



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123491** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

**A01H 1/00****C12N 15/82** (2006.01)**A01H 5/00****C12N 5/04** (2006.01)**A01H 6/46** (2018.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2013 10547</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Остлай Майк (US),</b> <b>Хейлі Скотт (US),</b> <b>Уестра Філіп (US),</b> <b>Валдез Вікторія Ешлі (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>31.01.2012</b>	<b>(73)</b> Володілець (володільці): <b>КОЛОРАДО УІТ РІСЕРЧ ФАУНДЕЙШН,</b> <b>ІНК.,</b> 4026 S. Timberline Road, Suite 100, Fort Collins, CO 80525, United States of America (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>15.04.2021</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.</b> <b>№367</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/438,294,</b> <b>61/553,830</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 6306636 B1, 23.10.2001 US 6222099 B1, 24.04.2001 US 2005/009163 A1, 13.01.2005 WO 2005/123946 A1, 29.12.2005 US 2004/216190 A1, 28.10.2004
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>01.02.2011,</b> <b>31.10.2011</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US,</b> <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.12.2013, Бюл.№ 23</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>14.04.2021, Бюл.№ 15</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2012/023298,</b> <b>31.01.2012</b>	

**(54) РОСЛИНА, СТІЙКА ДО КВІЗАЛОФОП-р-ЕТИЛУ, ТА СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ****(57) Реферат:**

Винахід стосується рослини пшениці, яка містить нуклеїнову кислоту ацетил-КоА карбоксилази, що надає стійкості до інгібування гербіцидом квізалофоп-р-етилу в дозах вказаного гербіциду, в яких він звичайно інгібує ріст рослини пшениці, де вказана нуклеїнова кислота, яка надає стійкості до інгібування вказаним гербіцидом, включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує білок ацетил-КоА карбоксилази, причому вказаний білок включає амінокислотне заміщення Ala2004Val, коли як порівняння наводиться послідовність ацетил-КоА карбоксилази *Alopecurus myosuroides*. Винахід також стосується способу підвищення продуктивності рослини пшениці, що має стійкість до гербіциду квізалофоп-р-етилу; способу отримання рослини пшениці, стійкої до гербіциду квізалофоп-р-етилу; способу ідентифікації рослини пшениці, яка є стійкою до гербіциду квізалофоп-р-етилу; рослини з модифікованою АКК полінуклеотидною послідовністю; виділеного полінуклеотиду; конструкту нуклеїнової кислоти, який включає в себе виділений полінуклеотид; експресійної касети, що включає ДНК-конструкт; клітину-хазяїна, що містить стабільно введений в її геном щонайменше один ДНК-конструкт; трансгенної рослини,

UA 123491 C2

що містить стабільно введений в її геном ДНК-конструкт та виділеного поліпептиду з АКК активністю.

Опис

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка вимагає пріоритет за Попередньою Заявкою на Патент США № 61/438294, заявленою 1 лютого 2011 року, і Попередньою Заявкою на Патент США № 61/553830, заявленою 31 жовтня 2011 року, кожна з яких у всій повноті включена в даний опис як посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується композицій і способів отримання рослин сільськогосподарських культур, стійких до гербіцидів. Зокрема, даний винахід надає рослини пшениці, а також рослинні тканини і насіння пшениці, яке містить модифіковані гени і білки ацетил-КоА карбоксилази (АКК) і є стійкими до інгібування гербіцидами, які звичайно інгібують активність білка АКК (АКК гербіциди).

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Пшеницю вирощують у всьому світі, і вона є найбільш широко адаптованою зерновою сільськогосподарською культурою. Звичайно рослини пшениці використовуються в різних харчових продуктах, таких як хліб, печиво, торти, крекери і локшина. Як правило, пшеницю твердих сортів подрібнюють в борошно, що використовується для хлібної продукції, а пшеницю м'яких сортів подрібнюють в борошно, що використовується для випічки і крекерів. Пшеничний крохмаль використовується в харчовій і паперовій промисловості, як крохмаль для прання і в інших продуктах.

Основною небезпекою для комерційного виробництва пшениці є конкуренція бур'янів, яка приводить до зниження урожаю і отримання зерна низької якості. Хоч для знищення бур'янів може використовуватися культивация ґрунту, ґрунт оброблених полів дуже вразливий до вітрової і водної ерозії. Завдяки легкості застосування і ефективності гербіцидна обробка є переважним способом контролю бур'янової рослинності. Гербіциди також дозволяють боротися з бур'яноюю рослинністю в системах землеробства із застосуванням зниженої підготовки ґрунту до посіву або прямого висіву, які розроблені для збереження високих рівнів залишків на поверхні ґрунту для запобігання його ерозії. Найбільш серйозну конкуренцію пшениці серед бур'янової рослинності створюють трав'янисті бур'яни споріднених пшениці видів, такі як вівсюг і колениця, і важко розробити ефективну стратегію хімічного контролю для цих проблемних видів бур'янової рослинності, споріднених сільськогосподарській культурі, оскільки культура також чутлива до гербіциду. Один з підходів до розв'язання цієї проблеми включає розробку сортів, стійких до гербіцидів. У такій системі гербіцид застосовується "по культурі" для боротьби із бур'яноюю рослинністю без збитку для стійких до гербіциду рослин культури.

Вироблення стійкості рослин до гербіцидів надає значні виробничі і економічні переваги; і по суті застосування гербіцидів для боротьби з бур'яноюю рослинністю в культурах стало майже загальноприйнятою практикою. Однак застосування таких гербіцидів може також викликати загибель або зниження росту цільових рослин сільськогосподарських культур, приводячи до того, що час і спосіб застосування гербіцидів стають критичними або, в деяких випадках, нездійсненними.

Особливий інтерес для фермерів представляє застосування гербіцидів з більш високою активністю, широким спектром дії і швидким розкладанням в ґрунті. Рослини, рослинні тканини і насіння з стійкістю до цих сполук забезпечили б привабливе рішення, що дозволяє застосовувати гербіциди для контролю росту бур'янової рослинності без ризику пошкодження сільськогосподарської культури. Одним таким класом гербіцидів широкого спектру дії є сполуки, які інгібують активність ензиму ацетил-КоА-карбоксилази (АКК) в рослині. Такі гербіциди належать до хімічних класів арилоксифеноксипропіонатів (FOP) і циклогександіонів (DIM). Однак пшениця, наприклад, чутлива до багатьох гербіцидів, що інгібують АКК, цільовими видами яких є однодольна (злакова) трав'яниста рослинність, що робить застосування цих гербіцидів для контролю бур'янової рослинності в пшениці практично неможливим.

Внаслідок важливості пшениці як сільськогосподарської культури в світовому масштабі, існує потреба в гібридах пшениці, стійких до гербіцидів, що інгібують АКК, що забезпечить більший урожай при застосуванні цих гербіцидів для контролю злакової бур'янової рослинності.

СУТЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід надає композиції і способи отримання рослин пшениці, стійких до гербіцидів. Зокрема, даний винахід надає рослини, сорти, лінії і гібриди пшениці, а також рослинні тканини і насіння пшениці, які містять гени і білки зміненої ацетил-КоА карбоксилази (АКК), стійкої до інгібування гербіцидами, які звичайно інгібують активність білка АКК.

Пшениця, яка є сільськогосподарською культурою, чутлива до багатьох гербіцидів, що інгібують АКК, цільовими видами яких є однодольні або злакові види бур'янової рослинності.

Однак, як описано в даному винаході, створений генотип пшениці, який виявляється стійкість до гербіцидів, що інгібують АКК. Генетичний аналіз ідентифікував генетичні відмінності в зародковій плазмі мутантної пшениці, які приводять до фенотипу стійкості до АКК гербіцидів.

В одному варіанті здійснення даний винахід надає одну або декілька рослин пшениці, зародкова плазма яких несе мутацію, що приводить до стійкості рослини до АКК гербіцидів. Крім того, в подальших варіантах здійснення даний винахід стосується нащадків (наприклад, F1, F2, F3 і т. д.) гібридів вказаних рослин, де зародкова плазма у вказаних нащадках має таку ж мутацію, як і в батьківській рослині. Отже, варіанти здійснення даного винаходу надають сорти/гібриди пшениці, чия зародкова плазма містить мутацію, яка визначає, що фенотипом рослин є стійкість до АКК гербіцидів. У деяких варіантах здійснення вказані нащадки (наприклад, F1, F2, F3 і т. д.) є результатом схрещування між елітними лініями пшениці, в яких щонайменше одна лінія містить в зародковій плазмі мутацію, що приводить до стійкості до АКК гербіцидів.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід надає рослину пшениці, де зародкова плазма вказаної рослини пшениці надає стійкості до інгібування одним або декількома гербіцидами, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, в дозах, при яких вказані один або декілька гербіцидів звичайно інгібують ріст рослини пшениці. У деяких варіантах здійснення винаходу вказаний один або декілька гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, є представниками хімічних класів арилоксифеноксипропіонатів (FOP) і циклогександіонів (DIM). У деяких варіантах здійснення винаходу зародкова плазма вказаної рослини пшениці, яка надає стійкості до інгібування одним або декількома гербіцидами, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, включає в себе одну або декілька мутацій в гені ацетил-КоА карбоксилази, як виявлено в AF28-A, AF26-B або AF10-D, (ATCC №№ \_\_\_\_\_).

В іншому варіанті здійснення даний винахід надає спосіб контролю бур'янової рослинності поблизу рослини пшениці або сукупності рослин пшениці, який включає надавання одного або декількох гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу; нанесення вказаних одного або декількох гербіцидів, що діють на ацетил-КоА карбоксилазу, на поле з рослиною пшениці або сукупністю рослин пшениці таким чином, що застосування вказаних одного або декількох гербіцидів не чинить несприятливої дії на ріст бур'янової рослинності, а на ріст вказаної рослини пшениці або сукупності рослин пшениці несприятливої дії не чинить. У деяких варіантах здійснення винаходу вказані один або декілька гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, є представниками хімічних класів арилоксифеноксипропіонатів (FOP) і циклогександіонів (DIM). У деяких варіантах здійснення винаходу вказана рослина пшениці або сукупність рослин пшениці включає одну або декілька мутацій в гені ацетил-КоА карбоксилази, як виявлено в AF28-A, AF26-B і/або AF10-D, (ATCC №№ \_\_\_\_\_).

У ще одному варіанті здійснення даний винахід надає гібрид, лінію або сорт пшениці, де вказаний гібрид, лінія або сорт пшениці містять зародкову плазму, що включає в себе одну або декілька мутацій в гені ацетил-КоА карбоксилази, так що вказаним гібриду, лінії або сорту надається стійкість до одного або декількох гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу. У деяких варіантах здійснення винаходу вказані гібрид, лінія або сорт створені за допомогою інтрогресії зародкової плазми пшениці, яка включає вказані одну або декілька мутацій для надавання стійкості до одного або декількох гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу. У деяких варіантах здійснення винаходу вказані гібрид, лінія або сорт пшениці створені за допомогою введення гетерологічного гену, що включає в себе одну або декілька мутацій для надавання стійкості до одного або декількох гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід надає спосіб отримання гібриду, лінії або сортів пшениці, стійкого до одного або декількох гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, що включає ідентифікування зародкової плазми, що надає вказану стійкість до гербіциду, де вказана стійка до гербіциду зародкова плазма отримана з стійкої до гербіциду рослини пшениці, і введення вказаної зародкової плазми в елітний гібрид, елітну лінію або елітний сорт рослини пшениці. У деяких варіантах здійснення винаходу вказане введення вказаної зародкової плазми у вказаний елітний гібрид, рослинну лінію або елітний сорт рослини пшениці проводиться шляхом інтрогресії. У деяких варіантах здійснення винаходу вказане введення вказаної зародкової плазми у вказані елітний гібрид рослини пшениці, елітну лінію або елітний сорт пшениці проводиться шляхом введення гетерологічного гену.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід надає гібрид, лінію або сорт пшениці, де зародкова плазма вказаних гібриду, лінії або сортів має надану стійкість до одного або декількох гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА-карбоксилазу, і стійкість до одного або декількох сполук з однієї або декількох груп гербіцидів, які не є інгібіторами ацетил-КоА-



карбоксилази.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід надає спосіб ідентифікації рослинних ліній пшениці, стійких до гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, який включає отримання зразка нуклеїнової кислоти з рослини пшениці, надавання ампліфікаційних  
5 праймерів для ампліфікації ділянки геному рослини пшениці, що відповідає гену ацетил-КоА карбоксилази, присутньому у вказаному зразку нуклеїнової кислоти, застосування вказаних ампліфікаційних праймерів до вказаного зразка нуклеїнової кислоти таким чином, що відбувається ампліфікація вказаної ділянки вказаного гену ацетил-КоА карбоксилази, і ідентифікацію рослин пшениці, стійких до гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА  
10 карбоксилазу, на основі наявності у вказаному зразку нуклеїнової кислоти однієї або декількох мутацій, які надають стійкість до гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід надає насіння пшениці, де вказана зародкова плазма вказаного насіння включає мутантний ген ацетил-КоА карбоксилази так, що вказана мутація надає стійкості до інгібування гербіцидами, що впливають на ацетил-КоА  
15 карбоксилазу. У деяких варіантах здійснення винаходу зародкова плазма вказаного насіння пшениці включає мутантний ген ацетил-КоА карбоксилази, як виявлена в AF28-A, AF26-B і/або AF10-D, (ATCC №№ \_\_\_\_\_). У деяких варіантах здійснення даний винахід надає рослини пшениці, вирощені з вказаного насіння і інших частин вказаних рослин пшениці, вирощеного з вказаного насіння. У деяких варіантах здійснення винаходу мутантний ген ацетил-КоА карбоксилази є функціональним фрагментом гену, як виявлений в AF28-A, AF26-B і/або AF10-D, (ATCC №№ \_\_\_\_\_), так що фрагмент гену кодує фрагмент білка, який є достатнім, щоб надати рослинам пшениці стійкість до інгібування гербіцидами, що впливає на ацетил-КоА карбоксилазу. У деяких варіантах здійснення даний винахід надає рослини пшениці, вирощені з вказаного насіння і інших частин вказаних рослин пшениці, вирощених з вказаного насіння.

У деяких варіантах здійснення даний винахід надає очищені і виділені з пшениці послідовності нуклеїнових кислот, які кодують ацетил-КоА-карбоксилазу. Згідно з винаходом, послідовності дикого типу, що кодують ацетил-КоА-карбоксилазу, були ідентифіковані з B, D і A геномів (SEQ ID NOS: 1, 2 і 3, відповідно). Далі, були ідентифіковані мутації кожного геному, які забезпечують стійкість до гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА-карбоксилазу, SEQ ID NOS:  
30 4, 5 і 6, відповідно. Мутація представляє перехід від Ala до Val в амінокислотному положенні 2004 (на який вказують стандартні посилання китника мишачохвостикового gij199600899|emb|AM408429.1| і gij199600901|emb|AM408430.1 послідовності ID NOS: 13, 14 15 і 16, див. також фігуру 9) для кожного геному, А геному (SEQ ID NO: 8); В геному (SEQ ID NO: 10), D геному (SEQ ID NO: 12). Винахід також включає амінокислоти, кодовані даними послідовностями, включаючи SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 або 12, консервативно модифіковані  
35 варіанти і фрагменти, які зберігають АКК активність, а також мутанти, які забезпечують стійкість до гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА-карбоксилазу.

Таким чином, композиції згідно з даним винаходом включають ізольований поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка включає (а) амінокислотну  
40 послідовність, в тому числі SEQ ID NO: 7, 9 або 11 і SEQ ID NOS 8, 10 або 12, і (b) амінокислотну послідовність, ідентичну щонайменше на 90 %, 95 % або 99 % послідовності SEQ ID NO: 7, 9, 11 або SEQ ID NOS: 8, 10 або 12, де вказаний поліпептид має АКК активність або надає стійкості до гербіциду, що впливає на ацетил-КоА-карбоксилазу.

Винахід також включає рослину пшениці, яка містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 70 % гомологічна, щонайменше на 80 % гомологічна, щонайменше на 85 % гомологічна, щонайменше на 90 % гомологічна, щонайменше на 95 % гомологічна, щонайменше на 97 % гомологічна або щонайменше на 99 % гомологічна послідовності ацетил-КоА-карбоксилази SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, або 6 або як виявлено в AF28-A, AF26 B і/або AF10-D (ATCC №№ \_\_\_\_\_). У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність ацетил-КоА-карбоксилази кодує або включає в себе одне або декілька амінокислотних заміщень, наприклад Ala2004Val, як виявлено в SEQ ID NO: 8, \_\_\_\_\_, як виявлено в SEQ ID NO: 10, або \_\_\_\_\_, як виявлено в SEQ ID NO: 12.

В одному варіанті здійснення даний винахід додатково надає гібридні рослини пшениці, які мають всі фізіологічні і морфологічні характеристики вказаної рослини пшениці, вирощеної з вказаного насіння пшениці. У додаткових варіантах здійснення даний винахід надає культури  
55 тканин і регенеровані культури тканин, які походять з вказаного насіння пшениці або вказаної частини рослини пшениці, які включають мутацію у вказаному гені ацетил-КоА-карбоксилази, як виявлено в AF28-A, AF26 B і/або AF10-D (ATCC Nos. \_\_\_\_\_).

У ще одному варіанті здійснення даний винахід надає спосіб отримання насіння пшениці, що  
60 включає в себе схрещування рослини, що містить мутантну форму гену ацетил-КоА

карбоксилази, яка виявлена в AF28-A, AF26 B і/або AF10-D (ATCC Nos. \_\_\_\_\_), з самими собою або з другою рослиною пшениці і збирання вказаного насіння, отриманого внаслідок вказаного схрещування. У деяких варіантах здійснення винаходу способи отримання вказаного насіння пшениці включають в себе посадку насіння батьківської насінневої лінії пшениці, де вказана батьківська насіннева лінія містить зародкову плазму, яка надає стійкості до гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, з батьківською лінією запилювача пшениці, де вказана зародкова плазма вказаних запилювача і/або насінневої лінії містить зародкову плазму, що надає стійкості до гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, спільне вирощування вказаних батьківського насіння і запилювальних рослин пшениці, що дозволяє вказаним батьківським насіннєвим рослинам запилюватися вказаними батьківськими рослинами-запилювачами, і збирання насіння, що є результатом вказаного запилення.

У ще одному варіанті здійснення винахід забезпечує для генетично модифікованих рослин пшениці введення гетерологічного нуклеотидного конструкта, що включає в себе SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 або 6, функціонально зв'язані з регуляторними послідовностями, такими як експресійні касети, конструкти інгібування, рослини, рослинні клітини і насіння. Генетично модифіковані рослини, рослинні клітини і насіння згідно з даним винаходом можуть виявляти зміни фенотипу, такі як модульована АКК або рівні вмісту мутантної АКК.

Надані способи зниження або усунення активності АКК поліпептиду в рослині, що включають введення в рослину вибраного полінуклеотиду. У специфічних способах наданий полінуклеотид знижує рівень вмісту АКК в рослині.

Надані також способи підвищення рівня мутантного АКК поліпептиду в рослині конститутивно або в специфічно регульовані проміжки часу і тканини, що включають введення в рослину вибраного полінуклеотиду з прийнятними регуляторними елементами. У специфічних способах експресія мутантного АКК полінуклеотиду поліпшує стійкість рослини до АКК гербіцидів.

#### ОПИС ФІГУР

Фігура 1 являє собою фотографію першої виявленої рослини, стійкої до дії гербіциду. Дана рослина вижила після двох застосувань гербіциду клітодиму в летальних дозах.

Фігура 2 являє собою фотографію М3 рослин, вирощених з двох М2 батьків. Рослини були двічі послідовно оброблені хізалофопом в летальних дозах. Рослини зліва вижили після двох застосувань гербіциду. Рослини праворуч загинули після одного застосування.

Фігура 3 являє собою фотографію дослідження залежності "доза-ефект", що показує підвищену стійкість відібраних мутантних рослин до гербіциду хізалофопу в М3 поколінні в порівнянні з немутагенними рослинами озимої пшениці сорту Hatcher. У 1, 3 і 4 колонках представлені рослини, відібрані для отримання підвищеної стійкості до гербіцидів; в колонці 2 представлена немутагенізована озима пшениця сорту Hatcher.

На фігурі 4 представлені послідовності АКК генів з А, В і D геномів і мутантного АКК гену AF28-A, мутантного АКК гену AF26-B і мутантного АКК гену AF26-D.

Фігура 5 являє собою графік, що описує візуальні пошкодження М3 мутантів, отриманих від М2 і відібраних з використанням хізалофопу. Значення нижче горизонтальної лінії відрізняються від значення, отриманого для немутагенної контрольної рослини сорту Хетчера і представленого лівим прямокутником.

Фігура 6 являє собою графік, що описує результати випробувань мутагенних рослин для визначення залежності "доза-ефект" з використанням хізалофопу в порівнянні зі значеннями для немутагенного контролю сорту Хетчера, представленого лівим прямокутником, з М2-відібраним М3 рослинами.

Фігура 7 являє собою графік, що показує порівняння АКК послідовностей дикого типу і мутантних АКК послідовностей в геномах пшениці А, В і D, що включають знову відкритий несинонімічний однонуклеотидний поліморфізм (single nucleotide polymorphism-SNP) в кожній мутантній послідовності.

Фігура 8 являє собою графік порівняння стійкості ензиму АКК до зростаючих концентрацій хізалофопу.

Фігура 9 показує вирівнювання послідовностей згідно з винаходом відносно довідкової послідовності китника мишачохвостикового і між собою.

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Для забезпечення чіткого і послідовного розуміння опису і формули винаходу, включаючи розділ, відведений для таких термінів, надані наступні визначення. Одиниці, префікси і символи можуть бути позначені відповідно до їх SI прийнятої форми. Якщо не вказане інше, нуклеїнові кислоти, записані зліва направо в напрямі від 5' до 3'; амінокислотні послідовності записані зліва направо в напрямі від аміногрупи до карбоксильної групи, відповідно. Інтервали числових

значень включають значення, що визначають діапазон, і включають кожне ціле число в межах певного інтервалу значень. Амінокислоти можуть позначатися в описі або трьома відомими буквеними символами або однією буквою, як рекомендовано Комісією з біохімічної номенклатури IUPAC-IUB. Нуклеотиди, аналогічно, можуть позначатися їх загальноприйнятими

5

однобуквеними кодами. Якщо інше не передбачене, терміни програмних забезпечень, а також електротехніки і електроніки, що використовуються в даному описі, являють собою терміни, визначені в The New IEEE Standard Dictionary of Electrical and Electronics Terms (5th edition, 1993). Терміни, визначені нижче, більш детально визначені посиланням на специфікацію загалом.

Термін "консервативно модифіковані варіанти" стосується послідовностей амінокислот і нуклеїнових кислот. Що стосується конкретних послідовностей нуклеїнових кислот, термін "консервативно модифіковані варіанти" стосується тих нуклеїнових кислот, які кодують ідентичні або стабільно модифіковані варіанти амінокислотних послідовностей. Внаслідок виродженості генетичного коду велика кількість функціонально ідентичних нуклеїнових кислот кодує будь-який білок. Наприклад, кодони GCA, GCC, GCG і GCU кодують амінокислоту аланін. Таким чином, на кожній позиції, де аланін визначений кодоном, цей кодон може бути замінений будь-яким з відповідних описаних кодонів без зміни кодованого поліпептиду. Такі варіації нуклеїнових кислот є "мовчазними (безсимптомними) варіаціями" і являють собою один з видів консервативно модифікованих варіацій. У даному описі кожна послідовність нуклеїнових кислот, яка кодує поліпептид, також за допомогою посилання на генетичний код описує кожну можливу мовчазну варіацію нуклеїнової кислоти. Фахівцеві буде зрозуміло, що кожний кодон в нуклеїновій кислоті (за винятком AUG, який звичайно являє собою тільки кодон метіоніну, і UGG, який звичайно являє собою тільки кодон триптофану) може бути модифікований для отримання функціонально ідентичної молекули. Відповідно, кожна мовчазна варіація нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид згідно з даним винаходом, є прихованою в кожній описаній поліпептидній послідовності і охоплюється областю даного винаходу.

10

15

20

25

Що стосується амінокислотних послідовностей, фахівцеві даної галузі техніки буде зрозуміло, що окремі заміщення, делеції або додавання в послідовність нуклеїнової кислоти, пептиду, поліпептиду або білка, яка змінює, додає або видаляє єдину амінокислоту або невеликий процент амінокислот в кодованій послідовності, являє собою "консервативно модифіковані варіанти", де альтерація приводить до заміщення амінокислоти хімічно подібною амінокислотою. Таким чином, може бути змінене будь-яке число амінокислотних залишків, вибране з групи, яка включає цілі числа від 1 до 15. Відповідно, може бути виконано, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 7 або 10 альтерацій. Консервативно модифіковані варіанти звичайно забезпечують аналогічну біологічну активність, як і немодифікована поліпептидна послідовність, з якої вони отримані. Таблиці консервативних заміщень, що забезпечують отримання функціонально подібних амінокислот, добре відомі в даній галузі техніки.

30

35

Нижче представлені шість груп, кожна з яких містить амінокислоти, які являють собою консервативні заміщення один одного:

40

- 1) аланін (A), серин (S), треонін (T);
- 2) аспарагінова кислота (D), глютамінова кислота (E);
- 3) аспарагін (N), глютамін (Q);
- 4) аргінін (R), лізин (K);
- 5) ізолейцин (I), лейцин (L), метіонін (M), валін (V);
- 6) фенілаланін (F), тирозин (Y), триптофан (W).

45

Див. також Creighton (1984) Proteins W.H. Freeman and Company. Посилання на будь-яку послідовність в даному описі повинне інтерпретуватися як послідовність, що включає консервативно модифіковані варіанти.

50

Термін "кодуюча" або "кодована" по відношенню до вказаної нуклеїнової кислоти означає включення інформації для трансляції у вказаний білок. Нуклеїнова кислота, що кодує білок, може включати послідовності (наприклад, інтрони), що не транскрибуються, всередині областей нуклеїнової кислоти, що транскрибуються, або може не містити таких проміжних послідовностей, що не транскрибуються (наприклад, як в кДНК). Інформація, за допомогою якої кодується білок, визначається за допомогою використання кодонів. Звичайно амінокислотна послідовність кодується нуклеїновою кислотою з використанням "універсального" генетичного коду. Однак варіанти "універсального коду", такі як присутні в деяких мітохондріях рослин, тварин і грибів, бактеріях *Mycoplasma capricolum* або війчастих *Mycoplasma*, можуть використовуватися при експресуванні нуклеїнової кислоти.

55

Коли нуклеїнова кислота отримана або змінена синтетично, можна отримати перевагу відомих кодонових переваг передбачуваного хазяїна, куди повинна експресуватися нуклеїнова

60

кислота. Наприклад, незважаючи на те, що послідовності нуклеїнових кислот згідно з даним винаходом можуть експресуватися як в однодольні, так і в дводольні рослини, послідовності можуть модифікуватися для обліку специфічних переваг кодону і переваг вмісту GC однодольних або дводольних, оскільки, як було показано, ці переваги відрізняються (Murray and al. *Acids Res.* 17:477-498 (1989)).

Термін "гетерологічна", що використовується в даному описі відносно нуклеїнової кислоти, означає нуклеїнову кислоту, яка походить з чужорідних видів або, якщо з таких же видів, істотно модифікована відносно своєї природної форми в композиції і/або геномному локусі навмисним втручанням людини. Наприклад, промотор, функціонально зв'язаний з гетерологічним структурним геном, походить з видів, що відрізняються від тих, з яких був отриманий вказаний структурний ген, або, якщо походить з того ж виду, один з них або обидва істотно модифіковані відносно вихідної форми. Гетерологічний білок може походити з чужорідних видів або, якщо походить з того ж виду, істотно модифікований відносно вихідної форми за допомогою навмисного втручання людини.

Термін "клітина-хазяїн" означає клітину, яка містить вектор і підтримує реплікацію і/або експресію вектора. Клітини-хазяїни можуть являти собою прокаріотичні клітини, такі як *E. coli*, або еукаріотичні клітини, такі як клітини дріжджів, комах, амфібій або ссавців. Переважно, клітини-хазяїни являють собою клітини однодольних або дводольних рослин. Особливо переважної клітиною-хазяїном однодольної рослини є клітина-хазяїн кукурудзи.

Термін "введена" в контексті вставки нуклеїнової кислоти в клітину означає "трансфекцію", "трансформацію" або "трансдукцію" і стосується впровадження нуклеїнової кислоти в еукаріотичні або прокаріотичні клітини, де нуклеїнова кислота може бути впроваджена в геном клітини (наприклад, хромосому, плазмиду, пластиду або мітохондріальну ДНК), перетворена в автономний реплікон або тимчасово експресована (наприклад, трансфікована мРНК).

Термін "виділений (ізолюваний)" стосується матеріалу, такого як нуклеїнова кислота або білок, який: (1) головним чином або по суті вільний від компонентів, які звичайно супроводжують його або взаємодіють з ним і виявлені в його природному навколишньому середовищі. Виділений матеріал необов'язково містить матеріал, не виявлений з ним в його природному навколишньому середовищі; або (2) якщо матеріал знаходиться в своєму природному навколишньому середовищі і був синтетично (не природним чином) змінений навмисним втручанням людини в композицію і/або вміщений в місцеположення в клітині (наприклад, геном або субклітинну органелу), яке не є рідним для матеріалу, знайденого в цьому середовищі. Альтерація для отримання синтетичного матеріалу може проводитися з матеріалом в його природному стані або після видалення з його природного стану. Наприклад, існуюча в природі нуклеїнова кислота стає виділеною нуклеїновою кислотою, якщо вона змінена або транскрибована з ДНК, яка була змінена за допомогою втручання людини, виконаного всередині клітини, з якої вона походить (див., наприклад, *Compounds and Methods for Site Directed Mutagenesis in Eukaryotic Cells*, Kmiec, Патент США № 5565350; *In Vivo Homologous Sequence Targeting in Eukaryotic Cells*; Zarling et al. PCT/US93/03868). Аналогічно, нуклеїнова кислота, що існує в природі (наприклад, промотор), стає виділеною, якщо вона введена за допомогою засобів, що не існують в природі, в локус геному, який не є рідним для даної нуклеїнової кислоти. Нуклеїнові кислоти, які є "виділеними", як визначено в описі, також називаються "гетерологічними" нуклеїновими кислотами.

Термін "нуклеїнова кислота", що використовується в даному описі, стосується дезоксирибонуклеотидного або рибонуклеотидного полімеру в одноланцюжковій або дволанцюжковій формі і, якщо не вказане інше, включає відомі аналоги, що мають, по суті, природу нуклеотидів в тому, що вони гібридизуються до одноланцюжкових нуклеїнових кислот способом, аналогічним способу гібридизації природних нуклеотидів (наприклад, пептидних нуклеїнових кислот).

Термін "бібліотека нуклеїнових кислот" означає колекцію молекул виділених ДНК або кДНК, які включають і по суті представляють повну транскрибовану фракцію геному вказаного організму. Способи конструювання типових бібліотек нуклеїнових кислот, таких як геномні бібліотеки і бібліотеки кДНК, описані в стандартних посиланнях по молекулярній біології, таких *Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd ed., Vol. 1-3 (1989); Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al, Eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (1994).*

Термін "функціонально (оперативно, операбельно) зв'язаний", коли використовується в даному описі, стосується функціонального зв'язку між промотором і другою послідовністю, де

послідовність промотора ініціює і опосередковує транскрипцію послідовності ДНК, що відповідає другій послідовності. Звичайно термін "функціонально зв'язаний" означає, що послідовності зв'язаних нуклеїнових кислот є суміжними і, коли необхідно з'єднати дві області, що кодують білок, суміжними і в одній рамці читування.

5 Якщо не вказане інше, термін "АКК нуклеїнова кислота" означає нуклеїнову кислоту, що містить полінуклеотид ("АКК полінуклеотид"), що кодує АКК поліпептид з АКК активністю, і включає в себе всі консервативно модифіковані варіанти, гомологи, паралоги і т. п. Термін "АКК генів" означає ген згідно з даним винаходом і стосується гетерологічної геномної форми АКК полінуклеотиду повної довжини.

10 Термін "рослина", коли використовується в даному описі, може стосуватися цілих рослин, частин або органів рослин (наприклад, листя, стебел, коріння і т. д.), рослинних клітин, насіння рослин і їх потомства. Термін "рослинна клітина", коли використовується в даному описі, додатково включає, але без обмеження, клітини, отримані з насіння, суспензійних культур, ембріонів, меристематичних областей, калусної тканини, листя, коріння, пагонів, гаметофітів, спорофітів, пилки і мікроспор або виявлені у вказаних тканинах. Потрібно також розуміти, що  
15 термін "рослинні клітини" включає модифіковані клітини, такі як протопласти, отримані з вищезазначених тканин. Клас рослин, які можуть бути використані в способах згідно з винаходом, як правило, є такими ж широкими, як і клас вищих рослин, що піддаються методикам трансформації, включаючи як однодольні, так і дводольні рослини. Особливо переважні рослини включають кукурудзу, сою, соняшник, сорго, канолу, пшеницю, люцерну, бавовник, рис, ячмінь і просо.

Термін "полінуклеотид", коли використовується в даному описі, стосується полідезоксирибонуклеотиду, полірибонуклеотиду або їх аналогів, які мають по суті природу натурального рибонуклеотиду, в який вони гібридизуються в жорстких умовах гібридизації до по  
25 суті такої ж нуклеотидної послідовності, як і природні нуклеотиди, і/або дають можливість здійснювати трансляцію в ту ж амінокислоту(и), що і нуклеотид(и), що існує(ють) в природі. Полінуклеотид може являти собою послідовність повної довжини або послідовність природного або гетерологічного структурного або регуляторного гену. Якщо не вказане інше, термін стосується специфічної послідовності, а також її комплементарної послідовності. Таким чином,  
30 в даному описі мається на увазі, що термін "полінуклеотиди" включає ДНК або РНК з кістками макромолекул, модифікованими для стабільності або по інших причинах. Крім того, термін "полінуклеотиди", коли використовується в даному описі, включає ДНК або РНК, що містять незвичайні основи, такі як, наприклад, інозин, або модифіковані основи, такі як, наприклад, тритильовані основи, названі в даному описі тільки як два приклади, є полінуклеотидами, коли  
35 даний термін використовується в описі. Потрібно розуміти, що велика кількість різноманітних модифікацій зроблена в ДНК і РНК, які служать безлічі корисних цілей, відомих фахівцям в даній галузі техніки. Термін "полінуклеотид", коли використовується в даному описі, включає такі хімічно, ферментативно або метаболічно модифіковані форми полінуклеотидів, а також хімічні форми характеристичних ДНК і РНК вірусів і клітин, в тому числі, серед інших, простих і  
40 складних клітин.

Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовуються в даному описі взаємозамінно для позначення полімеру з амінокислотних залишків. Терміни стосуються амінокислотних полімерів, в яких один або декілька амінокислотних залишків являє собою штучний хімічний аналог  
45 відповідної існуючої в природі амінокислоти, а також існуючим в природі амінокислотним полімерам. Основна природа таких аналогів природних амінокислот така, що білок, в який вони вводяться, стає специфічно реакційноздатним по відношенню до антитіл, виявлених до такого ж білка, але що походить виключно з існуючих в природі амінокислот. Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" також охоплюють модифікації, включаючи, але без обмеження, глікозилювання, приєднання ліпиду, сульфатування, гамма-карбоксилювання залишків  
50 глютамінової кислоти, гідроксилювання і АДФ-рибозилювання. Потрібно розуміти, як добре відомо і як вказано вище, що поліпептиди не є повністю лінійними. Наприклад, поліпептиди можуть бути розгалуженими в результаті убіквітинування, і вони можуть бути кільцевими з розгалуженнями або без, які звичайно є результатом посттрансляційних подій, включаючи подію природної переробки і події, викликані маніпуляцією, що проводиться людиною, яка не  
55 зустрічається в природі. Циклічні, розгалужені і розгалужені циклічні поліпептиди можуть бути синтезовані за допомогою нетрансляційного природного процесу, а також повністю синтетичними способами. Крім того, даний винахід передбачає застосування метіонін-вмісних і тих, що не містять метіоніну, амінокінцевих варіантів білка згідно з даним винаходом.

Термін "промотор", коли використовується в даному описі, стосується області ДНК, яка  
60 розташована вище за початок транскрипції і бере участь в розпізнаванні і зв'язуванні РНК-

полімерази і інших білків для ініціації транскрипції. Термін "рослинний промотор" означає промотор, здатний ініціювати транскрипцію в рослинних клітинах, незалежно від того чи є рослинна клітина джерелом його походження чи ні. Приклади рослинних промоторів включають, але без обмеження, промотори, отримані з рослин, рослинних вірусів і бактерій, які містять гени, експресовані в клітинах рослин, таких як *Agrobacterium* і *Rhizobium*. Приклади промоторів під контролем розвитку (under development control) включають промотори, які переважно ініціюють транскрипцію в певних тканинах, таких як листя, коріння або насіння. Такі промотори називають "тканино переважними". Промотори, які ініціюють транскрипцію тільки в певній тканині, називають "тканино специфічними". Промотор специфічного "типу клітин" насамперед стимулює експресію в клітинах певного типу, в одному або декількох органах, наприклад судинних клітинах в корінні або листі. "Індуцибельний" промотор або "промотор, що репресується" являє собою промотор, який знаходиться під контролем навколишнього середовища. Приклади умов навколишнього середовища, які можуть впливати на транскрипцію за рахунок індукцибельних промоторів включають анаеробні умови або присутність світла. Тканиноспецифічні промотори, тканепереважні промотори, промотори специфічних типів клітин і індукцибельні промотори складають клас "не конститутивних" промоторів. "Конститутивний" промотор являє собою промотор, який є активним в будь-яких умовах навколишнього середовища.

Термін "рекомбінантний" або "генетично модифікований", що використовується в даному описі, стосується клітини або вектора, які були змінені шляхом введення гетерологічної нуклеїнової кислоти, або клітини, отриманої з модифікованої таким чином клітини. Отже, рекомбінантні або генетично модифіковані клітини, наприклад, експресують гени, які не виявлені в ідентичній формі всередині природної (нерекомбінантної) форми клітини, або експресують природні гени, які інакше неправильно експресовані, недостатньо експресовані (under-expressed) або взагалі не експресовані внаслідок навмисного втручання людини. Термін "рекомбінантний" або "генетично модифікований", коли використовується в даному описі, не охоплює альтерацію клітини або вектора внаслідок природних подій (таких як, наприклад, природна мутація, природна трансформація/трансдукція/транспозиція), тобто подій, які відбуваються без навмисного втручання людини.

Термін "експресійна касета", коли використовується в даному описі, означає конструкт нуклеїнової кислоти, генерований рекомбінантно або синтетично, з серією специфічних елементів нуклеїнових кислот, які забезпечують транскрипцію конкретної нуклеїнової кислоти в клітину-хазяїна. Рекомбінантна експресійна касета може бути включена в плазмідну, хромосому, мітохондріальну ДНК, пластидну ДНК, вірус або фрагмент нуклеїнової кислоти. Звичайно частина рекомбінантної експресійної касети вектора експресії включає, крім інших послідовностей, нуклеїнову кислоту, що підлягає транскрибуванню, і промотор.

Терміни "залишок", "амінокислотний залишок" або "амінокислота" використовуються в даному описі взаємозамінно і стосуються амінокислоти, яка включена в білок, поліпептид або пептид (загальне визначення: "білок"). Амінокислота може являти собою існуючу в природі амінокислоту і, якщо не обмежено іншим чином, може охоплювати неприродні аналоги природних амінокислот, які можуть функціонувати таким же чином, як і природні амінокислоти.

Термін "селективно гібридується" означає гібридизацію в жорстких умовах послідовності нуклеїнової кислоти з вказаною цільовою амінокислотою послідовністю в більшій мірі, яку можна визначити (наприклад, щонайменше в 2 рази в порівнянні з фоновою гібридизацією), ніж її гібридизація з нецільовими амінокислотними послідовностями, і по суті до виключення нецільових нуклеїнових кислот. Послідовності, що селективно гібридизуються, звичайно мають щонайменше приблизно 80 % ідентичність, переважно 90 % ідентичність і найбільш переважно 100 % ідентичність послідовності (тобто комплементарні) по відношенню одна до одної.

Термін "жорсткі (суворі) умови" або "жорсткі умови гібридизації" стосується умов, при яких зонд буде гібридуватися зі своєю цільовою послідовністю в більшому ступені, що визначається, ніж з іншими послідовностями (наприклад, щонайменше в два рази більшого ступеня в порівнянні з фоновою гібридизацією). Жорсткі умови залежать від нуклеотидної послідовності і різні в різних умовах. За допомогою контролю жорсткості умов гібридизації і/або промивання можуть бути ідентифіковані цільові послідовності, які на 100 % комплементарні зонду (гомологічне зондування). Альтернативно, жорсткість умов можна регулювати таким чином, щоб допустити деяке неспівпадіння послідовностей для виявлення більш низьких ступенів схожості (гетерологічне зондування). Звичайно зонд складає менш ніж приблизно 1000 нуклеотидів в довжину, необов'язково менше за 500 нуклеотидів в довжину.

Звичайно жорсткими умовами будуть умови, при яких концентрація солі становить менше приблизно 1,5 М іонів натрію, як правило, концентрація іонів натрію (або інших солей) складає

приблизно від 0,01 до 1,0 M при значенні pH від 7,0 до 8,3 і температурі щонайменше приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, що містять від 10 до приблизно 50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, що містять більше 50 нуклеотидів). Жорсткі умови можуть бути також досягнуті при додаванні дестабілізуючих агентів, таких як формаїд. Типові приклади умов низької жорсткості включають гібридизацію з буферним розчином, що містить від 30 до 35 % формаїду, 1M NaCl, 1 % SDS (додецилсульфат натрію) при 37 °C з промиванням розчином від 1X до 2X SSC (20×SSC=3,0 M NaCl/0,3 M тринатрійцитрат) при температурі від 50 до 55 °C. Ілюстративні приклади умов помірної жорсткості включають гібридизацію в розчині, що містить 40 до 45 % формаїду, 1M NaCl, 1 % SDS, при 37 °C і промивання розчином від 0,5 X до 1X SSC при температурі від 55 до 50 °C. Типові приклади умов високої жорсткості включають гібридизацію в розчині, що містить 50 % формаїду, 1M NaCl, 1 % SDS при 37 °C і промивання розчином 0,1 X SSC при температурі від 60 до 65 °C протягом 20 хвилин.

Специфічність, як правило, є функцією післягібридаційного промивання, причому критичними факторами є іонна сила і температура кінцевого промивального розчину. Для ДНК-ДНК гібридів  $T_m$  може бути апроксимована з рівняння Meinkoth і Wahl, Anal. Biochem, 138:267-284 (1984).  $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ форм.}) - 500/L$ , де M являє собою молярність одновалентних катіонів, %GC представляє процент нуклеотидів гуанозину і цитозину в ДНК, % форм. представляє процент формаїду в розчині для гібридизації, і L являє собою довжину гібриду в парах основ.  $T_m$  являє собою температуру (при визначених іонній силі і pH), при якій 50 % комплементарно цільової послідовності гібридується із зондом, що ідеально підходить.  $T_m$  знижується приблизно на 1 °C на кожний 1 % невідповідності; таким чином,  $T_m$  гібридизації і/або промивання може регулюватися для гібридизації з послідовностями потрібної ідентичності. Наприклад, якщо метою є послідовності 90 % ідентичності,  $T_m$  може бути знижена на 10 °C. Як правило, жорсткі умови вибираються таким чином, щоб бути приблизно на 5 °C нижче за температуру плавлення ( $T_m$ ) конкретної послідовності і її комплементу при певній іонній силі і певному значенні pH. Проте, суворо жорсткі умови можуть використовуватися для гібридизації і/або промивання при температурі на 1, 2, 3, 4, 5 або 6 °C нижче за температуру плавлення ( $T_m$ ); помірно суворі умови можуть використовуватися для гібридизації і/або промивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижче за температуру плавлення ( $T_m$ ); умови низької жорсткості можуть використовуватися для гібридизації і/або промивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижче за температуру плавлення ( $T_m$ ). Використовуючи рівняння, гібридизацію і композицію промивного розчину, а також потрібну  $T_m$ , фахівцві будуть зрозумілі варіації жорсткості гібридизації і/або розчину для промивання, які по суті описані вище. Якщо бажаний ступінь невідповідності приводить до  $T_m$  нижче за 45 °C (водний розчин) або 32 °C (формаїдний розчин), переважно збільшити концентрацію SSC так, щоб можна було використати більш високі температури. Докладне керівництво по гібридизації нуклеїнових кислот можна знайти в публікації Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acids Probes, Part I, Chapter 2, Ausubel, et al, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995). Звичайно, умовами високої жорсткості промивання є 2 × 15 хв. в 0,5 X SSC, що містить 0,1 % SDS, при 65 °C.

Термін "трансгенна рослина" або "генетично модифікована рослина", коли використовується в даному описі, стосується рослини, яка містить в своєму геномі гетерологічний полінуклеотид. Звичайно гетерологічний полінуклеотид стабільно інтегрований в геном таким чином, що полінуклеотид передається в подальші покоління. Гетерологічний полінуклеотид може бути інтегрований в геном окремо або як частина експресійної касети. Терміни "трансгенна(ий, е)" або "генетично модифікована(ий, е)", що використовуються в даному описі, стосується будь-якої клітини, клітинної лінії, калусу, тканини, частини рослини або рослини, генотип яких був змінений присутністю гетерологічної нуклеїнової кислоти, в тому числі трансгенним, спочатку зміненим таким чином, а також створеним статевим схрещуванням або безстатевим розмноженням з вихідних трансгенних. Термін "трансгенний" або "генетично модифікований", що використовується в даному описі, не включає зміну геному (хромосомну або позахромосомну) звичайними методами селекції рослин або природними подіями, такими як випадкове перехресне запилення, нерекомбінантна вірусна інфекція, нерекомбінантна бактерійна трансформація, нерекомбінантна транспозиція або спонтанна мутація.

Термін "вектор", що використовується в даному описі, означає нуклеїнову кислоту, що використовується в трансфекції клітини-хазяїна, в яку може бути вставлений полінуклеотид. Вектори часто є репліконами. Вектори експресії дозволяють здійснити транскрипцію нуклеїнової кислоти, вставленої в нього.

Для опису взаємозв'язку між послідовностями двох або декількох нуклеїнових кислот або

полінуклеотидів використовуються наступні терміни: (a) "порівняльна (еталонна) послідовність", (b) "вікно порівняння", (c) "ідентичність послідовностей", (d) "процент ідентичності послідовностей" і (e) "істотна ідентичність".

5 Термін "порівняльна (еталонна) послідовність", що використовується в даному описі, означає певну послідовність, що використовується як основа для порівняння послідовностей. Порівняльна послідовність може являти собою частину вказаної послідовності або всю вказану послідовність; наприклад, сегмент повнорозмірної кДНК або генної послідовності або повну кДНК або генну послідовність.

10 Термін "вікно порівняння", що використовується в даному описі, означає сегмент полінуклеотидної послідовності сполучених і точно визначених нуклеотидів, де полінуклеотидну послідовність можна порівняти з еталонною послідовністю і де частина полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може включати додатки або делеції (тобто пропуски) в порівнянні з еталонною послідовністю (яка не містить додатків або делецій) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Звичайно вікно порівняння являє собою щонайменше 20 суміжних нуклеотидів в довжину і необов'язково може являти собою 30, 40, 50, 100 нуклеотидів або більше. Фахівцям в даній галузі зрозуміло, що для уникнення високої схожості з еталонною послідовністю за рахунок включення пропусків в полінуклеотидну послідовність звичайно вводиться штраф (gap penalty) пропусків, який віднімають з кількості збігів.

20 Методи вирівнювання послідовностей для порівняння добре відомі в даній галузі техніки. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може проводитися з використанням алгоритму локальної гомологічності Сміта і Уотермана (див. Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)); за допомогою алгоритму гомологічного вирівнювання Нідлемана і Уансша (див. Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)); методу дослідження схожості Пірсона і Ліпмана (див. Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444 (1988)); за допомогою комп'ютерної реалізації цих алгоритмів, включаючи, але без обмеження: CLUSTAL in the PC/Gene program by Intelligenetics, Mountain View, Calif; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., USA; програма CLUSTAL детально описана: Higgins and Sharp, Gene 73:237-244 (1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989); Corpet, et al., Nucleic Acids Research 16: 10881-90 (1988); Huang, et al. Computer Applications in the Biosciences 8: 155-65 (1992); Pearson, et al. Methods in Molecular Biology 24:307-331 (1994). Група програм BLAST, які можуть застосовуватися для дослідження бази даних по ідентичності, включає наступні програми: BLASTN для дослідження нуклеотидних послідовностей, що вивчаються відносно нуклеотидних послідовностей бази даних; BLASTX для дослідження нуклеотидних послідовностей, що вивчаються відносно білкових послідовностей бази даних; BLASTP для дослідження білкових послідовностей, що вивчаються відносно білкових послідовностей бази даних; TBLASTN для дослідження білкових послідовностей, що вивчаються відносно нуклеотидних послідовностей бази даних; і TBLASTX для дослідження нуклеотидних послідовностей, що вивчаються, відносно нуклеотидних послідовностей бази даних (див., Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19, Ausubel, et al, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)).

45 Якщо не вказане інше, показники ідентичності/схожості послідовностей, наведені в даному описі, стосуються величини, отриманої за допомогою пакету програм BLAST 2.0 з використанням параметрів за умовчанням (див. Altschul et al, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). Програмне забезпечення для проведення BLAST аналізів є загальнодоступним, наприклад, через Національний центр біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology-Information) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Цей алгоритм включає, насамперед, виявлення пар послідовностей з високою оцінкою (HSP) шляхом ідентифікації коротких слів довжини W в послідовності, що досліджується, які співпадають або задовольняють деякі позитивно оцінені порогові значення T при вирівнюванні зі словом тієї ж довжини в послідовності з бази даних. T називають пороговою оцінкою близького "слова" (Altschul et al, supra). Ці вихідні вибірки близького "слова" використовуються як затравка для ініціації пошуку, призначеного для знаходження більш довгих HSP, що включають їх. Потім вибірки "слова" довшать в обох напрямках вздовж кожної послідовності доти, поки може збільшуватися кумулятивний (накопичувальний) бал. Кумулятивні бали для нуклеотидних послідовностей обчислюють з використанням параметрів M (призовий бал за пару залишків, що співпадають; завжди >0) і N (штрафний бал за залишки, що не співпадають; завжди <0). В амінокислотних послідовностях для обчислення кумулятивного балу використовують матрицю балів. Подовження вибірки "слова" в кожному напрямі припиняється в тому випадку, якщо 60 кумулятивний бал при порівняльному аналізі знижується на величину X від свого



максимального досягнутого значення; якщо кумулятивний бал знижується до нуля або нижче внаслідок накопичення одного або декількох негативних балів при порівняльному аналізі залишків; або якщо досягається кінець якої-небудь послідовності. Параметри алгоритму BLAST: W, T і X -визначають чутливість і швидкість порівняльного аналізу. У програмі BLASTN (для нуклеотидних послідовностей) як параметри, що задаються за умовчанням, використовуються довжина "слова" (W), що дорівнює 11, очікування (E), що дорівнює 10, граничне значення 100, M=5, N=-4, при цьому проводиться порівняння обох ланцюжків. Для амінокислотних послідовностей в програмі BLASTP використовуються як параметри, що задаються за умовчанням, довжина "слова" (W), що дорівнює 3, очікування (E), що дорівнює 10, і матриця балів BLOSUM62 (див. Henikoff і Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Крім обчислення процента ідентичності послідовностей алгоритм BLAST також проводить статистичних аналіз подібності двох послідовностей (див., наприклад, e.g., Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одним з критеріїв подібності, наданих BLAST алгоритмом, є найменша сумарна імовірність (P(N)), яка показує імовірність, з якою збіг між двома нуклеотидними або амінокислотними послідовностями може статися випадково.

BLAST дослідження передбачають, що білки можуть бути змодельовані як випадкові послідовності. Однак безліч реальних білків містить області не випадкових послідовностей, які можуть бути гомополімерними ділянками, повтореннями з коротким періодом або областями, збагаченими однією або декількома амінокислотами. Такі області низької складності можуть вирівнюватися між незв'язаними білками, навіть якщо інші ділянки білка абсолютно не схожі. Ряд програм, що фільтрують низьку складність, можуть використовуватися для зменшення таких вирівнювань низької складності. Наприклад, фільтри низької складності SEG (Wooten and Federhen, Comput. Chem., 17: 149-163 (1993)) і XNU (Claverie and States, Comput. Chem., 17: 191-201 (1993)) можуть використовуватися окремо або в комбінації.

Термін "ідентичність послідовностей" або "ідентичність", коли використовується в даному описі відносно двох нуклеїнових кислот або поліпептидів, стосується залишків двох послідовностей, які є однаковими при вирівнюванні для максимальної відповідності в заданому вікні порівняння. Коли процент ідентичності послідовностей використовується по відношенню до білка, признається, що положення залишків, які не є ідентичними, часто відрізняються консервативними амінокислотними заміщеннями, де амінокислотні залишки заміщені на інші амінокислотні залишки зі схожими хімічними властивостями (наприклад, зарядом або гідрофобністю) і, отже, не змінюють функціональних властивостей молекули. Коли послідовності відрізняються такими консервативними заміщеннями, процент ідентичності послідовності може бути скоректований у бік підвищення для корекції консервативної природи заміщення. Вважається, що послідовності, які відрізняються такими консервативними заміщеннями, мають "схожість послідовностей" або "схожість". Засоби для такого коректування добре відомі фахівцям даної галузі техніки. Звичайно, це включає в себе оцінку консервативного заміщення як часткового, а не повного помилкового спарювання, що підвищує процент ідентичності послідовностей. Таким чином, наприклад, якщо ідентичній амінокислоті дається оцінка 1, а неконсервативному заміщенню дана оцінка, що дорівнює нулю, консервативне заміщення має оцінку між нулем і 1. Бальна оцінка консервативних заміщень обчислюється, наприклад, відповідно до алгоритму Мейєрса і Міллера (Meyers and Miller, Computer Applic. Biol. Sci., 4: 11-17 (1988)), як це реалізовано в програмі PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif, USA).

Термін "процент ідентичності послідовностей", коли використовується в даному описі, означає, що дане значення визначене шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей у вікні порівняння, де частина полінуклеотидної послідовності у вікні порівняння може містити додатки або делеції (тобто пропуски) в порівнянні з еталонною послідовністю (яка не містить додатків або делецій) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Процент розраховується шляхом визначення числа положень, в яких ідентична основа нуклеїнової кислоти або ідентичний залишок амінокислоти зустрічається в обох послідовностях, для отримання числа положень, що співпадають, поділу числа положень, що співпадають, на загальне число положень у вікні порівняння і множення результату на 100 для отримання процента ідентичності послідовностей.

Терміни "сорт" і "культivar", коли використовуються в даному описі, стосуються рослин, які визначені експресією характеристик, отриманих з даного генотипу або комбінації генотипів, відрізняються від будь-якої іншої групи рослин ступенем вираженості щонайменше однієї з характеристик і розглядаються як ціле з точки зору придатності для розмноження незмінними.

Термін "гібрид", коли використовується в даному описі, стосується нащадка або потомства генетично різних рослин-батьків або стоку, виробленого в результаті контрольованого

перехресного запилення на відміну від негібридного насіння, виробленого в результаті природного запилення.

Термін "потомство", коли використовується в даному описі, стосується поколінь рослини, в яких походження покоління може бути прослідковане зворотно до вказаної рослини. Термін "потомство рослини, стійкої до гербіциду", коли використовується в даному описі, стосується потомства вказаної рослини, стійкої до гербіцидів, а також будь-якого мутантного, рекомбінантного або генно-інженерного похідного такої рослини того ж виду або різних видів, де характеристика(и) стійкості до гербіцидів вихідної рослини, стійкої до гербіциду, була передана рослині-нащадку.

Термін "рослинна тканина", коли використовується в даному описі, включає диференційовані і недиференційовані тканини рослин, включаючи ті, які присутні в корінні, пагонах, листі, пилку, насінні і пухлинах, а також клітини в культурі (наприклад, одиничні клітини, протопласти, ембріони, калуси і т. д.). Рослинна тканина може бути в рослинах, в органій культурі, тканинній культурі або в клітинній культурі.

Термін "частина рослини", коли використовується в даному описі, стосується структурної частини рослини або рослинної тканини, наприклад пилку, яйцеклітини, тканини, шкірки, насіння і клітини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансгенні рослини є рослинами сільськогосподарських культур. Терміни "сільськогосподарська культура" і "рослина сільськогосподарської культури", коли використовуються в даному описі, використовуються в самому широкому значенні. Терміни включають, але без обмеження, будь-який вид рослин, їстівний для людей або що використовується як корм для тварин, риби або морських тварин, споживаних людьми, що використовується для огляду людьми або будь-яку рослину, що використовується в промисловості, в торгівлі або в освіті.

Термін "елітна зародкова плазма", коли використовується в даному описі відносно рослин, стосується спадкового матеріалу з доведеною спадковою перевагою.

Термін "елітна рослина", коли використовується в даному описі, стосується будь-якої рослини, яка була отримана виведенням і селекцією для найкращої агрономічної продуктивності.

Термін "ознака", коли використовується в даному описі, стосується характеристики організму, яку можна виміряти і/або спостерігати. Наприклад, даний винахід описує рослини, які стійкі до FOP і DIM гербіцидів.

Терміни "маркер", "ДНК маркер" і "молекулярний маркер", коли використовуються в даному описі відносно "селектованого маркера", стосуються фізіологічної або морфологічної ознаки, яка може бути визначений як маркер для його власної селекції або для селекції інших ознак, близько зв'язаних з маркером. Наприклад, таким маркером міг би бути ген або ознака, асоційований з стійкістю до гербіцидів, що включає, але без обмеження, типові повтори з простою структурою (simple sequence repeat-SSR), одонуклеотидний поліморфізм (single nucleotide polymorphism-SNP), генетичні вставки і/або делеції і т. п.

Терміни "інтрогресувати", "інтрогресування" і "інтрогресія", коли використовуються в даному описі, стосуються традиційних (тобто класичних) методик селекції запиленням для вставки чужорідного генетичного матеріалу в лінію виробників. Наприклад, даний винахід надає рослини сільськогосподарської культури пшениці, інтрогресовані мутантним АКК геном стійкості до гербіциду шляхом схрещування двох генерацій рослин.

Термін "дикий тип", коли використовується в даному описі по відношенню до гену, стосується функціонального гену, який є спільним для популяції рослин. Функціональний ген дикого типу - це ген, який найчастіше спостерігається в популяції і, таким чином, довільно визначає "нормальну" форму гену або форму гену "дикого типу".

Терміни "мутант" або "функціональний мутант", коли використовуються в даному описі по відношенню до гену або генного продукту, стосуються, відповідно, гену або продукту гену, які демонструють зміни в послідовності і/або в функціональних властивостях (наприклад, змінені характеристики) в порівнянні з геном або продуктом гену дикого типу. Таким чином, терміни "модифікована" або "мутантна", коли використовуються по відношенню до нуклеотидної послідовності, стосуються послідовності нуклеїнової кислоти, яка відрізняється на один або декілька нуклеотидів від іншої, звичайно спорідненої послідовності нуклеїнової кислоти, а термін "функціональний мутант", коли використовується по відношенню до поліпептиду, що кодується вказаною "модифікованою" або "мутантною" нуклеїновою кислотою, стосується білка або поліпептиду, який зберігає активність. У даному винаході мутантний АКК білок або "функціональний мутант" являє собою АКК генів, який зберігає свою природну активність для створення необхідних амінокислот. Крім того, термін "модифікована" нуклеотидна послідовність інтерпретується як послідовність на основі виродженого генетичного коду, як відомо фахівцям в

даний галузі. Наприклад, генетичний код є виродженим, оскільки існують приклади, в яких різні кодони точно визначають одну і ту ж амінокислоту; також існують приклади, коли в генетичному коді деякі амінокислоти можуть кодуватися більш ніж одним кодоном кожна. Передбачається, що даний винахід може охоплювати таку виродженість (наприклад, коли гібрид пшениці включає АКК генів, який гомологічний щонайменше на 70 %, гомологічний щонайменше на 80 %, гомологічний щонайменше на 85 %, гомологічний щонайменше на 90 %, гомологічний щонайменше на 95 %, гомологічний щонайменше на 97 % і гомологічний щонайменше на 99 % послідовності нуклеотидів SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 або 6, або який виявлений, наприклад, в AF28-A, AF26-B і/або AF10-D, (ATCC Nos. \_\_\_\_\_), як виявлено, наприклад, в зародковій плазмі пшениці.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Ацетил-КоА карбоксилаза (АКК) є біотинільованим ензимом, який каталізує карбоксилювання ацетил-КоА для отримання малоніл-КоА. Це карбоксилювання є двоступеневою, оборотною реакцією, що включає в себе АТФ-залежне карбоксилювання біотинової групи на карбоксильному домені-переноснику за допомогою біотин-карбоксилазної активності і подальше перенесення карбоксильної групи з біотину на ацетил-КоА за допомогою карбоксил-трансферазної активності (Nikolau et al., 2003, Arch. Biochem. Biophys. 414:211-22). В рослинах ацетил-КоА карбоксилаза є не тільки ключовим ензимом для біосинтезу жирних кислот, процесу, що йде в хлоропластах і мітохондріях, але і грає важливу роль в утворенні довголанцюгових жирних кислот і флавоноїдів, а також в малонілюванні, що протікає в цитоплазмі. Існує дві ізоформи АКК, і АКК хлоропластів відповідальна більш ніж за 80 % загальної активності АКК (Herbert et al., 1996, Biochem. J. 318:997-1006). Арилоксифеноксипропіонати (FOP) і циклогександіони (DIM) представляють два класи хімічних речовин, які, як відомо, селективно інгібують хлоропластну форму АКК в травах (Rendina et al., 1990, J. Agric. Food Chem. 38: 1282-1287).

Насіння варієтету пшениці зазнавало впливу хімічного мутагену етанметилсульфонату (ethan methylsulfonate-EMS), висаджувалося і оцінювалося на стійкість до АКК гербіцидів. Один з генотипів, AF28-A, (SEQ ID NO: 4) експресував високі рівні стійкості до кожного з перевірених гербіцидів. Крім того, в даному винаході було показано, що схрещування AF28-A, AF26-B і/або AF10-D з елітними батьківськими лініями приводить до отримання множини гарного насіння і стійкості до АКК гербіцидів у потомства рослин.

По суті, один варіант здійснення даного винаходу надає зародкову плазму рослини, яка містить змінені гени і білки АКК. У деяких варіантах здійснення даний винахід надає застосування АКК гербіцидів на полях гібридних рослин для зменшення кількості однодольної бур'янової рослинності, присутньої на вказаному полі культури, де вказана зародкова плазма вказаного гібриду включає змінений енізм АКК, який надає стійкості до АКК гербіцидів, а вказані бур'яни є чутливими до АКК гербіцидів. Переважні рослини сільськогосподарських культур включають пшеницю, рис і ячмінь або інші однодольні зернові рослини з аналогічною мутацією.

В одному варіанті здійснення даний винахід надає рослину з стійкістю до інгібування АКК гербіцидами, окремо або в поєднанні з іншими ознаками стійкості, наприклад резистентність до комах - вогнівки *Chilo partellus* (Girijashankar et al., 2005, Plant Cell Rep. 24:513-522, дана публікація включена в даний опис у всій повноті). У деяких варіантах здійснення винаходу, наприклад, гібрид пшениці, зародкова плазма якого містить синтетичний ген *cryI Ac* з *Bacillus thuringiensis* (Bt), інтрогресується в лінію пшениці, зародкова плазма якої надає стійкості до АКК гербіцидів. Також включення в один і той же гібрид стійкості до АКК гербіцидів і стійкості до комах досягається з допомогою трансгенезу. Фахівцеві даної галузі техніки будуть зрозумілі різні методики, описані в даному винаході, які застосовні для введення двох або декількох характерних ознак стійкості в одну і ту ж рослину.

В одному варіанті здійснення даний винахід надає стійкості до АКК гербіцидів в рослинах, що містять, наприклад, АКК зародкову плазму, позначену AF28-A, AF26-B і/або AF10-D, (ATCC Nos. \_\_\_\_\_), введену в елітні сорти шляхом розмноження і відбору, тим самим забезпечуючи створення стійких до гербіцидів рослин, які будуть витримувати застосування гербіцидів, що інгібують АКК, для контролю росту бур'янової рослинності. Введення цієї ознаки стійкості до гербіцидів у вказані вище рослини дозволяє застосовувати ці гербіциди для контролю однодольних бур'янів, які ростуть в присутності даних сільськогосподарських культур. У деяких варіантах здійснення винаходу введення зародкової плазми з стійкістю до АКК гербіцидів в елітні лінії являє собою інтрогресію або класичні способи селекції. У деяких варіантах здійснення винаходу введення гену стійкості до АКК гербіцидів в елітні лінії являє собою трансгенез гетерологічного гену з експресією або конструкторами інгібування. У деяких варіантах здійснення винахід надає рослину, переважно рослину пшениці, у якої, щонайменше,

5 один предок містить ген стійкості до АКК гербіцидів із зародкової плазми AF28-A, депонованої під інвентарним номером ATCC №\_\_\_\_\_. У деяких варіантах здійснення ген стійкості до АКК гербіцидів включає послідовність нуклеїнової кислоти, якої гомологічна щонайменше на 70 %, гомологічна щонайменше на 80 %, гомологічна щонайменше на 85 %, гомологічна щонайменше на 90 %, гомологічна щонайменше на 95 %, гомологічна щонайменше на 97 % і гомологічна щонайменше на 99 % послідовності SEQ ID NO: 4, або ген стійкості до АКК гербіцидів, виявлений в AF28-A, депонований під інвентарним номером ATCC №\_\_\_\_\_. У деяких варіантах здійснення ген стійкості до АКК гербіцидів гомологічний щонайменше на 70 %, гомологічний щонайменше на 80 %, гомологічний щонайменше на 85 %, гомологічний щонайменше на 90 %, гомологічний щонайменше на 95 %, гомологічний щонайменше на 97 % або гомологічний щонайменше на 99 % послідовності SEQ ID NO: 4 або гену стійкості до АКК гербіцидів, виявленому в AF28-A, депонований під інвентарним номером ATCC №\_\_\_\_\_, який включає амінокислотне заміщення Ala2004Val.

15 У деяких варіантах здійснення зародкова плазма, стійка до АКК гербіцидів, інтрогресована в елітну лінію рослини з використанням класичних способів селекції. Приклади класичних способів селекції пшениці, ячменю, рису і інших однодольних зернових рослин можуть бути знайдені, наприклад, в публікації Sleper and Poehlman, 2006, Breeding Field Crops, Fifth Edition, Blackwell Publishing, зміст якої введений в даний опис у всій повноті.

20 В одному варіанті здійснення винаходу, зародкова плазма з стійкістю до АКК гербіцидів інтрогресована в рослину, переважно рослину пшениці, що використовується для споживання в їжу людиною. У деяких варіантах здійснення винаходу зародкова плазма з стійкістю до АКК гербіцидів інтрогресована в рослини пшениці, що використовуються для корму худоби (наприклад, для домашніх птахів, великої рогатої худоби, свиней, овець і т. д.). У деяких варіантах здійснення винаходу зародкова плазма, стійка до АКК гербіцидів, інтрогресована в рослини пшениці, що використовуються в промислових процесах, таких як виробництво етанолу. В одному варіанті здійснення винаходу ген стійкості до АКК гербіцидів введений в геном рослини шляхом трансгенезу за допомогою векторів і методів, відомих в даній галузі техніки.

30 У деяких варіантах здійснення даний винахід надає стійку до АКК гербіцидів зародкову плазму частин рослин пшениці лінії AF28-A, депонованої під інвентарним номером ATCC №\_\_\_\_\_, де вказана частина рослини пшениці являє собою одну або декілька частин рослини, вибрану з пилку, яйцеклітини, тканини, плоду, насіння і клітини. В одному варіанті здійснення даний винахід надає гібриди покоління F1, зародкова плазма яких містить ген стійкості до АКК гербіцидів, як описана в даному винаході. У деяких варіантах здійснення винаходу F1-гібриди є результатом схрещування двох елітних ліній пшениці, з яких щонайменше одна містить ген стійкості до АКК гербіцидів, як описана в даному винаході.

40 В одному варіанті здійснення даний винахід надає способи контролю бур'янової рослинності на полях з сукупністю культурних рослин. У деяких варіантах здійснення даного винаходу контроль бур'янової рослинності включає застосування АКК гербіциду по вказаній сукупності рослин таким чином, що ріст бур'янової рослинності інгібується, а ріст культурних рослин не зазнає несприятливого впливу. У деяких варіантах здійснення винаходу АКК гербіцид, що застосовується, належить до сімейства гербіцидів класу арилоксифеноксипропіонатів (FOP), включаючи, але без обмеження, клодинафоп-пропаргіл, цигалофоп-бутил, диклофоп-метил, феноксапроп-п-етил, флуазифоп-б-бутил, галоксифоп-етоксіетил, галоксифоп-етотил, галоксифоп-R-метил, пропахізафоп, хізалофоп-р-етил і хізало-Р-рефурил. У деяких варіантах здійснення винаходу АКК гербіцид, що застосовується, належить до сімейства гербіцидів класу циклогександіонів (DIM), включаючи, але без обмеження, алоксидим, бутроксидим, клефоксидим, клетодим, циклоксидим, профоксидим, сетоксидим, тепралоксидим і тралоксидим. У деяких варіантах здійснення винаходу АКК гербіцид, що застосовується, включає комбінацію АКК гербіцидів хімічних сполук класів FOP і DIM, як описується в даному винаході. Однак застосування згідно з даним винаходом не обмежується АКК гербіцидами, що використовуються, і фахівцеві даної галузі техніки буде зрозуміло, що в будь-який момент часу можуть бути відкриті нові АКК гербіциди, які інгібують ензим АКК.

55 В одному варіанті здійснення даний винахід надає рослину (наприклад, F1, F2, F3, F4 і т. д.), зародкова плазма якого надає стійкості до АКК гербіцидів і стійкості до одного або декількох додаткових гербіцидів, що належать до однієї або декількох різних груп гербіцидів. Наприклад, додаткові групи гербіцидів, що використовуються для інгібування росту бур'янової рослинності, включають, але без обмеження, інгібітори синтезу ліпідів (наприклад, арилоксифеноксипропіонати, циклогександіони (cyclohexanodeiones), бензофурани, хлорзаміщені карбонові кислоти, фосфордитіати, тіокарбамати), інгібітори фотосинтезу

фотосистеми II (наприклад, фенілкарбамати, піридазинони, триазины, триазинони, триазолінони, урацили, аміди, сечовини, бензотіадіазинони, нітрили, фенілпіридини), інгібітори фотосинтезу фотосистеми I (наприклад, біпіридиліуми), інгібітори протопорфіриногеноксидази (наприклад, дифенілефіри, N-фенілфталіміди, оксадіазоли, оксизолідіндіони, фенілпіразоли, піримідиндіони, тіадіазоли), інгібітори біосинтезу каротиноїдів (наприклад, піридазинони, піридинкарбоксаміди, ізоксазолідинони, триазоли), інгібітори 4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази (наприклад, калістемони, ізоксазоли, піразоли, трикетони), інгібітори ЕПШП синтази (наприклад, гліцини), інгібітори глутамінсинтази (наприклад, фосфінові кислоти), інгібітори дигідрофтератсинтази (наприклад, карбамати), інгібітори збирання мікротрубочок (наприклад, бензаміди, бензойні кислоти, динітроаніліни, фосфороамідати, піридини), інгібітори клітинного поділу (наприклад, ацетаміди, хлороацетаміди, оксіацетаміди), інгібітори синтезу клітинної стінки (наприклад, нітрили, триазолкарбоксаміди) і інгібітори транспорту ауксину (наприклад, фталамати, семікарбазони). У деяких варіантах здійснення даний винахід надає F1 гібриди елітних ліній рослин, які включають стійкість до одного або декількох АКК гербіцидів окремо або в поєднанні з стійкістю до гербіцидів з однієї або декількох з вказаних груп гербіцидів.

В одному варіанті здійснення даний винахід надає застосування гетерологічної нуклеотидної послідовності, що включає SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 або 6, що кодує АКК білок дикого типу або мутантний АКК білок (SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 або 12) для забезпечення вибраної агрономічної ознаки стійкості до АКК гербіцидів. В одному варіанті здійснення нуклеотидна послідовність включає мутантний АКК ген, виявлений в зародковій плазмі, позначений як AF28-A, AF26-B і/або AF10-D і депонований під інвентарними номерами ATCC №\_\_\_\_\_. У деяких варіантах здійснення винаходу нуклеотидна послідовність є гомологічною щонайменше на 70 %, гомологічною щонайменше на 80 %, гомологічною щонайменше на 85 %, гомологічною щонайменше на 90 %, гомологічною щонайменше на 95 %, гомологічною щонайменше на 97 %, гомологічною щонайменше на 99 % послідовності SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення винаходу АКК нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана з промоторною послідовністю і утворює частину експресії або конструкту інгібування, і в деяких варіантах здійснення винаходу АКК нуклеотидна послідовність є гомологічною щонайменше на 70 %, гомологічною щонайменше на 80 %, гомологічною щонайменше на 85 %, гомологічною щонайменше на 90 %, гомологічною щонайменше на 95 %, гомологічною щонайменше на 97 %, гомологічною щонайменше на 99 % до гену, стійкого до АКК гербіцидів, як виявлено в AF28-A, AF26-B і/або AF10-D і/або SEQ ID NO: 6, що включає амінокислотне заміщення Ala 2004 Val в A, B або D геномі.

#### Класичне розмноження пшениці

Польові культури були виведені класичним способом на основі підходів, в яких використовувалися переваги методу(ів) запилення рослин. Рослина вважається "самозапилювальною", якщо пилок з однієї квітки може бути перенесений на цю ж або іншу квітку цієї ж рослини, в той час як "перехреснозапилювальними" вважаються рослини, у яких для того, щоб запилення могло статися, пилок повинен бути перенесений з квітки іншої рослини. Рослини, які самозапилювалися і відбиралися протягом багатьох поколінь, стають гомозиготними по більшості, якщо не по всіх генних локусах, продукуючи таким чином однорідну популяцію істинного "племінного" потомства. Схрещування двох гомозиготних рослин різного походження або двох різних гомозиготних ліній буде давати однорідну популяцію гібридних рослин, які, більш ніж ймовірно, будуть гомозиготними у великій кількості генних локусів. Схрещування двох рослин, кожна з яких є гетерозиготною по ряду генних локусів, буде давати покоління гібридних рослин, які генетично різні і не є однорідними.

Рослини пшениці є самозапилювальними рослинами, але їх також можна розводити перехресним запиленням. Розробка гібридів пшениці вимагає розробки батьків-запилювачів (відновників родючості) і насіннєвих інбредних батьків за допомогою системи чоловічої стерильності - відновлення фертильності, схрещування насіннєвих батьків і батьків-запилювачів, а також оцінки результатів схрещування. Гібриди пшениці також можуть бути розроблені з використанням агентів хімічної гібридизації, які застосовуються для забезпечення чоловічої стерильності жіночого родителя гібриду. Програми чистопородного розведення об'єднують бажані ознаки; в даній заявці бажаною ознакою є стійкість рослини до АКК гербіцидів. Ця ознака вміщується в пул розведення, що складається з однієї або декількох ліній, так що нові інбредні лінії створюються шляхом схрещування і подальшим відбором рослин з бажаною ознакою, подальшими додатковими схрещуваннями і т. д. Нові інбредні особні схрещуються з іншими інбредними лініями (наприклад, з елітними рослинними лініями, як

описано в даному описі).

Селекційне розведення починається зі схрещування двох генотипів, таких як AF28-A, AF26-B і/або AF10-D, і елітної лінії пшениці. Якщо два вихідні батьки не забезпечують всі необхідні характеристики, то в селекційну популяцію можуть бути включені і інші джерела. Наприклад, якщо бажаний гібрид, стійкий до АКК гербіцидів і гербіцидів іншої групи, як описано у винаході, то можуть схрещуватися рослини з цими ознаками з використанням класичних методів селекції. У методі селекції вищі рослини є самозапилювальними і відбираються в подальших поколіннях. У подальших поколіннях гетерозиготний стан дає шлях до однорідних ліній гомозиготних рослин як результат самозапилення і селекції. Як правило, в методі селекції на практиці отримують п'ять або більше поколінь самозапилення і селекцію (наприклад, S1, S2, S3, S4, S5 і т. д.).

Зворотне схрещування використовується для поліпшення рослинної лінії. Зворотне схрещування переносить специфічну бажану ознаку з одного джерела в інше, яке потребує даної ознаки. Це досягається, наприклад, схрещуванням донора (наприклад, AF28-A) з елітною інбредною лінією (наприклад, з елітною лінією). Потомство цього схрещування потім схрещується зворотно (тобто проводиться зворотне схрещування) з елітною інбредною лінією з подальшим відбором в потомстві, що вийшло по бажаній ознаці (наприклад, стійкість до АКК гербіцидів). Після п'яти або більшої кількості поколінь зворотного схрещування з відбором по бажаній ознаці потомство стає типово гетерозиготним по локусу, що контролює бажаний фенотип, але буде схожим на елітного батька за іншими генетичними ознаками. Останнє зворотне схрещування звичайно проводиться з самою рослиною для створення чистого селекційного ("племінного") потомства для передачі гену.

У програмах розведення гібридів пшениці, що використовуються в даний час, розробляються нові батьківські лінії для отримання насіннєвих батьківських ліній або ліній батьків-запилювачів в залежності від того, чи містять вони гени відновлення фертильності; насіннєві батьківські лінії не мають генів відновлення фертильності, мають чоловічу стерильність в певних цитоплазмах (також відомі як рослини "А" лінії) і мають чоловічу фертильність в інших цитоплазмах (також відомі як рослини "В" лінії), тоді як лінії батьків-запилювачів не мають чоловічої стерильності і містять гени відновлення фертильності (також відомі як рослини "R" лінії). Насіннєві батьківські лінії звичайно створюються так, щоб вони мали цитоплазматичну чоловічу стерильність і щоб пильовики в цих рослинах були або мінімального розміру, або були відсутні взагалі і, отже, було потрібне перехресне запилення. Насіннєві батьківські лінії будуть виробляти тільки насіння, і цитоплазма переноситься тільки через яйцеклітину. Пилок для перехресного запилення надається лініями батьків-запилювачів, які містять гени, необхідні для повного відновлення фертильності в гібридах F1, і схрещування об'єднує цих батьків з насіннєвим батьком, що має чоловічу стерильність для отримання високоврожайного простого гібриду з хорошою якістю зерна.

Звичайно така система цитоплазматичної стерильності/відновлення фертильності використовується для отримання гібридного насіння шляхом висадження блоків грядок з рослинами з чоловічою стерильністю (насіннєвими батьками) і блоків грядок з рослинами відновниками фертильності (батьками-запилювачами), так щоб рослини насіннєвих батьків запилювалися за допомогою вітру пилом з рослини батька-запилювача. Цей процес дає потужний простий гібрид, який збирається і вирощується споживачем. Рослини насіннєвих батьків, що мають чоловічу стерильність можуть бути також створені за допомогою генетичної селекції в певній популяції рецесивних ядерних генів чоловічої стерильності, однак цитоплазматична система чоловічої стерильності-відновлення фертильності є основною системою, що використовується при виведенні гібриду пшениці, хоч широко використовується і хімічно індукована чоловіча стерильність. Слєпер і Поєльман (див. Sleper and Poehlman, 2006, Breeding Field Crops, Fifth Ed., Blackwell Publishing) представили хороший огляд сучасних методик по селекції рослин пшениці, і дана публікація включена в даний опис у всій повноті у вигляді посилання.

Даний винахід не обмежується перерахованими лініями пшениці, і кваліфікованому фахівцеві даної галузі техніки буде зрозуміло, що будь-яка елітна лінія пшениці в рівній мірі підходить для композицій і способів, описаних в даному описі.

#### ТРАНСГЕНЕЗ РОСЛИН

Композиції згідно з даним винаходом включають послідовності для нуклеотидних послідовностей пшениці, які були ідентифіковані як АКК кодуєчі послідовності і які залучені до реакції рослин на дію АКК гербіцидів. Зокрема, даний винахід надає молекули виділених нуклеїнових кислот, що включають нуклеотидні послідовності, що кодують амінокислотні послідовності, показані в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8 і 9. Надані також поліпептиди, що містять амінокислотну послідовність, кодовану молекулою нуклеїнової кислоти, описаною в даному

винаході, наприклад нуклеотидними послідовностями, показаними SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 або 6.

Композиції згідно з даним винаходом можуть застосовуватися в різних способах, за допомогою яких білкові продукти можуть експресуватися в культурні рослини для функціонування як стійкі до гербіцидів білки. Така експресія приводить до альтерації або модулювання рівня, тканини або тривалості експресії для досягнення поліпшеної стійкості до АКК гербіцидів. Композиції згідно з даним винаходом можуть експресуватися в ті ж види, з яких походить ацетил-КоА карбоксилаза, або, альтернативно, можуть експресуватися в будь-яку рослину, що представляє інтерес. У даному способі кодуюча послідовність для АКК може використовуватися в комбінації з промотором, який вводиться в культурну рослину. В одному варіанті здійснення винаходу може застосовуватися конститутивний промотор високого рівня експресії, що повинно приводити до високих рівнів експресії АКК. В інших варіантах здійснення винаходу кодуюча послідовність може оперативно зв'язуватися з тканиноспецифічним промотором для ініціювання експресії в рослинній тканині, яка, як відомо, має чутливість до АКК гербіцидів, такої як листя. Аналогічно може застосовуватися маніпуляція таймінгу експресії. Наприклад, за допомогою розумного вибору промотора експресія може бути підвищена на ранній стадії росту рослини, коли рослина повинна бути чутлива до гербіцидної обробки.

У конкретних варіантах здійснення винаходу способи підвищення стійкості до дії гербіциду в рослині включають стабільне трансформування рослини з допомогою ДНК конструкта, що включає нуклеотидну послідовність згідно з винаходом, функціонально зв'язану з промотором, який стимулюють експресію в рослині.

Надані також трансформовані рослини, рослинні клітини, рослинні тканини і насіння.

Способи згідно з даним винаходом можуть застосовуватися з іншими способами, доступними в даній галузі техніки для поліпшення інших ознак в рослині. Зрозуміло, що такі інші нуклеотидні послідовності можуть застосовуватися для підвищення смислової і антисмислової орієнтації в залежності від бажаного результату.

Саме така надекспресія мутантних нуклеотидних послідовностей АКК (SEQ ID NO: 4, 5 і/або 6) була б переважним способом застосування мутантних нуклеотидних послідовностей. Різні переваги і недоліки застосування різних промоторів для стимулювання такої надекспресії добре відомі фахівцям даної галузі техніки. Однак, наприклад, конститутивний промотор міг би стимулювати експресію, але більш ідеальним промотором був би промотор цільової тканини, такої як листя.

Послідовності згідно з даним винаходом, як більш детально обговорено нижче, включають кодуючі послідовності, антисмислові послідовності і їх фрагменти і варіанти. Експресія послідовностей згідно з даним винаходом може застосовуватися для модулювання або регулювання експресії відповідних АКК білків. Даний винахід включає виділені або по суті очищені композиції нуклеїнових кислот або білків.

Фрагменти і варіанти розкритих нуклеотидних послідовностей і білків, кодованих з їх допомогою, включені в галузь даного винаходу. Термін "фрагмент" означає частину нуклеотидної послідовності або частину амінокислотної послідовності і, отже, білка, що кодується з її допомогою. Фрагменти нуклеотидної послідовності можуть кодувати фрагменти білка, які зберігають біологічну активність природного білка, отже мають АКК-подібну активність і, таким чином, впливають на чутливість до гербіцидів. Альтернативно, фрагменти нуклеотидної послідовності, які можуть застосовуватися як зонди гібридизації, звичайно не кодують фрагменти білків, що зберігають біологічну активність. Таким чином, фрагменти нуклеотидної послідовності можуть містити від щонайменше приблизно 20 нуклеотидів, від приблизно 50 нуклеотидів, від приблизно 100 нуклеотидів і до нуклеотидної послідовності повної довжини, що кодує білки згідно з даним винаходом.

Фрагмент АКК нуклеотидної послідовності, який кодує біологічно активну частину АКК білка згідно з винаходом, буде кодувати від щонайменше 15, 25, 30, 50, 100, 150 або 250 зв'язаних амінокислот до повної кількості амінокислот, присутньої в білці повної довжини згідно з даним винаходом.

Нуклеотидні послідовності згідно з винаходом можуть застосовуватися для виділення відповідних послідовностей з інших організмів, зокрема з інших рослин, точніше з інших однодольних рослин. У цьому випадку способи, такі як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), гібридизація і т. п., можуть застосовуватися для ідентифікації таких послідовностей на основі їх гомології з послідовностями, що знаходяться в цих організмах. Послідовності, виділені на основі ідентичності таких послідовностей до повних АКК послідовностей, представлених в них, або до їх фрагментів, включені в об'єм даного винаходу. Такі послідовності включають послідовності, які є ортологами розкритих послідовностей. Термін "ортолог" означає гени, які отримані із звичайних анцестральних генів і які виявлені в інших видах як результат видоутворення. Гени,

виявлені в інших видах, вважаються ортологами, коли їх нуклеотидні послідовності і/або послідовності білків, що кодуються, виявляють по суті ідентичність, як визначено в даному описі. Функції ортологів часто є висококонсервативними серед видів.

У ПЛР підході олігонуклеотидні праймери можуть бути розроблені для застосування в ПЛР реакції для ампліфікації ДНК послідовностей з кДНК або геномних ДНК, витягнутих з будь-якої рослини, що представляє інтерес. Способи розробки ПЛР праймерів і ПЛР клонування добре відомі в даній галузі техніки і розкриті, наприклад, Sambrook (див. також Innis et al, eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) PCR Strategies (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1999) PCR Methods Manual (Academic Press, New York)). Відомі способи ПЛР включають, але без обмеження, способи, що використовують спарені праймери, вкладені праймери, єдині специфічні праймери, дегенеративні праймери, ген-специфічні праймери, вектор-специфічні праймери, частково помилково спарені праймери (partially-mismatched primers) і т. п.

У методиках гібридизації вся відома нуклеотидна послідовність або її частина використовуються як зонд, який селективно гібридується з іншими відповідними нуклеотидними послідовностями, присутніми в популяції клонованих геномних ДНК фрагментів або кДНК фрагментах (наприклад, геномних або кДНК бібліотеках). Зонди гібридизації можуть являти собою геномні ДНК фрагменти, кДНК фрагменти, РНК фрагменти або інші олігонуклеотиди, і можуть бути помічені групою, що виявляється, такою як  $^{32}\text{P}$ , або будь-яким іншим маркером, що виявляється. Таким чином, наприклад, зонди гібридизації можуть бути отримані за допомогою синтетичних полінуклеотидів, що вводять мітку на основі АКК послідовностей згідно з винаходом. Способи отримання зондів для гібридизації і конструкції кДНК і геномних бібліотек загалом добре відомі в даній галузі техніки і описані в Sambrook.

Біологічна активність АКК поліпептидів (тобто, вплив на АКК гербіцидна відповідь) може бути оцінена способом, відомим в даній галузі техніки і описаним в даному винаході.

Послідовності нуклеїнових кислот згідно з даним винаходом можуть бути експресовані в клітині-хазяїні, такий як клітини бактерій, дріжджів, комах, ссавців і, переважно, рослин. Передбачається, що фахівцям в цій галузі техніки добре відомі численні системи експресії, доступні для експресії нуклеїнової кислоти, що кодує білок згідно з даним винаходом. Не буде зроблено ніяких спроб детально описати різні способи, відомі для експресії білків в прокаріотах і еукаріотах.

Послідовності згідно з даним винаходом надані в експресійних касетах або ДНК конструктах для експресії в рослинах, що представляють інтерес. Касета може додатково містити щонайменше один додатковий ген, призначений для спільної трансформації в організм. Альтернативно, додатковий(і) ген(и) може(ють) бути наданий(і) на касетах множинної експресії.

Така касета експресії надана з безліччю сайтів рестрикції для вставки АКК послідовності з транскрипційною регуляцією регуляторними областями. Касета експресії може додатково містити селектовані маркерні гени.

Експресійна касета може включати в 5'-3' напрямку транскрипції область ініціювання транскрипції (тобто промотор), область ініціювання трансляції, полінуклеотид згідно з винаходом, область завершення трансляції і, необов'язково область завершення транскрипції в організмі-хазяїні. Регуляторні області (тобто промотори, області регулювання транскрипції і області термінації трансляції) і/або полінуклеотид згідно з винаходом можуть бути природними/аналогічними клітині-хазяїну або один одному. Альтернативно, регуляторні області і/або полінуклеотид згідно з винаходом можуть бути гетерологічними клітині-хазяїну або один одному.

Хоч може бути переважно експресувати послідовності з використанням гетерологічних промоторів, можуть використовуватися і природні промоторні послідовності. Такі конструкти повинні змінювати рівні експресії АКК в клітині-хазяїні (тобто рослині або рослинній клітині). Таким чином, фенотип клітини-хазяїна (тобто рослини або рослинної клітини) змінюється.

Область термінації може бути "рідною" області ініціювання транскрипції, може бути "рідною" оперативно зв'язаний ДНК послідовності, що представляє інтерес, або може походити з іншого джерела. Традиційні області термінації доступні з Ті-плазмиди *A. tumefaciens*, таких як області термінації октопінсинтази і нопалінсинтази. Див. також Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91: 151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; and Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15:9627-9639.

Коли прийнятно, ген(и) може(ють) оптимізуватися для підвищеної експресії в трансформованій рослині. Тобто, гени можуть синтезуватися з використанням рослина-переважних кодонів для поліпшеної експресії. Вказані способи доступні в даній галузі техніки



для синтезування рослина-переважних генів. Див., наприклад Патенти США №№ 5380831 і 5436391 і Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, зміст яких введений в даний опис у всій повноті у вигляді посилання.

Додаткові модифікації послідовностей, як відомо, посилюють експресію гену в клітинному хазяїні. Вони включають елімінацію послідовностей, що кодують помилкові сигнали поліаденілювання, сигнали сайтів сплайсингу екзон-інтрон, транспозон-подібні повтори, і інших подібних добре відомих послідовностей, які можуть бути шкідливими для експресії генів. G-C зміст послідовності може бути доведений до рівнів, середніх для даного клітинного хазяїна, які розраховані для відомих генів, експресованих в клітині-хазяїні. Коли це можливо, послідовність модифікується, щоб уникнути передбачених повторних структур мРНК у вигляді петлі ("шпильки").

Касети експресії можуть додатково містити 5'-лідерні послідовності в конструкторі експресійної касети. Такі лідерні послідовності можуть діяти, посилюючи трансляцію. Лідери трансляції відомі в даній галузі і включають пікорнавірусні лідерні послідовності, наприклад EMCV лідер (енцефаломіокардит 5'-некодуєча область) (Elroy-Stein et al. (1989) *PNAS USA* 86:6126-6130); потівірусні лідерні послідовності, наприклад TEV лідерна послідовність (послідовність вірусу гравіювання тютюну - Tobacco Etch Virus) (Allison et al. (1986) *Virology* 154:9-20); і людський білок, що зв'язує важкий ланцюг імуноглобулінів (BiP), (Macejak et al. (1991) *Nature* 353:90-94); лідерна послідовність мРНК білка оболонки, що не транскрибується, вірусу мозаїки люцерни (AMV RNA 4) (Job ling et al. (1987) *Nature* 325:622-625); лідерна послідовність вірусу тютюнової мозаїки (TMV (Gallie et al. (1989) in *Molecular Biology of RA*, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); лідерна послідовність вірусу хлоротичної плямистості кукурудзи ((MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81: 382-385). Див. також Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968. Можуть використовуватися і інші відомі способи підвищення транскрипції.

При підготовці експресійної касети можна маніпулювати різними фрагментами ДНК таким чином, щоб забезпечити послідовності ДНК в належній орієнтації і, коли це підходить, в належній рамці зчитування. З цією метою можуть використовуватися адаптери або лінкери для об'єднання фрагментів ДНК, або можуть залучатися інші маніпуляції для забезпечення зручних сайтів рестрикції, видалення непотрібної ДНК, видалення сайтів рестрикції або т. п. Для цього можуть використовуватися *in vitro* мутагенез, репарація праймерів, рестрикція, відновлення заміщень, наприклад можуть задіятися транзиції і трансверсії.

Звичайно експресійні касети будуть включати селектований маркерний ген для селекції трансформованих клітин. Селектовані маркерні гени використовуються для відбору трансформованих клітин або тканин. Гени-маркери включають гени, що кодують стійкість до антибіотиків, такі як гени, що кодують неоміцинфосфотрансферазу II (NEO) і гігromіцинфосфотрансферазу (HPT), а також гени, що надають стійкості до гербіцидних сполук, таких як глюфосинат, гліфосат, амоній, бромоксиніл, імідазоліони і 2,4-дихлорофеноксіацетат (2,4-D). Див. Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao et al. (1992) *Cell* 71: 63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley et al. (1980) in *The Operon*, pp. 177-220; Hu et al. (1987) *Cell* 48:555-566; Brown et al. (1987) *Cell* 49:603-612; Figge et al. (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle et al. (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1917-1921; Labow et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Bairn et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10: 143-162; Degenkolb et al. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) *Biochemistry* 27: 1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva et al. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka et al. (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill et al. (1988) *Nature* 334:721-724; і WO Публікація № 02/36782. Зміст вказаних публікацій включений в даний опис у вигляді посилання.

Наведений вище список вибраних маркерних генів не є обмеженням. Будь-який селектований маркерний ген може використовуватися згідно з даним винаходом.

Ряд промоторів може використовуватися при практичному застосуванні даного винаходу. Промотори можуть вибиратися виходячи з бажаного результату. Тобто нуклеїнові кислоти можуть об'єднуватися з конститутивними, тканинопереважними або іншими промоторами для експресії в клітині-хазяїні, що представляє інтерес. Такі конститутивні промотори включають, наприклад, коровий промотор Rsyn7 (WO 99/48338 і Патент США № 6072050); коровий

промотор 35S CaMV (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812); промотор актину рису (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171); промотор убівітину (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 і Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); промотор pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); промотор MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730);  
 5 промотор ALS (Патент США № 5659026) і т. п. Інші конститутивні промотори включають, наприклад, промотори, описані, в патентах США 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463 і 5608142.

І так само, як експресія АКК поліпептидів згідно з даним винаходом може бути націлена на конкретні рослинні тканини або типи клітин через використання відповідних промоторів, вона  
 10 також може бути направлена на різні місцеположення всередині клітини за допомогою націлювальної інформації або "націлювальних міток". На відміну від промотору, який діє на рівні транскрипції, така націлювальна інформація є частиною продукту вихідної трансляції. В залежності від способу інфекції патогену або метаболічної функції тканини або клітинного типу, місцеположення білка в різних компартментах клітини може зробити його більш ефективним  
 15 проти даного патогену або зробити його таким, що приносить менші перешкоди функції клітини. Наприклад, можна отримати білок, що передує сигнальному пептиду, який направляє трансляцію продукту в ендоплазматичний ретикулум шляхом включення в конструкт (тобто експресійну касету) послідовностей, що кодують сигнальний пептид (такі послідовності можуть також називатися "сигнальними послідовностями"). Сигнальна послідовність, що  
 20 використовується, може являти собою, наприклад, послідовність, пов'язану з геном, що кодує поліпептид, або вона може бути взята з іншого гену.

Існує велика кількість сигнальних пептидів, які описані в літературі, і вони значною мірою є взаємозамінними (Raikhel N., Chrispeels M.J. (2000) *Protein sorting and vesicle traffic*. In B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, eds., *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American  
 25 Society of Plant Physiologists, Rockville, Md., pp. 160-201, зміст вказаної публікації введений в даний опис у вигляді посилання). Додавання сигнального пептиду буде приводити до трансляційного продукту, що поступає в ендоплазматичний ретикулум (в процесі чого сигнальний пептид сам видаляється з поліпептиду), але кінцеве внутрішньоклітинне місцеположення білка залежить і від інших чинників, якими можна маніпулювати для отримання  
 30 місцеположення, найбільш прийнятного для патогену і клітинного типу. Шлях "за умовчанням", тобто шлях, прийнятий поліпептидами, якщо не включені ніякі інші націлювальні мітки, приводить до секреції поліпептиду через клітинну мембрану (Raikhel і Chrispeel, *supra*) в апопласт. Апопласт являє собою область поза системою плазматичної мембрани і включає в себе клітинні стінки, міжклітинні простори і судини ксилеми, що створюють безперервну  
 35 проникну систему, через яку можуть рухатися вода і розчинені речовини.

Метод трансформації/трансфекції не є критичним для даного винаходу; різні методи трансформації або трансфекції доступні в даний час. По мірі появи нових методів для перетворення культур або інших клітин-хазяїнів ці нові методи також можуть застосовуватися. Таким чином, широкий спектр методів був розроблений для вставки послідовності ДНК в геном  
 40 клітини-хазяїна з метою отримання транскрипції і/або трансляції послідовності для впливу на фенотипічні зміни в організмі. Таким чином, може застосовуватися будь-який метод, який забезпечує ефективну трансформацію/трансфекцію.

Протоколи трансформації, а також протоколи введення нуклеотидних послідовностей в рослини можуть змінюватися в залежності від виду рослин, тобто однодольних або  
 45 дводольних, або рослинних клітин, що підлягають трансформації. Прийнятні способи введення нуклеотидних послідовностей в рослинні клітини і подальшої вставки в геном рослини включають мікроін'єкції (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334), електропорації (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606), агробактеріальну трансформацію (Townsend et al., Патент США № 5563055, Zhao et al., Патент США № 5981840), пряме перенесення гену  
 50 (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722), і "балістичне" прискорення частинок (див., наприклад, Sanford et al. Патент США № 4945050; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment", in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923-926). Див. також Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (onion); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soybean); McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soybean); Finer and McMullen (1991) *In vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (soybean); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soybean); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (rice); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (maize); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559-563  
 60 (maize); Tomes, Патент США № 5240855; Buisning et al. Патенти США №№ 5322783 і 5324646;

Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (maize); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (maize); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (pollen); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418; Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (whisker-mediated transformation); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (electroporation); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255; Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (rice); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (maize via *Agrobacterium tumefaciens*); які введені в даний опис у вигляді посилань.

З клітин, які були трансформовані, можуть бути вирощені рослини згідно з звичайними способами. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Ці рослини можна вирощувати і запилювати такою ж трансформованою лінією або іншими лініями і ідентифікувати гібриди з конститутивною експресією потрібної фенотипічної ознаки. Два або більше поколінь можуть бути вирощені для гарантії того, що конститутивна експресія потрібної фенотипічної ознаки стабільно підтримується і успадковується, а потім збирають насіння для забезпечення конститутивної експресії потрібної фенотипічної ознаки. Фахівцеві буде зрозуміло, що після того, як рекомбінантна експресійна касета стабільно введена в трансгенні рослини і підтверджено, що є діючою, вона може вводитися в інші рослини шляхом статевого схрещування (sexual crossing). Будь-яка методика з числа стандартних методик може бути використана в залежності від виду, що підлягає схрещуванню.

У культурах, що вегетативно розмножуються, зрілі трансгенні рослини можна розмножувати живцями або методами культури тканин для отримання безлічі ідентичних рослин. Проводять відбір бажаних трансгенних рослин і нові сорти отримують і розмножують вегетативно для комерційного застосування. У культурах, що розмножуються насінням, зрілі трансгенні рослини можуть бути піддані самосхрещуванню для отримання гомозиготних інбредних рослин. Інбредна рослина виробляє насіння, що містить наново введену гетерологічну нуклеїнову кислоту. Це насіння можна вирощувати для отримання рослин, які будуть відтворювати вибраний фенотип.

Частини, отримані з регеноерованої рослини, такі як квіти, насіння, листя, гілки, плоди і т. п., включені у винахід при умові, що ці частини включають клітини, що містять виділену нуклеїнову кислоту згідно з даним винаходом. Потомство і варіанти, а також мутанти регеноерованих рослин також включені в об'єм даного винаходу, при умові, що ці частини включають введені послідовності нуклеїнових кислот.

Переважаючий варіант здійснення даного винаходу являє собою трансгенну рослину, яка є гомозиготною для доданої гетерологічної нуклеїнової кислоти; тобто трансгенна рослина, яка містить дві додані послідовності нуклеїнових кислот, один ген в тому ж локусі на кожній хромосомі з пари хромосом. Гомозиготна трансгенна рослина може бути отримана шляхом статевого схрещування (самозапилення) гетерозиготної трансгенної рослини, яка містить єдину додану гетерологічну нуклеїнову кислоту, вирощуванням деяких з отриманого насіння і аналізом рослин, отриманих для зміненої експресії полінуклеотиду згідно з даним винаходом відносно контрольної рослини (тобто, природної, нетрансгенної рослини). Зворотне схрещування з батьківською рослиною і ауткросинг з нетрансгенною рослиною також розглядаються.

Даний винахід може застосовуватися для трансформації рослин будь-яких видів, включаючи, але без обмеження, однодольні і дводольні рослини. Приклади рослин, що представляють інтерес, включають, але без обмеження, наступні: кукурудза (*Zea Mays*), капустові рослини (*Brassica* sp.) (наприклад, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), особливо ті, які застосовуються як джерела рослинної олії, люцерна (*Medicago Sativa*), рис (*Oryza Sativa*), жито (*Secale Cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (наприклад, пеннісетум сизий (*Pennisetum glaucum*), просо посівне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), токуса або коракан (*Eleusine coracana*)), соняшник (*Helianthus Annuus*), сафлор красильний (*Carthamus tinctorius*), пшениця м'яка (*Triticum aestivum*), соя культурна (*Glycine max*), тютюн звичайний (*Nicotiana tabacum*), картопля (*Solanum Tuberosum*), арахіс (*Arachis hypogaea*), бавовник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium Hirsutum*), батат або солодка картопля (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кава (*Coffea* spp.), кокос горіхоносний (*Cocos nucifera*), ананас чубатий (*Ananas comosus*), цитрусові дерева (*Citrus* spp.), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо або персея американська (*Persea americana*), інжир або фікус карійський (*Ficus casica*), гуава або псидіум гуйява (*Psidium guajava*), магніфера індійська (манго) (*Mangifera indica*), олива європейська (*Olea europaea*), папайя (*Carica papaya*), кеш'ю (анакардіум західний) (*Anacardium occidentale*), макадамія (*Macadamia integrifolia*),

мигдаль (*Prunus amygdalus*), цукровий буряк (*Beta vulgaris*), цукрова тростина (*Saccharum spp.*), овес (*Avena sativa*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), овочеві культури, декоративні рослини і дерева хвойних порід.

Овочеві культури включають томати (*Lycopersicon Esculentum*), салат (наприклад, *Lactuca sativa*), квасолю звичайну (*Phaseolus vulgaris*), квасолю лимську (*Phaseolus limensis*), горох (*Lathyrus spp.*), і представників роду *Cucumis*, такі як огірок звичайний (*C. sativus*), диня звичайна (канталуп) (*C. cantalupensis*) і диня столова (*C. melo*). Декоративні рослини включають чагарник рододендрон (*Rhododendron spp.*), гортензію великоквіткову (*Macrophylla hydrangea*), гібіскус китайський (*Hibiscus rosasanensis*), троянди (*Rosa SPP.*), тюльпани (*Tulipa spp.*), нарциси (*Narcissus spp.*), петунію гібридну (*Petunia hybrida*), гвоздику садову (*Dianthus caryophyllus*), молочай найпрекрасніший або пуансетію найпрекраснішу (*Euphorbia pulcherrima*) і хризантему (*Chrysanthemum*). Хвойні дерева, які можуть використовуватися в практиці даного винаходу, включають, наприклад, сосни, такі як сосна ладанна (*Pinus taeda*), сосна Елліона (*Pinus elliotii*), сосна жовта (*Pinus ponderosa*), сосна скручена (*Pinus contorta*) і сосна промениста (*Pinus radiata*); псевдотсугу Мензіса (*Pseudotsuga menziesi*), тсугу канадську (*Tsuga canadensis*); ялину канадську (*Picea glauca*); секвою вічнозелену (або червоне дерево) (*Sequoia sempervirens*); ялиці справжні, такі як ялиця миловидна (*Abies amabilis*) і ялиця бальзамічна (*Abies balsamea*); і туї і кипариси, такі як туя складчаста (*Thuja plicata*) і кипарис нутканський (*Chamaecyparis nootkatensis*). Переважно, рослини згідно з сучасним являють собою рослини сільськогосподарських культур (наприклад, кукурудзу, люцерну, соняшник, капусту, сою, бавовник, соняшник, арахіс, сорго, пшеницю, ячмінь, рис, просо, тютюн і т. д.).

Прокаріотичні клітини можуть бути використані як хазяїни для експресії. Прокаріоти найчастіше представлені різними штамми кишкової палички *E.coli*, однак можуть також використовуватися і інші мікробні штами. Прокаріотичні контрольні послідовності, що звичайно використовуються, які визначені в даному описі для включення промоторів ініціації транскрипції, необов'язково з оператором, нарівні з рибосомними зв'язувальними послідовностями включають такі промотори, що звичайно використовуються, як бета-лактамазні (пеніциліназа) і лактозні (*lac*) промоторні системи (Chang et al. (1977) *Nature* 198: 1056), триптофанові (*trp*) промоторні системи (Goeddel et al. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057), а також лямбда-похідний PL промотор і N-генний рибосомний сайт зв'язування (Shimatake і інш. (1981) *Nature* 292:128). Приклади маркерів селекції для *E.coli*, включають, наприклад, гени, що задають стійкість до ампіциліну, тетрацикліну або хлорамфеніколу.

Вектор вибирають таким чином, щоб дозволити здійснити введення у відповідну клітину-хазяїна. Бактерійні вектори, як правило, походять з плазмиди або фагу. Прийнятні бактерійні клітини інфікують частинками фагового вектора або трансфікують голою ДНК фагового вектора. Якщо використовується плазмідний вектор, бактерійні клітини трансфікують ДНК плазмідного вектора. Системи експресії для експресії білка згідно з даним винаходом доступні при використанні *Bacillus sp.* і *Salmonella* (Palva et al. (1983) *Gene* 22:229-235 and Mosbach et al. (1983) *Nature* 302:543-545).

Різноманітність еукаріотичних систем експресії, таких як дріжджі, клітинні лінії комах, клітини рослин і ссавців, відомі фахівцям даної галузі. Як стисло пояснено нижче, полінуклеотид згідно з даним винаходом може експресуватися в цих еукаріотичних системах. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансформовані/трансфіковані клітини рослин, як обговорюється нижче, використовуються як система експресії для отримання білків згідно з даним винаходом. Такі протимікробні білки можуть використовуватися для будь-якого застосування, включаючи покриття поверхонь цільових мікробів. У цьому випадку цільові мікроби включають людські патогени або мікроорганізми.

Синтез гетерологічних нуклеотидних послідовностей в дріжджах добре відомий. Публікація: Sherman, F., et al. (1982) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory - є добре відомою роботою, в якій описуються різні методи, які можуть використовуватися для отримання білка в дріжджах. Двома видами дріжджів, що широко використовуються для виробництва еукаріотичних білків, є *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia Pastoris*. Вектори, штами і методики експресії в *Saccharomyces* і *Pichia* відомі в даній галузі і доступні з комерційних джерел (наприклад, Invitrogen). Прийнятні вектори, як правило, містять послідовності контролю експресії, такі як промотори, включаючи 3-фосфогліцераткінази або спиртову оксидазу, а також джерело (точку початку) реплікації, послідовності термінації і т. п., як це потрібно.

Білок згідно з даним винаходом відразу після експресування може бути виділений з дріжджів шляхом лізису клітин і застосуванням стандартних методів виділення білка в лізатах. Моніторинг процесу очищення здійснюється за допомогою методик Вестерн-блот-аналізу (Western blot), радіоімунаналізу або інших стандартних методів імуноаналізу.

Нуклеотидні послідовності згідно з даним винаходом можуть також застосовуватися в смисловій орієнтації для пригнічення експресії ендегенних генів в рослинах. Методи пригнічення генної експресії в рослинах з використанням нуклеотидних послідовностей в смисловій орієнтації добре відомі в даній галузі техніки. Методи звичайно включають трансформацію рослин з допомогою ДНК конструкту, що включає промотор, який стимулює експресію в рослині і оперативно зв'язаний щонайменше з частиною нуклеотидної послідовності, яка відповідає транскрипту ендегенного гену. Звичайно така нуклеотидна послідовність має по суті ідентичність до послідовності транскрипту ендегенного гену, переважно більше ніж приблизно 65 % ідентичність послідовності, більш переважно більше ніж приблизно 85 % ідентичність послідовності, найбільш переважно більш ніж приблизно 95 % ідентичність послідовності. Див. Патенти США №№ 5283184 і 5034323, які введені в даний опис у вигляді посилання.

Даний винахід також стосується способу модуляції (тобто збільшення або зменшення) концентрації або композиції поліпептидів згідно з даним винаходом в рослині або її частині. Збільшення або зменшення концентрації і/або зміна композиції поліпептидів в рослині може впливати на модуляцію. Наприклад, збільшення частки поліпептидів згідно з винаходом відносно природних поліпептидів може впливати на модуляцію. Цей спосіб включає введення полінуклеотиду згідно з даним винаходом в рослинну клітину з рекомбінантною експресійною касетою, як описано вище, для отримання трансформованих рослинних клітин, вирощування трансформованої рослинної клітини при відповідних умовах росту і індукцію або пригнічення експресії полінуклеотиду згідно з даним винаходом в рослині протягом часу, достатнього для модуляції концентрації і/або композиції поліпептидів в частині рослини або рослинного.

Підвищення активності і/або рівня АКК поліпептиду

Надані способи підвищення активності і/або рівня мутантних АКК поліпептидів для підвищення стійкості до АКК гербіцидів. Підвищення рівня і/або активності АКК мутантного поліпептиду може бути досягнуте за допомогою надавання рослині АКК поліпептиду. Поліпептид може бути наданий шляхом введення мутантного АКК поліпептиду в рослину, введення в рослину нуклеотидної послідовності, що кодує мутантний АКК поліпептид, або, альтернативно, шляхом зміни геномного локусу, що кодує АКК поліпептид згідно з винаходом.

Як обговорювалося в даному винаході, в даній галузі техніки відома велика кількість способів надавання поліпептиду в рослину, включаючи, але без обмеження, пряме введення поліпептиду в рослину, введення в рослину (тимчасово або стабільно) полінуклеотидного конструкту, що кодує поліпептид, що має підвищену АКК активність. Визнано також, що в способах згідно з даним винаходом може використовуватися полінуклеотид, який не здатний направляти в трансформованій рослині експресію білка або РНК. Таким чином, рівень і/або активність АКК мутантного поліпептиду можуть бути підвищені видозміною гену, що кодує мутантний АКК поліпептид або його промотор. Див., наприклад, Kmies, Патент США № 5565350; Zarling et al. PCT/US93/03868. Отже, надані мутагенізовані рослини, які несуть мутації в АКК генах, де мутації підвищують експресію мутантного АКК гену АКК або підвищують активність поліпептиду, що кодується.

Зниження активності і/або рівня АКК поліпептиду

Надані також способи зниження або усунення активності АКК поліпептиду трансформацією рослинної клітини за допомогою експресійної касети, яка експресує полінуклеотид, що інгібує експресію АСС. Полінуклеотид може інгібувати експресію АКК напряму, шляхом запобігання транскрипції або трансляції месенджерної РНК АКК синтази, або опосередковано, кодуванням поліпептиду, яким інгібує транскрипцію або трансляцію АКК гену, що кодує АКК поліпептид. Способи інгібування або усунення експресії гену в рослині добре відомі в даній галузі техніки, і в даному винаході для інгібування експресії АКК поліпептиду може використовуватися будь-який такий спосіб. Для зменшення або усунення активності поліпептиду АКК синтази може використовуватися безліч способів. Крім того, декілька способів можуть використовуватися для зниження активності єдиного АКК поліпептиду.

1. Способи на основі полінуклеотиду:

У деяких варіантах здійснення даного винаходу рослина трансформується експресійною касетою, здатною експресувати полінуклеотид, який інгібує експресію поліпептиду АКК синтази згідно з винаходом. Термін "експресія", коли використовується в даному описі, стосується біосинтезу генного продукту, включаючи транскрипцію і/або трансляцію вказаного генного продукту. Наприклад, для цілей даного винаходу експресійна касета, здатна експресувати полінуклеотид, який інгібує експресію щонайменше одного поліпептиду АКК синтази, являє собою експресійну касету, здатну продукувати молекулу РНК, яка інгібує транскрипцію і/або трансляцію щонайменше одного поліпептиду АКК синтази згідно з даним винаходом. Термін "експресія" або "продукування" білка або поліпептиду з молекули ДНК стосується транскрипції і

трансляції кодувочої послідовності для отримання білка або поліпептиду, тоді як термін "експресія" або "продукування" білка або поліпептиду з молекули РНК стосується трансляції РНК кодувочої послідовності для продукування білка або поліпептиду.

Приклади полінуклеотидів, які інгібують експресію поліпептиду АКК синтази включають

5 смислову супресію/косупресію, де експресійна касета призначена для експресії молекули РНК, що відповідає всій або частині месенжерної РНК, що кодує АКК синтазний поліпептид в "смисловій" орієнтації, і через експресію молекули РНК може приводити до зниження експресії природного гену; антисмислову супресію, де експресійна касета призначена для експресії молекули РНК, комплементарної до всієї або частини РНК, що кодує АКК синтазний поліпептид і

10 через експресію антисмислової РНК молекули може приводити до зниження експресії природного гену; інтерференцію дволанцюжкової РНК, де молекула смислової РНК, подібна описаній вище для співсупресії і антисмисловій молекулі РНК, яка повністю або частково комплементарна молекулі смислової РНК, експресована в тій же самій клітині, що приводить до

15 інгібування експресії відповідної ендегенної месенжерної мРНК, "шпилькову" РНК інтерференцію і інтрон-вмісну "шпилькову" РНК-інтерференцію, де експресійна касета призначена для експресії молекули РНК, яка самогібридується для утворення структури шпильки, яка включає область одноланцюжкової петлі і стовбур спареної основи; малу інтерферуючу РНК або мікро РНК, де експресійна касета призначена для експресії молекули РНК, яка змодельована по ендегенному гену міРНК.

## 2. Інгібування експресії гену на основі поліпептиду

В одному варіанті здійснення винаходу полінуклеотид кодує білок "цинковий палець", який зв'язується з геном, що кодує АКК поліпептид, приводячи до зниження експресії гену. Методи відбору ділянок для націлення за допомогою білка "цинковий палець" були описані, наприклад, в Патенті США № 6453242, а методи застосування білків "цинковий палець" для інгібування експресії генів в рослинах описані, наприклад, в Патентній публікації США № 2003/0037355, де

25 вказані патенти включені в даний опис у вигляді посилання.

## 3. Інгібування активності білка на основі поліпептиду

У деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотид кодує антитіло, яке зв'язується щонайменше з однією АКК і знижує активність поліпептиду АКК синтази. Експресія антитіл в

30 рослинних клітинах і інгібування молекулярних шляхів за допомогою експресії і зв'язування антитіл з білками в рослинних клітинах добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, публікацію Conrad and Sonnewald, (2003) Nature Biotech. 21: 35-36, яка включена в даний опис у вигляді посилання.

## 4. Розрив гену

У деяких варіантах здійснення даного винаходу активність поліпептиду АКК синтази знижена або усунена шляхом розриву гену, що кодує поліпептид АКК синтази. Ген, що кодує поліпептид АКК синтази, може бути зруйнований будь-яким способом, відомим в даній галузі. Наприклад, в

35 одному варіанті здійснення винаходу ген зруйнований за допомогою мічення транспозону. В іншому варіанті здійснення винаходу ген зруйнований за допомогою мутагенезу рослин з використанням випадкового або направленного мутагенезу і відбором рослин, що мають знижену АКК активність.

У деяких варіантах здійснення винаходу послідовності нуклеїнових кислот згідно з даним винаходом можуть бути зібрані з будь-якою комбінацією полінуклеотидних послідовностей, що представляють інтерес для створення рослин бажаного фенотипу. Наприклад, полінуклеотиди

45 згідно з даним винаходом можуть бути укладені з будь-якими іншими полінуклеотидами згідно з даним винаходом (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 або 6) або з іншими генами, залученими до стійкості до гербіцидів. Комбінації, що генеруються, також можуть включати безліч копій будь-якого одного з полінуклеотидів, що представляють інтерес. Полінуклеотиди згідно з даним винаходом також можуть бути укладені з будь-яким іншим геном або будь-якою комбінацією генів для

50 отримання рослин з безліччю різних комбінацій бажаних ознак, включаючи, але без обмеження, ознаки, бажані для годування тварин, таких як високий вміст олійних генів (наприклад, Патент США № 6232529); збалансований вміст амінокислот (наприклад, гордотіонінів (патенти США №№ 5990389; 5885801; 5885802 і 5703409)); ячміль з високим вмістом лізину (Williamson et al. (1987) Eur. J. Biochem. 165:99-106; і WO 98/20122), а також високометіонінові білки (Pedersen et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:6279; Kiriha et al. (1988) Gene 71:359; Musumura et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:123)); підвищена перетравлюваність (наприклад, модифіковані білки, що накопичуються (modified storage proteins) (Заявка на Патенті США Сер. № 10/053410, заявлена 7 листопада 2001 року)); і тіоредоксини (Заявка на Патенті США Сер. № 10/005429, заявлена 3 грудня 2001); де вміст представлених вище публікацій включений в даний опис у вигляді

60 посилання.

Полінуклеотиди згідно з даним винаходом також можуть бути укладені з ознаками, бажаними для стійкості до комах, захворювань або гербіцидів (наприклад, токсичні для комах білки *Bacillus Thuringiensis* (патенти США №№ 5366892; 5747450; 5737514; 5723756; 5593881; Geiser et al (1986) *Gene* 48: 109); лектини (Van Damme et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:825); гени детоксикації фумонізіну (Патенти США № 5792931); гени авірулентності і стійкості до хвороб (Jones et al. (1994) *Science* 266:789; Martin et al. (1993) *Science* 262: 1432; Mindrinos et al. (1994) *Cell* 78: 1089); ацетолактатсинтази (ALS) мутанти, які приводять до стійкості до гербіцидів, такі як S4 і/або Hra мутації; інгібітори глутамінсинтази, такі як фосфінотрицин або Баста (наприклад, *bar* gene) і стійкість до гліфосату (EPSPS гену і GAT генів)), і ознаки, бажані для технологічних або продуктів, що виробляються, такі як високий вміст масла (патент США № 6232529); модифіковані масла (наприклад, гени десатурази жирних кислот (патент США № 5952544; WO 94/11516)), модифікований крохмаль (наприклад, ADPG-пірофосфорилаза (АГФ), крохмальсинтаза (SS), розгалужувальні ферменти крохмалю (SBE) і дерозгалужувальні ферменти крохмалю (SDBE)), а також полімери або біопластики (Патенти США № 5602321); бета-кетотіолаза, полігідроксибутиратсинтаза і ацетоацетил-KoA-редуктаза (Schubert et al. (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847), які сприяють експресії поліоксіалканоатів (ПГА)), де зміст вказаних публікацій включений в даний опис у вигляді посилання. Можна також об'єднати полінуклеотиди згідно з даним винаходом з полінуклеотидами, що забезпечують агрономічні ознаки, такі як чоловіча стерильність (див. Патент США № 5583210), сильне стебло, час цвітіння або ознаки зміни технологічних властивостей, такі як регуляція клітинного циклу або цілеспрямована зміна генів (див. WO 99/61619, WO 00/17364, WO 99/25821), де зміст вказаних публікацій включений в даний опис за допомогою посилання.

Ці укладені комбінації можуть бути створені будь-яким способом, включаючи, але без обмеження, полінуклеотидні послідовності, що представляють інтерес, які можуть бути об'єднані в будь-який час і в будь-якому порядку. Наприклад, трансгенна рослина, що включає одну або декілька бажаних ознак, може бути використана як мішень для введення додаткових ознак подальшою трансформацією. Ознаки можуть вводитися одночасно відповідно до протоколу спільної трансформації з полінуклеотидами, що представляють інтерес, наданими будь-якою комбінацією касет трансформації. Наприклад, якщо будуть введені дві послідовності, ці дві послідовності можуть міститися в окремих касетах трансформації (транс) або міститися в одній касеті трансформації (цис). Експресія послідовностей може стимулюватися одним і тим же промотором або різними промоторами. У деяких випадках може бути бажано ввести касету трансформації, яка буде пригнічувати експресію полінуклеотиду, що представляє інтерес. Вона може об'єднуватися з будь-якою комбінацією інших касет супресії або касет надекспресії для генерації бажаної комбінації ознак в рослині.

Даний винахід надає спосіб генотипування рослини, який включає полінуклеотид згідно з даним винаходом. Генотипування забезпечує засоби розпізнавання відмінностей гомологів хромосомних пар і може використовуватися для розрізнення сегрегантів в популяції рослин. Способи молекулярних маркерів можуть використовуватися для філогенетичних досліджень, що характеризують генетичний взаємозв'язок варіантів сортів сільськогосподарських культур, ідентифікації схрещувань або соматичних гібридів, локалізацію хромосомних сегментів, що впливають на моногенні ознаки, засновані на картах клонування, і вивчення спадковості кількісних ознак. Див., наприклад, *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Chapter 7, Clark, Ed., Springer-Verlag, Berlin (1997). Методи молекулярних маркерів див., загалом, в публікації *The DNA Revolution* by Andrew H. Paterson 1996 (Chapter 2) in: *Genome Mapping in plants* (Ed., Andrew H. Paterson) by Academic Press/R.G. Lands Company, Austin, Tex., pp. 7-21.

У конкретному способі генотипування в даному винаході може використовуватися будь-яка кількість аналітичних методів молекулярних маркерів, таких як, але без обмеження, методи поліморфізму довжин рестриктних фрагментів (ПДРФ). ПДРФ є результатом алельних відмінностей між фрагментами рестриктних ДНК, які є результатом мінливості нуклеотидних послідовностей. Як добре відомо фахівцям даної галузі техніки, ПДРФ звичайно виявляються за допомогою екстракції геномної ДНК і розщеплення ферментом рестрикції. Фрагменти, що звичайно утворюються, розділяють за розміром і гібридизують із зондом; переважні зонди єдиної копії (single copy probe). Виявляють рестриктні фрагменти з гомологічних хромосом. Відмінності в розмірі фрагментів алелів представляють ПДРФ. Таким чином, даний винахід додатково надає засоби для подальшої сегрегації гену або нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом, а також хромосомних послідовностей, генетично зв'язаного з цими генами або нуклеїнових кислот з використанням таких методів, як ПДРФ-аналіз. Розміри зв'язаних хромосомних послідовностей знаходяться в межах 50 сантиморган (сМ), часто в межах 40 або 30 сМ, переважно в межах 20 або 10 сМ, більш переважно в межах 5, 3, 2 або 1 сМ гену згідно з

даним винаходом.

У даному винаході зонди нуклеїнових кислот, що використовуються для картування молекулярних маркерів рослинних ядерних геномів, гібридизуються в умовах селективної гібридизації з геном, що кодує полінуклеотид згідно з даним винаходом. У переважних варіантах здійснення винаходу зонди вибрані з полінуклеотидів згідно з даним винаходом. Звичайно ці зонди являють собою кДНК-зонди або геномні клони, оброблені рестриктивними ферментами (наприклад, PST I). Довжина зонду звичайно складає щонайменше 15 гетероциклічних основ нуклеїнової кислоти в довжину, більш переважно щонайменше 20, 25, 30, 35, 40 або 50 гетероциклічних основ нуклеїнової кислоти в довжину. Однак звичайно зонди складають менш ніж приблизно 1 кілобазу в довжину. Переважно, зонди являють собою зонди однієї копії, які гібридизуються з унікальним локусом в гаплоїдному хромосомному комплексі. Деякі типові приклади рестриктивних ферментів, що використовуються в ПДРФ картуванні, являють собою EcoRI, EcoRV і SstI. Термін "фермент рестрикції, рестриктивний фермент", коли використовується в даному описі, стосується композиції, яка розпізнає і, сама по собі або в поєднанні з іншою композицією, розщеплює в певному місці нуклеотидну послідовність.

Спосіб виявлення ПДРФ включає наступні стадії: (а) розщеплення геномної ДНК рослини за допомогою ферменту рестрикції, (б) гібридизація зонда нуклеїнової кислоти в умовах селективної гібридизації з послідовністю полінуклеотиду згідно з даним винаходом геномної ДНК, (с) виявлення ПДРФ. Можна отримати і інші методи диференціації поліморфних (алельних) варіантів полінуклеотидів згідно з даним винаходом, використовуючи методи молекулярних маркерів, добре відомі фахівцям даної галузі, включаючи такі методи, як: 1) одноланцюжковий конформаційний аналіз (SSCA), 2) метод денатуруючого градієнтного геле-електрофорезу (DGGE), 3) аналізи захисту від РНКаз, 4) метод алель-специфічних олігонуклеотидів (ASO); 5) використання білків, які розпізнають нуклеотидні неспівпадіння, таких як білок E. coli, mutS; 6) метод алель-специфічної ПЛР. Інші підходи, засновані на виявленні невідповідності між двома комплементарними ланцюгами ДНК, включають фіксовано денатуруючий геле-електрофорез (CDGE), гетеродуплексний аналіз (HA) і хімічне розщеплення помилкового спарювання (CMC). Таким чином, даний винахід також стосується способу генотипування, який включає стадії контактування зразка в жорстких умовах гібридизації, що приблизно містить полінуклеотид згідно з даним винаходом, із зондом нуклеїнової кислоти. Звичайно, зразок являє собою рослинний зразок, переважно зразок, що приблизно містить полінуклеотид кукурудзи згідно з даним винаходом (наприклад, ген, mPDK). Зонд нуклеїнової кислоти селективно гібридизується в жорстких умовах з підпослідовністю полінуклеотиду згідно з даним винаходом, що містить поліморфний маркер. Селективна гібридизація зонду нуклеїнової кислоти з послідовністю нуклеїнової кислоти поліморфного маркера приводить до отримання гібридизаційного комплексу. Виявлення гібридизаційного комплексу вказує на присутність цього поліморфного маркера в зразку. У переважних варіантах здійснення винаходу зонд нуклеїнової кислоти включає полінуклеотид згідно з даним винаходом.

Крім того, визнано, що в способах згідно з винаходом може використовуватися нуклеотидний конструкт, який здатний викликати в трансформованій рослині експресію щонайменше одного білка або щонайменше однієї РНК, такої як, наприклад, антисмислова РНК, яка є комплементарною щонайменше частині мРНК. Звичайно такий нуклеотидний конструкт складається з послідовності, що кодує білок або РНК, функціонально зв'язану з 5' і 3' транскрипційними регуляторними областями. Крім того, також визнано, що в способах згідно з винаходом може використовуватися нуклеотидний конструкт, який не здатний стимулювати в трансформованій рослині експресію білка або РНК.

Визнано також, що способи згідно з даним винаходом не залежать від введення повного нуклеотидного конструкта в геном, якщо рослина або її клітина не змінюється внаслідок введення нуклеотидного конструкта в клітину. В одному варіанті здійснення винаходу геном може бути змінений після введення нуклеотидного конструкта в клітину. Наприклад, нуклеотидний конструкт або будь-яка його частина може вводитися в геном рослини. Зміни в геномі згідно з даним винаходом включають, але без обмеження, додавання, делеції і заміни нуклеотидів в геномі. Хоч способи згідно з даним винаходом не залежать від додатків, делецій або заміщень будь-якого конкретного числа нуклеотидів, визнається, що такі додатки, делеції або заміщення включають щонайменше один нуклеотид.

Далі для демонстрації і додаткової ілюстрації деяких переважних варіантів здійснення винаходу і його аспектів представлені приклади, які не повинні розглядатися як обмеження об'єму даного винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1



Пшениця (*Triticum aestivum* L.), стійка до інгібітору ферменту ацетил-КоА карбоксилази, для застосування в системі обробки сільськогосподарських культур, стійких до гербіцидів

Озиму пшеницю (*Triticum aestivum* L.), стійку до гербіцидів класу інгібіторів ферменту ацетил-КоА карбоксилази (АКК), отримують за допомогою наступного способу:

- 5 Насіння озимої пшениці сорту Hatcher піддають впливу потужного хімічного мутагену (нетрансгенний метод), етанметилсульфонату (EMS), в дозі 0,75 % протягом 2,5 годин. Отримане насіння позначають як М1, а кожне подальше покоління насіння буде позначатися з послідовним збільшенням цифри після М. Це приводить до частоти мутацій в геномі пшениці приблизно 1 мутація на 96 тисяч нуклеотидів (тн) (розраховується в М2-поколінні). Цю пшеницю
- 10 висівають в лютому і урожай збирають в липні. Отримане М2 насіння висаджують в полі у вересні при загальній чисельності популяції 2,5 млн. рослин.

- У травні наступного року поле розділяють на дві частини: одну частину обробляють летальною дозою хізалофопу (~1 мільйон рослин), а іншу частину обробляють летальною дозою клетодиму (~1,5 мільйони рослин). Хізалофоп і клетодим є високоефективними
- 15 інгібіторами АКК (інгібітори синтезу ліпідів). Частину поля, оброблену хізалофопом, обробляють у другий раз в червні. У липні з поля збирають 46 колосків, що вижили, оброблених хізалофопом, і 167 колосків, що вижили, оброблених клетодимом.

- Одночасно невелику частину насіння М2 вирощують в теплиці з січня по квітень. Приблизно 75000 і 175000 рослин відбирають після обробки летальними дозами хізалофопу і клетодиму,
- 20 відповідно. Після застосування невелику частину рослин, що вижили після обробки клетодимом (7 рослин), які, як виявилось, є більш здоровими, ніж інші, відбирають у другий раз. Це перший документально підтверджений показник поліпшеної стійкості до гербіцидів в отриманій мутантній популяції (фігура 1), травень. У загальній складності з цих рослин збирають 26 рослин, що вижили після обробки хізалофопом, і 42 рослини, що вижили після обробки
- 25 клетодимом.

- М3 покоління збирають з поля в теплиці (серпень-жовтень) і відбирають для обробки хізалофопом і клетодимом з двома послідовними смертельними дозами гербіцидів (фігура 2). Деякі рослини виявляють високу здатність до виживання в порівнянні з іншими мутантними
- 30 рослинами і немутагенізованим контролем. Починають деякі попередні характеристичні дослідження по вивченню різних мутацій. На фігурі 3 показані деякі М3 рослини, стійкі до АСС-гербіцидів, в порівнянні з немутагенізованим контролем.

Ці скринінги забезпечують чіткий доказ того, що рослини пшениці набули стійкості до АКК гербіцидів, яка є успадкованою і функціональною.

#### Приклад 2

- 35 Пшениця (*Triticum aestivum* L.), стійка до інгібітору ферменту ацетил-КоА карбоксилази, для застосування в системі обробки сільськогосподарських культур, стійких до гербіцидів

Озиму пшеницю (*Triticum aestivum* L.) з стійкістю до гербіцидів класу інгібіторів ферменту ацетил-КоА карбоксилази (АСС), характеризують за допомогою наступних методів:

- 40 Рослини, що виявляють підвищену толерантність до гербіциду хізалофопу, піддають скринінгу декількома методами для ідентифікації і характеристики причини такого підвищення стійкості. Рослини обстежують на наявність візуальних пошкоджень, відмінностей стійкості до хізалофопу загалом, перехресну стійкість до інших гербіцидів, і оцінюють генотипічно і ферментативно.

- Візуальна оцінка. 18 стійких до хізалофопу рослин з приросту обробляють хізалофопом в дозі 21,05 г аі/га, доза вибрана на основі попередніх досліджень. Рослини оцінюють через 28 днів після обробки (DAT) на наявність видимих пошкоджень хізалофопом по шкалі від 0 до 100 %, де 0 означає відсутність пошкоджень і 100 означає повне всихання рослини. Майже всі
- 45 рослини, оцінені в даному дослідженні, виявляються більш стійкими до хізалофопу, ніж рослини немутантної пшениці сорту Hatcher (фігура 5).

- 50 Отримані рослини містять декілька повністю загиблених рослин, за винятком однієї рослини, яка не відрізнялася від фону.

- Доза-ефект. Дослідження залежності "доза-ефект" проводять з використанням хізалофопу в дозах з 11, 23, 46, 92, і 184 г/м. Через сім днів після обробки верхні частини рослин зрізають вище самого молодого надземного пагона. Біноміальну оцінку виживання рослин проводять
- 55 через 28 днів після обробки. Виявляють відмінності в чутливості рослини в цілому до зростаючих доз хізалофопу. LD<sub>50</sub> знаходиться в інтервалі від 10 г аі га<sup>-1</sup> (для необроблених) до 76 г аі га<sup>-1</sup> (фігура 6). Співвідношення стійких і чутливих рослин для даного експерименту знаходиться в інтервалі від 1,6 до 7,5 з розрахунку на співвідношення рослин, що вижили/загинули.

- 60 Перехресна стійкість. Дослідження перехресної стійкості проводять з використанням

гербіцидів, що впливають на ацетил-КоА карбоксилазу, в дозах, звичайно летальних для пшениці. Клетодим, сетоксидим і флуазифоп використовують в дозах 65, 264, і 361 г аї на га з обробкою клетодимом в поєднанні з хізалофопом в дозі 10,5 г аї на га. Через сім днів після обробки верхні частини рослин зрізають вище самого молодого надземного пагона. Біноміальну оцінку виживання рослин проводять через 28 днів після обробки. Стійкість хізалофопних мутантів до клетодиму і сетоксидиму є низькою (таблиця 1). Наявність будь-якої перехресної стійкості надає докази того, що об'єднання декількох гомологічних стійких до АКК гербіцидів генів в одній рослині може привести до додаткової стійкості до гербіцидів. На цій стадії тільки третина від всієї АКК в рослині буде містити мутації і показувати стійкість до інгібіторів АКК, якщо мутація заснована на цільовому сайті.

Секвенування ДНК. ДНК збирають з 26 хізалофоп-стійких фенотипів. Розробляють геном-специфічні праймери для ампліфікації послідовностей з А, В і D анцестральних геномів пшениці. Отримані послідовності порівнюють з раніше клонованою немутантною послідовністю пшениці для визначення наявності нуклеотидних заміщень. При порівнянні послідовностей з немутантного сорту Hatcher з мутантним фенотипом три несинонімічні мутації виявляють в АКК карбоксилтрансферазному домені, всі в положенні 2004 в системі амінокислотної нумерації *Alopecurus myosuroides*. Ця мутація в А геномі виявлена у восьми зразках, в В геномі в дев'яти зразках, а в D геномі в дев'яти зразках. Немає зразків з більш ніж однією з цих SNS. Мутація являє собою заміщення С на Т, що приводить до заміни аланіну на валін в амінокислотній послідовності (фігура 7). Кожне нове покоління має більш високу здатність до виживання, ніж вихідне покоління, що містить один з цього поліморфізму. Виходячи з хроматографічної картини вважають, що більшість цих SNS також є гомозиготними.

Отримання характеристик ферменту АКК. Ферментний аналіз *in vitro* проводять для дослідження АССази в поєднанні з хізалофопом безпосередньо для визначення наявності мутації АССази, яка знижує здатність гербіцидів інгібувати активність АССази. В аналіз разом з необробленим контролем включені чотири концентрації хізалофопу: 0,1, 1, 10 і 100 мкМ. Експеримент включає в себе чотири зразки, які включають по одному представнику від трьох виявлених мутацій і не мутагенізовану пшеницю. Немутагенізована озима пшениця сорту Hatcher виявляє велику чутливість до хізалофопу, ніж мутантне покоління (фігура 8). Рослини з В і D геномними нуклеотидними заміщеннями показують більш високі рівні стійкості до хізалофопу при 10 мкМ, ніж фон, а рослини з А і D геномними нуклеотидними заміщеннями виявили більшу, ніж фон, стійкість до хізалофопу в концентрації 100 мкМ, при LSD ( $\alpha=0,05$ ) 14,5 і 21,6, відповідно. Розраховане при рівні  $I_{25}$ , значення стійких до сприйнятливих для геному А дорівнює 4,57, для геному В дорівнює 3,57 і для геному D дорівнює 10,86.

На основі цих експериментів встановлено, що основним фактором рослини, стійкої до хізалофопу, є наявність нуклеотидного заміщення С на Т в положенні 2004.

Таблиця 1

Вживання мутанту, стійкого до хізалофопу, після застосування інших АКК гербіцидів

Зразок	Гербіцидна обробка			
	Клетодим	Сетоксидим	Флуазифоп	Кліт.+хіз.
№№	%	%	%	%
0	0	0	0	0
1	10	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	25	0	0	0
9	17	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	8	0	0
12	17	8	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
LSD=16				

Всі публікації і патенти, згадані в даній заявці, включені в даний опис у вигляді посилання. Різні модифікації і зміни описаних способів і композицій по винаходу будуть очевидними для фахівців даної галузі техніки без виділення їх об'єму і суті даного винаходу. Хоч винахід був описаний в зв'язку з конкретними переважними варіантами здійснення, потрібно розуміти, що винахід не повинен бути обмеженим такими конкретними варіантами його здійснення. Дійсно, мається на увазі, що різні модифікації описаних способів здійснення винаходу, які є очевидними для фахівців у відповідних галузях техніки, знаходяться в об'ємі представленої нижче формули винаходу.

## ЗБЕРІГАННЯ

Насіння сортів пшениці AF28, AF26, A10, описаних в даному винаході, зберігаються і зберігалися в Університет штату Колорадо, (Ft. Collins, Colorado 80523) аж до дати подачі цієї заявки на патент і всіх попередніх заявок на патенти, вказаної в посиланнях і введеної в даний опис. Доступ до цього депозиту буде наданий на час розгляду заяви Комісаром по патентах і товарних знаках і особами, визначеними комісаром як що мають право по запиту. Після визнання будь-яких пунктів формули винаходу заявник(и) надасть(дуть) громадськості без обмежень депозит в розмірі не менше за 2500 насіння кожного сорту або лінії в Американській колекції типових культур (ATCC), Rockville, Maryland, 20 852. Насіння, депоноване в ATCC, буде взяте з того ж депозиту, що міститься в Університеті штату Колорадо, який вказаний вище. Крім того, заявник(и) буде(уть) задовольняти всі вимоги 37 CFR з 1,801-1,809, включаючи надавання вказівки життєздатності зразка, коли зроблений депозит. Цей запас вищезазначених сортів пшениці буде міститися в ATCC, який є державним депозитарієм, протягом 30 років або 5 років після останнього запиту, або протягом терміну дії патенту, яким би тривалим він ні був, і буде замінений, якщо протягом цього періоду насіння стане нежиттєздатним. Заявник не буде накладати ніяких обмежень на доступність депозитного матеріалу з ATCC, однак заявник не має право відмовитися від будь-яких обмежень, встановлених законом про передачу біологічного матеріалу або його транспортування для комерційних цілей.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Colorado Wheat Research Foundation, Inc  
Ostlie, Michael  
Haley, Scott  
Westra, Philip  
Valdez, Victoria

<120> РОСЛИНИ, СТИЙКІ ДО ГЕРБИЦИДІВ, ЯКІ ВПЛИВАЮТЬ НА АЦЕТИЛ-КоА  
КАРБОКСИЛАЗУ

<130> 11-046 P09844US01

<150> 61/438,294

<151> 2011-02-01

<150> 61/553,830

<151> 2011-10-31

<160> 16

<170> Патент версіїи 3.5

<210> 1

<211> 1152

<212> ДНК

<213> Triticum aestivum

<400> 1

cgtgttgat ggtctgatga tggcagccct gaacgtgggt ttcagtacat ttatctgact	60
gaagaagacc atgctcgtat tagcaacttct gttatagcgc acaagatgca gcttgataat	120
ggtgaaatta ggtgggttat cgattctgtt gtggggaagg aggatgggct aggtgtggag	180
aacatacatg gaagtctgc tattgccagt gcctattcta gggcctatga ggagacattt	240
acgcttacat ttgtgactgg acggactgtt ggaataggag catatcttgc tcgacttggc	300
atacgggtgca tacacgtac tgaccagccc attatcctaa ctgggttctc tgccttgaac	360
aagcttcttg gccgggaagt ttacagctcc cacatgcagt tgggtggccc caaaattatg	420
gcgacaaacg gtgttgcca totgacagtt tcagatgacc ttgaagggtg atctaataa	480
ttgaggtggc tcagctatgt tcttgccaac attggtggac ctcttctat taaaaatct	540
ttggaccac ctgacagacc cgttgcttac atccctgaga atacatgca tcctcgtgct	600
gccatcagt gcattgatga tagccaagg aaatggttg ggggcatgt cgacaaagac	660
agttttgtgg agacatttga aggatgggag aagtcagttg ttactggcag agctaaactc	720
ggagggattc cgggtgggtg tatagctgtg gagacacaga ctatgatgca gctcatccct	780
gctgatccag gccagcttga ttcccatgag cggctctgtc ctctgtctgg gcaagtctgg	840
tttccagatt cagctactaa gacagcgag gcaatgctgg acttcaaccg tgaaggatta	900
cctctgttca tccttgctaa ctggagaggc ttctctgggt gacaaagaga tcttttgaa	960
ggaatccttc aggtctgggtc aacaattgtt gagaacctta ggacatacaa tcagcctgcc	1020

tttgtatata tccccaaggc tgcagagcta cgtggagggg cttgggtcgt gattgatagc 1080  
aagataaatc cagatcgcat tgagttctat gctgagagga ctgcaaaggg caatgttctc 1140  
gaacctcaag gg 1152

<210> 2  
<211> 1161  
<212> ДНК  
<213> Triticum aestivum

<400> 2  
atcttgcttc cgtgttggat ggtctgatga tggcagccct gaacgtgggt ttcaatatat 60  
ttatctgact gaagaagacc atgctcgat tagcgcttct gttatagcgc acaagatgca 120  
gcttgataat ggtgaaatta ggtgggttat tgattctgtt gtagggaagg aggatgggct 180  
aggtgtggag aacatacatg gaagtgtgc tattgccagt gcctattcta gggcctatga 240  
ggagacattt acgcttacat ttgtgactgg aaggactgtt ggaataggag catatcttgc 300  
tcgacttggc atacggtgca ttcagcgtac tgaccagccc attatcctaa ctgggttttc 360  
tgccctgaac aagcttcttg gccgggaagt gtacagctcc cacatgcagt tgggtggccc 420  
caaaattatg gccacaaacg gtgttgcca tctgacagtt tcagatgacc ttgaaggtgt 480  
atctaataata ttgaggtggc tcagctatgt tectgccaac attggtggac ctcttctat 540  
tacaaaatct ttggaccac ctgacagacc cgttgcttac atccctgaga atacatgtga 600  
tcctctgca gccatcagtg gcattgatga tagccaagg aaatggttg gggcatgtt 660  
cgacaaagac agttttgtg agacatttga aggatgggcg aagtcagtag ttactggcag 720  
agcgaaactc ggagggattc cgggtgggtgt tatagctgtg gagacacaga ctatgatgca 780  
gctcatccct gctgatccag gtcagcttga ttcccatgag cggctctgtc ctctgtctgg 840  
gcaagtctgg ttccagatt cagctactaa gacagcgag gcaatgctgg acttcaaccg 900  
tgaaggatta cctctgttca tccttgctaa ctggagaggc ttctctggtg ggcaaagaga 960  
tctttttgaa ggaatccttc aggtgggtc aacaattgtt gagaacctta ggacatacaa 1020  
tcagcctgcc tttgtatata tccccaaggc tgcagagcta cgtggagggg cttgggtcgt 1080  
gattgatagc aagataaatc cagatcgcat tgagttctat gctgagagga ctgcaaaggg 1140  
caatgttctg aaacctcaag g 1161

<210> 3  
<211> 1129  
<212> ДНК  
<213> Triticum aestivum

<400> 3  
gtgttgatg gtctgatgat ggcagccctg aacgtgggtt tcagtacatt tatctgactg 60  
aagaagacca tgctcgtatt agcaattctg ttatagcgca caagatgcag cttgataatg 120

gtgaaattag gtgggttatt gattctgttg tggggaagga ggatgggcta ggtgtggaga 180  
 acatacatgg aagtgtctgt attgccagtg cctattctag ggcctatgag gagacattta 240  
 cgcttacatt tgtgactgga cggactgttg gaataggagc atatcttgct cgacttgcca 300  
 tacgggtgat acagcgtact gaccagccca ttatcctaac cgggttctct gctttgaaca 360  
 agcttcttggt ccgggaagtgt tacagctccc acatgcagtt ggggtggccc aaaattatgg 420  
 cgacaaacgg tgtgttccat ctgacagttt cagatgacct tgaagggtgtg tctaatatat 480  
 tgagggtggct cagctatggt cctgccaaaca ttggtggacc tcttcctatt acaaaatctt 540  
 tggaccacc tgacagaccc gttgcatata tccctgagaa tacatgtgat cctcgtgcag 600  
 ccatcagtggt cattgatgat agccaaggga aatgggtggg gggcatgttc gacaaagaca 660  
 gttttgtgga gacatttgaa ggatgggcga agtcagtagt tactggcaga gcgaaactcg 720  
 gagggtatcc ggtgggtgtt atagctgttg agacacagac tatgatgcag ctcatccctg 780  
 ctgatccagg ccagcttgat tcccatgagc ggtctgttcc tcgtgctggg caagtctggt 840  
 ttccagattc agctactaag acagctcaag caatgctgga cttcaaccgt gaaggattac 900  
 ctctgttcat ccttgctaac tggagaggct tctctggtgg gcaaagagat ctttttgaag 960  
 gaatccttca ggctgggtca acaattgttg agaacccttag gacatacaat cagcctgcct 1020  
 ttgtatatat cccaaggtc gcagagctac gtggaggggc ttgggtcgtg attgatagca 1080  
 agataaatcc agatcgaatt gagttctatg ctgagaggac tgcaaaggg 1129

<210> 4  
 <211> 1188  
 <212> ДНК  
 <213> Triticum aestivum

<400> 4  
 gatgaagtaa aatcgtgctt cgtgttggat ggtctgatga tggcagccct gaacgtgggt 60  
 ttcagtacat ttatctgact gaagaagacc atgctcgtat tagcacttct gttatagcgc 120  
 acaagatgca gcttgataat ggtgaaatta ggtgggttat tgattctgtt gtggggaagg 180  
 aggatgggct aggtgtggag aacatacatg gaagtgtctc tattgccagt gcctattcta 240  
 gggcctatga ggagacattt acgcttacat ttgtgactgg acggactgtt ggaataggag 300  
 catatcttgc tcgacttggc atacggtgca tacagcgtac tgaccagccc attatcctaa 360  
 ccgggttctc tgctttgaac aagcttcttg gccgggaagt gtacagctcc cacatgcagt 420  
 tgggtggccc caaaattatg gcgacaaacg gtgttgtcca tctgacagtt tcagatgacc 480  
 ttgaagggtgt gtctaataata ttgaggtggc tcagctatgt tcctgccaac attggtggac 540  
 ctcttcctat tacaaaatct ttggaccacac ctgacagacc cgttgcatat atccctgaga 600  
 atacatgtga tcctcgtgca gccatcagtg gcattgatga tagccaaggg aaatgggttg 660

ggggcatgtt cgacaaagac agttttgtgg agacatttga aggatgggag aagtcagtag 720  
 ttactggcag agcgaaactc ggagggattc cggtaggtgt tatagctgtg gagacacaga 780  
 ctatgatgca gctcatccct gctgatccag gccagcttga ttcccatgag cggctctgttc 840  
 ctctgtctgg gcaagtctgg tttccagatt cagttactaa gacagctcaa gcaatgctgg 900  
 acttcaaccg tgaaggatta cctctgttca tccttgctaa ctggagaggc ttctctggtg 960  
 ggcaaagaga tctttttgaa ggaatccttc aggtctgggtc aacaattgtt gagaacctta 1020  
 ggacatacaa tcagcctgcc tttgtatata tccccaaggc tgcagagcta cgtggagggg 1080  
 cttgggtcgt gattgatagc aagataaatc cagatcgaat tgagttctat gctgagagga 1140  
 ctgcaaaggg taatgttctt gaacctcaag ggttgattga gataccag 1188

<210> 5  
 <211> 1194  
 <212> ДНК  
 <213> Triticum aestivum

<400> 5  
 ggcatagcag atgaagtaga gtcttgcttc cgtgttggat ggtctgatga tggcagccct 60  
 gaacgtgggt ttcagtacat ttatctgact gaagaagacc atgctcgtat tagcacttct 120  
 gttatagcgc acaagatgca gcttgataat ggtgaaatta ggtgggttat cgattctgtt 180  
 gtggggaagg aggatgggct aggtgtggag aacatacatg gaagtgtctg tattgccagt 240  
 gctatttcta gggcctatga ggagacattt acgcttacat ttgtgactgg acggactgtt 300  
 ggaataggag catatcttgc tcgacttggc atacgggtgca tacagcgtac tgaccagccc 360  
 attatcctaa ctgggttctc tgccttgaac aagcttcttg gccgggaagt ttacagctcc 420  
 cacatgcagt tgggtggccc caaaattatg gcgacaaacg gtgttgtcca tctgacagtt 480  
 tcagatgacc ttgaaggtgt atctaataa ttgaggtggc tcagctatgt tcctgccaac 540  
 attggtggac ctcttcttat tacaaaatct ttggaccac ctgacagacc cgttcttac 600  
 atccctgaga atacatgcga tcctcgtgct gccatcagtg gcattgatga tagccaaggg 660  
 aaatgggttg ggggcatgtt cgacaaagac agttttgtgg agacatttga aggatgggag 720  
 aagtcagttg ttactggcag agctaaactc ggagggattc cggtaggtgt tatagctgtg 780  
 gagacacaga ctatgatgca gctcatccct gctgatccag gccagcttga ttcccatgag 840  
 cggctctgttc ctctgtctgg gcaagtctgg tttccagatt cagttactaa gacagcgag 900  
 gcaatgctgg acttcaaccg tgaaggatta cctctgttca tccttgctaa ctggagaggc 960  
 ttctctggtg gacaaagaga tctttttgaa ggaatccttc aggtctgggtc aacaattgtt 1020  
 gagaacctta ggacatacaa tcagcctgcc tttgtatata tccccaaggc tgcagagcta 1080  
 cgtggagggg cttgggtcgt gattgatagc aagataaatc cagatcgcgt tgagttctat 1140

gctgagagga ctgcaaaggg caatgtttct gaacctcaag ggttgattga gatg 1194

<210> 6  
<211> 1184  
<212> ДНК  
<213> Triticum aestivum

<400> 6  
tgaagtaaaa tcttgcttcc gtgttgatg gtctgatgat ggcagccctg aacgtgggtt 60  
tcaatatatt tatctgactg aagaagacca tgctcgtatt agcgcttctg ttatagcgca 120  
caagatgcag cttgataatg gtgaaattag gtgggttatt gattctgttg tagggaagga 180  
ggatgggcta ggtgtggaga acatacatgg aagtgcctgt attgccagtg cctattctag 240  
ggcctatgag gagacattta cgcttacatt tgtgactgga aggactgttg gaataggagc 300  
atatcttgct cgacttggca tacggtgcat tcagcgtact gaccagccca ttatcctaac 360  
tgggttttct gccttgaaca agcttcttgg ccgggaagtg tacagctccc acatgcagtt 420  
gggtggcccc aaaattatgg ccacaaacgg tgtgtccat ctgacagttt cagatgacct 480  
tgaaggtgta tctaataat tgaggtggct cagctatgtt cctgcccaaca ttggtggacc 540  
tcttctatt acaaaatctt tggaccacc tgacagacc gttgcttaca tccctgagaa 600  
tacatgtgat cctcgtgcag ccatcagtg cattgatgat agccaaggga aatggttggg 660  
gggcatgttc gacaaagaca gttttgtgga gacatttgaa ggatgggcca agtcagtagt 720  
tactggcaga gcgaaactcg gagggattcc ggtgggtgtt atagctgttg agacacagac 780  
tatgatgcag ctcatccctg ctgatccagg tcagcttgat tcccatgagc ggtctgttcc 840  
tcgtgctggg caagtctggt ttccagattc agttactaag acagcgagg caatgctgga 900  
cttcaaccgt gaaggattac ctctgttcat ccttgctaac tggagaggct tctctggttg 960  
gcaaagagat ctttttgaag gaatccttca ggtgggttca acaattgttg agaaccttag 1020  
gacatacaat cagcctgcct ttgtatatat cccaaggct gcagagctac gtggaggggc 1080  
ttgggtcgtg attgatagca agataaatcc agatgcatt gagttctatg ctgagaggac 1140  
tgcaaagggc aatgttcttg aacctcaagg gttgattgag atgc 1184

<210> 7  
<211> 375  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum

<400> 7

Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser Pro Glu Arg Gly Phe Gln Tyr Ile  
1 5 10 15

Tyr Leu Thr Glu Glu Asp His Ala Arg Ile Ser Thr Ser Val Ile Ala



## UA 123491 C2

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

Pro Arg Ala Gly Gln Val Trp Phe Pro Asp Ser Ala Thr Lys Thr Ala  
275 280 285

Gln Ala Met Leu Asp Phe Asn Arg Glu Gly Leu Pro Leu Phe Ile Leu  
290 295 300

Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly Gly Gln Arg Asp Leu Phe Glu Gly  
305 310 315 320

Ile Leu Gln Ala Gly Ser Thr Ile Val Glu Asn Leu Arg Thr Tyr Asn  
325 330 335

Gln Pro Ala Phe Val Tyr Ile Pro Lys Ala Ala Glu Leu Arg Gly Gly  
340 345 350

Ala Trp Val Val Ile Asp Ser Lys Ile Asn Pro Asp Arg Ile Glu Phe  
355 360 365

Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys  
370 375

<210> 8  
<211> 394  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum

<400> 8

Ser Lys Ile Val Leu Arg Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser Pro Glu  
1 5 10 15

Arg Gly Phe Gln Tyr Ile Tyr Leu Thr Glu Glu Asp His Ala Arg Ile  
20 25 30

Ser Thr Ser Val Ile Ala His Lys Met Gln Leu Asp Asn Gly Glu Ile  
35 40 45

Arg Trp Val Ile Asp Ser Val Val Gly Lys Glu Asp Gly Leu Gly Val  
50 55 60

Glu Asn Ile His Gly Ser Ala Ala Ile Ala Ser Ala Tyr Ser Arg Ala  
65 70 75 80

Tyr Glu Glu Thr Phe Thr Leu Thr Phe Val Thr Gly Arg Thr Val Gly  
85 90 95

Ile Gly Ala Tyr Leu Ala Arg Leu Gly Ile Arg Cys Ile Gln Arg Thr  
100 105 110

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

Pro Asp Arg Ile Glu Phe Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys Gly Asn Val  
370 375 380

Leu Glu Pro Gln Gly Leu Ile Glu Ile Pro  
385 390

<210> 9  
<211> 384  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum

<400> 9

Arg Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser Pro Glu Arg Gly Phe Gln Tyr  
1 5 10 15

Ile Tyr Leu Thr Glu Glu Asp His Ala Arg Ile Ser Thr Ser Val Ile  
20 25 30

Ala His Lys Met Gln Leu Asp Asn Gly Glu Ile Arg Trp Val Ile Asp  
35 40 45

Ser Val Val Gly Lys Glu Asp Gly Leu Gly Val Glu Asn Ile His Gly  
50 55 60

Ser Ala Ala Ile Ala Ser Ala Tyr Ser Arg Ala Tyr Glu Glu Thr Phe  
65 70 75 80

Thr Leu Thr Phe Val Thr Gly Arg Thr Val Gly Ile Gly Ala Tyr Leu  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Ile Arg Cys Ile Gln Arg Thr Asp Gln Pro Ile Ile  
100 105 110

Leu Thr Gly Phe Ser Ala Leu Asn Lys Leu Leu Gly Arg Glu Val Tyr  
115 120 125

Ser Ser His Met Gln Leu Gly Gly Pro Lys Ile Met Ala Thr Asn Gly  
130 135 140

Val Val His Leu Thr Val Ser Asp Asp Leu Glu Gly Val Ser Asn Ile  
145 150 155 160

Leu Arg Trp Leu Ser Tyr Val Pro Ala Asn Ile Gly Gly Pro Leu Pro  
165 170 175

Ile Thr Lys Ser Leu Asp Pro Pro Asp Arg Pro Val Ala Tyr Ile Pro  
180 185 190

Glu Asn Thr Cys Asp Pro Arg Ala Ala Ile Ser Gly Ile Asp Asp Ser  
195 200 205

Gln Gly Lys Trp Leu Gly Gly Met Phe Asp Lys Asp Ser Phe Val Glu  
210 215 220

Thr Phe Glu Gly Trp Ala Lys Ser Val Val Thr Gly Arg Ala Lys Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Ile Ala Val Glu Thr Gln Thr Met Met  
245 250 255

Gln Leu Ile Pro Ala Asp Pro Gly Gln Leu Asp Ser His Glu Arg Ser  
260 265 270

Val Pro Arg Ala Gly Gln Val Trp Phe Pro Asp Ser Ala Thr Lys Thr  
275 280 285

Ala Gln Ala Met Leu Asp Phe Asn Arg Glu Gly Leu Pro Leu Phe Ile  
290 295 300

Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly Gly Gln Arg Asp Leu Phe Glu  
305 310 315 320

Gly Ile Leu Gln Ala Gly Ser Thr Ile Val Glu Asn Leu Arg Thr Tyr  
325 330 335

Asn Gln Pro Ala Phe Val Tyr Ile Pro Lys Ala Ala Glu Leu Arg Gly  
340 345 350

Gly Ala Trp Val Val Ile Asp Ser Lys Ile Asn Pro Asp Arg Ile Glu  
355 360 365

Phe Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys Gly Asn Val Leu Glu Pro Gln Gly  
370 375 380

<210> 10

<211> 398

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 10

Gly Ile Ala Asp Glu Val Glu Ser Cys Phe Arg Val Gly Trp Ser Asp  
1 5 10 15

Asp Gly Ser Pro Glu Arg Gly Phe Gln Tyr Ile Tyr Leu Thr Glu Glu  
20 25 30

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

Val Trp Phe Pro Asp Ser Val Thr Lys Thr Ala Gln Ala Met Leu Asp  
290 295 300

Phe Asn Arg Glu Gly Leu Pro Leu Phe Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly  
305 310 315 320

Phe Ser Gly Gly Gln Arg Asp Leu Phe Glu Gly Ile Leu Gln Ala Gly  
325 330 335

Ser Thr Ile Val Glu Asn Leu Arg Thr Tyr Asn Gln Pro Ala Phe Val  
340 345 350

Tyr Ile Pro Lys Ala Ala Glu Leu Arg Gly Gly Ala Trp Val Val Ile  
355 360 365

Asp Ser Lys Ile Asn Pro Asp Arg Ile Glu Phe Tyr Ala Glu Arg Thr  
370 375 380

Ala Lys Gly Asn Val Leu Glu Pro Gln Gly Leu Ile Glu Met  
385 390 395

<210> 11  
<211> 386  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum

<400> 11

Ser Cys Phe Arg Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser Pro Glu Arg Gly  
1 5 10 15

Phe Gln Tyr Ile Tyr Leu Thr Glu Glu Asp His Ala Arg Ile Ser Ala  
20 25 30

Ser Val Ile Ala His Lys Met Gln Leu Asp Asn Gly Glu Ile Arg Trp  
35 40 45

Val Ile Asp Ser Val Val Gly Lys Glu Asp Gly Leu Gly Val Glu Asn  
50 55 60

Ile His Gly Ser Ala Ala Ile Ala Ser Ala Tyr Ser Arg Ala Tyr Glu  
65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Leu Thr Phe Val Thr Gly Arg Thr Val Gly Ile Gly  
85 90 95

Ala Tyr Leu Ala Arg Leu Gly Ile Arg Cys Ile Gln Arg Thr Asp Gln  
100 105 110

Pro Ile Ile Leu Thr Gly Phe Ser Ala Leu Asn Lys Leu Leu Gly Arg  
115 120 125

Glu Val Tyr Ser Ser His Met Gln Leu Gly Gly Pro Lys Ile Met Ala  
130 135 140

Thr Asn Gly Val Val His Leu Thr Val Ser Asp Asp Leu Glu Gly Val  
145 150 155 160

Ser Asn Ile Leu Arg Trp Leu Ser Tyr Val Pro Ala Asn Ile Gly Gly  
165 170 175

Pro Leu Pro Ile Thr Lys Ser Leu Asp Pro Pro Asp Arg Pro Val Ala  
180 185 190

Tyr Ile Pro Glu Asn Thr Cys Asp Pro Arg Ala Ala Ile Ser Gly Ile  
195 200 205

Asp Asp Ser Gln Gly Lys Trp Leu Gly Gly Met Phe Asp Lys Asp Ser  
210 215 220

Phe Val Glu Thr Phe Glu Gly Trp Ala Lys Ser Val Val Thr Gly Arg  
225 230 235 240

Ala Lys Leu Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Ile Ala Val Glu Thr Gln  
245 250 255

Thr Met Met Gln Leu Ile Pro Ala Asp Pro Gly Gln Leu Asp Ser His  
260 265 270

Glu Arg Ser Val Pro Arg Ala Gly Gln Val Trp Phe Pro Asp Ser Ala  
275 280 285

Thr Lys Thr Ala Gln Ala Met Leu Asp Phe Asn Arg Glu Gly Leu Pro  
290 295 300

Leu Phe Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly Gly Gln Arg Asp  
305 310 315 320

Leu Phe Glu Gly Ile Leu Gln Ala Gly Ser Thr Ile Val Glu Asn Leu  
325 330 335

Arg Thr Tyr Asn Gln Pro Ala Phe Val Tyr Ile Pro Lys Ala Ala Glu  
340 345 350

Leu Arg Gly Gly Ala Trp Val Val Ile Asp Ser Lys Ile Asn Pro Asp



355 360 365

Arg Ile Glu Phe Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys Gly Asn Val Leu Asn  
370 375 380

Leu Lys  
385

<210> 12  
<211> 394  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum

<400> 12

Glu Val Lys Ser Cys Phe Arg Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser Pro  
1 5 10 15

Glu Arg Gly Phe Gln Tyr Ile Tyr Leu Thr Glu Glu Asp His Ala Arg  
20 25 30

Ile Ser Ala Ser Val Ile Ala His Lys Met Gln Leu Asp Asn Gly Glu  
35 40 45

Ile Arg Trp Val Ile Asp Ser Val Val Gly Lys Glu Asp Gly Leu Gly  
50 55 60

Val Glu Asn Ile His Gly Ser Ala Ala Ile Ala Ser Ala Tyr Ser Arg  
65 70 75 80

Ala Tyr Glu Glu Thr Phe Thr Leu Thr Phe Val Thr Gly Arg Thr Val  
85 90 95

Gly Ile Gly Ala Tyr Leu Ala Arg Leu Gly Ile Arg Cys Ile Gln Arg  
100 105 110

Thr Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Gly Phe Ser Ala Leu Asn Lys Leu  
115 120 125

Leu Gly Arg Glu Val Tyr Ser Ser His Met Gln Leu Gly Gly Pro Lys  
130 135 140

Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Leu Thr Val Ser Asp Asp Leu  
145 150 155 160

Glu Gly Val Ser Asn Ile Leu Arg Trp Leu Ser Tyr Val Pro Ala Asn  
165 170 175

Ile Gly Gly Pro Leu Pro Ile Thr Lys Ser Leu Asp Pro Pro Asp Arg

```

180              185              190

Pro Val Ala Tyr Ile Pro Glu Asn Thr Cys Asp Pro Arg Ala Ala Ile
  195              200              205

Ser Gly Ile Asp Asp Ser Gln Gly Lys Trp Leu Gly Gly Met Phe Asp
  210              215              220

Lys Asp Ser Phe Val Glu Thr Phe Glu Gly Trp Ala Lys Ser Val Val
  225              230              235

Thr Gly Arg Ala Lys Leu Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Ile Ala Val
              245              250              255

Glu Thr Gln Thr Met Met Gln Leu Ile Pro Ala Asp Pro Gly Gln Leu
              260              265              270

Asp Ser His Glu Arg Ser Val Pro Arg Ala Gly Gln Val Trp Phe Pro
              275              280              285

Asp Ser Val Thr Lys Thr Ala Gln Ala Met Leu Asp Phe Asn Arg Glu
              290              295              300

Gly Leu Pro Leu Phe Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly Gly
  305              310              315              320

Gln Arg Asp Leu Phe Glu Gly Ile Leu Gln Ala Gly Ser Thr Ile Val
              325              330              335

Glu Asn Leu Arg Thr Tyr Asn Gln Pro Ala Phe Val Tyr Ile Pro Lys
              340              345              350

Ala Ala Glu Leu Arg Gly Gly Ala Trp Val Val Ile Asp Ser Lys Ile
              355              360              365

Asn Pro Asp Arg Ile Glu Phe Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys Gly Asn
  370              375              380

Val Leu Glu Pro Gln Gly Leu Ile Glu Met
  385              390

```

```

<210> 13
<211> 12753
<212> ДНК
<213> Alopecurus myosuroides Huds

<400> 13
tcagtttatg gcagtcctgtg ttggaagaac actgcaactc cgctgtctgt ccaaaggag

```

60

gacgatggga tccacacatc tgcccattgt cgggtttaat gcatccacaa caccatcgct	120
atccactcct cgccagataa actcagctgc tgctgcattc caatcttcgt ccccttcaag	180
gtcatccaag aagaaaagcc gacgtgttaa gtcaataagg gatgatggcg atggaagcgt	240
gccagaccct gcaggccatg gccagtctat tcgccaaagt gaaccacagga ccatctcctt	300
acttttttgt cgtcaacctc agacttgcac agatttactt tcttgattga gagcatgctt	360
gttttagtgt aagatatctc aatactgtat caaaaatga tagttaagaa caaaccacta	420
caccaatcct cacatatgtt tcttattggg ttgctaaat cttagtctgc attagatttt	480
tttatgtcta tgctgacacc ctgagcctcc ccgtgtctct gcattgagat tcaagcaggg	540
ataggggaaa tcacgactgg atccttagcc ataattaaat ctctgtcaac ttaggtgtag	600
atggactctg tttttaatat tcagtatgat gttttcttaa gggagaggga caaaaaata	660
catgtatggt gcagtttaag aatttatgac tgaatgtttt gatgatataa tagttctgga	720
aaagaaggat gcctagattt tgtatttttg ataaatgtag ttataaaatt cgaaagggtg	780
gcaaaccatt gcttcttctt agctattgtg ttggcttgct cagtttccaa tgcatatctg	840
gatgtaggtc tcgctggcat catcgacctc ccaaaggagg gcgcacagc tccagatgtg	900
gacatttcac agtaagtacc tcagcacact cacattatag cttagtcttc ttgaaagaac	960
aggcaaaaa gtataacgca tgtataattc ctagatttca cttgtcttat tatcgttacg	1020
ctgaaatggt gaagttgtaa attcgttatt ctcatagatt tacacctcta tgtacatcat	1080
agttatgcac tatgcacctg ctgtgagttc tggaaattga accattcagc gcactgcaat	1140
ctgtaagggt ttgtttttat ataatatggt tataaatcat gttcaacctc tgcacttaca	1200
acattattta tgttgtgtat agtatatagt aatgttacag ggtgagattt tgctatataa	1260
gttatgaaac ttgtgtttta ctttgtaaag ggaacatcc tcaaacctgt tcttagtggt	1320
tacagcccag gcacatggcc gttgcactgt atggagtatt gttgggcact tacagaacat	1380
tttattggaa agactttttc atataagtat tgtttaaatt taattgccaa ctgaaacct	1440
tacccgata acaagatgaa taaccacctt gcgtttttga ttcatactag gcattactat	1500
gtcatatgta ttacggtgac cgcagtaata actttgctct ttcttttcta gtgggtctga	1560
agaccacaag gcctcctacc aaatgaatgg gatactgaat gaatcacata acgggaggca	1620
cgctctctg tctaaagttt atgaattttg cacggaattg ggtggaaaaa caccaattca	1680
cagtgtatta gtgcccaaca atggaatggc agcagctaag ttcatgcgga gtgtccggac	1740
atgggcta at gatacatttg ggtcagagaa ggcgattcag ttgatagcta tggcaactcc	1800
ggaagacatg agaataaatg cagagcacat tagaattgct gatcagtttg ttgaagtacc	1860
tggtggaaca aacaataaca actatgcaaa tgtccaactc atagtggagg tcagtactgg	1920
tcaccccttg atgtgcagtt atgcacaagc tcctcttttg tctttagcat gacatggcaa	1980

cttcactttt gcagatagca gagagaactg gtgtctccgc cgtttggcct ggttggggcc	2040
atgcatctga gaatcctgaa ctccagatg cactaactgc aaaaggaatt gtttttcttg	2100
ggccaccagc atcatcaatg aacgcactag gcgacaaggt tggttcagct ctcatgtctc	2160
aagcagcagg ggttcccact ctgtcttga gtggatcaca tgtaagcctc acattctctc	2220
tgataaatca tcacctgata tttatggtgg atgcattatg taacctatga cttttttatt	2280
ctaggtggaa attccattag aactttgttt ggactcgata cctgaggaga tgtataggaa	2340
agcctgtgtt acaaccgtg atgaagcagt tgcaagttgt cagatgattg gttaccctgc	2400
catgatcaag gcatcctggg gtggtggtgg taaagggatt agaaaggtag attattcatt	2460
tgattggact gtacacaaga gattgtgtgg gctgtgatat tttgtgcaca gtgttagccc	2520
taaccttttt aacatattaa ctcgatatct ctgtcaggtt aataatgatg acgaggtgaa	2580
agcactgttt aagcaagtac agggtagagt tcttggtctc ccgatattta tcatgagact	2640
tgcatctcag gtagacttc tctggaagtt ctattttcca agcgtgctgt atctgggttg	2700
tatattgtac gtatggaagc tttatttgct ctttcttaca ggctaaaatt gtatcctgta	2760
atctgtacta atattgtaat tttcatttaa atccctctcc cctttccttt tgtagagtcg	2820
tcatcttgaa gtccagctgc tttgtgatga atatggcaat gtagcagcac ttcacagtcg	2880
tgattgcagt gtgcaacgac gacacccaaa ggtagctgc tccaaactga aatcatcact	2940
tttatttcgg ttctgcttta cgtgtagttt tgatcaaatg gttcaactgt gtccattttg	3000
tttgtttata acagattatc gaggaaggac cagttactgt tgctctctgt gaaacagtga	3060
aagagctaga gcaagcagca agggaggctg ctaaggccgt gggttacgtc ggtgctgcta	3120
ctgttgaata tctctacagc atggagactg gtgaatacta ttttctggag cttaatccac	3180
ggttgcaggt ttgttctttt ggacactctc caggacttct attttgttg cagtcgttta	3240
cattgttaaa tggctctatat tcaggttgag caccagtcac ccgagtcgat agctgaagta	3300
aatttgctg cagcccaagt tgcagttggg atgggtatac ccctttggca gattccaggt	3360
aataataata tcattgtaaa gagtttcgtt tctgtcccat gttctttctg tctaactatc	3420
tccttattca gagatcagac gtttctacgg aatggacaat ggaggaggct atgatatttg	3480
gagggaaaaca gcagctctcg ctactccatt caactttgat gaagtagatt ctcaatggcc	3540
gaagggcat tgtgtggcag ttaggataac cagtgagaat ccagatgatg gattcaagcc	3600
tactggtgga aaagtaaaagg tgggatttcc taatgttata tctatgtttc aattacacta	3660
cggtagtaaa actgatctga tcttgatttt ttctgtatat ttcaggagat aagttttaaa	3720
agtaagccaa atgtctgggg atatttctca gtttaaggtaa gctgttcata gctctgttgc	3780
agggtcactt tgttttgagt tccgcagaag attagctctgc aagattttta ttcgaattag	3840

tattctcatt ttggtttttg actaagtatt gatccaatca acaaattattg tctctccctt	3900
catctgtttt cagtctgggtg gaggcattca tgaatttgcg gattctcagt ttggtatgta	3960
aatgtaacg taatgaatat tctcttttgc tattcgtaact gatccttaca ttggaattgc	4020
tcttttcatt acaggacacg tttttgccta tggagagact agatcagcag caataaccag	4080
catgtctctt gcactaaaag agattcaaat tcgtggagaa attcatacaa acgttgatta	4140
cacggttgat ctcttgaatg taagtaacaa taacaatttg ttgaatccta cttttgatgt	4200
gatacaacca ttttacatcc ggctttcctt caaaataatc ccattctgtg gtttctcgta	4260
tctttaattc aggccccaga cttcagagaa aacacgatcc ataccggttg gctggatacc	4320
agaatagcta tgcgtgttca agctgagagg cctccctggt atatttcagt ggttgaggga	4380
gctctatatg taagatatga aactatgtta atgttactgc aacttttggc aagccaatct	4440
tgaaaaacac tagtgtttaa ttgaaataat tgttttgtgc tgtagaaaac aataaccacc	4500
aatgcggaga ccgtttctga atatgttagc tatctcatca agggtcagat tccaccaaag	4560
gtagtgtctt aatgggctta aactctgtat attgcttgaa ggtggacatt gctgaccagt	4620
gtttttgtgc agcacatata ccttgtccat tcaactattt ctttgaatat agaggaaagc	4680
aaatatacag taagtgtgac attccttaaa aaaagactct cagttacaat gaaatgatac	4740
ttacactgat gctcatctac accatgccac agattgagat tgtgaggagt ggacagggtta	4800
gctacagatt gagactgaat ggatcactta ttgaagccaa tgtacaaaca ttatgtgatg	4860
gaggcccttt aatgcaggta ccttctttct tttacttgct cataaatgtg atataatgtc	4920
tgctgaaata gttctgattc tttagttgta atgtctccag ctggatggaa atagccatgt	4980
tatttatgct gaagaagaag cgggtggtac acggcttctt attgatggaa aaacatgctt	5040
gctacaggta agaataattct gtttgtttgc tctttataa tcttagtggt tgatggtagg	5100
actttatatt cttatttgtg actttttaga gcatccacaa cccaaagcgc ttaggtagac	5160
gcttaaatat aaaaaataa atacttaaaa agagtaaaac ggataagagt tgctacctgc	5220
aacgcccggc gcttaatctg aggcgcttaa tccggtatag ctacaggccg tcgctgcctt	5280
tttgctgcaa aaagaaaggg taagcgtcag gcgcatactt tggcgtcgat gtcacccga	5340
cgctaggatt tgtgggcata accgtcgggt tggccaggat tttcttccta gcacggagg	5400
ctaagcggcc cgttgtggct gctcttactg cattcacctc ttgaccatta gcacttcatt	5460
ttttacactt catctgtatt gcttctgctg tttctcaatt atagtatttc caatgaccac	5520
tctttagtaa ttttaacaat tgccaattta tcataatacg gggcaaaaaa gtaggcgtcc	5580
ttaacaccat gtcatgtaac ctataataag cttgtgataa aatcatttgt gatacaatag	5640
aacagttgaa tactttatga tttctttctt acatgaatac tttatgattc ttgatgacgc	5700
tgcactgtat cctaagctac ataaattaca aatcgttttg cagaatgacc atgatccgtc	5760

aaggttatta gctgagacac cctgcaaact tcttcgtttc ttgattgccg atgggtgtca	5820
tgttgatgct gatgtaccat acgcggaagt tgaggttatg aagatgtgca tgccccctctt	5880
gtgcctgct gctggtgtca ttaatgtttt gttgtctgag ggccaggcga tgcaggttat	5940
attactgcc ttttgttgct totgctgtta aaagccattg catgcgaagc atctgaactt	6000
aatatatttt gtttcaggct ggtgatctta tagcgagact tgatctcgat gacccttctg	6060
ctgtgaagag agccgagcca tttgaaggat cttttccaga aatgagcctt cctattgctg	6120
cttctggcca agttcacaaa agatgtgctg caagtttgaa cgctgctcga atggtccttg	6180
caggatatga ccatgcggcc aacaaagtaa acatcaagac attttatctc atgtttcctg	6240
cttttctcaa ataccattct ttaatagtat gaattctgga ttattctgac ttattggcat	6300
tttctgcctt ttgtaccaa atggtttcta atctatagaa gttcttgagc ttgtctttgc	6360
aaatcttgat ttaatgcttt tcttgatgt tcatcact catthtatgat aggttgcaat	6420
tatcttctg ctattttctt tctctcagt aaatcatgat ggatgctctt tctgttatgt	6480
tcatcatgct gtctattatc ctgtgctat ttttctatth ccagtagtgg atgtattggt	6540
ttaataatth ctgatcaaac ttgtattht gttgttatth atacttggt cctttttcag	6600
gttggtgcaag atttggtatg gtgccttgat acacctgctc ttcctttcct acaatgggaa	6660
gagcttatgt ctgttttagc aactagactt ccaagacgct ttaagagcga ggtatgtgat	6720
aattgatatg atatgcagaa tcaggcataa agggacattg atacatttaa tttatgatat	6780
agaagggtct tcatctcga ttaaaagatc aattcactta tcatgattta cattctacat	6840
tgttgaatca ccttggtaat ttgccgtaac ttattgggca actattagct tttctaataa	6900
cgtaatcaaa attcagaata ttttacttca attcttcgta acatggaaca tttggtactt	6960
cgtctcattt atttgcactg tacgctgttt tagttggttt gccattctaa ctgaatcttt	7020
aaagttctta cttatthtgg ttttaaccag atcttgthta tttatctttt ataactthct	7080
tatgttctgc ctcaacggtt tatacttht atgcatccag ttggagggca aatacaatga	7140
atacaagtta aatgttgacc atgtgaagat caaggatttc cctaccgaga tgcttagaga	7200
gacaatcgag gtcagthttht gtttcttatg gcacccagct ctaaattata ctatthttht	7260
taacaagtht tctthtagga aaatcttgca tgtgtthtccg agaaggaaat ggtgacaatt	7320
gagaggcttg ttgacctct gatgagcctg ctgaagtcac acgagggtgg gagagaaagc	7380
catgcccact ttattgtcaa gtccctthttht gaggagtatc tctcggttga ggaactatth	7440
agtgatggca ttcaggtht cttaacactth taaactgagc agatctacta gagtcattht	7500
ctaagggtca taatthtcca gaacctcttg ggtgattaag tagcaaaaat aatttgta	7560
cgacttacga cttgctthct tcgaaacact tthcactcat tatthtctc aaaaatgtgc	7620

atTTTgtagt ctgacgtgat tgaacgcctg cgctacaat atagtaaaga cctccagaag	7680
gtTgtagaca ttgttttTgc tcaccaggta aactactttt tggcctaata acttggtgca	7740
aatgatcaca gaaacaatct ttgttactga tagtttgatt tgttctaggg tgtgagaaac	7800
aaaacaaagc tgatactgc gctcatggag aaactggtct atccaaaccc tgcTgcctac	7860
agagatcagt tgattcgctt ttcttccctc aaccataaaa gatattataa ggtgacaatg	7920
gcgacctaaa gtaatggaag ctttttgatt aatttgTgt gatattttag gctaataat	7980
tactttcatt gtaattatgc agttggctct taaagctagt gaacttcttg aacaaaccaa	8040
gctcagcgaa ctccgcacaa gcattgcaag gaacctttca gcgctggata tgttcaccga	8100
ggaaaaggca gatttctcct tgcaagacag aaaattggcc attaatgaga gcatgggaga	8160
tttagtcaact gcccactgc cagttgaaga tgcacttggt tctttgtttg attgtactga	8220
tcaaactctt cagcagagag tgattgagac atacatatct cgattatacc aggtattaca	8280
tgagctatTT ttttctggat ttattatac tctctctcag catttctgga agcataaact	8340
aaggTtccta atgaaataag atactcagt tttcattaag ataaatccta gataatctag	8400
gcgtgggaag atttgattta gaacttTtag gcatgttact gctctgtaag ttggctaact	8460
tgccaatgat attttcagcc tcaactTgtg aaggatagca tccagctgaa atatcaggat	8520
tctggTgtta ttgctttatg ggaattcact gaaggaaatc atgagaagag attgggtgct	8580
atggttatcc tgaagtcaact agaatctgtg tcaacagcca ttggagctgc tctaaaggat	8640
gcatcacatt atgcaagctc tgcgggcaac acggtgcata ttgctttggt ggatgctgat	8700
acccaactga atacaactga agataggtat gtTcatgtgc agtattagtg cagatgagtt	8760
tatttggTgc aaaaataagt taatctatTT ctttcagtgg tgataatgac caagctcaag	8820
acaagatgga taaactttct ttgtactga aacaagatgt tgtcatggct gatctacgtg	8880
ctgctgatgt caaggTgtt agttgcattg ttcaaagaga tggagcaatc atgcctatgc	8940
gccgtacctt cctcttTtca gagggaaaaac ttgtttacga ggaagagccg attcttcggc	9000
atgtggagcc tccactttct gcaacttctg agttggtagt caactccatc aaactgacta	9060
ogtgctgttt tgatatatTT taatgctttc attttgttat ttgctacttg tattcactta	9120
gcttgctgtg gatacaggat aaattgaaag tgaaaggata caatgagatg aagtatacac	9180
ogtcacgtga tcgtcagtgg catatataca cacttagaaa tactgaaaat ccaaaaatgc	9240
tgcacagggt atttttccga acacttTtca gacaaccag tgcaggcaac aggtttacat	9300
cagaccatat cactgatgtt gaagtaggac atgcagagga acctctttca ttacttcaa	9360
gcagcatatt aaaatcgTtg atgattgcta aagaagaatt ggagcttcac gcgatcagga	9420
ctggccattc tcatatgtac ttgtgcatat tgaaagagca aaagcttctt gacctgttc	9480
ctgtttcagg gtaagcctgc acatcgTtct ttttgagaa catgtattcc ttgctcttgt	9540

gttctgcctt ctcaatgagc ttttcacgt actcaggaac actgttggtg atgttggtca	9600
agatgaagct actgcatgct ctcttttgaa agaaatggct ttaaagatac atgaacttgt	9660
tggtgaaga atgcatcatc tttctgtatg ccagtgggaa gtgaaactta agttggtgag	9720
cgatgggctt gccagtggta gctggagagt tgtaacaacc aatgttactg gtcacacctg	9780
cactgtggat gtgagtttta tctccttgct tctgtttttt ctgcatggaa ctaatgaaac	9840
tgaagtgaac atattatata tgtgacatac ataggactat catctttgat tatcataaaa	9900
aaagaactat catcttcgtt tcgtttgttg tcatctccac ctcatctttg gtctgaatct	9960
catggtgctt ttaatgcttt tagatctacc gggaggctga agatacagaa tcacagaaac	10020
tagtatacca ctccaccgca ttgtcatctg gtcttttgca tggtgttgca ctgaatactt	10080
cgtatcaacc tttagtgtt attgatttaa aacgttgctc tgccaggaac aacaaaacta	10140
catactgcta tgattttcca ttggttagta tctatctcta tatgtattat gttagcaggt	10200
tcttattggt attacatgct ctaaactga caacaactca aaatgtagac atttgaagct	10260
gcagtgcaga agtcgtggct taacatttcc agtgaaaaca accaatgtta tgttaaagcg	10320
acagagcttg tgtttgctga aaagaatggg tcgtggggca ctctataat tcctatgcag	10380
cgtgctgctg ggctgaatga cattggtatg gtagcctgga tcttgacat gtccactcct	10440
gaatttccca gcggcagaca gatcattgtt atcgcaaatg atattacatt tagagctgga	10500
tcatttggcc caaggggaaga tgcatttttc gaagctgtaa ccaacctggc ttgtgagaag	10560
aagcttccac ttatctactt ggctgcaaac tctggtgctc ggattggcat tgctgatgaa	10620
gtaaaatctt gcttccgtgt tggatggact gatgatagca gccctgaacg tggatttagg	10680
tacatttata tgactgacga agaccatgat cgtattggct cttcagttat agcacacaag	10740
atgcagctag atagtggcga gatcaggtgg gttatcgatt ctgttggtggg aaaagaggat	10800
ggactagggtg tggagaacat acatggaagt gctgctattg ccagtgccta ttctagggcg	10860
tacgaggaga catcttacct tacattcgtt actggacgaa ctgttggaat cggagcctat	10920
cttgctcgac ttggcatacg gtgcatacag cgtattgacc agcccattat tttgactggg	10980
ttttctgccc tgaacaagct tcttgggcgg gaggtgtaca gctccacat gcagttgggt	11040
ggtcccaaaa tcatggcgac gaatggtgtt gtccatctga ctgttcaga tgacctgaa	11100
ggtgtttcta atattattgag gtggctcagc tatgttcctg caaacattgg tggacctctt	11160
cctattacaa aatcttttga cccaatagac agaccctgtg catacatccc tgagaataca	11220
tgtgatcctc gtgcagccat cagtggcatt gatgacagcc aagggaatg gttgggtggc	11280
atgtttgaca aagacagttt tgtggagaca tttgaaggat gggcgaagac agtagttact	11340
ggcagagcaa aacttgaggg gattcctgtt ggtgttatag ctgtggagac acagacctg	11400



atgcagctcg tccccgctga tccaggccag cctgattccc acgagcggtc tgttcctcgt 11460  
gctgggcaag tttggtttcc agattctgct accaagacag cgcaggcgat gttggacttc 11520  
aaccgtgaag gattacctct gttcatactt gctaactgga gaggccttctc tggagggcaa 11580  
agagatcttt ttgaaggaaa tctgcaggct gggtaacaaa ttgttgagaa ccttaggaca 11640  
tacaatcagc ctgcctttgt atatatcccc aaggetgcag agctacgtgg aggagcctgg 11700  
gtcgtgattg atagcaagat aaaccagat cgcacgagt gctatgctga gaggactgca 11760  
aagggtaatg ttctcgaacc tcaagggttg attgagatca agttcaggtc agaggaactc 11820  
aaagaatgca tgggtaggct tgatccagaa ttgatagatc tgaaagcaag actccaggga 11880  
gcaaatggaa gcctatctga tggagaatcc cttcagaaga gcatagaagc tcggaagaaa 11940  
cagttgctgc ctctgtacac ccaaactcgc gtacgttttg cggaattgca cgacacttcc 12000  
cttagaatgg ctgctaaagg tgtgatcagg aaagttgtag actgggaaga ctctcggtct 12060  
ttcttctaca agagattacg gaggaggcta tccgaggacg ttctggcaaa ggagattaga 12120  
ggtgtaattg gtgagaagtt tcctcacaaa tcagcgatcg agctgatcaa gaaatggtac 12180  
ttggcttctg aggcagctgc agcaggaagc accgactggg atgatgacga tgcttttctc 12240  
gcctggaggg agaaccctga aaactataag gaatatatca aagagcttag ggctcaaagg 12300  
gtatctcggg tgctctcaga tgttgaggc tccagttcgg atttacaagc cttgccgcag 12360  
ggtctttcca tgctactaga taaggtagc atacttacag ttttacctgc atctgtttat 12420  
ttgcaagtat tttatcgagg ttgagtatgt cctgctatct tattcaaata tagtatctta 12480  
ccaaataata tctaagacgc tggatacttt gttcagatgg atccctctaa gagagcacag 12540  
tttatcgagg aggtcatgaa ggtcctgaaa tgatcaaatg ataccaacac atccaataca 12600  
gtatgtgcat gatatctgtt tctcttgaag tacatatata gatggatata aggcggctgt 12660  
aactgatggt agctaactctg ggccaacat tacttttctg aacttgctgg tggcttttat 12720  
tattcaaggc acagctcgcc ttggacccc ctc 12753

<210> 14

<211> 2320

<212> PRT

<213> Alopecurus myosuroides Huds

<400> 14

Met Gly Ser Thr His Leu Pro Ile Val Gly Phe Asn Ala Ser Thr Thr  
1 5 10 15

Pro Ser Leu Ser Thr Leu Arg Gln Ile Asn Ser Ala Ala Ala Phe  
20 25 30

Gln Ser Ser Ser Pro Ser Arg Ser Ser Lys Lys Lys Ser Arg Arg Val

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

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

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

Pro Tyr Ala Glu Val Glu Val Met Lys Met Cys Met Pro Leu Leu Ser  
805 810 815

Pro Ala Ala Gly Val Ile Asn Val Leu Leu Ser Glu Gly Gln Ala Met  
820 825 830

Gln Ala Gly Asp Leu Ile Ala Arg Leu Asp Leu Asp Asp Pro Ser Ala  
835 840 845

Val Lys Arg Ala Glu Pro Phe Glu Gly Ser Phe Pro Glu Met Ser Leu  
850 855 860

Pro Ile Ala Ala Ser Gly Gln Val His Lys Arg Cys Ala Ala Ser Leu  
865 870 875 880

Asn Ala Ala Arg Met Val Leu Ala Gly Tyr Asp His Ala Ala Asn Lys  
885 890 895

Val Val Gln Asp Leu Val Trp Cys Leu Asp Thr Pro Ala Leu Pro Phe  
900 905 910

Leu Gln Trp Glu Glu Leu Met Ser Val Leu Ala Thr Arg Leu Pro Arg  
915 920 925

Arg Leu Lys Ser Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Asn Glu Tyr Lys Leu Asn  
930 935 940

Val Asp His Val Lys Ile Lys Asp Phe Pro Thr Glu Met Leu Arg Glu  
945 950 955 960

Thr Ile Glu Glu Asn Leu Ala Cys Val Ser Glu Lys Glu Met Val Thr  
965 970 975

Ile Glu Arg Leu Val Asp Pro Leu Met Ser Leu Leu Lys Ser Tyr Glu  
980 985 990

Gly Gly Arg Glu Ser His Ala His Phe Ile Val Lys Ser Leu Phe Glu  
995 1000 1005

Glu Tyr Leu Ser Val Glu Glu Leu Phe Ser Asp Gly Ile Gln Ser  
1010 1015 1020

Asp Val Ile Glu Arg Leu Arg Leu Gln Tyr Ser Lys Asp Leu Gln  
1025 1030 1035

Lys Val Val Asp Ile Val Leu Ser His Gln Gly Val Arg Asn Lys

1040		1045		1050
Thr Lys Leu Ile Leu Ala Leu Met Glu Lys Leu Val Tyr Pro Asn				
1055		1060		1065
Pro Ala Ala Tyr Arg Asp Gln Leu Ile Arg Phe Ser Ser Leu Asn				
1070		1075		1080
His Lys Arg Tyr Tyr Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ser Glu Leu Leu				
1085		1090		1095
Glu Gln Thr Lys Leu Ser Glu Leu Arg Thr Ser Ile Ala Arg Asn				
1100		1105		1110
Leu Ser Ala Leu Asp Met Phe Thr Glu Glu Lys Ala Asp Phe Ser				
1115		1120		1125
Leu Gln Asp Arg Lys Leu Ala Ile Asn Glu Ser Met Gly Asp Leu				
1130		1135		1140
Val Thr Ala Pro Leu Pro Val Glu Asp Ala Leu Val Ser Leu Phe				
1145		1150		1155
Asp Cys Thr Asp Gln Thr Leu Gln Gln Arg Val Ile Glu Thr Tyr				
1160		1165		1170
Ile Ser Arg Leu Tyr Gln Pro Gln Leu Val Lys Asp Ser Ile Gln				
1175		1180		1185
Leu Lys Tyr Gln Asp Ser Gly Val Ile Ala Leu Trp Glu Phe Thr				
1190		1195		1200
Glu Gly Asn His Glu Lys Arg Leu Gly Ala Met Val Ile Leu Lys				
1205		1210		1215
Ser Leu Glu Ser Val Ser Thr Ala Ile Gly Ala Ala Leu Lys Asp				
1220		1225		1230
Ala Ser His Tyr Ala Ser Ser Ala Gly Asn Thr Val His Ile Ala				
1235		1240		1245
Leu Leu Asp Ala Asp Thr Gln Leu Asn Thr Thr Glu Asp Ser Gly				
1250		1255		1260
Asp Asn Asp Gln Ala Gln Asp Lys Met Asp Lys Leu Ser Phe Val				
1265		1270		1275

Leu	Lys	Gln	Asp	Val	Val	Met	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Asp	Val
1280						1285					1290			
Lys	Val	Val	Ser	Cys	Ile	Val	Gln	Arg	Asp	Gly	Ala	Ile	Met	Pro
1295						1300					1305			
Met	Arg	Arg	Thr	Phe	Leu	Leu	Ser	Glu	Glu	Lys	Leu	Cys	Tyr	Glu
1310						1315					1320			
Glu	Glu	Pro	Ile	Leu	Arg	His	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Ala	Leu
1325						1330					1335			
Leu	Glu	Leu	Asp	Lys	Leu	Lys	Val	Lys	Gly	Tyr	Asn	Glu	Met	Lys
1340						1345					1350			
Tyr	Thr	Pro	Ser	Arg	Asp	Arg	Gln	Trp	His	Ile	Tyr	Thr	Leu	Arg
1355						1360					1365			
Asn	Thr	Glu	Asn	Pro	Lys	Met	Leu	His	Arg	Val	Phe	Phe	Arg	Thr
1370						1375					1380			
Leu	Val	Arg	Gln	Pro	Ser	Ala	Gly	Asn	Arg	Phe	Thr	Ser	Asp	His
1385						1390					1395			
Ile	Thr	Asp	Val	Glu	Val	Gly	His	Ala	Glu	Glu	Pro	Leu	Ser	Phe
1400						1405					1410			
Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Lys	Ser	Leu	Met	Ile	Ala	Lys	Glu	Glu
1415						1420					1425			
Leu	Glu	Leu	His	Ala	Ile	Arg	Thr	Gly	His	Ser	His	Met	Tyr	Leu
1430						1435					1440			
Cys	Ile	Leu	Lys	Glu	Gln	Lys	Leu	Leu	Asp	Leu	Val	Pro	Val	Ser
1445						1450					1455			
Gly	Asn	Thr	Val	Val	Asp	Val	Gly	Gln	Asp	Glu	Ala	Thr	Ala	Cys
1460						1465					1470			
Ser	Leu	Leu	Lys	Glu	Met	Ala	Leu	Lys	Ile	His	Glu	Leu	Val	Gly
1475						1480					1485			
Ala	Arg	Met	His	His	Leu	Ser	Val	Cys	Gln	Trp	Glu	Val	Lys	Leu
1490						1495					1500			
Lys	Leu	Val	Ser	Asp	Gly	Pro	Ala	Ser	Gly	Ser	Trp	Arg	Val	Val
1505						1510					1515			

Thr	Thr	Asn	Val	Thr	Gly	His	Thr	Cys	Thr	Val	Asp	Ile	Tyr	Arg
1520						1525					1530			
Glu	Val	Glu	Asp	Thr	Glu	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	His	Ser	Thr
1535						1540					1545			
Ala	Leu	Ser	Ser	Gly	Pro	Leu	His	Gly	Val	Ala	Leu	Asn	Thr	Ser
1550						1555					1560			
Tyr	Gln	Pro	Leu	Ser	Val	Ile	Asp	Leu	Lys	Arg	Cys	Ser	Ala	Arg
1565						1570					1575			
Asn	Asn	Lys	Thr	Thr	Tyr	Cys	Tyr	Asp	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Glu
1580						1585					1590			
Ala	Ala	Val	Gln	Lys	Ser	Trp	Ser	Asn	Ile	Ser	Ser	Glu	Asn	Asn
1595						1600					1605			
Gln	Cys	Tyr	Val	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Val	Phe	Ala	Glu	Lys	Asn
1610						1615					1620			
Gly	Ser	Trp	Gly	Thr	Pro	Ile	Ile	Pro	Met	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly
1625						1630					1635			
Leu	Asn	Asp	Ile	Gly	Met	Val	Ala	Trp	Ile	Leu	Asp	Met	Ser	Thr
1640						1645					1650			
Pro	Glu	Phe	Pro	Ser	Gly	Arg	Gln	Ile	Ile	Val	Ile	Ala	Asn	Asp
1655						1660					1665			
Ile	Thr	Phe	Arg	Ala	Gly	Ser	Phe	Gly	Pro	Arg	Glu	Asp	Ala	Phe
1670						1675					1680			
Phe	Glu	Ala	Val	Thr	Asn	Leu	Ala	Cys	Glu	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu
1685						1690					1695			
Ile	Tyr	Leu	Ala	Ala	Asn	Ser	Gly	Ala	Arg	Ile	Gly	Ile	Ala	Asp
1700						1705					1710			
Glu	Val	Lys	Ser	Cys	Phe	Arg	Val	Gly	Trp	Thr	Asp	Asp	Ser	Ser
1715						1720					1725			
Pro	Glu	Arg	Gly	Phe	Arg	Tyr	Ile	Tyr	Met	Thr	Asp	Glu	Asp	His
1730						1735					1740			
Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Ser	Val	Ile	Ala	His	Lys	Met	Gln	Leu	Asp
1745						1750					1755			



Ser Gly	Glu Ile Arg Trp	Val	Ile Asp Ser Val	Val	Gly Lys Glu
1760		1765		1770	
Asp Gly	Leu Gly Val Glu Asn	Ile His Gly Ser	Ala	Ala Ile Ala	
1775		1780		1785	
Ser Ala	Tyr Ser Arg Ala Tyr	Glu Glu Thr Phe	Thr	Leu Thr Phe	
1790		1795		1800	
Val Thr	Gly Arg Thr Val Gly	Ile Gly Ala Tyr	Leu	Ala Arg Leu	
1805		1810		1815	
Gly Ile	Arg Cys Ile Gln Arg	Ile Asp Gln Pro	Ile	Ile Leu Thr	
1820		1825		1830	
Gly Phe	Ser Ala Leu Asn Lys	Leu Leu Gly Arg	Glu	Val Tyr Ser	
1835		1840		1845	
Ser His	Met Gln Leu Gly Gly	Pro Lys Ile Met	Ala	Thr Asn Gly	
1850		1855		1860	
Val Val	His Leu Thr Val Pro	Asp Asp Leu Glu	Gly	Val Ser Asn	
1865		1870		1875	
Ile Leu	Arg Trp Leu Ser Tyr	Val Pro Ala Asn	Ile	Gly Gly Pro	
1880		1885		1890	
Leu Pro	Ile Thr Lys Ser Leu	Asp Pro Ile Asp	Arg	Pro Val Ala	
1895		1900		1905	
Tyr Ile	Pro Glu Asn Thr Cys	Asp Pro Arg Ala	Ala	Ile Ser Gly	
1910		1915		1920	
Ile Asp	Asp Ser Gln Gly Lys	Trp Leu Gly Gly	Met	Phe Asp Lys	
1925		1930		1935	
Asp Ser	Phe Val Glu Thr Phe	Glu Gly Trp Ala	Lys	Thr Val Val	
1940		1945		1950	
Thr Gly	Arg Ala Lys Leu Gly	Gly Ile Pro Val	Gly	Val Ile Ala	
1955		1960		1965	
Val Glu	Thr Gln Thr Met Met	Gln Leu Val Pro	Ala	Asp Pro Gly	
1970		1975		1980	
Gln Pro	Asp Ser His Glu Arg	Ser Val Pro Arg	Ala	Gly Gln Val	

1985	1990	1995
Trp Phe Pro Asp Ser Ala Thr 2000	Lys Thr Ala Gln Ala 2005	Met Leu Asp 2010
Phe Asn Arg Glu Gly Leu Pro 2015	Leu Phe Ile Leu Ala 2020	Asn Trp Arg 2025
Gly Phe Ser Gly Gly Gln Arg 2030	Asp Leu Phe Glu Gly 2035	Asn Leu Gln 2040
Ala Gly Ser Thr Ile Val Glu 2045	Asn Leu Arg Thr Tyr 2050	Asn Gln Pro 2055
Ala Phe Val Tyr Ile Pro Lys 2060	Ala Ala Glu Leu Arg 2065	Gly Gly Ala 2070
Trp Val Val Ile Asp Ser Lys 2075	Ile Asn Pro Asp Arg 2080	Ile Glu Cys 2085
Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys 2090	Gly Asn Val Leu Glu 2095	Pro Gln Gly 2100
Leu Ile Glu Ile Lys Phe Arg 2105	Ser Glu Glu Leu Lys 2110	Glu Cys Met 2115
Gly Arg Leu Asp Pro Glu Leu 2120	Ile Asp Leu Lys Ala 2125	Arg Leu Gln 2130
Gly Ala Asn Gly Ser Leu Ser 2135	Asp Gly Glu Ser Leu 2140	Gln Lys Ser 2145
Ile Glu Ala Arg Lys Lys Gln 2150	Leu Leu Pro Leu Tyr 2155	Thr Gln Ile 2160
Ala Val Arg Phe Ala Glu Leu 2165	His Asp Thr Ser Leu 2170	Arg Met Ala 2175
Ala Lys Gly Val Ile Arg Lys 2180	Val Val Asp Trp Glu 2185	Asp Ser Arg 2190
Ser Phe Phe Tyr Lys Arg Leu 2195	Arg Arg Arg Leu Ser 2200	Glu Asp Val 2205
Leu Ala Lys Glu Ile Arg Gly 2210	Val Ile Gly Glu Lys 2215	Phe Pro His 2220

Lys Ser Ala Ile Glu Leu Ile Lys Lys Trp Tyr Leu Ala Ser Glu  
2225 2230 2235

Ala Ala Ala Ala Gly Ser Thr Asp Trp Asp Asp Asp Asp Ala Phe  
2240 2245 2250

Val Ala Trp Arg Glu Asn Pro Glu Asn Tyr Lys Glu Tyr Ile Lys  
2255 2260 2265

Glu Leu Arg Ala Gln Arg Val Ser Arg Leu Leu Ser Asp Val Ala  
2270 2275 2280

Gly Ser Ser Ser Asp Leu Gln Ala Leu Pro Gln Gly Leu Ser Met  
2285 2290 2295

Leu Leu Asp Lys Met Asp Pro Ser Lys Arg Ala Gln Phe Ile Glu  
2300 2305 2310

Glu Val Met Lys Val Leu Lys  
2315 2320

<210> 15  
<211> 12683  
<212> ДНК  
<213> Alopecurus myosuroides Huds

<400> 15  
tcagtttatg gcagtctgtg tttgaagaac actgcaactc cgctgtctgt ccaaagggag 60  
gacgatggga tccacacatc tgccattgt cggtttaa gcattccaca caccatcgct 120  
atccactctt cgccagataa actcagctgc tgctgcattc caatcttcgt ccccttcaag 180  
gtcatccaag aagaaaagcc gacgtgttaa gtcaataagg gatgatggcg atggaagcgt 240  
gccagaccct gcaggccatg gccagtctat tcgccaaagt gaacctagga ccatctcctt 300  
acttttttgt cgtcaaacctc agacttgcat agatttactt tcttgattga gagcatgctt 360  
gttttagtgt aagatatctc aatactgtat cacaaaatga tagttaagaa caaatcacta 420  
caccaatctt cacatatgtt tcttattggg tttgctaaat cttagttcgc attagatttt 480  
tttatgtcta tgctgacacc ctgagcctcc ccgtgtctct gcattgagat tcaagcaggg 540  
attagggaaa tcacgactgg atcagaaggc aagcaccatc gccttagcca taattaaatc 600  
tctgtcaacc taggtgtaga tggactctgt ttttaatat cagtatgatg tttctttaag 660  
ggagagggac acaaaaatat agtaagtaga agccttacct tcggaaaata cccatttaac 720  
ctctggggagc atttgctact gcctagaaaa atccactttt taaagtttca ataattgcaa 780  
agacaagtta ctatgtgata gtacaaagtt tgggtggagaa acaacttttt ggtctatgta 840  
ataaaaaaga caaatatatg acacatgtat gttgcagttt aagaatttat gactgaatgt 900

tttgatgata taatagttct ggaaaagaag gatgcctaga ttttgttttt tgataaatgt	960
agttataaaa ttcgaaaggt tggcaaacca ttgcttcttc ttagctattg tgttggttg	1020
ctcagtttcc aatgcatatc tggatgtagg tctcgtggtc atcatcgacc tcccaaagga	1080
gggcgcacat gctccagatg tggacatttc acagtaagta cctcagcaca ctcacattat	1140
agcttagttc tcttgaaaga acagcaaaaa tgtataacgc atgtatagtt cctagatttc	1200
acttgtctta ttatcggtac gctgaaatgt tgaagtgtga aattcggtat tctcatagat	1260
ttacacctct atgtacatct atgcactatg cacctgctgt gagtcttgga aattgaacca	1320
ttcagcgcac tgcaatctgt aaggttttgt ttttatataa tatggttata aatcatgttc	1380
aacctctgca tctacaacat tatttatgtg tggatatagta tatagtaatg ttacagggtg	1440
agattttgct atataagtta tgaaacttgt gttcaacttt gtaaaggga acatcctcaa	1500
acctgttctt agtggttaca gcccaggcac atggccgttg cactgtatgg agtattgttg	1560
ggcacttaca aaacatttta ttggaaagat tttttgatat aagtattgtt taaatttaat	1620
tgccaactga aacccttacc cggataacaa gatgaataac ccacttgctt ttttgattca	1680
tactaggcat tactacgtca tatgtattac ggtgaccgca gtaataactt tgctctttct	1740
tttctagtgg gtctgaagac cacaaggcct cctaccaa atgaatgggata ctgaatgaat	1800
cacataacgg gaggcacgcc tctctgtcta aagtttatga atttgcacg gaattgggtg	1860
gaaaaacacc aattcacagt gtattagtcg ccaacaatgg aatggcagca gctaagttca	1920
tgccggagtgt ccggacatgg gctaatagata catttgggtc agagaaggcg attcagttga	1980
tagctatggc aactccggaa gacatgagaa taaatgcaga gcacattaga attgctgac	2040
agtttggtga agtacctggt ggaacaaaca ataacaacta tgcaaatgtc caactcatag	2100
tggaggtcag tactgggtcat cccttgatgt gcagttatgc acaagctcct ctttgggtctt	2160
tagcatgaca tggcaacttc acttttgagc atagcagaga gaactgggtg ctccgccgtt	2220
tggcctggtt ggggccatgc atctgagaat cctgaacttc cagatgcaact aactgcaaaa	2280
ggaattgttt ttcttgggcc accagcatca tcaatgaacg cactaggcga caaggttggt	2340
tcagctctca ttgctcaagc agcaggggtt ccactcttg cttggagtgg atcacacgta	2400
agcctcacat tctctctgat aaatcatcac ctgatatttg tgggtggatgc attatgtaac	2460
ctatgacatt tttattatag gtggaaattc cattagaact ttgtttggac tcgatacctg	2520
aggagatgta taggaaagcc tgtgttataa ccgctgatga agcagttgca agttgtcaga	2580
tgattgggta ccctgccatg atcaaggcat cctgggggtg tgggtggtaaa gggattagaa	2640
aggtacatta ttcatttgat tggactgtac acaagagatt gtgtgggctg tgatattttg	2700
tgcacagtgt tagccctaac ctttttaaca tattaactcg atatctcttg caggttaata	2760

atgatgacga ggtgaaagca ctgtttaagc aagtacaggg tgaagttcct ggctccccga	2820
tatttatcat gagacttgca tctcaggta gacttctcta gaagttctat tttccaagcg	2880
tgctgtatct gggttgtata ttgtacgtat ggaagcttta tttgtctctt cttacaggct	2940
aaaattgtat cctgtaatct gtactaatat tgtaattttc atttaaatec ctctccccct	3000
tccctttgta gaggctcat cttgaagtc agctgctttg tgatgaatat ggcaatgtag	3060
cagcacttca cagtcgtgat tgcagtgatc aacgacgaca ccaaaaggta tgctgctcca	3120
aactgaaatc atcactttta tttcggttct gctttacgtg tagttttgat caaatggttc	3180
aactgtgtcc attttgtttg ttataacag attatcgagg aaggaccagt tactgttgct	3240
cctcgtgaaa cagtgaaga gctagagcaa gcagcaagga ggcttgctaa ggccgtgggt	3300
tacgtcgggt ctgctactgt tgaatatctc tacagcatgg agactgggta atactatatt	3360
ctggagctta atccacggtt gcaggtttgt tcttttgac actctccagg acttctatatt	3420
tgttggcagt cgtttacatt gttaaatggt ctatattcag gttgagcacc cagtcaccga	3480
gtcgtatagct gaagtaaatt tgccctgcgc ccaagttgca gttgggatgg gtatacccct	3540
ttggcagatt ccaggtaata ataatatcat tgtaaagagt ttcgtttctg tcccatgttc	3600
ttctgtctca actatctcct tattcagaga tcagacgttt ctacggaatg gacaatggag	3660
gaggctatga tatttgaggg aaaacagcag ctctcgtac tccattcaac tttgatgaag	3720
tagattctca atggccgaag ggtcattgtg tggcagttag gataaccagt gagaatccag	3780
atgatggatt caagcctact ggtggaaaag taaagggtgg atttcctaatt gttatatcta	3840
tgtttcaatt aactacggt tagtaaatct atctgatctt gatttttttc gtatatttca	3900
ggagataagt tttaaaagta agccaaatgt ctggggatat ttctcagttt aggtaagctg	3960
ttcatagctc tgttgacagg tcatcttggt ttgagttccg cagaagatta gtctgcaaga	4020
tttttattcg aattagtatt ctcatcttggt tttttgacta agtattgatc caatcaacaa	4080
atattgtctc tcccttcacg tgttttcagt ctgggtggagg cattcatgaa tttgcggatt	4140
ctcagtttgg tatgtaaaat gtgacgtaat gaatattcct ctttgcattt cgtattgatc	4200
cttacattgg aattgctcct ttcatcacag gacatgtttt tgcctatgga gagactagat	4260
cagcagcaat aaccagcatg tctcttgcat taaaagagat tcaaattcgt ggagaaattc	4320
atacaaacgt tgattacacg gttgatctct tgaatgtaag taacaataac aatttgttga	4380
atcctacttt tgatgtgata caaccatttt acatccggtt ttccctcaaa ataatcccat	4440
tctgtggttt ctctgatctt taattcaggc ccagacttc agagaaaaca cgatccatac	4500
cggttggctg gataccagaa tagctatgct tgttcaagct gagaggctc cctggtatat	4560
ttcagtgggt ggaggagctc tatatgtaag atatgaaact atgttaattgt tactgcaact	4620
tttggaagc caatcttgaa aaacagtagt gtttaattga aataattgtt ttgtgctgta	4680

gaaaacaata accaccaatg cggagaccgt ttctgaatat gttagctatc tcatcaaggg	4740
tcagattcca ccaaaggtag tgtcttaatg ggcttaaact ctgtatattg cttgaagggtg	4800
gacattgctg accattgttt ttgtgcagca tatatccctt gtccattcaa ctatttcttt	4860
gaatatagag gaaagcaaata atacagtaag tgtgacattc cttaaaaaaa gactctcagt	4920
tacaatgaaa tgatacttac actgatgctc atctacacca tgccacagat tgagattgtg	4980
aggagtggac agggtagcta cagattgaga atgaatggat cacttattga agccaatgta	5040
caaacattat gtgatggagg ccttttaatg caggtaacct cttctcttta cttgctcata	5100
aatgtgatat aatgtctgct gaaagagttc tgattcttta gttgtaatgt ctccagctgg	5160
atggaaaatag ccatgttatt tatgctgaag aagaagcggg tggtaacacag cttcttattg	5220
atggaaaaac atgcttgcta caggtaagaa tattctgttt gtttgcctct ttataatctt	5280
agtgtttgat ggtaggactt tatattctta tttgtgactt tttactgcat tcacctcttg	5340
accattagca cttcattttt tacacttcat ctgtattgct tctgctgttt ctcaattata	5400
gttattccaa tgaccactct ttagtaattt taacaattgc caatttatca taatacgggg	5460
caaaaaagta ggtgtcctta acaccatgct atgtaacctt taataagctt gtgataaaat	5520
catttgatgat ataatagaac aattgaatac tttatgattt cttctcttaca tgaatacttt	5580
atgattcttg atgacgctgc actgtatcct aaactacata aattacaaat cgttttgcag	5640
aatgaccatg atccgtcaag gttattagct gagacacctt gcaaacttct tcgtttcttg	5700
attgccgatg gtgctcatgt tgatgctgat gtaccatacg cggaagtga ggttatgaag	5760
atgtgcatgc cctcttgctc gctgctgctt ggtgtcatta atgttttggt gtctgagggc	5820
caggcgatgc aggttatatt actgcccttt tgttgcttct gctgataaaa gccattgcat	5880
gtgaagcatc tgaacttaat atattttggt tcaggctggt gatcttatag cgagacttga	5940
tctcgatgac ccttctgctg tgaagagagc tgagccattt gaaggatctt ttccagaaat	6000
gagccttctt attgctgctt ctggccaagt tcacaaaaga tgtgctgcaa gtttgaacgc	6060
tgctcgaatg gtccttgcat gatatgacca tgccggccaac aaagtaaaca tcaagacatt	6120
ttatctcatg tttctgctt ttctcaaata ccattcttta atagtatgaa ttctggatta	6180
ttctgactta ttggcatttt ctgccttttg ctaccaaagtg gtttctaatc tatagaagtt	6240
cttgagcttg tctttgcaaa tctcgattta atgcttttct tgtatgttca tcatactcat	6300
ttatgatagg ttgcatttat ccttctgcta ttttcttttc tctcagtaaa tcatgatgga	6360
tgctctttct gttatgttca tcatgctgct tattatcctt gtgctatttt tctatttcca	6420
gtagtggatg tattggttta ataattcctg atcaaacttt gtattttggt gttatttata	6480
cttggcttcc ttttcagggt gtgcaagatt tggatatggt ccttgataca cctgctcttc	6540

ctttcctaca atgggaagag cttatgtctg ttttagcaac tagacttcca agacgtctta	6600
agagcgaggt atgtgataat tgatatgata tgcagaatca ggcataaagg gacattgata	6660
catttaattt atgatataga agggctctca tcctcgatta aaagatcaat tcacttatca	6720
tgatttacat tctacattgt tgaatcacct tggtaatgtg ccgtaactta ttgggcaact	6780
attagctttt ctaataacgt aatcaaaatt cagaatattt tacttcaatt ctctgtaaca	6840
tggaacattt ggtacttcgt ctcatcttatt tgcactgtac gctgttttag ttggtttgcc	6900
attctaactg aatctttaaa gttcttactt atttggtttt aaccagatc ttgtttattt	6960
atcttttata actttcttat gttctgcctc aacggttcat actttttatg catccagttg	7020
gagggcaaat acaatgaata caagttaaat gttgacctg tgaagatcaa ggatttcctt	7080
accgagatgc ttagagagac aatcgaggtc agtttttgtt tcttatggca tcccagtcta	7140
aattatacta ttttttgtaa caagttttct tttaggaaaa tcttgcatgt gtttcgaga	7200
aggaaatggg gacaattgag aggcttggtg accctctgat gaacctgctg aagtcatacg	7260
agggtgaggg agaaagccat gcccaactta ttgtcaagtc cctttttgag gagtatctct	7320
cggttgagga actattcagt gatggcattc aggttatcta acacttctaa actgagcaga	7380
tctactagag tcattttcta agggtcataa ttttccagaa cctcttgggt gattaagtag	7440
caaaaaatat ttgtacacga cttacgaact acttccttcg aaacactttt cactcattat	7500
tttcctcaaa atgtgccatt ttgtagtctg acgtgattga acgcctgcgc ctacaatata	7560
gtaaagacct ccagaagggt gtagacattg ttttgtctca ccaggtaaac tactttttgg	7620
cctaatagact tggtgcaagt gatcacagaa acaatctttg ttactgatag ttgatttgt	7680
tctaggggtg gagaacaaaa acaaagctga tactcgcgct catggagaaa ctggtctatc	7740
caaaccctgc tgccacaga gatcagttga ttcgcttttc ttocctoaac cataaaagat	7800
attataaggt gacaatggcg acctaaagta atggaagctt tttgattaat ttgttgtgat	7860
attttaggct aatgaattac tttcattgta attctgcagt tggctcttaa agctagtgaa	7920
cttcttgaac aaaccaagct cagcgaactc cgcacaagca ttgcaaggaa cctttcaacg	7980
ctggatatgt tcaccgagga aaaggcagat ttctccttgc aagacagaaa attggccatt	8040
aatgagagca tgggagattt agtcactgcc ccaactgccag ttgaagatgc acttgttct	8100
ttgtttgatt gtactgatca aactcttcag cagagagtga ttgagacata catatctcga	8160
ttataccagg tattacatga gctatttttt tctggatttt attatactct ctctcagcat	8220
ttctggaagc ataaactaag gttcctaag aaataagata ctcaagtgtt cattaagata	8280
aatcctagat aatctaggcg tggaagatt tgatttagaa cttgtaggca tgttactgct	8340
ctgtaagttg gctaacttgc caatgatatt ttcagcctca acttgtgaag gatagcatcc	8400
agctgaaata tcaggattct ggtgttattg ctttatggga attcactgaa ggaaatcatg	8460

agaagagatt ggggtgctatg gttatcctga agtcactaga atctgtgtca acagccattg	8520
gagctgctct aaaggatgca tcacattatg caagctctgc gggcaacacg gtgcatattg	8580
ctttgttgga tgctgatacc caactgaata caactgaaga taggtatggt catgtgcagt	8640
attagtgcag atgagtttat ttggtgcaaa aataagttaa tctatttcct tcagtggatga	8700
taatgaccaa gctcaagaca agatggataa actttctttt gtactgaaac aagatgttgt	8760
catggtgat ctacgtgctg ctgatgtcaa ggttgtagt tgcattgttc aaagagatgg	8820
agcaatcatg cctatgcgcc gtaccttctt cttgtcagag gaaaaacttt gttacgagga	8880
agagccgatt cttcggcatg tggagcctcc actttctgca cttcttgagt tggtagcaa	8940
ctccatcaaa ctgactacgt gctgttttga tataatttaa tgctttcact ttgttatttg	9000
ctacttgat tcaacttagct tgctgtggat acaggataaa ttgaaagtga aagatacaa	9060
tgagatgaag tatacacctg cacgtgatcg tcagtggcat atatacacac ttagaaatac	9120
tgaaaatcca aaaatgctgc acagggtatt ttccgaaca ctagtacagc aaccagtg	9180
aggcaacagg ttacatcag accatatcac tgatgttgaa gtaggacacg cagaggaaac	9240
tctttcattt acttcaagca gcatattaaa atcgttgatg attgctaaag aagaattgga	9300
gcttcacgag atcaggactg gccattctca tatgtacttg tgcatttga aagagcaaaa	9360
gcttcttgac cttgttctg tttcagggtg agcctgcaca tcgttctttt tgcagaacat	9420
gtattccttg ctcttggtt ttgccttctc aatgagcttt tcatcgtact caggaacact	9480
gttggtgatg ttggtcaaga tgaagctact gcatgctctc ttttgaaaga aatggcttta	9540
aagatacatg aacttggttg tgcaagaatg catcatcttt ctgtttgcca gtgggaagtg	9600
aaacttaagt ttggtgagcga tgggcctgcc agtggttagct ggagagtgt aacaaccaat	9660
gttactggtc acacctgcac tgtggatgtg agttttatct ccttgcttcc tgttttctg	9720
catggaacta atgaaactga agtgaacata ttatatatgt gacatacata tgactatcat	9780
ctttgattat cataaaaaaa gaactatcat cttcgttttag tttgttgtca ttccacctc	9840
atttttggtc tgaatctcat ggtgctttta atgcttttag atctaccggg aggtcgaaga	9900
tacagaatca cagaaactag tataaccctc caccgcattg tcatctggtc ctttgcatgg	9960
tggtgcactg aatacttcgt atcagccttt gagtgttatt gatttaaaac gttgctctgc	10020
caggaacaac aaaactacat actgctatga ttttccattg gttagtatct atctctctct	10080
atatgtatta tgtagcagg ttcttatttg tattacatgt cctaaatctg acaacaactc	10140
aaaatgtaga ctttgaagc tgcagtgcag aagtcgtggc ctaacatttc cagtgaaaac	10200
aaccaatgtt atgttaaagc gacagagctt gtgtttgctg aaaagaatgg gtcgtggggc	10260
actctataa ttccatgca gcgtgctgct gggctgaatg acattggtat ggtagcctgg	10320



atcttggaca tgtccactcc tgaatttccc agcggcagac agatcattgt tatcgcaa	10380
gatattacat tttagagctgg atcatttggc ccaagggaag atgcattttt cgaagctgta	10440
accaacctgg ctgtgagaa gaagcttcca cttatctact tggctgcaaa ctctggtgct	10500
cggattggca ttgctgatga agtaaaatct tgcttccgtg ttggatggac tgatgatagc	10560
agccctgaac gtggatttag gtacatttat atgactgacg aagaccatga tcgtataggc	10620
tcttcagtta tagcacacaa gatgcagcta gatagtggcg agatcagggt gggtatcgat	10680
tctgttggg gaaaagagga tggactaggt gtggagaaca tacatggaag tgctgctatt	10740
gccagtgcct attctagggc gtacgaggag acatttacac ttacattcgt tactggacga	10800
actgttgga tcggagccta tcttgctcga cttggcatac ggtgcataca gcgtattgac	10860
cagccatta ttttgaccgg gttttctgcc ctgaacaagc ttcttgggcg ggaggtgtac	10920
agctcccaca tgcagttggg tggccccaaa atcatggcg cgaatggtgt tgtccatctg	10980
actgttccag atgacctga aggtgtttct aatatattga ggtggctcag ctatgttct	11040
gcaaacattg gtggacctct tctattaca aaatcttgg acccaataga cagaccggt	11100
gcatacatcc ctgagaatac atgtgacct cgtgcagcca tcagtggcat tgatgacagc	11160
caagggaaat ggttgggtgg catgtttgac aaagacagtt ttgtggagac atttgaagga	11220
tgggcgaaga cagtagttac tggcagagca aaacttggag ggattcctgt tgggtgtata	11280
gctgtggaga cacagaccat gatgcagctc gtccccgctg atccaggcca gcctgattcc	11340
catgagcggc ctgttcctcg tgctgggcaa gtttggttcc cagattctgc taccaagaca	11400
gcgcaggcga tgttggactt caaccgtgaa ggattacctc tgttcatact tgctaactgg	11460
agaggcttct ctggagggca aagagatctt tttgaaggaa atctgcaggc tgggtcaaca	11520
attgttgaga acctaggac atacaatcag cctgcctttg tatatatccc caaggctgca	11580
gagctacgtg gaggagcctg ggtcgtgatt gatagcaaga taaaccaga tcgcatcgag	11640
tgctatgctg agaggactgc aaagggtaat gttctcgaac ctcaagggtt gattgagatc	11700
aagttcaggt cagaggaact caaagaatgc atgggtaggc ttgatccaga attgatagat	11760
ctgaaagcaa gactccaggg agcaaatgga agcctatctg atggagaatc ccttcagaag	11820
agcatagaag ctcggaagaa acagttgctg cctctgtaca cccaaatcgc ggtacgtttt	11880
gcggaattgc acgacacttc ccttagaatg gctgctaaag gtgtgatcag gaaagttgta	11940
gactgggaag actctcggtc tttcttctac aagagattac ggaggaggct atccgaggac	12000
gttctggcaa aggagattag aggtgtaatt ggtgagaagt ttctcacia atcagcgatc	12060
gagctgatca agaaatggta cttggcttcc gaggcagctg cagcaggaag caccgactgg	12120
gatgacgacg atgcttttgt cgcctggagg gagaaccctg aaaactataa ggagtatatc	12180
aaagagctta gggctcaaag ggtatctcgg ttgctctcag atgttcagc ctccagttcg	12240

gatttacaag ccttgccgca gggctcttcc atgctactag ataaggtacg catacttaca 12300  
 gttttacctg catctgttta ttgcaagta ttttatcgag gttgagtaaa atgctgctat 12360  
 cttcatatac acttgatatgt cctgctatct tattcaaata tagtatctta ccaaataata 12420  
 tctaagacgc tggatacttt gttcagatgg atccctctaa gagagcacag tttatcgagg 12480  
 aggtcatgaa ggtcctgaaa tgatcaaatg ataccaaac atccaatata gtatgtgcat 12540  
 gatattctgtt tctcttgaag tacatatata gatggatata aggcggctgt aactgatggt 12600  
 agctaactctg ggccaacctat tacttttgtg aacttgctgg tggctcttat tattcaaggc 12660  
 acagctcgcc ttcggacccc ctc 12683

<210> 16  
 <211> 2320  
 <212> PRT  
 <213> Alopecurus myosuroides Huds  
 <400> 16

Met Gly Ser Thr His Leu Pro Ile Val Gly Phe Asn Ala Ser Thr Thr  
 1 5 10 15

Pro Ser Leu Ser Thr Leu Arg Gln Ile Asn Ser Ala Ala Ala Phe  
 20 25 30

Gln Ser Ser Ser Pro Ser Arg Ser Ser Lys Lys Lys Ser Arg Arg Val  
 35 40 45

Lys Ser Ile Arg Asp Asp Gly Asp Gly Ser Val Pro Asp Pro Ala Gly  
 50 55 60

His Gly Gln Ser Ile Arg Gln Gly Leu Ala Gly Ile Ile Asp Leu Pro  
 65 70 75 80

Lys Glu Gly Ala Ser Ala Pro Asp Val Asp Ile Ser His Gly Ser Glu  
 85 90 95

Asp His Lys Ala Ser Tyr Gln Met Asn Gly Ile Leu Asn Glu Ser His  
 100 105 110

Asn Gly Arg His Ala Ser Leu Ser Lys Val Tyr Glu Phe Cys Thr Glu  
 115 120 125

Leu Gly Gly Lys Thr Pro Ile His Ser Val Leu Val Ala Asn Asn Gly  
 130 135 140

Met Ala Ala Ala Lys Phe Met Arg Ser Val Arg Thr Trp Ala Asn Asp  
 145 150 155 160

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

UA 123491 C2

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

UA 123491 C2

Gly	Gly	Ala	Leu	Tyr	Lys	Thr	Ile	Thr	Thr	Asn	Ala	Glu	Thr	Val	Ser
			660												
Glu	Tyr	Val	Ser	Tyr	Leu	Ile	Lys	Gly	Gln	Ile	Pro	Pro	Lys	His	Ile
			675												
Ser	Leu	Val	His	Ser	Thr	Ile	Ser	Leu	Asn	Ile	Glu	Glu	Ser	Lys	Tyr
			690												
Thr	Ile	Glu	Ile	Val	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Met
			705												
Asn	Gly	Ser	Leu	Ile	Glu	Ala	Asn	Val	Gln	Thr	Leu	Cys	Asp	Gly	Gly
			725												
Leu	Leu	Met	Gln	Leu	Asp	Gly	Asn	Ser	His	Val	Ile	Tyr	Ala	Glu	Glu
			740												
Glu	Ala	Gly	Gly	Thr	Gln	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Lys	Thr	Cys	Leu	Leu
			755												
Gln	Asn	Asp	His	Asp	Pro	Ser	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	Thr	Pro	Cys	Lys
			770												
Leu	Leu	Arg	Phe	Leu	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala	His	Val	Asp	Ala	Asp	Val
			785												
Pro	Tyr	Ala	Glu	Val	Glu	Val	Met	Lys	Met	Cys	Met	Pro	Leu	Leu	Ser
			805												
Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Ile	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Glu	Gly	Gln	Ala	Met
			820												
Gln	Ala	Gly	Asp	Leu	Ile	Ala	Arg	Leu	Asp	Leu	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala
			835												
Val	Lys	Arg	Ala	Glu	Pro	Phe	Glu	Gly	Ser	Phe	Pro	Glu	Met	Ser	Leu
			850												
Pro	Ile	Ala	Ala	Ser	Gly	Gln	Val	His	Lys	Arg	Cys	Ala	Ala	Ser	Leu
			865												
Asn	Ala	Ala	Arg	Met	Val	Leu	Ala	Gly	Tyr	Asp	His	Ala	Ala	Asn	Lys
			885												
Val	Val	Gln	Asp	Leu	Val	Trp	Cys	Leu	Asp	Thr	Pro	Ala	Leu	Pro	Phe
			900												

Leu Gln Trp Glu Glu Leu Met Ser Val Leu Ala Thr Arg Leu Pro Arg  
 915 920 925  
 Arg Leu Lys Ser Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Asn Glu Tyr Lys Leu Asn  
 930 935 940  
 Val Asp His Val Lys Ile Lys Asp Phe Pro Thr Glu Met Leu Arg Glu  
 945 950 955 960  
 Thr Ile Glu Glu Asn Leu Ala Cys Val Ser Glu Lys Glu Met Val Thr  
 965 970 975  
 Ile Glu Arg Leu Val Asp Pro Leu Met Asn Leu Leu Lys Ser Tyr Glu  
 980 985 990  
 Gly Gly Arg Glu Ser His Ala His Phe Ile Val Lys Ser Leu Phe Glu  
 995 1000 1005  
 Glu Tyr Leu Ser Val Glu Glu Leu Phe Ser Asp Gly Ile Gln Ser  
 1010 1015 1020  
 Asp Val Ile Glu Arg Leu Arg Leu Gln Tyr Ser Lys Asp Leu Gln  
 1025 1030 1035  
 Lys Val Val Asp Ile Val Leu Ser His Gln Gly Val Arg Asn Lys  
 1040 1045 1050  
 Thr Lys Leu Ile Leu Ala Leu Met Glu Lys Leu Val Tyr Pro Asn  
 1055 1060 1065  
 Pro Ala Ala Tyr Arg Asp Gln Leu Ile Arg Phe Ser Ser Leu Asn  
 1070 1075 1080  
 His Lys Arg Tyr Tyr Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ser Glu Leu Leu  
 1085 1090 1095  
 Glu Gln Thr Lys Leu Ser Glu Leu Arg Thr Ser Ile Ala Arg Asn  
 1100 1105 1110  
 Leu Ser Thr Leu Asp Met Phe Thr Glu Glu Lys Ala Asp Phe Ser  
 1115 1120 1125  
 Leu Gln Asp Arg Lys Leu Ala Ile Asn Glu Ser Met Gly Asp Leu  
 1130 1135 1140  
 Val Thr Ala Pro Leu Pro Val Glu Asp Ala Leu Val Ser Leu Phe  
 1145 1150 1155

Asp	Cys	Thr	Asp	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Arg	Val	Ile	Glu	Thr	Tyr
1160						1165					1170			
Ile	Ser	Arg	Leu	Tyr	Gln	Pro	Gln	Leu	Val	Lys	Asp	Ser	Ile	Gln
1175						1180					1185			
Leu	Lys	Tyr	Gln	Asp	Ser	Gly	Val	Ile	Ala	Leu	Trp	Glu	Phe	Thr
1190						1195					1200			
Glu	Gly	Asn	His	Glu	Lys	Arg	Leu	Gly	Ala	Met	Val	Ile	Leu	Lys
1205						1210					1215			
Ser	Leu	Glu	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Leu	Lys	Asp
1220						1225					1230			
Ala	Ser	His	Tyr	Ala	Ser	Ser	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	His	Ile	Ala
1235						1240					1245			
Leu	Leu	Asp	Ala	Asp	Thr	Gln	Leu	Asn	Thr	Thr	Glu	Asp	Ser	Gly
1250						1255					1260			
Asp	Asn	Asp	Gln	Ala	Gln	Asp	Lys	Met	Asp	Lys	Leu	Ser	Phe	Val
1265						1270					1275			
Leu	Lys	Gln	Asp	Val	Val	Met	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Asp	Val
1280						1285					1290			
Lys	Val	Val	Ser	Cys	Ile	Val	Gln	Arg	Asp	Gly	Ala	Ile	Met	Pro
1295						1300					1305			
Met	Arg	Arg	Thr	Phe	Leu	Leu	Ser	Glu	Glu	Lys	Leu	Cys	Tyr	Glu
1310						1315					1320			
Glu	Glu	Pro	Ile	Leu	Arg	His	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Ala	Leu
1325						1330					1335			
Leu	Glu	Leu	Asp	Lys	Leu	Lys	Val	Lys	Gly	Tyr	Asn	Glu	Met	Lys
1340						1345					1350			
Tyr	Thr	Pro	Ser	Arg	Asp	Arg	Gln	Trp	His	Ile	Tyr	Thr	Leu	Arg
1355						1360					1365			
Asn	Thr	Glu	Asn	Pro	Lys	Met	Leu	His	Arg	Val	Phe	Phe	Arg	Thr
1370						1375					1380			
Leu	Val	Arg	Gln	Pro	Ser	Ala	Gly	Asn	Arg	Phe	Thr	Ser	Asp	His

1385	1390	1395
Ile Thr Asp Val Glu Val Gly	His Ala Glu Glu Pro	Leu Ser Phe
1400	1405	1410
Thr Ser Ser Ser Ile Leu Lys	Ser Leu Met Ile Ala	Lys Glu Glu
1415	1420	1425
Leu Glu Leu His Ala Ile Arg	Thr Gly His Ser His	Met Tyr Leu
1430	1435	1440
Cys Ile Leu Lys Glu Gln Lys	Leu Leu Asp Leu Val	Pro Val Ser
1445	1450	1455
Gly Asn Thr Val Val Asp Val	Gly Gln Asp Glu Ala	Thr Ala Cys
1460	1465	1470
Ser Leu Leu Lys Glu Met Ala	Leu Lys Ile His Glu	Leu Val Gly
1475	1480	1485
Ala Arg Met His His Leu Ser	Val Cys Gln Trp Glu	Val Lys Leu
1490	1495	1500
Lys Leu Val Ser Asp Gly Pro	Ala Ser Gly Ser Trp	Arg Val Val
1505	1510	1515
Thr Thr Asn Val Thr Gly His	Thr Cys Thr Val Asp	Ile Tyr Arg
1520	1525	1530
Glu Val Glu Asp Thr Glu Ser	Gln Lys Leu Val Tyr	His Ser Thr
1535	1540	1545
Ala Leu Ser Ser Gly Pro Leu	His Gly Val Ala Leu	Asn Thr Ser
1550	1555	1560
Tyr Gln Pro Leu Ser Val Ile	Asp Leu Lys Arg Cys	Ser Ala Arg
1565	1570	1575
Asn Asn Lys Thr Thr Tyr Cys	Tyr Asp Phe Pro Leu	Thr Phe Glu
1580	1585	1590
Ala Ala Val Gln Lys Ser Trp	Ser Asn Ile Ser Ser	Glu Asn Asn
1595	1600	1605
Gln Cys Tyr Val Lys Ala Thr	Glu Leu Val Phe Ala	Glu Lys Asn
1610	1615	1620



Gly	Ser	Trp	Gly	Thr	Pro	Ile	Ile	Pro	Met	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly
1625						1630					1635			
Leu	Asn	Asp	Ile	Gly	Met	Val	Ala	Trp	Ile	Leu	Asp	Met	Ser	Thr
1640						1645					1650			
Pro	Glu	Phe	Pro	Ser	Gly	Arg	Gln	Ile	Ile	Val	Ile	Ala	Asn	Asp
1655						1660					1665			
Ile	Thr	Phe	Arg	Ala	Gly	Ser	Phe	Gly	Pro	Arg	Glu	Asp	Ala	Phe
1670						1675					1680			
Phe	Glu	Ala	Val	Thr	Asn	Leu	Ala	Cys	Glu	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu
1685						1690					1695			
Ile	Tyr	Leu	Ala	Ala	Asn	Ser	Gly	Ala	Arg	Ile	Gly	Ile	Ala	Asp
1700						1705					1710			
Glu	Val	Lys	Ser	Cys	Phe	Arg	Val	Gly	Trp	Thr	Asp	Asp	Ser	Ser
1715						1720					1725			
Pro	Glu	Arg	Gly	Phe	Arg	Tyr	Ile	Tyr	Met	Thr	Asp	Glu	Asp	His
1730						1735					1740			
Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Ser	Val	Ile	Ala	His	Lys	Met	Gln	Leu	Asp
1745						1750					1755			
Ser	Gly	Glu	Ile	Arg	Trp	Val	Ile	Asp	Ser	Val	Val	Gly	Lys	Glu
1760						1765					1770			
Asp	Gly	Leu	Gly	Val	Glu	Asn	Ile	His	Gly	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala
1775						1780					1785			
Ser	Ala	Tyr	Ser	Arg	Ala	Tyr	Glu	Glu	Thr	Phe	Thr	Leu	Thr	Phe
1790						1795					1800			
Val	Thr	Gly	Arg	Thr	Val	Gly	Ile	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Arg	Leu
1805						1810					1815			
Gly	Ile	Arg	Cys	Ile	Gln	Arg	Ile	Asp	Gln	Pro	Ile	Ile	Leu	Thr
1820						1825					1830			
Gly	Phe	Ser	Ala	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Gly	Arg	Glu	Val	Tyr	Ser
1835						1840					1845			
Ser	His	Met	Gln	Leu	Gly	Gly	Pro	Lys	Ile	Met	Ala	Thr	Asn	Gly
1850						1855					1860			

Val	Val	His	Leu	Thr	Val	Pro	Asp	Asp	Leu	Glu	Gly	Val	Ser	Asn
1865						1870					1875			
Ile	Leu	Arg	Trp	Leu	Ser	Tyr	Val	Pro	Ala	Asn	Ile	Gly	Gly	Pro
1880						1885					1890			
Leu	Pro	Ile	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ile	Asp	Arg	Pro	Val	Ala
1895						1900					1905			
Tyr	Ile	Pro	Glu	Asn	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Ala	Ala	Ile	Ser	Gly
1910						1915					1920			
Ile	Asp	Asp	Ser	Gln	Gly	Lys	Trp	Leu	Gly	Gly	Met	Phe	Asp	Lys
1925						1930					1935			
Asp	Ser	Phe	Val	Glu	Thr	Phe	Glu	Gly	Trp	Ala	Lys	Thr	Val	Val
1940						1945					1950			
Thr	Gly	Arg	Ala	Lys	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Val	Gly	Val	Ile	Ala
1955						1960					1965			
Val	Glu	Thr	Gln	Thr	Met	Met	Gln	Leu	Val	Pro	Ala	Asp	Pro	Gly
1970						1975					1980			
Gln	Pro	Asp	Ser	His	Glu	Arg	Ser	Val	Pro	Arg	Ala	Gly	Gln	Val
1985						1990					1995			
Trp	Phe	Pro	Asp	Ser	Ala	Thr	Lys	Thr	Ala	Gln	Ala	Met	Leu	Asp
2000						2005					2010			
Phe	Asn	Arg	Glu	Gly	Leu	Pro	Leu	Phe	Ile	Leu	Ala	Asn	Trp	Arg
2015						2020					2025			
Gly	Phe	Ser	Gly	Gly	Gln	Arg	Asp	Leu	Phe	Glu	Gly	Asn	Leu	Gln
2030						2035					2040			
Ala	Gly	Ser	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Arg	Thr	Tyr	Asn	Gln	Pro
2045						2050					2055			
Ala	Phe	Val	Tyr	Ile	Pro	Lys	Ala	Ala	Glu	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala
2060						2065					2070			
Trp	Val	Val	Ile	Asp	Ser	Lys	Ile	Asn	Pro	Asp	Arg	Ile	Glu	Cys
2075						2080					2085			
Tyr	Ala	Glu	Arg	Thr	Ala	Lys	Gly	Asn	Val	Leu	Glu	Pro	Gln	Gly
2090						2095					2100			

Leu	Ile	Glu	Ile	Lys	Phe	Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Cys	Met
2105						2110					2115			
Gly	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Leu	Ile	Asp	Leu	Lys	Ala	Arg	Leu	Gln
2120						2125					2130			
Gly	Ala	Asn	Gly	Ser	Leu	Ser	Asp	Gly	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	Ser
2135						2140					2145			
Ile	Glu	Ala	Arg	Lys	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Leu	Tyr	Thr	Gln	Ile
2150						2155					2160			
Ala	Val	Arg	Phe	Ala	Glu	Leu	His	Asp	Thr	Ser	Leu	Arg	Met	Ala
2165						2170					2175			
Ala	Lys	Gly	Val	Ile	Arg	Lys	Val	Val	Asp	Trp	Glu	Asp	Ser	Arg
2180						2185					2190			
Ser	Phe	Phe	Tyr	Lys	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Leu	Ser	Glu	Asp	Val
2195						2200					2205			
Leu	Ala	Lys	Glu	Ile	Arg	Gly	Val	Ile	Gly	Glu	Lys	Phe	Pro	His
2210						2215					2220			
Lys	Ser	Ala	Ile	Glu	Leu	Ile	Lys	Lys	Trp	Tyr	Leu	Ala	Ser	Glu
2225						2230					2235			
Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Asp	Trp	Asp	Asp	Asp	Asp	Ala	Phe
2240						2245					2250			
Val	Ala	Trp	Arg	Glu	Asn	Pro	Glu	Asn	Tyr	Lys	Glu	Tyr	Ile	Lys
2255						2260					2265			
Glu	Leu	Arg	Ala	Gln	Arg	Val	Ser	Arg	Leu	Leu	Ser	Asp	Val	Ala
2270						2275					2280			
Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Gln	Ala	Leu	Pro	Gln	Gly	Leu	Ser	Met
2285						2290					2295			
Leu	Leu	Asp	Lys	Met	Asp	Pro	Ser	Lys	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Glu
2300						2305					2310			
Glu	Val	Met	Lys	Val	Leu	Lys								
2315						2320								

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рослина пшениці, яка містить нуклеїнову кислоту ацетил-КоА карбоксилази, що надає стійкості до інгібування гербіцидом квізалофоп-р-етилу в дозах вказаного гербіциду, в яких він звичайно інгібує ріст рослини пшениці, де вказана нуклеїнова кислота, яка надає стійкості до інгібування вказаним гербіцидом, включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує білок ацетил-КоА карбоксилази, причому вказаний білок включає амінокислотне заміщення Ala2004Val, коли як порівняння наводиться *Alopecurus myosuroides*, SEQ ID NO: 14 або 16.
2. Рослина пшениці за п. 1, де вказаний білок являє собою SEQ ID NO: 8, 10 або 12, або їхні консервативно модифіковані варіанти, які включають заміщення Ala2004Val.
3. Рослина пшениці за п. 1, де вказана рослина пшениці включає послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 4, 5 або 6.
4. Рослина пшениці за п. 1, де вказана рослина пшениці створена введенням у вказану рослину гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує АКК-білок з одним або декількома заміщеннями, які надають стійкості до інгібування вказаним гербіцидом.
5. Спосіб підвищення продуктивності рослини пшениці, що має стійкість до гербіциду квізалофоп-р-етилу, шляхом обробки бур'янової рослинності та рослини пшениці за п. 1 вказаним гербіцидом.
6. Спосіб за п. 5, де вказана рослина пшениці за п. 1 має стійкість до інгібування вказаним гербіцидом, яка введена в зародкову плазму вказаної рослини пшениці за допомогою інтрогресії.
7. Спосіб за п. 5, де вказана рослина пшениці містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує білок ацетил-КоА карбоксилази, який включає в себе амінокислотне заміщення Ala2004Val.
8. Спосіб за п. 5, де вказана рослина пшениці включає в себе SEQ ID NO: 4.
9. Спосіб за п. 5, де вказана рослина пшениці створена введенням у вказану рослину гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує АКК-білок з одним або більше заміщеннями, який надає стійкості до вказаного гербіциду.
10. Спосіб отримання рослини пшениці, стійкої до гербіциду квізалофоп-р-етилу, який включає введення у вказану рослину послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує АКК-білок, що включає амінокислотне заміщення Ala2004Val, порівняно з диким типом і стандартною послідовністю *Alopecurus myosuroides* (SEQ ID NO: 14 або 16), де вказаний АКК-білок надає стійкості до інгібування вказаним гербіцидом в дозах вказаного гербіциду, при яких він звичайно інгібує ріст рослини пшениці.
11. Спосіб за п. 10, де вказане введення вказаної зародкової плазми в елітну лінію вказаної рослини пшениці являє собою введення гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти.
12. Спосіб ідентифікації рослини пшениці, яка є стійкою до гербіциду квізалофоп-р-етилу, який включає:
  - (a) отримання зразка нуклеїнової кислоти з рослини пшениці,
  - (b) аналіз вказаного зразка нуклеїнової кислоти на присутність послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує АКК-білок, що включає амінокислотне заміщення Ala2004Val, що надає стійкість до вказаного гербіциду, яка присутня у вказаному зразку ампліфікованої нуклеїнової кислоти.
13. Рослина з модифікованою АКК полінуклеотидною послідовністю, причому вказана послідовність кодує АКК-поліпептид, що містить валін в положенні 2004, при порівнянні зі стандартною послідовністю *Alopecurus myosuroides* SEQ ID NO: 14 або 16.
14. Виділений полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, яка включає:
  - (a) послідовність нуклеїнової кислоти, представлена в SEQ ID NO: 4, 5 або 6;
  - (b) послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 8, 10 або 12; і
  - (c) послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає повнорозмірний комплемент будь-якої однієї послідовності за пп. (a)-(b).
15. Виділений полінуклеотид за п. 14, де вказаний полінуклеотид оптимізований для експресії в рослині.
16. Конструкт нуклеїнової кислоти, який включає в себе виділений полінуклеотид за п. 15, де вказаний полінуклеотид функціонально зв'язаний з промотором, який стимулює експресію в клітині-хазяїні.

17. Конструкт за п. 16, де вказаний полінуклеотид функціонально зв'язаний в антисмисловій орієнтації з вказаним промотором.
18. Експресійна касета, що включає ДНК-конструкт за п. 16.
19. Клітина-хазяїн, що містить стабільно введений в її геном щонайменше один ДНК-конструкт за п. 16.
- 5 20. Клітина-хазяїн за п. 19, де вказана клітина-хазяїн являє собою рослинну клітину.
21. Трансгенна рослина, що містить стабільно введений в її геном ДНК-конструкт за п. 16.
22. Трансгенна рослина за п. 21, де вказана рослина вибрана з групи, яка включає: кукурудзу, сою, пшеницю, рис, люцерну, ячмінь, просо, соняшник, сорго, канолу і бавовник.
- 10 23. Трансгенна рослина за п. 22, де вказана рослина являє собою пшеницю.
24. Виділений поліпептид з АКК активністю, вибраний з групи, що включає:  
(a) поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8, 10 або 12;  
(b) поліпептид, кодований амінокислотою послідовністю, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, 5 або 6.
- 15

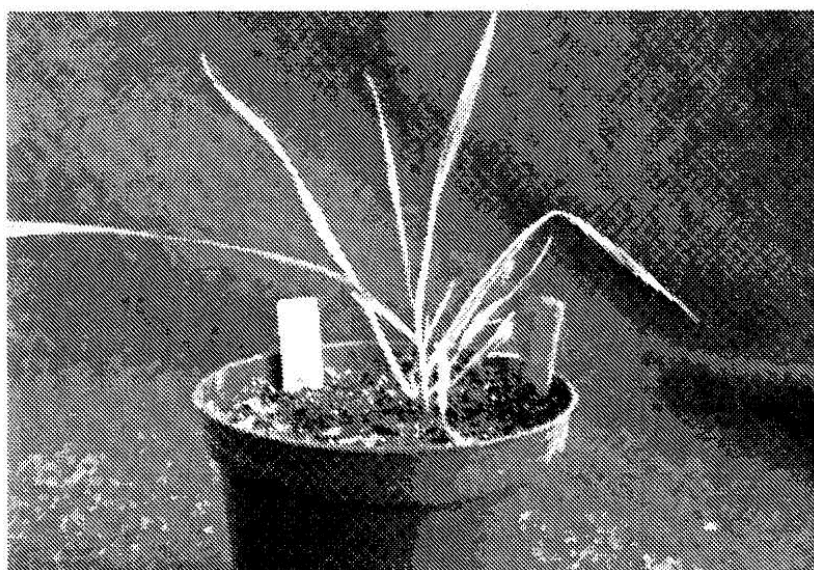


Fig. 1

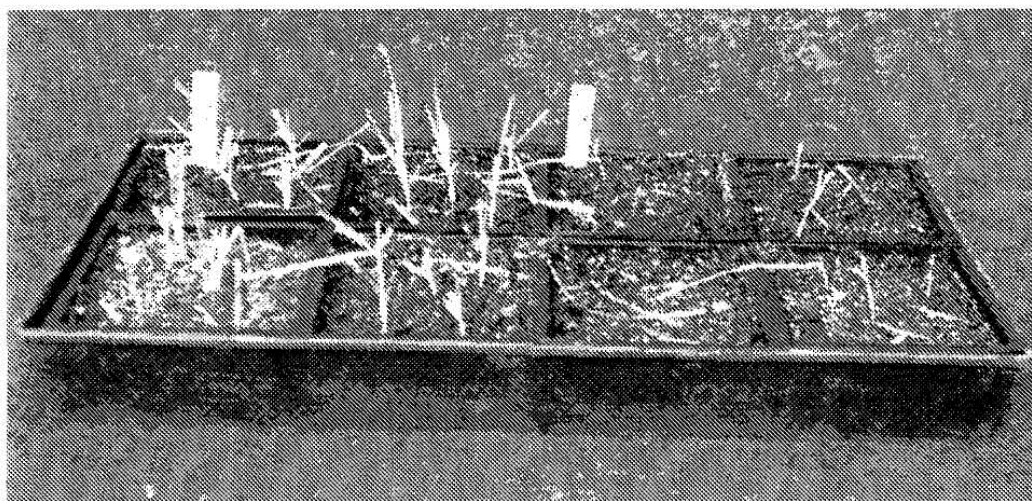


Fig. 2



Фиг. 3

Геном А пшениця сорту Hatcher (не мутантний)

GTGTTGGATGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAGTACATTTATCTGACTGAAGAAGACCATGCT  
CGTATTAGCACTTCTGTTATAGCGCACAAAGATGCAGCTTGATAATGGTGAAATTAGGTGGGTTATTGATTCTGTT  
GTGGGGAAGGAGGATGGGCTAGGTGTGGAGAACATACATGGAAGTGCTGCTATTGCCAGTGCCTATTCTAGGG  
CCTATGAGGAGACATTTACGCTTACATTTGTGACTGGACGGACTGTTGGAATAGGAGCATATCTTGCTCGACTTG  
GCATACGGTGCATACAGCGTACTGACCAGCCATTATCCTAACCGGGTTCTCTGCTTTGAACAAGCTTCTTGCC  
GGGAAGTGTACAGCTCCACATGCAGTTGGGTGGCCCCAAAATTATGGCGACAAACGGTGTGTCCATCTGACA  
GTTTCAGATGACCTGAAGGTGTGTCTAATATATTGAGGTGGCTCAGCTATGTTCTCGCAACATTGGTGGACCT  
CTTCTATTACAAAATCTTTGGACCCACCTGACAGACCCGTTGCATATATCCCTGAGAATACATGTGATCCTCGTG  
CAGCCATCAGTGGCATTGATGATAGCCAAGGGAAATGGTTGGGGGCATGTTGACAAAGACAGTTTTGTGGA  
GACATTTGAAGGATGGGCGAAGTCAGTAGTTACTGGCAGAGCGAAACTCGGAGGGATTCCGGTGGGTGTTATA  
GCTGTGGAGACACAGACTATGATGCAGCTCATCCCTGCTGATCCAGGCCAGCTTGATTCCCATGAGCGGTCTGTT  
CCTCGTGCTGGGCAAGTCTGGTTCCAGATTCAGCTACTAAGACAGCTCAAGCAATGCTGGACTCAACCGTGAA  
GGATTACCTCTGTTATCCTTGCTAACTGGAGAGGCTTCTCTGGTGGGCAAAGAGATCTTTTGAAGGAATCCTT  
CAGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAACCTTAGGACATACAATCAGCCTGCCTTTGTATATATCCCAAGGCTGCA  
GAGCTACGTGGAGGGGCTGGGTCTGATTGATAGCAAGATAAATCCAGATCGAATTGAGTTCTATGCTGAGA  
GGACTGCAAAGGG

Білок

VGWSDDGSPERGFQYIYLTEEDHARISTSVIAHKMQLDNGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEE  
TFTLTFTVTRTVGIGAYLARLGIRCIQRTDQPIILTGFSALNKLGREVYSSHMLGGPKIMATNGVVHLTVSDDLEGV  
SNILRWLSYVVPANIGGPLPITKSLDPPDRPVAYIPENTCDPRAAISGIDDSQGWLGGMFDKDSFVETFEGWAKSVV  
TGRAKLGIPVGVIAVETQTMMLQIPADPGQLDSHERSVPRAGQVWFPDSATKTAQAMLDNFNREGLPLFILANWR  
GFSGGQRDLFEGILQAGSTIVENLRTYNQPAFVYIPKAAELRGGAWVVIDSKINPDRIEFYAERTAK

Фиг. 4А

Мутантна послідовність генома А (узагальнююча типова послідовність)

GATGAAGTAAATCGTGCTTC-  
 GTGTTGGATGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAGTACATTTATCTGACTGAAGAAGACCATGCT  
 CGTATTAGCACTTCTGTTATAGCGCACAAAGATGCAGCTTGATAATGGTGAAATTAGGTGGGTATTGATTCTGTT  
 GTGGGGAAGGAGGATGGGCTAGGTGTGGAGAACATACATGGAAGTGCTGCTATTGCCAGTGCCTATTCTAGGG  
 CCTATGAGGAGACATTTACGCTTACATTTGTGACTGGACGGACTGTTGGAATAGGAGCATATCTTGCTCGACTTG  
 GCATACGGTGCATACAGCGTACTGACCAGCCCATTATCCTAACC GG GTTCTCTGCTTTGAACAAGCTTCTTGCC  
 GGGAAAGTGACAGCTCCACATGCAGTTGGGTGGCCCCAAAATTATGGCGACAAACGGTGTTGTCCATCTGACA  
 GTTTCAGATGACCTTGAAGGTGTGTCTAATATATTGAGGTGGCTCAGCTATGTTCTGCCAACATTGGTGGACCT  
 CTTCTATTACAAAATCTTGGACCCACCTGACAGACCCGTTGCATATATCCCTGAGAATACATGTGATCCTCGTG  
 CAGCCATCAGTGGCATTGATGATAGCCAAGGGAAATGGTTGGGGGGCATGTTGACAAAGACAGTTTTGTGGA  
 GACATTTGAAGGATGGGCGAAGTCAGTAGTTACTGGCAGAGCGAAACTCGGAGGGATTCCGGTGGGTGTTATA  
 GCTGTGGAGACACAGACTATGATGCAGCTCATCCCTGCTGATCCAGGCCAGCTTGATTCCCATGAGCGGTCTGTT  
 CCTCGTGCTGGGCAAGTCTGGTTCCAGATTCACTTAAAGACAGCTCAAGCAATGCTGGACTTCAACCGTGAA  
 GGATTACCTCTGTTTCATCCTTGCTAACTGGAGAGGGCTTCTCTGGTGGGCAAAGAGATCTTTTTGAAGGAATCCTT  
 CAGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAACCTTAGGACATACAATCAGCCTGCCTTTGTATATATCCCCAAGGCTGCA  
 GAGCTACGTGGAGGGGCTTGGGTCGTGATTGATAGCAAGATAAATCCAGATCGAATTGAGTTCTATGCTGAGA  
 GGACTGCAAAGGGTAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTGATTGAGATACCAG

Білок

\*SKIVLRVGSDDGSPERGFQYIYLTEEDHARISTSVIAHKMQLDNGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAIASAY  
 SRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQRDQPIILTGFSALNKL GREVYSSHMLGGPKIMATNGVVHLTVS  
 DDLEGVSNILRWLSYVPANIGGPLPITKSLDPPDRPVAYIPENTCDPRAAISGIDDSQGWLGGMFDKDSFVETFE  
 WAKSVVTGRAKLGIPVGVIAVETQTMMLIPADPGQLDSHERSVPRAGQVWFPDSVTKTAAQAMLDNFNREGLPL  
 FILANWRGFSGGQRDLFEGILQAGSTIVENLRTYNQPAFVYIPKAAELRGGAWVVIDSKINPDRIEFAERTAKGNVL  
 EPQGLIEIP

Фіг. 4В

Геном В пшениця сорту Hatcher (немутантний)

CGTGTGGATGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAGTACATTTATCTGACTGAAGAAGACCATGC  
TCGTATTAGCACTTCTGTTATAGCGCACAAGATGCAGCTTGATAATGGTGAAATTAGGTGGGTTATCGATTCTGT  
TGTGGGGAAGGAGGATGGGCTAGGTGTGGAGAACATACATGGAAGTGCTGCTATTGCCAGTGCCTATTCTAGG  
GCCTATGAGGAGACATTTACGCTTACATTTGTGACTGGACGGACTGTTGGAATAGGAGCATATCTTGCTCGACTT  
GGCATACGGTGCATACAGCGTACTGACCAGCCCATTATCCTAACTGGGTTCTCTGCCTTGAACAAGCTTCTTGGC  
CGGGAAGTTTACAGCTCCCATGTCAGTTGGGTGGCCCCAAAATTATGGCGACAAACGGTGTTGTCCATCTGAC  
AGTTTCAGATGACCTTGAAGGTGTATCTAATATATTGAGGTGGCTCAGCTATGTTCTGCGCAACATTGGTGGACC  
TCTTCCTATTACAAAATCTTTGGACCCACCTGACAGACCCGTTGCTTACATCCCTGAGAATACATGCGATCCTCGT  
GCTGCCATCAGTGGCATTGATGATAGCCAAGGGAAATGGTTGGGGGGCATGTTGACAAAAGACAGTTTTGTGG  
AGACATTTGAAGGATGGGCGAAGTCAGTTGTTACTGGCAGAGCTAACTCGGAGGGATTCCGGTGGGTGTTAT  
AGCTGTGGAGACACAGACTATGATGCAGCTCATCCCTGCTGATCCAGGCCAGCTTGATTCCCATGAGCGGTCTGT  
TCCTCGTGCTGGGCAAGTCTGGTTTCCAGATTGAGCTACTAAGACAGCGCAGGCAATGCTGGACTTCAACCGTGA  
AGGATTACCTCTGTTTCATCCTTGCTAACTGGAGAGGCTTCTCTGGTGGACAAAGAGATCTTTTGAAGGAATCCT  
TCAGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAACCTTAGGACATACAATCAGCCTGCCTTTGTATATATCCCAAGGCTGC  
AGAGCTACGTGGAGGGGCTTGGGTCGTGATTGATAGCAAGATAAATCCAGATCGCATTGAGTTCTATGCTGAG  
AGGACTGCAAAGGGCAATGTTCTCGAACCTCAAGGG

Блок

RVGWSDDGSPERGFQYIYLTEEDHARISTSVIAHKMQLDNGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAVE  
ETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQRTDQPIILTGFSALNKLLGREVYSSHMLGGPKIMATNGVVHLTVSDDLEG  
VSNILRWLSYVPANIGGPLITKSLDPPDRPVAYIPENTCDPRAAISGIDDSQGWLGGMFDDKDSFVETFEWAKSV  
VTGRAKLGIPVGVIIVETQTMMLIPADPGQLDSHERSVPRAGQVWFPSATKTAQAMLDFNREGLPLFILANW  
RGFSGGQRDLFEGILQAGSTIVENLRTYNQPAFVYIPKAAELRGGAWVVIDSKINPDRIEFAERTAKGNVLEPQG

Фиг. 4C



Мутантна послідовність генома В (узагальнююча типова послідовність)

GGCATAGCAGATGAAGTAGAGTCTTGCTCCGTGTTGGATGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCA  
GTACATTATCTGACTGAAGAAGACCATGCTCGTATTAGCACTTCTGTTATAGCGCACAAAGATGCAGCTTGATAA  
TGGTGAAATTAGGTGGGTATCGATTCTGTTGTGGGAAGGAGGATGGGCTAGGTGTGGAGAACATACATGG  
AAGTGCTGCTATTGCCAGTGCCTATTCTAGGGCCTATGAGGAGACATTTACGCTTACATTTGTGACTGGACGGAC  
TGTGGAAATAGGAGCATATCTTGCTCGACTTGGCATAACGGTGCATACAGCGTACTGACCAGCCCATTATCCTAAC  
TGGGTTCTCTGCCTTGAACAAGCTTCTTGGCCGGGAAGTTTACAGCTCCACATGCAGTTGGGTGGCCCCAAAT  
TATGGCGACAAACGGTGTTGTCCATCTGACAGTTTCAGATGACCTTGAAGGTGTATCTAATATATTGAGGTGGCT  
CAGCTATGTTCTGCCAACATTGGTGGACCTCTTCCTATTACAAAATCTTTGGACCCACCTGACAGACCCGTTGCT  
TACATCCCTGAGAATACATGCGATCCTCGTCTGCCATCAGTGGCATTGATGATAGCCAAGGGAAATGGTTGGG  
GGGCATGTTGACAAAGACAGTTTTGTGGAGACATTTGAAGGATGGGCGAAGTCAGTTGTTACTGGCAGAGCT  
AAACTCGGAGGGATTCCCGTGGGTGTTATAGCTGTGGAGACACAGACTATGATGCAGCTCATCCCTGCTGATCC  
AGGCCAGCTTGATTCCCATGAGCGGTCTGTTCTCGTCTGGGCAAGTCTGGTTCCAGATTCACTTAAGAC  
AGCGCAGGCAATGCTGGACTTCAACCGTGAAGGATTACCTCTGTTTATCCTTGCTAACTGGAGAGGCTTCTCTGG  
TGGACAAAGAGATCTTTTGAAGGAATCCTCAGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAACCTTAGGACATACAATC  
AGCCTGCCTTGTATATATCCCCAAGGCTGCAGAGCTACGTGGAGGGGCTTGGGTCTGATTGATAGCAAGATA  
AATCCAGATCGCATTGAGTTCTATGCTGAGAGGACTGCAAAGGGCAATGTTCTCGAACCTCAAGGGTTGATTGA  
GATG

Білок

GIADEVESCFRVGWSDDGSPERGFQYIYLTEEDHARISTSVIAHKMQLDNGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAA  
IASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQRTDQPIILTGFSAINKLLGREVYSSHMLGGPKIMATNGVVH  
LTVSDDLEGVSNILRWLSYVPANIGGPLPITKSLDPPDRPVAYIPENTCDPRAAISGIDDSQGWLGGMFDKDSFVET  
FEGWAKSVVTGRAKLGGIPVGVIAVETQTMMLIPADPGQLDSHERSVPRAGQVWFPSVTKTAQAMLDNFNREG  
LPLFILANWRGFSGGQRDLFEGILQAGSTIVENLRTYNQPAFVYIPKAAELRGGAWVVIDSKINPDRIEFYAERTAKGN  
VLEPQGLIEM

Фиг. 4D

Геном D пшениця сорту Hatcher (немутантний)

ATCTTGCTCCGTGTTGGATGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAATATATTTATCTGACTGAAGA  
 AGACCATGCTCGTATTAGCGCTTCTGTTATAGCGCACAAAGATGCAGCTTGATAATGGTGAAATTAGGTGGGTTA  
 TTGATTCTGTTGTAGGGAAGGAGGATGGGCTAGGTGTGGAGAACATACATGGAAGTGCTGCTATTGCCAGTGC  
 CTATTCTAGGGCCTATGAGGAGACATTTACGCTTACATTTGTGACTGGAAGGACTGTTGGAATAGGAGCATATC  
 TTGCTCGACTTGGCATACGGTGCATTGAGCGTACTGACCAGCCCATTCCTAACTGGGTTTTCTGCCTTGAACAA  
 GCTTCTTGGCCGGGAAGTGACAGCTCCACATGCAGTTGGGTGGCCCCAAAATTATGGCCACAAACGGTGTTG  
 TCCATCTGACAGTTTCAGATGACCTTGAAGGTGTATCTAATATATTGAGGTGGCTCAGCTATGTTCTGCCAACA  
 TTGGTGGACCTCTTCTATTACAAAATCTTGGACCCACCTGACAGACCCGTTGCTTACATCCCTGAGAATACATG  
 TGATCCTCGTGAGCCATCAGTGGCATTGATGATAGCCAAGGGAAATGTTGGGGGGCATGTTGACAAAGAC  
 AGTTTTGTGGAGACATTTGAAGGATGGGCGAAGTCAGTAGTTACTGGCAGAGCGAAACTCGGAGGGATTCCGG  
 TGGGTGTTATAGCTGTGGAGACACAGACTATGATGCAGCTCATCCCTGCTGATCCAGGTGAGCTTGATTCCCATG  
 AGCGGTCTGTTCTCGTGTGGGCAAGTCTGGTTCCAGATTCAGCTACTAAGACAGCGCAGGCAATGCTGGAC  
 TTCAACCGTGAAGGATTACCTCTGTTATCCTTGCTAACTGGAGAGGCTTCTCTGGTGGGCAAAGAGATCTTTT  
 GAAGGAATCCTTCAGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAACCTTAGGACATACAATCAGCCTGCCTTTGTATATATC  
 CCCAAGGCTGCAGAGCTACGTGGAGGGGCTTGGGTCTGATTGATAGCAAGATAAATCCAGATCGCATTGAGT  
 TCTATGCTGAGAGGACTGCAAAGGGCAATGTTCT-GAACCTCAAGGG

Блок

SCFRVGWSDDGSPERGFQYIYLTEEDHARISASVIAHKMQLDNGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYS  
 RAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQRTDQPIILTGFSALNKLGREVYSSHMQLGGPKIMATNGVVHLTVSDD  
 LEGVSNILRWLSYVPANIGGPLPITKSLDPPDRPVAYIPENTCDPRAAISGIDDSQGWLGGMFDKDSFVETFE  
 GWA KSVVTGRAKLGIPVGVIIVETQTMMLPADPGQLDSHERSVPRAGQVWFPSATKTAQAMLDNFNREGLPLFI  
 LA NWRGFSGGQRDLFEGILQAGSTIVENLRTYNQPAFVYIPKAAELRGGAWVVIDSKINPDRIEFYAERTAKGNV  
 LNLK

Фіг. 4Е

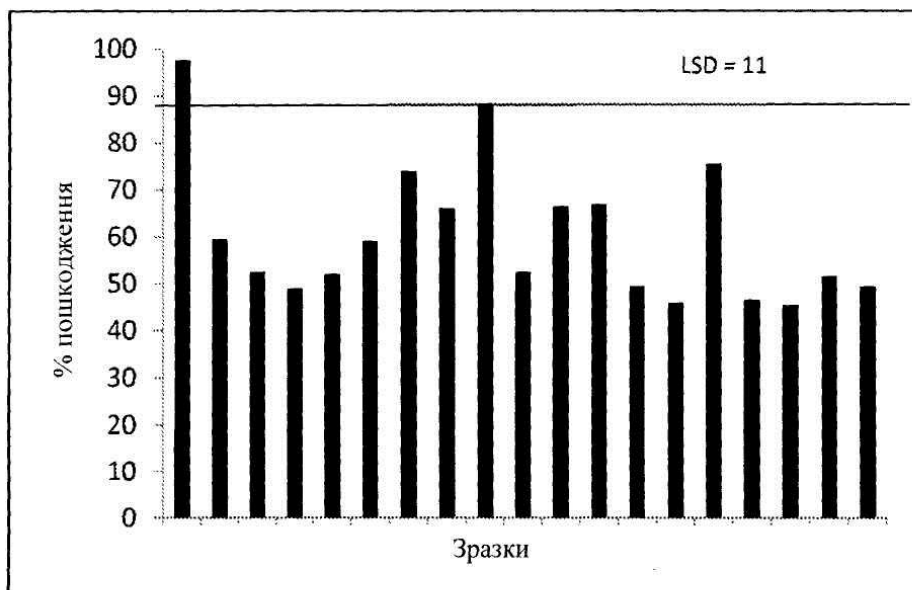
Послідовність мутантного геному D (узагальнююча типова послідовність)

TGAAGTAAAATCTTGCTTCCGTGTTGGATGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAATATATTTATCT  
 GACTGAAGAAGACCATGCTCGTATTAGCGCTTCTGTTATAGCGCACAGATGCAGCTTGATAATGGTGAAATTA  
 GGTGGGTTATTGATTCTGTTGTAGGGAAGGAGGATGGGCTAGGTGTGGAGAACATACATGGAAGTGCTGCTAT  
 TGCCAGTGCCTATTCTAGGGCCTATGAGGAGACATTTACGCTTACATTTGTGACTGGAAGGACTGTTGGAATAG  
 GAGCATATCTTGCTCGACTTGGCATAACGGTGCACTTCAGCGTACTGACCAGCCCATTATCCTAACTGGGTTTTCTGC  
 CTTGAACAAGCTTCTTGGCCGGGAAGTGTACAGCTCCACATGCAGTTGGGTGGCCCCAAAATTATGGCCACAA  
 ACGGTGTTGTCCATCTGACAGTTTCAGATGACCTTGAAGGTGTATCTAATATATTGAGGTGGCTCAGCTATGTTT  
 CTGCCAACATTGGTGGACCTCTTCTATTACAAAATCTTTGGACCCACCTGACAGACCCGTTGCTTACATCCCTGA  
 GAATACATGTGATCCTCGTGACCCATCAGTGGCATTGATGATAGCCAAGGGAAATGGTTGGGGGGCATGTTT  
 GACAAAGACAGTTTTGTGGAGACATTTGAAGGATGGGCGAAGTCAGTAGTTACTGGCAGAGCGAAACTCGGA  
 GGGATTCCGGTGGGTGTTATAGCTGTGGAGACACAGACTATGATGCAGCTCATCCCTGCTGATCCAGGTGAGCT  
 TGATTCCCATGAGCGGTCTGTTCTCGTGCTGGGCAAGTCTGGTTTCCAGATTGAGTTACTAAGACAGCGCAGGC  
 AATGCTGGACTTCAACCGTGAAGGATTACCTCTGTTTCATCCTTGCTAACTGGAGAGGCTTCTCTGGTGGGCAAAG  
 AGATCTTTTTGAAGGAATCCTTCAGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAACCTTAGGACATACAATCAGCCTGCCTT  
 TGTATATATCCCAAGGCTGCAGAGCTACGTGGAGGGGCTTGGGTCGTGATTGATAGCAAGATAAATCCAGATC  
 GCATTGAGTTCTATGCTGAGAGGACTGCAAAGGGCAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTGATTGAGATGC

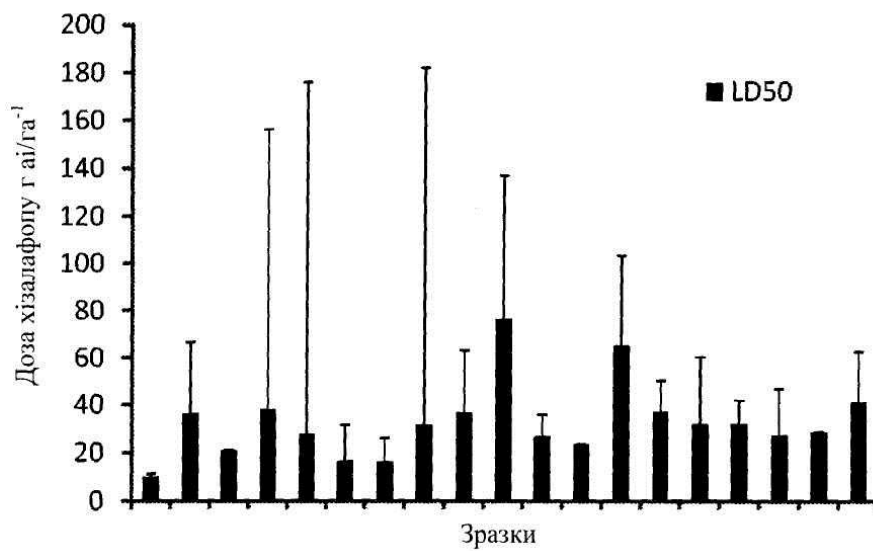
Білок

EVKSCFRVGSDDGSPERGFQYIYLTEEDHARISASVIAHKMQLDNGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYS  
 RAYEETFTLFTVTVGIGAYLARLGIRCIQRDQPIILTGFSALNKLGREVYSSHMLGGPKIMATNGVHLLTVSDDL  
 EGVSNILRWLSYVPANIGGPLPITKSLDPPDRPVAYIPENTCDPRAAISGIDDSQGWLGGMFDKDSFVETFEWAKSV  
 VTGRAKLGGIPVGVIAVETQTMMLPADPGQLDSHERSVPRAGQVWFDPDSVTKTAQAMLDNFNREGLPLFILANWR  
 GFSGGQRDLFEGILQAGSTIVENLRQYQPAFVYIPKAAELRGAWVIDSKINPDRIEFYAERTAKGNVLEPQGLIEM

Фіг. 4F



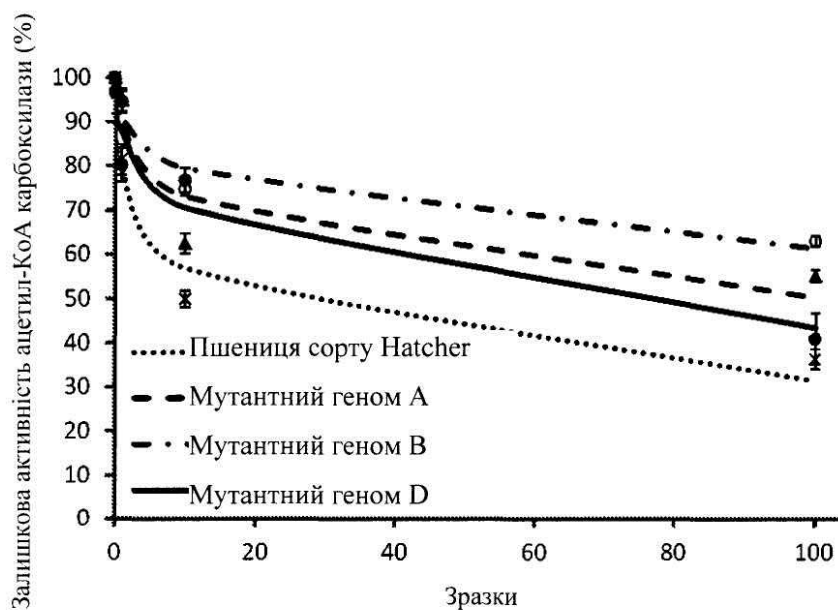
Фіг. 5



Фіг. 6

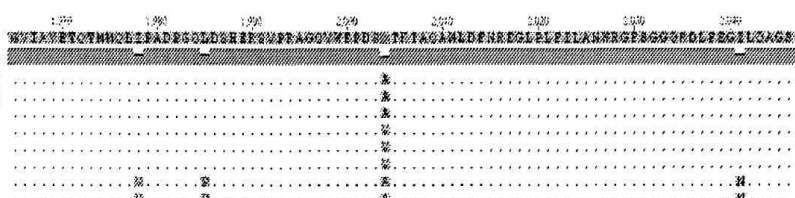
Геном А пшениці сорту Hatcher	GGTTTCCAGATTCTCGTACTAAGACAGCGGCAAGCAATGCTGGG
Мутантний геном А	GGTTTCCAGATTCTCGTACTAAGACAGCGGCAAGCAATGCTGGG
Геном В пшениці сорту Hatcher	GGTTTCCAGATTCTCGTACTAAGACAGCGGCAAGCAATGCTGGG
Мутантний геном В	GGTTTCCAGATTCTCGTACTAAGACAGCGGCAAGCAATGCTGGG
Геном D пшениці сорту Hatcher	GGTTTCCAGATTCTCGTACTAAGACAGCGGCAAGCAATGCTGGG
Мутантний геном D	GGTTTCCAGATTCTCGTACTAAGACAGCGGCAAGCAATGCTGGG

Фіг. 7

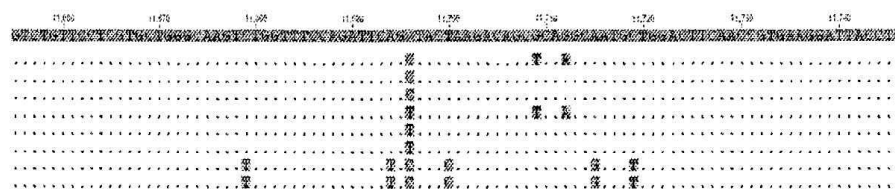


Фіг. 8

- Консенсусна (узагальноюча) послідовність
1. Трансляція генома А пшениці сорту Hatcher
  2. Трансляція генома В пшениці сорту Hatcher
  3. Трансляція генома D пшениці сорту Hatcher
  4. Трансляція мутантного гена А
  5. Трансляція мутантного гена В
  6. Трансляція мутантного гена D
  7. Трансляція gi|199600899|emb|AM408429.1|
  8. Трансляція gi|199600901|emb|AM408430.1|



- Консенсусна (узагальноюча) послідовність
- Геном А пшениці сорту Hatcher
- Геном В пшениці сорту Hatcher
- Геном D пшениці сорту Hatcher
- Мутантний геном А
- Мутантний геном В
- Мутантний геном D
- gi|199600899|emb|AM408429.1|
- gi|199600901|emb|AM408430.1|



Фіг. 9

