УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119742** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)
A01H 5/00
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)
A23L 7/10 (2016.01)
C07K 14/415 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2015 02663**

(22) Дата подання заявки: **22.08.2013**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **12.08.2019**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2012903673**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **24.08.2012**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **AU**

(41) Публікація відомостей про заявку: **25.08.2015, Бюл.№ 16**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **12.08.2019, Бюл.№ 15**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/AU2013/000942, 22.08.2013**

(72) Винахідник(и):
Чендлєр Пітер Майкл (AU),
Хардінг Керол Енн (AU)

(73) Власник(и):
КОММОНВЕЛТ САЙНТІФІК ЕНД ІНДАСТРІЕЛ РІСЕРЧ ОРГАНІЗЕЙШН,
Limestone Avenue, Campbell, Australian Capital Territory 2612, Australia (AU),
ГРЕЙНЗ РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КОРПОРЕЙШН,
Level 4, 4 National Circuit, Barton, ACT 2600, Australia (AU)

(74) Представник:
Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WU J.et al. Dominant and pleiotropic effects of a GAI gene in wheat results from a lack of Interaction between DELLA and GID1. Plant physiology, 2011, Vol. 157, no. 4, P. 2120 – 2130
AIXIA LI et al. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene,-, and development of an allele-specific PCR marker. Molecular breeding, Kluwer academic publishers, DO, 2012, Vol. 30, no. 3, P. 1443 – 1451
GOODING M.J. et al. Reduced height alleles () and Hagberg falling number of wheat. Journal of cereal science, Academic press LTD, GB, 2012, Vol. 55, no. 3, P. 305 – 311
PEARCE S. et al. Molecular characterization of Rht-1 dwarfing genes in hexaploid wheat. Plant physiology, 2011, Vol. 157, P. 1820 – 1831
CHANDLER P.M. et al. "Overgrowth" mutants in barley and wheat: new alleles and phenotypes of the "green revolution" DELLA gene. Journal of experimental botany, 2013, Vol. 64, no. 6, P. 1603 – 1613

(54) РОСЛИНА ПШЕНИЦІ З НОВИМИ АЛЕЛЯМИ Rht-B1

(57) Реферат:

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

UA 119742 C2

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

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

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

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ, ЩО ПЕРЕДУЄ ВИНАХОДУ

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

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

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

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

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

Таким чином, залишається необхідність у поліпшених сортах напівкарликової пшениці.

СУТЬ ВИНАХОДУ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

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

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

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

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

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

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

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

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

Примітки до списку послідовностей

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

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

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

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

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

SEQ ID NO:6 демонструє нуклеотидну послідовність довжиною 7057 нуклеотидів гена Rht1-B1b Triticum aestivum для (номер доступу GeneBank FN649763) з культивару Xiaoyan54. Нуклеотиди 1-2136 відповідають промотору і 5'-UTR Rht-B1b, нуклеотиди 2137-4002 відповідають кодуючій області білка, що переривається нуклеотидною заміною з C на T у положенні 2326 відносно дикого типу, і нуклеотиди 4003-7057 відповідають 3'-UTR Rht-B1b і 3'-області гена.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Рослини

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

для порівняння. Для проведення порівняння рослину за винаходом і контрольну рослину вирощують по суті в однакових часових умовах і умовах навколишнього середовища, наприклад у повторних польових випробуваннях, включаючи однакові температурний режим, умови освітлення, подачу живильних речовин і води і характеристики ґрунту. Переважно висоту рослини вимірюють у вирощуваних у польових умовах рослин, хоча для порівняння також можна використовувати рослини, вирощувані в теплицях і зростаючі відповідно до польових випробувань, як відомо в даній галузі. Висоту рослин можна вимірювати в будь-який момент циклу росту, але переважно її вимірюють при дозріванні рослин.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Як використовують у даному документі, "химерний ген" або "генетична конструкція" стосується будь-якого гена, що не є природним геном у його природному положенні, тобто з ним проводили штучні маніпуляції, включаючи химерний ген або генетичну конструкцію, що інтегровані в геном пшениці. Як правило, химерний ген або генетична конструкція містять регуляторні і транскрибовані або кодуючі білок послідовності, які разом у природі не зустрічаються. Таким чином, химерний ген або генетична конструкція може містити регуляторні послідовності і кодуючі послідовності, що походять з різних джерел, або регуляторні послідовності і кодуючі послідовності, що походять з одного і того ж джерела, але організовані відмінно від того, як вони існують у природі. Термін "ендогенний" застосовують у даному документі для позначення речовини, яку у нормі продукує немодифікована рослина на тій же стадії розвитку, як досліджувана рослина, переважно рослина пшениці. "Ендогенний ген" стосується природного гена в його природному положенні в геномі організму, переважно в рослині пшениці. Як використовують у даному документі, "рекомбінантна молекула нуклеїнової кислоти" стосується молекули нуклеїнової кислоти, що сконструйована або модифікована за допомогою технології рекомбінантних ДНК. Терміни "чужорідний полінуклеотид" або "екзогенний полінуклеотид", або "гетерологічний полінуклеотид" і т. п. стосуються будь-якої нуклеїнової кислоти, яку вводять у геном клітини, переважно геном пшениці, за допомогою експериментальних маніпуляцій, але яка в природі не зустрічається в цій клітині. Вони включають модифіковані форми генних послідовностей, що знаходяться в цій клітині, за умови, що ген, що вводиться, відносно природного гена містить визначену модифікацію, наприклад внесену мутацію або присутність гена селективного маркера. Чужорідні або екзогенні гени можуть являти собою гени, що існують у природі, які вводять у неприродний організм, природні гени, які вводяться в нове положення у природного хазяїна, або химерні гени або генетичні конструкції. "Трансген" являє собою ген, який вводять у геном способом трансформації. Термін "генетично модифікований" включає введення генів у клітини, мутацію генів у клітинах і зміну або модуляцію регуляції гена в клітинах або організмах, у яких проводять ці дії, або їх потомстві.

"Функціонально зв'язаний" з транскрибованим полінуклеотидом промотор або енхансерний елемент означає поміщення транскрибованого полінуклеотиду (наприклад, кодуючого білок полінуклеотиду або іншого транскрипту) під регуляторний контроль промотору, який потім контролює транскрипцію цього полінуклеотиду. При конструюванні комбінацій гетерологічний промотор/структурний ген, як правило, переважно поміщати промотор або його варіант на відстані від ділянки старту транскрипції транскрибованого полінуклеотиду, яка є приблизно такою ж, як відстань між цим промотором і геном, який він контролює в його природних умовах; тобто геном, з якого одержаний промотор. Як відомо в даній галузі, проводити визначену зміну цієї відстані без втрати функції.

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

"Частка проростання" насіння стосується відсотка насіння у популяції, що проростає за визначений період часу, наприклад до 21 доби, або в період від 1 до 10 діб після початку набухання. Для визначення відсотка проростання залежно від часу популяцію насіння можна оцінювати кожну добу протягом декількох діб. Визначені аспекти винаходу стосуються зміни/модуляції частки проростання насіння. Ці зміна/модуляція можуть бути транзиторними протягом життя насіння. Наприклад, після збирання насіння трансгенної рослини за винаходом може мати змінену частку проростання при порівнянні з насінням відповідної нетрансгенної рослини після збирання, однак після шести місяців зберігання в елеваторі насіння тієї ж трансгенної рослини за винаходом може мати таку ж частку проростання при порівнянні з насінням відповідної нетрансгенної рослини після шести місяців зберігання в елеваторі, або навпаки. Іншими словами, у той самий момент протягом життя насіння воно має змінену частку проростання при порівнянні з придатним контролем (нетрансгенним або дикого типу і т. д.), що піддавався впливу тих же умов.

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

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

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

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

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

Конструкції нуклеїнових кислот, придатні для одержання зазначених вище трансгенних рослин, можна легко одержувати стандартними способами. Для забезпечення відповідної експресії гена, кодуючого іРНК, що представляє інтерес, конструкція нуклеїнової кислоти, як правило, містить один або декілька регуляторних елементів, таких як промотори, енхансери, а також послідовності термінації транскрипції або поліаденілювання. Такі елементи добре відомі в даній галузі. Область ініціації транскрипції, що містить регуляторний елемент(и), може забезпечувати регульовану або конститутивну експресію в рослині. Регуляторні елементи можна вибирати, наприклад, зі специфічних для насіння промоторів або промоторів, не специфічних для клітин насіння (таких як промотор убіквітину або промотор CaMV35S або посилений промотор 35S). Приклади специфічних для насіння промоторів, придатних за даним винаходом, як необмежувальні приклади, включають промотор низькомолекулярного глютеніну пшениці (Colot et al., 1987), промотор експресії α-амілази в насінні пшениці (Stefanov et al., 1991) і промотор гордеїну (Brandt et al., 1985). Промотори можуть регулювати такі фактори, як температура, світло або стрес. Як правило, регуляторні елементи знаходяться з 5'-кінця генної послідовності, що підлягає експресії. Також конструкція може містити інші елементи, що підсилюють транскрипцію, такі як області поліаденілювання nos 3' або ocs 3', або термінатори транскрипції.

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

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

Один з варіантів здійснення даного винаходу стосується рекомбінантного вектора, що містить щонайменше одну полінуклеотидну молекулу за даним винаходом, вбудовану у будь-який вектор, здатний до доставки молекули нуклеїнової кислоти в клітину-хазяїна. Такий вектор містить гетерологічні послідовності нуклеїнових кислот, що являють собою послідовності нуклеїнових кислот, які у природі не граничать з молекулами нуклеїнової кислоти за даним винаходом і які переважно походять з видів, відмінних від видів, з яких походить молекула(и) нуклеїнової кислоти. Вектор може являти собою РНК або ДНК, бути прокаріотичним або еукаріотичним, і, як правило, він являє собою вірус або плазміду.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Матеріали і методи

Рослинний матеріал

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

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

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

Мутагенез

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

Конструювання похідних ліній, що несуть алелі посиленого росту

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

Продукція α-амілази напівзернами з ендоспермом

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

Оцінка стану спокою зерна

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

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

Довжина колеоптилю ліній ячменю і пшениці з посиленим ростом

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

Вихід на поверхню після глибокого засівання в сухих умовах

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

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

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

Вимірювання довжини коренів

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

Ампліфікація ДНК за допомогою ПЛР і секвенування

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

Послідовності ДНК

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

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

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

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

Зерна пшениці сорту Maringá, який містить алель Rht-B1c, що викликає важку карликовість рослин, обробляли азидом натрію, як описано в прикладі 1. Зерна, що мутували, висівали в полі й одержаним рослинам M_1 дозволяли самозапліднюватися. Після дозрівання з рослин M_1 збирали зерна M_2. Зерна M_2 висівали в полі або при високій щільності в лотки (фігура 1) у теплиці і піддавали скринінгу на збільшену висоту протягом росту на ранньому етапі або при дозріванні в полі. Цими способами скринінгу піддали приблизно 1,6 мільйона рослин M_2. На фігурі 1 представлено як легко можна ідентифікувати мутантів. Вибирали приблизно 400 рослин, що демонстрували швидкості подовження раннього листа або висоту зрілої рослини, що знаходилася в діапазоні від трохи більшої, ніж карликовий батько сорту Maringa (Rht-B1c), до такої ж високорослої, як майже ізогенні рослини Rht-B1a (алель дикого типу). Їх самозапліднювали і рослини-нащадки вирощували в контрольованих умовах і порівнювали з батьківськими рослинами (Rht-B1c) і рослинами дикого типу (Rht-B1a) (фігура 2). Ці рослини назвали "мутанти з посиленим ростом", тому що вони росли з підвищеними швидкостями або до збільшеної висоти зрілої рослини відносно батьківського сорту.

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

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

B1c, кожен являє собою один варіант алеля Rht-B1c Maringa. Їх позначили Rht-B1c.1, Rht-B1c.2, Rht-B1c.3 і т. д. Вони перераховані в таблиці 3. Багато які з 35 алелів представлені в декількох лініях, що містять ідентичні специфічні мутації. У деяких випадках ці декілька ліній можуть бути сестринськими, тоді як в інших випадках вони можуть представляти незалежні події мутування. Усього спостерігали 62 незалежні події, що породили 35 алелів.

Мутанти демонстрували три різних класи мутацій, відповідальних за фенотип посиленого росту. У першому класі десять алелів містили передчасні кодони термінації трансляції в гені Rht-B1. У більшості випадків мутантний кодон являє собою заміну кодону TGG (кодуючого Trp) на TGA (стоп-кодон). У ячмені передчасні стоп-кодони в DELLA приводять до подовженого потоншеного фенотипу і чоловічої стерильності. На відміну від цього, рослини цих десяти мутантних ліній пшениці, за одним виключенням, росли до висоти, що була такою ж або майже такою ж, як у високорослої (дикого типу) ізолінії, і демонстрували подібну з диким типом фертильність. Передбачувано експресія білків Rht-1 геномів A і/або D у цих мутантів забезпечувала генетичну компенсацію нуль-мутантів генів геному B і обмежувала фенотипічну експресію до "високорослої", а не "потоншеної". Одне виключення, рослини єдиного представника Rht-B1c.22 representative (лінія TR544) були напівкарликовими, а не "високорослими". Цей фенотип міг бути результатом альтернативного сплайсингу мутантного гена Rht-B1c.22 у цих рослинах, який приводив до утворення білка Rht-B1 з іншою вставкою в рамку зчитування (описано нижче).

Другий клас включав заміни амінокислот у білку Rht-B1, кодованому геномом B. Двадцять прикладів перераховані в таблиці 3. Представляє інтерес порівняння цих 20 замін з мутантами DELLA із замінами, одержаними у ячменю (приклад 5), див. фігуру 3. У двох видів існує 31 одиночна заміна амінокислот, включаючи чотири ділянки, де відбулися ідентичні заміни амінокислот. Також помічено, що у ячменю й у пшениці відбулися ідентичні, хоча і незалежні, мутації, де одну і ту ж мутацію виявляли у відповідних положеннях у лініях, що походять з різних субпопуляцій зерен M_2.

Фігура 3 схематично демонструє ділянки замін амінокислот у мутантів відносно положень консервативних мотивів у C-кінцевій області білків ячменю і пшениці. Спостереження, що мутації з посиленим ростом розташовані на всьому протязі більшої частини C-кінцевої області, означає, що існує суттєвий потенціал для змін зв'язування білків DELLA із взаємодіючими білковими партнерами.

Третій клас мутантів включав 5 алелів, де кожний містив мутації в областях Rht-B1, для яких теоретично розраховано, що вони залучені у вирізання більшості вставок у ген Rht-B1, які утворювали алель Rht-B1c (таблиця 3). Кожний з цих алелів зачіпав один з чотирьох нуклеотидів, що безпосередньо граничать з донорною і акцепторною ділянками сплайсингу. У деяких випадках, включаючи алель Rht-B1c.22, і залежно від того, яке програмне забезпечення прогнозування сплайсингу використовували, для цих змін послідовності існував потенціал зміни переважної ділянки сплайсингу, таким чином одержуючи білки Rht-B1 з трохи більшими або меншими вставками в рамку зчитування. Ці алелі сплайсингу передбачувано приводили до продукції меншої кількості білка Rht-B1, що містить вставку 30 амінокислот, і/або приводили до продукції модифікованих білків Rht-B1 зі зміненими вставками в рамку зчитування. Експериментальні дані по зміні ефективності сплайсингу одержували, досліджуючи РНК способами ЗТ-ПЛР.

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

Мутанти пшениці з посиленим ростом, що містять нові алелі Rht-B1, тестували на ряд ознак, які значимі для практичного застосування в полі для комерційного одержання пшениці. Вимірювали довжину зрілих стебел, довжину колеоптилів і відносний стан спокою зерна для зерна, одержуваного з мутантних рослин, і порівнювали з контрольними рослинами. Дані наведені в таблиці 4. Довжину стебла зрілих рослин оцінювали в різних умовах зрошуваних полів (тобто з гарним водопостачанням) і в різних сезонах. У більшості випадків одержували чотири незалежних точки даних і використовували для розрахунку середніх, представлених у таблиці 4, які виражені у вигляді відсотків відносно рослин Rht-B1a. Різні алелі приводять до різної довжини стебла, де деякі приклади (наприклад, Rht-B1c.6, c.8, c.21) є повністю карликовими, а інші (Rht-B1c.11, c.25, c.31) є такими високорослими, як ізолінія Rht-B1a. У більшості випадків між лініями, що несуть один і той же алель, існують невеликі варіації. На основі напівкарликовості, спостережуваної у рослин ізолінії Rht-B1b, що складала приблизно 81 % висоти рослини дикого типу (високорослої), виявили 15 нових алелів, що приводили до того ж ступеня карликовості, наприклад у діапазоні 75-91 % від високорослої рослини.

Також у мутантних рослин вимірювали довжину колеоптилів і розраховували як відсоток від середньої довжини колеоптилю у рослин Rht-B1a. Значення середньої 2-4 незалежних

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

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

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

Приклад 4. Виділення мутантів ячменю з посиленим ростом

Для виділення мутантів ячменю з посиленим ростом як вихідний матеріал вибирали три карликових мутанти ячменю "Himalaya". Кожен мутант містив визначену однонуклеотидну заміну в гені, залученому у (i) біосинтез GA, а саме Grd2, кодуючому GA3-оксидазу, (ii) рецептор GA "GID1", кодований геном Gse1, і (iii) відповідь на GA, а саме ген Sln1, кодуючий білок DELLA ячменю. Зерна кожної карликової лінії обробляли азидом натрію, висівали в полі і дозволяли самозапліднюватися з одержанням насіння M_1. Його висаджували з одержанням рослин M_1, з яких збирали зерна M_2. Одержані паростки M_2, вирощувані в ґрунті, піддавали скринінгу на стадії другого листа на паростки, що демонструють більш швидкий ріст, ніж їх карликові сибси. Усього з висіяних приблизно 10^6 зерен одержали три різних категорії мутантів, що представляють приблизно 50000 колосів M_1.

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

Друга категорія, одержувана тільки на генетичній основі карлика Sln1d, включала три рослини, що росли більш швидко, ніж їх карликові сибси, але усе ще зберігали визначений ступінь карликовості. У наступному поколінні потомство цих рослин складалося з карликових і типових подовжених потоншених рослин у співвідношенні приблизно 3:1. Додатковий аналіз (нижче) продемонстрував, що вони містили нові алелі sln1, у яких друга мутація функціонувала як внутрішньогенний супресор мутації Sln1d.

Третя категорія, спостережувана на основі карликів з порушеним біосинтезом GA і рецептором GA, складалася з типових подовжених потоншених мутантів. Їх легко розпізнавали по їх характерному сильно подовженому фенотипу і блідо-зеленому забарвленню і, після пересадження, по їх сильно подовжених стеблах і стерильності. Цей клас мутантів очікувався, оскільки нуль-алелі подовженості sln1 є епістатичними для дефектів у біосинтезі GA або функції рецепторів GA (Chandler and Robertson, 1999).

Приклад 5. Ідентифікація мутацій ячменю і дослідження генетичного зчеплення

З потоншених рослин трьох сегрегуючих ліній на основі карлика Sln1d (друга категорія вище) одержували ДНК і секвенували ген Sln1. Рослини кожної лінії містили різні нові мутації в гені Sln1, що приводять до передчасного кодону термінації трансляції у відкритій рамці

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

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

У двох лініях з посиленим ростом (TR26, TR103), що залишилися, були відсутні які-небудь нові мутації в ORF Sln1 і потенційно були присутні мутації в інших генах. Вони виникали на основі карлика Sln1d. Рослини цих ліній схрещували з Himalaya разом з Sln1d.5 як позитивним контролем для оцінки генетичного зчеплення алеля карликовості Sln1d і нового алеля посиленого росту. Популяція F_2 після схрещування контрольного WT×Sln1d.5 демонструвала очікуваний розподіл максимальної швидкості подовження листів 3:1 (Sln1d.5:WT). Індивідуальних рослин F_2 з уповільненою швидкістю росту батьківського Sln1d не спостерігали, що вказувало на повне зчеплення вихідної мутації карликовості і вторинної мутації посиленого росту в цій відносно невеликій популяції. Таким чином, вторинна мутація являла собою внутрішньогенну супресорну мутацію. Подібний результат спостерігали для популяції F_2 TR103×WT, що вказувало на те, що мутація посиленого росту в TR103 демонструвала повне зчеплення з Sln1d. На відміну від цього популяція F_2 TR26×WT містила більшість паростків зі швидкостями росту, такими ж, як Sln1d, приблизно 25 % зі швидкостями росту, такими ж, як у WT, і деякі паростки з проміжними швидкостями росту. Ці результати узгоджуються з тим, що мутація посиленого росту в TR26 знаходиться в гені, що не зчеплений з Sln1.

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

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

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

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

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

Приклад 7. Продукція α-амілази напівзернами з ендоспермом

Продукція α-амілази напівзернами з ендоспермом ячменю дикого типу залежить від присутності активного GA. Таким чином, моніторинг α-амілазної активності за відсутності активного GA забезпечує зручну міру ступеня "базальної" передачі сигналу GA у мутантів. Дві контрольні лінії з нормальною чутливістю до GA (WT, grd2b) через 72 години інкубації з GA_3 демонстрували майже 15-кратне збільшення α-амілазної активності в порівнянні з базальними рівнями (таблиця 5). Коли досліджували мутантів з посиленим ростом і їх карликових батьків, вихідний рівень α-амілазної активності у зрілих напівзерен з ендоспермом був дуже низьким, але при інкубації деяких ліній з посиленим ростом (Sln1d.4, Sln1d.7, Sln1d.8, Sln1d.9; Sln1d, spy1a; grd2b, sln1m; grd2b, sln1o; grd2b, sln1s) демонстрували збільшену продукцію α-амілази відносно карликового батька, тоді як в інших (Sln1d.5, Sln1d.6, Sln1d.10; gse1n, sln1n) цього не спостерігали. Серед похідних Sln1d з посиленим ростом, похідне Sln1d.9 було незвичайним, накопичуючи дуже високі рівні α-амілази і через 42 години, і через 72 години інкубації, незважаючи на те, що ця лінія демонструвала тільки помірне відновлення швидкості росту (таблиця 5).

Приклад 8. Інші ознаки, асоційовані з алелями посиленого росту

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

Однією загальною характеристикою мутантних рослин ячменю з посиленим ростом було те, що вони продукували більш великі зерна, ніж їх карликові батьки. У різних врожаях у різних сезонах росту розміри зерен в основному були проміжними між батьківським карликом (маса зерна приблизно 40 мг) і високорослим диким типом (маса зерна приблизно 55 мг). Однак декілька ліній з посиленим ростом, що при дозріванні були такими ж високорослими, як дикий тип, мали значно більші колоси і зерна. У різних тепличних поколіннях зерна grd2b і sln1m у середньому були на 40 % більше, ніж зерна карликового батька grd2b. Коли проводили зворотне схрещування з основою Himalaya, спостерігали 20 % середнє збільшення спостережуваної маси зерна, а при ауткросингу з комерційним сортом Sloop спостерігали 15 % збільшення в матеріалі BC_2. Повний аналіз проводили, коли стали доступні сестринські лінії Sloop BC_3.

Приклад 9. Опис деяких досконалих маркерів

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

Приклад 10. Зворотне схрещування вибраних алелів з іншими сортами пшениці

Дослідження схрещування у ячменю, як описано вище, продемонстрували 100 % спільне успадковування у мутантних алелів Rht-B1 і фенотип посиленого росту. У пшениці проводили два експерименти по схрещуванню. У першому рослини шести ліній з посиленим ростом схрещували з гомозиготами Maringa по алелю Rht-B1b (напівкарликовість), а рослини інших чотирьох ліній схрещували з гомозиготами Maringa по алелю Rht-B1a дикого типу (високий ріст). Потомство F_1 піддавали самозапиленню з одержанням рослин F_2. Наявності карликових (гомозиготних по Rht-B1c) рослин у поколінні F_2 не детектували в жодному випадку, що вказує на те, що для кожної з десяти ліній спостерігали 100 % генетичне зчеплення між новими алелями Rht-B1 і фенотипом посиленого росту, і нова мутація, що пригнічує карликовість, знаходилася в гені Rht-B1, а не в іншому місці геному. У схрещуваннях з Rht-B1b у потомстві F_2 продемонстровані очікувані профілі успадковування для алелів посиленого росту і Rht-B1b, тобто співвідношення гомозигот:гетерозигот:гомозигот 1:2:1. В одному зі схрещувань батька з

посиленим ростом (лінія TR550, Rht-B1c.8) спостерігали значною мірою більш карликовим, ніж Rht-B1b, і популяція F_2 демонструвала сегрегацію по висоті (гомозиготи з посиленим ростом = 65 см, гетерозиготи = 80-85 см, гомозиготи Rht-B1b=95-100 см) у співвідношенні, що незначно відрізняється від 1:2:1, що означає, що фенотип визначали по відмінності в одному гені. Важливо, що цей помірно карликовий алель посиленого росту в лінії TR550 був асоційований з тривалим станом спокою. Крім того, популяція F_3 зерен вирощених у полі рослин F_2 демонструвала тривалий стан спокою для гомозиготних по Rht-B1c.8 рослин F_2, проміжний стан спокою для гетерозиготних по Rht-B1c.8/Rht-B1b рослин F_2 і короткочасний стан спокою для гомозиготних по Rht-B1b рослин F_2. Цей результат означає, що алель посиленого росту після схрещування є визначальним для фенотипів висоти і стану спокою.

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

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

Обговорення

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

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

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

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

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

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

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

Таблиця 1

Лінії, генотипи і мутації ячменю

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

Виноски

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

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

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

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

Таблиця 2

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

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

Таблиця 3

Лінії пшениці, генотип Rht-B1 і мутації

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

Продовження таблиці 3

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

Таблиця 4

Фенотипи ліній з посиленим ростом відповідно до алеля

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

Продовження таблиці 4

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

Продовження таблиці 4

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

Продовження таблиці 4

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

Таблиця 5

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

Лінія	Генотип LER	LER_{max}	α-амілаза (Ceralpha одиниці/зерно) через:		
		(мм.доб.$^{-1}$)	0 год. ($\times 10^3$)	42 год.	72 год.
Him	WT	34,6±0,9	1,6	0,36±0,08	1,7±0,09
Him (GA_3)	WT	52,3±0,1	н.д.	9,81±0,86	23,1±2,8
M640	Sln1d	9,2±0,2	1,6	0,21±0,01	0,19±0,05
M640 (GA_3)	Sln1d	12,1±0,3	н.д.	н.д.	н.д.
TR1	Sln1d.4	23,8±0,5	2,5	0,26±0,01	2,88±0,27
TR9	Sln1d.5	15,5±0,7	1,6	0,21±0,01	0,16±0,04
TR13	Sln1d.6	15,8±0,6	1,8	0,20±0,02	0,19±0,04
TR26	Див. таблицю 6				
TR56	Sln1d.7	16,7±0,6	2,7	0,93±0,22	3,24±0,47
TR60	Sln1d.8	28,6±0,9	3,6	0,82±0,13	3,76±0,23
TR100	Sln1d.9	20,2±0,6	3,2	4,34±0,13	14,6±0,39
TR103	-	16,1±0,4	3,4	0,74±0,10	0,39±0,1
TR107	Sln1d.10	13,2±0,3	2,4	0,39±0,07	0,17±0,03
M463	grd2b	16,9±0,8	2,5	0,67±0,04	1,3±0,2
M463 (GA_3)	grd2b	49,8±0,8	н.д.	7,20±0,73	18,9±1,4
TR216	grd2b, sln1s	23,2±0,6	4,1	1,01±0,12	4,16±0,55
TR261	grd2b, sln1m	38,4±1,5	3,8	7,50±0,24	18,1±0,8
TR305	grd2b, sln1o	32,9±0,9	3,8	9,85±0,43	16,9±1,2
M693	gse1n	19,7±0,4	2,5	0,29±0,05	0,11±0,01
M693 (GA_3)	gse1n	35,3±1,2	н.д.	н.д.	н.д.
TR407	gse1n, sln1n	29,3±0,5	9,9	0,27±0,03	0,26±0,13
M240	sln1m	42,2±1,6	6,5	11,6±1,4	22,6±2,3
M242	sln1n	44,3±3,1	3,0	1,07±0,08	6,39±1,52
M243	sln1s	35,4±0,9	3,8	3,66±0,53	15,4±0,9

Таблиця 6

Дія spy1a на швидкості росту і продукцію α-амілази

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

Таблиця 7

Довжина колеоптилів (у мм) ліній ячменю з посиленим ростом

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

Таблиця 8

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

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

Продовження таблиці 8

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

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

ПОСИЛАННЯ

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

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

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION

<120> ПШЕНИЦЯ З НОВИМИ АЛЕЛЯМИ RHT-B1

<130> 35103002/WJP

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 3892
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 1
atgaagcgcg agtaccagga cgccggaggg agcggcggtg gccggggagg catgggctcg 60

tccgaggaca agataatggt gtcggggtcg gcggcggcgg gggaggggga ggaggtggac 120

gagctgctgg cggcgctcgg gtacaaggtg tgttggcgcc gcctcctcgc agcgccgttc 180

ttcttcctct catctctcat gaacacacac catggagaaa ctctacacac acacacacac 240

aaccaagaag aacaccggct gttactttgc acgagaggcc cttctccttg gtggaacaag 300

agactacatt gtgtttttcc cagccctctt ggctcacttt tctcattcat cttctccaac 360

ttaaatagct aagtacaaga ctgacccaag cacttgccag ccgccactct cgcagctgct 420

aacgcccact aactcatgca ctaggccact aatcacaact aactcatgca cgcatgcacc 480

acaccggcca ctatcacatg accgggcgac taacccacta gctacatgca tgcaactaga 540

taactacctt atccatgcac tccaggactc ggcaactcca ccggacgccc cgctcgtagc 600

agccgcggga cttgctgcta acgaaaccac gcacatcaag attagtgcta acatttcccc 660

ccttaatctt gacacgcctt gccgtcgacc gtcatcttga acgcctgagc tcgacgtctt 720

cacacgcctc cgcgcccgct gcgacgtgcc gtgcgcccgc ctgtcaccgg agttgatgca 780

gcttgcgtcg tcgtcgtcac ggccgtgacc cagcctgcgg acccgacccg acgcatcgac 840

gccggtcaca ccgccacgga cccgacctgg cgcactgacg ccggtcgcac cgtgctccct 900

cacgaccccg gcgacatacg ccgagctcct ccgccggcga cacacgcctg gcgtccctct 960

gcgtcccgca cgtcccgcac gcatccgacg tgcccgacga gcccgaccgc agcagtgcgt 1020

cccgcacgtc ccgcgcgcat tcgacgcgcc cgacgagccc gacagcacca gacgctcacc 1080

acgtgccgcc tccgcgtccg ccatggcagc caccacgccg cgcctacgtg ccacgcacct 1140

tccacggtcg ttgccccgag ccgtcgcgac ctatgcgcca ccacgcaggt ccttcgcgac 1200

ctcctcgtct ccgcgaccgc cgtgcccttc gcgcacactc cccacgtccc cgcgctccca 1260

gcccgcgctc ccgccgcgca cgtacgcggt ctgcgcaacc aggtccagcg cctcgacgcg 1320

gtccactccc gcggtcccga cgcgctcgac acgtccagtg cgcgcccata acacgcaccg 1380

gtcgcgtccg gctcgccgcc gcatcttatt gccctgcacc gccgcggcct ccatgccgcc 1440

atgcagtgcc tccacgccgc cacaccgtgt tgcaccgctg cgccaccacg cagcgcctcg 1500

gcggcctccg cggtcgccgc acgtacgacg tcaccgcccg ccgcctccgc cacgcgctcg 1560

ccgcgcgccg cagccgatgc ctccatgtcg gccgcgcatg ccccgtccgc cgcggacgcc 1620

accgcgcgcc acggccgccc ctcgaacctt gtggctctga ataccaaatg ttggcgccgc 1680

ctcctcgcag cgccgttctt cttcctctca tctctcatga acacacacca tggagaaact 1740

ctacacacac acacacacaa ccaagaagaa caccggctgt tactttgcac gagaggccct 1800

tctccttggt ggaacaagag actacattgt gtttttccca gccctcttgg ctcacttttc 1860

tcattcatct tctccaactt aaatagctaa gtacaagact gacccaagca cttgccagcc 1920

gccactctcg cagctgctaa cgcccactaa ctcatgcact aggccactaa tcacaactaa 1980

ctcatgcacg catgcaccac accggccact atcacatgac cgggcgacta acccactagc 2040

tacatgcatg caactagata actaccttat ccatgcactc caggactcgg caactccacc 2100

ggacgccccg ctcgtagcag ccgcgggact tgctgctaac gaaaccacgc acatcaagat 2160

tagtgctaac aaggtgcggg cgtccgacat ggcggacgtg gcgcagaagc tggagcagct 2220

ggagatggcc atggggatgg gcggcgtggg cgccggcgcc gcgcccgacg acagcttcgc 2280

cacccacctc gccacggaca ccgtgcacta caaccccacc gacctctcct cctgggtcga 2340

gagcatgctg tcggagctca acgcgccgcc gccgcccctc ccgcccgccc cgcagctcaa 2400

cgcctccacc tcctccaccg tcaccggcgg cgggtacttc gatctcccgc cctccgtcga 2460

ctcctcctgc agcacctacg cgctgcggcc gatcccgtcc ccggccgtcg cgccggccga 2520

cctctccgcc gactccgtcg tgcgggatcc caagcggatg cgcactggcg gcagcagcac 2580

ctcgtcgtca tcctcatcgt cctctctcgg cggtggcggc gccaggagct ctgtggtgga 2640

ggctgccccg ccggtggccg ccgcggccgg tgcgcccgcg ctgccggtcg tcgtggtcga 2700

cacgcaggag gccgggattc ggctggtgca cgcgctgctg gcgtgcgcgg aggccgtgca 2760

gcaggagaac ttctctgccg cggaggcgct ggtgaagcag ataccttgc tggccgcgtc 2820

ccagggcggc gccatgcgca aggtcgccgc ctacttcggc gaggccctcg cccgccgcgt 2880

cttccgcttc cgcccgcagc cggacagctc cctcctcgac gccgccttcg ccgacctcct 2940

ccacgcgcac ttctacgagt cctgccccta cctcaagttc gcccacttca ccgccaacca 3000

ggccatcctg gaggcgttcg ccggctgccg ccgcgtgcac gtcgtcgact tcggcatcaa 3060

gcaggggatg cagtggcccg cccttctcca ggccctggcg ctccgtcccg gcggccctcc 3120

ctcgttccgc ctcaccggcg tcggcccccc gcagccggac gagaccgacg ccttgcagca 3180

ggtgggctgg aagctcgccc agttcgcgca caccatccgc gtcgacttcc agtaccgcgg 3240

cctcgtcgcc gccacgctcg cggacctgga gccgttcatg ctgcagccgg agggcgagga 3300

ggacccgaac gaggagcccg aggtaatcgc cgtcaactcg gtcttcgaga tgcaccggct 3360

gctcgcgcag cccggcgccc tggagaaggt cctgggcacc gtgcgcgccg tgcggccgag 3420

gatcgtcacc gtggtggagc aggaggcgaa ccacaactcc ggcacattcc tggaccgctt 3480

caccgagtcc ctgcactact actccaccat gttcgattct ctggagggcg gcagctccgg 3540

cggcccatcc gaagtctcat ctggggcggc tgctgctcct gccgccgccg gcacggacca 3600

ggtcatgtcc gaggtgtacc tcggccggca gatctgcaac gtggtggcct gcgagggggc 3660

ggagcgcaca gagcggcacg agaccctggg gcagtggcgg aaccgcctcg gcaacgccgg 3720

gttcgagacc gtccacctgg gctccaatgc ctacaagcag gcgagcacgc tgctggcgct 3780

cttcgccggc ggcgacgggt acaaggtgga ggagaaggag ggctgcctga cgctggggtg 3840

gcacacgcgc ccgctgatcg ccacctccgc atggcgcctg gccgcgccgt ga 3892

<210> 2
<211> 1956
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 2
atgaagcgcg agtaccagga cgccggaggg agcggcggtg gccggggagg catgggctcg 60

tccgaggaca agataatggt gtcggggtcg gcggcggcgg gggaggggga ggaggtggac 120

gagctgctgg cggcgctcgg gtacaaggac tcggcaactc caccggacgc cccgctcgta 180

gcagccgcgg gacttgctgc taacgaaacc acgcacatca agattagtgc taacaaggtg 240

cgggcgtccg acatggcgga cgtggcgcag aagctggagc agctggagat ggccatgggg 300

atgggcggcg tgggcgccgg cgccgcgccc gacgacagct tcgccaccca cctcgccacg 360

gacaccgtgc actacaaccc caccgacctc tcctcctggg tcgagagcat gctgtcggag 420

ctcaacgcgc cgccgccgcc cctcccgccc gccccgcagc tcaacgcctc cacctcctcc 480

accgtcaccg gcggcgggta cttcgatctc ccgccctccg tcgactcctc ctgcagcacc 540

tacgcgctgc ggccgatccc gtccccggcc gtcgcgccgg ccgacctctc cgccgactcc 600

gtcgtgcggg atcccaagcg gatgcgcact ggcggcagca gcacctcgtc gtcatcctca 660

tcgtcctctc tcggcggtgg cggcgccagg agctctgtgg tggaggctgc cccgccggtg 720

gccgccgcgg ccggtgcgcc cgcgctgccg gtcgtcgtgg tcgacacgca ggaggccggg 780

attcggctgg tgcacgcgct gctggcgtgc gcggaggccg tgcagcagga gaacttctct 840

gccgcggagg cgctggtgaa gcagataccc ttgctggccg cgtcccaggg cggcgccatg 900

cgcaaggtcg ccgcctactt cggcgaggcc ctcgcccgcc gcgtcttccg cttccgcccg 960

cagccggaca gctccctcct cgacgccgcc ttcgccgacc tcctccacgc gcacttctac 1020

gagtcctgcc cctacctcaa gttcgcccac ttcaccgcca accaggccat cctggaggcg 1080

ttcgccggct gccgccgcgt gcacgtcgtc gacttcggca tcaagcaggg gatgcagtgg 1140

cccgcccttc tccaggccct ggcgctccgt cccggcggcc ctccctcgtt ccgcctcacc 1200

ggcgtcggcc ccccgcagcc ggacgagacc gacgccttgc agcaggtggg ctggaagctc 1260

gcccagttcg cgcacaccat ccgcgtcgac ttccagtacc gcggcctcgt cgccgccacg 1320

ctcgcggacc tggagccgtt catgctgcag ccggagggcg aggaggaccc gaacgaggag 1380

cccgaggtaa tcgccgtcaa ctcggtcttc gagatgcacc ggctgctcgc gcagcccggc 1440

gccctggaga aggtcctggg caccgtgcgc gccgtgcggc cgaggatcgt caccgtggtg 1500

gagcaggagg cgaaccacaa ctccggcaca ttcctggacc gcttcaccga gtccctgcac 1560

tactactcca ccatgttcga ttctctggag ggcggcagct ccggcggccc atccgaagtc 1620

tcatctgggg cggctgctgc tcctgccgcc gccggcacgg accaggtcat gtccgaggtg 1680

tacctcggcc ggcagatctg caacgtggtg gcctgcgagg gggcggagcg cacagagcgg 1740

cacgagaccc tggggcagtg gcggaaccgc ctcggcaacg ccgggttcga gaccgtccac 1800

ctgggctcca atgcctacaa gcaggcgagc acgctgctgg cgctcttcgc cggcggcgac 1860

gggtacaagg tggaggagaa ggagggctgc ctgacgctgg ggtggcacac gcgcccgctg 1920

atcgccacct ccgcatggcg cctggccgcg ccgtga 1956

<210> 3
<211> 651
<212> Білок
<213> Triticum aestivum

<400> 3

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

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

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

Lys Asp Ser Ala Thr Pro Pro Asp Ala Pro Leu Val Ala Ala Ala Gly
50 55 60

Leu Ala Ala Asn Glu Thr Thr His Ile Lys Ile Ser Ala Asn Lys Val
65 70 75 80

Arg Ala Ser Asp Met Ala Asp Val Ala Gln Lys Leu Glu Gln Leu Glu
85 90 95

Met Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Pro Asp Asp
100 105 110

Ser Phe Ala Thr His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro Thr
115 120 125

Asp Leu Ser Ser Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Glu Leu Asn Ala Pro
130 135 140

Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ala Pro Gln Leu Asn Ala Ser Thr Ser Ser
145 150 155 160

Thr Val Thr Gly Gly Gly Tyr Phe Asp Leu Pro Pro Ser Val Asp Ser
165 170 175

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

Pro Ala Asp Leu Ser Ala Asp Ser Val Val Arg Asp Pro Lys Arg Met
195 200 205

Arg Thr Gly Gly Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ala Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro Pro Val
225 230 235 240

Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Ala Leu Pro Val Val Val Val Asp Thr
245 250 255

Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu
260 265 270

Ala Val Gln Gln Glu Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln
275 280 285

Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val Ala
290 295 300

Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe Arg Pro
305 310 315 320

Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu His
325 330 335

Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr
340 345 350

Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg Arg Val His
355 360 365

Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Leu
370 375 380

Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr
385 390 395 400

Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val
405 410 415

Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe Gln
420 425 430

Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe Met
435 440 445

Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro Glu Val Ile
450 455 460

Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln Pro Gly
465 470 475 480

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 4
atgaagcgcg agtaccagga cgccggaggg agcggcggtg gcgggggagg catgggctcg 60

tccgaggaca agatgatggt gtcggggtcg gcggcggcgg gggaggggga ggaggtggac 120

gagctgctgg cggcgctcgg gtacaaggtg cgggcgtccg acatggcgga cgtggcgcag 180

aagctggagc agctggagat ggccatgggg atgggcggcg tgggcgccgg cgccgcgccc 240

gacgacagct tcgccaccca cctcgccacg gacaccgtgc actacaaccc caccgacctc 300

tcctcctggg tcgagagcat gctgtcggag ctcaacgcgc cgccgccgcc cctcccgccc 360

gccccgcagc tcaacgcctc cacctcctcc accgtcaccg gcggcgggta cttcgatctc 420

ccgccctccg tcgactcctc ctgcagcacc tacgcgctgc ggccgatccc gtccccggcc 480

gtcgcgccgg ccgacctctc cgccgactcc gtcgtgcggg atcccaagcg gatgcgcact 540

ggcggcagca gcacctcgtc gtcatcctca tcgtcctctc tcggcggtgg cggcgccagg 600

agctctgtgg tggaggctgc cccgccggtg gccgccgcgg ccggtgcgcc cgcgctgccg 660

gtcgtcgtgg tcgacacgca ggaggccggg attcggctgg tgcacgcgct gctggcgtgc 720

gcagaggccg tgcagcagga gaacttctct gccgcggagg cgctggtgaa gcagataccc 780

ttgctggccg cgtcccaggg cggcgccatg cgcaaggtcg ccgcctactt cggcgaggcc 840

ctcgcccgcc gcgtcttccg cttccgcccg cagccggaca gctccctcct cgacgccgcc 900

ttcgccgacc tcctccacgc gcacttctac gagtcctgcc cctacctcaa gttcgcccac 960

ttcaccgcca accaggccat cctggaggcg ttcgccggct gccgccgcgt gcacgtcgtc 1020

gacttcggca tcaagcaggg gatgcagtgg cccgcccttc tccaggccct ggcgctccgt 1080

cccggcggcc ctccctcgtt ccgcctcacc ggcgtcggcc ccccgcagcc ggacgagacc 1140

gacgccttgc agcaggtggg ctggaagctc gcccagttcg cgcacaccat ccgcgtcgac 1200

ttccagtacc gcggcctcgt cgccgccacg ctcgcggacc tggagccgtt catgctgcag 1260

ccggagggcg aggaggaccc gaacgaggag cccgaggtaa tcgccgtcaa ctcggtcttc 1320

gagatgcacc ggctgctcgc gcagcccggc gccctggaga aggtcctggg caccgtgcgc 1380

gccgtgcggc cgaggatcgt caccgtggtg gagcaggagg cgaaccacaa ctccggcaca 1440

ttcctggacc gcttcaccga gtccctgcac tactactcca ccatgttcga ttctctggag 1500

ggcggcagct ccggcggccc atccgaagtc tcatctgggg cggctgctgc tcctgccgcc 1560

gccggcacgg accaggtcat gtccgaggtg tacctcggcc ggcagatctg caacgtggtg 1620

gcctgcgagg gggcggagcg cacagagcgg cacgagaccc tggggcagtg gcggaaccgc 1680

ctcggcaacg ccgggttcga gaccgtccac ctgggctcca atgcctacaa gcaggcgagc 1740

acgctgctgg cgctcttcgc aggcggcgac gggtacaagg tggaggagaa ggagggctgc 1800

ctgacgctgg ggtggcacac gcgcccgctg atcgccacct ccgcatggcg cctggccgcg 1860

ccgtga 1866

<210> 5
<211> 621
<212> Білок
<213> Triticum aestivum

<400> 5

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

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

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

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

Leu Glu Met Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Pro
65 70 75 80

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

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

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

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

Asp Ser Ser Cys Ser Thr Tyr Ala Leu Arg Pro Ile Pro Ser Pro Ala
145 150 155 160

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

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

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ala Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro
195 200 205

Pro Val Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Ala Leu Pro Val Val Val Val
210 215 220

Asp Thr Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys

225 230 235 240

Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val
245 250 255

Lys Gln Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys
260 265 270

Val Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe
275 280 285

Arg Pro Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu
290 295 300

Leu His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His
305 310 315 320

Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg Arg
325 330 335

Val His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala
340 345 350

Leu Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg
355 360 365

Leu Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln
370 375 380

Gln Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp
385 390 395 400

Phe Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro
405 410 415

Phe Met Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro Glu
420 425 430

Val Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln
435 440 445

Pro Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro
450 455 460

Arg Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Thr

465 470 475 480

Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe
485 490 495

Asp Ser Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly Gly Pro Ser Glu Val Ser Ser
500 505 510

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

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

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

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

Lys Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr
580 585 590

Lys Val Glu Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly Trp His Thr Arg
595 600 605

Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Leu Ala Ala Pro
610 615 620

<210> 6
<211> 7057
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 6
gaattcgaac tgcacatacg tatgaagatg acctcaaggt ccaccgattt ggtccattga 60

ttatatatag ggctaattcc tccaaaagga ggatcggctc gcatcaccaa agtatccaac 120

gtactcagtc actcaagcgg atatgcatga gccggcacga cttggtcgcg ccgcgcgtac 180

cacacgagcg ggcgggtggg cgtcgcgatt acccggtccg tgcgctcgta cagtcacgca 240

cagggcgcac caccgatctc gaacaatttt cactaccccc tccacacttc ttctgttgtg 300

gctgtacgac ggaaattatc ggcgcgggcg gtgcaccgtg gaccgatcgg gggccccacc 360

ggtgcagcag ctctggtcca cgaagacccg tggtatcccc gcggtgaccc ccacaggaag 420

aagcacatgg cgctgcctcc gcgataaggt ttgctaggcc tcgtgaacct accaggatcg 480

gctgcacgaa tcgtgaggcc tgcgtcggat ccgcccgcgg cgaccgtccg tggcccacgg 540

cagctcagcc gtctctgaaa gaaagtctgg tggcccacgg caactgtagt acgcgcgcgg 600

ggtggaaaat gataatgcgc gccagaagaa taaataaaca gaaataagga tttttctagc 660

aaggataaac aaaaataaag tgggagtcgg ggtccaatcc ggtatagccc atccctgctc 720

cgttttctgc accgccgggt ccagtgtgcc gacctgtggc ttttgacaaa tgtgtacagc 780

aaacacactg acgatctgct tagatcgatc agtattagtg gagaagataa gacaattata 840

tatgccatag tagtagttgt catatttagc tatatatttt cattgttaat tttaatcatc 900

ccacatatct aggagcatgc aagcattaat agttatatgt aacaccaaga gatagcgtgt 960

cattttaat gacatgtgtg gcataagtac atgatctaaa agacttgagt ggatgataat 1020

ttttcctcca aatagaatac atttgtgaga ggaaaaacgt aagagctccg attacattga 1080

tcaatgatat gcatgtgaaa gcagtctcca acagattgga atgacatagc gcgtatataa 1140

caaggtatga tcaatgacaa aataatagcc attctccaag atgaatcaca tagctaacgc 1200

gacgaggagc atcccacggt cattatcatg tacccaccgc cagctcaagt gggtcctcat 1260

gttttttgct ttctcttctt tgcttgttgg atctagagct tcttttgtat tgacttgagt 1320

tatgagtgga tattgatggt gaacattgct gacatgagat tacctcttgt gattcccacc 1380

ggttcccccc ttatgttcgt cgtgctctta ctcgaatcca cctccaatca tgaagatcgg 1440

ccgccctatg gcttgccctg tatcagaacc gtgtgtcgca ttagctatgt atacgtgtca 1500

cgtgaggcaa aatcacgcaa gtacttgaaa tgttggttgt tatatccttg gtaaatattc 1560

gtgctggatt caatcctaca aactaaacga ccagcacgga aaagaatccc aagtcttgga 1620

atccattttg ccataagcca cagggagggc cacacggccg cagcgcacgg agagggagag 1680

ggagagggag tctgacgcag cagagagccc catcacccgc agcgtttttt ttctctaatt 1740

tgcggggatt tctggggtgg tgggctcagg atttgtaact ggatggcgaa gtttgtctgg 1800

tgataaagac gcgcgcgacg aatccgtcca tcgatccaac gctgtgcgcg tgttggcccg 1860

ggccccgccc gccagcgacc caccactgtg ccccgcccag atgccttccc ccccctccca 1920

tccatcgccc gatgccgtct acaactacta cgctgccgct ccctcgctgc tctgctcgct 1980

ctcctccctc cccaccccaa ccatccccgt ctcctcctcc ttcctcctct cccccgaccc 2040

tggatccaaa tcccggcccg ccccagagcc ggaatcgagg caagcaaaag cttgagatag 2100

atagagaggc gaggtaggga ggcgagaggc gagatcatga agcgcgagta ccaggacgcc 2160

ggagggagcg gcggtggcgg gggaggcatg ggctcgtccg aggacaagat gatggtgtcg 2220

gggtcggcgg cggcggggga gggggaggag gtggacgagc tgctggcggc gctcgggtac 2280

aaggtgcggg cgtccgacat ggcggacgtg gcgcagaagc tggagtagct ggagatggcc 2340

atggggatgg gcggcgtggg cgccggcgcc gcgcccgacg acagcttcgc cacccacctc 2400

gccacggaca ccgtgcacta caaccccacc gacctctcct cctgggtcga gagcatgctg 2460

tcggagctca acgcgccgcc gccgcccctc ccgcccgccc cgcagctcaa cgcctccacc 2520

tcctccaccg tcaccggcgg cgggtacttc gatctcccgc cctccgtcga ctcctcctgc 2580

agcacctacg cgctgcggcc gatcccgtcc ccggccgtcg cgccggccga cctctccgcc 2640

gactccgtcg tgcgggatcc caagcggatg cgcactggcg gcagcagcac ctcgtcgtca 2700

tcctcatcgt cctctctcgg cggtggcggc gccaggagct ctgtggtgga ggctgccccg 2760

ccggtggccg ccgcggccgg tgcgcccgcg ctgccggtcg tcgtggtcga cacgcaggag 2820

gccgggattc ggctggtgca cgcgctgctg gcgtgcgcag aggccgtgca gcaggagaac 2880

ttctctgccg cggaggcgct ggtgaagcag ataccttgc tggccgcgtc ccagggcggc 2940

gccatgcgca aggtcgccgc ctacttcggc gaggccctcg cccgccgcgt cttccgcttc 3000

cgcccgcagc cggacagctc cctcctcgac gccgccttcg ccgacctcct ccacgcgcac 3060

ttctacgagt cctgccccta cctcaagttc gcccacttca ccgccaacca ggccatcctg 3120

gaggcgttcg ccggctgccg ccgcgtgcac gtcgtcgact tcggcatcaa gcaggggatg 3180

cagtggcccg cccttctcca ggccctggcg ctccgtcccg gcggccctcc ctcgttccgc 3240

ctcaccggcg tcggcccccc gcagccggac gagaccgacg ccttgcagca ggtgggctgg 3300

aagctcgccc agttcgcgca caccatccgc gtcgacttcc agtaccgcgg cctcgtcgcc 3360

gccacgctcg cggacctgga gccgttcatg ctgcagccgg agggcgagga gaacccgaac 3420

gaggagcccg aggtaatcgc cgtcaactcg gtcttcgaga tgcaccggct gctcgcgcag 3480

cccggcgccc tggagaaggt cctgggcacc gtgcgcgccg tgcggccgag gatcgtcacc 3540

gtggtggagc aggaggcgaa ccacaactcc ggcacattcc tggaccgctt caccgagtcc 3600

ctgcactact actccgccat gttcgattct ctggagggcg gcagctccgg cggcccatcc 3660

gaagtctcat ctggggcggc tgctgctcct gccgccgccg gcacggacca ggtcatgtcc 3720

gaggtgtacc tcggccggca gatctgcaac gtggtggcct gcgaggggggc ggagcgcaca 3780

gagcggcacg agaccctggg gcagtggcgg aaccgcctcg gcaacgccgg gttcgagacc 3840

gtccacctgg gctccaatgc ctacaagcag gcgagcacgc tgctggcgct cttcgcaggc 3900

ggcgacgggt acaaggtgga ggagaaggag ggctgcctga cgctggggtg gcacacgcgc 3960

ccgctgatcg ccacctccgc atggcgcctg gccgcgccgt gaccgcgagt tttgaacgct 4020

gtaagtacac atcgtgagca tggaggacga cacaaccccg gcggccgccc cggctctccg 4080

gcgcacgcac gcacgcacgc tcttgaagaa gaagaagaag ctaaatgtca tgtcagtgaa 4140

cgctgaattg cagcggccgg ccacgatcga ccgtccggcg tgaagagacg gacgacgacg 4200

aactccgagc cgaccatccc accggcatgt agtaatgtaa tcccttcttc gtccccagtt 4260

ctccaccgcc tccatgatca cccgtaaaac tcccaagccc tactactact actactacta 4320

ctactactac tatcatgttt aaatgtctat tattgcaatg tgtaattcct ccaatcgctc 4380

atatcaaaat aagcgcgggc cggactttgt tagctgctcc aatgagaatg aaaatgaatt 4440

ttgtacgcaa cgcacgtccg aaactgagcc gagctctgtt ctgttcttga tgttcatggt 4500

gtctttggtg atcaacttag cttcctttgc cgtgtttgag ggcttgccga aggaagtttc 4560

ccgatctagg agttgctgca aatgatgcgg cgtgttggaa agatctcgtg tagtttcccc 4620

ctgcggtgtg tggtcacccc gccgctggct gtttcctgat ctaaaaatga acctgcacgt 4680

tagttggaga ggggggcgca tcagcatcag catcaccacc gatcggccaa ggcttcggcc 4740

ctgctgccgg agcaatcagt tgatcaaaac cgaataccgt ttctgcacaa cagcttgccg 4800

tctaagggca tgtacaatgg tggcatatgg atacatatgt cccatgacaa aaagtaattt 4860

gaggcaccta catttagttt ttcttcccaa ggcaacccac agtaagaaga ctcattaaga 4920

aatagaaaat aaaaatttta gtacacatgc atctctactt ttcacttcaa ttttttcagc 4980

ttttgtcacc ggacttcaag cacccgcctc ctggagagga tcccgctttc ctatccgaat 5040

ctactttacg tcatatccga tcctacatgg catgtgaggc atcaccttga ggctatgcat 5100

tgtacatgac atgagtgccg caccgccgta gcaatcagct cgatgatcaa agcatgttat 5160

acccgagcgc atacgcatta ccggcggcgc tgatcgtcgt cggggagcag taacttttgc 5220

gggatgggat tggcgcagag gcgggcggag cagtaacttt tgcgggatgg gattggcgca 5280

gaggcgggcg gagcagtgga aacctgagag gccactgctg gctggcgtgg cgcattgcca 5340

cttctgttgg tgatttctgc ctctgcacag tgaccagcgt ggccggccgg cctatcgaaa 5400

ctcaccgcgc cgcgcggtaa aatgttcgtc cgttgggcgg gggcgtgggg ctgggctgca 5460

gcacagagaa cacttaaccc gcgtgcatca tcaccgccag ccagccggcc agccgcggcg 5520

tccgtggtgt acccacggga gcttctgaca gcagtaaaaa aaacacaagg cggtgtgtgg 5580

atgggccgtg gagatctggc gtgcgtggcc gcaaatctcc cccgccggtg acgtcgggcc 5640

tgcgagcttt ttatttaacc tggcctgccc gaggcgaggc ccggcggcca atgggaggcc 5700

gcggtagaag tttgggcggg gggaaaggaa agggaaggag gtgggcggca gcaacagctg 5760

tccaatcggg atcaggtggg cgtgtcaggg agatgatggt ggtggggccc ggccgtcggc 5820

ctctgcccct ccctgtcgat cccagtcaga gacacacacc gctagctagc tgtggctact 5880

agcagctctg ggcctctgac tcacctcctg ctcggcccgg ggacagcccg gccccaccgc 5940

cgataaagaa aacggaaaaa ggagagggga aatagttcta gcgtgggtgg gggccccaac 6000

cccagctccg ccgatccggg gccgggggggt caattcgcgc gtgtgtgacc ccgacgggcg 6060

cgatgatgcc gcccccgtgc cgtgcccgcg cacgcctcgc cgctccccgg tcgccgggtc 6120

agctccgtcg cgcgccgcgg cggcgacgtg tagcccgccc ctgctcgccc cacatgcaca 6180

cggaccacgc cggtgacctg acccatccaa ccgaacccga tcctatcctc gcgtcgcggc 6240

catgccgagg gatgggcggt tttgttatcc cgcggcgcgc cacgaggccg gtcctatccg 6300

acggccggcg caccggcgca tggaattgtt gcgctgggcg cggcgggggg acgtgtgagc 6360

gtgtccgtgc atgggtacgc gtgggattcc gtgcgattcc gctggccatt ggccacgcag 6420

ctgcaaggga agggtggtgg tggttgggtg ggaggatcga ttcggtggat gtgacccggt 6480

gtggtggtgc gcgcacatgc gacggggtgg tgcgggtcag gggctcatcg gccgtcttgt 6540

gctcgaacca ctctctgcag gggaaatgcg ccggagcccg cgtcaactcg gcggtcacac 6600

cgatcacagg ataaggttga cggacgagat gttttctctt gttcgatata agaaagggtg 6660

gcgttaaagc gactgcacgc agaggcgtca ggtctatata aagaagattt ttttttaca 6720

ttcggaaaat gtgggctagt actcctacat acatatgttt tctttttttt ttgagcatca 6780

tacatatgtt ttctttgatt tgaaggcgcg taaatatgga ttgacttatt tattggaact 6840

ggaatattga ttacgtaagt tatttattgg agctggacat gcttacccag tgcgattaat 6900

gctgcaacta cctccattct gatttattag ccccccttgta tttaaggcaa aaaaaaaaga 6960

aattaaggtc atagtttgac cataatttca actaataaag taaaagttaa acataggaga 7020

aataatatta tccgaaacta ttgtcaaata tgaattc 7057

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

<400> 7

Met Ala Met Gly Met Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Pro Asp Asp
1 5 10 15

Ser Phe Ala Thr His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro Thr
20 25 30

Asp Leu Ser Ser Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Glu Leu Asn Ala Pro
35 40 45

Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ala Pro Gln Leu Asn Ala Ser Thr Ser Ser
50 55 60

Thr Val Thr Gly Gly Gly Tyr Phe Asp Leu Pro Pro Ser Val Asp Ser
65 70 75 80

Ser Cys Ser Thr Tyr Ala Leu Arg Pro Ile Pro Ser Pro Ala Val Ala
85 90 95

Pro Ala Asp Leu Ser Ala Asp Ser Val Val Arg Asp Pro Lys Arg Met
100 105 110

Arg Thr Gly Gly Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ala Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro Pro Val
130 135 140

Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Ala Leu Pro Val Val Val Val Asp Thr
145 150 155 160

Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu
165 170 175

Ala Val Gln Gln Glu Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln
180 185 190

Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val Ala
195 200 205

Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe Arg Pro
210 215 220

Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu His
225 230 235 240

Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr
245 250 255

Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg Arg Val His
260 265 270

Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Leu
275 280 285

Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr
290 295 300

Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val
305 310 315 320

Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe Gln
325 330 335

Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe Met
340 345 350

Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asn Pro Asn Glu Glu Pro Glu Val Ile
355 360 365

Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln Pro Gly
370 375 380

Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro Arg Ile
385 390 395 400

Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Thr Phe Leu
405 410 415

Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Ala Met Phe Asp Ser
420 425 430

Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly Gly Pro Ser Glu Val Ser Ser Gly Ala
435 440 445

Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Gly Thr Asp Gln Val Met Ser Glu Val
450 455 460

Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Cys Glu Gly Ala Glu
465 470 475 480

Arg Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln Trp Arg Asn Arg Leu Gly
485 490 495

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

Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Lys Val
515 520 525

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

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

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

<400> 8
tatacatgtt gtggtactag ttgtcatatt tagctatata ttttttcaata ttaattttaa 60

tcaacccaca tatctaggag catgcaagca ttaatagtta gacttaacac caagagatag 120

tgtgtctttc ttaataacat gtgtggcata agtacacgat ctaaaagact tgagtcgatg 180

ataatttgtc ctccaaaaag aatacatttg tgagagatag aacacaagaa ctccgatcac 240

attgatcaat gatctgcatg tgaaaatggt ctccagcgga ttagaatgac atagcgcgta 300

tttaacaaga tatggtcaat gacaaaataa tagtcactgt acaagatgaa tgacatagct 360

aaactgacgc ggagcatccc atggtcatca ccatgcacac accgccaact caagtgggtc 420

ctaatgttat ttgctttctc tagtttgctt gttggatcta acggttcttt tgtattaact 480

tgagttatga gtggatattg gtggagaata ttattgactt gtgcctacct ctttttatcc 540

cccctccccg ttttcccctt ctattcatcg ttttgttact tgaatccgcc tccaatcatg 600

aatattgacc atccctatgg cttgacccgt atcataaccg tgtgtcgcat tagctatgta 660

cgtgtcatgc gagacaaaat catgtagata ggtcaaaatg ttggttgtta gattcggtca 720

tcgatagaca agttagggca tctttgattc acatgattct agaaacacat gaaatgaaaa 780

gattgcaaag ttacgcccat ttgaatcatg cacggttttt ggtttggttg catcgccgga 840

aaaacgtgga tccttttcat gaggttttca gtggacacta gaattccttg gaatgaatac 900

aaatgaatcc ttggcaaata tttgtgttgg attcaatcct acaaactaaa cgaccagcac 960

ggaaaaagaa tccccaagga ttaaaagact ccttcgattc aaagaggccc tcaacagtgc 1020

aataccttca aagtcttgga atccattttt cccatgagca ctgcaagcca cagagagggc 1080

cacacggccg cagcgcacgg agaaggagtc agacgtagca gagcccccat cccgcatagc 1140

atttttattt aatttgcggg gatttctggg gtggtgggcg caagatttgt aactggatgg 1200

cgaagtttgt ctggtgataa agatgggcgc gacgaatccg tccatcgatc caacgctgtg 1260

cgcgtgttgg cccggggccc cgcccgccag cgacccacca ctccacccag acccagatgc 1320

cttccccctc ccatcacccg atgccgtctc gcaatctccc ccctcccctt cccctacaac 1380

tactactact cgctcccgct gccgctcgct cgctcgctcg ctgctttgct ctctctcctt 1440

cttcttcctc cttcttcctc ccccaccccc cgccccccga ccctggatcc aaatcccgac 1500

cctccccaga accggaaccg aggcaagcaa aagcttggcg caattattgg ccggagatag 1560

gtagagaagc gaggcagctc gctcgcggtg aggcgagatc atgaagcgcg agtaccagga 1620

cgccggcggg agcggtggcg ggggcggcat gggctcgtct gaggacaaga tgatggtgtc 1680

ggcggcggcg ggggaggggg aggaggtgga cgagctgctg gcggcgctcg ggtacaaggt 1740

gcgggcctcc gacatggcgg acgtggcgca gaagctggag cagctggaga tggccatggg 1800

gatgggcggc gtgggcgccg gcgccgcccc cgacgacagc ttcgccaccc acctcgccac 1860

ggacaccgtg cactacaacc ccaccgacct ctcctcctgg gtcgagagca tgctgtcgga 1920

gctcaacgcg ccgccgccgc ccctcccgcc cgccccgcag cagctcaacg cctccacctc 1980

ctccaccgtc acgggcggtg ggtacttcga tctcccgccc tcggttgact cctcctgcag 2040

cacctacgcc ctgcggccga tcccctcccc ggccggcgcc gtcgggccgg ccgacctgtc 2100

cgccgactcc gtgcgggacc ccaagcggat gcgcactggc gggagcagca cctcgtcgtc 2160

gtcatcctcc tcgtcctctc tcggtggggg cgccaggagc tctgtggtgg aggctgctcc 2220

gccggtcgcg gccggggcca acgcgcccgc gctgccggtc gtcgtggtcg acacgcagga 2280

ggccgggatt cggctggtgc acgcgctgct ggcctgcgcg gaggccgtgc agcaggagaa 2340

cttctctgcc gcggaggcgc tggtgaagca gataccctg ctggccgcgt cccagggcgg 2400

cgcgatgcgc aaggtcgccg cctacttcgg cgaggccctc gcccgccgcg tcttccgctt 2460

ccgcccgcag ccggacagct ccctcctcga cgccgccttc gccgacctcc tccacgcgca 2520

cttctacgag tcctgcccct acctcaagtt cgcccacttc accgccaacc aggccatcct 2580

ggaggccttc gccggctgcc gccgcgtgca cgtcgtcgac ttcggcatca agcaggggat 2640

gcagtggccc gccctcctcc aggccctcgc gctccgtccc ggcggccctc cctcgttccg 2700

cctcaccggc gtcggccccc cgcagccgga cgagaccgac gccttgcagc aggtgggctg 2760

gaagctcgcc cagttcgcgc acaccatccg cgtcgacttc cagtaccgcg gcctcgtcgc 2820

cgccacgctc gcggacctgg agccattcat gctgcagccg gagggcgagg aggacccgaa 2880

cgaggagccc gaggtaatcg ccgtcaactc ggtcttcgag atgcaccggc tgctcgcgca 2940

gcccggcgcc ctggagaagg tcctgggcac cgtgcgcgcc gtgcggccga ggatcgtcac 3000

cgtggtggag caggaggcca accacaactc cggcacattc ctggaccgct tcaccgagtc 3060

tctgcactac tactccacca tgttcgattc cctcgagggc ggcagctccg gcggcccatc 3120

cgaagtctca tcgggggctg ccgctgctcc tgccgccgcc ggcacggacc aggtcatgtc 3180

cgaggtgtac ctcggccggc agatctgcaa cgtggtggcc tgcgaggggg cggagcgcac 3240

agagcgccac gagacgctgg ggcagtggcg gaaccggctg ggcaacgccg ggttcgagac 3300

cgtgcacctg ggctccaatg cctacaagca ggcgagcacg ctgctggccc tattcgccgg 3360

cggcgacggg tacaaggtgg aggagaagga gggctgcctg actctcgggt ggcacacgcg 3420

cccgctgatc gccacctcgg catggcgcct ggccgcgccg tga 3463

<210> 9
<211> 620
<212> Білок
<213> Triticum aestivum

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

165 170 175

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

Ser Leu Gly Gly Gly Ala Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro Pro
195 200 205

Val Ala Ala Gly Ala Asn Ala Pro Ala Leu Pro Val Val Val Val Asp
210 215 220

Thr Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala
225 230 235 240

Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys
245 250 255

Gln Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val
260 265 270

Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe Arg
275 280 285

Pro Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu
290 295 300

His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe
305 310 315 320

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

His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu
340 345 350

Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu
355 360 365

Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln
370 375 380

Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe
385 390 395 400

Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe

405 410 415

Met Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro Glu Val
420 425 430

Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln Pro
435 440 445

Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro Arg
450 455 460

Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Thr Phe
465 470 475 480

Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe Asp
485 490 495

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

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

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

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

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

Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Lys
580 585 590

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

Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Leu Ala Ala Pro
610 615 620

<210> 10
<211> 1872
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 10

atgaagcggg agtaccagga cgccggaggg agcggcggcg gcggtggcgg catgggctcg 60

tccgaggaca agatgatggt gtcggcggcg gcgggggagg gggaggaggt ggacgagctg 120

ctggcggcgc tcgggtacaa ggtgcgcgcc tccgacatgg cggacgtggc gcagaagctg 180

gagcagctcg agatggccat ggggatgggc ggcgtgggcg ccggcgccgc ccccgacgac 240

agcttcgcca cccacctcgc cacggacacc gtgcactaca accccaccga cctgtcgtct 300

tgggtcgaga gcatgctgtc ggagctcaac gcgccgccgc cgcccctccc gcccgccccg 360

cagctcaacg cctccacctc ctccaccgtc acgggcagcg gcggctactt cgatctcccg 420

ccctccgtcg actcctccag cagcatctac gcgctgcggc cgatcccctc cccggccggc 480

gcgacggcgc cggccgacct gtccgccgac tccgtgcggg atcccaagcg gatgcgcact 540

ggcgggagca gcacctcgtc gtcatcctcc tcctcgtcgt ctctcggtgg gggcgccagg 600

agctctgtgg tggaggctgc cccgccggtc gcggccgcgg ccaacgcgac gcccgcgctg 660

ccggtcgtcg tggtcgacac gcaggaggcc gggattcggc tggtgcacgc gctgctggcg 720

tgcgcggagg ccgtgcagca ggagaacctc tccgccgcgg aggcgctggt gaagcagata 780

cccttgctgg ccgcgtccca gggcggcgcg atgcgcaagg tcgccgccta cttcggcgag 840

gccctcgccc gccgcgtctt ccgcttccgc ccgcagccgg acagctccct cctcgacgcc 900

gccttcgccg acctcctcca cgcgcacttc tacgagtcct gcccctacct caagttcgcg 960

cacttcaccg ccaaccaggc catcctggag gcgttcgccg gctgccgccg cgtgcacgtc 1020

gtcgacttcg gcatcaagca ggggatgcag tggcccgcac ttctccaggc cctcgccctc 1080

cgtcccggcg gccctccctc gttccgcctc accggcgtcg gccccccgca gccggacgag 1140

accgacgccc tgcagcaggt gggctggaag ctcgcccagt tcgcgcacac catccgcgtc 1200

gacttccagt accgcggcct cgtcgccgcc acgctcgcgg acctggagcc gttcatgctg 1260

cagccggagg gcgaggagga cccgaacgag gagcccgagg taatcgccgt caactcagtc 1320

ttcgagatgc accggctgct cgcgcagccc ggcgccctgg agaaggtcct gggcaccgtg 1380

cgcgccgtgc ggcccaggat cgtcaccgtg gtggagcagg aggcgaatca caactccggc 1440

acattcctgg accgcttcac cgagtctctg cactactact ccaccatgtt cgattccctc 1500

gagggcggca gctccggcgg cggcccatcc gaagtctcat cgggggctgc tgctgctcct 1560

gccgccgccg gcacggacca ggtcatgtcc gaggtgtacc tcggccggca gatctgcaac 1620

gtggtggcct gcgaggggggc ggagcgcaca gagcgccacg agacgctggg ccagtggcgg 1680

aaccggctgg gcaacgccgg gttcgagacc gtccacctgg gctccaatgc ctacaagcag 1740

gcgagcacgc tgctggcgct cttcgccggc ggcgacggct acaaggtgga ggagaaggaa 1800

ggctgcctga cgctggggtg gcacacgcgc ccgctgatcg ccacctcggc atggcgcctg 1860

gccgggccgt ga 1872

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

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ala Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro
195 200 205

Pro Val Ala Ala Ala Ala Asn Ala Thr Pro Ala Leu Pro Val Val Val
210 215 220

Val Asp Thr Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala
225 230 235 240

Cys Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn Leu Ser Ala Ala Glu Ala Leu
245 250 255

Val Lys Gln Ile Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg
260 265 270

Lys Val Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg
275 280 285

Phe Arg Pro Gln Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp
290 295 300

Leu Leu His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala
305 310 315 320

His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg
325 330 335

Arg Val His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro
340 345 350

Ala Leu Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe
355 360 365

Arg Leu Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu
370 375 380

Gln Gln Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val
385 390 395 400

Asp Phe Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu
405 410 415

Pro Phe Met Leu Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro
420 425 430

Glu Val Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala
435 440 445

Gln Pro Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg
450 455 460

Pro Arg Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly
465 470 475 480

Thr Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met
485 490 495

Phe Asp Ser Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Pro Ser Glu Val
500 505 510

Ser Ser Gly Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Gly Thr Asp Gln Val
515 520 525

Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Cys
530 535 540

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

Asn Arg Leu Gly Asn Ala Gly Phe Glu Thr Val His Leu Gly Ser Asn
565 570 575

Ala Tyr Lys Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp
580 585 590

Gly Tyr Lys Val Glu Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly Trp His
595 600 605

Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Leu Ala Gly Pro
610 615 620

<210> 12
<211> 618
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 12

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

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

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

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

Glu Met Ala Met Gly Met Gly Gly Pro Ala Pro Asp Asp Gly Phe Ala
65 70 75 80

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

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

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

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

Ser Ser Thr Tyr Ala Leu Arg Pro Ile Ile Ser Pro Pro Val Ala Pro
145 150 155 160

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

Gly Gly Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Gly Gly Ala Ala Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala
195 200 205

Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Leu Pro Val Val Val Val Asp Thr Gln
210 215 220

Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala
225 230 235 240

Val Gln Gln Glu Asn Leu Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile
245 250 255

Pro Leu Leu Ala Ala Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Ala
260 265 270

Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Phe Arg Phe Arg Pro Gln
275 280 285

Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu His Ala
290 295 300

His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala
305 310 315 320

Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg Arg Val His Val
325 330 335

Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Leu Gln
340 345 350

Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly
355 360 365

Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val Gly
370 375 380

Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe Gln Tyr
385 390 395 400

Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe Met Leu
405 410 415

Gln Pro Glu Gly Glu Glu Asp Pro Asn Glu Glu Pro Glu Val Ile Ala
420 425 430

Val Asn Ser Val Phe Glu Met His Arg Leu Leu Ala Gln Pro Gly Ala
435 440 445

Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro Arg Ile Val
450 455 460

Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Ser Phe Leu Asp
465 470 475 480

Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe Asp Ser Leu
485 490 495

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 13

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

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

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

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

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

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

85 90 95

Ala Glu Tyr Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asp Ala Ile Leu Asn Gln
100 105 110

Phe Ala Ile Asp Ser Ala Ser Ser Ser Asn Gln Gly Gly Gly Gly Asp
115 120 125

Thr Tyr Thr Thr Asn Lys Arg Leu Lys Cys Ser Asn Gly Val Val Glu
130 135 140

Thr Thr Thr Ala Thr Ala Glu Ser Thr Arg His Val Val Leu Val Asp
145 150 155 160

Ser Gln Glu Asn Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala
165 170 175

Glu Ala Val Gln Lys Glu Asn Leu Thr Val Ala Glu Ala Leu Val Lys
180 185 190

Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser Gln Ile Gly Ala Met Arg Lys Val
195 200 205

Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Leu Ser
210 215 220

Pro Ser Gln Ser Pro Ile Asp His Ser Leu Ser Asp Thr Leu Gln Met
225 230 235 240

His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala
245 250 255

Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Gln Gly Lys Lys Arg Val His Val
260 265 270

Ile Asp Phe Ser Met Ser Gln Gly Leu Gln Trp Pro Ala Leu Met Gln
275 280 285

Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Val Phe Arg Leu Thr Gly
290 295 300

Ile Gly Pro Pro Ala Pro Asp Asn Phe Asp Tyr Leu His Glu Val Gly
305 310 315 320

Cys Lys Leu Ala His Leu Ala Glu Ala Ile His Val Glu Phe Glu Tyr

325 330 335

Arg Gly Phe Val Ala Asn Thr Leu Ala Asp Leu Asp Ala Ser Met Leu
340 345 350

Glu Leu Arg Pro Ser Glu Ile Glu Ser Val Ala Val Asn Ser Val Phe
355 360 365

Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg Pro Gly Ala Ile Asp Lys Val Leu
370 375 380

Gly Val Val Asn Gln Ile Lys Pro Glu Ile Phe Thr Val Val Glu Gln
385 390 395 400

Glu Ser Asn His Asn Ser Pro Ile Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser
405 410 415

Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Val Pro Ser
420 425 430

Gly Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile Cys
435 440 445

Asn Val Val Ala Cys Asp Gly Pro Asp Arg Val Glu Arg His Glu Thr
450 455 460

Leu Ser Gln Trp Arg Asn Arg Phe Gly Ser Ala Gly Phe Ala Ala Ala
465 470 475 480

His Ile Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala Leu
485 490 495

Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg Val Glu Glu Ser Asp Gly Cys Leu
500 505 510

Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Lys
515 520 525

Leu Ser Thr Asn
530

<210> 14
<211> 30
<212> Білок
<213> Triticum aestivum

<400> 14

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

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

<210> 15
<211> 11
<212> Білок
<213> Triticum aestivum

<400> 15

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

<210> 16
<211> 4501
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 16
atgccgtcta caactactac gctgccgctc cctcgctgct ctgctcgctc tcctccctcc 60

ccaccccaac catccccgtc tcctcctcct tcctcctctc ccccgaccct ggatccaaat 120

cccggcccgc cccagagccg gaatcgaggc aagcaaaagc ttgagataga tagagaggcg 180

aggtagggag gcgagaggcg agatcatgaa gcgcgagtac caggacgccg gagggagcgg 240

cggtggccgg ggaggcatgg gctcgtccga ggacaagata atggtgtcgg ggtcggcggc 300

ggcgggggag ggggaggagg tggacgagct gctggcggcg ctcgggtaca aggtgtgttg 360

gcgccgcctc ctcgcagcgc cgttcttctt cctctcatct ctcatgaaca cacaccatgg 420

agaaactcta cacacacaca cacacaacca agaagaacac cggctgttac tttgcacgag 480

aggcccttct ccttggtgga acaagagact acattgtgtt tttcccagcc ctcttggctc 540

acttttctca ttcatcttct ccaacttaaa tagctaagta caagactgac ccaagcactt 600

gccagccgcc actctcgcag ctgctaacgc ccactaactc atgcactagg ccactaatca 660

caactaactc atgcacgcat gcaccacacc ggccactatc acatgaccgg gcgactaacc 720

cactagctac atgcatgcaa ctagataact accttatcca tgcactccag gactcggcaa 780

ctccaccgga cgccccgctc gtagcagccg cgggacttgc tgctaacgaa accacgcaca 840

tcaagattag tgctaacatt tccccccctta atcttgacac gccttgccgt cgaccgtcat 900

cttgaacgcc tgagctcgac gtcttcacac gcctccgcgc ccgctgcgac gtgccgtgcg 960

cccgcctgtc accggagttg atgcagcttg cgtcgtcgtc gtcacggccg tgacccagcc 1020

tgcggacccg acccgacgca tcgacgccgg tcacaccgcc acggacccga cctggcgcac 1080

tgacgccggt cgcaccgtgc tccctcacga ccccggcgac atacgccgag ctcctccgcc 1140

ggcgacacac gcctggcgtc cctctgcgtc ccgcacgtcc cgcacgcatc cgacgtgccc 1200

gacgagcccg accgcagcag tgcgtcccgc acgtcccgcg cgcattcgac gcgcccgacg 1260

agcccgacag caccagacgc tcaccacgtg ccgcctccgc gtccgccatg gcagccacca 1320

cgccgcgcct acgtgccacg caccttccac ggtcgttgcc ccgagccgtc gcgacctatg 1380

cgccaccacg caggtccttc gcgacctcct cgtctccgcg accgccgtgc ccttcgcgca 1440

cactccccac gtccccgcgc tcccagcccg cgctcccgcc gcgcacgtac gcggtctgcg 1500

caaccaggtc cagcgcctcg acgcggtcca ctcccgcggt cccgacgcgc tcgacacgtc 1560

cagtgcgcgc ccataacacg caccggtcgc gtccggctcg ccgccgcatc ttattgccct 1620

gcaccgccgc ggcctccatg ccgccatgca gtgcctccac gccgccacac cgtgttgcac 1680

cgctgcgcca ccacgcagcg cctcggcggc ctccgcggtc gccgcacgta cgacgtcacc 1740

gcccgccgcc tccgccacgc gctcgccgcg cgccgcagcc gatgcctcca tgtcggccgc 1800

gcatgccccg tccgccgcgg acgccaccgc gcgccacggc cgcccctcga accttgtggc 1860

tctgaatacc aaatgttggc gccgcctcct cgcagcgccg ttcttcttcc tctcatctct 1920

catgaacaca caccatggag aaactctaca cacacacaca cacaaccaag aagaacaccg 1980

gctgttactt tgcacgagag gcccttctcc ttggtggaac aagagactac attgtgtttt 2040

tcccagccct cttggctcac ttttctcatt catcttctcc aacttaaata gctaagtaca 2100

agactgaccc aagcacttgc cagccgccac tctcgcagct gctaacgccc actaactcat 2160

gcactaggcc actaatcaca actaactcat gcacgcatgc accacaccgg ccactatcac 2220

atgaccgggc gactaaccca ctagctacat gcatgcaact agataactac cttatccatg 2280

cactccagga ctcggcaact ccaccggacg ccccgctcgt agcagccgcg ggacttgctg 2340

ctaacgaaac cacgcacatc aagattagtg ctaacaaggt gcgggcgtcc gacatggcgg 2400

acgtggcgca gaagctggag cagctggaga tggccatggg gatgggcggc gtgggcgccg 2460

gcgccgcgcc cgacgacagc ttcgccaccc acctcgccac ggacaccgtg cactacaacc 2520

ccaccgacct ctcctcctgg gtcgagagca tgctgtcgga gctcaacgcg ccgccgccgc 2580

ccctcccgcc cgccccgcag ctcaacgcct ccacctcctc caccgtcacc ggcggcgggt 2640

acttcgatct cccgccctcc gtcgactcct cctgcagcac ctacgcgctg cggccgatcc 2700

cgtccccggc cgtcgcgccg gccgacctct ccgccgactc cgtcgtgcgg gatcccaagc 2760

ggatgcgcac tggcggcagc agcacctcgt cgtcatcctc atcgtcctct ctcggcggtg 2820

gcggcgccag gagctctgtg gtggaggctg ccccgccggt ggccgccgcg gccggtgcgc 2880

ccgcgctgcc ggtcgtcgtg gtcgacacgc aggaggccgg gattcggctg gtgcacgcgc 2940

tgctggcgtg cgcagaggcc gtgcagcagg agaacttctc tgccgcggag gcgctggtga 3000

agcagatacc cttgctggcc gcgtcccagg gcggcgccat gcgcaaggtc gccgcctact 3060

tcggcgaggc cctcgcccgc cgcgtcttcc gcttccgccc gcagccggac agctccctcc 3120

tcgacgccgc cttcgccgac ctcctccacg cgcacttcta cgagtcctgc ccctacctca 3180

agttcgccca cttcaccgcc aaccaggcca tcctggaggc gttcgccggc tgccgccgcg 3240

tgcacgtcgt cgacttcggc atcaagcagg ggatgcagtg gcccgccctt ctccaggccc 3300

tggcgctccg tcccggcggc cctccctcgt tccgcctcac cggcgtcggc cccccgcagc 3360

cggacgagac cgacgccttg cagcaggtgg gctggaagct cgcccagttc gcgcacacca 3420

tccgcgtcga cttccagtac cgcggcctcg tcgccgccac gctcgcggac ctggagccgt 3480

tcatgctgca gccggagggc gaggaggacc cgaacgagga gcccgaggta atcgccgtca 3540

actcggtctt cgagatgcac cggctgctcg cgcagcccgg cgccctggag aaggtcctgg 3600

gcaccgtgcg cgccgtgcgg ccgaggatcg tcaccgtggt ggagcaggag gcgaaccaca 3660

actccggcac attcctggac cgcttcaccg agtccctgca ctactactcc accatgttcg 3720

attctctgga gggcggcagc tccggcggcc catccgaagt ctcatctggg gcggctgctg 3780

ctcctgccgc cgccggcacg gaccaggtca tgtccgaggt gtacctcggc cggcagatct 3840

gcaacgtggt ggcctgcgag ggggcggagc gcacagagcg gcacgagacc ctggggcagt 3900

ggcggaaccg cctcggcaac gccgggttcg agaccgtcca cctgggctcc aatgcctaca 3960

agcaggcgag cacgctgctg gcgctcttcg caggcggcga cgggtacaag gtggaggaga 4020

aggagggctg cctgacgctg gggtggcaca cgcgcccgct gatcgccacc tccgcatggc 4080

gcctggccgc gccgtgaccg cgagttttga acgctgtaag tacacatcgt gagcatggag 4140

gacgacacaa ccccggcggc cgccccggct ctccggcgca cgcacgcacg cacgctcttg 4200

aagaagaaga agaagctaaa tgtcatgtca gtgaacgctg aattgcagcg gccggccacg 4260

atcgaccgtc cggcgtgaag agacggacga cgacgaactc cgagccgacc atcccaccgg 4320

catgtagtaa tgtaatccct tcttcgtccc cagttctcca ccgcctccat gatcacccgt 4380

aaaactccca agccctacta ctactactac tactactact actactatca tgtttaaatg 4440

tctattattg caatgtgtaa ttcctccaat cgctcatatc aaaataagcg cgggccggac 4500

t 4501

<210> 17
<211> 24
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 17
ggcaagcaaa agcttgagat agat 24

<210> 18
<211> 19
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 18
ggtgcagggc aataagatg 19

<210> 19
<211> 19
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 19
gacagcacca gacgctcac 19

<210> 20
<211> 19
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 20
gctctcgacc caggaggag 19

<210> 21
<211> 18
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 21
tggagcagct ggagatgg 18

<210> 22
<211> 20
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 22
taggggcagg actcgtagaa 20

<210> 23
<211> 19
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 23

gcgctggtga agcagatac 19

<210> 24
<211> 18
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 24
ttcaaactcg cggtcacg 18

<210> 25
<211> 22
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 25
tctcctccct ccccacccca ac 22

<210> 26
<211> 18
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 26
gcgtccggtg gagttgcc 18

<210> 27
<211> 20
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 27
gtgtttttcc cagccctctt 20

<210> 28
<211> 19
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 28
gctctcgacc caggaggag 19

<210> 29
<211> 18
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<400> 29
gaggtagctc gcggatca 18

<210> 30
<211> 18
<212> ДНК

<213> Triticum aestivum

<400> 30
cgttcaaaac tcgcgaga 18
1

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці, кожна з яких містить алель Rht-B1, кодуючий поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO: 5, і де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, вказаної як SEQ ID NO: 5, щонайменше (i) вставкою амінокислот DSATPPDAPLVAAAGLAANETTHIKISANK (SEQ ID NO: 14) або їхнім варіантом між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO: 5, де варіант послідовності відрізняється від SEQ ID NO: 14 амінокислотними замінами, вставками або делеціями з не більше ніж 5 амінокислот, і (ii) однією або декількома замінами амінокислот в С-кінцевому домені відносно амінокислот 50-621 SEQ ID NO: 5.

2. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці, кожна з яких містить алель Rht-B1, кодуючий поліпептид Rht-B1, де поліпептид містить N-кінцевий домен і С-кінцевий домен, де амінокислотна послідовність С-кінцевого домену щонайменше на 98 % ідентична амінокислотам 50-621 SEQ ID NO: 5, де амінокислотна послідовність поліпептиду Rht-B1 відрізняється від послідовності, вказаної як SEQ ID NO: 5, щонайменше вставкою амінокислот DSATPPDAPLVAAAGLAANETTHIKISANK (SEQ ID NO: 14) або їхнім варіантом між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO: 5, де послідовність варіанта відрізняється від SEQ ID NO: 14 амінокислотними замінами, вставками або делеціями з не більше ніж 5 амінокислот, і де нуклеотидна послідовність алелю Rht-B1 відрізняється від нуклеотидної послідовності, вказаної як SEQ ID NO: 1, щонайменше присутністю мутації ділянки сплайсингу інтрона.

3. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за п. 1 або 2, де поліпептид Rht-B1 містить одну або декілька замін амінокислот в N-кінцевому домені відносно амінокислот 1-49 SEQ ID NO: 5.

4. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за будь-яким з пп. 1-3, де вставка однієї або декількох амінокислот між амінокислотами 49 і 50 SEQ ID NO: 5 являє собою вставку 30 амінокислот, послідовність яких являє собою DSATPPDAPLVAAAGLAANETTHIKISANK (SEQ ID NO: 14).

5. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за будь-яким з пп. 1 або 3-4, у якої одна або декілька замін амінокислот в С-кінцевому домені поліпептиду Rht-B1 включають заміну амінокислоти, що відповідає амінокислоті G260, V264, A271, G298, A299, A305, A310, P344, L346, G377, P394, R514, T524, S528, G563, V286, D371 або E579 відносно SEQ ID NO: 3, або амінокислоти, яка відповідає S493, R283, R271, A280, V234, R484, V285, G230, S488 або C240 відносно SEQ ID NO: 5.

6. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за п. 5, у якої заміна вибрана з групи, яка складається з G260E, V264M, A271T, G298D, A299T, A305T, A310V, P344S, L346F, G377R, P394L, R514H, T524I, S528F, G563D, V286M, D371N, A310T і E579K відносно SEQ ID NO: 3, і S493F, R283H, R271H, A280T, V234M, R484H, V285F, G230E, S488F і C240Y відносно SEQ ID NO: 5.

7. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за будь-яким з пп. 1 або 3-6, де алель Rht-B1 містить варіант послідовності відносно SEQ ID NO: 1, де варіант послідовності вибраний з групи, яка складається з G2715A, G2726A, G2747A, G2829A, G2831A, G2849A, C2865T, C2966T, C2972T, G3065A, C3117T, G3477A, C3507T, C3519T, G3624A, G2792A, CC2108TA, G3047A, G2864A і G3671A.

8. Рослина пшениці або зерно пшениці, або клітина пшениці за будь-яким з пп. 2-7, де алель Rht-B1 містить варіант послідовності відносно SEQ ID NO: 1, де варіант послідовності вибраний з групи, яка складається з G148A, G148T, G147A, G2084A і G2083A.

9. Рослина пшениці за будь-яким з пп. 1-8, де рослина пшениці має підвищений ріст порівняно з рослиною пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1c алелем, і знижений ріст порівняно з рослиною пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1a алелем, коли рослини вирощують за однакових умов.

10. Рослина пшениці за будь-яким з пп. 1-9, де рослина пшениці має підвищену фертильність і/або має підвищений урожай зерна порівняно з рослиною пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1c алелем.

11. Рослина пшениці за п. 10, де урожай зерна відповідає урожаю або є вищим, ніж урожай рослини пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1b алелем.

12. Рослина пшениці за будь-яким з пп. 1-11, де рослина пшениці має збільшену довжину колеоптилю порівняно з рослиною пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1c алелем, і де довжина колеоптилю становить 80-100 % довжини колеоптилю рослини пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1a алелем.

13. Рослина пшениці за будь-яким з пп. 1-12, де зерно має підвищений стан спокою порівняно із зерном, отриманим від рослини пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1a алелем.

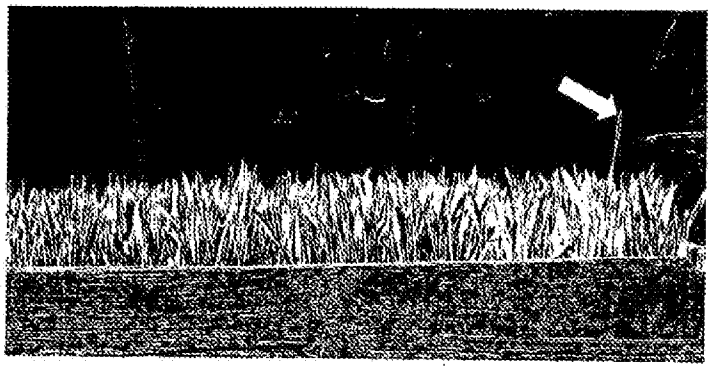
14. Зерно пшениці, отримане з рослини пшениці за будь-яким з пп. 1-13, що містить алель Rht-B1.

15. Рослина пшениці за п. 14, яка є гомозиготною по Rht-B1a алелю.

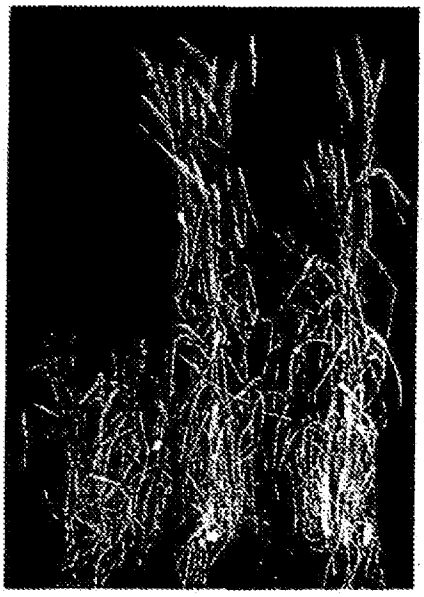
16. Спосіб отримання зерна пшениці, який включає (i) вирощування рослини пшениці за пп. 1-13, і (ii) збирання зерна з рослини.

17. Спосіб отримання борошна, непросіяного борошна або висівок, який включає переробку зерна пшениці, що містить Rht-B1 алель, отриманого від рослини пшениці за будь-яким з пп. 1-13, де зерно має більш тривалий стан спокою порівняно із зерном, отриманим від рослини пшениці, яка є гомозиготною за Rht-B1a алелем.

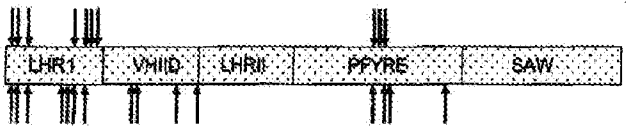
18. Спосіб отримання харчового продукту, який включає змішування борошна, непросіяного борошна або висівок, отриманих способом за п. 17, зі щонайменше одним іншим харчовим інгредієнтом.



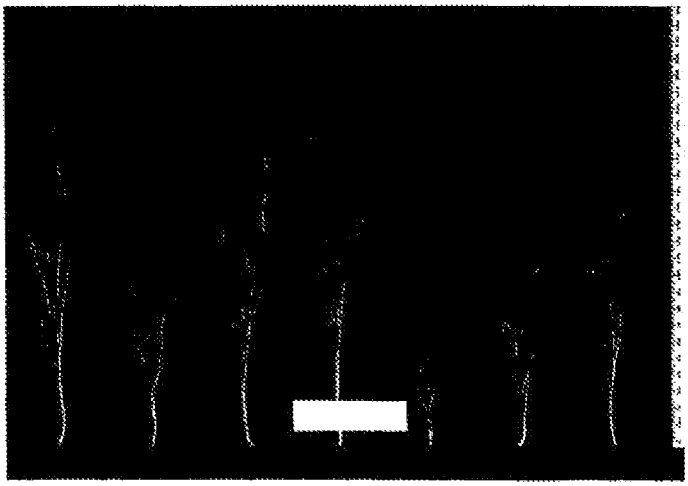
Фіг. 1



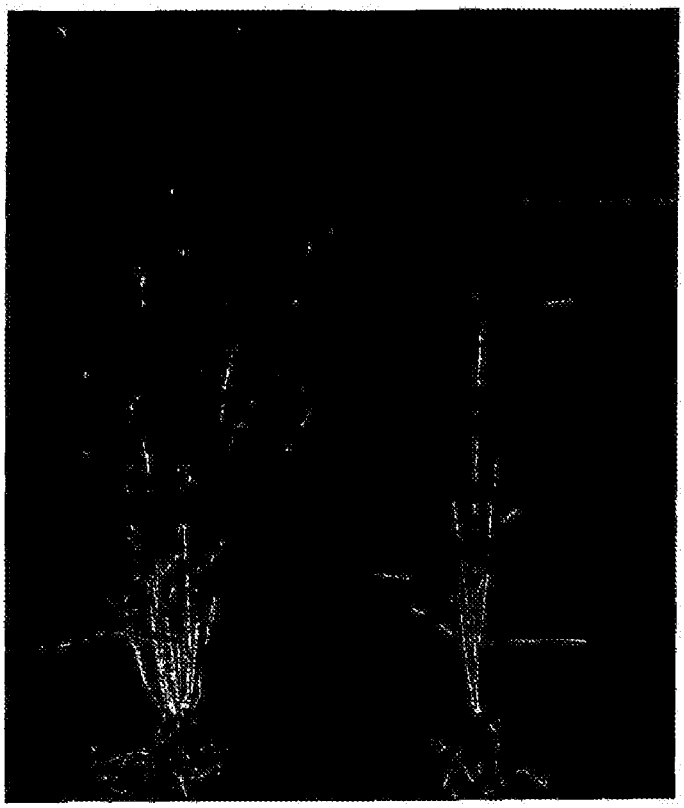
Фіг. 2



Фіг. 3

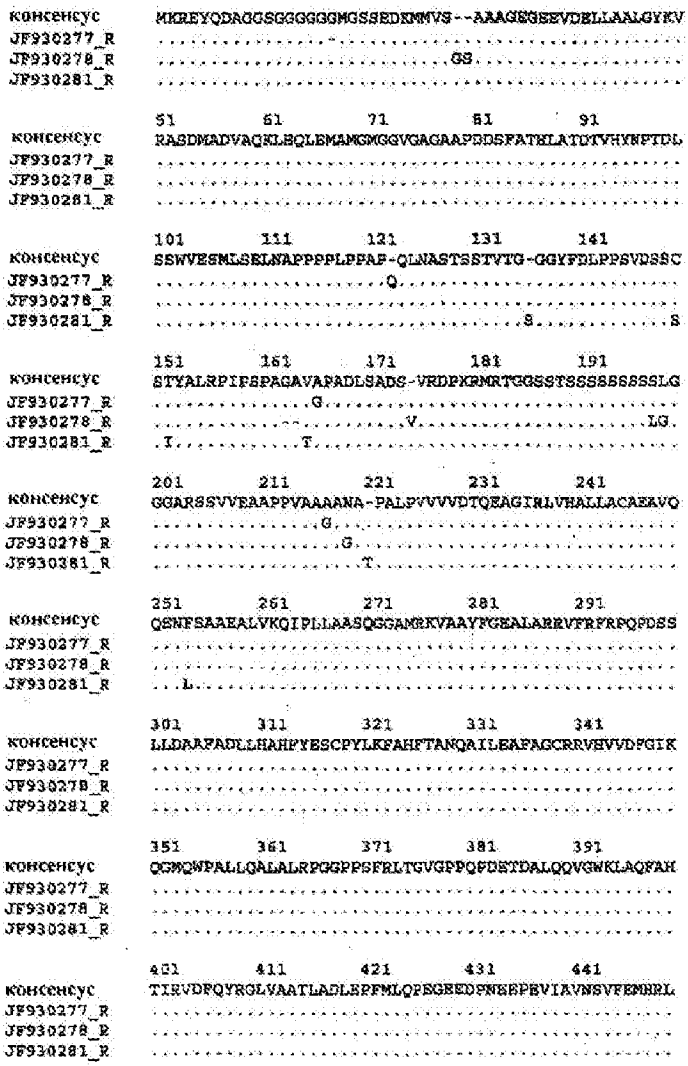


Фіг. 4

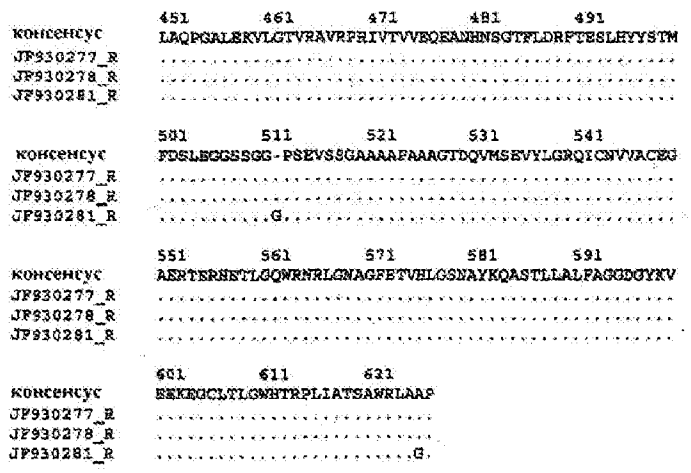


Фіг. 5

Фіг. 6

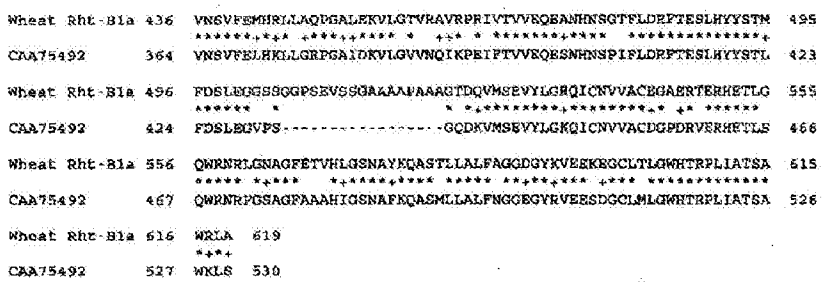

консенсус MKREYQDAGGSGGGGGGMGSSEDKMVS--AAAGEGSEVDELLAALGYKV
JF930277_R
JF930278_R GS
JF930281_R
51 61 71 81 91
консенсус RASDMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHVNPTDL
JF930277_R
JF930278_R
JF930281_R
101 111 121 131 141
консенсус SSWVESMLSELNAPPPPLPFAF-QLNASTSSTVTG-GGYFDLPPSVDSSC
JF930277_R Q
JF930278_R
JF930281_R S S
151 161 171 181 191
консенсус STYALRPIFSPAGAVAPADLSADS-VRDPKRMRTGGSSTSSSSSSSSSLG
JF930277_R G
JF930278_R V LG.
JF930281_R .I T
201 211 221 231 241
консенсус GGARSSVVEAAPPVAAAANA-PALPVVVVDTQEAGIRLVHALLACAEAVQ
JF930277_R G
JF930278_R G
JF930281_R T
251 261 271 281 291
консенсус QSNFSAAEALVKQIPLLAASQGGAMRKVAAYFGEALARRVFRFRPQFDSS
JF930277_R
JF930278_R
JF930281_R L
301 311 321 331 341
консенсус LLDAAFADLLHAHPYESCPYLKFAHFTANQAILEAFAGCRRVHVVDFGIK
JF930277_R
JF930278_R
JF930281_R
351 361 371 381 391
консенсус QGMQWPALLQALALRPGGPPSFRLTGVGPPQPDETDALQQVGWKLAQFAH
JF930277_R
JF930278_R
JF930281_R
401 411 421 431 441
консенсус TIRVDFQYRGLVAATLADLEPFMLQFSGEEDFNEEPEVIAVNSVFEMHRL
JF930277_R
JF930278_R
JF930281_R

Фіг. 7а

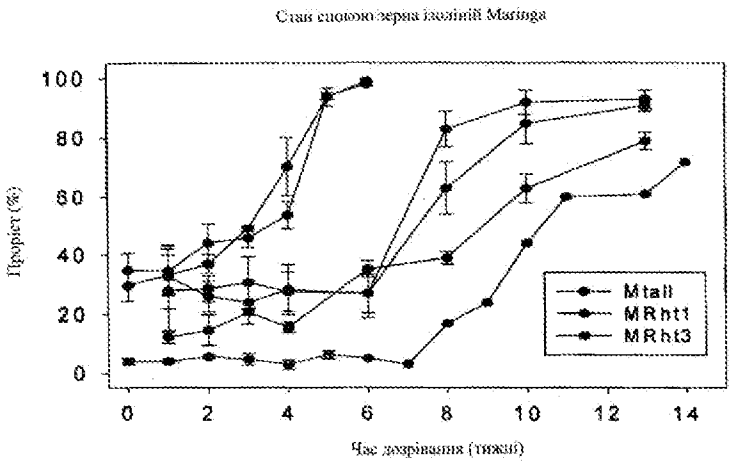


Фіг. 7b

Фіг. 8a



Фіг. 8b



Фіг. 9

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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

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