати, як описано в прикладі 1. Наприклад, можна оцінювати час, необхідний популяціям зерен для досягнення 50 % проростання. У переважному варіанті здійснення зерну за винаходом, що демонструє "більш тривалий стан спокою", для досягнення 50 % частки проростання відносно зерна відповідної рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a, необхідно на 1-8 тижнів більше, переважно на 2-5 тижнів більше, зберігання при кімнатній температурі ("періоду дозрівання"). Також зерно пшениці за винаходом при висіванні в ґрунт переважно здатне до розвитку в рослину пшениці, де рослина має збільшену висоту відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c, і знижену висоту відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1a, коли рослини вирощують в однакових умовах. Рослина пшениці, що розвивається з цього зерна, може мати підвищену фертильність і/або продукує збільшену кількість зерна відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c, і/або має збільшену довжину колеоптилю відносно рослини пшениці, гомозиготної по алелю Rht-B1c.

Даний винахід також стосується способу одержання зерна за винаходом, де спосіб включає (i) вирощування рослини пшениці за даним винаходом і (ii) збирання зерна у рослини. У деяких варіантах здійснення зерно пшениці обробляють так, щоб воно більше не було здатним до проростання. Цього можна досягати видаленням із зерна зародка, наприклад, за допомогою перемелювання або за допомогою теплової обробки, або за допомогою іншої обробки зерна. Зерно можна дробити, розколювати, ошпарювати окропом, розплющувати, гранулювати, розмелювати або дробити.

Даний винахід також стосується способу одержання борошна тонкого помелу, непросіяного борошна, крохмалю, гранул крохмалю або висівков, де спосіб включає одержання зерна за даним винаходом й обробку зерна з одержанням борошна тонкого помелу, непросіяного борошна, крохмалю, гранул крохмалю або висівков. Способи такої обробки добре відомі в даній галузі. Етап одержання зерна може включати, наприклад, збирання зерна рослини пшениці за винаходом або придбання цього зерна.

Даний винахід також стосується продуктів, одержуваних з рослин або зерна за даним винаходом, таких як харчові продукти, що можуть бути інгредієнтами харчових продуктів. Приклади харчових продуктів включають борошно тонкого помелу, крохмаль, квасний або прісний хліб, макарони, локшину, зоокорми, зерновий сніданок, закуски, пироги, солод, кондитерські вироби і харчові продукти, що містять соуси на основі борошна тонкого помелу. Харчовий продукт може являти собою бейгл, бісквіт, хліб, здобну булку, круасан, вареник, англійську булочку, кекс, піту, бездріжджовий хліб, охолоджену/заморожену тістову заготовку, тісто, печені боби, буріто, чилі, тако, тамале, тортілью, закритий пиріг, готовий до вживання зерновий продукт, готовий до вживання продукт, начинку, призначений для приготування в мікрохвильовій печі продукт, брауні, пиріг, сирний пиріг, булочку до кави, булочку, десерт, тістечко, солодкий батончик, корж пирога, наповнення пирога, дитяче харчування, суміш для запікання, тісто, паніровку, суміш для підливи, наповнювач для м'яса, заміник м'яса, суміш спецій, супову суміш, підливу, заправку для соусу, приправу до салату, суп, сметану, локшину, макарони, локшину рамен, локшину для рагу по-китайськи, локшину для ломейн, включення в

морозиво, брикет морозива, ріжок для морозива, багатошарове морозиво, сухе печиво, грінку, пончик, продукт у клярі, екструдовану закуску, плодовий і зерновий батончик, призначений для приготування в мікрохвильовій печі продукт для закуски, поживний батончик, млинець, заморожений хлібобулочний напівфабрикат, сушку, пудинг, продукт на основі мюслі, закуску з чипсів, закуску, суміш для закуски, вафлі, основу для піци, корм для тварин або корм для домашніх тварин. Харчовий продукт можна одержувати змішуючи зерно або борошно тонкого помелу, непросіяне борошно або висівки зазначеного зерна з іншим інгредієнтом. Іншим продуктом є корм для тварин, такий як зібране зерно, сіно, солома або силос. Рослини за винаходом можна використовувати безпосередньо як корм для тварин, наприклад, при вирощуванні в полі.

Полінуклеотиди. У третьому аспекті даний винахід стосується молекули нуклеїнової кислоти, кодуєчої поліпептид Rht-B1 за винаходом. Молекулу нуклеїнової кислоти можна виділяти з рослини пшениці або вона може міститися в рослині пшениці або як екзогенна молекула нуклеїнової кислоти в рослині, що може являти собою будь-яку рослину, таку як злакова рослина або рослина, відмінна від пшениці. В одному з варіантів здійснення поліпептид Rht-B1 містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у C-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5. Поліпептид Rht-B1 за винаходом можна додатково визначити, як описано в абзацах вище відносно рослини пшениці. У переважних варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти несе алель Rht-B1, вибраний із групи, що складається з Rht-B1c.1, Rht-B1c.2, Rht-B1c.3, Rht-B1c.4, Rht-B1c.5, Rht-B1c.6, Rht-B1c.7, Rht-B1c.8, Rht-B1c.9, Rht-B1c.10, Rht-B1c.12, Rht-B1c.15, Rht-B1c.16, Rht-B1c.17, Rht-B1c.18, Rht-B1c.21, Rht-B1c.22, Rht-B1c.23, Rht-B1c.24, Rht-B1c.26, Rht-B1c.27, Rht-B1c.28, Rht-B1c.29, Rht-B1c.30 і Rht-B1c.32. У більш переважних варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти несе алель Rht-B1, вибраний із групи, що складається з Rht-B1c.22, Rht-B1c.23, Rht-B1c.24 і Rht-B1c.26.

Поліпептиди. У четвертому аспекті даний винахід стосується поліпептиду Rht-B1, що містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO:5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, зазначеної як SEQ ID NO:5, щонайменше (i) вставкою однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO:5 і (ii) однією або декількома замінами амінокислот у C-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO:5. Поліпептид Rht-B1 за винаходом можна додатково визначити, як описано в абзацах вище відносно рослини пшениці.

Даний винахід також стосується способу генотипування рослини пшениці, де спосіб включає (i) одержання зразка, що містить нуклеїнову кислоту або білок, виділені з рослини пшениці, і (ii) детекцію молекули нуклеїнової кислоти або поліпептиду за даним винаходом в зразку. У переважних варіантах здійснення рослина пшениці несе алель Rht-B1, вибраний із групи, що складається з Rht-B1c.1, Rht-B1c.2, Rht-B1c.3, Rht-B1c.4, Rht-B1c.5, Rht-B1c.6, Rht-B1c.7, Rht-B1c.8, Rht-B1c.9, Rht-B1c.10, Rht-B1c.12, Rht-B1c.15, Rht-B1c.16, Rht-B1c.17, Rht-B1c.18, Rht-B1c.21, Rht-B1c.22, Rht-B1c.23, Rht-B1c.24, Rht-B1c.26, Rht-B1c.27, Rht-B1c.28, Rht-B1c.29, Rht-B1c.30 і Rht-B1c.32.

Даний винахід також стосується способу введення алеля Rht-B1 у рослину пшениці з відсутністю зазначеного алеля, де спосіб включає i) схрещування першої батьківської рослини пшениці з другою батьківською рослиною пшениці, де друга рослина являє собою рослину пшениці за даним винаходом, і ii) зворотне схрещування рослини-нащадка схрещування на етапі i) з рослиною того ж генотипу, що і перша батьківська рослина, з одержанням рослини з більшістю генотипу першого батька, але із вмістом зазначеного алеля Rht-B1.

Молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом може бути функціонально зв'язана з промотором, здатним контролювати експресію молекули нуклеїнової кислоти в рослинній клітині. Також наданий вектор, що містить або кодує молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, і клітини-хазяїни, що містять цей вектор і/або молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом.

Даний винахід також стосується генетично модифікованої рослини, де рослина трансформована молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом, і її рослин-нащадків, що містять цю молекулу нуклеїнової кислоти. У визначених варіантах здійснення генетично модифікована рослина являє собою рослину пшениці або ячменю.

Як використовують у даному документі, злакові означають рослини або зерно сімейств однодольних Poaceae або Graminae, що культивують для одержання харчових компонентів їх зерен, і включають пшеницю, ячмінь, кукурудзу, овес, жито, рис, сорго, тритикале, просо, гречку. Переважно, злакова рослина або зерно являє собою рослину або зерно пшениці або ячменю, більш переважно рослину або зерно пшениці. У додатковому переважному варіанті здійснення злакова рослина не є рисом або кукурудзою або будь-чим з них.

Як використовують у даному документі, термін "ячмінь" стосується будь-якого виду роду *Hordeum*, включаючи його предків, а також його потомство, одержуване за допомогою схрещування з іншими видами. Переважно, рослина являє собою рослину виду *Hordeum*, яку культивують комерційно, таку як, наприклад, лінія або культивар, або сорт *Hordeum vulgare*, або яка придатна для комерційного одержання зерна.

Рослини пшениці за винаходом можна використовувати множиною способів, відмінних від використання для харчових продуктів або корму для тварин, наприклад використовувати в дослідженнях або розведенні. У вирощуваннях на насіння зернових, таких як пшениця, рослини можна піддавати самосхрещуванню з одержанням рослин, гомозиготних по бажаних генах, або в гаплоїдних тканинах, таких як статеві клітини, що розвиваються, можна індукувати подвоєння набору хромосом з одержанням гомозиготної рослини.

Рослини пшениці за винаходом можна схрещувати з рослинами, які містять більш бажану генетичну основу. Бажана генетична основа може включати придатну комбінацію генів, що забезпечує врожайність при комерційному виробництві й інші характеристики, такі як агрономічні характеристики або стійкість до абіотичного стресу. Генетична основа також може включати інші змінені гени біосинтезу або модифікації крохмалю, наприклад гени інших ліній пшениці. Генетична основа може містити один або декілька трансгенів, таких як, наприклад, ген, що надає стійкість до гербіциду, такого як гліфосат.

Як використовують у даному документі, термін "зчеплені" стосується маркерного локусу і другого локусу, розташованих в хромосомі в достатній близькості так, що вони успадковуються разом більше ніж у 50 % мейозів, наприклад, не випадково. Це визначення включає випадок, коли маркерний локус і другий локус формують частини одного гена. Крім того, це визначення включає випадок, коли маркерний локус містить поліморфізм, відповідальний за ознаку, що представляє інтерес (іншими словами маркерний локус безпосередньо "зчеплений" з фенотипом). Як використовують у даному документі, термін "генетично зчеплені" є більш вузьким, і його використовують тільки відносно випадку, коли маркерний локус і другий локус знаходяться в достатній близькості в хромосомі так, що вони успадковуються разом більше ніж у 50 % мейозів. Таким чином, відсоток рекомбінації, спостережуваний між локусами на одне покоління (сантиморган (сМ)), складає менше 50. У конкретних варіантах здійснення винаходу генетично зчеплені локуси можуть розташовуватися в хромосомі на відстані 45, 35, 25, 15, 10, 5, 4, 3, 2 або 1 або менше сМ. Переважно, маркери знаходяться на відстані менше 5 сМ або 2 сМ і найбільш переважно на відстані приблизно 0 сМ.

Як використовують у даному документі, "інші генетичні маркери" можуть являти собою будь-які молекули, що зчеплені з бажаною ознакою злакової рослини, такої як пшениця. Такі маркери добре відомі фахівцям у даній галузі і включають молекулярні маркери, зчеплені з генами, що визначають такі ознаки, як стійкість до захворювань, врожайність, морфологія рослини, якість зерна, інші ознаки стану спокою, такі як колір зерна, вміст гіберелової кислоти в зерні, висота рослини, колір борошна тонкого помелу і т. п. Приклади таких генів являють собою гени стійкості до стеблової іржі *Sr2* або *Sr38*, гени стійкості до жовтої іржі *Yr10* або *Yr17*, гени стійкості до нематодів, такі як *Cre1* і *Cre3*, алелі глютенінових локусів, що визначають пружний опір тіста, такі як алелі *Ax*, *Bx*, *Dx*, *Ay*, *By* і *Dy*. У конкретному відношенні до стану спокою зерна інші маркери включають ген *R* червоного забарвлення зерна (Himi et al., 2002), а також маркери, описані Mares et al. (2005), Li et al. (2004), Kato et al. (2001), Mori et al. (2005) і Prada et al. (2004).

Як використовують у даному документі, термін "рослина" як іменник стосується всієї рослини, але при використанні як прикметника стосується будь-якого об'єкта, що знаходиться в рослині, одержують, походить з рослини або пов'язаний з рослиною, такого як, наприклад, органи рослин (наприклад, листи, стебла, корені, квіти), одиночні клітини (наприклад, пилки), насіння, рослинні клітини і т. п. Рослини, надані або передбачувані для застосування в практичному здійсненні даного винаходу, включають однодольні і дводольні. У переважних варіантах здійснення рослини за даним винаходом являють собою сільськогосподарські культури (наприклад, злаки і зернобобові, кукурудзу, пшеницю, картоплю, тапіоку, рис, сорго, сою, просо, маніок, ячмінь або горох) або бобові. Рослини можна вирощувати для одержання придатних у їжу коренів, бульб, листів, стебел, квітів або плодів.

Як використовують у даному документі, терміни "насіння" і "зерно" мають значення, що перекриваються. "Зерно" включає насіння, яке зібрали у рослини й в основному стосується зрілого, зібраного зерна, але також може стосуватися зерна після набухання або проростання, залежно від контексту. "Насіння" може стосуватися або зрілого зерна, до або після збирання, або незрілого насіння, що розвивається в рослинах. Як правило, вміст води зрілого зерна складає менше ніж приблизно 10-15 %.

Як використовують у даному документі, термін "ген" варто розглядати в його найбільш широкому розумінні, і він включає дезоксирибонуклеотидні послідовності, що містять кодуючу область білка структурного гена й містять послідовності, розташовані поруч з кодуючою областю на обох 5'- і 3'-кінцях на відстані щонайменше приблизно 2 т.п.н. на кожному кінці. Послідовності, розташовані з 5'-кінця від кодуючої області і присутні в іРНК, позначають як 5'-нетрансльовані послідовності. Послідовності, розташовані з 3'-кінця або нижче кодуючої області і присутні в іРНК, позначають як 3'-нетрансльовані послідовності. Термін "ген" включає кДНК і геномну форму гена. Геномна форма або клон гена містить кодуючу область, що може перериватися некодуючими послідовностями, називаними "інтронами" або "вставними областями", або "вставними послідовностями". Інтрони являють собою ділянки гена, транскрибовані в ядерну РНК (гяРНК); інтрони можуть містити регуляторні елементи, такі як енхансери. Інтрони видаляються або "сплайсуються" з ядерного або первинного транскрипту; таким чином, інтрони відсутні в транскрипті інформаційної РНК (іРНК). іРНК функціонує при трансляції з визначенням послідовності або порядку амінокислот у поліпептиді, що утворюється. Термін "ген" включає синтетичну або зливу молекулу, кодуючу всі або частину білків за винаходом, описуваних у даному документі, і комплементарну нуклеотидну послідовність до будь-якого з зазначених вище.

Алель являє собою варіант гена по одному генетичному локусу. Гексаплоїдна пшениця, така як *Triticum aestivum* L., містить шість наборів хромосом з організацією геному AABBDD. Кожна хромосома містить одну копію кожного гена (один алель). Якщо обидва алелі пари хромосом є однаковими, організм є гомозиготним по цьому гену, якщо алелі є різними, організм є гетерозиготним по цьому гену. Взаємовідношення між алелями в локусі, як правило, описують як домінантні або рецесивні.

Рослини пшениці за винаходом можна одержувати й ідентифікувати після мутагенезу. Це може забезпечувати рослину пшениці, яка не є трансгенною, що бажано на певних ринках, або яка не містить екзогенної молекули нуклеїнової кислоти. Як правило, мутагенез можна піддавати предкові рослинні клітини, тканину, насіння або рослину з одержанням однієї або декількох мутацій, таких як заміни, видалення, додавання нуклеотидів і/або модифікації кодонів.

Мутагенез можна проводити хімічними або радіаційними засобами, наприклад, за допомогою обробки насіння EMS або азидом натрію (Zwar and Chandler, 1995) або за допомогою гамма-випромінювання, добре відомих у даній галузі. Хімічний мутагенез має тенденцію до переваги заміни нуклеотидів делеціям. Як ефективний спосіб мутаційної селекції з одержанням нових сортів рослин відоме опромінення пучком важких іонів (HIB), див., наприклад, Hayashi et al., 2007, і Kazama et al., 2008. Опромінення пучком іонів для біологічної дії, що визначає ступінь uszkodження ДНК і розмір делецій ДНК, включає два фізичних фактори: дозу (Гр) і LET (лінійне перенесення енергії, кеВ/мкм), і їх можна регулювати залежно від бажаного ступеня мутагенезу.

Біологічні засоби, придатні для одержання сайт-специфічних мутантів, включають ферменти, які вносять дволанцюжкові розриви в ДНК, що стимулюють ендogenous механізми репарації. Вони включають ендонуклеази, нуклеази з цинковими пальцями, ефектори TAL, транспозази і сайт-специфічні рекомбінази. Нуклеази з цинковими пальцями (ZFN), наприклад, полегшують сайт-специфічне розщеплення в геномі, дозволяючи ендogenous або іншим механізмам репарації, що зрощують кінці, здійснювати видалення або вставки для репарації пропуску. Технологія нуклеаз з цинковими пальцями розглянута в Le Provost et al., 2009, також див. Durai et al., 2005 і Liu et al., 2010.

Виділення мутантів можна проводити за допомогою скринінгу рослин або насіння, що мутували. Наприклад, популяцію пшениці, що мутувала, можна піддавати скринінгу безпосередньо на бажаний генотип або опосередковано за допомогою скринінгу фенотипу, такого як висота рослини. Скринінг безпосередньо на генотип переважно включає аналіз присутності мутацій, що можна спостерігати в аналізах ПЛР по відсутності маркерів, як і очікується, коли деякі гени піддають видаленню, або в аналізах на основі гетеродуплексів, як у Tilling, або за допомогою глибокого секвенування. Скринінг фенотипу може включати скринінг проростання, як описано в прикладах. З використанням цієї методології скринінгу на посилений

ріст, що забезпечує збільшену висоту рослини, можна піддавати великі групи насіння, що мутувало.

Потім ідентифіковані мутації можна вводити в бажану генетичну основу за допомогою схрещування мутанта з рослиною з бажаною генетичною основою і проведення придатної кількості зворотних схрещувань для видалення вихідної небажаної батьківської основи.

У контексті даної заявки "індукована мутація" або "внесена мутація" являє собою штучно індуковану генетичну варіацію, що може являти собою результат хімічної або радіаційної обробки предкового насіння або рослини. Похідні з вставками нуклеотидів включають 5'- і 3'-кінцеві злиття, а також вставки одного або декількох нуклеотидів усередину послідовності. Варіанти з вставками в нуклеотидну послідовність являють собою варіанти, у яких у ділянку нуклеотидної послідовності, або у попередньо визначену ділянку, як це можливо в способах з нуклеазами з цинковими пальцями (ZFN), ефекторами TAL або способах гомологічної рекомбінації, або за допомогою випадкової вставки з придатним скринінгом одержаного продукту, введені один або декілька нуклеотидів. Варіанти з делеціями характеризуються видаленням одного або декількох нуклеотидів з послідовності. Переважно, мутантний ген містить тільки одну вставку послідовності нуклеотидів відносно гена дикого типу й одну або декілька мутацій замінів. Варіанти з замінами нуклеотидів являють собою варіанти, у яких в послідовності видалений щонайменше один нуклеотид, а на його місце вставлений інший нуклеотид. Переважна кількість нуклеотидів, зачеплених замінами в мутантному гені відносно гена дикого типу, складає максимум десять нуклеотидів, більш переважно максимум 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 або 2, або, найбільш переважно, тільки один нуклеотид.

Як використовують у даному документі, термін "мутація" не включає мовчазні заміни нуклеотидів, що не впливають на активність гена, і, таким чином, включає тільки зміни в послідовності гена, що впливають на активність гена. Термін "поліморфізм" стосується будь-якої зміни нуклеотидної послідовності, включаючи такі мовчазні заміни нуклеотидів. Способи скринінгу можуть спочатку включати скринінг на поліморфізми, а потім на мутації в групі поліморфних варіантів.

Відбір за допомогою маркера являє собою добре відомий спосіб відбору гетерозиготних рослин, необхідний при зворотному схрещуванні з рекурентним батьком у класичній селекційній програмі. Популяція рослин у кожному поколінні зворотного схрещування є гетерозиготною по гену, що представляє інтерес, в нормі присутньому в популяції після зворотного схрещування у відношенні 1:1, і молекулярний маркер можна використовувати для розрізнення двох алелів гена. Виділяючи ДНК, наприклад з молодих пагонів, і тестуючи введення бажаної ознаки з використанням специфічного маркера, проводять ранню селекцію рослин для подальшого зворотного схрещування, при цьому концентруючи енергію і ресурси на меншій кількості рослин. Для додаткового прискорення програми зворотного схрещування можна виділяти зародки з незрілого насіння (25 діб після цвітіння) і вирощувати на живильних середовищах у стерильних умовах, а не доводити до повної зрілості насіння.

У способах за даним винаходом можна використовувати будь-який молекулярно-біологічний спосіб, відомий у даній галузі, що здатний детектувати алелі Rht-B1. Такі способи, як необмежувальні приклади, включають використання ампліфікації нуклеїнової кислоти, секвенування нуклеїнової кислоти, гібридизації нуклеїнової кислоти з придатним чином міченими зондами, аналіз конформації одиночних ланцюгів (SSCA), електрофорез у градієнті денатуруючого гелю (DGGE), аналіз гетеродуплексів (HET), аналіз хімічного розщеплення (CCM), каталітичне розщеплення нуклеїнової кислоти або їх сполучення (див., наприклад, Lemieux, 2000; Langridge et al., 2001).

"Полімеразна ланцюгова реакція" ("ПЛР") являє собою реакцію, у якій одержують ідентичні копії полінуклеотиду-мішені з використанням "пари праймерів" або "набору праймерів", що складається з "прямого" і "зворотного" праймерів, і каталізатора полімеризації, такого як ДНК-полімераза, і, як правило, термостабільного полімеразного ферменту. Способи ПЛР відомі в даній галузі і розглянуті, наприклад, у "PCR" (Ed. M.J. McPherson and S.G. Moller (2000), BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford).

Праймер являє собою олігонуклеотидну послідовність, що здатна до гібридизації специфічним для послідовностей способом з послідовністю-мішенню і добувається при ПЛР. Амплікони або продукти ПЛР, або фрагменти ПЛР, або продукти ампліфікації являють собою продукти добування, що містять праймер і знову синтезовані копії послідовностей-мішеней. Системи мультиплексної ПЛР містять декілька наборів праймерів, що приводять до одночасного одержання більше одного амплікону. Праймери можуть повністю відповідати послідовності-мішені або вони можуть містити внутрішні невідповідні основи, що можуть приводити до внесення в конкретні послідовності-мішені рестрикційних ферментів або ділянок

розпізнавання/розщеплення каталітичних нуклеїнових кислот. Також праймери можуть містити додаткові послідовності і/або містити модифіковані або мічені нуклеотиди для полегшення захоплення або детекції ампліконів. Повторювані цикли теплової денатурації ДНК, відпалу праймерів з комплементарними ним послідовностями і добування відпалених праймерів полімеразою приводять до експонентної ампліфікації послідовності-мішені. Терміни мішень або послідовність-мішень, або матриця стосуються ампліфікованих послідовностей нуклеїнових кислот.

Як використовують у даному документі, терміни "трансгенна рослина" і "трансгенна рослина пшениці" стосуються рослини, що містить генну конструкцію ("трансген"), відсутню у рослині дикого типу того ж виду, сорту або культивару. Таким чином, трансгенні рослини (трансформовані рослини) містять генетичний матеріал, який вони не містили до трансформації. Як зазначено в даному документі, "трансген" має звичайне для галузі біотехнології значення і стосується генетичної послідовності, яка одержана або змінена за допомогою технології рекомбінантних ДНК або РНК і яка введена в рослинну клітину-предка, де цю клітину використовують для одержання нової рослини. Трансген може містити генетичні послідовності, які одержуються або походять з клітини рослини, або з клітини іншої рослини, або з нерослинного джерела, або із синтетичної послідовності. Як правило, трансген введений у рослину за допомогою маніпуляцій людини, наприклад, таких як трансформація, але можна використовувати будь-який спосіб, відомий фахівцю в даній галузі. Як правило, генетичний матеріал стабільно інтегрований у геном рослини. Генетичний матеріал, що вноситься, може містити послідовності, що зустрічаються у того ж виду в природі, але в переставленому порядку або в іншому розташуванні елементів, наприклад антисмислова послідовність або послідовність, кодуєча дволанцюжкову РНК або штучний попередник мікроРНК. Рослини, що містять такі послідовності, включені в даному документі в "трансгенні рослини". Як визначено в даному документі, трансгенні рослини включають усе потомство вихідної трансформованої і регеноерованої рослини (рослина T_0), яка генетично модифікована рекомбінантними способами, де потомство містить трансген. Таке потомство можна одержувати за допомогою самозапліднення первинної трансгенної рослини або за допомогою схрещування такої рослини з іншою рослиною того ж виду. В одному з варіантів здійснення трансгенні рослини є гомозиготними по кожному і будь-якому гену (трансгену), що вноситься, так, що їх потомство не сегрегує по бажаному фенотипу. Частина трансгенної рослини включають усі частини і клітини зазначеної рослини, що містять трансген, такі як, наприклад, насіння, культивовані тканини, каліус і протопласти. "Нетрансгенна рослина", переважно нетрансгенна рослина пшениці, являє собою рослину, що генетично не модифікована за допомогою введення генетичного матеріалу за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

Як використовують у даному документі, термін "відповідна нетрансгенна рослина" стосується рослини, що є такою ж або подібною по більшості характеристик, переважно ізогенною або майже ізогенною відносно трансгенної рослини, але не містить трансген, що представляє інтерес. Переважно, відповідна нетрансгенна рослина належить до того ж культивару або сорту, що і предок трансгенної рослини, що представляє інтерес, або сестринської лінії рослин, у якій відсутня конструкція, часто називаної "сегрегант", або являє собою рослину того ж культивару або сорту, трансформовану конструкцією "порожнього вектора", і може являти собою нетрансгенну рослину. Як використовують у даному документі, "дикий тип" стосується клітини, тканини або рослини, які не модифіковані за винаходом. Клітини, тканини або рослини дикого типу відомі в даній галузі і їх можна використовувати як контролі для порівняння рівнів експресії екзогенних нуклеїнових кислот або ступеня і характеру модифікації ознаки з клітинами, тканинами або рослинами, модифікованими, як описано в даному документі. Як використовують у даному документі, "зерно пшениці дикого типу" означає відповідне немутоване, нетрансгенне зерно пшениці. Як використовують у даному документі, конкретне зерно пшениці дикого типу, як необмежувальні приклади, включає Sunstate.

Для визначення присутності трансгена в трансформованій рослині можна використовувати будь-який з декількох способів. Наприклад, можна використовувати полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для ампліфікації послідовностей, що унікальні у трансформованій рослині, з детекцією продуктів ампліфікації за допомогою електрофорезу в гелі або іншими способами. ДНК можна виділяти з рослин загальноприйнятими способами, а реакцію ПЛР проводити з використанням праймерів, за допомогою яких можна розрізнити трансформовані і нетрансформовані рослини. Альтернативний спосіб підтвердження позитивного трансформанта являє собою гібридизацію способом саузерн-блотингу, добре відому в даній галузі. Трансформовані рослини пшениці також можна ідентифікувати, тобто відрізнити від нетрансформованих рослин пшениці або рослин пшениці дикого типу, по їх фенотипу,

наприклад, забезпечуваному присутністю гена селективного маркера, або за допомогою імунологічних аналізів, за допомогою яких детектують або кількісно визначають експресію ферменту, кодованого трансгеном, або по будь-якому іншому фенотипу забезпечуваному трансгеном.

Рослини пшениці за даним винаходом можна вирощувати або збирати на зерно переважно для застосування як харчових продуктів для споживання людиною або як корму для тварин, або для ферментації або для одержання промислової сировини, у тому числі такого, як одержання етанолу. Альтернативно, рослини пшениці можна використовувати безпосередньо як корм. Рослина за даним винаходом переважно придатна для виробництва харчових продуктів і, зокрема, для комерційного виробництва харчових продуктів. Таке виробництво харчових продуктів може включати одержання борошна тонкого помелу, тіста, крупи або інших продуктів із зерна, що можуть бути інгредієнтами при комерційному виробництві харчових продуктів. Винахід також стосується борошна тонкого помелу, борошна грубого помелу або інших продуктів, одержуваних із зерна. Вони можуть бути необробленими або обробленими, наприклад, за допомогою фракціонування або відбілювання.

Терміни "поліпептид" і "білок" у даному документі, як правило, використовують взаємозамінно. Як використовують у даному документі, терміни "білки" і "поліпептиди" також включають варіанти, мутанти, модифікації і/або похідні поліпептидів за винаходом, як описано в даному документі. Як використовують у даному документі, "значною мірою очищений поліпептид" стосується поліпептиду, що відділений від ліпідів, нуклеїнових кислот, інших пептидів і інших молекул, з якими він асоційований у його природному стані. Переважно, значною мірою очищений поліпептид щонайменше на 60 % очищений, більш переважно щонайменше на 75 % очищений і більш переважно щонайменше на 90 % очищений від інших компонентів, з якими він асоційований у природі. Під "рекомбінантним поліпептидом" мають на увазі поліпептид, одержуваний рекомбінантними способами, тобто за допомогою експресії рекомбінантного полінуклеотиду в клітині, переважно в клітині рослини і більш переважно в клітині пшениці.

% ідентичності поліпептиду з іншим поліпептидом можна визначати за допомогою аналізу GAP (Нідлмана і Вунша, 1970) (програма GCG) зі штрафом за створення пропуску = 5 і штрафом за продовження пропуску = 0,3. Довжина аналізованої послідовності складає щонайменше 250 амінокислот, і аналіз GAP вирівнює дві послідовності на протязі області щонайменше з 250 амінокислот. Найбільш переважно два аналізованих поліпептиди вирівнюють на протязі їх повнорозмірної амінокислотної послідовності.

Застосовно до визначуваного поліпептиду варто розуміти, що показники % ідентичності, більші, ніж % ідентичності, надані вище, включають переважні варіанти здійснення. Таким чином, коли застосовно, з урахуванням мінімальних показників % ідентичності, поліпептид переважно містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 75 %, більш переважно щонайменше на 80 %, більш переважно щонайменше на 85 %, більш переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 91 %, більш переважно щонайменше на 92 %, більш переважно щонайменше на 93 %, більш переважно щонайменше на 94 %, більш переважно щонайменше на 95 %, більш переважно щонайменше на 96 %, більш переважно щонайменше на 97 %, більш переважно щонайменше на 98 %, більш переважно щонайменше на 99 %, більш переважно щонайменше на 99,1 %, більш переважно щонайменше на 99,2 %, більш переважно щонайменше на 99,3 %, більш переважно щонайменше на 99,4 %, більш переважно щонайменше на 99,5 %, більш переважно щонайменше на 99,6 %, більш переважно щонайменше на 99,7 %, більш переважно щонайменше на 99,8 % і навіть більш переважно щонайменше на 99,9 % ідентична відповідній зазначеній SEQ ID NO.

Делеції в амінокислотних послідовностях, як правило, знаходяться в межах приблизно від 1 до 15 залишків, більш переважно приблизно від 1 до 10 залишків і, як правило, приблизно від 1 до 5 суміжних залишків. У мутантів із замінами в молекулі поліпептиду видалений щонайменше один амінокислотний залишок і на його місце вставлений інший залишок.

Під "виділеним" мають на увазі речовину, яка значною мірою або по суті очищена від компонентів, що у нормі знаходяться разом з нею у її природному стані. Як використовують у даному документі, "виділений полінуклеотид" або "виділена молекула нуклеїнової кислоти" означає полінуклеотид, який щонайменше частково відділений, переважно значною мірою або по суті очищений від полінуклеотидних послідовностей того ж типу, з якими він асоційований або зв'язаний у його природному стані. Наприклад, "виділений полінуклеотид" включає полінуклеотид, який очищений або відділений від послідовностей, що фланкують його в природному стані, наприклад фрагмент ДНК, що відділений від послідовностей, які у нормі граничать із фрагментом. Переважно, виділений полінуклеотид також щонайменше на 90 %

очищений від інших компонентів, таких як білки, вуглеводи, ліпіди і т. д. Як використовують у даному документі, термін "рекомбінантний полінуклеотид" стосується полінуклеотиду, одержуваного *in vitro* за допомогою маніпуляцій з нуклеїновими кислотами у формі, що у нормі не зустрічається в природі. Наприклад, рекомбінантний полінуклеотид може знаходитися у формі експресуючого вектора. Як правило, такі експресуючі вектори включають регулюючі транскрипцію і трансляцію нуклеїнові кислоти, функціонально зв'язані з нуклеотидною послідовністю, яку необхідно транскрибувати в клітині.

Даний винахід стосується застосування олігонуклеотидів, які можна використовувати як "зонди" або "праймери". Як використовують у даному документі, "олігонуклеотиди" являють собою полінуклеотиди довжиною до 50 нуклеотидів. Вони можуть являти собою РНК, ДНК або їх комбінації або похідні. Як правило, олігонуклеотиди являють собою відносно короткі одноланцюжкові молекули довжиною від 10 до 30 нуклеотидів, як правило 15-25 нуклеотидів, які як правило, містять 10-30 або 15-25 нуклеотидів, ідентичних або комплементарних послідовності, що представляє інтерес. Коли його використовують як зонд або як праймер в реакції ампліфікації, мінімальним розміром такого олігонуклеотиду є розмір, необхідний для формування стабільного гібриду між олігонуклеотидом і комплементарною послідовністю в молекулі нуклеїнової кислоти-мішені. Переважно, довжина олігонуклеотидів складає щонайменше 15 нуклеотидів, більш переважно щонайменше 18 нуклеотидів, більш переважно щонайменше 19 нуклеотидів, більш переважно щонайменше 20 нуклеотидів, навіть більш переважно щонайменше 25 нуклеотидів. Полінуклеотиди, використовувані як зонд, як правило кон'югують з детектованою міткою, такою як радіоактивний ізотоп, фермент, біотин, флуоресцентна молекула або хемілюмінесцентна молекула.

Терміни "варіант полінуклеотиду" і "варіант" і т. п. стосуються полінуклеотидів, що демонструють значну ідентичність послідовності з вихідною полінуклеотидною послідовністю і здатні функціонувати аналогічним чином з такою же активністю, що і вихідна послідовність. Ці терміни також включають полінуклеотиди, які відрізняються від вихідного полінуклеотиду додаванням, видаленням або заміною щонайменше одного нуклеотиду або які при порівнянні з природними молекулами містять одну або декілька мутацій. Таким чином, терміни "варіант полінуклеотиду" і "варіант" включають полінуклеотиди, у яких додані або видалені, або замінені іншими нуклеотидами один або декілька нуклеотидів. У цьому відношенні, у даній галузі добре відомо, що з вихідним полінуклеотидом можна провести визначені зміни, включаючи мутації, додавання, делеції і заміни, при цьому змінений полінуклеотид збереже біологічну функцію або активність вихідного полінуклеотиду. Таким чином, ці терміни включають полінуклеотиди, які кодують поліпептиди, що демонструють ферментативну або іншу регулюючу активність, або полінуклеотиди, здатні служити як селективні зонди або інші засоби, що гібридизуються. Терміни "варіант полінуклеотиду" і "варіант" також включають природні алельні варіанти. Мутанти можуть бути природними (таким чином виділеними з природного джерела) або синтетичними (наприклад, за допомогою проведення сайт-специфічного мутагенезу у нуклеїнової кислоти). Переважно, довжина варіанта полінуклеотиду за винаходом, кодуючого поліпептид з ферментативною активністю, складає більше 400, більш переважно більше 500, більш переважно більше 600, більш переважно більше 700, більш переважно більше 800, більш переважно більше 900 і навіть більш переважно більше 1000 нуклеотидів, аж до повнорозмірного гена.

Варіант олігонуклеотиду за винаходом включає молекули різних розмірів, що здатні до гібридизації, наприклад, з геномом пшениці в положенні, близькому до положення молекули специфічного олігонуклеотиду, визначеного в даному документі. Наприклад, варіанти можуть містити додаткові нуклеотиди (наприклад, 1, 2, 3, 4 або більше) або менше нуклеотидів, за умови, що вони усе ще гібридизуються з областю-мішенню. Крім того, можна замінити декілька нуклеотидів без впливу на здатність олігонуклеотиду до гібридизації з областю-мішенню. Крім того, можна легко сконструювати варіанти, що гібридизуються поруч (як необмежувальні приклади, у межах 50 нуклеотидів) з областю геному рослини, де гібридизуються специфічні олігонуклеотиди, визначені в даному документі.

Під "відповідає" або "відповідний" відносно полінуклеотидів або поліпептидів мають на увазі полінуклеотид, який (а) містить нуклеотидну послідовність, що по суті ідентична або комплементарна всій або частині вихідної полінуклеотидної послідовності, або (b) кодує амінокислотну послідовність, ідентичну амінокислотній послідовності у пептиді або білку. Ця фраза також охоплює пептид або поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, яка по суті ідентична послідовності амінокислот у вихідному пептиді або білку. Терміни, використовувані для опису відношення послідовностей у двох або більше полінуклеотидів або поліпептидів, включають "вихідну послідовність", "вікно порівняння", "ідентичність

послідовностей", "відсоток ідентичності послідовностей", "ідентичність по суті" і "ідентичність" і визначені відносно визначеної мінімальної кількості нуклеотидів або амінокислотних залишків або переважно на всій довжині. Терміни "ідентичність послідовностей" і "ідентичність" у даному документі використовують взаємозамінно для позначення тих випадків, коли послідовності у вікні порівняння ідентичні понуклеотидно або поамінокислотно. Таким чином, "відсоток ідентичності послідовностей" розраховують, порівнюючи дві оптимально вирівняні послідовності у вікні порівняння, визначаючи кількість положень, у яких в обох послідовностях знаходяться ідентичні нуклеїнові основи (наприклад, A, T, C, G, U) або ідентичні амінокислотні залишки (наприклад, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys і Met), з одержанням кількості співпадаючих положень, ділячи кількість співпадаючих положень на загальну кількість положень у вікні порівняння (тобто на розмір вікна) і множачи результат на 100 з одержанням відсотка ідентичності послідовностей.

% ідентичності полінуклеотиду можна визначати за допомогою аналізу GAP (Нідлмана і Вунша, 1970) (програма GCG) зі штрафом за створення пропуску = 5 і штрафом за продовження пропуску = 0,3. Якщо не зазначено інакше, довжина аналізованої послідовності складає щонайменше 45 нуклеотидів, і в аналізі GAP вирівнюють дві послідовності в області щонайменше 45 нуклеотидів. Переважно, довжина аналізованої послідовності складає щонайменше 150 нуклеотидів, в аналізі GAP вирівнюють дві послідовності в області щонайменше 150 нуклеотидів. Більш переважно, довжина аналізованої послідовності складає щонайменше 300 нуклеотидів, і в аналізі GAP вирівнюють дві послідовності в області щонайменше 300 нуклеотидів або щонайменше 400, 500 або 600 нуклеотидів у кожному випадку. Також можна навести посилання на сімейство програм BLAST, як, наприклад, описано в Altschul et al., 1997. Докладне обговорення аналізу послідовностей можна знайти в розділі 19.3 Ausubel et al., 1994-1998, глава 15.

Нуклеотидні або амінокислотні послідовності позначають як "значною мірою подібні", коли ідентичність таких послідовностей складає щонайменше приблизно 98 %, більш конкретно щонайменше приблизно 98,5 %, дуже конкретно приблизно 99 %, особливо приблизно 99,5 %, більш конкретно приблизно 100 %, дуже конкретно вони є ідентичними. Зрозуміло, що, коли послідовності РНК описані як значною мірою подібні або такі, що мають визначену ідентичність послідовності з послідовностями ДНК, тимін (T) у послідовності ДНК вважають еквівалентним урацилу (U) у послідовності РНК.

Застосовно до визначуваних полінуклеотидів варто розуміти, що показники % ідентичності, більші, ніж % ідентичності, надані вище, включають переважні варіанти здійснення. Таким чином, коли застосовно, з урахуванням мінімальних показників % ідентичності, полінуклеотид переважно містить полінуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 75 %, більш переважно щонайменше на 80 %, більш переважно щонайменше на 85 %, більш переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 91 %, більш переважно щонайменше на 92 %, більш переважно щонайменше на 93 %, більш переважно щонайменше на 94 %, більш переважно щонайменше на 95 %, більш переважно щонайменше на 96 %, більш переважно щонайменше на 97 %, більш переважно щонайменше на 98 %, більш переважно щонайменше на 99 %, більш переважно щонайменше на 99,1 %, більш переважно щонайменше на 99,2 %, більш переважно щонайменше на 99,3 %, більш переважно щонайменше на 99,4 %, більш переважно щонайменше на 99,5 %, більш переважно щонайменше на 99,6 %, більш переважно щонайменше на 99,7 %, більш переважно щонайменше на 99,8 % і навіть більш переважно щонайменше на 99,9 % ідентична відповідній зазначеній SEQ ID NO.

У деяких варіантах здійснення даний винахід стосується жорсткості умов гібридизації для визначення ступеня комплементарності двох полінуклеотидів. Як використовують у даному документі, "жорсткість" стосується температурних умов і умов іонної сили і присутності або відсутності визначених органічних розчинників протягом гібридизації. Чим вище жорсткість, тим вище ступінь комплементарності між нуклеотидною послідовністю-мішенню і міченою полінуклеотидною послідовністю. "Жорсткі умови" стосуються температури й іонних умов, у яких гібридизуються тільки нуклеотидні послідовності з високою частотою комплементарних основ. Як використовують у даному документі, термін "гібридизуються в умовах з низькою жорсткістю, середньою жорсткістю, високою жорсткістю або дуже високою жорсткістю" описує умови гібридизації і відмивання. Посібники по проведенню реакцій гібридизації можна знайти в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, включений у даний документ як посилання. Конкретні умови гібридизації, що вказуються в даному документі, є наступними: 1) умови гібридизації з низькою жорсткістю в 6× хлориді натрію/цитраті натрію (SSC) приблизно при 45 °C з наступними двома відмиваннями d 0,2× SSC, 0,1 % SDS при 50-55 °C; 2) умови гібридизації із середньою жорсткістю в 6× SSC приблизно при 45 °C з

наступними одним або декількома відмиваннями в 0,2× SSC, 0,1 % SDS при 60 °C; 3) умови гібридизації з високою жорсткістю в 6× SSC приблизно при 45 °C з наступними одним або декількома відмиваннями в 0,2× SSC, 0,1 % SDS при 65 °C; і 4) умови гібридизації з дуже високою жорсткістю являють собою 0,5M фосфат натрію, 7 % SDS при 65 °C з наступними

5 одним або декількома відмиваннями в 0,2× SSC, 1 % SDS при 65 °C.

Як використовують у даному документі, "химерний ген" або "генетична конструкція" стосується будь-якого гена, що не є природним геном у його природному положенні, тобто з ним проводили штучні маніпуляції, включаючи химерний ген або генетичну конструкцію, що інтегровані в геном пшениці. Як правило, химерний ген або генетична конструкція містять

10 регуляторні і транскрибовані або кодуєчі білок послідовності, які разом у природі не зустрічаються. Таким чином, химерний ген або генетична конструкція може містити регуляторні послідовності і кодуєчі послідовності, що походять з різних джерел, або регуляторні послідовності і кодуєчі послідовності, що походять з одного і того ж джерела, але організовані відмінно від того, як вони існують у природі. Термін "ендогенний" застосовують у даному

15 документі для позначення речовини, яку у нормі продукує немодифікована рослина на тій же стадії розвитку, як досліджувана рослина, переважно рослина пшениці. "Ендогенний ген" стосується природного гена в його природному положенні в геномі організму, переважно в рослині пшениці. Як використовують у даному документі, "рекомбінантна молекула нуклеїнової кислоти" стосується молекули нуклеїнової кислоти, що сконструйована або модифікована за

20 допомогою технології рекомбінантних ДНК. Терміни "чужорідний полінуклеотид" або "екзогенний полінуклеотид", або "гетерологічний полінуклеотид" і т. п. стосуються будь-якої нуклеїнової кислоти, яку вводять у геном клітини, переважно геном пшениці, за допомогою експериментальних маніпуляцій, але яка в природі не зустрічається в цій клітині. Вони включають модифіковані форми генних послідовностей, що знаходяться в цій клітині, за умови,

25 що ген, що вводиться, відносно природного гена містить визначену модифікацію, наприклад внесену мутацію або присутність гена селективного маркера. Чужорідні або екзогенні гени можуть являти собою гени, що існують у природі, які вводять у неприродний організм, природні гени, які вводяться в нове положення у природного хазяїна, або химерні гени або генетичні конструкції. "Трансген" являє собою ген, який вводять у геном способом трансформації. Термін

30 "генетично модифікований" включає введення генів у клітини, мутацію генів у клітинах і зміну або модуляцію регуляції гена в клітинах або організмах, у яких проводять ці дії, або їх потомстві.

"Функціонально зв'язаний" з транскрибованим полінуклеотидом промотор або енхансерний елемент означає поміщення транскрибованого полінуклеотиду (наприклад, кодуєчого білок полінуклеотиду або іншого транскрипту) під регуляторний контроль промотору, який потім контролює транскрипцію цього полінуклеотиду. При конструюванні комбінацій гетерологічний промотор/структурний ген, як правило, переважно поміщати промотор або його варіант на відстані від ділянки старту транскрипції транскрибованого полінуклеотиду, яка є приблизно

35 такою ж, як відстань між цим промотором і геном, який він контролює в його природних умовах; тобто геном, з якого одержаний промотор. Як відомо в даній галузі, проводити визначену зміну цієї відстані без втрати функції.

Як використовують у даному документі відносно злакових рослин, термін "проростання" стосується появи колеоризи з насінної оболонки після набухання.

"Частка проростання" насіння стосується відсотка насіння у популяції, що проростає за визначений період часу, наприклад до 21 доби, або в період від 1 до 10 діб після початку набухання. Для визначення відсотка проростання залежно від часу популяцію насіння можна оцінювати кожну добу протягом декількох діб. Визначені аспекти винаходу стосуються зміни/модуляції частки проростання насіння. Ця зміна/модуляція можуть бути транзиторними протягом життя насіння. Наприклад, після збирання насіння трансгенної рослини за винаходом

50 може мати змінену частку проростання при порівнянні з насінням відповідної нетрансгенної рослини після збирання, однак після шести місяців зберігання в елеваторі насіння тієї ж трансгенної рослини за винаходом може мати таку ж частку проростання при порівнянні з насінням відповідної нетрансгенної рослини після шести місяців зберігання в елеваторі, або навпаки. Іншими словами, у той самий момент протягом життя насіння воно має змінену частку

55 проростання при порівнянні з придатним контролем (нетрансгенним або дикого типу і т. д.), що піддавався впливу тих же умов.

Як використовують у даному документі, термін "який знаходиться в стані спокою" стосується нездатності життєздатного, інтактного насіння рослини проростати в конкретних придатних умовах, зокрема відносно температури і присутності вологи. Стан спокою являє собою кількісну ознаку. Стосовно ячменю і пшениці, насіння рослини вважають спочиваючим, якщо після

60

початку набухання через 7 діб при 20 °С проростає менше 90 % життєздатного, інтактного насіння. Життєздатне насіння являє собою насіння, яке здатне проростати після порушення стану спокою, наприклад після значного періоду (тижні або місяці) зберігання при кімнатній температурі або теплової обробки, добре відомих у даній галузі.

5 Як використовують у даному документі, термін "не знаходиться в стані спокою" стосується здатності насіння рослини проростати в конкретних придатних умовах. Стосовно ячменю і пшениці, насіння рослини вважають таким, що не знаходиться в стані спокою, якщо після початку набухання через 7 діб при 20 °С проростає щонайменше 90 % життєздатного, інтактного насіння.

10 Як використовують у даному документі, термін "ампліфікація нуклеїнової кислоти" стосується будь-якого способу *in vitro* для збільшення кількості копій молекули нуклеїнової кислоти з використанням ДНК-полімерази. Ампліфікація нуклеїнової кислоти приводить до вбудовування нуклеотидів у молекулу ДНК або праймер, таким чином утворюючи нову молекулу ДНК, комплементарну матричній ДНК. Знову утворену молекулу ДНК можна

15 використовувати як матрицю для синтезу додаткових молекул ДНК.

Даний винахід стосується одержання різних трансгенних рослин. Як необмежувальні приклади, вони включають рослини, що несуть одну або декілька бажаних ознак, демонстрованих рослинами пшениці за даним винаходом.

20 Конструкції нуклеїнових кислот, придатні для одержання зазначених вище трансгенних рослин, можна легко одержувати стандартними способами. Для забезпечення відповідної експресії гена, кодуєного іРНК, що представляє інтерес, конструкція нуклеїнової кислоти, як правило, містить один або декілька регуляторних елементів, таких як промотори, енхансери, а також послідовності термінації транскрипції або поліаденілювання. Такі елементи добре відомі в даній галузі. Область ініціації транскрипції, що містить регуляторний елемент(и), може

25 забезпечувати регульовану або конститутивну експресію в рослині. Регуляторні елементи можна вибирати, наприклад, зі специфічних для насіння промоторів або промоторів, не специфічних для клітин насіння (таких як промотор убіквітину або промотор CaMV35S або посилений промотор 35S). Приклади специфічних для насіння промоторів, придатних за даним винаходом, як необмежувальні приклади, включають промотор низькомолекулярного глютеніну

30 пшениці (Colot et al., 1987), промотор експресії α -амілази в насінні пшениці (Stefanov et al., 1991) і промотор гордеїну (Brandt et al., 1985). Промотори можуть регулювати такі фактори, як температура, світло або стрес. Як правило, регуляторні елементи знаходяться з 5'-кінця генної послідовності, що підлягає експресії. Також конструкція може містити інші елементи, що підсилюють транскрипцію, такі як області поліаденілювання *pos* 3' або *ocs* 3', або термінатори

35 транскрипції.

Як правило, конструкція нуклеїнової кислоти містить селективний маркер. Селективні маркери допомагають в ідентифікації і скринінгу рослин або клітин, що трансформовані екзогенною молекулою нуклеїнової кислоти. Ген селективного маркера може забезпечувати клітинам пшениці стійкість до антибіотика або гербіциду або забезпечувати утилізацію таких

40 субстратів як маноза. Селективний маркер переважно надає клітинам пшениці стійкість до гіроміцину.

Переважно, конструкція нуклеїнової кислоти стабільно вбудована в геном рослини. Таким чином, нуклеїнова кислота містить відповідні елементи, що забезпечують вбудовування молекули в геном, або конструкцію поміщають у відповідний вектор, що може вбудовуватися в

45 хромосому клітини рослини.

Один з варіантів здійснення даного винаходу стосується рекомбінантного вектора, що містить щонайменше одну полінуклеотидну молекулу за даним винаходом, вбудовану у будь-який вектор, здатний до доставки молекули нуклеїнової кислоти в клітину-хазяїна. Такий вектор містить гетерологічні послідовності нуклеїнових кислот, що являють собою послідовності

50 нуклеїнових кислот, які у природі не граничать з молекулами нуклеїнової кислоти за даним винаходом і які переважно походять з видів, відмінних від видів, з яких походить молекула(и) нуклеїнової кислоти. Вектор може являти собою РНК або ДНК, бути прокаріотичним або еукаріотичним, і, як правило, він являє собою вірус або плазмиду.

Інший варіант здійснення даного винаходу стосується рекомбінантної клітини, що включає клітину-хазяїна, трансформовану однією або декількома рекомбінантними молекулами за даним винаходом. Трансформацію молекули нуклеїнової кислоти в клітину можна проводити будь-яким способом, яким молекулу нуклеїнової кислоти можна ввести в клітину. Способи трансформації, як необмежувальні приклади, включають трансфекцію, електропорацію, мікроін'єкцію, ліпофекцію, адсорбцію і злиття протопластів. Рекомбінантна клітина може

60 залишатися одноклітинною або може розвиватися в тканину, орган або багатоклітинний

організм. Трансформовані молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом можуть залишатися позахромосомними або можуть інтегруватися в одну або декілька ділянок хромосоми трансформованої (тобто рекомбінантної) клітини таким чином, що зберігається їх здатність до експресії. Переважно клітини-хазяїни являють собою рослинні клітини, більш переважно клітини злакової рослини, більш переважно клітини ячменю або пшениці і навіть більш переважно клітини пшениці.

Переважно, трансгенна рослина являє собою злакову рослину. Приклади злакових рослин, як необмежувальні приклади, включають пшеницю, ячмінь, сорго, овес і жито. Більш переважно, злакова рослина являє собою пшеницю або ячмінь. У додатковому переважному варіанті здійснення злакова рослина не є рисом.

Трансгенні рослини, як визначено в контексті даного винаходу, включають рослини і їх потомство, що генетично модифіковані рекомбінантними способами. Як правило, це модулює продукцію в бажаних рослині або органі рослини щонайменше одного поліпептиду, визначеного в даному документі. Частини трансгенної рослини включають усі частини і клітини зазначеної рослини, такі як, наприклад, культивовані тканини, калюс і протопласти. Трансформовані рослини містять генетичний матеріал, який вони не містили до трансформації. Генетичний матеріал переважно стабільно інтегрований у геном рослини. Внесений генетичний матеріал може містити послідовності, що у природі знаходяться в тому ж вигляді, але в переставленому порядку або в іншому розташуванні елементів, наприклад антисмислова послідовність. Такі рослини включені в даний документ як "трансгенні рослини". "Нетрансгенна рослина" являє собою рослину, що генетично не модифікована введенням генетичного матеріалу за допомогою технологій рекомбінантних ДНК. У переважному варіанті здійснення трансгенні рослини є гомозиготними по кожному і будь-якому внесеному гену (трансгену) так, що їх потомство не сегрегує по бажаному фенотипу.

Існує декілька способів введення чужорідного генетичного матеріалу в рослинну клітину. Такі способи включають прискорення покритих генетичним матеріалом мікрочастинок безпосередньо в клітини (див., наприклад, US 4945050 і US 5141131). Рослини можна трансформувати з використанням технології агробактерій (див., наприклад, US 5177010, US 5104310, US 5004863, US 5159135). Для трансформації рослин також можна використовувати технологію електропорації (див., наприклад, WO 87/06614, US 5472869, US 5384253, WO 92/09696 і WO 93/21335). На доповнення до численних способів трансформації рослин також можна варіювати тип тканини, що контактує з чужорідними генами. Така тканина може включати, але не обмежуватися ними, ембріогенну тканину, тканину калюсу типу I і II, гіпокотиль, меристему і т. п. Протягом розвитку і/або диференціювання відповідними способами, описуваними в даному документі, трансформувати можна майже всі тканини рослини.

Ряд векторів, придатних для стабільної трансфекції рослинних клітин або для одержання трансгенних рослин, описаний, наприклад, у Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; і Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Як правило, експресуючі вектори рослини включають, наприклад, один або декілька клонуваних генів рослини під транскрипційним контролем 5'- і 3'-регуляторних послідовностей і домінантний селективний маркер. Такі експресуючі вектори рослин також можуть містити регуляторну область промотору (наприклад, регуляторну область, що контролює індуковану або конститутивну, регульовану навколишнім середовищем або розвитком, або клітино- або тканиноспецифічну експресію), ділянку ініціації транскрипції, ділянку зв'язування рибосоми, сигнал процесингу РНК, ділянку термінації транскрипції і/або сигнал поліаденілювання.

Для визначення присутності трансформованої рослини можна застосовувати будь-який з декількох способів. Наприклад, можна використовувати полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для ампліфікації послідовностей, що унікальні у трансформованій рослині, з детекцією продуктів ампліфікації за допомогою електрофорезу в гелі або іншими способами. ДНК можна виділяти з рослин загальноприйнятими способами, а реакцію ПЛР проводити з використанням праймерів, за допомогою яких можна розрізнити трансформовані і нетрансформовані рослини. Наприклад, можна конструювати праймери, за допомогою яких ампліфікують область ДНК від трансформуючого вектора, зчитуючи в напрямку конструкції, а зворотний праймер конструюють на основі гена, що представляє інтерес. Ці праймери дозволяють ампліфікувати фрагмент, тільки якщо рослина успішна трансформована. Альтернативний спосіб підтвердження позитивного трансформанта являє собою гібридизацію способом саузерн-блотингу, добре відому в даній галузі. Трансформовані рослини також можна ідентифікувати, тобто відрізнити від нетрансформованих рослин або рослин дикого типу, по їх фенотипу, наприклад,

забезпечуваному присутністю гена селективного маркера або забезпечуваному фенотипом бажаного стану спокою насіння.

Способи трансформації злакових рослин, таких як пшениця і ячмінь, із внесенням генетичної варіації в рослини за допомогою введення екзогенної нуклеїнової кислоти і регенерації рослин з протопластів або незрілих зародків рослин, добре відомі в даній галузі, див., наприклад, Wan and Lemaux (1994), Tingay et al., (1997), патентна заявка Канади № 2092588, патентна заявка Австралії № 61781/94, патент Австралії № 667939, патент США № 6100447, міжнародну патентну заявku PCT/US97/10621, патент США № 5589617, патент США № 6541257 і інші способи, зазначені в описі патенту WO 99/14314. Переважно, трансгенні рослини пшениці або ячменю одержують способами опосередкованої *Agrobacterium tumefaciens* трансформації. Вектори, що несуть бажані конструкції нуклеїнової кислоти, можна вводити в регеноеровані клітини пшениці культивованих у вигляді тканин рослин або експлантів або придатні рослинні системи, такі як протопласти.

Регеноеровані клітини пшениці переважно одержують із щитка зародка незрілих зародків, зрілих зародків, калюсу, одержаного з них, або меристемної тканини.

Відбір за допомогою маркера являє собою широко визнаний спосіб відбору гетерозиготних рослин, необхідний при зворотному схрещуванні з рекурентним батьком у класичній селекційній програмі. Популяція рослин в кожному поколінні зворотного схрещування є гетерозиготною по гену, що представляє інтерес, у нормі присутньому в популяції зворотного схрещування у співвідношенні 1:1, і молекулярний маркер можна використовувати для розрізнення двох алелів гена. Виділяючи ДНК, наприклад, з молодих пагонів, і тестуючи введення бажаної ознаки з використанням специфічного маркера, проводять ранню селекцію рослин для подальшого зворотного схрещування, при цьому концентруючи енергію і ресурси на меншій кількості рослин. Для додаткового прискорення програми зворотного схрещування можна виділяти зародки з незрілого насіння (25 діб після цвітіння) і вирощувати на живильних середовищах у стерильних умовах, а не доводити до повної зрілості насіння.

У способах за даним винаходом можна використовувати будь-який молекулярно-біологічний спосіб, відомий у даній галузі, яким можна детектувати алелі *Rht-B1*. Такі способи, як необмежувальні приклади, включають використання ампліфікації нуклеїнових кислот, секвенування нуклеїнових кислот, гібридизації нуклеїнових кислот із придатним чином міченими зондами, аналіз конформації одиночних ланцюгів (SSCA), електрофорез у градієнті денатуруючого гелю (DGGE), аналіз гетеродуплексів (HET), аналіз хімічного розщеплення (CCM), каталітичне розщеплення нуклеїнової кислоти або їх сполучення (див., наприклад, Lemieux, 2000; Langridge et al., 2001). Винахід також включає використання способів з молекулярними маркерами для детекції поліморфізмів, зчеплених з алелями *Rht-B1*. Такі способи включають детекцію або аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ), RAPD, поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP) і поліморфізму мікросателітів (простого повтору послідовності, SSR). Тісно зчеплені маркери можна легко одержувати добре відомими в даній галузі способами, такими як аналіз об'єднаних сегрегантів, як описано в Langridge et al. (2001).

Протягом даного опису слово "містити" або його варіанти, такі як "містить" або "який містить", варто розуміти як таке, що означає включення зазначеного елемента, числа або етапу або групи елементів, чисел або етапів, але не виключення яких-небудь інших елемента, числа або етапу або групи елементів, чисел або етапів.

Усі публікації, зазначені в даному описі, включені в даний документ як посилання. Будь-який опис документів, дій, матеріалів, пристроїв, виробів або т. п., що включений в даний опис, наведений винятково з метою надання контексту даного винаходу. Не слід розглядати як визнання, що будь-який або всі ці положення складають частину основи відомого рівня техніки або є загальновідомими фактами в галузі, що відповідає даному винаходу, як це існувало в Австралії або в інших регіонах до дати пріоритету кожного пункту формули даної заявки.

Як використовують в описі теми, якщо з контексту явно не випливає інакше, форми однини включають форми множини. Таким чином, наприклад, указання однини включає один, а також два або більше.

Після загального опису винаходу, його можна більш легко зрозуміти на основі наведених нижче прикладів, що надані як ілюстрація і не призначені для обмеження.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Матеріали і методи

Рослинний матеріал

Зерна високорослої пшениці сорту Maringá (*Rht-B1a*) і майже ізогенної карликової лінії (*Rht-B1c*) на генетичній основі Maringa одержували з Australian Winter Cereals Collection, Tamworth,

NSW, Australia. Maringá являє собою сорт бразильської хлібопекарської пшениці. Майже ізогенну карликову лінію одержували за допомогою семи зворотних схрещувань (BC7) з рекурентним відбором карликового алеля (Rht-B1c) у Maringá (Hoogendoorn et al. 1988).

У таблиці 1 описаний ячмінь Himalaya і три раніше охарактеризовані похідні карликові мутанти. Рослини вирощували в теплиці в 20 см горщиках, що містять суміш на основі компосту, з природним освітленням із продовженням тривалості дня до 14 годин, забезпечуванім у зимові місяці, або в полі в Black Mountain або на експериментальній станції Ginninderra Experimental Station, розташованих у Канберрі, Австралія.

Мутагенез

Спосіб мутагенезу зерна ячменю і пшениці являв собою спрощення способу, використовуваного раніше (Zwar and Chandler, 1995). 1-2 кг зерен кожної лінії вбирали воду до подвоєння їх маси при 4°C протягом ночі. Їх переносили в 2-літрові мірні циліндри, заповнені водою, й аерували стисненим повітрям протягом 8 годин з однією заміною на чисту воду, проведеною через 4 години. Потім зерна інкубували протягом 2 годин у свіжоодрержаному 1 mM азиді Na, розчиненому в 0,1M К-фосфатному буфері з pH 3,0, а потім ретельно промивали в проточній воді протягом 2 годин, поміщали у витяжну шафу для сушіння протягом ночі і висівали в полі в межах періоду декількох діб після обробки.

Конструювання похідних ліній, що несуть алелі посиленого росту

Алелі посиленого росту ячменю піддавали зворотному схрещуванню, інтеркросингу й ауткросингу з одержанням набору ліній, придатних для докладної фізіологічної характеристики. Виявили чотири нових алелі посиленого росту Sln1 на основі карликів *grd2b* або *gse1n* і два покоління піддали їх зворотному схрещуванню з WT, забезпечуючи фенотипи з посиленням ростом для порівняння у високорослих і карликових основах. Втрату вихідного алеля карликовості підтверджували ПЛР. Сім нових алелів посиленого росту Sln1, що залишилися, виявили на основі карлика Sln1d і чотири з них (Sln1d.7, Sln1d.8, Sln1d.9 і TR103) два покоління піддавали зворотному схрещуванню з WT.

Продукція α -амілази напівзернами з ендоспермом

Одержували напівзерна з ендоспермом і інкубували з GA_3 (1 мкМ) або без нього при 22°C протягом 0, 42 або 72 годин. У кожен зразок додавали 1,5 мл розчину 10 mM $CaCl_2$, напівзерна гомогенізували й очищали аліквоту 1 мл за допомогою центрифугування (20000g протягом 5 хв.). Супернатант аналізували на активність α -амілази з використанням способу визначення активності альфа-амілази Megazyme (Ceralpha).

Оцінка стану спокою зерна

Рослини вирощували у вигляді одиночних рядів у полі і колосся перевіряли двічі на тиждень для моніторингу висихання. Коли колосся втрачало все зелене забарвлення, його вважали фізіологічно зрілим і зрізали і забирали в лабораторію. Колосся поміщали у витяжну шафу на термін 48 годин для проведення кінцевого сушіння, особливо базальних зерен, що мають тенденцію залишатися вологими, а потім молотили вручну. Зерна поміщали в конверт з обгорткового паперу і залишали в лабораторних умовах протягом різних періодів післязбирального дозрівання. Проростання оцінювали, інкубуючи 100 зерен кожної лінії на вологому фільтрувальному папері в середовищі при 20 °C при низькоінтенсивному флуоресцентному освітленні. Відсоток проростання кожного зразка зерен оцінювали через 7 діб інкубації. Проростання в цьому контексті визначають як появу зародкового кореня з насінної оболонки. В експерименті першого сезону, багато зразків зерен, особливо високорослих рослин пшениці, демонстрували короточасний стан спокою і спостерігали значне проростання (щонайменше 50 % пророслих зерен) усього через 13-19 діб дозрівання. Ці лінії, як правило, більше не тестували. Інші зразки зерен через 13-19 діб дозрівання демонстрували незначне проростання і їх тестували знову через 32-33 доби, і, якщо проростання усе ще залишалося незначним, знову через 48-49 діб дозрівання. Відносні оцінки стану спокою давали по шкалі від 1 (найменший стан спокою) до 4 (найбільший стан спокою).

В експерименті другого сезону оцінки стану спокою сфокусували на напівкарликових і контрольних лініях, і проростання визначали щотижня, починаючи від збирання до втрати стану спокою, або до 12 тижнів дозрівання. Приклад результатів тестування стану спокою зерен наведений на фігурі 9. Одну з мір стану спокою зерен визначали як кількість тижнів збереження зерен (що також позначається як "дозрівання") при кімнатній температурі для того, щоб у популяції зерен проросло щонайменше 50 % зерен, як оцінювали способом, описаним у попередньому абзаці.

Довжина колеоптилю ліній ячменю і пшениці з посиленням ростом

Довжину колеоптилю визначали у паростків пшениці і ячменю через 21 добу росту в темряві з програмою добової температури 12 годин при 12°C і 12 годин при 8°C у присутності цілком достатньої подачі води.

Вихід на поверхню після глибокого засівання в сухих умовах

Зразки зерен висівали в ґрунт (стандартна ґрунтова горщикова суміш) у теплиці на глибину 10 см. Вихідний вміст вологи в ґрунті складав 12-14 % (мас./мас.). Проростання, ріст на ранньому етапі й утворення паростка після появи третього листа відбувалися без якого-небудь додаткового поливу для імітації сухих умов посіву в полі. Оцінювали відсоток зерен, які дають паростки, що виходять на поверхню, і час виходу на поверхню.

Швидкості подовження листів і криві залежності "доза-ефект" для GA

Способи описані раніше (Chandler and Robertson, 1999). Криві апроксимували по точках даних з використанням 4-параметричного рівняння Хілпа.

Вимірювання довжини коренів

Ріст коренів оцінюють у контрольованих умовах і у рослин, що ростуть у полі. У першому випадку довжину коренів оцінюють за допомогою сканування, тоді як у полі беруть 2-м стрижні і кількість коренів оцінюють з 10 см інтервалами уздовж стрижнів.

Ампліфікація ДНК за допомогою ПЛР і секвенування

ДНК одержували з листів ячменю або пшениці способом Ellis et al., 2005. Послідовності пшениці ампліфікували з використанням пар праймерів, у яких один із праймерів був специфічний для гена Rht-B1 (таблиця 2). 3'-частину гена ампліфікували з використанням консервативних прямих праймерів і зворотних праймерів, що були специфічні до генних послідовностей В у 3'-УТ-області. При ампліфікації ПЛР послідовностей ячменю використовували праймери, специфічні для генів Sln1, Spy1 і Gse1. Ампліфіковані фрагменти обробляли Exosap-IT (Affymetrix) для видалення праймерів, а потім секвенували з використанням Big Dye Terminator (Applied Biosystems).

Послідовності ДНК

Послідовності генів Rht-A1a, Rht-B1a і Rht-D1b пшениці і, таким чином, кодованих білків представлені номерами доступу JF930277, JF930278 і JF930281, відповідно. Амінокислотні послідовності вирівнюють ClustalW, демонструючи амінокислоти, що відрізняються (фігура 7). Частина нуклеотидної послідовності гена Rht3-B1c карликового похідного Maringa представлена в SEQ ID NO:1.

Послідовність білка Rht-B1c, кодованого алелем Rht-B1c, представлена в SEQ ID NO:3.

Номера доступу послідовностей для генів Sln1 і Spy1 ячменю являють собою AK372064 і AF035820, відповідно.

Приклад 2. Виділення мутантів пшениці, що містять нові алелі Rht-B1

Зерна пшениці сорту Maringá, який містить алель Rht-B1c, що викликає важку карликовість рослин, обробляли азидом натрію, як описано в прикладі 1. Зерна, що мутували, висівали в полі й одержаним рослинам M₁ дозволяли самозапліднюватися. Після дозрівання з рослин M₁ збирали зерна M₂. Зерна M₂ висівали в полі або при високій щільності в лотки (фігура 1) у теплиці і піддавали скринінгу на збільшену висоту протягом росту на ранньому етапі або при дозріванні в полі. Цими способами скринінгу піддали приблизно 1,6 мільйона рослин M₂. На фігурі 1 представлено як легко можна ідентифікувати мутантів. Вибирали приблизно 400 рослин, що демонстрували швидкості подовження раннього листа або висоту зрілої рослини, що знаходилася в діапазоні від трохи більшої, ніж карликовий батько сорту Maringa (Rht-B1c), до такої ж високорослої, як майже ізогенні рослини Rht-B1a (алель дикого типу). Їх самозапліднювали і рослини-нащадки вирощували в контрольованих умовах і порівнювали з батьківськими рослинами (Rht-B1c) і рослинами дикого типу (Rht-B1a) (фігура 2). Ці рослини назвали "мутанти з посиленням ростом", тому що вони росли з підвищеними швидкостями або до збільшеної висоти зрілої рослини відносно батьківського сорту.

Мутація карликовості в алелі Rht-B1c була наслідком вставки 2026 пар нуклеотидів у ген Rht-B1 Maringa (Wu et al., 2011). Тестування ПЛР виявило, що приблизно половина з 400 вибраних мутантних рослин були позитивними на наявність вставки в цьому гені; такі рослини зберегли ген Rht-B1. Вибрані рослини, що залишилися, були негативними в аналізі ПЛР і очевидно повністю втрачали ген Rht-B1, хоча гомологічний ген, кодований у геномі D (Rht-D1), основується на позитивних ампліфікаціях ПЛР, усе ще був присутній. Багато рослин у цій останній групі мали явні морфологічні зміни і погану фертильність колоса. Імовірно, що вони представляли делеції гена Rht-B1 поряд з варіюючими кількостями фланкуючої хромосомної ДНК. Лінії з цими делеціями далі не вивчали.

Ген Rht-B1 у кожного з 139 мутантів без делецій секвенували за допомогою ампліфікації областей гена за допомогою ПЛР. Ідентифіковано тридцять п'ять нових похідних алелів Rht-

B1c, кожен являє собою один варіант алеля Rht-B1c Maringa. Їх позначили Rht-B1c.1, Rht-B1c.2, Rht-B1c.3 і т. д. Вони перераховані в таблиці 3. Багато які з 35 алелів представлені в декількох лініях, що містять ідентичні специфічні мутації. У деяких випадках ці декілька ліній можуть бути сестринськими, тоді як в інших випадках вони можуть представляти незалежні події мутування.

5 Усього спостерігали 62 незалежні події, що породили 35 алелів.

Мутанти демонстрували три різних класи мутацій, відповідальних за фенотип посиленого росту. У першому класі десять алелів містили передчасні кодони термінації трансляції в гені Rht-B1. У більшості випадків мутантний кодон являє собою заміну кодону TGG (кодуєчного Trp) на TGA (стоп-кодон). У ячмені передчасні стоп-кодони в DELLA приводять до подовженого

10 потоншеного фенотипу і чоловічої стерильності. На відміну від цього, рослини цих десяти мутантних ліній пшениці, за одним виключенням, росли до висоти, що була такою ж або майже такою ж, як у високорослої (дикого типу) ізоляції, і демонстрували подібну з диким типом фертильність. Передбачувано експресія білків Rht-1 геномів A і/або D у цих мутантів забезпечувала генетичну компенсацію нуль-мутантів генів геному B і обмежувала фенотипічну

15 експресію до "високорослої", а не "потоншеної". Одне виключення, рослини єдиного представника Rht-B1c.22 representative (лінія TR544) були напівкарликовими, а не "високорослими". Цей фенотип міг бути результатом альтернативного сплайсингу мутантного гена Rht-B1c.22 у цих рослинах, який приводив до утворення білка Rht-B1 з іншою вставкою в рамку зчитування (описано нижче).

20 Другий клас включав заміни амінокислот у білку Rht-B1, кодованому геномом B. Двадцять прикладів перераховані в таблиці 3. Представляє інтерес порівняння цих 20 замін з мутантами DELLA із замінами, одержаними у ячменю (приклад 5), див. фігуру 3. У двох видів існує 31 одиночна заміна амінокислот, включаючи чотири ділянки, де відбулися ідентичні заміни амінокислот. Також помічено, що у ячменю й у пшениці відбулися ідентичні, хоча і незалежні,

25 мутації, де одну і ту ж мутацію виявляли у відповідних положеннях у лініях, що походять з різних субпопуляцій зерен M₂.

Фігура 3 схематично демонструє ділянки замін амінокислот у мутантів відносно положень консервативних мотивів у С-кінцевій області білків ячменю і пшениці. Спостереження, що

30 мутації з посиленням ростом розташовані на всьому протязі більшої частини С-кінцевої області, означає, що існує суттєвий потенціал для змін зв'язування білків DELLA із взаємодіючими білковими партнерами.

Третій клас мутантів включав 5 алелів, де кожний містив мутації в областях Rht-B1, для яких теоретично розраховано, що вони залучені у вирізання більшості вставок у ген Rht-B1, які утворювали алель Rht-B1c (таблиця 3). Кожний з цих алелів зачіпав один з чотирьох нуклеотидів, що безпосередньо граничать з донорною і акцепторною ділянками сплайсингу. У

35 деяких випадках, включаючи алель Rht-B1c.22, і залежно від того, яке програмне забезпечення прогнозування сплайсингу використовували, для цих змін послідовності існував потенціал змін переважної ділянки сплайсингу, таким чином одержуючи білки Rht-B1 з трохі більшими або меншими вставками в рамку зчитування. Ці алелі сплайсингу передбачувано приводили до

40 продукції меншої кількості білка Rht-B1, що містить вставку 30 амінокислот, і/або приводили до продукції модифікованих білків Rht-B1 зі зміненими вставками в рамку зчитування. Експериментальні дані по зміні ефективності сплайсингу одержували, досліджуючи РНК способами 3Т-ПЛР.

Приклад 3. Фенотипічне тестування мутантів пшениці, що містять нові алелі Rht-B1

45 Мутанти пшениці з посиленням ростом, що містять нові алелі Rht-B1, тестували на ряд ознак, які значимі для практичного застосування в полі для комерційного одержання пшениці. Вимірювали довжину зрілих стебел, довжину колеоптилів і відносний стан спокою зерна для зерна, одержуваного з мутантних рослин, і порівнювали з контрольними рослинами. Дані наведені в таблиці 4. Довжину стебла зрілих рослин оцінювали в різних умовах зрошуваних

50 полів (тобто з гарним водопостачанням) і в різних сезонах. У більшості випадків одержували чотири незалежних точки даних і використовували для розрахунку середніх, представлених у таблиці 4, які виражені у вигляді відсотків відносно рослин Rht-B1a. Пізні алелі приводять до різної довжини стебла, де деякі приклади (наприклад, Rht-B1c.6, с.8, с.21) є повністю карликовими, а інші (Rht-B1c.11, с.25, с.31) є такими високорослими, як ізоляція Rht-B1a. У

55 більшості випадків між лініями, що несуть один і той же алель, існують невеликі варіації. На основі напівкарликовості, спостережуваної у рослин ізоляції Rht-B1b, що складала приблизно 81 % висоти рослини дикого типу (високорослої), виявили 15 нових алелів, що приводили до того ж ступеня карликовості, наприклад у діапазоні 75-91 % від високорослої рослини.

Також у мутантних рослин вимірювали довжину колеоптилів і розраховували як відсоток від

60 середньої довжини колеоптилю у рослин Rht-B1a. Значення середньої 2-4 незалежних

вимірювань наведені в таблиці 4. Спостерігали більшу варіацію довжини колеоптилів у лінії, ніж виявили для довжини стебла. Частково це може бути пов'язане з відмінностями між зернами, що походять з поля і з теплиці. Вирощувані в полі зерна доступні для абсолютної більшості ліній у наступний сезон вирощування, і проводять додаткові вимірювання колеоптилів. Очікують, що вони продемонструють меншу варіацію. У цілому спостерігали загальну позитивну кореляцію між довжиною стебла і довжиною колеоптилю. У деяких випадках необхідна додаткова робота для оцінки статистичної значимості відмінностей, де спостерігали порушення кореляції.

Стан спокою зерен більшості мутантних ліній оцінювали для зерна, що збирається за два польових сезони. В обох сезонах високорослі ізоляції Maringa і ізоляції Maringa Rht-B1b демонстрували короточасний стан спокою, тоді як ізоляція Rht-B1c мала відносно довгостроковий стан спокою. Спостерігали суттєві відмінності у відносних показниках стану спокою зерна між різними лініями з посиленням ростом. На фігурі 9 представлені дані для деяких ліній у порівнянні з контролем. Особливий інтерес представляли алелі, що забезпечували придатну напівкарликову висоту рослин і зберігали суттєвий стан спокою зерна, такі як Rht-B1c.9, с.17, с.22, с.23, с.24, с.26, с.27. Вони включають чотири напівкарликові лінії, що на даний час піддаються зворотному схрещуванню з елітними лініями.

Багато які з ліній на третій сезон тестували в полі. Дані по висоті рослин і показники стану спокою представлені в таблиці 8. Результати узгоджувалися з трендом попередніх двох сезонів, демонструючи, що зерну деяких мутантних ліній необхідно значно більш тривале зберігання ("дозрівання") для проростання 50 % зерен у стандартному тесті проростання (приклад 1). Хоча тренд відносно стану спокою між лініями і контролем залишався однаковим від сезону до сезону, абсолютні кількості для будь-якої лінії від сезону до сезону варіювали.

Приклад 4. Виділення мутантів ячменю з посиленням ростом

Для виділення мутантів ячменю з посиленням ростом як вихідний матеріал вибирали три карликових мутанти ячменю "Himalaya". Кожен мутант містив визначену одонуклеотидну заміну в гені, залученому у (i) біосинтез GA, а саме Grd2, кодуєму GA3-оксидазу, (ii) рецептор GA "GID1", кодований геном Gse1, і (iii) відповідь на GA, а саме ген Slr1, кодуєму білок DELLA ячменю. Зерна кожної карликової лінії обробляли азидом натрію, висівали в полі і дозволяли самозапліднюватися з одержанням насіння M₁. Його висаджували з одержанням рослин M₁, з яких збирали зерна M₂. Одержані паростки M₂, вирощувані в ґрунті, піддавали скринінгу на стадії другого листа на паростки, що демонструють більш швидкий ріст, ніж їх карликові сибси. Усього з висіяних приблизно 10⁶ зерен одержали три різних категорії мутантів, що представляють приблизно 50000 колосів M₁.

Перша категорія, найбільш відповідна даній заявці, включала 22 рослини, що росли більш швидко, ніж їх карликові сибси. Вони були повністю фертильні і їх рослини-нащадки були однорідні і демонстрували швидкий ріст. У кожному випадку присутність вихідної мутації карликовості підтверджували за допомогою секвенування відповідного фрагмента ПЛР. Їх швидкості подовження листів були вище, ніж очікувалося на основі присутності мутації карликовості. Вони демонстрували діапазон ступеня посилення росту від деяких рослин зі швидкостями подовження листів незначно, але значимо більшими, ніж у їх карликового батька, до інших, у яких подовження відбувалося так само швидко або навіть трохи швидше, ніж у відповідних високорослих рослин дикого типу (див. нижче). Висота різних мутантів з посиленням ростом при досягненні зрілості знаходилася в діапазоні від проміжної між карликовим батьком і диким типом до такої ж високорослості, як у дикого типу.

Друга категорія, одержувана тільки на генетичній основі карлика Slr1d, включала три рослини, що росли більш швидко, ніж їх карликові сибси, але усе ще зберігали визначений ступінь карликовості. У наступному поколінні потомство цих рослин складалося з карликових і типових подовжених потоншених рослин у співвідношенні приблизно 3:1. Додатковий аналіз (нижче) продемонстрував, що вони містили нові алелі slr1, у яких друга мутація функціонувала як внутрішньогенний супресор мутації Slr1d.

Третя категорія, спостережувана на основі карликів з порушенням біосинтезом GA і рецептором GA, складалася з типових подовжених потоншених мутантів. Їх легко розпізнавали по їх характерному сильно подовженому фенотипу і блідо-зеленому забарвленню і, після пересадження, по їх сильно подовжених стеблах і стерильності. Цей клас мутантів очікувався, оскільки нуль-алелі подовженості slr1 є епістатичними для дефектів у біосинтезі GA або функції рецепторів GA (Chandler and Robertson, 1999).

Приклад 5. Ідентифікація мутацій ячменю і дослідження генетичного зчеплення

З потоншених рослин трьох сегрегуючих ліній на основі карлика Slr1d (друга категорія вище) одержували ДНК і секвенували ген Slr1. Рослини кожної лінії містили різні нові мутації в гені Slr1, що приводять до передчасного кодону термінації трансляції у відкритій рамці

зчитування (ORF). Нові мутантні алелі являли собою похідні Sln1d і, таким чином, названі Sln1d.1, Sln1d.2, Sln1d.3 (таблиця 1). Вони являють собою нові внутрішньоалельні мутації, де друга мутація перетворює локус карликовості Sln1d у типовий алель з втратою функції, алель подовженості sln1. Ці рослини далі не досліджували.

У кожного з мутантів з посиленням ростом (перша категорія вище) секвенували весь ген Sln1 з підтвердженням збереженої присутності алеля Sln1d і для визначення виникнення інших мутацій у цьому гені, оскільки він був одним з декількох генів-кандидатів, у яких нова мутація могла приводити до фенотипу посиленого росту. Нові мутації в ORF Sln1 знайдені в 20 з 22 рослин. Мутації визначали одинадцять нових алелів гена Sln1. Деякі з рослин несли ідентичні мутації і передбачувано були сибсами. Сім з нових алелів посиленого росту Sln1 виникли на основі карлика Sln1d і, таким чином, являли собою алелі, що містять внутрішньогенні супресорні мутації. Їх назвали Sln1d.4-Sln1d.10. Три мутації виникли на основі grd2b (sln1m, sln1o, sln1s) і одна виникла на основі gse1n (sln1n). Кожний з нових алелів відрізнявся від свого батьківського алеля одноклеотидною заміною, що приводила до заміни однієї амінокислоти в послідовності білка SLN1. Одержані заміни амінокислот наведені в таблиці 1 (лінії TR). Вони виникали в С-кінцевих 60 % білка SLN1, що відповідають домену GRAS, і усі відповідали аналогічним мутаціям у мутантів пшениці, описаних вище. Спостерігали дві ідентичних події мутації, що приводили до заміни амінокислоти G829A, одна відбувалася в популяції мутантів Sln1d.7, а інша - в популяції sln1s. Вони являли собою незалежні події мутацій, оскільки перший являв собою похідне алеля Sln1d, тоді як другий виникав у гені Sln1 дикого типу на основі карлика grd2b.

У двох лініях з посиленням ростом (TR26, TR103), що залишилися, були відсутні які-небудь нові мутації в ORF Sln1 і потенційно були присутні мутації в інших генах. Вони виникали на основі карлика Sln1d. Рослини цих ліній схрещували з Himalaya разом з Sln1d.5 як позитивним контролем для оцінки генетичного зчеплення алеля карликовості Sln1d і нового алеля посиленого росту. Популяція F₂ після схрещування контрольного WT×Sln1d.5 демонструвала очікуваний розподіл максимальної швидкості подовження листів 3:1 (Sln1d.5:WT). Індивідуальних рослин F₂ з уповільненою швидкістю росту батьківського Sln1d не спостерігали, що вказувало на повне зчеплення вихідної мутації карликовості і вторинної мутації посиленого росту в цій відносно невеликій популяції. Таким чином, вторинна мутація являла собою внутрішньогенну супресорну мутацію. Подібний результат спостерігали для популяції F₂ TR103×WT, що вказувало на те, що мутація посиленого росту в TR103 демонструвала повне зчеплення з Sln1d. На відміну від цього популяція F₂ TR26×WT містила більшість паростків зі швидкостями росту, такими ж, як Sln1d, приблизно 25 % зі швидкостями росту, такими ж, як у WT, і деякі паростки з проміжними швидкостями росту. Ці результати узгоджуються з тим, що мутація посиленого росту в TR26 знаходиться в гені, що не зчеплений з Sln1.

У TR26 секвенували декілька інших генів-кандидатів передачі сигналу GA. Ген-кандидат рецептора GA (Gse1) і два гени-кандидати F-box мали таку ж послідовність, як і у дикого типу, але в послідовності Spindly1 виявили одноклеотидну заміну (spy1a, таблиця 1), що приводила до заміни амінокислоти в шостому мотиві TPR SPY1. У Arabidopsis ця область важлива для активності SPY, оскільки вона містить декілька мутантних алелів (Silverstone et al., 2007). SPY1 кодує негативний регулятор передачі сигналу GA, що вперше ідентифікований у Arabidopsis, але пізніше показано, що в ячмені (Robertson et al., 1998) і рисі (Shimada et al., 2006) існують функціонально споріднені гени.

В результаті, 22 мутанти ячменю з посиленням ростом представляли 13 незалежних подій мутацій. Одинадцять з них являли собою нові алелі Sln1, що викликали заміни одиночних амінокислот у SLN1. Дванадцята була тісно зчеплена з Sln1, але знаходилася в невизначеній області, можливо являючи собою мутацію промотору, і тринадцята являла собою новий алель у незчепленому гені, Spy1.

Приклад 6. Швидкості подовження листів ячменю, що несе нові алелі Sln1

Надійну міру сприйнятливості до GA являла собою максимальна добова швидкість подовження (LER_{max}), що досягається першим листом у стандартних умовах (Chandler and Robertson, 1999), і, таким чином, її визначали для всіх ліній ячменю з посиленням ростом і їх предків (таблиця 5). У всіх тринадцяти вихідних ліній з посиленням ростом спостерігали значимі більш високі значення LER_{max}, ніж у їх відповідних карликових батьків, хоча ступінь посилення росту варіював залежно від алеля. Три алелі посиленого росту (sln1m, sln1n і sln1s) порівнювали в їх вихідній карликовій генетичній основі, а також після зворотного схрещування з високорослою рослиною на основі WT. Швидкості росту були систематично нижче в карликових основах, вказуючи на те, що алелі посиленого росту усе ще знаходилися під впливом зниженої передачі сигналу GA, що є результатом ушкодженого біосинтезу GA або ушкодженої функції

рецептора GA. В основі дикого типу алелі посиленого росту мали тенденцію збільшувати швидкості росту.

Приклад 7. Продукція α -амілази напівзернами з ендоспермом

Продукція α -амілази напівзернами з ендоспермом ячменю дикого типу залежить від присутності активного GA. Таким чином, моніторинг α -амілазної активності за відсутності активного GA забезпечує зручну міру ступеня "базальної" передачі сигналу GA у мутантів. Дві контрольні лінії з нормальною чутливістю до GA (WT, *grd2b*) через 72 години інкубації з GA₃ демонстрували майже 15-кратне збільшення α -амілазної активності в порівнянні з базальними рівнями (таблиця 5). Коли досліджували мутантів з посиленням ростом і їх карликових батьків, вихідний рівень α -амілазної активності у зрілих напівзерен з ендоспермом був дуже низьким, але при інкубації деяких ліній з посиленням ростом (*Sln1d.4*, *Sln1d.7*, *Sln1d.8*, *Sln1d.9*; *Sln1d.spru1a*; *grd2b*, *sln1m*; *grd2b*, *sln1o*; *grd2b*, *sln1s*) демонстрували збільшену продукцію α -амілази відносно карликового батька, тоді як в інших (*Sln1d.5*, *Sln1d.6*, *Sln1d.10*; *gse1n*, *sln1n*) цього не спостерігали. Серед похідних *Sln1d* з посиленням ростом, похідне *Sln1d.9* було незвичайним, накопичуючи дуже високі рівні α -амілази і через 42 години, і через 72 години інкубації, незважаючи на те, що ця лінія демонструвала тільки помірне відновлення швидкості росту (таблиця 5).

Приклад 8. Інші ознаки, асоційовані з алелями посиленого росту

Рослини ліній з посиленням ростом по виду протягом росту і при дозріванні були близькі до нормального за винятком відмінностей у загальній висоті. Існує діапазон висот у дев'яти похідних *Sln1d* з посиленням ростом, хоча жодне при дозріванні не було таким же високорослим як дикий тип. Довжина колеоптилю ліній з посиленням ростом варіювала в загальній відповідності зі значеннями LER_{max} і з кінцевою висотою рослини.

Однією загальною характеристикою мутантних рослин ячменю з посиленням ростом було те, що вони продукували більш великі зерна, ніж їх карликові батьки. У різних врожаєх у різних сезонах росту розміри зерен в основному були проміжними між батьківським карликом (маса зерна приблизно 40 мг) і високорослим диким типом (маса зерна приблизно 55 мг). Однак декілька ліній з посиленням ростом, що при дозріванні були такими ж високорослими, як дикий тип, мали значно більші колоси і зерна. У різних тепличних поколіннях зерна *grd2b* і *sln1m* у середньому були на 40 % більше, ніж зерна карликового батька *grd2b*. Коли проводили зворотне схрещування з основою *Himalaya*, спостерігали 20 % середнє збільшення спостережуваної маси зерна, а при ауткросингу з комерційним сортом *Sloop* спостерігали 15 % збільшення в матеріалі BC₂. Повний аналіз проводили, коли стали доступні сестринські лінії *Sloop* BC₃.

Приклад 9. Опис деяких досконалих маркерів

Нові алелі *Rht-B1c* у пшениці або ячменю легко вводити в селекційні програми і їх можна відслідковувати за допомогою відбору за допомогою маркера з використанням універсального досконалого маркера для алелів посиленого росту. Наприклад, для пшениці це включає ампліфікацію ПЛР між двома праймерами, один із яких знаходиться в області вставки 2062 нуклеотидів у гені *Rht-B1c*, а інший знаходиться поза вставкою, наприклад в кодуючій області *Rht-B1*. Ампліфікація відповідного продукту відбувається тільки тоді, коли матрична ДНК походить з рослинного матеріалу, що містить щонайменше одну копію алеля посиленого росту. Два їх приклади наведені в таблиці 2. Ці ампліфікації можна використовувати для простого розрізнення нових алелів, що походять з *Rht-B1c*, з іншим алелем напівкарликовості *Rht-B1b* і геном напівкарликовості *Rht-D1b*. Маркери для гена *Rht-B1*, відмінного від алеля *Rht-B1c* або його похідних алелів, можна легко одержувати з використанням пари праймерів, яка фланкує ділянку вставки в *Rht-B1c*.

Приклад 10. Зворотне схрещування вибраних алелів з іншими сортами пшениці

Дослідження схрещування у ячменю, як описано вище, продемонстрували 100 % спільне успадковування у мутантних алелів *Rht-B1* і фенотип посиленого росту. У пшениці проводили два експерименти по схрещуванню. У першому рослини шести ліній з посиленням ростом схрещували з гомозиготами *Maringa* по алелю *Rht-B1b* (напівкарликовість), а рослини інших чотирьох ліній схрещували з гомозиготами *Maringa* по алелю *Rht-B1a* дикого типу (високий ріст). Потомство F₁ піддавали самозапиленню з одержанням рослин F₂. Наявності карликових (гомозиготних по *Rht-B1c*) рослин у поколінні F₂ не детектували в жодному випадку, що вказує на те, що для кожної з десяти ліній спостерігали 100 % генетичне зчеплення між новими алелями *Rht-B1* і фенотипом посиленого росту, і нова мутація, що пригнічує карликовість, знаходилася в гені *Rht-B1*, а не в іншому місці геному. У схрещуваннях з *Rht-B1b* у потомстві F₂ продемонстровані очікувані профілі успадковування для алелів посиленого росту і *Rht-B1b*, тобто співвідношення гомозигот:гетерозигот:гомозигот 1:2:1. В одному зі схрещувань батька з

посиленим ростом (лінія TR550, Rht-B1c.8) спостерігали значною мірою більш карликовим, ніж Rht-B1b, і популяція F_2 демонструвала сегрегацію по висоті (гомозиготи з посиленим ростом = 65 см, гетерозиготи = 80-85 см, гомозиготи Rht-B1b=95-100 см) у співвідношенні, що незначно відрізняється від 1:2:1, що означає, що фенотип визначали по відмінності в одному гені.

Важливо, що цей помірно карликовий алель посиленого росту в лінії TR550 був асоційований з тривалим станом спокою. Крім того, популяція F_3 зерен вирощених у полі рослин F_2 демонструвала тривалий стан спокою для гомозиготних по Rht-B1c.8 рослин F_2 , проміжний стан спокою для гетерозиготних по Rht-B1c.8/Rht-B1b рослин F_2 і короточасний стан спокою для гомозиготних по Rht-B1b рослин F_2 . Цей результат означає, що алель посиленого росту після схрещування є визначальним для фенотипів висоти і стану спокою.

Чотири лінії, що схрещуються з Rht-B1a Maringa, являли собою лінії, позначувані 544, 612, 705 і 791 (таблиця 4), що несуть алелі Rht-B1 Rht-B1c.22, Rht1c.23, Rht-B1c.24 і Rht-B1c.26, відповідно. У кожному випадку в поколінні F_2 спостерігали очікуване співвідношення генотипної сегрегації. Рослини F_2 , гомозиготні по алелю посиленого росту, демонстрували очікуване зменшення висоти і збільшення стану спокою, що означало, що мутантні алелі Rht-B1 можна схрещувати з іншими генетичними основами і вони збережуть фенотипічний ефект. Це також означало генетичне зчеплення двох фенотипів, а саме напівкарликової висоти рослин і більш тривалого стану спокою, зумовлених мутантними алелями Rht-B1.

У другому експерименті вибрані алелі посиленого росту вводили в елітні селекційні лінії за допомогою зворотного схрещування з метою заміщення їх існуючого гена напівкарликовості (Rht-B1b або Rht-D1b) новим алелем посиленого росту. Це проводили для комбінації фенотипу напівкарликової висоти при дозріванні з іншими сприятливими ознаками, такими як поліпшена схожість і збільшені рівні стану спокою зерен. Схрещування проводили з використанням рослин ліній 544, 612, 705 і 791 як донорів пилка з рослинами 10 різних елітних сортів пшениці, а саме Crusader, EGA Gregory, Espada, Lincoln, Magenta, Yitpi, Young, KWS Chasmin, KWS Scirocco, McNeal і Outlook. Після всіх схрещувань одержували зерна F_1 , і висівали для додаткового зворотного схрещування трьох донорних алелів з рекурентними батьками. Для підтвердження гібридності рослин F_1 використовували маркери ПЛР. Один з чотирьох донорів був трохи вище, ніж рослини, що несуть Rht-B1b, але три з чотирьох донорів були дуже подібні по висоті один з одним і з рослинами, що несуть Rht-B1b (напівкарликами). В експерименті по схрещуванню включають один або два додаткових алелі, які є трохи більш карликовими, ніж Rht-B1b, і які мають прекрасний стан спокою зерна, такі як Rht-B1c.3 і/або Rht-B1c.17.

Обговорення

Після мутагенезу карликових сортів, що несуть алель важкої карликовості, виділяли мутанти ячменю і пшениці з посиленим ростом. Мутанти, що представляють інтерес, зберігали мутацію, яка викликає важку карликовість у батьківських сортах, але росли швидше, ніж батьківські рослини, внаслідок знову індукованої мутації в тих же генах Rht-B1 або Sln1. Вони характеризуються посиленою передачею сигналу GA, хоча ступінь посилення був специфічний для обох алелів і розглянутої відповіді GA. Результати вказують на те, що гени Della (Sln1 у ячмені, Rht-B1 у пшениці) є найбільш частими ділянками мутацій посиленого росту. Тільки в одному випадку був залучений інший ген - у ячменю один з мутантів з посиленим ростом був наслідком нової мутації в *Spy1*.

П'ять незалежних ліній підтримують висновок, що за фенотипи посиленого росту відповідали нові мутації в генах Della, ідентифіковані в даній роботі, а не незчеплена мутація або мутація в іншому гені або просто загальний наслідок обробки мутагеном. По-перше, для кожного з 13 мутантів ячменю секвенований "контрольний" ген (*Gse1*) приблизно такої ж довжини, як і Sln1, і в жодному випадку не детектували заміни основ. По-друге, спостережувані мутації були майже винятково (у 30 з 31 мутанта) замінами G на A, за умови, що C на T представляє G на A у протилежному ланцюзі ДНК, подібно з попередніми спостереженнями за індукованими азидом мутантами по інших локусах, включаючи *Gse1* (рецептор G), Sln1, гени біосинтезу GA і біосинтезу крохмалю. Внаслідок виродженості генетичного коду можна прогнозувати, що, при випадкових замінах G на A, 33 % не приведуть до відповідних заміни амінокислот. Однак у більше ніж 90 знову індукованих мутантів, де кожний містив мутацію у відкритій рамці читування, в цих різних генах ячменю не спостерігали жодного випадку мовчазної заміни нуклеотиду. Ця відсутність вказує на те, що мутації відбирали тільки тоді, коли амінокислотна заміна порушувала функцію білка, приводячи до змін фенотипу. По-третє, ідентифіковані мутації майже завжди зачіпали амінокислотні залишки, що були консервативними. Наприклад, мутації DELLA у видів злаків і таксономічно далекого *Arabidopsis* зачіпали амінокислотні залишки, що були ідентичними, тільки з двома або трьома виключеннями. Це можна спостерігати на фігурі 8, що демонструє вирівнювання білків GAI

пшениці Rht-B1a і *Arabidopsis*, демонструючи ідентичні консервативні амінокислоти в двох послідовностях. Заміна висококонсервативних амінокислотних залишків з набагато більшою імовірністю приводить до функціонального порушення активності білка, ніж заміни низькоконсервативних залишків. По-четверте, незалежні схеми мутагенезу давали приклади ідентичних мутацій і, таким чином, відповідних ідентичних заміни амінокислот, індукованих у ячменю, у ячменю і пшениці й у пшениці. По-п'яте, коли проводили дослідження зчеплення, після схрещування і наступної сегрегації, завжди спостерігали 100 % зчеплення між мутантними фенотипами і мутантними послідовностями генів.

Алелі посиленого росту підсилюють передачу сигналу GA і, таким чином, найбільш ймовірно знижують кількість білка DELLA або його функціональну активність, останнє ймовірно зачіпає його взаємодії з іншими білками. У деяких випадках диференціального сплайсингу, також існував потенціал утворення білків DELLA з різними вставками амінокислот у рамку зчитування. Наприклад, мутанти іноді продукували вставки, більш короткі або більш довгі, ніж вставка 30 амінокислот у білок Rht-B1c. Заміни амінокислот можуть приводити до збільшеного руйнування DELLA, якщо вони приводили до більш сильної афінності до комплексу GA-GID1 або до субодиниці F-box. Малоімовірно, що випадкові заміни підсилять білкові взаємодії, хоча при ефективному скринінгу мутантів усе-таки можна одержувати дуже рідкі події. Попередні спроби визначити вміст білка DELLA у різних частинах рослин пшениці за допомогою способів з антитілами були безуспішними (Pearce et al., 2011). Автори винаходу вважають, що більш ймовірним є те, що мутантні білки DELLA, одержані, як описано вище, мають знижену афінність до інших взаємодіючих білкових партнерів. Значна кількість заміни амінокислот відбувалася в мотиві LHR1, області, яка у *Arabidopsis* залучена у взаємодії з PIF4 і PIL5 (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Різний вплив конкретних алелів посиленого росту на ріст у порівнянні з продукцією α -амілази у ячменю свідчить, що різні області білка DELLA для регуляції цих двох відповідей взаємодіють з різними білковими партнерами.

Несподіваним виявилось те, що майже всі ідентифіковані мутації посиленого росту були в одному гені, особливо в гені, для якого показано, що він фундаментально важливий для контролю росту в ряді видів рослин у контрольованих і польових умовах. Перевага нових алелів у гені Della, закодованого у пшениці і ячменю, підкреслило важливість цього гена для контролю росту. Наприклад, серед похідних карлика зі зміною біосинтезу GA з посиленням ростом, мутантів, що могли збільшити вміст активних GA, наприклад, таких як мутації в генах катаболізму GA, не ідентифікували, незважаючи на великі кількості проаналізованих мутантів. Успіх в одержанні множини нових мутантів у пшениці є наслідком того факту, що карликовість внаслідок напівдомінантних алелів, таких як Rht-B1c, фактично була диплоїдною ознакою, що зачіпає тільки один із трьох геномів. Це забезпечило відбір ряду похідних алелів з втратою функції (відносно Rht-B1c), багато які з яких включають внутрішньогенні вторинні мутації.

В обох видах нові алелі виявляли по агрономічно важливій ознаці, а саме висоті рослини. Крім того, спостерігали варіацію інших залежних від GA ознак, деякі з яких мали практичний інтерес. У ячменю спостерігали більш великий розмір зерна і збільшену продукцію α -амілази без необхідності в додаванні GA. Обидві ознаки вважають корисними, наприклад, для збільшеної життєздатності раннього паростка і поліпшеної ефективності солодження, відповідно. Велика колекція мутантів пшениці включала мутанти з діапазоном у ступені карликовості крім існування алелів напівкарликовості Rht-1, що, за очікуваннями, має значення в спрямуванні конкретних алелів у конкретні навколишні середовища (Flintham et al., 1997). Також спостерігали значну варіацію інших залежних від GA ознак з практичним значенням, наприклад збільшену довжину колеоптилю відносно рослин, гомозиготних по Rht-1, і більш тривалий стан спокою зерна відносно рослин, гомозиготних по Rht-B1a або Rht-B1b. Ці алелі повинні функціонувати як основні генетичні детермінанти при введенні ряду ознак у селекційні лінії під контролем досконалих молекулярних маркерів, доступних для гена.

Гени Della є висококонсервативними у різних видів. Порівняння послідовностей білка пшениці Rht-B1a білків *Arabidopsis thaliana* GAI представлене на фігурі 8. Як можна бачити, існував великий ступінь ідентичності між цими білковими послідовностями у різних видів. Важливо, що з 20 заміни амінокислот, знайдених у мутантів пшениці з посиленням ростом, усі, за винятком двох або трьох, знаходилися в амінокислотах, консервативних у поліпептидах, кодованих генами пшениці і *Arabidopsis*. Це переконливо підтверджує те, що залишки в цих конкретних положеннях у білках DELLA у різних видів є особливо важливими для активності.

Таблиця 1

Лінії, генотипи і мутації ячменю

Лінія	Генотип	Мутація ¹		Посилання
		Нуклеотид	Амінокислота	
Himalaya	WT			
Sln1d і похідні				
M640	Sln1d	G137A	G46E	Chandler et al., 2002
M763seg ²	Sln1d/Sln1d.1	G294A ³	W98ter ³	Це дослідження
M778seg ²	Sln1d/Sln1d.2	G1041A ³	W347ter ³	" "
M783seg ²	Sln1d/Sln1d.3	G1839A ³	W613ter ³	" "
TR1	Sln1d.4	C1469T ³	S490F ³	" "
TR9	Sln1d.5	G839A ³	R280H ³	" "
TR13	Sln1d.6	G803A ³	R268H ³	" "
TR26	Sln1d, spy1a	G812A (Spy1)	G271D (SPY1)	" "
TR56 ⁴	Sln1d.7	G829A ³	A277T ³	" "
TR60 ⁴	Sln1d.8	G691A ³	V231M ³	" "
TR100 ⁴	Sln1d.9	G1442A ³	R481H ³	" "
TR103 ⁴	-	-	-	" "
TR107	Sln1d.10	G844T ³	V282F ³	" "
grd2b і похідні				
M463	grd2b	-		Wolbang et al., 2004
TR216	grd2b, sln1s	G829A	A277T	Це дослідження
TR261	grd2b, sln1m	G680A	G227E	" "
TR305	grd2b, sln1o	C1454T	S485F	" "
gse1n і похідні				
M693	gse1n	-		Chandler et al., 2008
TR407	gse1n, sln1n	G710A	C237Y	Це дослідження
Інші похідні лінії				
M240 ⁴	sln1m	Як зазначено вище		Це дослідження
M242 ⁴	sln1n	" "		" "
M243 ⁴	sln1s	" "		" "
M244seg ²	sln1s/Sln1d.7	" "		" "
M247 ⁴	spy1a	" "		" "
M248	grd2b, spy1a	" "		" "
M249	gse1l, spy1a	" "		" "

Виноски

¹ Координати стосуються положень в кодуючій послідовності HvSln1 або амінокислотній послідовності SLN1 Himalaya (номер доступу Genbank AK372064), починаючи від ATG і закінчуючи TGA. Для TR26 координата стосується положення в кодуючій послідовності HvSpy1 (AF035820) або амінокислотній послідовності SPY1, починаючи від ATG і закінчуючи TGA.

² Зерна являють собою потомство гетерозигот, сегрегуючих по локусу Sln1, як зазначено (гомозиготні подовжені потоншені рослини є стерильними).

³ Sln1d.1-Sln1d.10 являють собою похідні Sln1d і на доповнення до зазначених нових замін містять вихідну мутацію Sln1d. Тільки лінії з посиленням ростом (Sln1d.4-Sln1d.10) можуть підтримуватися як гомозиготи.

⁴ Показані лінії, одержані після двох зворотних схрещувань з Himalaya перед відбором на гомозиготність алеля.

Таблиця 2

Нуклеотидні послідовності праймерів для ПЛР,
використовуваних у даному документі (від 5' до 3')

Секвенуючі праймери			SEQ ID NO
1	Rht3 F40	GGCAAGCAAAAGCTTGAGATAGAT	SEQ ID NO:17
	Rht3 R55	GGTGCAGGGCAATAAGATG	SEQ ID NO:18
2	Rht3 F54	GACAGCACCCAGACGCTCAC	SEQ ID NO:19
	Rht3 R2	GCTCTCGACCCAGGAGGAG	SEQ ID NO:20
3	Rht3 F48	TGGAGCAGCTGGAGATGG	SEQ ID NO:21
	Rht3 R8	TAGGGGCAGGACTCGTAGAA	SEQ ID NO:22
4	Rht3 F13	GCGCTGGTGAAGCAGATAC	SEQ ID NO:23
	Rht3 R40	TTCAAACCTCGCGGTCACG	SEQ ID NO:24
Вставні праймери			
1	NHBF.2	TCTCCTCCCTCCCCACCCCAAC	SEQ ID NO:25
	Rht3 R5	GCGTCCGGTGGAGTTGCC	SEQ ID NO:26
2	Rht3 F6	GTGTTTTTCCCAGCCCTCTT	SEQ ID NO:27
	Rht3 R2	GCTCTCGACCCAGGAGGAG	SEQ ID NO:28
Специфічні для геному D праймери			
	Rht-D1F	GAGGTAGCTCGCGGATCA	SEQ ID NO:29
	Rht-D1R	CGTTCAAACTCGCGAGA	SEQ ID NO:30

Таблиця 3

Лінії пшениці, генотип Rht-B1 і мутації

Алеель Rht-B1	Мутація в Rht-B1c	Заміна амінокислоти або ефект
Rht-B1a	дикий тип	немає
Rht-B1b		
Rht-B1c	Вставка	Вставка
Rht-B1c.1	G2715A	G260E
Rht-B1c.2	G2726A	V264M
Rht-B1c.3	G2747A	A271T
Rht-B1c.4	G2829A	G298D
Rht-B1c.5	G2831A	A299T
Rht-B1c.6	G2849A	A305T
Rht-B1c.7	C2865T	A310V
Rht-B1c.8	C2966T	P344S
Rht-B1c.9	C2972T	L346F
Rht-B1c.10	G3065A	G377R
Rht-B1c.11	G3076A	W380ter
Rht-B1c.12	C3117T	P394L
Rht-B1c.13	G3190A	W418ter
Rht-B1c.15	G3477A	R514H
Rht-B1c.16	C3507T	T524I
Rht-B1c.17	C3519T	S528F
Rht-B1c.18	G3624A	G563D
Rht-B1c.19	G3697A	W587ter
Rht-B1c.20	G3874A	W646ter
Rht-B1c.21	G2792A	V286M
Rht-B1c.22	CC2108TA	P58ter
Rht-B1c.23	G3047A	D371N
Rht-B1c.24	G2864A	A310T
Rht-B1c.25	C3071T	Q379ter
Rht-B1c.26	G3671A	E579K

Продовження таблиці 3

Rht-B1c.27	G148A	сплайсинг
Rht-B1c.28	G148T	сплайсинг
Rht-B1c.29	G147A	сплайсинг
Rht-B1c.30	G2084A	сплайсинг
Rht-B1c.31	G2335A	W133ter
Rht-B1c.32	G2083A	сплайсинг
Rht-B1c.33	G3841A	W635ter
Rht-B1c.34	G3290T	E452ter
Rht-B1c.35	C2705T	Q257ter

Таблиця 4

Фенотипи ліній з посиленням ростом відповідно до алеля

Алель Rht-B1	Лінії TR	Висота зрілої рослини (% від високорослої)	Довжина колеоптилю (% від високорослої)	Показник стану спокою Сезон 1	Показник стану спокою Сезон 2
Rht-B1a		100	100	1,0	1,0
Rht-B1b		81	84	1,0	1,0
Rht-B1c		42	63	4,0	4,0
Rht-B1c.1	704	90	91	2,0	
	713	90	91	2,0	
	714	92	83	2,0	
	761	89	94	1,0	
	762	92	97	2,0	
	778	95	88		
	779	98	93	1	
	781	93	83	1	
	793	76	86		2,0
	804	99	87	1,0	
	811	92	89	1,0	
	813	93	101	2	
	827	92	96	2,0	
	830	95	99		
	845	96	73	2	
	873	98	97	1	
	879	88	93	1,0	
Rht-B1c.1	Середнє	92	91	1,5	2,0
Rht-B1c.2	610	93	102	2,0	
	618	96	98	1,0	
	675	96	82	1,0	
	881	88	89	1	
	884	97	105	1	
	947	97	96	2,0	
	982	98	93		
Rht-B1c.2	Середнє	95	95	1,3	
Rht-B1c.3	917	70	75	4,0	2,0
	920	71	78	2,0	2,0
Rht-B1c.3	Середнє	70	76	3,0	2,0
Rht-B1c.4	885	67	85	4,0	
Rht-B1c.5	725	65	67	3,0	
Rht-B1c.6	875	59	70	2,0	
	983	71	84	2,0	
Rht-B1c.6	Середнє	65	77	2,0	

Продовження таблиці 4

Rht-B1c.7	543	77	91	1,0	2,0
	602	92	95	1,0	
	606	90	97	1,0	
	608	95	88	3,0	
	641	89	92		
	646	89	94	3,0	
	679	90	79	1,0	
	680	93	90	1,0	
	710	91	95	2,0	
	784	98	102	1,0	
	785	94	91	1,0	
	790	97	92	1,0	
	943	82	88	1,0	1,0
	950	95	108	1,0	
Rht-B1c.7	Середнє	91	93	1,4	
Rht-B1c.8	550	59	80	4,0	3,0
	770	59	86		
Rht-B1c.8	Середнє	59	83	4,0	3,0
Rht-B1c.9	703	86	90	3,0	3,0
	730	91	86	2,0	2,0
Rht-B1c.9	Середнє	88	88	2,5	2,5
Rht-B1c.10	886	64	80	3,0	
Rht-B1c.11	615	100	94	1,0	
	701	93	82	1,0	
	712	98	96	2,0	
	771	102	95	1,0	
	777	103	96	1,0	
	782	98	99	1,0	
	786	99	97	1,0	
	792	100	93		
	875				
Rht-B1c.11	Середнє	99	94	1,1	
Rht-B1c.12	687	53	76	4,0	
Rht-B1c.13	692	80	104		1,0
	810	96	103	1,0	
	846	101	89	1,0	
	870	99	108	1,0	
	882	87	87	1,0	
	890	90	100		
	979	97	105	1,0	
	990	90	91		
Rht-B1c.13	Середнє	92	98	1,0	
Rht-B1c.14	973	57	82	4,0	
Rht-B1c.15	911	90	95	3,0	
Rht-B1c.16	510	89	92	2,0	2,0
Rht-B1c.17	603	78	84	1,0	3,0
	672	80	85	3,0	3,0
	686	76	89	2,0	3,0
	842	80	81	2,0	3,0
Rht-B1c.17	Середнє	78	85	2,0	3,0
Rht-B1c.18	613	96	94	4,0	
	671	93	88	3,0	
	783	99	97	1,0	
	805	94	105	1,0	
Rht-B1c.18	Середнє	96	96	2,3	

Продовження таблиці 4

Rht-B1c.19	508	85	95	2,0	2,0
	611	94	97	1,0	
	648	97	112	2,0	
	667	98	98	1,0	
Rht-B1c.19	Середнє	93	100	1,5	
Rht-B1c.20	601	93	90		
	614	97	93	1,0	
	622	97	90	1,0	
	647	99	92	2,0	
	649	102	95	1,0	
	664	97	98	1,0	
	666	98	98	1,0	
	674	99	84	1,0	
	677	99	96	1,0	
	682	95	97	1,0	
	683	98	90	1,0	
	684	99	87	1,0	
	685	103	84		
	889	90			
	910	95	94	1,0	
	986	95	122		
	989	84	91		
Rht-B1c.20	Середнє	96	94	1,1	
Rht-B1c.21	878	58	74	3,0	
	981	63	82	2,0	
Rht-B1c.21	Середнє	60	78	2,5	
Rht-B1c.22	544	84	86	4,0	1,0
Rht-B1c.23	612	74	82	2,0	3,0
	623	76	80	3,0	3,0
Rht-B1c.23	Середнє	75	81	2,5	3,0
Rht-B1c.24	542	81	88		
	688	85	92		3,0
	705	77	90	3,0	3,0
	722	82	84	4,0	3,0
	723	84	84	2,0	3,0
	741	97	85	1,0	
	877	81	88	3,0	2,0
Rht-B1c.24	Середнє	84	87	2,6	2,8
Rht-B1c.25	774	102	85	1,0	
	776	100	90	1,0	
Rht-B1c.25	Середнє	101	88	1,0	
Rht-B1c.26	717	74	78	2,0	3,0
	773	76	75		2,0
	791	80	83	3,0	3,0
	815	78	80	3,0	
Rht-B1c.26	Середнє	77	79	2,7	2,7
Rht-B1c.27	507	77	67	1,0	1,0
	605	76	73	4,0	1,0
	624	84	76	2,0	1,0
	880	77	75	1,0	1,0
Rht-B1c.27	Середнє	79	73	2,0	1,0
Rht-B1c.28	645	81	73	1,0	1,0
Rht-B1c.29	901	83	72	1,0	1,0
Rht-B1c.30	670	84	92	1,0	1,0
	678	82	85	1,0	1,0

Продовження таблиці 4

	690	80	78	1,0	
	752	86	82	1,0	1,0
Rht-B1c.30	Середнє	83	84	1,0	1,0
Rht-B1c.31	872	102	89	1	
	902	100	92	1	
	912	101	84	1	
Rht-B1c.31	Середнє	101	88,3	1,0	
Rht-B1c.32	913	91	87	1,0	
	987	82	88		
Rht-B1c.32	Середнє	87	87,5	1,0	
Rht-B1c.33	644	98	101	1,0	
	729	98	112	1,0	
	750	95	92	1,0	
	789	95	91	1,0	
Rht-B1c.33	Середнє	97	99	1,0	
Rht-B1c.34	728	98	91	1,0	
	745	95	89	1,0	
Rht-B1c.34	Середнє	96	90	1,0	
Rht-B1c.35	914	95	87		
	971	96	92	1,0	
Rht-B1c.35	Середнє	96	89,5	1,0	

Таблиця 5

Швидкості подовження листів і продукція α -амілази у мутантів ячменю з посиленням ростом

Лінія	Генотип LER	LER _{max} (мм.доб. ⁻¹)	α -амілаза (Ceralpha одиниці/зерно) через:		
			0 год. ($\times 10^3$)	42 год.	72 год.
Him	WT	34,6 \pm 0,9	1,6	0,36 \pm 0,08	1,7 \pm 0,09
Him (GA ₃)	WT	52,3 \pm 0,1	н.д.	9,81 \pm 0,86	23,1 \pm 2,8
M640	Sln1d	9,2 \pm 0,2	1,6	0,21 \pm 0,01	0,19 \pm 0,05
M640 (GA ₃)	Sln1d	12,1 \pm 0,3	н.д.	н.д.	н.д.
TR1	Sln1d.4	23,8 \pm 0,5	2,5	0,26 \pm 0,01	2,88 \pm 0,27
TR9	Sln1d.5	15,5 \pm 0,7	1,6	0,21 \pm 0,01	0,16 \pm 0,04
TR13	Sln1d.6	15,8 \pm 0,6	1,8	0,20 \pm 0,02	0,19 \pm 0,04
TR26	Див. таблицю 6				
TR56	Sln1d.7	16,7 \pm 0,6	2,7	0,93 \pm 0,22	3,24 \pm 0,47
TR60	Sln1d.8	28,6 \pm 0,9	3,6	0,82 \pm 0,13	3,76 \pm 0,23
TR100	Sln1d.9	20,2 \pm 0,6	3,2	4,34 \pm 0,13	14,6 \pm 0,39
TR103	-	16,1 \pm 0,4	3,4	0,74 \pm 0,10	0,39 \pm 0,1
TR107	Sln1d.10	13,2 \pm 0,3	2,4	0,39 \pm 0,07	0,17 \pm 0,03
M463	grd2b	16,9 \pm 0,8	2,5	0,67 \pm 0,04	1,3 \pm 0,2
M463 (GA ₃)	grd2b	49,8 \pm 0,8	н.д.	7,20 \pm 0,73	18,9 \pm 1,4
TR216	grd2b, sln1s	23,2 \pm 0,6	4,1	1,01 \pm 0,12	4,16 \pm 0,55
TR261	grd2b, sln1m	38,4 \pm 1,5	3,8	7,50 \pm 0,24	18,1 \pm 0,8
TR305	grd2b, sln1o	32,9 \pm 0,9	3,8	9,85 \pm 0,43	16,9 \pm 1,2
M693	gse1n	19,7 \pm 0,4	2,5	0,29 \pm 0,05	0,11 \pm 0,01
M693 (GA ₃)	gse1n	35,3 \pm 1,2	н.д.	н.д.	н.д.
TR407	gse1n, sln1n	29,3 \pm 0,5	9,9	0,27 \pm 0,03	0,26 \pm 0,13
M240	sln1m	42,2 \pm 1,6	6,5	11,6 \pm 1,4	22,6 \pm 2,3
M242	sln1n	44,3 \pm 3,1	3,0	1,07 \pm 0,08	6,39 \pm 1,52
M243	sln1s	35,4 \pm 0,9	3,8	3,66 \pm 0,53	15,4 \pm 0,9

Таблиця 6

Дія *spy1a* на швидкості росту і продукцію α -амілази

Лінія	Генотип LER_{max}	α -амілаза (Ceralpha одиниць/зерно) через:			
		(мм.доб. ⁻¹)	0 год. ($\times 10^3$)	42 год.	72 год.
Himalaya	WT	34,6 \pm 0,9	1,6	0,36 \pm 0,08	1,7 \pm 0,09
M247	<i>spy1a</i>	37,6 \pm 0,7	4,6	3,33 \pm 0,22	12,5 \pm 1,2
M640	<i>Sln1d</i>	9,2 \pm 0,2	1,6	0,21 \pm 0,01	0,19 \pm 0,05
TR26	<i>Sln1d, spy1a</i>	17,1 \pm 0,4	2,3	0,66 \pm 0,10	2,84 \pm 0,46
M463	<i>grd2b</i>	17,7 \pm 0,6	2,1	0,53 \pm 0,1	3,7 \pm 0,3
M248	<i>grd2b, spy1a</i>	23,4 \pm 0,5	3,6	10,2 \pm 0,9	15,0 \pm 1,8
M691	<i>gse1l</i>	20,6 \pm 0,4	1,6	0,07 \pm 0,01	0,13 \pm 0,03
M249	<i>gse1l, spy1a</i>	25,8 \pm 0,5	2,1	1,2 \pm 0,2	7,2 \pm 1,0

Таблиця 7

Довжина колеоптилів (у мм) ліній ячменю з посиленням ростом

Лінія	Генотип	Довжина колеоптилю (мм)
Himalaya	WT	100,3 \pm 1,6
M640	<i>Sln1d</i>	32,6 \pm 1,8
TR1	<i>Sln1d.4</i>	65,8 \pm 3,1
TR9	<i>Sln1d.5</i>	40,7 \pm 2,4
TR13	<i>Sln1d.6</i>	45,2 \pm 1,8
TR26	<i>Sln1d, spy1a</i>	50,9 \pm 1,0
TR56	<i>Sln1d.7</i>	60,7 \pm 2,1
TR60	<i>Sln1d.8</i>	80,7 \pm 2,5
TR100	<i>Sln1d.9</i>	66,9 \pm 1,7
TR103	-	58,5 \pm 1,5
TR107	<i>Sln1d.10</i>	44,6 \pm 2,0
M463	<i>grd2b</i>	62,4 \pm 2,2
TR216	<i>grd2b, sln1s</i>	84,1 \pm 1,7
TR261	<i>grd2b, sln1m</i>	96,4 \pm 3,5
TR305	<i>grd2b, sln1o</i>	104,4 \pm 2,0
M693	<i>gse1n</i>	72,0 \pm 1,5
TR407	<i>gse1n, sln1n</i>	89,7 \pm 1,5
M240	<i>sln1m</i>	123,3 \pm 2,7
M242	<i>sln1n</i>	119,8 \pm 2,3
M243	<i>sln1s</i>	112,9 \pm 4,6
M247	<i>spy1a</i>	101,6 \pm 2,5

Таблиця 8

Висота рослини відносно високорослого сорту (алель *Rht-B1a*)
і показники стану спокою зерна для рослин пшениці мутантних ліній

Алель <i>Rht</i>	Висота (% від високорослої)	Показник стану спокою*
		2012
<i>Rht-B1a</i>	100	0
<i>Rht-B1b</i>	81	0
<i>Rht-B1c</i>	42	8
<i>Rht-B1c.1</i>	93	2
<i>Rht-B1c.2</i>	95	0
<i>Rht-B1c.3</i>	71	2
<i>Rht-B1c.4</i>	67	4

Продовження таблиці 8

Rht-B1c.5	65	5
Rht-B1c.6	71	5
Rht-B1c.7	91	1,5
Rht-B1c.8	59	5
Rht-B1c.9	88	2
Rht-B1c.14	57	3
Rht-B1c.15	90	0,5
Rht-B1c.16	89	0
Rht-B1c.17	78	4
Rht-B1c.18	96	1,5
Rht-B1c.21	60	4
Rht-B1c.22	84	1
Rht-B1c.23	75	3
Rht-B1c.24	82	3,5
Rht-B1c.26	77	3,5
Rht-B1c.27	81	1,5
Rht-B1c.28	81	0
Rht-B1c.29	83	0,5
Rht-B1c.30	83	1
Rht-B1c.36	55	4

* Показник стану спокою розраховували як кількість тижнів зберігання зерна до проростання 50 % зерен у тесті проростання.

ПОСИЛАННЯ

- Achard et al. (2009), J. Exptl. Bot. 60, 1085-1092.
- Arana et al. (2011), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108, 9292-9297.
- 5 Asano et al. (2009), Mol. Genet. Genomics, 281, 223-231.
- Carol et al. (1995), Planta 197, 414-417.
- Chandler et al. (1999), Plant Physiol. 120, 623-632.
- Chandler et al. (2002), Plant Physiol. 129, 181-190.
- Chandler et al. (2008), Mol. Plant. 1, 285-294.
- 10 de Lucas M. et al. (2008), Nature, 451, 480-484.
- Dill et al. (2004), Plant Cell, 16, 1392-1405.
- Ellis et al. (2005), Theor. Appl. Genet. 111, 423-430.
- Feng et al. (2008), Nature, 451, 475-479.
- Flintham et al. (1997), J. Agric. Sci. 128, 11-25.
- 15 Fu et al. (2002), Plant Cell, 14, 3191-3200.
- Griffiths et al. (2006), Plant Cell, 18, 3399-3414.
- Hartweck (2008), Planta, 229, 1-13.
- Hirano et al. (2010), Plant Cell, 22, 2680-2696.
- Hoogendoorn et al. (1988), In Miller T.E., Koebner R.M.D., Proceedings of the Seventh
- 20 International Wheat Genetics Symposium, Institute of Plant Science Research, Cambridge, U.K., pp. 1093-1100.
- Ikeda et al. (2001), Plant Cell, 13, 999-1010.
- Kuppusamy et al. (2009), Plant Mol. Biol. 69, 375-381.
- Monna et al. (2002), DNA Res. 9, 11-17.
- 25 Murase et al. (2008), Nature, 456, 459-463.
- Pearce et al. (2011), Plant Physiol. DOI:10.1104/pp.111.183657.
- Peng et al. (1999), Nature, 400, 256-261.
- Robertson et al. (1998), Plant Cell, 10, 995-1007.
- Sasaki et al. (2002), Nature, 416, 701-702.
- 30 Sasaki et al. (2003), Science, 299, 1896-1898.
- Shimada et al. (2006), Plant J. 48, 390-402.
- Shimada et al. (2008), Nature, 456, 520-544.
- Silverstone et al. (1997), Genetics, 146, 1087-1099.
- Silverstone et al. (2007), Plant Physiol. 143, 987-1000.

- Spielmeyer et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 99, 9043-9048.
 Sun (2010), Plant Physiol. 154, 567-570.
 Ueguchi-Tanaka et al. (2005), Nature, 437, 693-698.
 Willige et al. (2007), Plant Cell, 19, 1209-1220.
 5 Wilson et al. (1995), Plant Physiol. 108: 495-502.
 Wolbang et al. (2004), Plant Physiol. 134, 769-776.
 Wu et al. (2011), Plant Physiol. DOI:10.1104/pp.111.185272.
 Yamaguchi (2008), Annu. Rev. Plant Biol. 59, 225-251.
 Yamamoto et al. (2010), Plant Cell, 22, 3589-3602.
 10 Zwar et al. (1995), Planta 197, 39-48.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 15 <110> COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH
 ORGANISATION
- <120> ПШЕНИЦЯ З НОВИМИ АЛЕЛЯМИ RHT-B1
- <130> 35103002/WJP
- 20 <160> 30
- <170> PatentIn version 3.5
- 25 <210> 1
 <211> 3892
 <212> ДНК
 <213> Triticum aestivum
- 30 <400> 1
 atgaagcgcg agtaccagga cgccggaggg agcggcggtg gccggggagg catgggctcg 60
 tccgaggaca agataatggt gtcggggctg gcggcgccgg gggaggggga ggaggtggac 120
 gagctgctgg cggcgctcgg gtacaaggtg tgttgccgcc gcctcctcgc agcgccgttc 180
 ttctctctct catctctcat gaacacacac catggagaaa ctctacacac acacacacac 240
 aaccaagaag aacaccggct gttactttgc acgagaggcc cttctccttg gtggaacaag 300
 40 agactacatt gtgttttcc cagccctctt ggctcacttt tctcatcat cttctccaac 360
 ttaaatagct aagtacaaga ctgacccaag cacttgccag ccgccactct cgcagctgct 420
 45 aacgccact aatcatgca ctaggccact aatcacaact aatcatgca cgcagtcacc 480
 acaccggcca ctatcacatg accggggcgac taaccacta gctacatgca tgcaactaga 540
 taactacctt atcatgcaac tccaggactc ggcaactcca ccggacgccc cgctcgtagc 600
 50 agccgcggga ctgtctgcta acgaaaccac gcacatcaag attagtgcta acatttcccc 660
 ccttaacttt gacacgcctt gccgtcgacc gtcatttga acgcctgagc tcgacgtctt 720
 55 cacacgcctc cgcgcccgtc gcgacgtgcc gtgcgcccgc ctgtcaccgg agttgatgca 780
 gcttgctgct tcgtcgtcac ggccgtgacc cagcctgcgg acccgaccgg acgcatcgac 840
 gccggtcaca ccgccacgga ccgacactgg cgcactgacg ccggtcgcac cgtgtccctt 900
 60

cacgaccccc gcgacatacg ccgagctcct ccgccggcga cacacgcctg gcgtccctct 960
 gcgtcccgca cgtcccgac gcatccgacg tgcccgacga gcccgaccgc agcagtgcgt 1020
 5 cccgcacgtc ccgcgcgcat tcgacgcgcc cgacgagccc gacagcacca gacgctcacc 1080
 acgtgccgcc tccggtccg ccatggcagc caccacgccg cgcctacgtg ccacgcacct 1140
 10 tccacggtcg ttccccgag ccgtcgcgac ctatgcgcca ccacgcaggt ccttcgcgac 1200
 ctctctgtct ccgcgaccgc cgtgcccttc gcgcacactc cccacgtccc cgcgtccca 1260
 gcccgcgctc ccgccgcga cgtacgcggt ctgcgcaacc aggtccagcg cctcgacgcg 1320
 15 gtccactccc gcggtccga cgcgtcgac acgtccagtg cgcgccata acacgcaccg 1380
 gtgcgtccg gtcgcccgc gcatcttatt gccctgcacc gcccgggcct ccatgccgc 1440
 atgcagtgc tccacgccg cacaccgtgt tgcaccgtg cgccaccacg cagcgctcg 1500
 20 gcggcctccg cggtcgccg acgtacgacg tcaccgccg ccgcctccgc cagcgctcg 1560
 ccgcgcgcc cagccgatgc ctccatgtg gccgcgatg ccccgccgc cgcggacgcc 1620
 25 accgcgcgcc acggccgcc ctgaacctt gtggctctga ataccaaag ttggcgccg 1680
 ctctcgag cgcgttctt ctctctca tctctatga acacacacca tggagaaact 1740
 ctacacacac acacacaaa ccaagaagaa caccggctgt tactttgcac gagaggccct 1800
 30 tctcttgg ggaacaagag actacattgt gttttccca gccctcttg ctactttc 1860
 tcattcatct tctcaactt aaatagctaa gtacaagact gaccaagca ctgccagcc 1920
 35 gccactctg cagctgtaa cgcctactaa ctatgcact aggcactaa tcacaactaa 1980
 ctatgcacg catgcaccac accggccact atcacatgac cgggcgacta accactagc 2040
 tacatgatg caactagata actacctat ccatgcactc caggactcg caactcacc 2100
 40 ggacgccccg ctgtagcag ccgcgggact tgtgctaac gaaaccacg acatcaagat 2160
 tagtgtaac aagggtcggg cgtccgacat ggcgacgtg gcgcagaagc tggagcagct 2220
 45 ggagatggc atggggatg gcggcgtgg cgccggcgcc gcgccgacg acagcttcg 2280
 caccacctc gccacggaca ccgtgacta caacccacc gacctcct cctgggtcga 2340
 gagcatgtg tcggagctca acgcgccgc gccgcccctc ccgccgccc cgcagctcaa 2400
 50 cgctccacc tctccaccg tcaccggcg cggtacttc gatctccgc cctccgtcga 2460
 ctctctgc agcacctacg cgctcggcc gatccgtcc ccggcgtcg cgcggccga 2520
 55 cctctccgc gactccgtg tgcgggatc caagcggatg cgcactggc gcagcagc 2580
 ctgtctca tctcatct cctctctcg cgtggcgcc gccaggagct ctgtgtgga 2640
 60 gggtgccccg ccggtggccg ccgcggccg tgcgcccg cgtccggtc tctgtgtcga 2700

cacgcaggag gccgggattc ggctggtgca cgcgctgctg gcgtgcgcgg aggccgtgca 2760
 gcaggagaac ttctctgccg cggaggcgct ggtgaagcag atacccttgc tggccgcgtc 2820
 5 ccagggcggc gccatgcgca aggtcgccgc ctacttcggc gaggccctcg cccgccgcgt 2880
 cttccgttc cgccgcgagc cggacagctc cctcctcgac gccgccttcg ccgacctcct 2940
 ccacgcgcac ttctacgagt cctgccccta cctcaagttc gccacttca ccgccaacca 3000
 10 ggccatcctg gaggcgttcg ccggctgccg ccgcgtgcac gtcgtcgact tcggcatcaa 3060
 gcaggggatg cagtggcccg ccttctcca ggccctggcg ctccgtcccg gcggccctcc 3120
 15 ctggtccgc ctaccggcg tcggccccc gcagccggac gagaccgacg ccttcagca 3180
 ggtgggctgg aagctgccc agttcgcgca caccatccgc gtcgacttcc agtaccgcgg 3240
 cctcgtcgcc gccacgtcg cggacctgga gccgttcag ctgcagccgg agggcgagga 3300
 20 ggaccgaac gaggagcccg aggtaatcg cgtcaactcg gtcttcgaga tgcaccggct 3360
 gctcgcgag cccggcgccc tggagaaggt cctgggcacc gtgcgcgcgg tgcggccgag 3420
 25 gatcgtcacc gtggtggagc aggaggcgaa ccacaactcc ggcacattcc tggaccgctt 3480
 caccgagtc ctgcactact actccacat gttcgattct ctggaggcg gcagctccgg 3540
 cggcccatcc gaagtctcat ctggggcggc tgctgtcct gccgccgccc gcacggacca 3600
 30 ggtcatgtcc gaggtgtacc tcggccggca gatctgaac gtggtggcct gcgagggggc 3660
 ggagcgcaca gagcggcacg agaccctggg gcagtggcg aaccgcctcg gcaacgccgg 3720
 35 gttcgagacc gtccacctgg gctcaatgc ctacaagcag gcgagcacgc tgctggcgct 3780
 cttcgccggc ggcgacgggt acaagggtga ggagaaggag ggctgcctga cgctggggtg 3840
 gcacacgcgc ccgtgatcg ccacctccgc atggcgccctg gccgcgccgt ga 3892
 40
 <210> 2
 <211> 1956
 <212> ДНК
 45 <213> Triticum aestivum
 <400> 2
 atgaagcgcg agtaccagga cgccggaggg agcggcggtg gccggggagg catgggctcg 60
 50 tccgaggaca agataatggt gtcggggctg gcggcgccgg gggaggggga ggaggtggac 120
 gagctgctgg cggcgctcgg gtacaaggac tcggcaactc caccggacgc cccgctcgta 180
 gcagccgcgg gacttgctgc taacgaaacc acgcacatca agattagtgc taacaagggt 240
 55 cgggctgccc acatggcgga cgtggcgagc aagctggagc agctggagat ggccatgggg 300
 atggcgggcg tggcgccgg cgccgcgcc gacgacagct tcgccacca cctcgccacg 360
 60 gacaccgtgc actacaacc caccgacctc tctcctggg tcgagagcat gctgtcgag 420

ctcaacgcgc cgccgccgcc cctcccgccc gccccgcagc tcaacgcctc cacctcctcc 480
 accgtcaccg gcgggcggta cttcgatctc ccgccctccg tcgactcctc ctgcagcacc 540
 5 tacgcgctgc ggccgatccc gtccccggcc gtcgcgccgg ccgacctctc cgccgactcc 600
 gtcgtgcggg atcccaagcg gatgcgcact ggcggcagca gcacctctc gtcactctca 660
 10 tcgtcctctc tcggcgggtg cggcgccagg agctctgtg tggaggctgc cccgccggtg 720
 gccgccgagg ccggtgcgcc cgcgtgccg gtcgtcgtg tcgacacgca ggaggccggg 780
 attcggctgg tgcacgcgct gctggcgtgc gcggaggccg tgcagcagga gaacttctct 840
 15 gccgcggagg cgctggtgaa gcagataccc ttgctggccg cgtcccaggg cggcgccatg 900
 cgcaaggctg ccgcctactt cggcgaggcc ctgcgccgcc cgtcttccg cttccgcccg 960
 20 cagccggaca gtccctctc cgacgccgcc ttgcgccacc tctccacgc gcactctac 1020
 gagtctgcc cctacctcaa gtgcgccac ttcaccgcca accaggccat cctggaggcg 1080
 ttgcgggtc gccgccgct gcacgtctc gacttcggca tcaagcaggg gatgcagtgg 1140
 25 cccgccctc tccaggccct ggcgtccgt cccggcggcc ctccctcgtt ccgcctcacc 1200
 ggcgtcggcc ccccgagacc ggacgagacc gacgccttc agcagggtgg ctggaagctc 1260
 30 gccagttc cgacacccat ccgcgtcgc ttccagtacc gcggcctcgt cgccgccacg 1320
 ctgcggacc tggagccgt catgtcgc cgaggaggcg aggaggacc gaacgaggag 1380
 cccgaggtaa tcgccgtcaa ctcggtctc gagatgcacc ggctgctgc gcagcccggc 1440
 35 gccctggaga aggtcctggg caccgtgcgc gccgtgcggc cgaggatcgt caccgtggtg 1500
 gagcaggagg cgaaccacaa ctccggcaca ttctggacc gttcaccga gtccctgcac 1560
 40 tactactcca ccatgttca ttcttggag ggcggcagct ccggcgcccc atccgaagtc 1620
 tcacttggg cggtcgtgc tctgccgcc gccggcacg accaggtcat gtccgagggt 1680
 tacctggcc gccagatctg caacgtggtg gcctgcgagg gggcgagcg cacagagcgg 1740
 45 cagcagacc tggggcagtg gcggaaccgc ctcggaacg ccgggttcga gaccgtccac 1800
 ctgggtcca atgcctacaa gcaggcgagc acgtgctgg cgctctcgc cggcggcgac 1860
 50 gggtaacaagg tggaggagaa ggagggtgc ctgacgctgg ggtggcacac gcgcccgtg 1920
 atgccacct ccgcatggcg cctggccgcg ccgtga 1956
 55 <210> 3
 <211> 651
 <212> Білок
 <213> Triticum aestivum
 60 <400> 3

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

	Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Ala Leu Pro Val Val Val Val Asp Thr	
	245 250 255	
5	Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu	
	260 265 270	
10	Ala Val Gln Gln Glu Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln	
	275 280 285	
15	Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val Ala	
	290 295 300	
20	Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe Arg Pro	
	305 310 315 320	
25	Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu His	
	325 330 335	
30	Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr	
	340 345 350	
35	Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg Arg Val His	
	355 360 365	
40	Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Leu	
	370 375 380	
45	Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr	
	385 390 395 400	
50	Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val	
	405 410 415	
55	Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe Gln	
	420 425 430	
60	Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe Met	
	435 440 445	
	Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro Glu Val Ile	
	450 455 460	
	Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln Pro Gly	
	465 470 475 480	

Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro Arg Ile
485 490 495

5 Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Thr Phe Leu
500 505 510

10 Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe Asp Ser
515 520 525

15 Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly Gly Pro Ser Glu Val Ser Ser Gly Ala
530 535 540

20 Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Gly Thr Asp Gln Val Met Ser Glu Val
545 550 555 560

Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Cys Glu Gly Ala Glu
565 570 575

25 Arg Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln Trp Arg Asn Arg Leu Gly
580 585 590

30 Asn Ala Gly Phe Glu Thr Val His Leu Gly Ser Asn Ala Tyr Lys Gln
595 600 605

35 Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Lys Val
610 615 620

40 Glu Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu
625 630 635 640

Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Leu Ala Ala Pro
645 650

45 <210> 4
<211> 1866
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

50 <400> 4
atgaagcgcg agtaccagga cgccggaggg agcggcggtg gcgggggagg catgggctcg 60

55 tccgaggaca agatgatggt gtcggggctg cgggcggcgg gggaggggga ggaggtggac 120

gagctgctgg cggcgctcgg gtacaaggtg cgggcgtccg acatggcgga cgtggcgag 180

aagctggagc agctggagat ggccatgggg atgggcggcg tgggcgccgg cgccgcgcc 240

60 gacgacagct tcgccacca cctcgccacg gacaccgtgc actacaacc caccgacctc 300

	tcctctggg tcgagagcat gctgtcggag ctcaacgcgc cgccgccgcc cctcccggcc	360
5	gccccgcagc tcaacgcctc cacctctcc accgtcaccg gcggcgggta cttgatctc	420
	ccgccctccg tcgactctc ctgcagcacc tacgcgtgc ggccgatccc gtccccggcc	480
	gtcgcgccgg ccgacctc cgccgactcc gtcgtcggg atcccaagcg gatgcgcact	540
10	ggcggcagca gcacctcgt gtcactctca tcgtctctc tcggcggg cggcgccagg	600
	agctctgtg tggaggctgc cccgccggtg gccgccggc cgggtgcgcc cgcgtgccg	660
15	gtcgtcgtg tcgacacgca ggaggccggg attcggctg tgcacgcgt gctggcgtgc	720
	gcagaggccg tgcagcagga gaacttctt gccgcggagg cgctggtgaa gcagataccc	780
	ttgtggccg cgtcccagg cggcgccatg cgcaaggctc ccgcctactt cggcgaggcc	840
20	ctgccccgcc gcgtctccg ctccgcccg cagccggaca gtcctctct cgacgccgcc	900
	ttgccgacc tctccacgc gcacttctac gagtctgcc cctacctaa gttgccccac	960
25	ttaccgcca accaggccat cctggaggcg ttgccggct gccgccgct gcacgtcgtc	1020
	gacttcggca tcaagcagg gatgcagtgg cccgccctt tccaggccct ggcgtccgt	1080
	ccggcgcc ctcctcgtt ccgcctacc ggcgtcggc cccgcagcc ggacgagacc	1140
30	gacgcctgc agcagggtgg ctggaagtc gccagttcg cgcacacat ccgcgtcgac	1200
	ttccagtacc gcggcctcgt cgcgccacg ctgcggacc tggagccgt catgctgcag	1260
35	ccggaggcg aggaggacc gaacgaggag cccgaggtaa tcgccgtaa ctcggtcttc	1320
	gagatgcacc ggctgctgc gcagccggc gccctggaga aggtcctgg caccgtcgc	1380
	gccgtcggc cgaggatcgt caccgtggtg gagcaggagg cgaaccacaa ctccggcaca	1440
40	ttcttgacc gttcaccga gtccctgcac tactactcca ccatgttca ttctctggag	1500
	ggcggcagct ccggcgcccc atccgaagtc tcatctggg cggctgctc tctgccgc	1560
45	gccggcacgg accaggtcat gtccgagggt tacctcggc gccagatctg caacgtggtg	1620
	gcctgcgagg gggcgagcg cacagagcg cagagaccc tggggcagtg gcggaaccgc	1680
	ctcggaacg ccgggttca gaccgtccac ctgggtcca atgcctacaa gcaggcgagc	1740
50	acgtgctgg cgctcttcg aggcggcgac ggtacaagg tggaggagaa ggagggtgc	1800
	ctgacgtgg ggtggcacac gcgcccgtg atgccacct ccgatggcg cctggccgcg	1860
55	ccgtga	1866
	<210> 5	
	<211> 621	
	<212> Білок	
60	<213> Triticum aestivum	

<400> 5

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

	225	230	235	240
5	Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val			
	245	250	255	
10	Lys Gln Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys			
	260	265	270	
15	Val Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe			
	275	280	285	
20	Arg Pro Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu			
	290	295	300	
25	Leu His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His			
	305	310	315	320
30	Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg Arg			
	325	330	335	
35	Val His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala			
	340	345	350	
40	Leu Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg			
	355	360	365	
45	Leu Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln			
	370	375	380	
50	Gln Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp			
	385	390	395	400
55	Phe Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro			
	405	410	415	
60	Phe Met Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro Glu			
	420	425	430	
	Val Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln			
	435	440	445	
	Pro Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro			
	450	455	460	
	Arg Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Thr			

	465	470	475	480												
5	Phe	Leu	Asp	Arg	Phe	Thr	Glu	Ser	Leu	His	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Met	Phe
		485		490					495							
10	Asp	Ser	Leu	Glu	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Ser	Glu	Val	Ser	Ser
		500			505				510							
15	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Gln	Val	Met	Ser
		515			520				525							
20	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Cys	Glu	Gly
		530			535				540							
25	Ala	Glu	Arg	Thr	Glu	Arg	His	Glu	Thr	Leu	Gly	Gln	Trp	Arg	Asn	Arg
		545			550				555				560			
30	Leu	Gly	Asn	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Val	His	Leu	Gly	Ser	Asn	Ala	Tyr
			565			570					575					
35	Lys	Gln	Ala	Ser	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Ala	Gly	Gly	Asp	Gly	Tyr
		580				585				590						
40	Lys	Val	Glu	Glu	Lys	Glu	Gly	Cys	Leu	Thr	Leu	Gly	Trp	His	Thr	Arg
		595			600				605							
45	Pro	Leu	Ile	Ala	Thr	Ser	Ala	Trp	Arg	Leu	Ala	Ala	Pro			
		610			615				620							
50	<210> 6 <211> 7057 <212> ДНК <213> Triticum aestivum															
55	<400> 6 gaattcgaac tgcacatacg tatgaagatg acctcaaggt ccaccgattt ggtccattga 60 ttatatatag ggctaattcc tccaaaagga ggatcggctc gcatcaccaa agtatccaac 120 gtactcagtc actcaagcgg atatgcatga gccggcacga cttggtcgcg ccgcgcgtac 180 cacacgagcg ggcgggtggg cgtcgcgatt acccgggccg tgcgctcgta cagtcacgca 240 cagggcgcac caccgatctc gaacaatttt cactaccccc tccacacttc ttctgtgtg 300 gctgtacgac ggaaattatc ggcgcgggcg gtgcaccgtg gaccgatcgg gggccccacc 360 ggtgcagcag ctctggtcca cgaagaccg tggtatcccc gcggtgaccc ccacaggaag 420 aagcacaatg cgctgcctcc gcgataaggt ttgctaggcc tcgtgaacct accaggatcg 480															

gctgcacgaa tcgtgaggcc tgcgtcgat ccgcccgcgg cgaccgtccg tggcccacgg 540

5 cagctcagcc gtctctgaaa gaaagtctgg tggcccacgg caactgtagt acgcgcgcgg 600

ggtggaaaat gataatgcgc gccagaagaa taaataaaca gaaataagga ttttctagc 660

aaggataaac aaaaataaag tgggagtcgg ggtccaatcc ggtatagccc atccctgctc 720

10 cgttttctgc accgccgggt ccagtgtgcc gacctgtggc ttttgacaaa tgtgtacagc 780

aaacacactg acgatctgct tagatcgatc agtattagtg gagaagataa gacaattata 840

15 tatgccatag tagtagttgt catatttagc tatatatttt cattgttaat ttaatcatc 900

ccacatatct aggagcatgc aagcattaat agttatatgt aacaccaaga gatagcgtgt 960

catttttaat gacatgtgtg gcataagtac atgatctaaa agacttgagt ggatgataat 1020

20 ttttctcca aatagaatac attgtgaga ggaaaaacgt aagagctccg attacattga 1080

tcaatgatat gcatgtgaaa gcagtctcca acagattgga atgacatagc gcgtatataa 1140

caaggtatga tcaatgacaa aataatagcc attctccaag atgaatcaca tagctaacgc 1200

25 gacgaggagc atcccacggt cattatcatg taccaccgc cagctcaagt gggctctcat 1260

gtttttgct ttctctctt tgctgttgg atctagagct tctttgtat tgacttgagt 1320

30 tatgagtgga tattgatggt gaacattgct gacatgagat tacctctgt gattcccacc 1380

ggttcccccc ttatgttctg cgtgctctta ctgaatcca cctccaatca tgaagatcgg 1440

ccgccctatg gcttgccctg tatcagaacc gtgtgtcgca ttagctatgt atacgtgtca 1500

35 cgtgaggcaa aatcacgcaa gtacttgaaa tgttggtgt tatatccttg gtaaatttc 1560

gtgctggatt caatctaca aactaaacga ccagcacgga aaagaatccc aagtcttga 1620

40 atccattttg ccataagcca caggaggggc cacacggccg cagcgcacgg agaggagag 1680

ggagagggag tctgacgcag cagagagccc catcaccgc agcgttttt ttcttaatt 1740

tgcggggatt tctggggtgg tgggtcagg atttgaact ggatggcgaa gttgtctgg 1800

45 tgataaagac gcgcgcgacg aatccgtcca tcgatccaac gctgtgcgcg tgttgccccg 1860

ggccccgccc gccagcgacc caccactgtg ccccgcccag atgccttccc cccctccca 1920

50 tccatgccc gatgccgtct acaactacta cgctgccgt cctcgctgc tctgctcgt 1980

ctctccctc cccaccccaa ccatccccgt ctctctctc ttctctctc ccccgaccc 2040

tgatccaaa tcccgccccg cccagagcc ggaatcgagg caagcaaaag cttagatag 2100

55 atagagaggc gaggtaggga ggcgagagg gagatcatga agcgcgagta ccaggacgcc 2160

ggagggagcg gcggtggcg gggaggcatg ggctcgtccg aggacaagat gatggtgtcg 2220

60 gggtcggcg cggcggggga gggggaggag gtggacgagc tgctggcggc gctcgggtac 2280

aaggtgcggg cgtccgacat ggcggacgtg gcgcagaagc tggagtagct ggagatggcc 2340
 atggggatgg gcggcggtgg gcgcggcgcc gcgcccgcg acagcttcgc caccacctc 2400
 5 gccacggaca ccgtgcacta caaccccacc gacctctct cctgggtcga gagcatgctg 2460
 tcggagctca acgcgccgcc gccgcccctc ccgcccgcg cgagctcaa cgcctccacc 2520
 10 tcctccaccg tcaccggcgg cgggtacttc gatctccgc cctccgtcga ctctctctgc 2580
 agcacctacg cgctgcggcc gatcccgctc ccggccgtcg gcgcggccga cctctccgcc 2640
 gactccgtcg tgcgggatcc caagcggatg gcactggcg gcagcagcac ctgctcgtca 2700
 15 tcctcatcgt cctctctcgg cgggtggcgg gccaggagct ctgtggtgga ggctgccccg 2760
 ccggtggccg ccgcggccgg tgcgcccgcg ctgccggtcg tcgtggtcga cacgcaggag 2820
 20 gccgggattc ggctggtcga cgcgtgctg gcgtgcgcag aggccgtgca gcaggagaac 2880
 ttctctccg cggaggcgct ggtgaagcag ataccttgc tggccgcgtc ccaggcgccg 2940
 gccatgcga aggtgccgc ctacttcggc gaggccctc cccgcgcgt cttccgctc 3000
 25 cgcgcgcagc cggacagctc cctctcgac gccgcctcg ccgacctct ccacgcgcac 3060
 ttctacgagt cctgccccta cctcaagttc gccacttca ccgccaacca ggccatcctg 3120
 30 gaggcgttcg ccggctgccg ccgcgtgcac gtcgtcgact tcggcatcaa gcaggggatg 3180
 cagtggcccg cccttctcca ggccctggcg ctccgtccg gcggccctcc ctggtccgc 3240
 ctaccggcg tcggccccc gcagccggac gagaccgac cttgcagca ggtgggctgg 3300
 35 aagctgccc agttcgcgca caccatccg gtcgacttc agtaccgcg cctcgtcgcc 3360
 gccacgctcg cggacctgga gccgttcag ctgcagccg agggcgagga gaaccgaac 3420
 40 gagagcccc aggtaatcg cgtcaactcg gtcttcgaga tgcaccggct gtcgcgcag 3480
 cccggcgccc tggagaaggt cctgggcacc gtgcgcgcg tgcggccgag gatcgtcacc 3540
 gtggtggagc aggaggcgaa ccacaactcc ggcacattc tggaccgct caccgagtcc 3600
 45 ctgcactact actccgcat gttcgattct ctggaggcg gcagctccg cggcccatcc 3660
 gaagtctcat ctggggcgcc tgctgtctct gccgcgcg gcacggacca ggtcatgtcc 3720
 50 gaggtgtacc tcggccggca gatctgcaac gtggtggcct gcgagggggc ggagcgcaca 3780
 gagcggcacg agaccctgg gcagtggcg aaccgcctc gcaacgccg gttcgagacc 3840
 gtccacctgg gtcctaatgc ctacaagcag gcgagcacg tgctggcgct cttgcaggc 3900
 55 ggcgacgggt acaaggtgga ggagaaggag ggctgcctga cgctggggtg gcacacgcgc 3960
 ccgctgatcg ccacctccg atggcgctg gccgcgccg gaccgcgagt ttgaacgct 4020
 60 gtaagtacac atcgtgagca tggaggacga cacaacccc gcggccgccc cggtctccg 4080

gcgacgcac gcacgcacgc tctgaagaa gaagaagaag ctaaatgtca tgtcagtga 4140

cgctgaattg cagcgccgg ccacgatcga ccgtccggcg tgaagagacg gacgacgacg 4200

5 aactccgagc cgaccatccc accggcatgt agtaatgtaa tcccttcttc gtccccagtt 4260

ctccaccgcc tccatgatca cccgtaaaac tccaagccc tactactact actactacta 4320

10 ctactactac tatcatgttt aaatgtctat tattgcaatg tgtaattcct ccaatcgctc 4380

atatcaaaat aagcgccggc cggaacttgt tagctgctcc aatgagaatg aaaatgaatt 4440

ttgtacgcaa cgacgcgcc aaactgagcc gagctctgtt ctgttctga tgtcatggt 4500

15 gtctttggg atcaacttag ctctcttgc cgtgttgag ggcttgccga aggaagtctc 4560

ccgatctagg agttgctgca aatgatgcgg cgtgttgaa agatctctg tagttcccc 4620

20 ctgcggtgtg tggcaccgcc gccgtggct gttctctgat ctaaaaatga acctgcacgt 4680

tagttggaga ggggggcccgc tcagcatcag catcaccacc gatcgcccaa ggcttcggcc 4740

ctgctgccgg agcaatcagt tgatcaaaac cgaataccgt ttctgcacaa cagcttgccg 4800

25 tctaagggca tgtacaatgg tggcatatgg atacatatgt cccatgacaa aaagtaattt 4860

gaggcaccta catttagttt ttctcccaa ggcaaccac agtaagaaga ctattaaga 4920

30 aatagaaaat aaaaatttta gtacacatgc atctctactt ttacttcaa tttttcagc 4980

ttttgtacc ggactcaag caccgcctc ctggagagga tcccgcttc ctatccgaat 5040

ctactttacg tcatatccga tcctacatgg catgtgaggc atcacctga ggctatgcat 5100

35 tgtacatgac atgagtgcgg caccgccgta gcaatcagct cgatgatcaa agcatgttat 5160

acccgagcgc atacgcatta ccggcggcgc tgatcgctg cggggagcag taactttgc 5220

40 gggatgggat tggcgcagag gcgggcggag cagtaacttt tgcgggatgg gattggcgca 5280

gaggcgggcg gagcagtga aacctgagag gccactgctg gctggcgtgg cgcatgcca 5340

cttctgttg tgattctgc ctctgcacag tgaccagcgt ggccggccgg cctatcgaaa 5400

45 ctaccgcgc cgcgcggtaa aatgttcgtc cgttggcgcg gggcggtggg ctgggctgca 5460

gcacagagaa cacttaacc gcgtgatca tcaccgccag ccagccggcc agccgcggcg 5520

50 tccgtggtgt acccacggga gctctgaca gcagtaaaaa aaacacaagg cgggtgtgtg 5580

atgggccgtg gagatctggc gtgcgtggcc gaaatctcc cccgccggtg acgtcgggcc 5640

tgcgagcttt ttatttaacc tggcctgcc gaggcgaggc ccggcgccca atgggaggcc 5700

55 gcggtagaag ttggggcggg gggaaaggaa aggaaggag gtggcgccga gcaacagctg 5760

tccaatcggg atcaggtggg cgtgtcaggg agatgatggt ggtggggccc ggccgtcggc 5820

60 ctctgccct cctgtcgtat ccagtcaga gacacacacc gctagctagc tgtggctact 5880

agcagctctg ggcctctgac tcacctctg ctcggcccgg ggacagcccc gccccaccgc 5940
 cgataaagaa aacggaaaaa ggagagggga aatagttcta gctggggtgg gggccccaac 6000
 5 cccagctccg ccgatccggg gccggggggt caattcgcg cgtgtgacc ccgacgggcg 6060
 cgatgatgcc gccccgtgc cgtgcccgcg cacgctcgc cgtccccgg tcgccgggtc 6120
 10 agtccgtcg cgcgccggg cggcgacgtg tagcccgccc ctgctcgccc cacatgcaca 6180
 cggaccacgc cggtgacctg acccatccaa ccgaaccga tcctatcctc gcgtcgcggc 6240
 catgccgagg gatgggagggt ttgttatcc cgcggcgcg cagaggccg gtcctatccg 6300
 15 acggccggcg caccggcgca tgaattgtt gcgctgggcg cggcgggggg acgtgtgagc 6360
 gtgtccgtgc atgggtacgc gtgggattcc gtgcgattcc gctggccatt ggccacgcag 6420
 20 ctgcaaggga aggggtggtg tgggtgggtg ggaggatcga ttcggtggat gtgacccggt 6480
 gtgggtggtc gcgcacatgc gacggggtg tgcgggtcag gggctcatcg gccgtctgt 6540
 gctcgaacca ctctctgag gggaaatgcg ccggagcccg cgtcaactcg gcggtcacac 6600
 25 cgatcacagg ataaggtga cggacgagat gtttctctt gttcgatata agaaagggtg 6660
 gcgttaaagc gactgcacgc agaggcgta ggtctatata aagaagattt ttttttaca 6720
 30 ttcgaaaaat gtgggctagt actctacat acatatgtt tctttttt ttgagcatca 6780
 tacatatgtt ttcttgatt tgaaggcgcg taaatatgga ttgactatt tattggaact 6840
 ggaatattga ttacgtaagt tatttattg agctggacat gcttaccag tgcgattaat 6900
 35 gctgcaacta cctccattct gatttattag ccccttgta ttaaggcaa aaaaaaaga 6960
 aattaaggtc atagttgac cataattca actaataaag taaaagtaa acataggaga 7020
 40 aataatatta tccgaaacta ttgcaaata tgaattc 7057

<210> 7
 <211> 555
 45 <212> Білок
 <213> Triticum aestivum

<400> 7
 50 Met Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Pro Asp Asp
 1 5 10 15
 55 Ser Phe Ala Thr His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro Thr
 20 25 30
 Asp Leu Ser Ser Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Glu Leu Asn Ala Pro
 35 40 45
 60

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

Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr
 290 295 300
 5
 Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val
 305 310 315 320
 10
 Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe Gln
 325 330 335
 15
 Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe Met
 340 345 350
 20
 Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asn Pro Asn Glu Glu Pro Glu Val Ile
 355 360 365
 Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln Pro Gly
 370 375 380
 25
 Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro Arg Ile
 385 390 395 400
 30
 Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Thr Phe Leu
 405 410 415
 35
 Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Ala Met Phe Asp Ser
 420 425 430
 40
 Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly Gly Pro Ser Glu Val Ser Ser Gly Ala
 435 440 445
 Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Gly Thr Asp Gln Val Met Ser Glu Val
 450 455 460
 45
 Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Cys Glu Gly Ala Glu
 465 470 475 480
 50
 Arg Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln Trp Arg Asn Arg Leu Gly
 485 490 495
 55
 Asn Ala Gly Phe Glu Thr Val His Leu Gly Ser Asn Ala Tyr Lys Gln
 500 505 510
 60
 Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Lys Val
 515 520 525

Glu Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu
530 535 540

5

Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Leu Ala Ala Pro
545 550 555

10

<210> 8
<211> 3463
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

15

<400> 8
tatacatgtt gtgttactag ttgtcatatt tagctatata ttttcaata ttaatttta 60
tcaaccacata tatctaggag catgcaagca ttaatagtta gacttaacac caagagatag 120
20 tgtgtctttc ttaataacat gtgtggcata agtacacgat ctaaaagact tgagtcgatg 180
ataattgtc ctccaaaaag aatacattg tgagagatag aacacaagaa ctccgatcac 240
attgatcaat gatctgcatg tgaaaatggt ctccagcgga ttagaatgac atagcgcgta 300
25 ttaacaaga tatgttcaat gacaaaataa tagtactgt acaagatgaa tgacatagct 360
aaactgacgc ggagcatccc atggatcatca ccatgcacac accgccaact caagtgggtc 420
30 ctaatgttat ttgctttctc tagtttgctt gttgatcta acggttcttt tttattaact 480
tgagtatga gtggatattg gtggagaata ttattgactt gtgcctacct cttttatcc 540
ccctccccc tttccctt ctattcatcg tttgttact tgaatccgcc tccaatcatg 600
35 aatattgacc atccctatgg ctgaccctg atcataaccg tgtgtcgcac tagctatgta 660
cgtgtcatgc gagacaaaat catgtagata ggtcaaaatg ttggttgta gattcgtgta 720
40 tcgatagaca agttagggca tctttgattc acatgattct agaaacacat gaaatgaaaa 780
gattgcaaag ttacgcccac ttgaatcatg cacggtttt gggttggtg catcgccgga 840
aaaacgtgga tcctttcat gaggtttca gtggacacta gaattccttg gaatgaatac 900
45 aatgaatcc ttggcaaata tttgtgttg atcaatcct acaactaaa cgaccagcac 960
ggaaaaagaa tcccaagga taaaagact ccttcgattc aaagaggccc tcaacagtgc 1020
50 aatacctca aagtcttga atccatttt cccatgagca ctgcaagcca cagagagggc 1080
cacacggccg cagcgcacgg agaaggagtc agacgtagca gagccccat cccgcatagc 1140
attttattt aattgcggg gatttctggg gtggtgggcg caagattgt aactggatgg 1200
55 cgaagttgt ctggtgataa agatgggagc gacgaatccg tccatcgatc caacgtgtg 1260
cgctgttgg cccggggccc cgccgcccag cgaccacca ctccaccag acccagatgc 1320
60 ctccccctc ccatcaccg atgccgtctc gcaatctccc cctccctt cccctacaac 1380

tactactact cgctcccgct gccgctcgct cgctcgctcg ctgctttgct ctctctcctt 1440

cttcttcctc tttcttcctc cccaccccc cgcccccca ccttgatcc aaatcccgac 1500

5 cctccccaga accggaaccg aggcaagcaa aagcttggcg caattattgg ccggagatag 1560

gtagagaagc gaggcagctc gctcgcggtg aggcgagatc atgaagcgcg agtaccagga 1620

10 cgccggcggg agcgggtggcg ggggcggcat gggctcgtct gaggacaaga tgatggtgtc 1680

ggcggcggcg ggggaggggg aggaggtgga cgagctgctg gcggcgctcg ggtacaaggt 1740

gcgggcctcc gacatggcgg acgtggcgca gaagctggag cagctggaga tggccatggg 1800

15 gatgggcggc gtgggcggcg gcgccgcccc cgacgacagc ttcgccacc acccgccac 1860

ggacaccgtg cactacaacc ccaccgacct ctctcctgg gtcgagagca tgctgtcgga 1920

20 gctcaacgcg ccgccggcg cctcccgcc cgccccgag cagctcaacg cctccacctc 1980

ctccaccgtc acgggcgggtg ggtacttca tctccgccc tcggttgact cctcctcag 2040

cacctacgcc ctgcggcca tccctcccc ggccggcgcc gtcggggcgg ccgacctgtc 2100

25 cgccgactcc gtgcgggacc ccaagcggat gcgactggc gggagcagca cctcgtcgtc 2160

gtcatcctcc tcgtctctc tcggtggggg cgccaggagc tctgtggtg aggtgtctcc 2220

30 gccggtcgcg gccggggcca acgcgcccgc gctgccggtc gtcgtggtcg acacgcagga 2280

ggccgggatt cggtgtgtc acgcgtgct ggctgcgcg gaggccgtgc agcaggagaa 2340

cttctctgcc gcggaggcgc tggtaagca gataccctg ctggccgct cccagggcgg 2400

35 cgcatgctc aaggtcgcc cctactcgg cgaggccctc gccgcccgcg tcttcgctt 2460

ccgccgcag ccggacagct cctcctcga cgccgcttc gccgacctc tccacgcgca 2520

40 cttctacgag tctgcccct acctcaagt cgcccactc accgccaacc aggccatcct 2580

ggaggccttc gccggctgcc gccgcgtgca cgtcgtcgac ttggcatca agcaggggat 2640

gcagtggccc gccctctcc aggcctcgc gtcctgccc ggcgccctc cctcgttccg 2700

45 cctcaccggc gtcggcccc cgagccgga cgagaccgac gcctgcagc aggtgggctg 2760

gaagctgcc cagttcgcg acaccatccg cgtcgactc cagtaccgc gcctcgtgc 2820

50 cgccacgctc gcggacctg agccattcat gctgcagccg gagggcgagg aggaccgaa 2880

cgaggagccc gaggtaatc ccgtcaactc ggtcttcgag atgcaccggc tgctcgcgca 2940

gcccggcgcc ctggagaagg tcttggcac cgtgcgcgcc gtgcggcca ggatcgtcac 3000

55 cgtggtggag caggaggcca accacaactc cggcacattc ctggaccgct tcaccgagtc 3060

tctgcactac tactccacca tgttcgatt cctcgaggc gccagctcc gcggcccatc 3120

60 cgaagtctca tcgggggctg ccgtgtctc tgccgccgc gccacggacc aggtcatgtc 3180

cgaggtgtac ctcggccggc agatctgcaa cgtggtggcc tgcgaggggg cggagcgcac 3240

agagcggcac gagacgctgg ggcagtggcg gaaccggctg ggcaacgccg ggctcgagac 3300

5 cgtgcacctg ggctccaatg cctacaagca ggcgagcacg ctgctggccc tattcgccgg 3360

cggcgacggg tacaaggtgg aggagaagga gggctgcctg actctcgggt ggcacacgcg 3420

10 cccgctgata gccacctcgg catggcgctt ggccgcgccg tga 3463

<210> 9

<211> 620

15 <212> Білок

<213> Triticum aestivum

<400> 9

20 Met Lys Arg Glu Tyr Gln Asp Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Met Gly Ser Ser Glu Asp Lys Met Met Val Ser Ala Ala Ala Gly Glu

25 20 25 30

Gly Glu Glu Val Asp Glu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Val Arg

30 35 40 45

Ala Ser Asp Met Ala Asp Val Ala Gln Lys Leu Glu Gln Leu Glu Met

50 55 60

35 Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Pro Asp Asp Ser

65 70 75 80

40 Phe Ala Thr His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro Thr Asp

85 90 95

Leu Ser Ser Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Glu Leu Asn Ala Pro Pro

45 100 105 110

Pro Pro Leu Pro Pro Ala Pro Gln Gln Leu Asn Ala Ser Thr Ser Ser

50 115 120 125

Thr Val Thr Gly Gly Gly Tyr Phe Asp Leu Pro Pro Ser Val Asp Ser

130 135 140

55 Ser Cys Ser Thr Tyr Ala Leu Arg Pro Ile Pro Ser Pro Ala Gly Ala

145 150 155 160

60 Val Gly Pro Ala Asp Leu Ser Ala Asp Ser Val Arg Asp Pro Lys Arg

	165	170	175
5	Met Arg Thr Gly Gly Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser	180	185
			190
10	Ser Leu Gly Gly Gly Ala Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro Pro	195	200
			205
15	Val Ala Ala Gly Ala Asn Ala Pro Ala Leu Pro Val Val Val Val Asp	210	215
			220
20	Thr Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala	225	230
			235
			240
25	Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys	245	250
			255
30	Gln Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val	260	265
			270
35	Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe Arg	275	280
			285
40	Pro Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu	290	295
			300
45	His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe	305	310
			315
			320
50	Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg Arg Val	325	330
			335
55	His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu	340	345
			350
60	Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu	355	360
			365
	Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln	370	375
			380
	Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe	385	390
			395
			400
	Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe		

	405	410	415
5	Met Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro Glu Val	420	425 430
10	Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln Pro	435	440 445
15	Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro Arg	450	455 460
20	Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Thr Phe	465	470 475 480
25	Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe Asp	485	490 495
30	Ser Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly Gly Pro Ser Glu Val Ser Ser Gly	500	505 510
35	Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Gly Thr Asp Gln Val Met Ser Glu	515	520 525
40	Val Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Cys Glu Gly Ala	530	535 540
45	Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln Trp Arg Asn Arg Leu	545	550 555 560
50	Gly Asn Ala Gly Phe Glu Thr Val His Leu Gly Ser Asn Ala Tyr Lys	565	570 575
55	Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Lys	580	585 590
60	Val Glu Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly Trp His Thr Arg Pro	595	600 605
	Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Leu Ala Ala Pro	610	615 620
	<210> 10		
	<211> 1872		
	<212> ДНК		
	<213> Triticum aestivum		

<400> 10
atgaagcggg agtaccagga cgccggaggg agcggcggcg gcggtggcgg catgggctcg 60
tccgaggaca agatgatggt gtcggcggcg gcgggggagg gggaggaggt ggacgagctg 120
5 ctggcggcgc tcgggtacaa ggtgcgcgcc tccgacatgg cggacgtggc gcagaagctg 180
gagcagctcg agatggccat ggggatgggc ggcgtgggcg ccggcgccgc ccccgacgac 240
10 agcttcgcca cccacctcgc cacggacacc gtgcactaca accccaccga cctgtcgtct 300
tgggtcgaga gcatgctgtc ggagctcaac gcgccgccgc cgcccctccc gcccgccccg 360
cagctcaacg cctccacctc ctccaccgtc acgggcagcg gcggctactt cgatctcccg 420
15 ccctcgcgtc actcctccag cagcatctac gcgctgcggc cgatcccctc cccggccggc 480
gcgacggcgc cggccgacct gtccgccgac tccgtgcggg atcccaagcg gatgcgcact 540
20 ggcgggagca gcacctcgtc gtcactctcc tctcgtcgt ctctcggtgg gggcgccagg 600
agctctgtgg tggaggctgc cccgccggtc gcggccgcgg ccaacgcgac gcccgcgctg 660
ccggtcgtcg tggtcgacac gcaggaggcc gggattcggc tggtcacgc gctgctggcg 720
25 tgcgcggagg ccgtgcagca ggagaacctc tccgcccgcg aggcgctggt gaagcagata 780
cccttgctgg ccgctccca gggcggcgcg atcgcaagg tcgccgccta ctcggcgag 840
30 gccctgccc gccgctctt ccgctccgc ccgagccgg acagctccct cctcgacgcc 900
gccttcgccc acctctcca cgcgcacttc tacgagtct gccctacct caagttcgcg 960
cacttcaccg ccaaccaggc catcctggag gcgttcgccc gctgccgccg cgtgcacgtc 1020
35 gtcgacttcg gcatcaagca ggggatgcag tggcccgcac ttctccaggc cctcgccctc 1080
cgtcccggcg gccctccctc gttccgcctc accggcgtcg gcccccgca gccggacgag 1140
40 accgacgccc tgcagcaggt gggctggaag ctgcccagt tcgcgcacac catccgctc 1200
gacttcagt accgggcctc cgtcgccgcc acgctcgcg acctggagcc gttcatgctg 1260
cagccggagg gcgaggagga cccgaacgag gagcccagg taatcgccgt caactcagtc 1320
45 ttcgagatgc accggtgct cgcgcagccc ggcgccctgg agaaggtcct gggcaccgtg 1380
cgcgccgtgc ggccaggat cgtcacctg gtggagcagg aggcgaatca caactccggc 1440
50 acattcctgg accgcttcac cgagtctctg cactactact ccacatgtt cgattccctc 1500
gagggcgcca gctccggcg cgcccatcc gaagtctcat cgggggctgc tgctgtcct 1560
gccgccgccc gcacggacca ggtcatgtcc gaggtgtacc tcggccggca gatctgcaac 1620
55 gtggtggcct gcgagggggc ggagcgcaca gagcggcacg agacgctggg ccagtggcgg 1680
aaccggctgg gcaacgccgg gttcgagacc gtccacctgg gctccaatgc ctacaagcag 1740
60 gcgagcacgc tgctggcgct cttcgccggc ggcgacggct acaaggtgga ggagaaggaa 1800

ggctgcctga cgctgggggtg gcacacgcgc cgcctgatcg ccacctcggc atggcgctg 1860

gccggggccgt ga 1872

5

<210> 11
 <211> 623
 <212> Білок
 <213> Triticum aestivum

10

<400> 11

Met Lys Arg Glu Tyr Gln Asp Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

15

Gly Met Gly Ser Ser Glu Asp Lys Met Met Val Ser Ala Ala Ala Gly
 20 25 30

20

Glu Gly Glu Glu Val Asp Glu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Val
 35 40 45

25

Arg Ala Ser Asp Met Ala Asp Val Ala Gln Lys Leu Glu Gln Leu Glu
 50 55 60

30

Met Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Pro Asp Asp
 65 70 75 80

35

Ser Phe Ala Thr His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro Thr
 85 90 95

40

Asp Leu Ser Ser Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Glu Leu Asn Ala Pro
 100 105 110

45

Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ala Pro Gln Leu Asn Ala Ser Thr Ser Ser
 115 120 125

50

Thr Val Thr Gly Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Leu Pro Pro Ser Val Asp
 130 135 140

55

Ser Ser Ser Ser Ile Tyr Ala Leu Arg Pro Ile Pro Ser Pro Ala Gly
 145 150 155 160

60

Ala Thr Ala Pro Ala Asp Leu Ser Ala Asp Ser Val Arg Asp Pro Lys
 165 170 175

Arg Met Arg Thr Gly Gly Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 180 185 190

	Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ala Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro
	195 200 205
5	Pro Val Ala Ala Ala Ala Asn Ala Thr Pro Ala Leu Pro Val Val Val
	210 215 220
10	Val Asp Thr Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala
	225 230 235 240
15	Cys Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn Leu Ser Ala Ala Glu Ala Leu
	245 250 255
20	Val Lys Gln Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg
	260 265 270
25	Lys Val Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg
	275 280 285
30	Phe Arg Pro Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp
	290 295 300
35	Leu Leu His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala
	305 310 315 320
40	His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg
	325 330 335
45	Arg Val His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro
	340 345 350
50	Ala Leu Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe
	355 360 365
55	Arg Leu Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu
	370 375 380
60	Gln Gln Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val
	385 390 395 400
	Asp Phe Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu
	405 410 415
	Pro Phe Met Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro
	420 425 430

Glu Val Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala
 435 440 445
 5
 Gln Pro Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg
 450 455 460
 10
 Pro Arg Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly
 465 470 475 480
 15
 Thr Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met
 485 490 495
 20
 Phe Asp Ser Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Pro Ser Glu Val
 500 505 510
 25
 Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Gly Thr Asp Gln Val
 515 520 525
 30
 Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Cys
 530 535 540
 35
 Glu Gly Ala Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln Trp Arg
 545 550 555 560
 40
 Asn Arg Leu Gly Asn Ala Gly Phe Glu Thr Val His Leu Gly Ser Asn
 565 570 575
 45
 Ala Tyr Lys Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp
 580 585 590
 50
 Gly Tyr Lys Val Glu Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly Trp His
 595 600 605
 55
 Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Leu Ala Gly Pro
 610 615 620
 60
 <210> 12
 <211> 618
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 12
 Met Lys Arg Glu Tyr Gln Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp
 1 5 10 15

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

	Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Ala	
	260 265 270	
5	Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe Arg Pro Gln	
	275 280 285	
10	Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu His Ala	
	290 295 300	
15	His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala	
	305 310 315 320	
	Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg Arg Val His Val	
	325 330 335	
20	Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Leu Gln	
	340 345 350	
25	Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly	
	355 360 365	
30	Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val Gly	
	370 375 380	
35	Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe Gln Tyr	
	385 390 395 400	
	Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe Met Leu	
	405 410 415	
40	Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro Glu Val Ile Ala	
	420 425 430	
45	Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln Pro Gly Ala	
	435 440 445	
50	Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro Arg Ile Val	
	450 455 460	
55	Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Ser Phe Leu Asp	
	465 470 475 480	
60	Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe Asp Ser Leu	
	485 490 495	

Glu Gly Gly Ser Ser Gly Gly Pro Ser Glu Val Ser Ser Gly Gly Ala
 500 505 510

5 Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gly Thr Asp Gln Val Met Ser Glu Val Tyr
 515 520 525

10 Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Cys Glu Gly Thr Glu Arg
 530 535 540

15 Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln Trp Arg Asn Arg Leu Gly Asn
 545 550 555 560

Ala Gly Phe Glu Thr Val His Leu Gly Ser Asn Ala Tyr Lys Gln Ala
 565 570 575

20 Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Lys Val Glu
 580 585 590

25 Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile
 595 600 605

30 Ala Thr Ser Ala Trp Arg Leu Ala Ala Pro
 610 615

35 <210> 13
 <211> 532
 <212> Білок
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 13

40 Met Lys Arg Asp His His His His His Gln Asp Lys Lys Thr Met Met
 1 5 10 15

45 Met Asn Glu Glu Asp Asp Gly Asn Gly Met Asp Glu Leu Leu Ala Val
 20 25 30

50 Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Asp Val Ala Gln Lys
 35 40 45

Leu Glu Gln Leu Glu Val Met Met Ser Asn Val Gln Glu Asp Asp Leu
 50 55 60

55 Ser Gln Leu Ala Thr Glu Thr Val His Tyr Asn Pro Ala Glu Leu Tyr
 65 70 75 80

60 Thr Trp Leu Asp Ser Met Leu Thr Asp Leu Asn Pro Pro Ser Ser Asn

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

	325	330	335
5	Arg Gly Phe Val Ala Asn Thr Leu Ala Asp Leu Asp Ala Ser Met Leu	340	345 350
10	Glu Leu Arg Pro Ser Glu Ile Glu Ser Val Ala Val Asn Ser Val Phe	355	360 365
15	Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg Pro Gly Ala Ile Asp Lys Val Leu	370	375 380
20	Gly Val Val Asn Gln Ile Lys Pro Glu Ile Phe Thr Val Val Glu Gln	385	390 395 400
25	Glu Ser Asn His Asn Ser Pro Ile Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser	405	410 415
30	Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Val Pro Ser	420	425 430
35	Gly Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile Cys	435	440 445
40	Asn Val Val Ala Cys Asp Gly Pro Asp Arg Val Glu Arg His Glu Thr	450	455 460
45	Leu Ser Gln Trp Arg Asn Arg Phe Gly Ser Ala Gly Phe Ala Ala Ala	465	470 475 480
50	His Ile Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala Leu	485	490 495
55	Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg Val Glu Glu Ser Asp Gly Cys Leu	500	505 510
60	Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Lys	515	520 525
	Leu Ser Thr Asn	530	
	<210> 14		
	<211> 30		
	<212> Білок		
	<213> Triticum aestivum		

<400> 14

Asp Ser Ala Thr Pro Pro Asp Ala Pro Leu Val Ala Ala Ala Gly Leu
1 5 10 15

5

Ala Ala Asn Glu Thr Thr His Ile Lys Ile Ser Ala Asn Lys
20 25 30

10

<210> 15

<211> 11

<212> Білок

<213> Triticum aestivum

15

<400> 15

Asp Glu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Val
1 5 10

20

<210> 16

<211> 4501

<212> ДНК

<213> Triticum aestivum

25

<400> 16

atgccgtcta caactactac gctgccgctc cctcgctgct ctgctcgctc tcctccctcc 60

30

ccacccaac catccccgtc tcctcctcct tcctcctctc ccccgaccct ggatccaaat 120

ccgggcccgc ccagagccg gaatcgaggc aagcaaaagc ttgagataga tagagaggcg 180

aggtagggag gcgagaggcg agatcatgaa gcgcgagtac caggacgccg gagggagcgg 240

35

cggtgccgg ggaggcatgg gctcgtccga ggacaagata atggtgtcgg ggtcggcggc 300

ggcgggggag ggggaggagg tggacgagct gctggcggcg ctcgggtaca aggtgtgttg 360

40

gcgccgcctc ctgcagcgc cgttcttct cctctcatct ctcatgaaca cacaccatgg 420

agaaactcta cacacacaca cacacaacca agaagaacac cggctgttac ttgcacgag 480

aggcccttct ccttggtgga acaagagact acattgtgtt ttcccagcc ctcttggtc 540

45

acttttctca ttcattctt ccaactaaa tagctaagta caagactgac ccaagcactt 600

gccagccgcc actctgcgag ctgctaacgc ccactaactc atgcactagg ccactaatca 660

50

caactaactc atgcacgcat gcaccacacc ggccactatc acatgaccgg gcgactaacc 720

cactagctac atgcatgcaa ctagataact accttatcca tgcactccag gactcggcaa 780

ctccaccgga cgccccgtc gtagcagccg cgggacttgc tgctaacgaa accacgcaca 840

55

tcaagattag tgctaacatt tccccctta atcttgacac gccttgccgt cgaccgtcat 900

cttgaacgcc tgagctcgac gtcttcacac gcctccgcgc ccgctgcgac gtgccgtgcg 960

60

ccgcctgtc accggagttg atgcagcttg cgtcgtcgtc gtcacggccg tgaccagcc 1020

5 tgccggacccg acccgacgca tcgacgccgg tcacaccgcc acggacccga cctggcgcac 1080
 tgacgccggc cgcaccgtgc tccctacga ccccgccgac atacgccgag ctctccgcc 1140
 ggcgacacac gcctggcgtc cctctgcgtc ccgcacgtcc cgcacgcac cgacgtgccc 1200
 gacgagcccg accgcagcag tgcgtcccg acgtcccgcg cgcattcgac gcgcccgcag 1260
 10 agcccgcag caccagacgc tcaccacgtg ccgcctccgc gtccgccatg gcagccacca 1320
 cgccgcgcct acgtgccacg cacctccac ggtcgttgc ccgagccgtc gcgacctatg 1380
 cgccaccacg caggtccttc gcgacctct cgtctccgc accgccgtgc ccttcgcgca 1440
 15 cactccccc gtccccgcgc tccagcccg cgctcccgcc gcgcacgtac gcggtctgcg 1500
 caaccaggtc cagcgccctg acgcggtcca ctcccggtt cccgacgcgc tcgacacgtc 1560
 20 cagtgcgcgc ccataacacg caccggctgc gtccggctcg ccgccgcac ttattgccct 1620
 gcaccgccgc ggctccatg ccgccatgca gtgcctccac gccgccacac cgtgttgac 1680
 cgctgcgcca ccacgcagcg cctcgccggc ctcccggtc gccgcacgta cgacgtcacc 1740
 25 gcccgccgc tccgccacgc gtcgcccgc cgccgcagcc gatgcctca tgcggccgc 1800
 gcatgccccg tccgccggg acgccaccgc gcgccacggc cggccctga acctgtggc 1860
 30 tctgaatacc aaatgttgc gccgcctct cgcagcgccg ttcttctcc tctcatctt 1920
 catgaacaca caccatggag aaactctaca cacacacaca cacaaccaag aagaacaccg 1980
 gctgttactt tgcacgagag gcccttctc ttgttgaac aagagactac attgtgttt 2040
 35 tccagccct ctggctcac tttctcatt catcttctc aacttaaata gctaagtaca 2100
 agactgaccc aagcacttg cagccgccac tctgcagct gtaacgccc actaactcat 2160
 40 gcactaggcc actaatcaca actaactcat gcacgcatg accacaccgg ccactatcac 2220
 atgaccgggc gactaaccca ctactacat gcatgcaact agataactac ctatccatg 2280
 cactccagga ctggcaact ccaccggacg ccccgctct agcagccgcg ggacttgctg 2340
 45 ctaacgaaac cagcacatc aagattagt ctaacaagg gcgggcgtc gacatggcg 2400
 acgtggcgca gaagctggag cagctggaga tggccatggg gatgggcggc gtgggcgccg 2460
 50 gcgccgcgcc cgacgacagc ttgccaccc acctgccac ggacaccgtg cactacaacc 2520
 ccaccgacct ctctcctgg gtcgagagca tgcgtcgga gctcaacgcg ccgccgccg 2580
 cctcccgcc cgcccgag ctcaacgct ccacctctc caccgtcacc ggcgccggg 2640
 55 acttcgatct cccgccctc gtcgactct cctgcagcac ctacgcgtg cgccgatcc 2700
 cgtccccggc cgtcgcccg gccgacctt ccgccgact cgtcgtcgg gatccaagc 2760
 60 ggatgcgcac tggcggcagc agcacctgt cgtcatctc atcgtctct ctggcggtg 2820

gcggcgccag gagctctgtg gtggaggctg ccccgccggt ggccgccgcg gccggtgcgc 2880

ccgcgctgcc ggtcgtcgtg gtcgacacgc aggaggccgg gattcggtg gtgcacgcgc 2940

5 tgctggcgtg cgcagaggcc gtgcagcagg agaacttctc tgccgcggag gcgctggtga 3000

agcagatacc cttgctggcc gcgtcccagg gcgggccat gcgaaggtc gccgcctact 3060

10 tcggcgaggc cctcgccgc cgcgtcttc gttccgccc gcagccggac agtccctcc 3120

tcgacgccgc ctcgccgc ctcctccac gcacttcta cgagtctgc ccctacctca 3180

agttcgccca cttaccgcc aaccaggcca tcttgaggc gttcgccgc tgccgccgcg 3240

15 tgcacgtcgt cgactcggc atcaagcagg ggatgcagtg gcccgccctt ctccaggccc 3300

tggcgtccg tcccgccgc cctccctgt tccgcctcac cggcgtcggc cccccgcagc 3360

20 cggacgagac cgacgcctg cagcaggtg gctggaagct cgcccagtc gcgcacacca 3420

tccgcgtcga cttcagtac cgcggcctc tcgccccac gctcgccgc ctggagccgt 3480

tcagtctga gccggaggc gaggaggacc cgaacgagga gcccgagga atcgccgtca 3540

25 actcgtctt cgagatgcac cggctgctc cgcagcccgc cgcctggag aaggtcctg 3600

gcaccgtgc cgccgtcgc cagaggatc tcaccgtgt ggagcaggag gcgaaccaca 3660

30 actccggcac attcctggac cgcttcacc agtccctga ctactactc accatgttc 3720

attctctga gggcgccgc tccggcgcc catccgaagt ccatctggg gcggctgctg 3780

ctcctccgc cgccggcac gaccaggta tgtccaggt gtacctggc cggcagatct 3840

35 gcaacgtgtt ggcctgcgag gggcgccgc gcacagagc gcacgagacc ctggggcagt 3900

ggcggaacc cctcggaac gccgggtc agaccgtca cctgggtcc aatgcctaca 3960

40 agcaggcgag cacgtcgtg gcgtcttcg caggcgccga cgggtacaag gtggaggaga 4020

aggagggctg cctgacgtg ggggtgcaca cgcgccgcgt gatcgccacc tccgcatggc 4080

gcctggccgc gccgtgacc cgagtttga acgtgtaag tacacatct gagcatggag 4140

45 gacgacaaa ccccgccgc cccccggc ctcggcgca cgcacgcac cacgtcttg 4200

aagaagaaga agaagctaaa tgcattgta gtgaacgtg aattgcagc gccggccacg 4260

50 atcgaccgtc cggcgtgaag agacggacga cgacgaact cgagccgacc atcccaccg 4320

catgtagtaa tgtaacctt tctcgtccc cagttctca ccgcctcat gatcaccgt 4380

aaaactccca agccctacta ctactacta tactactact actactatca tgtttaaag 4440

55 tctattattg caatgtgtaa ttctccaat cgctcatatc aaaataagc cgggcccgc 4500

t 4501

60

	<210> 17	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Triticum aestivum	
5	<400> 17	
	ggcaagcaaa agcttgagat agat	24
10	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> Triticum aestivum	
15	<400> 18	
	ggtgcagggc aataagatg	19
20	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> Triticum aestivum	
25	<400> 19	
	gacagcacca gacgctcac	19
30	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> Triticum aestivum	
35	<400> 20	
	gctctcgacc caggaggag	19
40	<210> 21	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Triticum aestivum	
45	<400> 21	
	tggagcagct ggagatgg	18
50	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Triticum aestivum	
55	<400> 22	
	taggggcagg actcgtagaa	20
60	<210> 23	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> Triticum aestivum	
65	<400> 23	

	gcgctggtga agcagatac	19
5	<210> 24 <211> 18 <212> ДНК <213> Triticum aestivum	
10	<400> 24 ttcaaactcg cggtcacg	18
15	<210> 25 <211> 22 <212> ДНК <213> Triticum aestivum	
20	<400> 25 tctctccct cccacccca ac	22
25	<210> 26 <211> 18 <212> ДНК <213> Triticum aestivum	
30	<400> 26 gcgtccggtg gagttgcc	18
35	<210> 27 <211> 20 <212> ДНК <213> Triticum aestivum	
40	<400> 27 gtgttttcc cagccctctt	20
45	<210> 28 <211> 19 <212> ДНК <213> Triticum aestivum	
50	<400> 28 gctctcgacc caggaggag	19
55	<210> 29 <211> 18 <212> ДНК <213> Triticum aestivum	
60	<400> 29 gaggtagctc gcggatca	18
	<210> 30 <211> 18 <212> ДНК	

<213> Triticum aestivum

<400> 30

cgttcaaaac tcgcgaga

18

5

1

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці, кожна з яких містить алель Rht-B1, кодує поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO: 5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, вказаної як SEQ ID NO: 5, щонайменше (i) вставкою амінокислот DSATPPDAPLVAAAGLAANETTHIKISANK (SEQ ID NO: 14) або їхнім варіантом між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO: 5, де варіант послідовності відрізняється від SEQ ID NO: 14 амінокислотними замінами, вставками або делеціями з не більше ніж 5 амінокислот, і (ii) однією або декількома замінами амінокислот в C-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO: 5.
2. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці, кожна з яких містить алель Rht-B1, кодує поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і C-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність C-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO: 5, де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, вказаної як SEQ ID NO: 5, щонайменше вставкою амінокислот DSATPPDAPLVAAAGLAANETTHIKISANK (SEQ ID NO: 14) або їхнім варіантом між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO: 5, де послідовність варіанта відрізняється від SEQ ID NO: 14 амінокислотними замінами, вставками або делеціями з не більше ніж 5 амінокислот, і де нуклеотидна послідовність алелю Rht-B1 відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної як SEQ ID NO: 1, щонайменше присутністю мутації ділянки сплайсингу інтрона.
3. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за п. 1 або 2, де поліпептид Rht-B1 містить одну або декілька заміни амінокислот в N-кінцевому домені відносно амінокислот 1-49 SEQ ID NO: 5.
4. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за будь-яким з пп. 1-3, де вставка однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO: 5 являє собою вставку 30 амінокислот, послідовність яких являє собою DSATPPDAPLVAAAGLAANETTHIKISANK (SEQ ID NO: 14).
5. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за будь-яким з пп. 1 або 3-4, у якій одна або декілька заміни амінокислот в C-кінцевому домені поліпептиду Rht-B1 включають заміну амінокислоти, що відповідає амінокислоті G260, V264, A271, G298, A299, A305, A310, P344, L346, G377, P394, R514, T524, S528, G563, V286, D371 або E579 відносно SEQ ID NO: 3, або амінокислоти, яка відповідає S493, R283, R271, A280, V234, R484, V285, G230, S488 або C240 відносно SEQ ID NO: 5.
6. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за п. 5, у якій заміна вибрана з групи, яка складається з G260E, V264M, A271T, G298D, A299T, A305T, A310V, P344S, L346F, G377R, P394L, R514H, T524I, S528F, G563D, V286M, D371N, A310T і E579K відносно SEQ ID NO: 3, і S493F, R283H, R271H, A280T, V234M, R484H, V285F, G230E, S488F і C240Y відносно SEQ ID NO: 5.
7. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за будь-яким з пп. 1 або 3-6, де алель Rht-B1 містить варіант послідовності відносно SEQ ID NO: 1, де варіант послідовності вибраний з групи, яка складається з G2715A, G2726A, G2747A, G2829A, G2831A, G2849A, C2865T, C2966T, C2972T, G3065A, C3117T, G3477A, C3507T, C3519T, G3624A, G2792A, CC2108TA, G3047A, G2864A і G3671A.
8. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за будь-яким з пп. 2-7, де алель Rht-B1 містить варіант послідовності відносно SEQ ID NO: 1, де варіант послідовності вибраний з групи, яка складається з G148A, G148T, G147A, G2084A і G2083A.
9. Рослина пшениці за будь-яким з пп. 1-8, де рослина пшениці має підвищений ріст порівняно з рослиною пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1c алелем, і знижений ріст порівняно з рослиною пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1a алелем, коли рослини вирощують за однакових умов.

10. Рослина пшениці за будь-яким з пп. 1-9, де рослина пшениці має підвищену фертильність і/або має підвищений урожай зерна порівняно з рослиною пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1c алелем.
11. Рослина пшениці за п. 10, де урожай зерна відповідає урожаю або є вищим, ніж урожай рослини пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1b алелем.
12. Рослина пшениці за будь-яким з пп. 1-11, де рослина пшениці має збільшену довжину колеоптилю порівняно з рослиною пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1c алелем, і де довжина колеоптилю становить 80-100 % довжини колеоптилю рослини пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1a алелем.
13. Рослина пшениці за будь-яким з пп. 1-12, де зерно має підвищений стан спокою порівняно із зерном, отриманим від рослини пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1a алелем.
14. Зерно пшениці, отримане з рослини пшениці за будь-яким з пп. 1-13, що містить алель Rht-B1.
15. Рослина пшениці за п. 14, яка є гомозиготною по Rht-B1a алелю.
16. Спосіб отримання зерна пшениці, який включає (i) вирощування рослини пшениці за пп. 1-13, і (ii) збирання зерна з рослини.
17. Спосіб отримання борошна, непросіяного борошна або висівку, який включає переробку зерна пшениці, що містить Rht-B1 алель, отриманого від рослини пшениці за будь-яким з пп. 1-13, де зерно має більш тривалий стан спокою порівняно із зерном, отриманим від рослини пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1a алелем.
18. Спосіб отримання харчового продукту, який включає змішування борошна, непросіяного борошна або висівку, отриманих способом за п. 17, зі щонайменше одним іншим харчовим інгредієнтом.



Фіг. 1



Fig. 2

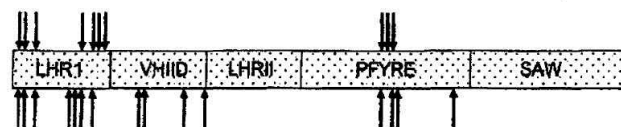


Fig. 3

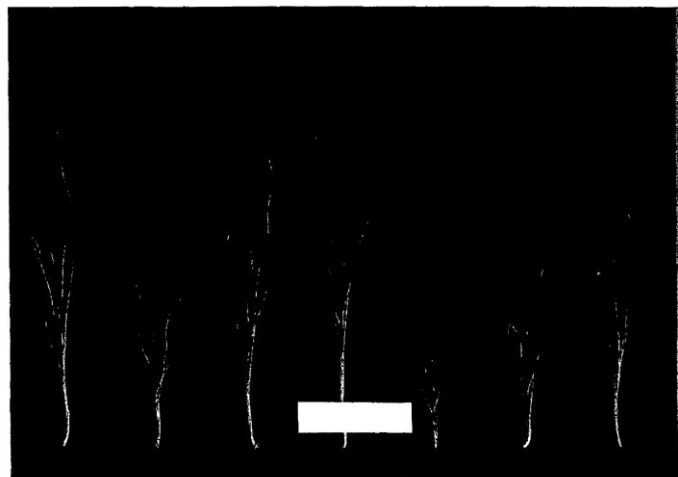


Fig. 4

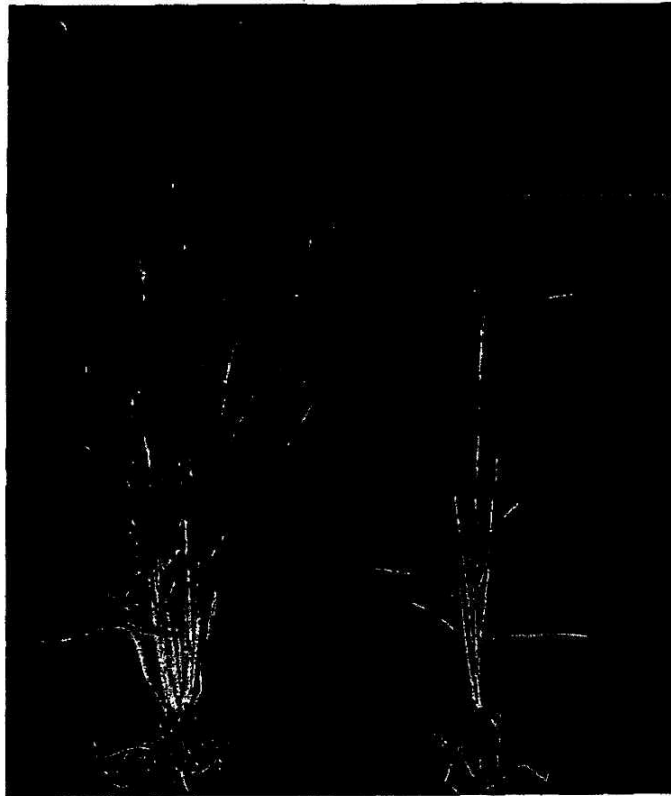


Fig. 5

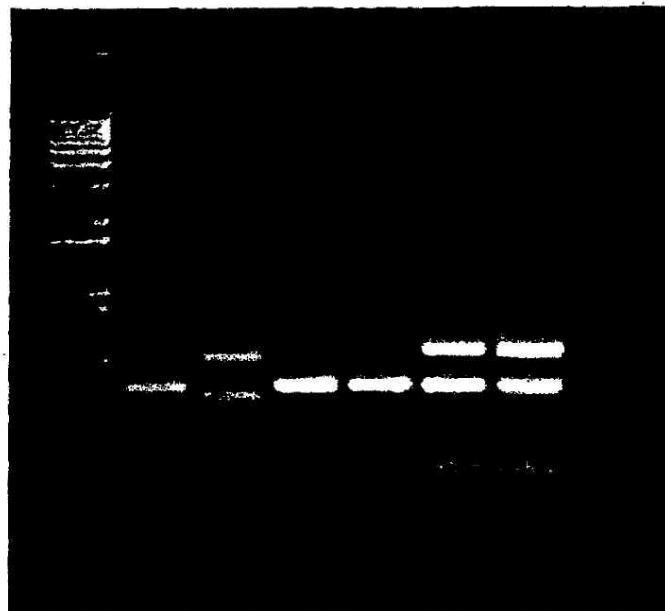


Fig. 6

консенсус	МКREYQDAGGSGGGGGMGSSSEDKMMVS--AAAGEGSEVDLLAALGYKV
JF930277_R
JF930278_RGS.....
JF930281_R
консенсус	51 61 71 81 91
JF930277_R	RASDMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDL
JF930278_R
JF930281_R
консенсус	101 111 121 131 141
JF930277_R	SSWVESMLSELNAPPPPLPPAP-QLNASTSSTVTG-GGYFDLPPSVDSSC
JF930278_RQ.....
JF930281_RS.....S
консенсус	151 161 171 181 191
JF930277_R	STYALRPIPSAGAVAPADLSADS-VRDPKRMRTGGSSTSSSSSSSSSLG
JF930278_RG.....
JF930281_RV.....LG.....
консенсус	201 211 221 231 241
JF930277_R	GGARSSVVEAAPPVAAAANA-PALFVVVVDTQEAGIRLVHALLACAEAVQ
JF930278_RG.....
JF930281_RG.....T.....
консенсус	251 261 271 281 291
JF930277_R	QENFSAAEALVKQIPLLAASQGGAMRKVAAYFGEALARRVFRFRPQPDSS
JF930278_R
JF930281_RL.....
консенсус	301 311 321 331 341
JF930277_R	LILDAAPADLLHAHFYESCPYLKFAHFTANQAILEAFAGCRRVHVVDPGIK
JF930278_R
JF930281_R
консенсус	351 361 371 381 391
JF930277_R	QGMQWPALLQALALRPGGPPSFRLTGVGPPQPDETDALQQVGWKLQFAH
JF930278_R
JF930281_R
консенсус	401 411 421 431 441
JF930277_R	TIRVDFQYRGLVAATLADLEPFMLQPEGEEDPNEEPEVIAVNSVFEMHRL
JF930278_R
JF930281_R

Фиг. 7a

```

      451      461      471      481      491
KOHCEHCYC LAQPGALEKVLGTVRAVRPRIVTVVEQEAHNHNSGTFLDRFTESLHYISTM
JF930277_R .....
JF930278_R .....
JF930281_R .....

      501      511      521      531      541
KOHCEHCYC FDSLEGGSSGG-PSEVSSGAAAAAPAAAGTDQVMSEVYLGRQICNVVACEG
JF930277_R .....
JF930278_R .....
JF930281_R .....G.....

      551      561      571      581      591
KOHCEHCYC AERTERHETLGQWRNRLGNAGFETVHLGSNAYKQASTLLALFAGGDGYKV
JF930277_R .....
JF930278_R .....
JF930281_R .....

      601      611      621
KOHCEHCYC EEKRGCLTLGWHTRPLIATSAWRLAAP
JF930277_R .....
JF930278_R .....
JF930281_R .....G.....

```

Фиг. 7b

```

Wheat Rht-B1a 22 EDKMMVSGSAAAGEEVDLLAALGYKVRASDMADVAQKLEQLMAMGMGGVGAAPD 81
CAA75492 11 DKKTMMNEEDDNG--MDELLAVLGKVRSEMDADVAQKLEQLEVM-----SNVQED 62

Wheat Rht-B1a 82 DSFATHLATDTVHYNPTDLSSWVESMLSELNAPPPPLPAPQLNASTSSTVTGGGYFDLP 141
CAA75492 63 D--LSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTDLNPP----- 93

Wheat Rht-B1a 142 PSVDSSCSTYALRPIPSPAVADLSADSVVRDPKMRRTGSGSTSSSSSSSLGGG--- 198
CAA75492 94 ---SSNAEYDLKAIPGDAIL-----NQFAIDSASSNQGGGDTY 130

Wheat Rht-B1a 199 --ARSSVVEAAPVAAAAGAPALPVVVVDTEAGIRLVHALLACAEAVQENFSAEAL 255
CAA75492 131 TTNKRLKCSNGVETTATTAESTRHVVLVDSQENGVRVLVHALLACAEAVQENLTVAEAL 190

Wheat Rht-B1a 256 VKQIPLLAASQOGAMRKVAAYFGEALARRVFRFPQDSSLLDAAFADLLHAHFYESCYP 315
CAA75492 191 VKQIGFLAVSQIGAMRKVATYFAEALARRIYRL--SPSQSPIDHSLSDTLQMHFYETCPY 248

Wheat Rht-B1a 316 LKFAHTANQAILEAFAGCRRVHVVDPGIKQGMQWALLQALALRPGGPPSFRLTGVGPP 375
CAA75492 249 LKFAHTANQAILEAFQGGKRVHVVDPSMSQGLQWPAALQALALRPGGPPVFRLTGIGPP 308

Wheat Rht-B1a 376 QPDETALQQVGWKLQFAHTIRVDFQYRGLVAATLADLEPFMLQPEGEEDPNEEPEVIA 435
CAA75492 309 APDNFDYLHEVGCKLAHLAEAIHVEFYRGFVANTLADLDASML---ELRPS-EIESVA 363

```

Фиг. 8a

```

Wheat Rht-B1a 436 VNSVFEMHRLLAQPGALEKVLGTVRAVRPRIVTVVEQEAHNHNSGTFLDRFTESLHYISTM 495
CAA75492 364 VNSVFEHLKLLGRPGAIDKVLGVVNIKPEIFTVVEQESNHNPIFLDRFTESLHYISTL 423

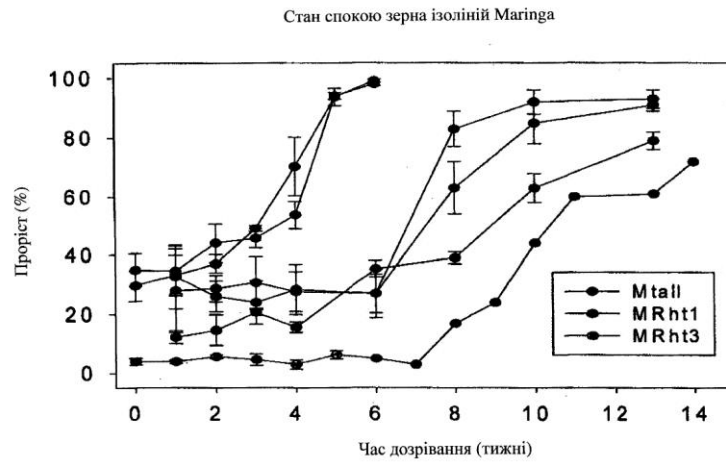
Wheat Rht-B1a 496 FDSLEGGSSGGPSEVSSGAAAAAPAAAGTDQVMSEVYLGRQICNVVACEGAERTERHETLG 555
CAA75492 424 FDSLEGVPS-----GQDKVMSEVYLKQICNVVACDGPDRVERHETLS 466

Wheat Rht-B1a 556 QWRNRLGNAGFETVHLGSNAYKQASTLLALFAGGDGYKVEEKGCLTLGWHTRPLIATSA 615
CAA75492 467 QWRNRFSGAGFAAAHIGSNAFKQASMLLALFNGGEGYRVESDGLMLGWHTRPLIATSA 526

Wheat Rht-B1a 616 WRLA 619
CAA75492 527 WKLS 530

```

Фиг. 8b



Фіг. 9

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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