



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129673** (13) **C2**
(51) МПК**C12Q 1/68** (2018.01)**A01H 6/46** (2018.01)**C12N 9/14** (2006.01)**C12N 15/11** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2020 07359**
(22) Дата подання заявки: **24.04.2019**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **03.07.2025**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **18169122.1**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **24.04.2018**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **24.02.2021, Бюл.№ 8**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **02.07.2025, Бюл.№ 27**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2019/060411, 24.04.2019**

(72) Винахідник(и):
**Клойбер-Майц Моніка (DE),
Болдуан Терезе (DE),
Оузунова Мілена (DE),
Меср Ніна (DE),
Лопез-Дюран Кароліна (DE)**
(73) Володілець (володільці):
**КВС СААТ СЕ ЕНД КО. КГАА,
Grimsehlstraße 31, 37574 Einbeck, Germany (DE)**
(74) Представник:
**Кістерський Кирило Арсенійович,
реєстр. №207**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2010/054191 A1, 14.05.2010
BOSCH M. et al. Identification of genes involved in cell wall biogenesis in grasses by differential gene expression profiling of elongating and non-elongating maize internodes. Journal of experimental botany. 14.03.2011. Vol. 62. No. 10. P. 3545 – 356. URL: <http://doi:10.1093/jxb/err045>
RIBOULET C. et al. QTL mapping and candidate gene research from lignin content and cell wall digestibility in a top-cross of a flint maize recombinant inbred line progeny harvested at silage stage. Maydica. 01.01.2008. Vol. 53. No. 1. P. 1 – 9
BARRIERE Y. et al. Genetic variation and breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. A review. Animal research. 01.05.2003. Vol. 52. No. 3. P. 193 – 228. URL: <http://doi:10.1051/animres:2003018>
GUILLAUMIE S. et al. MAIZEWALL. Database and developmental gene expression profiling of cell wall biosynthesis and assembly in maize. Plant physio. 01.01.2007. Vol. 143. No. 1. P. 339 – 363. URL: <http://doi:10.1104/pp.106.086405>

UA 129673 C2**(54) РОСЛИНА З ПОЛІПШЕНОЮ ПЕРЕТРАВЛЮВАНІСТЮ ТА МАРКЕРНИМИ ГАПЛОТИПАМИ****(57) Реферат:**

Винахід стосується способу ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини від кукурудзи, яка має поліпшену перетравлюваність, який включає скринінг на присутність алеля QTL, асоційованого із поліпшеною перетравлюваністю, або скринінг на присутність молекулярного маркерного алеля. Винахід також стосується рослини кукурудзи, що має поліпшену перетравлюваність, у якої ген F35H мутований або експресія F35H змінена, способу продукування такої рослини кукурудзи, а також способу продукування силосованого рослинного матеріалу або корму для тварин.

ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Цей винахід стосується локусів кількісних ознак (QTL) і маркерів, асоційованих із ними, які беруть участь та/або асоційовані з поліпшеною перетравлюваністю рослин і частин рослин, як-от кукурудза. Цей винахід також стосується використання таких QTL або маркерів для цілей

5 ідентифікації та/або вибору, а також для трансгенних або нетрансгенних рослин.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Кукурудза (*Zea mays* L.) – найважливіша однорічна кормова культура у світі. Щороку силосують понад 3 мільйони гектарів кукурудзи, переважно в Північній Європі. Завдяки високій енергетичній цінності та ефективності конверсії кормів кормова кукурудза є важливою

10 продовольчою сільськогосподарською культурою для молочної та м'ясної худоби і значно впливає на виробництво молока та м'яса. Характеристики корму, з погляду рослини кукурудзи загалом і стерні, мають широкий спектр генетичної варіації (Гейгер та ін., 1992; Барр'єр та ін., 2003).

Тому поліпшення перетравлюваності – головна мета програм селекції кормової кукурудзи. Енергія, що надходить із кормом у раціон жуйних або травоядних тварин, пов'язана із засвоюваністю та перетравлюваністю корму. Перетравлюваність будь-якого компонента корму (сухої речовини, органічної речовини або клітинної стінки) вимірюється у відсотковому вмісті

15 силосу, засвоєного в травному тракті тварини (Барр'єр та ін., 2003). На загальну перетравлюваність кормової кукурудзи впливає простота травлення фракції зерна та стерні. Композиція стерні та її перетравлюваність обмежують якість кормової кукурудзи. Основними фракціями стерні є геміцелюлози, целюлоза й лігніни. Сучасні сорти кормової кукурудзи поєднують високу продуктивність сухої речовини з високою перетравлюваністю стерні.

Здійснення вимірювань перетравлюваності у тварин, особливо під час великомасштабного оцінювання зародкової плазми в програмах селекції рослин, занадто дороге. Для здійснення кількісного аналізу перетравлюваності кукурудзи й інших кормових культур було розроблено біологічні й хімічні методи (Ван Соест та ін., 1963). Нейтрально-детергентна клітковина (NDF),

25 яка є залишком після видалення розчинного вмісту клітин, – важливий індикатор клітинної стінки рослин і целюлози.

Перетравлюваність NDF кормів в умовах *in vitro* (IVNDFD) – це оцінка перетравлюваності клітинних стінок на основі припущення, що частина рослинного матеріалу, яка не містить NDF, була цілковито перетравлена (Мешин та ін., 2000). Крім того, повідомлялося, що використання ближньої інфрачервоної спектроскопії (NIRS) дає змогу точно виміряти ознаки перетравлюваності в багатьох кормових культурах, включно з кукурудзою (Любберштедт та ін., 1997а, б; Циммер та ін., 1990).

30 Любберштедт та ін., (1997а, б) уперше опублікували інформацію про QTL, що належать до агрономічних та якісних ознак у кормовій кукурудзі, а також про QTL, що стосуються перетравлюваності цілої рослини. Використання доступної генетичної варіації для перетравлюваності стерні за допомогою маркерної селекції (MAS) – це перспективний спосіб поліпшення перетравлюваності корму. Крім генетичної варіації, причиною цих мінливих ознак

40 можуть бути зміни під впливом навколишнього середовища. QTL-аналізи ознак у кормових культурах у чотирьох різних популяціях кукурудзи виявили лише кілька QTL, що демонструють епістатичні взаємодії або взаємодії з навколишнім середовищем (Любберштедт та ін., 1998). Було визначено сім QTL для перетравлюваної нейтрально-детергентної клітковини (DNDF), за допомогою використання популяцій 242 RIL, отриманих із кросу F838 × F286, які були оцінені в експериментах з оцінювання *per se* в шести різних умовах навколишнього середовища, і були виявлені два основних QTL (Барр'єр та ін., 2010). Було здійснено додаткові QTL-аналізи, за допомогою використання потомства RIL, отриманого з кросу між старою лінією зубовидної кукурудзи й новою лінією *lodent*, і вперше були зареєстровані нові QTL у парах основ 2.06 і 5.04 для ADL/NDF і DNDF (Барр'єр та ін., 2012).

45 50 Тому метою цього винаходу є усунення щонайменше одного недоліку попереднього рівня техніки. Існує постійна потреба в поліпшенні перетравлюваності кормових культур, а також в ідентифікації рослин, включно з окремими частинами рослин або їхніми похідними, що володіють підвищеною перетравлюваністю. Зокрема, метою цього винаходу є пропозиція нових основних QTL для перетравлюваності та причинного гена(ів), а також пропозиція маркерів, які

55 дають змогу економно використовувати ці QTL у розвитку й селекції кукурудзи.

СТИСЛИЙ ВИКЛАД СУТІ ВІНАХОДУ

Цей винахід засновано на ідентифікації основного QTL для перетравлюваності рослин, а також на ідентифікації гена F35H, зчепленого з QTL і відповідального за QTL для перетравлюваності рослин, і на описі унікального маркерного гаплотипу для поліпшеної

60 перетравлюваності.

Було ідентифіковано молекулярні маркери, асоційовані з перетравлюваністю рослин, а також було описано маркерні алелі, асоційовані з поліпшеною перетравлюваністю. Одним з описаних маркерних алелів є мутований ген F35H.

Цей винахід, зокрема, належить до способів визначення ідентифікованого алеля QTL, асоційованого з поліпшеною перетравлюваністю, а також до визначення будь-якого з описаних маркерних алелів. Цей винахід також стосується описаних маркерних алелів і полінуклеїнових кислот, придатних для визначення маркерних алелів, як-от праймери й зонди, і наборів, що їх містять. Цей винахід також належить до способів поліпшення перетравлюваності рослин, зокрема, шляхом природного або штучного введення в рослини та/або шляхом вибору рослин, що містять описані в цьому документі маркерні алелі, як-от, зокрема, індукування мутацій F35H, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацій, що змінюють експресію F35H або ферментативну активність F35H, наприклад, зменшують або елімінують експресію F35H, або активність F35H, або іншим чином зменшують експресію F35H, або активність F35H, або підвищують активність F35H. Цей винахід також стосується рослин, що володіють поліпшеною перетравлюваністю, а також частин рослин, зокрема стерні, що мають поліпшену перетравлюваність.

Цей винахід, зокрема, включає в себе всі або будь-яку комбінацію зі щонайменше одного з наведених нижче пронумерованих пунктів [01]–[25] з будь-яким іншим пунктом та/або варіантами виконання цього винаходу.

[01] Спосіб ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, або вибору рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, що містить

(i) необов'язково, виділення генетичного матеріалу, у переважному варіанті виконання цього винаходу – генетичного матеріалу, зі щонайменше однієї клітини рослини або частини рослини;

(ii) а) скринінг на присутність алеля QTL, як-от алель QTL, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, водночас згаданий алель QTL містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H (наприклад, мутацію нокдаун або нокаут), або мутацію, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усиченого білка F35H) або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції, або

(ii) б) скринінг на змінену експресію мРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або на білок F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – на зменшену або відсутню експресію мРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або на нефункціональний білок F35H (наприклад, усичений білок F35H), або на білок F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю, або на білок F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю, або

(ii) в) скринінг на присутність мутації, що призводить до зміненої експресії мРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у переважному варіанті виконання цього винаходу, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H (наприклад, мутації нокдаун або нокаут), або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усиченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції;

(iii) необов'язково, вибір рослини або частини рослини, у якій присутній QTL або мутація, або в якій змінено експресію мРНК F35H та/або білка, або змінено ферментативну активність F35H, у переважному варіанті виконання цього винаходу – експресія мРНК F35H та/або білка зменшена або елімінована, або ферментативна активність F35H зменшена або збільшена.

[02] Спосіб за пунктом [01], у переважному варіанті виконання цього винаходу, водночас згадана рослина є рослиною кукурудзи, спосіб, що передбачає скринінг на присутність молекулярного маркерного алеля та61134xxx та/або щонайменше одного молекулярного

маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкований маркерними алелями та61070s01 та та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 та та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу, водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїною кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїною кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації як прямого праймера та зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегується з поліпшеною перетравлюваністю.

[03] Рослина або частина рослини, що містить алель QTL, як-от алель QTL, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, водночас згаданий алель QTL містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усиченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції; або рослина чи частина рослини, що містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усиченого білка F35H) або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції; або рослина або частина рослини, що містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що володіє зменшеною або відсутньою експресією мРНК гена та/або білка F35H, або володіє зменшеною ферментативною активністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – володіє зменшеною ферментативною активністю або володіє підвищеною ферментативною активністю; або рослина чи частина рослини, що містить молекулу інтерферувальної РНК (RNAi), як-от dsРНК, siРНК, shРНК або miРНК, спрямовану на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, націлюється на неї або гібридується з нею, або містить кодувальну полінуклеотидну послідовність, що кодує (і експресує або здатна експресувати) молекулу RNAi, спрямовану на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, націлюється на неї або гібридується з нею; або рослина чи частина рослини, що містить РНК-специфічну систему CRISPR/Cas, як-от система CRISPR/Cas13a, спрямовану або таку, що націлюється на нуклеотидну послідовність, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), або щонайменше одну полінуклеотидну послідовність, яка кодує (і експресує або здатна експресувати) згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas.

[04] Рослина або частина рослини за пунктом [03], у переважному варіанті виконання цього винаходу, водночас згадана рослина є рослиною кукурудзи, що містить маркерний алель та61134xxx.

[05] Рослина або частина рослини за пунктом [03] або [04], водночас згадана рослина містить згаданий алель QTL, згаданий маркерний алель та/або згадану нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію у вигляді інтрогресії.

[06] Рослина або частина рослини за пунктом [03] або [04], водночас згадана рослина містить згаданий алель QTL, згаданий маркерний алель, згадану нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, згадану молекулу RNAi або згадану полінуклеотидну послідовність, що кодує (та експресує або здатна експресувати) молекулу RNAi, згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas та/або згадану щонайменше одну полінуклеотидну послідовність, що кодує (та експресує або здатна експресувати) РНК-специфічну систему CRISPR/Cas як трансген або як (генно-) відредагований ендеген.

[07] Спосіб поліпшення перетравлюваності рослини або частини рослини, що передбачає введення або інтрогресування в геном рослини або частини рослини

(а) нуклеотидної послідовності гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H (наприклад, мутацію нокдаун або нокаут), або мутацію, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції, або

(б) алеля QTL, як-от алель QTL, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, і містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H (наприклад, мутацію нокдаун або нокаут), або мутацію, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції.

[08] Спосіб поліпшення перетравлюваності рослини або частини рослини, що містить зміну експресії мРНК гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, зміну ферментативної активності цитохром Р450-місного флавоноїда 3',5'-гідроксилази (F35H), у переважному варіанті виконання цього винаходу – зменшення, елімінування або інгібування експресії мРНК гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, зменшення ферментативної активності цитохром Р450-місного флавоноїда 3',5'-гідроксилази (F35H), інгібування білка F35H або підвищення ферментативної активності цитохром Р450-місного флавоноїда 3',5'-гідроксилази (F35H).

[09] Спосіб за пунктом [08], який передбачає

(а) введення в нуклеотидну послідовність ендегенного гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) (у геном рослини або частину рослини) мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутації, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H (наприклад, мутації нокдаун або нокаут), або мутації, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції, або

(б) введення в рослину або частину рослини молекули RNAi, як-от dsPHK, siPHK, shPHK або miPHK, спрямованої на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, націлюється на неї або гібридується з нею, або полінуклеотидну послідовність, що кодує (та експресує або здатна експресувати) молекулу RNAi, спрямовану на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, націлюється на неї або гібридується з нею, або

(с) введення в рослину або частину рослини РНК-специфічної системи CRISPR/Cas, як-от система CRISPR/Cas13a, спрямованої або такої, що націлюється на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, або щонайменше однієї полінуклеотидної послідовності, що кодує (та експресує або здатна експресувати) згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas, або

(d) введення в рослину або частину рослини хімічної сполуки або антитіла, що змінює (або здатного змінювати) ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим білком F35H, у переважному варіанті виконання цього винаходу – що зменшує (або здатного зменшувати) ферментативну активність білка F35H або що інгібує (або здатного інгібувати) ферментативну активність білка F35H, або що підвищує (або здатного підвищувати) ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим білком F35H.

[10] Спосіб продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, що містить

(а) введення або інтрогресування в геном рослини або частину рослини нуклеотидної послідовності гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до

зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H (наприклад, мутацію нокдаун або нокаут), або мутацію, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усиченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції, або

(b) введення або інтрогресування в геном рослини або частину рослини алеля QTL, як-от алель QTL, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, і містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H (наприклад, мутацію нокдаун або нокаут), або мутацію, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усиченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції.

(c) введення в нуклеотидну послідовність ендегенного гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) (у геном рослини або частину рослини) мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутації, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК гена та/або білка F35H (наприклад, мутації нокдаун або нокаут), або мутації, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усиченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції, або

(d) введення в рослину або частину рослини молекули RNAi, як-от dsPHK, siPHK, shPHK або miPHK, спрямованої на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, націлюється на неї або гібридується з нею, або полінуклеотидну послідовність, що кодує (та експресує або здатна експресувати) молекулу RNAi, спрямовану на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, націлюється на неї або гібридується з нею, або

(e) введення в рослину або частину рослини РНК-специфічної системи CRISPR/Cas, як-от система CRISPR/Cas13a, спрямованої або такої, що націлюється на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, або щонайменше однієї полінуклеотидної послідовності, що кодує (та експресує або здатна експресувати) згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas, або

(f) введення в рослину або частину рослини хімічної сполуки або антитіла, що змінює (або здатного змінювати) ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим F35H, у переважному варіанті виконання цього винаходу – що зменшує (або здатного зменшувати) ферментативну активність білка F35H або інгібувального (або здатного інгібувати) ферментативну активність білка F35H, або що підвищує (або здатного підвищувати) ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим білком F35H; та

(g) необов'язково, регенерування рослини з частини рослини за будь-яким із пунктів (a)–(e).

[11] Рослина або частина рослини, продукowana в спосіб за пунктом [10].

[12] Потомство рослини за будь-яким із пунктів [03]–[06] або [11].

[13] Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, водночас згадана рослина є рослиною кукурудзи, QTL розташований на хромосомі 9 і містить, та/або фланкований маркерними алелями та61070s01 та та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 та та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01.

[14] Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, водночас та61134xxx є інсерцією щонайменше одного нуклеотиду між положеннями 134254381 і 134254382 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, у переважному варіанті виконання цього винаходу – інсерцією, представленою в SEQ ID NO: 12; та/або

та61070s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 121588825 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Т, у переважному варіанті

виконання цього винаходу – однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 13; та/або

ma30168s02 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 139452428 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 14; та/або

ma50827s01 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 127454426 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 15; та/або

ma16983s02 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 137363784 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 16; та/або

ma17117s01 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 132038900 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 17; та/або

ma61125s01 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 135947973 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 18.

[15] Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, водночас нуклеотидна послідовність немутованого гена F35H містить послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(i) нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 1, 4 або 7;

(ii) нуклеотидної послідовності, що має сДНК, представлену в SEQ ID NO: 2, 5 або 8;

(iii) нуклеотидної послідовності, що кодує амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3, 6 або 9;

(iv) нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 або 8.

(v) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 3, 6 або 9;

(vi) нуклеотидної послідовності, що гібридизується зі зворотним комплементом нуклеотидної послідовності, як визначено в пунктах (i), (ii) або (iii), у жорстких умовах гібридизації; та

(vii) нуклеотидної послідовності, що кодує білок, отриманий з амінокислотної послідовності, кодованої нуклеотидною послідовністю з пунктів (i)–(vi) шляхом заміщення, делеції та/або додавання щонайменше однієї амінокислоти амінокислотної послідовності, кодованої нуклеотидною послідовністю з пунктів (i)–(vi).

[16] Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, водночас мутація є мутацією зсування рамки зчитування або нонсенс мутацією, призводить до зміненої експресії нуклеотидної послідовності або зміненої ферментативної активності кодованого білка, у переважному варіанті виконання цього винаходу – до зменшеної або відсутньої експресії нуклеотидної послідовності, або зменшеної ферментативної активності кодованого білка, або підвищеної ферментативної активності кодованого білка, призводить до зміненої послідовності білка, кодованого нуклеотидною послідовністю, або є інсерцією, делецією або заміщенням щонайменше одного нуклеотиду в кодованій області, у сигналі сплайсингу або в регуляторному елементі згаданої нуклеотидної послідовності.

[17] Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, водночас мутація є інсерцією, у переважному варіанті виконання цього винаходу – в екзон, у переважному варіанті виконання цього винаходу – інсерцією в перший екзон щонайменше одного нуклеотиду, у переважному варіанті виконання цього винаходу – інсерцією зі зсуванням рамки зчитування, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – інсерція складається зі 187 нуклеотидів або з близько 187 нуклеотидів, та/або інсерція перебуває між положеннями 97 і 98 гена F35H, представленого нуклеотидною послідовністю в SEQ ID NO: 1. В особливо переважному варіанті виконання цього винаходу мутований ген F35H містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11. В альтернативному варіанті виконання цього винаходу мутація є заміщенням, у переважному варіанті виконання цього винаходу – заміщенням щонайменше однієї нуклеїнової кислоти, що призводить до обміну щонайменше однієї амінокислоти, або призводить до перетворення кодону, що кодує

амінокислоту, на стоп-кодон. У переважних варіантах виконання цього винаходу мутований ген F35H містить нуклеотидну послідовність, що кодує одну з амінокислотних послідовностей, вибраних із групи, що складається із SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 або 40. Така нуклеотидна послідовність може бути вибраною з групи, що складається із SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 або 39.

[18] Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, водночас згадана частина рослини не є матеріалом для розмноження.

[19] Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, водночас згадана частина рослини не є стернею.

[20] Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, водночас згадана рослина або частина рослини походить із кукурудзи, сорго або цукрової тростини.

[21] Полінуклеїнова кислота, як-от алель-специфічна полінуклеїнова кислота (молекулярний маркер), специфічно гібридується з будь-якою з послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18 або з її комплементом, або зі зворотним комплементом.

[22] Використання полінуклеїнової кислоти за пунктом [21] або полінуклеїнової кислоти, як-от алель-специфічна полінуклеїнова кислота (молекулярний маркер), для ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, або для вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, за будь-яким із пунктів [03]–[06], у переважному варіанті виконання цього винаходу – у спосіб за пунктом [01] або [02], водночас у переважному варіанті виконання цього винаходу полінуклеїнова кислота придатна для гібридизації в якості прямого праймера та зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегуються з поліпшеною перетравлюваністю, водночас хромосомний інтервал розташований на хромосомі 9 і фланкований маркерними алелями та61070s01 та та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 та та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 та та61125s01.

[23] Спосіб продукування силосованого рослинного матеріалу або корму для тварин, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, який передбачає

(а) вирощування рослини за будь-яким із пунктів [03]–[06] або [11],

(b) збирання рослини або її частини,

(c) необов'язково, подрібнення та/або дроблення рослини чи її частини, та

(d) силосування рослини або її частини за пунктом (b) або (c), необов'язково, шляхом додавання стимулятора, як-от бактеріальний інокулянт, цукор і фермент.

[24] Силосований рослинний матеріал або корм для тварин, продукований в спосіб за пунктом [23].

[25] Спосіб продукування біогазу або біоетанолу, що передбачає такі етапи:

(а) пропозиція рослини за будь-яким із пунктів [03–06] або [11], або силосованого рослинного матеріалу за пунктом [24], і

(b) продукування біогазу або біоетанолу з рослини або силосованого рослинного матеріалу.

СТИСЛИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1: DNDF (перетравлювана нейтрально-детергентна клітковина)-ефекти QTL на хромосомі 9 кукурудзи (*Zea mays*). Ідентифікація сильного QTL для перетравлюваності на хромосомі 9. Зазначений відсотковий вміст DNDF стерні кукурудзи.

Фігура 2: Положення маркерних локусів для QTL силосу. Маркери було виявлено методом захоплення послідовностей (SeqCapture) на основі AGPv02 і WGS (повногеномне секвенування) лінії QTL і порівняння з еталонною лінією RH207.

Фігура 3: Область тонкого генетичного картування QTL силосу, здійсненого за допомогою молекулярних маркерів у різних рекомбінантних генотипах.

Фігура 4: Вирівнювання нуклеотидної послідовності еталонного гена F35H та мутованого гена F35H відповідно до одного варіанта виконання цього винаходу.

Фігура 5: Функціональна валідація за допомогою експерименту із секвенування РНК. Стрілка показує, що інсерція експресована й викликає зсування рамки зчитування.

Фігура 6: Вегетаційний досвід для швидкої валідації Мутантів гена F35H: Результати перетравлюваності мутантних рослин і рослин дикого типу для ідентифікованого QTL. У середньому мутант RH207m023a і дикий тип показали різницю, яка становить 7,3 одиниці DNDF.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВАРІАНТІВ ВИКОНАННЯ ВИНАХОДУ

Перед описом системи та способу цього винаходу треба розуміти, що цей винахід не обмежується описаними конкретними системами та способами або комбінаціями, оскільки йдеться про те, що такі системи, способи й комбінації можуть варіюватися. Також треба

розуміти, що використовується в цьому документі термінологія не є обмежувальною, оскільки обсяг цього винаходу буде обмежено лише запропонованою формулою винаходу.

У контексті цього документа форми однини "a", "an" та "the" включають і однину, і множину, якщо інше явно не впливає з контексту.

У контексті цього документа терміни "що містить", "містить", та "що складається з" є синонімами термінів "що включає", "включає в себе" або "містить у собі", "що містить у собі" та охоплюють або є багатоваріантними й не виключають використання додаткових, неперелічених членів, елементів або етапів способів. Треба розуміти, що терміни "що містить", "містить" та "що складається з", у контексті цього документа, містять терміни "що складається з", "складається" та "складається з", а також терміни "що складається, по суті, з", "складається, по суті" та "складається, по суті, з".

Перелічування діапазонів числових значень за кінцевими точками охоплює всі числа й частки, включені до відповідних діапазонів, а також перелічені кінцеві точки.

У контексті цього документа терміни "приблизно" або "близько", що стосуються вимірюваного значення, як-от параметр, величина, тимчасова тривалість тощо, передбачають включення варіацій $\pm 20\%$ або менше, у переважному варіанті виконання цього винаходу – $\pm 10\%$ або менше, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – $\pm 5\%$ або менше й у ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – $\pm 1\%$ або менше від зазначеного значення, тією мірою, якою такі варіації придатні для використання в розкритому винаході. Треба розуміти, що значення, до якого належить обставина "приблизно" або "близько", саме також певним чином і переважно розкрито.

Хоча термін "щонайменше один", як-от щонайменше один член із групи членів, ясний per se, за допомогою подальшого пояснення на прикладах буде зрозуміло, що цей термін включає, зокрема, посилання на будь-який один зі згаданих членів або на будь-які щонайменше два зі згаданих членів, як-от, наприклад, будь-які ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 або ≥ 7 тощо зі згаданих членів і аж до всіх згаданих членів.

Усі посилання, наведені в цьому описі, додані до цього документа за допомогою посилання в повному обсязі. Зокрема, ідеї, що містяться в усіх певним чином наведених посиланнях цього документа, додано до нього за допомогою посилання.

Якщо не дано інше визначення, усі терміни, розкриті в цьому документі, включно з технічними й науковими термінами, мають значення, зазвичай зрозумілі фахівцям середньої кваліфікації в цій області техніки, до якої належить цей винахід. За допомогою додаткових роз'яснень додано визначення термінів для того, щоб краще зрозуміти ідею цього винаходу.

Стандартні довідкові видання, що викладають загальні принципи технології рекомбінантної ДНК, містять Молекулярне клонування: Інструкція щодо здійснення лабораторних робіт, 2-е вид., Т. 1–3, за ред. Сембрук та ін., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спрінг Харбор, Нью-Йорк, 1989; Поточні протоколи в молекулярній біології, за ред. Осубель та ін., Greene Publishing і Wiley-Interscience, Нью-Йорк, 1992 (з періодичними оновленнями) ("Осубель та ін., 1992"); серія "Методи ензимології" (Academic Press, Inc.); Інніс та ін., Протоколи PCR: Посібник щодо методів і застосування, Academic Press: Сан-Дієго, 1990 рік; PCR 2: Практичний підхід (М. Дж. Макферсон, Б. Д. Хеймс і Г.Р. Тейлор, за ред. (1995); Харлоу й Лейн, за ред. (1988) Антитіла, Інструкція з проведення лабораторних робіт; і Культура тваринних клітин (Р. Я. Фрейшні, за ред. (1987). Загальні принципи мікробіології викладено, наприклад, у роботі Девіс, Б.Д. та ін., Microbiology, 3-е вид., Harper & Row, видавництво, Філадельфія, Пенсильванія (1980).

У наведених нижче витягах різні аспекти цього винаходу визначено докладніше. Кожен аспект, визначений таким чином, може бути об'єднаний із будь-яким іншим аспектом або аспектами, якщо явно не зазначено інше. Зокрема, будь-яка ознака, зазначена як переважна або та, що має перевагу, може бути об'єднана з будь-якою іншою ознакою або ознаками, зазначеними як переважні або як ті, що мають перевагу.

Посилання, що зазначається протягом усього цього опису на "один варіант виконання цього винаходу" або "варіант виконання цього винаходу" означає, що особлива ознака, структура або характеристика, описана у зв'язку з цим варіантом виконання цього винаходу, включена щонайменше до одного варіанта виконання цього винаходу. Таким чином, вирази "в одному варіанті виконання цього винаходу" або "у варіанті виконання цього винаходу", які є в різних місцях цього опису, необов'язково всі належать до одного й того ж варіанта виконання цього винаходу, проте це можливо. Крім того, особливі ознаки, структури або характеристики можуть бути об'єднані будь-яким придатним чином, як це було б очевидно з цього винаходу фахівцям в цій області техніки, щонайменше в одному варіанті виконання цього винаходу. Крім того, хоча деякі варіанти виконання цього винаходу, описані в цьому документі, включають деякі, але не інші ознаки, включені до інших варіантів виконання цього винаходу, передбачається, що

комбінації ознак різних варіантів виконання цього винаходу перебувають у межах обсягу цього винаходу й утворюють різні варіанти його виконання, що було б зрозуміло фахівцям у цій області техніки. Наприклад, у поданій формулі винаходу будь-який із заявлених варіантів виконання цього винаходу може бути використаний у будь-якій комбінації.

У наведеному нижче докладному описі винаходу наведено посилання на додані креслення, які є частиною цього документа й у яких для наочності показано лише конкретні варіанти виконання цього винаходу, за допомогою яких цей винахід може бути здійснено. Треба розуміти, що можуть бути використані й інші варіанти виконання цього винаходу, а структурні або логічні зміни можуть бути здійснені без виходу за межі обсягу цього винаходу. Тому подальший докладний опис варіантів виконання цього винаходу не варто розуміти в обмежувальному сенсі, а обсяг цього винаходу визначається формулою винаходу, яка додається.

Переважні пункти (ознаки) та варіанти виконання цього винаходу викладено нижче. Кожен із пунктів і варіантів виконання цього винаходу, визначених таким чином, може бути об'єднаним із будь-яким іншим пунктом та/або варіантом виконання цього винаходу, якщо явно не зазначено інше. Зокрема, будь-яка ознака, зазначена як переважна або та, що має перевагу, може бути об'єднана з будь-якою іншою ознакою або ознаками, зазначеними як переважні або як ті, що мають перевагу.

У контексті цього документа термін "кукурудза" стосується рослини виду *Zea mays*, у переважному варіанті виконання цього винаходу – *Zea mays ssp mays*.

У контексті цього документа термін "сорго" стосується рослини роду *Sorghum* і включає без обмеження *Sorghum bicolor*, *Sorghum sudanense*, *Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanense*, *Sorghum* × *aluum* (*Sorghum bicolor* × *Sorghum halepense*), *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum* × *drummondii*, *Sorghum halepense* та/або *Sorghum propinquum*.

У контексті цього документа термін "цукрова тростина" стосується рослини виду *Saccharum officinarum*.

Термін "рослина" охоплює цілі рослини, включно з їхніми нащадками або потомством. Термін "частина рослини" включає будь-яку частину чи похідні рослини, включно з певними тканинами або структурами рослини, рослинними клітинами, рослинним протопластом, рослинною клітиною або культурою тканини, з якої можна регенерувати рослини, калуси рослини, скупчення рослинних клітин і рослинні клітини, що перебувають в інтактному стані в рослинах або частинах рослин, як-от насіння, зерна, качани, квітки, сім'ядолі, листя, стебла, бруньки, коріння, кореневі кінчики, стерня тощо. Частини рослини можуть містити оброблені частини рослини або її похідні, включно з квітками, оліями, екстрактами тощо. У певних варіантах виконання цього винаходу частина рослини або її похідні, згадані в цьому документі, є стернею.

Термін "стерня", в контексті цього документа, використаний у своєму звичайному значенні, відомому в цій області техніки. За допомогою додаткових роз'яснень і без обмеження стерня може містити, складатися або складатися по суті з листя і стебел польових культур, як-от кукурудза або сорго, які зазвичай залишають у полі після збирання зерна, або у вигляді цукрової тростини. Стерня може також включати качани (наприклад, серцевину вушка кукурудзи, без зерен). Стерня може також не містити качани. Стерня може також включати лушпиння або оболонки (наприклад, листоподібний зовнішній покрив вушка кукурудзи). Стерня може також не містити лушпиння або оболонки. Стерня подібна до соломи, це залишок після збирання зерен будь-яких злакових або трави в стані зрілості на насіння. Її можна використовувати безпосередньо для випасання худоби або висушити для використання як фуражу. (Кукурудзяну) стерню можна використовувати як корм або грубий корм під час випасання худоби, у подрібненому вигляді, як силос, для подальшого використання як фуражу, або її можна збирати для безпосереднього (у несилосованому вигляді) використання як фуражу. Кормову кукурудзу зазвичай силосують у більш прохолодних регіонах, але її врожай можна збирати весь рік у тропіках і згодовувати тваринам як зелений корм. У разі використання як силосу зазвичай рослину цілком (разом із зерном і стернею) подрібнюють на шматки, які потім подрібнюють між валками під час збирання врожаю. Крім стебел, листя, лушпиння й качанів, що залишилися в полі, зерна також можуть залишитися після збирання врожаю. Ці зерна, що залишилися, разом із кукурудзяною стернею, слугують додатковим джерелом корму під час випасання худоби.

У певних варіантах виконання цього винаходу частина рослини або її похідне містить складається або складається по суті зі щонайменше одного, у переважному варіанті виконання цього винаходу – з усіх стебел, листя й качанів. У певних варіантах виконання цього винаходу частиною рослини або її похідним є листя. У певних варіантах виконання цього винаходу

частиною рослини або її похідним є стебла. У певних варіантах виконання цього винаходу частиною рослини або її похідним є качани. У певних варіантах виконання цього винаходу частина рослини або її похідне містить, складається або складається по суті зі щонайменше одного, у переважному варіанті виконання цього винаходу – з усіх стебел і листя. У певних варіантах виконання цього винаходу частина рослини або її похідне містить, складається або складається по суті зі щонайменше одного, у переважному варіанті виконання цього винаходу – з усіх стебел і качанів. У певних варіантах виконання цього винаходу частина рослини або її похідне містить, складається або складається по суті зі щонайменше одного, у переважному варіанті виконання цього винаходу – з усіх листків і качанів. У певних варіантах виконання цього винаходу частина рослини або її похідне не є (функціональним) матеріалом для розмноження, як-от зародкова плазма, насіння або зародок рослини або інший матеріал, з якого можна регенерувати рослину. У певних варіантах виконання цього винаходу частина рослини або її похідне не містить (функціональних) чоловічих і жіночих репродуктивних органів. У певних варіантах виконання цього винаходу частина рослини або її похідне є або містить матеріал для розмноження, але матеріал для розмноження, який не використовується або не може використовуватися (більше) для отримання або генерування нових рослин, наприклад, матеріал для розмноження, який був хімічним, механічним чи іншим чином приведений до нефункціонального стану, наприклад, шляхом термічної обробки, кислотної обробки, ущільнення, подрібнення, дроблення, силосування тощо.

У контексті цього документа термін "перетравлюваність" стосується продукту й вимірюється у відсотковому вмісті продукту (як-от рослина кукурудзи, сорго або цукрової тростини, або частина рослини, або її похідне, зокрема, наприклад, суха речовина, органічна речовина або клітинна стінка продукту), засвоєного в травному тракті тварини (Барр'єр та ін. 2003). Для здійснення кількісного аналізу перетравлюваності кукурудзи й інших кормових культур було розроблено біологічні й хімічні методи (Ван Соест та ін., 1963). Нейтрально-детергентна клітковина (NDF), яка є залишком після видалення розчинного вмісту клітин, – важливий індикатор клітинної стінки рослини й целюлози. Перетравлюваність NDF кормів в умовах *in vitro* (IVNDFD) – це оцінювання перетравлюваності клітинних стінок на основі припущення, що частина рослинного матеріалу, яка не містить NDF, була цілковито перетравлена (Мешин та ін., 2000). Крім того, повідомлялося, що використання ближньої інфрачервоної спектроскопії (NIRS) дає змогу точно виміряти ознаки перетравлюваності в багатьох кормових культур, включно з кукурудзою (Люббершtedт та ін., 1997а, b; Циммер та ін., 1990). У певних варіантах виконання цього винаходу тварина є ссавцем. У певних варіантах виконання цього винаходу тварина є жуйною твариною. У певних варіантах виконання цього винаходу тварина є трав'яною твариною. У певних варіантах виконання цього винаходу тварина є трав'яним ссавцем.

Поліпшена перетравлюваність, згадана в цьому документі, стосується поліпшеної перетравлюваності рослини або частини рослини або її похідного, що має характерні особливості цього винаходу, як-от мутація, маркер, SNP або QTL, як описано в іншому місці цього документа, порівняно з рослиною або частиною рослини, або з її похідним, які не мають таких характерних особливостей. У певних варіантах виконання цього винаходу поліпшена або підвищена перетравлюваність стосується підвищення середнього значення DNDF щонайменше на 1 %, наприклад, щонайменше на 2 %, щонайменше на 3 %, щонайменше на 4 %, щонайменше на 5 %, щонайменше на 6 %, щонайменше на 7 %, щонайменше на 8 %, щонайменше на 9 % або щонайменше на 10 %, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 2 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 3 %, наприклад щонайменше на 4 %.

Термін "локус" ("локуси" – у множині) означає певне місце або місця, або сайт на хромосомі, де виявлено, наприклад, QTL, ген або генетичний маркер. У контексті цього документа термін "локус кількісних ознак", або QTL, використовується у своєму звичайному значенні, відомому в цій області техніки. За допомогою додаткових роз'яснень і без обмеження, QTL може стосуватися області ДНК, яка асоційована з диференціальною експресією кількісної фенотипічної ознаки щонайменше в одному генетичному фоні, наприклад щонайменше в одній племінній популяції. Область QTL включає або тісно зчеплена з геном або генами, які впливають на аналізовану ознаку. "Алель QTL" може містити безліч генів або інших генетичних факторів у межах області функціонально зчеплених генів або групи зчеплення, як-от гаплотип. Алель QTL може означати гаплотип у межах зазначеного вікна, водночас зазначене вікно є областю функціонально зчеплених генів, яку можна визначити й відстежити за допомогою набору зі щонайменше одного мономорфного та/або поліморфного маркера. Гаплотип можна визначити за унікальним відбитком алелів на кожному маркері в зазначеному вікні. QTL може кодувати щонайменше один алель, який впливає на експресивність безперервно розподіленого

(кількісного) фенотипу. У певних варіантах виконання цього винаходу QTL, як описано в цьому документі, може бути гомозиготним. У певних варіантах виконання цього винаходу QTL, як описано в цьому документі, може бути гетерозиготним.

У контексті цього документа термін "алель", або "алелі", стосується щонайменше однієї альтернативної форми, тобто іншої нуклеотидної послідовності, локусу.

У контексті цього документа термін "мутантні алелі", або "мутація" алелів, включає алелі, що мають щонайменше одну мутацію, як-от інсерція, делеція, стоп-кодон, заміна основи (наприклад, транзиція або трансверсія) або зміна меж сплайсингу / сайтів сигналу сплайсингу, які можуть призводити або не призводити до появи змінених генних продуктів. Модифікації алелів можуть виникати в кодувальних або некодувальних областях (наприклад, у промоторних областях, екзонах, інтронах або в межах сплайсингу).

У контексті цього документа терміни "інтрогресія", "інтрогресований" та "інтрогресування" стосуються і природного, і штучного процесу, завдяки якому хромосомні фрагменти або гени одного виду, різновиду або сорту переміщуються в геном іншого виду, різновиду або сорту шляхом схрещування цих видів. Цей процес може бути необов'язково завершено шляхом зворотного схрещування з одним із рекурентних батьків. Наприклад, інтрогресія бажаного алеля в зазначеному локусі може бути передана щонайменше одному потомству за допомогою статевого схрещування між двома батьками одного й того ж виду, де щонайменше один із батьків має бажаний алель у своєму геномі. В альтернативному варіанті виконання цього винаходу, наприклад, передавання алеля може відбуватися шляхом рекомбінації між двома донорськими геномами, наприклад, у злитому протопласті, де щонайменше один донорський протопласт має у своєму геномі бажаний алель. Бажаний алель може бути, наприклад, визначений маркером, асоційованим із фенотипом, у QTL, трансгені або подібному. У будь-якому разі потомство, яке має бажаний алель, може бути повторно зворотно схрещеним із лінією, що має бажаний генетичний фон, і вибраним для бажаного алеля, щоб отримати алель, зафіксований у вибраному генетичному фоні. Термін "фрагмент інтрогресії" або "сегмент інтрогресії", або "область інтрогресії" стосується фрагмента хромосоми (або частини хромосоми, або області), який було введено в іншу рослину одного й того ж або спорідненого виду або штучним, або природним шляхом, наприклад, шляхом схрещування або традиційними методами селекції, як-от зворотне схрещування, тобто фрагмент інтрогресії є результатом способів селекції, які позначаються дієсловом "інтрогресувати" (наприклад, зворотне схрещування). Треба розуміти, що термін "фрагмент інтрогресії" ніколи не стосується цілої хромосоми, а лише частини хромосоми. Фрагмент інтрогресії може бути великим, наприклад, він може становити навіть три чверті або половину хромосоми, але в переважному варіанті виконання цього винаходу – менше, наприклад близько 50 млн п.о. або менше, наприклад близько 30 млн п.о. або менше, близько 20 млн п.о. або менше, близько 25 млн п.о. або менше, близько 10 млн п.о. або менше, близько 9 млн п.о. або менше, близько 8 млн п.о. або менше, близько 7 млн п.о. або менше, близько 6 млн п.о. або менше, близько 5 млн п.о. або менше, близько 4 млн п.о. або менше, близько 3 млн п.о. або менше, близько 2,5 млн п.о. або 2 млн п.о. або менше, близько 1 млн п.о. (дорівнює 1 000 000 пар основ) або менше, або близько 0,5 млн п.о. (дорівнює 500 000 пар основ) або менше, наприклад близько 200 000 п.о. (дорівнює 200 тисячам пар основ) або менше, близько 100 000 п.о. (100 т.п.о.) або менше, близько 50 000 п.о. (50 т.п.о.) або менше, близько 25 000 п.о. (25 т.п.о.) або менше.

Вважається, що генетичний елемент, локус, фрагмент інтрогресії, QTL або ген, або алель, що надає ознаку (наприклад, поліпшену перетравлюваність), можна "отримати з" або може бути "отриманий з", або можна "вивести з", або може бути "виведений з", або "присутній в", або "виявлений у" рослині або частині рослини, як описано в іншому місці цього документа, якщо його можна перенести з рослини, у якій він присутній, в іншу рослину, у якій його немає (наприклад, лінія або сорт), використовуючи традиційні методи селекції, що не призводять до фенотипічної зміни реципієнтної рослини, за винятком додавання ознаки, наданої генетичним елементом, локусом, фрагментом інтрогресії, QTL, геном або алелем. Терміни використовуються як взаємозамінні, і, таким чином, генетичний елемент, локус, фрагмент інтрогресії, QTL, ген або алель можуть бути перенесені в будь-який інший генетичний фон, позбавлений цієї ознаки. Можуть бути використані не тільки рослини, що містять генетичний елемент, локус, фрагмент інтрогресії, QTL, ген або алель, але також потомство/нащадки таких рослин, які були вибрані для збереження генетичного елемента, локусу, фрагмента інтрогресії, QTL, гена або алеля, які можуть бути використані й додані до цього документа. Фахівець у цій області техніки зможе визначити, чи містить рослина (або геномна ДНК, клітина або тканина рослини) один і той же генетичний елемент, локус, фрагмент інтрогресії, QTL, ген або алель, який можна отримати з такої рослини з використанням щонайменше одного методу, відомого в

цій області техніки, наприклад, фенотипічного кількісного аналізу, повногеномного секвенування, аналізу за допомогою молекулярного маркера, картування ознак, "розпису" хромосоми, тесту на алелізм тощо, або комбінації методів. Треба розуміти, що можуть бути додані і трансгенні або генно-відредаговані рослини.

У контексті цього документа всі терміни "трансформація" і "трансгенна модифікація" використовуються як синоніми для позначення переносу виділеної та клонованої молекули нуклеїнової кислоти в ДНК, зазвичай у хромосомну ДНК або геном, іншого організму/виду або одного й того ж організму/виду, але в місце, відмінне від місця, у якому молекула нуклеїнової кислоти природним чином розташована на хромосомній ДНК або в геномі.

Значення терміна "введення", використовуваного в цьому винаході, передбачає стабільну або транзійтну інтеграцію за допомогою трансформації, включно з *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією, трансфекцією, мікроін'єкцією, біолістичним бомбардуванням, інсерцією з використанням технології редагування генів, як-от системи CRISPR (наприклад, CRISPR/Cas, зокрема CRISPR/Cas9 або CRISPR/Cpf1), CRISPR/CasX або CRISPR/CasY), TALEN, цинк-пальцеві нуклеази або мегануклеази, гомологічна рекомбінація необов'язково за допомогою однієї з нижчезгаданих технологій редагування генів, включно, у переважному варіанті виконання цього винаходу, з матрицею для репарації, модифікацією ендогенного гена з використанням випадкового або цілеспрямованого мутагенезу, як-от TILLING, або вищезгаданою технологією редагування генів тощо.

Терміни "трансгенні" або "генетично модифіковані організми" (ГМО) у контексті цього документа означають організми, генетичний матеріал яких було змінено з використанням методів, зазвичай відомих як "технологія рекомбінантної ДНК". Технологія рекомбінантної ДНК передбачає здатність об'єднувати молекули ДНК з різних джерел в одну молекулу *ex vivo* (наприклад, у пробірці). Ця термінологія зазвичай не охоплює організми, генетичну композицію яких було змінено за допомогою звичайного кросбридингу або "мутаційної" селекції, оскільки ці способи передують відкриттю способів рекомбінантної ДНК. Термін "нетрансгенний" у контексті цього документа стосується рослин і харчових продуктів, отриманих із рослин, які не є "трансгенними" або "генетично модифікованими організмами", як визначено вище.

Термін "трансген" або "екзоген" стосується молекули нуклеїнової кислоти або генетичного локусу, який містить послідовність ДНК, як-от рекомбінантний ген, який було введено в геном рослини за допомогою трансформації, як-от *Agrobacterium*-опосередкована трансформація. Рослина, що містить трансген, стабільно інтегрований у її геном, називається "трансгенною рослиною". Термін "ендоген" стосується молекули нуклеїнової кислоти або генетичного локусу, який природним чином зустрічається в геномі рослини. Термін "редагування генів" або "редагування генома" належить до генної інженерії, під час якої ДНК або РНК вставляють, видаляють, модифікують або замінюють у геномі організму. Редагування генів може передбачати цілеспрямований або нецілеспрямований (випадковий) мутагенез. Цілеспрямований мутагенез може бути здійснений, наприклад, за допомогою сконструйованих нуклеаз, як-от мегануклеази, цинк-пальцеві нуклеази (ZFN), ефекторні нуклеази, подібні до активаторів транскрипції (TALEN), і системи кластеризованих регулярних проміжних коротких паліндромних повторів (CRISPR/Cas). Ці нуклеази створюють сайт-специфічні дволанцюжкові розриви (DSB) у бажаних місцях генома. Індуковані дволанцюжкові розриви репаруються за допомогою негомологічного з'єднання кінців (NHEJ) або гомологічної рекомбінації (HR), або гомологічно спрямованої репарації (HDR), що призводить до цілеспрямованих мутацій або до модифікацій нуклеїнової кислоти. Використання сконструйованих нуклеаз, необов'язково разом із матрицею для репарації / рекомбінаційною матрицею, особливо придатне для генерування нокаутів або нокадаунів генів. У певних варіантах виконання цього винаходу розроблено сконструйовані нуклеази, які специфічно індукують мутацію в гені F35H, як описано в іншому місці цього документа, наприклад для генерації мутованого гена F35H або нокауту гена F35H. У певних варіантах виконання цього винаходу розроблено сконструйовані нуклеази, зокрема РНК-специфічні системи CRISPR/Cas, які специфічно націлені на мРНК F35H, наприклад, для розщеплення мРНК F35H і генерації нокадауну гена / мРНК / білка F35H. Системи доставляння й експресії систем сконструйованих нуклеаз добре відомі в цій області техніки.

У певних варіантах виконання цього винаходу нуклеаза або цілеспрямована/сайт-специфічна/хомінг-нуклеаза є, містить, складається по суті або складається з (модифікованої) системи або комплексу CRISPR/Cas, (модифікованого) білка Cas, (модифікованого) цинкового пальця, (модифікованої) цинк-пальцевої нуклеази (ZFN), (модифікованого) ефектора, подібного до факторів транскрипції (TALE), (модифікованої) ефекторної нуклеази, подібної до активаторів транскрипції (TALEN) або (модифікованої) мегануклеази. У певних варіантах виконання цього винаходу згадана (модифікована) нуклеаза або цілеспрямована/сайт-специфічна/хомінг-

нуклеаза є, містить, складається по суті або складається з (модифікованої) РНК-спрямовуваної нуклеази. Треба розуміти, що в певних варіантах виконання цього винаходу нуклеази можуть бути кодон-оптимізованими для експресії в рослинах. У контексті цього документа термін "націлювання" вибраної послідовності нуклеїнової кислоти означає, що нуклеаза або нуклеазний комплекс діє специфічним для нуклеотидної послідовності чином. Наприклад, у контексті системи CRISPR/Cas напрямна РНК здатна до гібридизації з вибраною послідовністю нуклеїнової кислоти. У контексті цього документа термін "гібридизація" або "що гібридизується" стосується реакції, у якій щонайменше один полінуклеотид перетворюється на комплекс, який стабілізується за допомогою водневого зв'язку між основами нуклеотидних залишків. Водневий зв'язок може здійснюватися за допомогою спарювання основ за Вотсоном-Кріком, зв'язування за Хугстіном або будь-яким іншим специфічним для послідовності чином. Комплекс може містити два ланцюги, що утворюють дуплексну структуру, три або більше ланцюгів, що утворюють мультиланцюжковий комплекс, одиночний самогібридизувальний ланцюг або будь-яку їх комбінацію. Реакція гібридизації може бути етапом у більш екстенсивному процесі, як-от ініціація РGR або розщеплення полінуклеотиду ферментом. Послідовність, здатна до гібридизації з цією послідовністю, називається "комплементом" цієї послідовності.

Редагування генів може передбачати транзйєнтну, індуцибельну або конститутивну експресію компонентів або систем редагування генів. Редагування генів може передбачати геномну інтеграцію або епісомальну присутність компонентів або систем редагування генів. Компоненти або системи редагування генів можуть бути запропоновані на векторах, як-от плазміди, які можна доставляти відповідними засобами доставляння, відомими в цій області техніки. Найкращими векторами є експресійні вектори.

Для редагування генів можуть бути запропоновані рекомбінаційні матриці для здійснення гомологічно спрямованої репарації (HDR). Наприклад, генетичний елемент може бути замінений за допомогою редагування гена, у якому запропоновано рекомбінаційну матрицю. ДНК може бути розрізана вище та/або нижче послідовності, яку треба змінити. Таким чином, послідовність, що підлягає заміні, вирізають із ДНК. Потім за допомогою HDR вирізану послідовність замінюють матрицею. У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL за цим винаходом, описаний у цьому документі, може бути запропонований на матриці / як матриця. У разі конструювання системи таким чином, що дволанцюжкові розриви вводяться вище та/або нижче відповідної області в геномі рослини, яка не містить алеля QTL, цю область вирізають і можуть замінювати матрицею, що містить алель QTL за цим винаходом. Таким чином, введення в рослину алеля QTL за цим винаходом не обов'язково має включати множинне зворотне схрещування, зокрема в рослини зі специфічним генетичним фоном. Аналогічним чином мутований F35H за цим винаходом може бути запропонований на матриці / як матриця. Однак велику перевагу має варіант виконання цього винаходу, у якому мутований F35H за цим винаходом може бути згенерований без використання рекомбінаційної матриці, але виключно за допомогою дії ендонуклеази, що призводить до розриву дволанцюжкової ДНК, який репарується за допомогою NHEJ, що призводить до генерування інсерційно-делеційної мутації.

У певних варіантах виконання цього винаходу модифікація або мутація нуклеїнової кислоти здійснюються за допомогою (модифікованої) системи ефекторної нуклеази, подібної до активаторів транскрипції (TALEN). Ефектори, подібні до активаторів транскрипції (TALE), можуть бути сконструйовані для зв'язування практично будь-якої бажаної послідовності ДНК. Ілюстративні способи редагування генома з використанням системи TALEN можна знайти, наприклад, у роботі Чермак Т., Дойл Е.Л., Крістіан М., Ван Л., Чжан Ю., Шмідт С. та ін. Ефективне конструювання та збирання спеціально створених TALEN та інших конструкцій на основі ефекторів TAL для націлювання на ДНК. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:e82; Чжан Ф., Конг Л., Лодато С., Косурі С., Черч Г.М., Арлотта П. Ефективна конструкція сиквенс-специфічних ефекторів TAL для модуляції транскрипції у ссавців. *Nat Biotechnol.* 2011;29:149–153 і в Патентах США №№: 8,450,471, 8,440,431 та 8,440,432, і всі вони певним чином включені за допомогою посилання. За допомогою додаткових роз'яснень і без обмеження, TALE природного походження або "TALE дикого типу", є такими, які зв'язують нуклеїнові кислоти, білками, що секретуються численними видами протеобактерій. Поліпептиди TALE містять домен, який зв'язує нуклеїнові кислоти, що складається з тандемних повторів висококонсервативних мономерних поліпептидів, які переважно мають довжину 33, 34 або 35 амінокислот і відрізняються один від одного в основному положеннями амінокислот 12 і 13. У переважних варіантах виконання цього винаходу нуклеїновою кислотою є ДНК. У контексті цього документа термін "поліпептидні мономер", або "мономер TALE", буде використовуватися для позначення висококонсервативних повторюваних поліпептидних послідовностей, розташованих у межах домену, який зв'язує нуклеїнові кислоти TALE, а термін "пара варіабельних

амінокислотних залишків", або RVD, буде використовуватися для позначення високоваріабельних амінокислот у положеннях 12 і 13 поліпептидних мономерів. Як запропоновано в цьому винаході, амінокислотні залишки RVD представлені з використанням однопітерного коду IUPAC для амінокислот. Загальне уявлення мономера TALE, який входить до ДНК-зв'язувального домену, має такий вигляд: X1-11-(X12X13)-X14-33 або 34, або 35, де нижній індекс указує на положення амінокислоти, а X є будь-якою амінокислотою. X12X13 вказують на RVD. У деяких поліпептидних мономерах варіабельної амінокислоти в положенні 13 немає або вона відсутня, і в таких поліпептидних мономерах RVD складається з одиночної амінокислоти. У таких випадках RVD може бути альтернативно представлена як X*, де X є X12, а (*) вказує на те, що X13 відсутня. ДНК-зв'язувальний домен містить кілька повторів мономерів TALE, і це може бути представлено як (X1-11-(X12X13)-X14-33 або 34 або 35) z, де, в переважному варіанті виконання цього винаходу, z становить щонайменше від 5 до 40. В іншому переважному варіанті виконання цього винаходу z становить щонайменше від 10 до 26. Мономери TALE мають афінність зв'язування нуклеотидів, яка визначається за ідентичністю амінокислот у своїх RVD. Наприклад, поліпептидні мономери з RVD NI, у переважному варіанті виконання цього винаходу, зв'язуються з аденіном (A), поліпептидні мономери з RVD NG, у переважному варіанті виконання цього винаходу, зв'язуються з тиміном (T), поліпептидні мономери з RVD HD, у переважному варіанті виконання цього винаходу, зв'язуються з цитозином (C), а поліпептидні мономери з RVD NN, у переважному варіанті виконання цього винаходу, зв'язуються з гуаніном (G). У ще одному варіанті виконання цього винаходу поліпептидні мономери з RVD IG, у переважному варіанті виконання цього винаходу, зв'язуються з T. Таким чином, кількість і послідовність повторів поліпептидних мономерів у домені, який зв'язує нуклеїнові кислоти TALE, визначають цілеспрямовану специфічність його нуклеїнових кислот. Крім того, в інших варіантах виконання цього винаходу поліпептидні мономери з RVD NS розпізнають усі чотири пари основ і можуть зв'язуватися з A, T, G або C. Структура й функція TALE описані нижче, наприклад, у роботах Москун та ін., *Science* 326 : 1501 (2009); Бох та ін., *Science* 326: 1509–1512 (2009); і Чжан та ін., *Nature Biotechnology* 29: 149–153 (2011), кожну з яких включено як посилання в повному обсязі.

У певних варіантах виконання цього винаходу модифікація або мутація нуклеїнової кислоти здійснюється за допомогою (модифікованої) системи цинк-палацевої (ZFN) нуклеази. У системі ZFN використовуються штучні рестрикційні ферменти, згенеровані шляхом злиття ДНК-зв'язувального домену цинкового пальця з ДНК-розщеплювальним доменом, який може бути сконструйований для націлювання на бажані послідовності ДНК. Ілюстративні способи редагування геномів із використанням системи ZFN можна знайти, наприклад, у Патентах США №№: 6,534,261, 6,607,882, 6,746,838, 6,794,136, 6,824,978, 6,866,997, 6,933,113, 6,979,539, 7,013,219, 7,030,215, 7,220,719, 7,241,573, 7,241,574, 7,585,849, 7,595,376, 6,903,185 і 6,479,626, і всі вони певним чином включені за допомогою посилання. За допомогою додаткових роз'яснень і без обмеження, технологія штучного цинкового пальця (ZF) включає масиви модулів ZF для націлювання на нові ДНК-зв'язувальні сайти в геномі. Кожен модуль пальця в масиві ZF націлений на три основи ДНК. Спеціально створений масив окремих доменів цинкового пальця збирають у білок ZF (ZFP). ZFP можуть містити функціональний домен. Перші синтетичні цинк-пальцеві нуклеази (ZFN) були розроблені шляхом злиття білка ZF із каталітичним доменом рестрикційного ферменту типу IIS FokI. (Кім, Ю.Г. та ін., 1994, Химерна рестрикційна ендонуклеаза, *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 91, 883–887; Кім, Ю.Г. та ін., 1996, Гібридні рестрикційні ферменти: злиття цинкових пальців із доменом розщеплення Fok I. *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 93, 1156–1160). Підвищена специфічність розщеплення може бути досягнута зі зниженою нецілеспрямованою активністю за допомогою використання парних гетеродимерів ZFN, кожен з яких націлений на різні нуклеотидні послідовності, розділені коротким спейсером. (Дойон, Ю. та ін., 2011, Підвищення активності цинк-пальцевої нуклеази з поліпшеною облігатною гетеродимерною архітектурою. *Nat. Methods* 8, 74–79). ZFP також можуть бути сконструйовані як активатори й репресори транскрипції і використовуються для націлювання на велику кількість генів у різних організмів.

У певних варіантах виконання цього винаходу модифікація нуклеїнової кислоти здійснюється за допомогою (модифікованої) мегануклеази, яка є ендезоксирибонуклеазами, що характеризуються великим сайтом розпізнавання (послідовності дволанцюжкової ДНК з 12–40 пар основ). Ілюстративний спосіб використання мегануклеаз можна знайти в Патентах США №№: 8,163,514; 8,133,697; 8,021,867; 8,119,361; 8,119,381; 8,124,369 і 8,129,134, які певним чином включені за допомогою посилання.

У певних варіантах виконання цього винаходу модифікація нуклеїнової кислоти здійснюється за допомогою (модифікованого) комплексу або системи CRISPR/Cas. Що

стосується загальної інформації про системи CRISPR/Cas, їхні компоненти й доставляння таких компонентів, включно зі способами, матеріалами, засобами доставляння, векторами, частками, а також інформацією про їх отримання та використання, зокрема про кількість і склад, а також про Cas9CRISPR/Cas-експресувальні еукаріотичні клітини, Cas-9CRISPR/Cas-експресувальних еукаріотів, як-от у миші, то наведене посилання на: Патенти США №№: 8,999,641, 8,993,233, 8,697,359, 8,771,945, 8,795,965, 8,865,406, 8,871,445, 8,889,356, 8,889,418, 8,895,308, 8,906,616, 8,932,814, 8,945,839, 8,993,233 і 8,999,641; Патентні публікації США US 2014-0310830 (Реєстраційний номер заявки США 14/105,031), US 2014-0287938 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/213,991), US 2014-0273234 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/293,674), US2014-0273232 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/290,575), US 2014-0273231 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/259,420), US 2014-0256046 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/226,274), US 2014-0248702 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/258,458), US 2014-0242700 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/222,930), US 2014-0242699 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/183,512), US 2014-0242664 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/104,990), US 2014-0234972 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/183,471), US 2014-0227787 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/256,912), US 2014-0189896 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/105,035), US 2014-0186958 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/105,017), US 2014-0186919 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/104,977), US 2014-0186843 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/104,900), US 2014-0179770 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/104,837), US 2014-0179006 A1 (Реєстраційний номер заявки США 14/183,486), US 2014-0170753 (Реєстраційний номер заявки США 14/183,429); US 2015-0184139 (Реєстраційний номер заявки США 14/324,960); 14/054,414 Європейські патентні заявки EP 2 771 468 (EP13818570.7), EP 2 764 103 (EP13824232.6) та EP 2 784 162 (EP14170383.5); і Патентні публікації PCT WO 2014/093661 (PCT/US2013/074743), WO 2014/093694 (PCT/US2013/074790), WO 2014/093595 (PCT/US2013/074611), WO 2014/093718 (PCT/US2013/074825), WO 2014/093709 (PCT/US2013/074812), WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667), WO 2014/093635 (PCT/US2013/074691), WO 2014/093655 (PCT/US2013/074736), WO 2014/093712 (PCT/US2013/074819), WO 2014/093701 (PCT/US2013/074800), WO 2014/018423 (PCT/US2013/051418), WO 2014/204723 (PCT/US2014/041790), WO 2014/204724 (PCT/US2014/041800), WO 2014/204725 (PCT/US2014/041803), WO 2014/204726 (PCT/US2014/041804), WO 2014/204727 (PCT/US2014/041806), WO 2014/204728 (PCT/US2014/041808), WO 2014/204729 (PCT/US2014/041809), WO 2015/089351 (PCT/US2014/069897), WO 2015/089354 (PCT/US2014/069902), WO 2015/089364 (PCT/US2014/069925), WO 2015/089427 (PCT/US2014/070068), WO 2015/089462 (PCT/US2014/070127), WO 2015/089419 (PCT/US2014/070057), WO 2015/089465 (PCT/US2014/070135), WO 2015/089486 (PCT/US2014/070175), PCT/US2015/051691, PCT/US2015/051830. Також наведено посилання на попередні патентні заявки США 61/758,468; 61/802,174; 61/806,375; 61/814,263; 61/819,803 і 61/828,130, подані 30 січня 2013 року; 15 березня 2013 року; 28 березня 2013 року; 20 квітня 2013 року; 6 травня 2013 року і 28 травня 2013 року відповідно. Також наведено посилання на попередню патентну заявку США 61/836,123, подану 17 червня 2013 року. Додатково наведено посилання на попередні патентні заявки США 61/835,931, 61/835,936, 61/835,973, 61/836,080, 61/836,101 та 61/836,127, кожна з яких подана 17 червня 2013 року. Наведено ще одне посилання на попередні патентні заявки США 61/862,468 і 61/862,355, подані 5 серпня 2013 року; 61/871,301, подану 28 серпня 2013 року; 61/960,777, подану 25 вересня 2013 року, і 61/961,980, подану 28 жовтня 2013 року. Також наведено посилання на: PCT/US2014/62558, подану 28 жовтня 2014 року, і попередні патентні заявки США, Реєстраційні номери: 61/915,148, 61/915,150, 61/915,153, 61/915,203, 61/915,251, 61/915,301, 61/915,267, 61/915,260 та 61/915,397, кожна з яких подана 12 грудня 2013 року; 61/757,972 та 61/768,959, подані 29 січня 2013 року і 25 лютого 2013 року; 62/010,888 і 62/010,879, обидві подані 11 червня 2014 року; 62/010,329, 62/010,439 і 62/010,441, кожна з яких подана 10 червня 2014 року; 61/939,228 і 61/939,242, кожна з яких подана 12 лютого 2014 року; 61/980,012, подану 15 квітня 2014 року; 62/038,358, подану 17 серпня 2014 року; 62/055,484, 62/055,460 і 62/055,487, кожна з яких подана 25 вересня 2014 року; та 62/069,243, подану 27 жовтня 2014 року. Наведено посилання на заявку PCT, в якій указані, зокрема, Сполучені Штати, заявку № PCT/US14/41806, подану 10 червня 2014 року. Наведено посилання на попередню патентну заявку США 61/930,214, подану 22 червня 2014 року. Наведено посилання на заявку PCT, в якій указані, зокрема, Сполучені Штати, заявку № PCT/US14/41806, подану 10 червня 2014 року. Також згадується заявка США 62/180,709, 17 червня 2015 року, ЗАХИЩЕНІ НАПРЯМНІ РНК (PGRNA); Заявка США 62/091,455, подана 12 грудня 2014 року, ЗАХИЩЕНІ НАПРЯМНІ РНК (PGRNA); Заявка США 62/096,708, 24

грудня 1214 року, ЗАХИЩЕНІ НАПРЯМНІ РНК (PGRNA); Заявки США 62/091,462, 12 грудня 2014 року, 62/096,324, 23 грудня 2014 року, 62/180,681, 17 червня 2015 року та 62/237,496, 5 жовтня 2015 року, НЕАКТИВНІ НАПРЯМНІ ДЛЯ ФАКТОРІВ ТРАНСКРИПЦІЇ CRISPR; Заявка США 62/091,456, 12 грудня 2014 року і 62/180,692, 17 червня 2015 року, СУПРОВОДЖУВАНІ ТА

5 ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНІ НАПРЯМНІ ДЛЯ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/091,461, 12 грудня 2014 року, ДОСТАВЛЯННЯ, ВИКОРИСТАННЯ ТА ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ І КОМПОЗИЦІЙ CRISPR-CAS ДЛЯ РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМУ ЩОДО ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН (HSC); Заявка США 62/094,903, 19 грудня 2014 року, ОБ'ЄКТИВНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ДВОЛАНЦЮЖКОВИХ РОЗРИВІВ ТА ГЕНОМНА

10 ПЕРЕБУДОВА ЗА ДОПОМОГОЮ ПОВНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНУВАННЯ ЗАХОПЛЕНОЇ ІНСЕРЦІЇ; Заявка США 62/096,761, 24 грудня 2014 року, РОЗРОБКА СИСТЕМ, СПОСОБІВ ТА ОПТИМІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ, І НАПРЯМНИХ КАРКАСІВ ДЛЯ МАНІПУЛЯЦІЇ З ПОСЛІДОВНІСТЮ; Заявка США 62/098,059, 30 грудня 2014 року, 62/181,641, 18 червня 2015 року та 62/181,667, 18 червня 2015 року, СИСТЕМА НАЦІЛЮВАННЯ НА РНК; Заявка США

15 62/096,656, 24 грудня 2014 року і 62/181,151 від 17 червня 2015 року, CRISPR, ЩО МАЮТЬ АБО АСОЦІЙОВАНІ З ДЕСТАБІЛІЗУВАЛЬНИМИ ДОМЕНАМИ; Заявка США 62/096,697, 24 грудня 2014 року, CRISPR, ЩО МАЮТЬ АБО АСОЦІЙОВАНІ З AAV; Заявка США 62/098,158, 30 грудня 2014 року, РОЗРОБЛЕНІ ПРИЦІЛЬНІ ІНСЕРЦІЙНІ СИСТЕМИ КОМПЛЕКСУ CRISPR; Заявка США 62/151,052, 22 квітня 2015 року, КЛІТИННЕ НАЦІЛЮВАННЯ ДЛЯ СКЛАДАННЯ ДАНИХ

20 ЩОДО ПОЗАКЛІТИННИХ ЕКЗОСОМІВ; Заявка США 62/054,490, 24 вересня 2014 року, ДОСТАВЛЯННЯ, ВИКОРИСТАННЯ І ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ І КОМПОЗИЦІЙ CRISPR-CAS ДЛЯ НАЦІЛЮВАННЯ НА ПАТОЛОГІЇ ТА ЗАХВОРЮВАННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ КОМПОНЕНТІВ ДОСТАВЛЯННЯ ЧАСТИНОК; Заявка США 61/939,154, 12-ЕВ-14, СИСТЕМИ, СПОСОБИ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ МАНІПУЛЯЦІЇ З ПОСЛІДОВНІСТЮ ЗА

25 ДОПОМОГОЮ ОПТИМІЗОВАНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/055,484, 25 вересня 2014 року, СИСТЕМИ, СПОСОБИ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ МАНІПУЛЯЦІЇ З ПОСЛІДОВНІСТЮ ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТИМІЗОВАНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/087,537, 4 грудня 2014 року, СИСТЕМИ, СПОСОБИ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ МАНІПУЛЯЦІЇ З ПОСЛІДОВНІСТЮ ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТИМІЗОВАНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/054,651, 24 вересня 2014 року, ДОСТАВЛЯННЯ, ВИКОРИСТАННЯ І ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ ТА КОМПОЗИЦІЙ CRISPR-CAS ДЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ КОНКУРЕНЦІЇ МНОЖИННИХ МУТАЦІЙ РАКУ В УМОВАХ IN VIVO; Заявка США 62/067,886, 23 жовтня 2014 року, ДОСТАВЛЯННЯ, ВИКОРИСТАННЯ ТА ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ І КОМПОЗИЦІЙ CRISPR-CAS ДЛЯ

35 МОДЕЛЮВАННЯ КОНКУРЕНЦІЇ МНОЖИННИХ МУТАЦІЙ РАКУ В УМОВАХ IN VIVO; Заявки США 62/054,675, 24 вересня 14 року і 62/181,002, 17 червня 2015 року, ДОСТАВЛЯННЯ, ВИКОРИСТАННЯ І ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ ТА КОМПОЗИЦІЙ CRISPR-CAS В НЕЙРОНАХ/ТКАНИНАХ; Заявка США 62/054,528, 24 вересня 2014 року, ДОСТАВЛЯННЯ, ВИКОРИСТАННЯ ТА ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ І

40 КОМПОЗИЦІЙ CRISPR-CAS У РАЗІ ІМУННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ АБО ПАТОЛОГІЙ; Заявка США 62/055,454, 25 вересня 2014 року, ДОСТАВЛЯННЯ, ВИКОРИСТАННЯ ТА ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СИСТЕМ І КОМПОЗИЦІЙ CRISPR-CAS ДЛЯ НАЦІЛЮВАННЯ НА ПАТОЛОГІЇ ТА ЗАХВОРЮВАННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ПЕПТИДІВ, ЩО ПРОНИКАЮТЬ У КЛІТИНИ (CPR); Заявка США 62/055,460, 25 вересня 2014 року, БАГАТОФУНКЦІОНАЛЬНІ КОМПЛЕКСИ CRISPR ТА/АБО ОПТИМІЗОВАНІ, ЗЧЕПЛЕНІ З ФЕРМЕНТАМИ ФУНКЦІОНАЛЬНІ КОМПЛЕКСИ CRISPR; Заявка США 62/087,475, 4 грудня 2014 року і 62/181,690, 18 червня 2015 року, ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СКРИНІНГ ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТИМІЗОВАНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/055,487, 25 вересня 2014 року, ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СКРИНІНГ ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТИМІЗОВАНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/087,546, 4 грудня 2014 року і 62/181,687, 18 червня 2015 року, БАГАТОФУНКЦІОНАЛЬНІ КОМПЛЕКСИ CRISPR ТА/АБО ОПТИМІЗОВАНІ, ЗЧЕПЛЕНІ З ФЕРМЕНТАМИ ФУНКЦІОНАЛЬНІ КОМПЛЕКСИ CRISPR; і заявка США 62/098,285, 30 грудня 2014 року, CRISPR-ОПОСЕРЕДКОВАНЕ МОДЕЛЮВАННЯ В УМОВАХ IN VIVO ТА ГЕНЕТИЧНИЙ СКРИНІНГ ЗРОСТАННЯ ПУХЛИНИ ТА МЕТАСТАЗІВ. Згадуються заявки США 62/181,659, 18 червня 2015 року та 62/207,318, 19 серпня 2015 року, РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ СИСТЕМ, СПОСОБІВ, ФЕРМЕНТІВ І НАПРЯМНИХ КАРКАСІВ ОРТОЛОГІВ CAS9 І ВАРІАНТІВ ДЛЯ МАНІПУЛЯЦІЇ З ПОСЛІДОВНІСТЮ. Згадуються заявки США 62/181,663, 18 червня 2015 року та 62/245,264, 22 жовтня 2015 року, НОВІ ФЕРМЕНТИ І СИСТЕМИ CRISPR, заявки США 62/181,675, 18 червня 2015 року та справа патентного реєстру за № 46783.01.2128, подана 22 жовтня 2015 року, НОВІ ФЕРМЕНТИ ТА СИСТЕМИ CRISPR, заявка США 62/232,067,

60

24 вересня 2015 року, заявка США 62/205,733, 16 серпня 2015 року, заявка США 62/201,542, 5 серпня 2015 року, заявка США 62/193,507, 16 липня 2015 року та заявка США 62/181,739, 18 червня 2015 року, кожна з яких має назву "НОВІ ФЕРМЕНТИ ТА СИСТЕМИ CRISPR", і заявка США 62/245,270, 22 жовтня 2015 року, НОВІ ФЕРМЕНТИ І СИСТЕМИ CRISPR. Згадуються також заявки США 61/939,256 від 12 лютого 2014 року і WO 2015/089473 (PCT/US2014/070152) від 12 грудня 2014 року, кожна з яких має назву "РОЗРОБКА СИСТЕМ, СПОСОБІВ ТА ОПТИМІЗОВАНИХ НАПРЯМНИХ КОМППОЗИЦІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ НОВИХ АРХІТЕКТУР ДЛЯ МАНІПУЛЯЦІЇ З ПОСЛІДОВНІСТЮ". Згадуються також PCT/US2015/045504, 15 серпня 2015 року, заявка США 62/180,699, 17 червня 2015 року та заявка США 62/038,358, 17 серпня 2014 року, кожна з яких має назву "РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМА З ВИКОРИСТАННЯМ НІКАЗ CAS9". Європейська патентна заявка EP3009511. Також наведено посилання на роботу "Мультиплексна геномна інженерія з використанням систем CRISPR/Cas". Конг, Л., Рен, Ф.А., Кокс, Д., Лін, С., Барретто, Р., Хабіб, Н., Сюй, П.Д., Ву, Х., Цзян, В., Марраффіні, Л.А. та Чжан, Ф. *Science*, 15 лютого; 339(6121):819-23 (2013); РНК-спрямовуване редагування бактеріальних геномів із використанням систем CRISPR-Cas. Цзян В., Бікард Д., Кокс Д., Чжан Ф., Марраффіні, Л.А. *Nat Biotechnol*, березень; 31(3):233-9 (2013); Одноетапне генерування мишей, що несуть мутації в безлічі генів, за допомогою CRISPR/Cas-опосередкованої геномної інженерії. Ван Х., Ян Х., Шиваліла К.С., Давлаті М.М., Ченг А.В., Чжан Ф., Єніш Р. *Cell*, 9 травня; 153(4): 910-8 (2013); Оптичний контроль за ендегенною транскрипцією та епігенетичними станами ссавців. Конерманн С., Брігхем М.Д., Тревіно А.Е., Сюй П.Д., Хайденрайх М., Конг Л., Платт Р.Дж., Скотт Д.А., Черч Г.М., Чжан Ф. *Nature*. 2013, 22 серпня; 500(7463): 472-6. ідентифікатор цифрового об'єкта (doi): 10.1038/Nature12466. Електронна публікація 23 серпня 2013 року; Подвійне нікування за допомогою РНК-спрямованого Cas9 CRISPR для підвищеної специфічності редагування генома. Рен, Ф.А., Сюй, П.Д., Лін, С.Ю., Гутенберг, Дж.С., Конерманн, С., Тревіно, А.Е., Скотт, Д.А., Іноуе, А., Мато́ба, С., Чжан, Ю. і Чжан Ф. *Cell*, 28 серпня. унікальний ідентифікатор, застосовуваний видавництвом для ідентифікації наукових робіт (pii): S0092-8674(13)01015-5. (2013); Специфічність націлювання на ДНК РНК-спрямовуваних нуклеаз Cas9. Сюй, П., Скотт, Д., Вайнштейн, Дж., Рен, Ф.А., Конерманн, С., Агарвала, В., Лі, Ю., Файн, Е., Ву, Х., Шалем, О., Крадік, Т.Дж., Марраффіні, Л.А., Бао, Г. та Чжан, Ф. *Nat Biotechnol* doi: 10.1038/nbt.2647 (2013); Геномна інженерія з використанням системи CRISPR-Cas9. Рен, Ф.А., Сюй, П.Д., Райт, Дж., Агарвала, В., Скотт, Д.А., Чжан, Ф., *Nature Protocols*, листопад; 8(11): 2281-308. (2013); Повногеномний скринінг нокаутів CRISPR-Cas9 у клітинах людини. Шалем О., Санджана, Нью-Йорк, Хартеніан, Е., Ши, Х., Скотт, Д.А., Міккельсон, Т., Хекл, Д., Еберт, Б.Л., Рут, Д.Е., Доенч, Дж.Г., Чжан, Ф. *Science*, 12 грудня. (2013). [Електронна публікація до друку]; Кристалічна структура cas9 у комплексі з напрямною РНК і ДНК-мішенню. Нісімасу, Х., Рен, Ф.А., Сюй, П.Д., Конерманн, С., Шехата, С.І., Дохма, Н., Ішітани, Р., Чжан, Ф., Нурекі, О. *Cell* 27 лютого. (2014). 156(5): 935-49; Повногеномне зв'язування ендонуклеази Cas9 системи CRISPR у клітинах ссавців. Ву Х., Скотт Д.А., Криз А.Дж., Чиу А.С., Сюй П.Д., Дадон Д.Б., Ченг А.В., Тревіно А.Е., Конерманн С., Чен С., Єніш Р., Чжан, Ф., Шарп П.А. *Nat Biotechnol*. (2014 року) 20 квітня. doi: 10.1038/nbt.2889; Нокін CRISPR-Cas9 мишей для редагування генома та моделювання раку, Платт та ін., *Cell* 159(2): 440–455 (2014) DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.014; Розробка та застосування CRISPR-Cas9 для геномної інженерії, Сюй та ін., *Cell* 157, 1262–1278 (5 червня 2014 року) (Сюй 2014 року); Генетичні екрани в клітинах людини з використанням системи CRISPR/Cas9, Ван та ін., *Science*. 2014 року, 3 січня; 343(6166): 80–84. doi: 10.1126/science.1246981; Раціональна конструкція високоактивних sgРНК для CRISPR-Cas9-опосередкованої інактивації генів, Доенч та ін., *Nature Biotechnology* 32(12):1262-7 (2014 року), опубліковано онлайн 3 вересня 2014 року; doi: 10.1038/nbt.3026, і Дослідження функції генів у мозку ссавців в умовах *in vivo* з використанням системи CRISPR-Cas9, Свіч та ін., *Nature Biotechnology* 33, 102-106 (2015), опубліковано онлайн 19 жовтня 2014 року; doi: 10.1038/nbt.3055, Cpf1 – це єдина РНК-спрямовувана ендонуклеаза системи CRISPR-Cas класу 2, Цетше та ін., *Cell* 163, 1–13 (2015); Відкриття та функціональна характеристика різноманітних систем CRISPR-Cas класу 2, Шмаков та ін., *Mol Cell* 60 (3): 385–397 (2015); C2c2 – це однокомпонентний, програмований, РНК-спрямовуваний, націлений на РНК, ефектор CRISPR, Абудаїе та ін., *Science* (2016) опубліковано онлайн 2 червня 2016 року doi: 10.1126/science.aaf5573. Кожна з цих публікацій, патентів, патентних публікацій і заявок, а також усі документи, цитовані в них або в діловодстві за ними ("документи, цитовані в заявці"), і всі документи, цитовані або які приводяться як посилання в документах, цитованих у заявці, разом із будь-якими інструкціями, описами, специфікаціями продуктів і паспортами продуктів щодо будь-яких продуктів, згаданих у них або в будь-якому з таких документів, і включені до цього документа як посилання, вважаються включеними до цього документа як посилання і можуть

використовуватися для здійснення цього винаходу. Усі документи (наприклад, ці патенти, патентні публікації і заявки, а також документи, цитовані в заявці), включені до цього документа як посилання тією ж мірою, якби кожен окремих документ був певним чином і окремо зазначений як включений як посилання.

У певних варіантах виконання цього винаходу система або комплекс CRISPR/Cas є системою CRISPR/Cas класу 2. У певних варіантах виконання цього винаходу згадана система або комплекс CRISPR/Cas є системою або комплексом CRISPR/Cas типу II, типу V або типу VI. Система CRISPR/Cas не вимагає генерації спеціально створених білків для націлювання на специфічні послідовності, але швидше одиночний білок Cas може бути запрограмований напрямною РНК (gРНК) для розпізнавання специфічної нуклеїнової кислоти-мішені, іншими словами, ферментний білок Cas може бути рекрутованим у локус, що становить інтерес, специфічної нуклеїнової кислоти-мішені (який може містити або складатися з РНК та/або ДНК) з використанням згаданої короткої прямої РНК.

Загалом система CRISPR/Cas або CRISPR, у контексті вищезгаданих документів, у сукупності належить до транскриптів та інших елементів, які беруть участь в експресії або спрямовують активність CRISPR-асоційованих ("Cas") генів, включно з послідовностями, що кодують ген Cas і щонайменше одну з таких: tracr (транскриптувальну CRISPR) послідовність (наприклад, tracrРНК або активну часткову tracrРНК), tracr-mate (напарницю транскриптувальної) послідовність (що охоплює "прямий повтор" і частковий прямий повтор, процесований tracrРНК, у контексті ендогенної системи CRISPR), яка спрямовує послідовність (також відому як "спейсер" у контексті ендогенної системи CRISPR) або "РНК", у тому сенсі, у якому цей термін використовується в цьому документі (наприклад, РНК, що слугують для спрямовування Cas, як-от Cas9, наприклад, РНК CRISPR, і там, де це може бути застосовано, транскриптувальну (tracr) РНК або одиночну пряму РНК (sgРНК) (химерну РНК)), або інші послідовності та транскрипти з локусу CRISPR. Загалом система CRISPR характеризується елементами, які сприяють утворенню комплексу CRISPR у сайті послідовності-мішені (також званої протоспейсером у контексті ендогенної системи CRISPR). У контексті формування комплексу CRISPR термін "послідовність-мішень" стосується послідовності, для якої сконструйована пряма послідовність для комплементарності, водночас гібридизація між послідовністю-мішенню і прямою послідовністю сприяє утворенню комплексу CRISPR. Послідовність-мішень може містити будь-який полінуклеотид, наприклад полінуклеотиди ДНК або РНК.

У певних варіантах виконання цього винаходу gРНК є химерною прямою РНК або одиночною прямою РНК (sgРНК). У певних варіантах виконання цього винаходу gРНК містить пряму послідовність і tracr-mate послідовність (або прямий повтор). У певних варіантах виконання цього винаходу gРНК містить пряму послідовність, tracr-mate послідовність (або прямий повтор) і tracr послідовність. У певних варіантах виконання цього винаходу система або комплекс CRISPR/Cas, описані в цьому документі, не містить та/або не залежить від наявності tracr послідовності (наприклад, якщо білок Cas є Cpf1).

У контексті цього документа термін sgРНК або "пряма РНК", або "одиночна пряма РНК", або "sgРНК", або "щонайменше один компонент нуклеїнової кислоти" ефекторного білка локусу CRISPR/Cas у разі потреби містить будь-яку полінуклеотидну послідовність, що має достатню компліментарність із послідовністю нуклеїнової кислоти-мішенню, для гібридизації з послідовністю нуклеїнової кислоти-мішенню і для прямого сиквенс-специфічного зв'язування комплексу, націленого на нуклеїнову кислоту, з послідовністю нуклеїнової кислоти-мішенню. У деяких варіантах виконання цього винаходу ступінь комплементарності за оптимального вирівнювання з використанням відповідного алгоритму вирівнювання становить близько або понад 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97,5 %, 99 % або більше. Оптимальне вирівнювання може бути визначено з використанням будь-якого відповідного алгоритму для вирівнювання послідовностей, необмежувальний приклад якого включає алгоритм Сміта-Уотермана, алгоритм Нідлман-Вунша, алгоритми, засновані на перетворенні Барроуза-Уїлера (наприклад, вирівнювач Барроуза-Уїлера), програми для множинного вирівнювання послідовностей ClustalW, ClustalX, BLAST, Novoalign (Novocraft Technologies; доступно за адресою www.novocraft.com), ELAND (Illumina, Сан-Дієго, Каліфорнія), SOAP (доступно за адресою soap.genomics.org.cn) і Maq (доступно за адресою maq.sourceforge.net). Здатність прямої послідовності (у межах прямої РНК, націленої на нуклеїнову кислоту) спрямовувати сиквенс-специфічне зв'язування комплексу, націленого на нуклеїнову кислоту, до послідовності нуклеїнової кислоти-мішені може бути оцінена за допомогою будь-якого відповідного кількісного аналізу.

Напрямна послідовність, а отже, прямна РНК, націлена на нуклеїнову кислоту, можуть бути вибрані для націлювання на будь-яку послідовність нуклеїнової кислоти-мішені. Послідовністю-мішенню може бути ДНК. Послідовністю-мішенню може бути геномна ДНК. Послідовністю-мішенню може бути мітохондріальна ДНК. Послідовністю-мішенню може бути
 5 будь-яка послідовність РНК. У деяких варіантах виконання цього винаходу послідовністю-мішенню може бути послідовність, що перебуває в межах молекули РНК, вибраної з групи, що складається з інформаційної РНК (mРНК), попередника mРНК (pre-mРНК), рибосомної РНК (rРНК), транспортної РНК (tРНК), мікро-РНК (miРНК), малої інтерферувальної РНК (siРНК), малої ядерної РНК (snРНК), малої ядерцевої РНК (snoРНК), дволанцюжкової РНК (dsРНК), некодувальної РНК (ncРНК), довгої некодувальної РНК (lncРНК) та малої цитоплазматичної РНК (scРНК).
 10 У деяких переважних варіантах виконання цього винаходу послідовністю-мішенню може бути послідовність, що перебуває в межах молекули РНК, вибраної з групи, що складається з mРНК, pre-mРНК і rРНК. У деяких переважних варіантах виконання цього винаходу послідовністю-мішенню може бути послідовність, що перебуває в межах молекули РНК, вибраної з групи, що складається з ncРНК і lncРНК. У деяких більш переважних варіантах виконання цього винаходу послідовністю-мішенню може бути послідовність, що перебуває в межах молекули mРНК або молекули pre-mРНК.

У певних варіантах виконання цього винаходу gРНК містить петлю стебла, у переважному варіанті виконання цього винаходу – одиночну петлю стебла. У певних варіантах виконання цього винаходу послідовність прямого повтору формує петлю стебла, у переважному варіанті виконання цього винаходу – одиночну петлю стебла. У певних варіантах виконання цього винаходу довжина спейсера напрямної РНК становить від 15 до 35 нуклеотидів. У певних варіантах виконання цього винаходу довжина спейсера напрямної РНК становить щонайменше 15 нуклеотидів. У певних варіантах виконання цього винаходу довжина спейсера становить від
 25 15 до 17 нуклеотидів, наприклад, 15, 16 або 17 нуклеотидів, від 17 до 20 нуклеотидів, наприклад, 17, 18, 19 або 20 нуклеотидів, від 20 до 24 нуклеотидів, наприклад, 20, 21, 22, 23 або 24 нуклеотидів, від 23 до 25 нуклеотидів, наприклад, 23, 24 або 25 нуклеотидів, від 24 до 27 нуклеотидів, наприклад, 24, 25, 26 або 27 нуклеотидів, від 27 до 30 нуклеотидів, наприклад, 27, 28, 29 або 30 нуклеотидів, від 30 до 35 нуклеотидів, наприклад, 30, 31, 32, 33, 34 або 35 нуклеотидів, або 35 нуклеотидів, або більше. У конкретних варіантах виконання цього винаходу система CRISPR/Cas вимагає наявності tracrРНК. Послідовність "tracrРНК" або аналогічні терміни включають будь-яку полінуклеотидну послідовність, яка володіє компліментарністю із послідовністю crРНК, достатньою для гібридизації. У деяких варіантах виконання цього винаходу ступінь комплементарності між послідовністю tracrРНК і послідовністю crРНК за
 35 довжиною коротшої з двох за оптимального вирівнювання становить близько або більше, близько 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97,5 %, 99 % або вище. У деяких варіантах виконання цього винаходу tracr послідовність становить близько або більше 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 або більше нуклеотидів у довжину. У деяких варіантах виконання цього винаходу tracr послідовність і послідовність gРНК містяться в межах одного транскрипту, таким чином, унаслідок гібридизації між ними утворюється транскрипт, який має вторинну структуру, як-от шпилька. В одному варіанті виконання цього винаходу, транскрипт або транскрибована полінуклеотидна послідовність має щонайменше дві шпильки. У переважних варіантах виконання цього винаходу транскрипт має дві, три, чотири або п'ять шпильок. В іншому варіанті виконання цього винаходу транскрипт має не більше п'яти шпильок. У шпилькової структурі ділянка послідовності 5' кінцевого "N" і вище петлі може відповідати tracr-mate послідовності, а ділянка послідовності 3' петлі, отже, відповідає tracr послідовності. У шпильковій структурі ділянка послідовності 5' кінцевого "N" і та, що розташована вище петлі, може, в альтернативному варіанті виконання цього винаходу, відповідати tracr послідовності, а ділянка послідовності 3' петлі відповідає tracr-mate
 45 послідовності. В альтернативних варіантах виконання цього винаходу для системи CRISPR/Cas не потрібна tracrРНК, що відомо фахівцям в цій області техніки.

У певних варіантах виконання цього винаходу прямна РНК (здатна спрямовувати Cas до локусу-мішені) може містити (1) пряму послідовність, здатну гібридизуватися з локусом-мішенню, і (2) tracr-mate послідовність або послідовність прямого повтору (в орієнтації від 5' до 3' або, в альтернативному варіанті виконання цього винаходу, в орієнтації від 3' до 5', залежно від типу білка Cas, що відомо фахівцям в цій області техніки). У конкретних варіантах виконання цього винаходу білок CRISPR/Cas характеризується тим, що він використовує пряму РНК, яка містить пряму послідовність, здатну гібридизуватися з локусом-мішенню та послідовністю прямого повтору, і йому не потрібна tracrРНК. У конкретних варіантах виконання
 50 цього винаходу, водночас, білок CRISPR/Cas характеризується тим, що він використовує

tracrPНК, а напрямна послідовність, tracr-mate послідовність і tracr послідовність можуть перебувати в одиночній РНК, тобто в sgРНК (розташовані в орієнтації від 5' до 3' або, в альтернативному варіанті виконання цього винаходу, розташовані в орієнтації від 3' до 5'), або tracr РНК може бути РНК, відмінною від РНК, що містить напрямну і tracr-mate послідовність. У

5 цих варіантах виконання цього винаходу tracr послідовність гібридизується з tracr-mate послідовністю і спрямовує комплекс CRISPR/Cas до послідовності-мішені.

Зазвичай у контексті ендогенної системи, націленої на нуклеїнову кислоту, утворення комплексу, націленого на нуклеїнову кислоту (який містить напрямну РНК, гібридизовану з послідовністю-мішенню та входить до складу щонайменше одного ефекторного білка, націленого на нуклеїнову кислоту), призводить до модифікації (наприклад, до розщеплення)

10 одного або обох ланцюгів ДНК або РНК, що розташовані в межах або поруч (наприклад, у межах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 або більше пар основ) із послідовністю-мішенню. У контексті цього документа термін "послідовність(ості)", асоційована з локусом-мішенню, що становить інтерес" стосується послідовностей, які розташовані поруч із послідовністю-мішенню

15 (наприклад, у межах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 або більше пар основ від послідовності-мішені, водночас послідовність-мішень міститься в локусі-мішені, що становить інтерес). Фахівцevi в цій області техніки відомі специфічні сайти розрізу, призначені для вибраних систем CRISPR/Cas, щодо послідовності-мішені, яка, як це відомо в цій області техніки, може перебувати в межах послідовності-мішені або, в альтернативному варіанті виконання цього

20 винаходу, в орієнтації 3' або 5' послідовності-мішені.

У деяких варіантах виконання цього винаходу немодифікований ефекторний білок, націлений на нуклеїнову кислоту, може володіти активністю розщеплення нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах виконання цього винаходу, нуклеаза, як описано в цьому документі, може спрямовувати розщеплення одного або обох ланцюгів нуклеїнових кислот (ДНК, РНК або

25 гібридів, які можуть бути одно- або дволанцюжковими) у місці розташування або поруч із послідовністю-мішенню, наприклад, у межах послідовності-мішені та/або в межах комплементу послідовності-мішені, або в послідовностях, асоційованих із послідовністю-мішенню. У деяких варіантах виконання цього винаходу ефекторний білок, націлений на нуклеїнову кислоту, може спрямовувати розщеплення одного або обох ланцюгів ДНК або РНК, що перебувають у межах

30 приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500 або більше пар основ від першого або останнього нуклеотиду послідовності-мішені. У деяких варіантах виконання цього винаходу розщеплення може бути тупим (наприклад, для Cas9, як-от SaCas9 або SpCas9). У деяких варіантах виконання цього винаходу розщеплення може бути ступінчастим (наприклад, для Cpf1), тобто з генеруванням липких кінців. У деяких варіантах виконання цього винаходу розщеплення є ступінчастим розрізом із 5' нуклеотидами, які виступають. У деяких варіантах виконання цього винаходу розщеплення є ступінчастим розрізом з 5' нуклеотидами, що виступають, у кількості від 1 до 5 нуклеотидів, у переважному варіанті виконання цього винаходу – 4 або 5 нуклеотидів. У деяких варіантах виконання цього винаходу сайт розщеплення розташований вище РАМ. У деяких варіантах виконання цього винаходу сайт розщеплення розташований нижче РАМ. У деяких варіантах виконання цього винаходу

40 ефекторний білок, націлений на нуклеїнову кислоту, який може бути мутованим щодо відповідного ферменту дикого типу таким чином, що мутований ефекторний білок, націлений на нуклеїнову кислоту, буде позбавлений здатності розщеплювати один або обидва ланцюги ДНК або РНК полінуклеотиду-мішені, що містить послідовність-мішень. Як додатковий приклад, щонайменше два каталітичних домени білка Cas9 (наприклад, RuvC I, RuvC II та RuvC III або домен HNH білка Cas9) можуть бути мутованими для продукування мутованого білка Cas9, по суті, цілковито позбавленого активності розщеплення ДНК. У деяких варіантах виконання цього винаходу можна вважати, що ефекторний білок, націлений на нуклеїнову кислоту, по суті, цілковито позбавлений активності розщеплення ДНК та/або РНК, коли активність розщеплення

45 ДНК мутованого ферменту становить не більше 25 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % або менше активності розщеплення нуклеїнової кислоти немутованої форми ферменту; прикладом може слугувати випадок, коли активність розщеплення нуклеїнової кислоти мутованої форми є нульовою або незначною, порівняно з немутованою формою.

У контексті цього документа термін "модифікований" Cas зазвичай стосується білка Cas, що має щонайменше одну модифікацію або мутацію (включно з точковими мутаціями, усіканнями, інсерціями, делеціями, химерами, білками злиття тощо), порівняно з білком Cas дикого типу, з якого він отриманий. Термін "отриманий" означає, що отриманий фермент значною мірою заснований, у сенсі володіння високим ступенем гомології послідовностей, на ферменті дикого типу, але був мутований (модифікований) будь-яким чином, відомим у цій області техніки або

60 описаним у цьому документі.

У конкретному варіанті виконання цього винаходу мутований ефекторний білок, націлений на нуклеїнову кислоту, заснований на системі CRISPR, як описано вище, який позбавлений здатності розщеплювати один або обидва ланцюги ДНК або РНК полінуклеотиду-мішені, що містить послідовність-мішень, може бути злитий з іншими інструментами, як-от інші нуклеази, нікази, рекомбінази, транспозази, редактори основи або молекулярні комплекси, які включають ці інструменти. Термін "редактор основи", у контексті цього документа, стосується білка або його фрагмента, що володіє тією ж каталітичною активністю, що й білок, із якого він отриманий, водночас білок або його фрагмент, сам по собі або коли він запропонований у вигляді молекулярного комплексу, названого в цьому документі комплексом редагування основи, має здатність опосередковувати цілеспрямовану модифікацію основи, тобто перетворювати основу, що становить інтерес, що призводить до точкової мутації, що становить інтерес. У переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше один редактор основи, у контексті цього винаходу, тимчасово або постійно зчеплений щонайменше з одним сайт-специфічним ефектором або необов'язково з компонентом щонайменше одного сайт-специфічного ефекторного комплексу (наприклад, з доменом розпізнавання ДНК системи CRISPR, з цинковим пальцем або TAL-ефекторами). Зчеплення може бути ковалентним та/або нековалентним.

У численних публікаціях показано цілеспрямоване перетворення основи, насамперед цитидину (C) на тимін (T), із використанням нікази CRISPR/Cas9 або нефункціональної нуклеази, зчепленої з доменом цитидиндезамінази, каталітичним поліпептидом, який редагує mРНК Аполіпопротеїну В (APOBEC1), наприклад, з APOBEC, отриманим у щура. Дезамінування цитозину (C) каталізується цитидиндезаміназами й призводить до утворення урацилу (U), який має властивості спаровування основ тиміну (T). Більшість відомих цитидиндезаміназ впливають на РНК, і відомо кілька прикладів, коли приймається ДНК, у якій потрібна одноланцюжкова (ss) ДНК. Дослідження комплексу dCas9-ДНК-мішень свідчать, що щонайменше дев'ять нуклеотидів (nt) витісненого ланцюга ДНК не спаровуються під час утворення комплексу Cas9-напрямна РНК-Р-петля ДНК (Джор та ін., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 529-536 (2011)). Дійсно, у структурі комплексу Cas9 R-петля перші 11 nt (нуклеотидів) протоспейсера на витісненому ланцюгу ДНК невпорядковані, а це говорить про те, що їхній рух не дуже обмежений. Також було висловлено припущення про те, що мутації, індуковані ніказою Cas9, у цитозин у нематричному ланцюжку можуть виникати через їхню доступність для клітинних ферментів цитозиндезамінази. На нашу думку, підмножина цього подовження ssДНК в R-петлі могла б слугувати ефективним субстратом для dCas9-прив'язаної цитидиндезамінази для здійснення безпосереднього програмованого перетворення C на U в ДНК (див. вище, Комор та ін.). Recently, Гоуделлі та ін. (2017). Програмоване редагування основи А•Т в G•С в геномній ДНК без розщеплення ДНК. У журналі *Nature*, 551(7681), 464.) описані редактори основи аденіну (ABE), які опосередковують перетворення А•Т на G•С в геномній ДНК.

Будь-який комплекс редагування основи за цим винаходом може, таким чином, містити щонайменше одну цитидиндезаміназу або її каталітично активний фрагмент. Щонайменше один комплекс редагування основи може містити цитидиндезаміназу або її домен у вигляді каталітично активного фрагмента в якості редактора основи.

В іншому варіанті виконання цього винаходу щонайменше одна перша цілеспрямована модифікація основи є перетворенням будь-якого нуклеотиду C, A, T або G на будь-який інший нуклеотид. Будь-який з нуклеотидів C, A, T або G можна обміняти сайт-спрямованим способом, опосередкованим редактором основи або його каталітично активним фрагментом, на інший нуклеотид. Таким чином, щонайменше один комплекс редагування основи може містити будь-який редактор основи або домен редактора основи, або його каталітично активний фрагмент, який може перетворювати нуклеотид, що становить інтерес, на будь-який інший нуклеотид, що становить інтерес, у цілеспрямований спосіб.

У певних варіантах виконання цього винаходу послідовність-мішень для системи CRISPR/Cas має бути асоційована з PAM (мотив, що прилягає до протоспейсера) або PFS (фланкувальна послідовність протоспейсера або сайт); тобто з короткою послідовністю, яка розпізнається комплексом CRISPR. Вимоги до точності й довжини послідовностей для PAM розрізняються залежно від використовуваного ферменту CRISPR, але PAM зазвичай є послідовностями з 2–5 пар основ, що прилягають до протоспейсера (тобто до послідовності-мішені). Приклади послідовностей PAM наведено в розділі прикладів нижче, а фахівець у цій області техніки зможе ідентифікувати інші послідовності PAM для використання з цим ферментом CRISPR. Крім того, розробка домену взаємодії з PAM (PI) може дати змогу програмувати специфічність PAM, підвищити точність розпізнавання сайту-мішені й підвищити універсальність Cas, як-от Cas9, платформи геномної інженерії. Білки Cas, як-от білки Cas9, можуть бути розроблені для зміни їхньої PAM-специфічності, наприклад як описано в роботі

Клейнстівер Б.П. та ін. Розроблені нуклеази CRISPR-Cas9 зі зміненою PAM-специфічністю. *Nature*. 2015, 23 липня;523(7561):481-5. doi: 10.1038/nature14592. У деяких варіантах виконання цього винаходу спосіб містить можливість зв'язування комплексу CRISPR з полінуклеотидом-мішенню для здійснення розщеплення згаданого полінуклеотиду-мішені, модифікуючи тим самим полінуклеотид-мішень, водночас комплекс CRISPR містить фермент CRISPR, зв'язаний у комплекс із напрямною послідовністю, гібридизованою з послідовністю-мішенню в межах згаданого полінуклеотиду-мішені, водночас згадана напрямна послідовність зчеплена з tracr-mate послідовністю, яка, своєю чергою, гібридизується з tracr послідовністю. Фахівець у цій області техніки зрозуміє, що інші білки Cas можуть бути модифіковані аналогічним чином.

Білок Cas, згаданий у цьому документі, наприклад, без обмеження Cas9, Cpf1 (Cas12a), C2c1 (Cas12b), C2c2 (Cas13a), C2c3, Cas13b, може походити з будь-якого відповідного джерела і, отже, може включати різні ортологи, що походять із безлічі (прокаріотичних) організмів, що повною мірою документально підтверджено в цій області техніки. У певних варіантах виконання цього винаходу – (модифікованим) *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) або (модифікованим) *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9). У певних варіантах виконання цього винаходу білок Cas є (модифікованим) Cpf1, у переважному варіанті виконання цього винаходу – *Acidaminococcus* sp., як-от *Acidaminococcus* sp. BV3L6 Cpf1 (AsCpf1) або *Lachnospiraceae* bacterium Cpf1, як-от *Lachnospiraceae* bacterium MA2020 або *Lachnospiraceae* bacterium MD2006 (LbCpf1). У певних варіантах виконання цього винаходу білок Cas є (модифікованим) C2c2, у переважному варіанті виконання цього винаходу – *Leptotrichia wadei* C2c2 (LwC2c2) або *Listeria newyorkensis* FSL M6-0635 C2c2 (LbFSLC2c2). У певних варіантах виконання цього винаходу (модифікований) білок Cas є C2c1. У певних варіантах виконання цього винаходу (модифікований) білок Cas є C2c3. У певних варіантах виконання цього винаходу (модифікований) білок Cas є Cas13b.

У певних варіантах виконання цього винаходу модифікація нуклеїнової кислоти здійснюється випадковим мутагенезом. Клітини або організми можуть піддаватися впливу мутагенів, як-от УФ-випромінювання або мутагенні хімічні речовини (наприклад, як-от етилметансульфонат (EMS)), а потім відбирають мутантів з бажаними характеристиками. Наприклад, мутантів можна ідентифікувати за допомогою TILLING (Націлювання на індуковані локальні пошкодження в геномах). Цей метод поєднує в собі мутагенез, як-от мутагенез із використанням хімічного мутагену, як-от етилметансульфонат (EMS), і метод скринінгу, чутливого до ДНК, який ідентифікує мутації з однією основою / точкові мутації в гені-мішені. Метод TILLING заснований на утворенні гетеродуплексів ДНК, які утворюються, коли безліч алелів ампліфікують за допомогою PCR, а потім нагрівають і повільно охолоджують. У разі розбіжності двох ланцюгів ДНК утворюється "бульбашка", яка потім розщеплюється одноланцюжковими нуклеазами. Потім продукти розділяють за розміром, наприклад за допомогою ВЕРХ. Див. також Маккаллум та ін. "Скринінг, націлений на індуковані мутації"; *Nat Biotechnol.* 2000, квітень; 18 (4):455-7, і Маккаллум та ін. "Націлювання на індуковані локальні пошкодження в геномах (TILLING) для функціональної геноміки рослин"; *Plant Physiol.* 2000, червень; 123(2):439-42.

РНК-інтерференція (РНКі) – це біологічний процес, під час якого молекули РНК інгібують експресію або трансляцію генів, нейтралізуючи молекули-мішені mРНК. Два типи малих молекул рибонуклеїнової кислоти (РНК) – мікро-РНК (miРНК) і мала інтерферувальна РНК (siRNA) – є центральними для РНК-інтерференції. РНК є безпосередніми продуктами генів, і ці малі РНК можуть зв'язуватися з іншими специфічними молекулами інформаційної РНК (mРНК) та або підвищувати, або знижувати їхню активність, наприклад запобігаючи трансляції mРНК в білок. Шлях РНКі виявлений у багатьох еукаріотів, включно з тваринами, та ініціюється ферментом Дайсер (Dicer), який розщеплює молекули довгих дволанцюжкових РНК (dsРНК) на короткі дволанцюжкові фрагменти siRNA, що складаються з близько 21 нуклеотиду (малі інтерферувальні РНК). Кожна siRNA розмотується на дві одноланцюжкові РНК (ssРНК), які супроводжують ланцюг і напрямний ланцюг. Супровідний ланцюг деградує, а напрямний ланцюг включається в РНК-індукований сайленсинг-комплекс (RISC). Зрілі miРНК структурно схожі на siРНК, продукованими з екзогенної dsРНК, але перш ніж досягти зрілості, miРНК повинні спочатку піддаватися широкій посттранскрипційній модифікації. miРНК експресується зі значно довшого РНК-кодувального гена у вигляді первинного транскрипту, відомого як pri-miРНК, яка обробляється (у ядрі клітини до 70-нуклеотидної структури "петля на стеблі", названої pre-miРНК) мікропроцесорним комплексом. Цей комплекс складається з ферменту РНази III, названого Дроша (Drosha), і dsРНК-зв'язувального білка DGCR8. Ділянка dsРНК цієї pre-miРНК зв'язується та розщеплюється ферментом Дайсер для отримання зрілої молекули miРНК, яка може бути інтегрована в комплекс RISC; таким чином, miРНК і siРНК мають однаковий

низхідний клітинний механізм. Коротка шпилька РНК або мала шпилька РНК (shРНК / Шпильковий вектор) – це штучна молекула РНК з крутим поворотом шпильки, яка може бути використана для сайленсинга експресії гена-мішені за допомогою РНК-інтерференції. Найкраще вивченим результатом є посттранскрипційний сайленсинг генів, який відбувається, коли

5 напрямний ланцюг злучається з комплементарною послідовністю в молекулі інформаційної РНК та індукує розщеплення за допомогою Argonaute 2 (Ago2), каталітичним компонентом RISC. У контексті цього документа молекула РНКі може бути siРНК, shРНК або miРНК. Треба розуміти, що молекули РНКі можуть застосовуватися як такі до рослини / у рослині або можуть кодуватися відповідними векторами, з яких експресується молекула РНКі. Системи доставляння й експресії молекул РНКі, як-от siРНК, shРНК або miРНК, добре відомі в цій області техніки.

У контексті цього документа термін "гомозигота" стосується окремої клітини або рослини, що має однакові алелі щонайменше в одному або в усіх локусах. Коли цей термін використовується щодо специфічного локусу або гена, це означає, що щонайменше цей локус або ген має однакові алелі. У контексті цього документа термін "гомозиготний" означає генетичний стан,

15 який існує, коли ідентичні алелі перебувають у відповідних локусах на гомологічних хромосомах. У контексті цього документа термін "гетерозигота" стосується окремої клітини або рослини, що має різні алелі щонайменше в одному або в усіх локусах. Коли цей термін використовується щодо специфічного локусу або гена, це означає, що щонайменше цей локус або ген має різні алелі. У контексті цього документа термін "гетерозиготний" означає генетичний

20 стан, який існує, коли різні алелі перебувають у відповідних локусах на гомологічних хромосомах. У певних варіантах виконання цього винаходу QTL та/або щонайменше один маркер, описаний у цьому документі, є гомозиготним. У певних варіантах виконання цього винаходу QTL та/або щонайменше один маркер, описаний у цьому документі, є гетерозиготним. У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL та/або щонайменше один маркерний алель, описаний в цьому документі, є гомозиготним. У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL та/або щонайменше один маркерний алель, описаний у цьому документі, є гетерозиготним.

"Маркер" – це засіб знаходження положення на генетичній або фізичній карті або ж зчеплень між маркерами й локусами ознак (локусами, що впливають на ознаки). Положення, яке визначає

30 маркер, може бути відомим за допомогою визначення поліморфних алелів і їх генетичного картування або ж за допомогою гібридизації, зіставлення збігів послідовностей або ампліфікації послідовності, яка була фізично картована. Маркер може бути маркером ДНК (визначає поліморфізми ДНК), білком (визначає варіацію в кодованому поліпептиді) або просто спадковим фенотипом (як-от "восковий" фенотип). Маркер ДНК може бути розробленим на основі нуклеотидної послідовності генома або на основі експресованих нуклеотидних послідовностей (наприклад, на основі сплайсованої РНК або сДНК). Залежно від технології маркерів ДНК, маркер може складатися з комплементарних праймерів, які фланкують локус, та/або з комплементарних зондів, які гібридизуються з поліморфними алелями в локусі. Термін "маркерний локус" означає локус (ген, послідовність або нуклеотид), який визначається

40 маркером. Термін "маркер", або "молекулярний маркер", або "маркерний локус" також можна використовувати для позначення послідовності нуклеїнової кислоти або амінокислотної послідовності, яка є достатньо унікальною для характеристики конкретного локусу в геномі. Будь-яка поліморфна ознака, що визначається, може використовуватися як маркер, якщо успадковується диференційно й демонструє нерівновагу за зчепленням з фенотипічною

45 ознакою, що становить інтерес.

Маркери, що визначають генетичні поліморфізми між членами популяції, добре відомі в цій області техніки. Маркери можуть бути визначені за типом поліморфізму, який вони визначають, а також за маркерною технологією, використовуваною для визначення поліморфізму. Типи маркерів включають, але цим не обмежуються, наприклад, визначення поліморфізмів довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), визначення ізоферментних маркерів, випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD), поліморфізмів довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP), визначення простих повторюваних послідовностей (SSR), визначення ампліфікованих варіабельних послідовностей генома рослини, визначення самопідтримуваної реплікації послідовностей, або визначення одонуклеотидних поліморфізмів (SNP). SNP можуть бути

50 визначені, наприклад, за допомогою секвенування ДНК, методів сиквенс-специфічної ампліфікації на основі PCR, визначення полінуклеотидних поліморфізмів за допомогою алель-специфічної гібридизації (ASH), динамічної алель-специфічної гібридизації (DASH), молекулярних маячків, гібридизації на мікрочипах, кількісних аналізів олігонуклеотидних лігаз, Флеп-ендонуклеаз, 5' ендонуклеаз, подовження праймерів, одноланцюжкового

60 конформаційного поліморфізму (SSCP) або гелю з використанням градієнта температури

(TGGE). Перевага секвенування ДНК, наприклад технології піросеквенування, полягає в тому, що воно дає змогу визначити серію зчеплених алелів SNP, які складають гаплотип. Гаплотипи зазвичай більш інформативні (визначають вищий рівень поліморфізму) порівняно із SNP.

5 Термін "маркерний алель", в альтернативному варіанті виконання цього винаходу – "алель маркерного локусу", може стосуватися однієї з безлічі поліморфних нуклеотидних послідовностей, виявлених у маркерному локусі в популяції. Щодо маркера SNP, алель належить до специфічної нуклеотидної основи, присутньої в цьому локусі SNP у цієї окремої рослини.

10 Термін "тонке картування" стосується способів, за допомогою яких положення QTL може бути визначено більш точно (локалізовано) та за допомогою яких розмір фрагмента інтрогресії, що містить QTL, зменшується. Наприклад, можуть бути використані майже ізогенні лінії для QTL (QTL–NIL), які містять різні фрагменти фрагмента інтрогресії, що перекриваються, у межах іншого однорідного генетичного фону рекурентних батьків. Потім такі лінії можуть бути використані для картування фрагмента, на якому розташований QTL, і для ідентифікації лінії, 15 яка має короткий фрагмент інтрогресії, що містить QTL.

Термін "вибір за допомогою маркера" (MAS) означає процес, під час якого вибирають окремі рослини на основі маркерних генотипів. Термін "контр-вибір за допомогою маркера" означає процес, за допомогою якого маркерні генотипи використовуються для ідентифікації рослин, які не будуть вибрані, що дає змогу виключити їх із програми селекції або висаджування. У разі 20 вибору за допомогою маркера використовується присутність молекулярних маркерів, які генетично зчеплені з певним локусом або з певною областю хромосоми (наприклад, із фрагментом інтрогресії, трансгеном, поліморфізмом, мутацією тощо), для вибору рослин, у яких є специфічний локус або область (фрагмент інтрогресії, трансген, поліморфізм, мутація тощо). Наприклад, молекулярний маркер, генетично зчеплений із QTL перетравлюваності, як визначено в цьому документі, може бути використаний для визначення та/або вибору рослин, 25 що містять QTL на хромосомі 9. Що ближче генетичне зчеплення молекулярного маркера з локусом (наприклад, близько 7 cM, 6 cM, 5 cM, 4 cM, 3 cM, 2 cM, 1 cM, 0,5 cM або менше), то менш імовірно, що маркер дисоційований від локусу за допомогою мейотичної рекомбінації. Аналогічним чином, що ближче два маркери зчеплені один з одним (наприклад, у межах 7 cM 30 або 5 cM, 4 cM, 3 cM, 2 cM, 1 cM або менше), то менш імовірно, що два маркери будуть відокремлені один від одного (і то більш імовірно, що вони будуть спільно сегрегуватися як єдине ціле). Термін "LOD-бал" (логарифм (основа 10) ймовірності) стосується статистичного тесту, який часто використовується для аналізування зчеплень у популяціях тварин і рослин. LOD-бал порівнює ймовірність отримання тестових даних, якщо два локуси (локус 35 молекулярного маркера та/або локус фенотипічної ознаки) дійсно зчеплені, з ймовірністю спостереження однакових даних суто випадково. Позитивні LOD-бали свідчать про наявність зчеплення, а LOD-бал, який перевищує 3,0, вважається доказом зчеплення. LOD-бал зі значенням +3 свідчить про ймовірність 1000 до 1, що спостережуване зчеплення не випадкове.

Термін "маркерний гаплотип" стосується комбінації алелів у маркерному локусі.

40 Термін "маркерний локус" означає місце розташування специфічної хромосоми в геномі виду, де може бути виявлений специфічний маркер. Маркерний локус може бути використаний для відстеження присутності другого зчепленого локусу, наприклад, локусу, який впливає на експресію фенотипічної ознаки. Наприклад, маркерний локус може використовуватися для моніторингу сегрегації алелів у генетично або фізично зчепленому локусі.

45 Термін "маркерний зонд" означає послідовність або молекулу нуклеїнової кислоти, яка може бути використана для ідентифікації присутності маркерного локусу, наприклад, зонда нуклеїнової кислоти, комплементарної послідовності маркерного локусу, за допомогою гібридизації нуклеїнової кислоти. Маркерні зонди, що містять 30 або більше безперервних нуклеотидів маркерного локусу ("уся або ділянка" послідовності маркерного локусу), можуть 50 бути використані для гібридизації нуклеїнової кислоти. В альтернативному варіанті виконання цього винаходу, в деяких аспектах, маркерний зонд належить до зонду будь-якого типу, який здатний розрізняти (тобто генотип) конкретний алель, який є в маркерному локусі.

Термін "молекулярний маркер" може використовуватися для позначення генетичного маркера або його кодованого продукту (наприклад, білка), що використовується як вихідна 55 точка під час ідентифікації зчепленого локусу. Маркер ДНК може бути отриманий із нуклеотидних послідовностей генома або з експресованих нуклеотидних послідовностей (наприклад, зі сплайсованої РНК або сДНК тощо) або з кодованого поліпептиду. Цей термін стосується також послідовностей нуклеїнових кислот, комплементарних або які фланкують маркерні послідовності, як-от нуклеїнові кислоти, які використовуються як зонди або пари 60 праймерів, здатні ампліфікувати маркерну послідовність. Термін "молекулярний маркерний

зонд" означає послідовність або молекулу нуклеїнової кислоти, яка може бути використана для ідентифікації присутності маркерного локусу, наприклад, зонда нуклеїнової кислоти, комплементарної послідовності маркерного локусу. В альтернативному варіанті виконання цього винаходу, в деяких аспектах, маркерний зонд належить до зонду будь-якого типу, який

5 здатний розрізняти (тобто генотип) конкретний алель, який є в маркерному локусі. Нуклеїнові кислоти "комплементарні", коли вони специфічно гібридизуються в розчині, наприклад відповідно до правил спаровування основ за Вотсоном-Кріком. Деякі з маркерів, описаних у цьому документі, також належать до маркерів гібридизації, коли вони розташовані в області індела, як-от неколінеарна область, описана в цьому документі. Це пов'язано з тим, що область

10 інсерції, за визначенням, є поліморфізмом щодо рослини без інсерції.

Таким чином, маркер повинен лише вказувати, є чи немає області індела. Для ідентифікації такого маркера гібридизації може бути використана будь-яка відповідна технологія визначення маркера, наприклад, технологія SNP використовується в прикладах, наведених у цьому документі.

15 "Генетичні маркери" є нуклеїновими кислотами, які є поліморфними в популяції та алелі яких можна визначити й виділити за допомогою щонайменше одного аналітичного методу, наприклад, RFLP, AFLP, ізоферменту, SNP, SSR тощо. Терміни "молекулярний маркер" і "генетичний маркер" використовуються в цьому документі як взаємозамінні. Цей термін стосується також послідовностей нуклеїнових кислот, комплементарних геномним

20 послідовностям, як-от нуклеїнові кислоти, які використовуються як зонди. Маркери, що відповідають генетичним поліморфізмам між членами популяції, можуть бути визначені методами, добре відомими в цій області техніки. Вони включають, наприклад, методи сиквенс-специфічної ампліфікації на основі PCR, визначення поліморфізмів довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), визначення ізоферментних маркерів, визначення полінуклеотидних

25 поліморфізмів за допомогою алель-специфічної гібридизації (ASH), визначення ампліфікованих варіабельних послідовностей генома рослини, визначення самопідтримуваної реплікації послідовностей, визначення простих повторюваних послідовностей (SSR), визначення одонуклеотидних поліморфізмів (SNP) або визначення поліморфізмів довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP). Також відомі методи, які добре зарекомендували себе для визначення

30 маркерів експресованих послідовностей (EST) і маркерів SSR, отриманих із послідовностей EST, і випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD).

Термін "поліморфізм" означає мінливість у ДНК між щонайменше двома особинами в межах популяції. Поліморфізм, у переважному варіанті виконання цього винаходу, має частоту, що становить щонайменше 1% у популяції. Корисний поліморфізм може включати

35 одонуклеотидний поліморфізм (SNP), просту повторювану послідовність (SSR) або поліморфізм інсерцій/делецій, також названий у цьому документі "інделом". Термін "індел" стосується інсерції або делеції, водночас одна лінія може бути позначена як та, що має вставлений нуклеотид або фрагмент ДНК щодо другої лінії, або друга лінія може бути позначена як та, що має віддалений нуклеотид або фрагмент ДНК щодо першої лінії.

40 Термін "фізична відстань" між локусами (наприклад, між молекулярними маркерами та/або між фенотипічними маркерами) на одній і тій же хромосомі означає фактичну фізичну відстань, виражену в основах або парах основ (п.о.), тисячах основ або тисячах пар основ (т.п.о.) або мільйонах основ або мільйонах пар основ (млн.п.о.).

"Генетична відстань" між локусами (наприклад, між молекулярними маркерами та/або між фенотипічними маркерами) на одній і тій же хромосомі вимірюється частотою кросинговеру або частотою рекомбінацій (RF) і зазначається в сантиморганах (сМ). Один сМ відповідає частоті рекомбінації 1%. Якщо рекомбінантів не виявлено, то RF дорівнює нулю, а локуси або перебувають дуже близько один до одного фізично, або вони ідентичні. Що далі два локуси

45 перебувають один від одного, то вище RF.

50 Термін "фізична карта" генома означає карту, яка показує лінійну послідовність ідентифікованих орієнтирів (включно з генами, маркерами тощо) на ДНК хромосоми. Однак, на відміну від генетичних карт, відстані між орієнтирами є абсолютними (наприклад, вимірюються в парах основ або в ізольованих і безперервних генетичних фрагментах, що перекриваються) і не засновані на генетичній рекомбінації (яка може варіюватися в різних популяціях).

55 Алель "негативно" корелює з ознакою, коли він зчеплений із нею та коли присутність алеля є показником того, що бажана ознака або форма ознаки не будуть зустрічатися в рослині, що містить цей алель. Алель "позитивно" корелює з ознакою, коли він зчеплений із нею та коли присутність алеля є показником того, що бажана ознака або форма ознаки будуть зустрічатися в рослині, що містить цей алель.

Сантиморган ("сМ") є одиницею вимірювання частоти рекомбінацій. Один сМ дорівнює 1 % імовірності того, що маркер в одному генетичному локусі буде відділений від маркера в другому локусі через кросинговер в одному поколінні.

У контексті цього документа термін "хромосомний інтервал" означає безперервну лінійну ділянку геномної ДНК, що розташована в рослині на одній хромосомі. Генетичні елементи або гени, розташовані на одному хромосомному інтервалі, фізично зчеплені. Розмір хромосомного інтервалу не є конкретно обмеженим. У деяких аспектах генетичні елементи, розташовані в межах одного хромосомного інтервалу, генетично зчеплені зазвичай із відстанню генетичної рекомбінації, наприклад, що менше або дорівнює 20 сМ або, в альтернативному варіанті виконання цього винаходу, – менше або дорівнює 10 сМ. Тобто два генетичних елементи в межах одного хромосомного інтервалу піддаються рекомбінації з частотою, що менше або дорівнює 20 % або 10 %.

Термін "тісно зчеплений", застосовуваний у цій заявці, означає, що рекомбінація між двома зчепленими локусами відбувається з частотою, що менше або дорівнює близько 10 % (тобто вони розділені на генетичній карті відстанню, що не перевищує 10 сМ). Іншими словами, тісно зчеплені локуси спільно сегрегуються щонайменше в 90 % випадків. Маркерні локуси особливо корисні щодо об'єкта цього винаходу, коли вони демонструють значну ймовірність спільної сегрегації (зчеплення) з бажаною ознакою (наприклад, стійкість до сірої плямистості листя). Тісно зчеплені локуси, як-от маркерний локус і другий локус, можуть демонструвати частоту міжлокусної рекомбінації, що становить 10 % або менше, у переважному варіанті виконання цього винаходу – близько, 9 % або менше, у ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 8 % або менше, у ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 7 % або менше, у ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 6 % або менше, у ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 5 % або менше, у ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 4 % або менше, у ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 3 % або менше, і в ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 2 % або менше. В особливо переважних варіантах виконання цього винаходу відповідні локуси демонструють рекомбінацію з частотою, що становить близько 1 % або менше, наприклад близько 0,75 % або менше, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 0,5 % або менше або в ще більш переважному варіанті виконання цього винаходу – близько 0,25 % або менше. Також вважається, що два локуси, розташовані на одній хромосомі й на такій відстані, що рекомбінація між цими двома локусами відбувається з частотою, що становить менше 10 % (наприклад, близько 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % або менше), "проксимальні" відносно до один одного. У деяких випадках два різних маркери можуть мати однакові координати генетичної карти. У цьому разі два маркери настільки тісно проксимальні відносно до один одного, що рекомбінація відбувається між ними з такою низькою частотою, що її неможливо визначити.

Термін "зчеплення" стосується тенденції алелів спільно сегрегуватися частіше, ніж це можна було б очікувати внаслідок випадковості, якщо їхня трансмісія була незалежною. Зазвичай зчеплення стосується алелів, розташованих на одній і тій же хромосомі. Генетична рекомбінація відбувається з передбачуваною випадковою частотою по всьому геному. Генетичні карти будують шляхом вимірювання частоти рекомбінації між парами ознак або маркерів. Що тісніше ознаки або маркери розміщені один до одного на хромосомі, то нижча частота рекомбінації і то вищий ступінь зчеплення. У цьому документі ознаки або маркери розглядаються як зчеплені, якщо вони зазвичай спільно сегрегуються. Імовірність рекомбінації 1/100 на покоління визначається як відстань генетичної карти, що становить 1,0 сантиморган (1,0 сМ). Термін "нерівновага за зчепленням" стосується невідповідності сегрегації генетичних локусів або ознак (або і того й іншого). У будь-якому разі нерівновага за зчепленням передбачає, що відповідні локуси розташовані в межах достатньої фізичної проксимальності за довжиною хромосоми, завдяки чому вони спільно сегрегуються частіше, ніж із випадковою частотою (тобто з невідповідною частотою). Маркери, які показують нерівновагу за зчепленням, вважаються зчепленими. Зчеплені локуси спільно сегрегуються більш ніж у 50 % випадків, наприклад від близько 51 % до близько 100 % випадків. Іншими словами, два маркери, які спільно сегрегуються, мають частоту рекомбінації, що становить менше 50 % (і, за визначенням, вони розділені відстанню, що становить менше 50 сМ, в одній і тій же групі зчеплення). У контексті цього документа зчеплення може бути між двома маркерами або, в альтернативному варіанті виконання цього винаходу, між маркером і локусом, який впливає на фенотип. Маркерний локус може бути "асоційованим із" (зчепленим із) ознакою. Ступінь зчеплення маркерного локусу й локусу, що впливає на фенотипічну ознаку, вимірюється,

наприклад, як статистична ймовірність спільної сегрегації цього молекулярного маркера з фенотипом (наприклад, F-статистика або LOD-бал).

У контексті цього документа термін "ідентичність послідовності" стосується ступеня ідентичності будь-якої даної послідовності нуклеїнової кислоти до послідовності нуклеїнової кислоти-мішені. Відсоток ідентичності послідовності обчислюється шляхом визначення кількості положень, які збігаються, у вирівняних послідовностях нуклеїнових кислот, ділення кількості положень, які збігаються, на загальну кількість вирівняних нуклеотидів і множення на 100. Положення, яке збігається, належить до положення, у якому ідентичні нуклеотиди зустрічаються в одному й тому ж положенні у вирівняних послідовностях нуклеїнових кислот. Відсоток ідентичності послідовності також може бути визначений для будь-якої амінокислотної послідовності. Для визначення відсотка ідентичності послідовності послідовність нуклеїнової кислоти-мішені або амінокислотну послідовність порівнюють з ідентифікованою послідовністю нуклеїнової кислоти або амінокислотною послідовністю з використанням програми BLAST 2 Sequences (Послідовності) (BL2seq) з автономної версії BLASTZ, що містить BLASTN і BLASTP. Цю автономну версію BLASTZ можна придбати на веб-сайті компанії Fish & Richardson (World Wide Web за адресою fr.com/blast) або на веб-сайті Національного центру біотехнологічної інформації уряду США (World Wide Web за адресою ncbi.nlm.nih.gov). Інструкції, що пояснюють, як користуватися програмою BL2seq, можна знайти у файлі readme, що додається до BLASTZ. BL2seq виконує порівняння двох послідовностей із використанням алгоритму BLASTN або BLASTP.

BLASTN використовується для порівняння послідовностей нуклеїнових кислот, а BLASTP використовується для порівняння амінокислотних послідовностей. Для порівняння двох послідовностей нуклеїнових кислот параметри задаються таким чином: -i встановлюється у файл, який містить першу послідовність нуклеїнової кислоти, що підлягає порівнянню (наприклад, C:\seq1.txt); -j встановлюється у файл, який містить другу послідовність нуклеїнової кислоти, що підлягає порівнянню (наприклад, C:\seq2.txt); -p встановлюється в blastn; -o встановлюється у файл із будь-яким бажаним ім'ям (наприклад, C:\output.txt); -q встановлюється на - 1; -r встановлюється на 2; а для решти параметрів залишаються їхні значення, задані за замовчуванням. Наступна команда буде генерувати вихідний файл, який містить порівняння двох послідовностей: C:\BL2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q - 1 -r 2. Якщо послідовність-мішень має гомологію з будь-якою ділянкою ідентифікованої послідовності, то зазначений вихідний файл буде представляти ці області гомології як вирівняні послідовності. Якщо послідовність-мішень не має гомології з будь-якою ділянкою ідентифікованої послідовності, то зазначений вихідний файл не буде представляти ці області гомології як вирівняні послідовності. Після вирівнювання визначають довжину шляхом обчислення кількості послідовних нуклеотидів із послідовності-мішені, представленої у вирівнюванні з послідовністю з ідентифікованої послідовності, починаючи з будь-якого положення, що збігається, і закінчуючи будь-яким іншим положенням, що збігається. Положення, що збігається, – це будь-яке положення, у якому ідентичний нуклеотид представлений як в послідовності-мішені, так і в ідентифікованій послідовності. Гепи, представлені в послідовності-мішені, не беруться до уваги, оскільки гепи не є нуклеотидами. Аналогічним чином, гепи, представлені в ідентифікованій послідовності, не беруться до уваги, оскільки беруться до уваги нуклеотиди послідовності-мішені, а не нуклеотиди з ідентифікованої послідовності. Відсоток ідентичності за певною довжиною визначають шляхом обчислення кількості положень, що збігаються, по цій довжині й ділення цієї кількості на довжину, а потім множення отриманого значення на 100. Наприклад, якщо (i) послідовність нуклеїнової кислоти-мішені з основою з 500 нуклеотидів порівнюють із послідовністю нуклеїнової кислоти, що розглядається, (ii) програма BL2seq представляє 200 основ з послідовності-мішені, вирівняної з областю послідовності, що розглядається, де перша й остання основи цієї області з 200 основ збігаються, та (iii) кількість збігів за цими 200 вирівняними основами дорівнює 180, то послідовність нуклеїнової кислоти-мішені з основою з 500 нуклеотидів має довжину 200, а ідентичність послідовності за цією довжиною становить 90 % (тобто $180/200 \times 100 = 90$). Треба мати на увазі, що кожна з різних областей у межах одиночної послідовності нуклеїнової кислоти-мішені, вирівняної з ідентифікованою послідовністю, може мати свій власний відсоток ідентичності. Варто зазначити, що значення відсотка ідентичності округлюється до найближчої десятної частки. Наприклад, 78,11, 78,12, 78,13 і 78,14 округлюються до 78,1, а 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 та 78,19 округлюються до 78,2. Також варто зазначити, що значення довжини завжди буде цілим числом.

Термін "виділена послідовність нуклеїнової кислоти" або "виділена ДНК" стосується послідовності нуклеїнової кислоти, яка більше не перебуває в природному середовищі, з якої

вона була виділена, наприклад, послідовність нуклеїнової кислоти в бактеріальній клітині-господарі або в ядерному або пластидному геномі рослини. Під час згадки в цьому документі терміна "послідовність" передбачається, що мається на увазі молекула, що має таку послідовність, наприклад молекула нуклеїнової кислоти. "Клітина-господар", або "рекомбінантна клітина-господар", або "трансформована клітина" – це терміни, що стосуються нової окремої клітини (або організму), що виникає внаслідок уведення в згадану клітину щонайменше однієї молекули нуклеїнової кислоти. Клітина-господар у переважному варіанті виконання цього винаходу є рослинною клітиною або бактеріальною клітиною. Клітина-господар може містити нуклеїнову кислоту у вигляді молекули, що реплікується екстрахромосомно (епісомально), або вона містить нуклеїнову кислоту, інтегровану в ядерний або пластидний геном клітини-господаря, або у вигляді введеної хромосоми, наприклад мініхромосоми.

Коли наводиться посилення на послідовність нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК або геномної ДНК), що має "значний ступінь ідентичності послідовності" до еталонної послідовності, або має ідентичність послідовності, що становить щонайменше 60 %, наприклад, щонайменше 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти до еталонної послідовності, в одному варіанті виконання цього винаходу, згадана нуклеотидна послідовність вважається значною мірою ідентичною цій нуклеотидній послідовності й може бути ідентифікована з використанням жорстких умов гібридизації. В іншому варіанті виконання цього винаходу послідовність нуклеїнової кислоти містить щонайменше одну мутацію, порівняно з цією нуклеотидною послідовністю, однак може бути ідентифікована з використанням жорстких умов гібридизації. "Жорсткі умови гібридизації" можуть бути використані для ідентифікації нуклеотидних послідовностей, які значною мірою ідентичні цій нуклеотидній послідовності. Жорсткі умови залежать від послідовності й будуть відрізнятися за різних обставин. Зазвичай жорсткі умови вибирають з огляду на температуру, яка приблизно на 5 °C нижча за точку термічного плавлення (T_m) для специфічних послідовностей за певної іонної сили та pH. T_m – це температура (за певної іонної сили та pH), за якої 50 % послідовності-мішені гібридизуються із зондом, який ідеально збігається. Зазвичай вибираються жорсткі умови, за яких концентрація солі становить приблизно 0,02 моляра за pH 7 і температури щонайменше 60 °C. Зниження концентрації солі та/або підвищення температури призводить до збільшення жорсткості. Жорсткі умови для гібридизації РНК–ДНК (Нозерн-блоти з використанням зонда, що складається, наприклад, зі 100 нуклеотидів) є, наприклад, такими умовами, які передбачають щонайменше одне промивання в 0,2 X SSC за 63 °C протягом 20 хвилин або еквівалентні умови. Жорсткі умови для гібридизації ДНК–ДНК (Саузерн-блоти з використанням зонда, що складається, наприклад, зі 100 нуклеотидів) є, наприклад, такими умовами, які передбачають щонайменше одне промивання (зазвичай 2) в 0,2 X SSC за температури щонайменше 50 °C, зазвичай близько 55 °C протягом 20 хв або еквівалентні умови. Див. також Сембрук та ін. (1989) і Сембрук і Рассел (2001). Прикладами вкрай жорстких умов гібридизації є умови, за яких гібридизації зазнають переважно лише ті молекули нуклеїнової кислоти, які мають щонайменше 90 % або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей. Такими вкрай жорсткими умовами гібридизації є, наприклад: гібридизація в 4 X SSC за 65 °C із подальшими багаторазовими промиваннями в 0,1 X SSC за 65 °C протягом близько 1 години. Використовуваний у цьому документі термін "вкрай жорсткі умови гібридизації" також може означати: гібридизацію за 68 °C в 0,25 M фосфату натрію, pH 7,2, 7 % SDS, 1 mM EDTA та 1 % BSA протягом 16 годин із подальшим дворазовим промиванням 2 X SSC та 0,1 % SDS за 68 °C. У переважному варіанті виконання цього винаходу гібридизація відбувається в жорстких умовах. Менш жорсткими умовами гібридизації є, наприклад: гібридизація в 4 X SSC за 37 °C із подальшими багаторазовими промиваннями в 1 X SSC за кімнатної температури.

У контексті цього документа F35H (код ферменту ExPASy, EC 1.14.13.88) стосується гена або білка флавоноїд 3',5'-гідроксилази. F35H також відомий як F3'5'H, F3',5'H, цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази, або флаванон,НАДФН:кисень-оксидоредуктаза. F35H каталізує наступну реакцію: флаванон + 2 НАДФН + 2 O (2) $\rightleftharpoons$ 3',5'-дигідроксифлаванон + 2 НАДФ (+) + 2 H(2)O.

В одному аспекті цей винахід належить до способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить скринінг на наявність алеля QTL (наприклад, у генетичному матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини), асоційованого з поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього

В одному варіанті виконання, цей винахід належить до способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення генетичного матеріалу щонайменше з однієї клітини рослини або частини рослини, скринінгу в цьому генетичному матеріалі на наявність алеля QTL, що містить нуклеотидну послідовність гена, який кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, і вибору рослини або частини рослини, у якій є алель QTL.

У певних варіантах виконання цього винаходу рослина є кукурудзою, і алель QTL розташований на хромосомі 9 і містить та/або фланкований (молекулярними) маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01.

У певних варіантах виконання цього винаходу рослина є кукурудзою, і алель QTL розташований на хромосомі 9 і містить (молекулярний) маркерний алель ma61134xxx.

У певних варіантах виконання цього винаходу рослина є кукурудзою, і алель QTL розташований на хромосомному інтервалі, що містить та/або фланкований (молекулярними) маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01.

У певних варіантах виконання цього винаходу рослина є кукурудзою, і алель QTL розташований на хромосомному інтервалі, що містить маркерний алель ma61134xxx, та/або щонайменше один молекулярний маркерний алель розташований на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкований маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегують з поліпшеною перетравлюваністю.

У одному аспекті, цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить скринінг (наприклад, у генетичному матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини) на присутність мутації в нуклеотидній послідовності гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або на присутність мутації, яка призводить до зміненої експресії mPНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у переважному варіанті виконання цього винаходу – що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mPНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H (наприклад, мутації нокдаун або нокаут), або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною активністю ферментативної під час трансляції.

У одному варіанті виконання, цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення генетичного матеріалу з щонайменше однієї клітини рослини або частини рослини, і скринінгу в згаданому генетичному матеріалі на присутність мутації в нуклеотидній послідовності гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), або на присутність мутації, що призводить до зміненої експресії mPНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою

ферментативною активністю під час трансляції, у переважному варіанті виконання цього винаходу – що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mPHK гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H (наприклад, мутації нокдаун або нокаут), або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H або білка F35H, що володіє зниженою ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції.

У одному аспекті цієї винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить скринінг (наприклад, у генетичному матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини) на присутність мутації в нуклеотидній послідовності гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або на присутність мутації, що призводить до зміненої експресії mP450 гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у переважному варіанті виконання цього винаходу – що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mP450 гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H (наприклад, мутації нокдаун або нокаут), або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції, і вибору рослини або частини рослини, у якій є мутація в згаданому F35H.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення генетичного матеріалу щонайменше з однієї клітини рослини або частини рослини, і скринінгу в згаданому генетичному матеріалі на присутність мутації в нуклеотидній послідовності гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), або на присутність мутації, що призводить до зміненої експресії mPHK гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у переважному варіанті виконання цього винаходу – що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mPHK гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H (наприклад, мутації нокдаун або нокаут), або мутації, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції, і вибору рослини або частини рослини, у якій є мутація в згаданому F35H.

У одному аспекті, цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить (наприклад, у матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини) аналіз (білка та/або mPНК) рівня експресії гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або скринінгу на змінену експресію mPНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або на білок F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – на зменшену або відсутню експресію mPНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або на нефункціональний білок F35H, або білок F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю, або білок F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи

частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення матеріалу щонайменше з однієї клітини рослини або частини рослини, і аналіз (білка та/або мРНК) рівня експресії гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) у згаданому матеріалі, та/або скринінгу на змінену експресію мРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або на білок F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – на зменшену або відсутню експресію мРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або на нефункціональний білок F35H, або білок F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю, або білок F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю в згаданому матеріалі.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить (наприклад, у матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини) аналіз (білка та/або мРНК) рівня експресії гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або вибору рослини або частини рослини, у якій мРНК F35H та/або експресія білка, або ферментативна активність F35H змінена, у переважному варіанті виконання цього винаходу – зменшена або елімінована, або ферментативна активність F35H зменшена або збільшена.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення матеріалу з щонайменше однієї клітини рослини або частини рослини, і аналіз (білка та/або мРНК) рівня експресії гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) у згаданому матеріалі, та/або скринінгу на змінену експресію мРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або на білок F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – на зменшену або відсутню експресію мРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H, або на нефункціональний білок F35H, або білок F35H, що володіє зниженою ферментативною активністю, або білок F35H, що володіє зниженою ферментативною активністю в згаданому матеріалі, і вибору рослини або частини рослини, у якому мРНК F35H та/або експресія білка, або ферментативна активність F35H змінена, у переважному варіанті виконання цього винаходу – зменшена або елімінована, або ферментативна активність F35H зменшена або збільшена.

У певних варіантах виконання цього винаходу, якщо рівень експресії (білка та/або мРНК) F35H, зокрема F35H дикого типу або нативного F35H, змінений, то рослина або частина рослини має поліпшену перетравлюваність. У певних варіантах виконання цього винаходу, якщо рівень експресії (білка та/або мРНК) F35H, зокрема F35H дикого типу або нативного F35H, змінений, порівняно з еталонним рівнем експресії, то рослина або частина рослини має поліпшену перетравлюваність. У певних варіантах виконання цього винаходу, якщо рівень експресії (білка та/або мРНК) F35H, зокрема F35H дикого типу або нативного F35H, змінений, порівняно з еталонним рівнем експресії в еталонній рослині й частині рослини, то рослина або частина рослини має поліпшену перетравлюваність. У певних варіантах виконання цього винаходу еталонною рослиною (або частиною рослини) є інбредна лінія кукурудзи PH207, як описано в роботі "Проект збірки елітної інбредної лінії PH207 дає уявлення про геномну та транскриптомну різноманітність кукурудзи", Хірш та ін., Plant Cell. 2016, листопад; 28(11): 2700-2714. Опубліковано онлайн 2016 1 листопада. doi: 10.1105/tpc.16.00353, або рослина кукурудзи, що містить алель QTL, що містить нуклеотидну послідовність дикого типу або нативну (немутовану) нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) (наприклад, отриманий із PH207), у переважному варіанті виконання цього винаходу – еталонна рослина (або частина рослини) отримана з майже ізогенної лінії.

У контексті цього документа змінені (білка та/або мРНК) рівні експресії належать до підвищених або знижених рівнів експресії, близько щонайменше на 10 %, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 30 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 50 %, наприклад, щонайменше на 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %.

60 %, 80 % або більше, наприклад, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або більше.

У конкретних варіантах виконання цього винаходу, якщо рівень експресії (білка та/або мРНК) F35H, зокрема F35H дикого типу або нативного F35H, зменшений або експресія (по суті) відсутня або елімінована, то рослина або частина рослини має поліпшену перетравлюваність. У певних варіантах виконання цього винаходу, якщо рівень експресії (білка та/або мРНК) F35H, зокрема F35H дикого типу або нативного F35H, зменшений або експресія (по суті) відсутня або елімінована, порівняно з еталонним рівнем експресії, то рослина або частина рослини має поліпшену перетравлюваність. У певних варіантах виконання цього винаходу, якщо рівень експресії (білка та/або мРНК) F35H, зокрема F35H дикого типу або нативного F35H, зменшений або експресія (по суті) відсутня або елімінована, порівняно з еталонним рівнем експресії в еталонній рослині або частині рослини, то рослина або частина рослини має поліпшену перетравлюваність. У певних варіантах виконання цього винаходу еталонною рослиною (або частиною рослини) є інбредна лінія кукурудзи PH207, як описано в роботі "Проект збірки елітної інбредної лінії PH207 дає уявлення про геномну та транскриптомну різноманітність кукурудзи", Хірш та ін., Plant Cell. 2016, листопад; 28(11): 2700-2714. Опубліковано онлайн 2016 1 листопада. doi: 10.1105/tpc.16.00353, або рослина кукурудзи, що містить алель QTL, що містить нуклеотидну послідовність дикого типу або нативну (немутовану) нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) (наприклад, отриманий із PH207), у переважному варіанті виконання цього винаходу – еталонна рослина (або частина рослини) отримана з майже ізогенної лінії.

У контексті цього документа зменшені (білка та/або мРНК) рівні експресії належать до рівнів експресії, знизених близько щонайменше на 10 %, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 30 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 50 %, наприклад, щонайменше на 20 %, 40 %, 60 %, 80 % або більше, наприклад, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або більше. Експресія (по суті) відсутня або елімінована, якщо рівні експресії зменшені щонайменше на 80 %, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 90 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 95 %. У певних варіантах виконання цього винаходу експресія (по суті) відсутня, якщо неможливо визначити білок та/або мРНК, зокрема білок дикого типу або нативний білок, та/або мРНК, наприклад, стандартними методами визначення, включно з, наприклад, (кількісною) PCR, Нозерн-блотом, вестерн-блотом, ELISA та іншими.

У одному аспекті цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить скринінг (наприклад, у генетичному матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини) на присутність щонайменше одного (молекулярного) маркерного алеля, асоційованого з поліпшеною перетравлюваністю, водночас цей (молекулярний) маркерний алель є молекулярним маркерним алелем та61134xxx, та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегують з поліпшеною перетравлюваністю.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення генетичного матеріалу з щонайменше однієї клітини рослини або частини рослини, і скринінгу в згаданому генетичному матеріалі на присутність щонайменше одного (молекулярного) маркерного алеля, асоційованого з поліпшеною перетравлюваністю, водночас згаданий (молекулярний) маркерний алель є молекулярним маркерним алелем та61134xxx, та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному

інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегуються з поліпшеною перетравлюваністю.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить скринінг (наприклад, у генетичному матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини) на присутність щонайменше одного (молекулярного) маркерного алеля, асоційованого з поліпшеною перетравлюваністю, водночас згаданий (молекулярний) маркерний алель є молекулярним маркерним алелем ma61134xxx, та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегуються з поліпшеною перетравлюваністю, і вибору рослини або частини рослини, у якій присутній щонайменше один (молекулярний) маркерний алель.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення генетичного матеріалу з щонайменше однієї клітини рослини або частини рослини, скринінгу в згаданому генетичному матеріалі на присутність щонайменше одного (молекулярного) маркерного алеля, асоційованого з поліпшеною перетравлюваністю, водночас цей (молекулярний) маркерний алель є молекулярним маркерним алелем ma61134xxx, та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегуються з поліпшеною перетравлюваністю, і вибору рослини або частини рослини, у якій є щонайменше один (молекулярний) маркерний алель.

У одному аспекті, цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить скринінг (наприклад, у генетичному матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини) на присутність молекулярного маркерного алеля ma61134xxx, та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125 s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається за допомогою полінуклеїнової кислоти, наприклад, алель-специфічної полінуклеїнової кислоти (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного

праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегується з поліпшеною перетравлюваністю.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення генетичного матеріалу з щонайменше однієї клітини рослини або частини рослини, і скринінгу в згаданому генетичному матеріалі на присутність молекулярного маркерного алеля та61134xxx, та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегується з поліпшеною перетравлюваністю.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить скринінг (наприклад, у генетичному матеріалі, виділеному з рослини або частини рослини) на присутність молекулярного маркерного алеля та61134xxx, та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегується з поліпшеною перетравлюваністю, і вибору рослини або частини рослини, у якій є щонайменше один (молекулярний) маркерний алель.

У одному варіанті виконання цей винахід стосується способу ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, або вибору рослини чи частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, який містить виділення генетичного матеріалу з щонайменше однієї клітини рослини або частини рослини, скринінгу в згаданому генетичному матеріалі на присутність молекулярного маркерного алеля та61134xxx, та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегується з поліпшеною перетравлюваністю, і вибору рослини або частини рослини, у якій присутній щонайменше один (молекулярний) маркерний алель.

Треба розуміти, що в способах, описаних вище, коли присутній алель QTL або (молекулярний) маркерний алель, то рослину або частину рослини ідентифікують як таку, що володіє поліпшеною перетравлюваністю.

Способи скринінгу на присутність алеля QTL або (молекулярного) маркерного алеля, як описано в цьому документі, відомі в цій області техніки. Без обмеження, скринінг може охоплювати або містити секвенування, методи на основі гібридизації (як-от (динамічна) алель-специфічна гібридизація, молекулярні маячки, SNP-мікрочипи), методи на основі ферментів (як-

от PCR, KASP (Конкурентна алель-специфічна PCR), RFLP, ALFP, RAPD, Флеп-ендонуклеаза, подовження праймера, 5'-нуклеаза, кількісний аналіз олігонуклеотидних лігаз), методи пост-ампліфікації на основі фізичних властивостей ДНК (як-от одноланцюжковий конформаційний поліморфізм, гель із використанням градієнта температури, денатурувальна високоєфективна рідинна хроматографія, високороздільне плавлення всього амплікону, використання білків, що зв'язують незбіжні ДНК, SNPlex, кількісний аналіз розщеплення невідповідності ферментів (нуклеази Surveyor)) тощо.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу – перетравлюваності стерні, який містить введення або інтрогресування в геном рослини або частини рослини алеля QTL, асоційованого з поліпшеною перетравлюваністю, і містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази, що має мутацію.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу – перетравлюваності стерні, який містить введення або інтрогресування в геном рослини або частини рослини алелі QTL, що містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази, що має мутацію.

У певних варіантах виконання цього винаходу мутація призводить до зміненої експресії мРНК гена та/або білка F35H, або мутація призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу мутація призводить до зменшеної або відсутньої експресії мРНК цього гена та/або білка F35H, до нокауту або нокадауну цього гена, або мутація призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції.

У певних варіантах виконання обох вищезазначених аспектів цього винаходу, що належать до способу генерування/продукування рослини або частини рослини, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання цього винаходу – перетравлюваності стерні, алель QTL розташований на хромосомі 9 і містить та/або фланкований маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL розташований на хромосомі 9 і містить (молекулярний) маркерний алель та61134xxx.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL розташований на хромосомному інтервалі, що містить та/або фланкований (молекулярними) маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL розташований на хромосомному інтервалі, що містить маркерний алель та61134xxx, та/або щонайменше один молекулярний маркерний алель розташований на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкований маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїновою кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїновою кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегується з поліпшеною перетравлюваністю.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу –

перетравлюваності стерні, який містить введення в геном рослини або частини рослини алеля QTL, асоційованого з поліпшеною перетравлюваністю, і що містить маркерний алель та61134xxx, та/або щонайменше один молекулярний маркерний алель, розташований на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкований маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїною кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїною кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегуються з поліпшеною перетравлюваністю.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу – перетравлюваності стерні, який містить введення в геном рослини або частини рослини алеля QTL, що містить маркерний алель та61134xxx, та/або щонайменше один молекулярний маркерний алель, розташований на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкований маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїною кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїною кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегуються з поліпшеною перетравлюваністю.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу – перетравлюваності стерні, який містить введення або інтрогресування в геном рослини або частини рослини нуклеотидної послідовності гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу – перетравлюваності стерні, який містить введення в геном рослини або частини рослини, зокрема, у нуклеотидну послідовність ендегенного гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази, мутації.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу – перетравлюваності стерні, який містить зміну ендегенного гена, що кодує ген цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази, у переважному варіанті виконання цього винаходу, здійснення нокауту ендегенного гена, що кодує ген цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу – перетравлюваності стерні, який містить зміну експресії мРНК гена, що кодує ген цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або кодованого білка F35H, у переважному варіанті виконання цього винаходу, здійснення нокауту експресії мРНК гена, що кодує ген цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або кодованого білка F35H.

У одному аспекті цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення

перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання винаходу – перетравлюваності стерні, який містить зміну експресії mPHK гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази, та/або білка F35H, або зміну ферментативної активності цитохром P450-місного флавоноїда 5',3'-гідроксилази (F35H), у переважному варіанті виконання цього винаходу, елімінування або зменшення, або інгібування експресії mPHK гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази, або білка F35H, зменшення ферментативної активності цитохром P450-місного флавоноїда 5',3'-гідроксилази (F35H), або інгібування білка F35H, або підвищення ферментативної активності цитохром P450-місного флавоноїда 5',3'-гідроксилази (F35H).

У певних варіантах виконання цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності рослини чи частини рослини, у переважному варіанті виконання цього винаходу – перетравлюваності стерні, який містить

А. введення в нуклеотидну послідовність ендогенного гена рослини або частини рослини, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази, мутації або іншої генетичної події, що призводить до зміненої експресії mPHK гена та/або білка F35H, або мутації, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутації, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mPHK згаданого гена та/або білка F35H, до нокауту або нокдауну згаданого гена, або мутації, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною активністю ферментативної при трансляції; або

В. введення в геном рослини або частини рослини першої дволанцюжкової ДНК і другої дволанцюжкової ДНК, при цьому нуклеотидні послідовності кодувальних ланцюгів першої та другої ДНК є зворотними комплементами один одного, у результаті чого транскрипт першої ДНК і транскрипт другої ДНК здатні гібридуватися з утворенням дволанцюжкової РНК, водночас кодувальний ланцюг першої або другої ДНК містить:

а. щонайменше 19 нуклеотидів, що прямують один за одним, нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, або нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 70 % або щонайменше 80 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 90 %, щонайменше 92 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8; або

б. нуклеотидну послідовність, яка комплементарна щонайменше 19 нуклеотидам, що прямують один за одним, нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, або нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 70 % або щонайменше 80 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 90 %, щонайменше 92 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8; або

С. дволанцюжкову РНК, при цьому один ланцюг відповідає:

а. щонайменше 19 нуклеотидам, що прямують один за одним, нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, або нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 70 % або щонайменше 80 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 90 %, щонайменше 92 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, водночас Т замінений на U; або

б. нуклеотидної послідовності, яка комплементарна щонайменше 19 нуклеотидам, що прямують один за одним, нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, або нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 70 % або щонайменше 80 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 90 %, щонайменше 92 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, водночас Т замінений на U; або

Д. введення в рослину або частину рослини РНК-специфічної системи CRISPR/Cas, як-от система CRISPR/Cas13a, спрямованої або націленої на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, або в геном рослини чи частину рослини щонайменше однієї полінуклеотидної послідовності, що кодує (та експресує або здатна експресувати) згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas; або

Е. введення в рослину або частину рослини хімічної сполуки або антитіла, що змінює (або здатного змінювати) ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим білком F35H, у переважному варіанті виконання цього винаходу – що зменшує (або здатного зменшувати) ферментативну активність білка F35H або такого, що інгібує (або здатного інгібувати) ферментативну активність білка F35H, або такого, що підвищує (або здатного підвищувати) ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим білком F35H.

У певних варіантах виконання цей винахід стосується способу, як-от спосіб генерування/продукування рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, та/або поліпшення перетравлюваності, у переважному варіанті виконання цього винаходу – перетравлюваності стерні, рослини або частини рослини, що містить регенерацію рослини з частини рослини вищезазначених модифікованих рослин або з частин рослини.

В одному аспекті цей винахід стосується рослини або частини рослини, що містить алель QTL, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні, водночас згаданий алель QTL містить нуклеотидну послідовність гена, який кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію.

В одному аспекті цей винахід стосується рослини або частини рослини, що містить алель QTL, що містить нуклеотидну послідовність гена, який кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію.

У певних варіантах виконання цього винаходу мутація призводить до зміни експресії mРНК згаданого гена та/або білка F35H, або мутація призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції. Змінену експресію F35H можна здійснити, використовуючи, наприклад, будь-які способи мутагенезу, описані в цьому документі.

У певних варіантах виконання цього винаходу мутація призводить до зменшеної або відсутньої експресії mРНК згаданого гена та/або білка F35H, до нокауту або нокдауну згаданого гена, або мутація призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H) або білка F35H, що володіє зменшеною або підвищеною ферментативною активністю під час трансляції. Нокдаун або нокаут F35H можна здійснити, використовуючи, наприклад, будь-які способи мутагенезу, описані в цьому документі.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL розташований на хромосомі 9 і містить та/або фланкований (молекулярними) маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL розташований на хромосомі 9 і містить маркерний алель та61134xxx та/або щонайменше один молекулярний маркерний алель, розташований на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкований маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїною кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїною кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегуються з поліпшеною перетравлюваністю.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL розташований на хромосомному інтервалі, що містить та/або фланкований (молекулярними) маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL розташований на хромосомному інтервалі, що містить маркерний алель та61134xxx, та/або щонайменше один молекулярний маркерний алель розташований на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкований

маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається

полінуклеїною кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїною кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера і зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегується з поліпшеною перетравлюваністю.

В одному аспекті, цей винахід стосується рослини або частини рослини, що містить нуклеотидну послідовність гена, який кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію.

В одному аспекті, цей винахід стосується рослини й частини рослини, що містить маркерний алель ma61134xxx та/або щонайменше один молекулярний маркерний алель, розташований на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкований маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01, у переважному варіанті виконання цього винаходу водночас щонайменше один молекулярний маркерний алель визначається полінуклеїною кислотою, наприклад, алель-специфічною полінуклеїною кислотою (молекулярним маркером), придатною для гібридизації в якості прямого праймера та зворотного праймера для локусу на хромосомному інтервалі, який спільно сегрегується з поліпшеною перетравлюваністю.

В одному аспекті, цей винахід стосується рослини або частини рослини, що містить

А. ген, який кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію або іншу генетичну подію, у переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію або іншу генетичну подію, що призводить до зміненої експресії mРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до отримання білка F35H, що володіє зміненою ферментативною активністю під час трансляції, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – мутацію, що призводить до нокауту або нокдауну згаданого гена, або має зменшену або еліміновану експресію mРНК та/або білка гена F35H, або мутацію, або іншу генетичну подію, що призводить до отримання нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H), або білка F35H, що володіє зменшеною ферментативною активністю під час трансляції, або білка F35H, що володіє підвищеною ферментативною активністю під час трансляції; або

В. (стабільно інтегровану) першу дволанцюжкову ДНК і (стабільно інтегровану) другу дволанцюжкову ДНК, водночас нуклеотидні послідовності кодувальних ланцюгів першої та другої ДНК є зворотними комплементами один одного, унаслідок чого транскрипт першої ДНК і транскрипт другої ДНК здатні гібридизуватися з утворенням дволанцюжкової РНК, водночас кодувальний ланцюг першої або другої ДНК містить:

а. щонайменше 19 нуклеотидів, що прямують один за одним, нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, або нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 70 % або щонайменше 80 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 90 %, щонайменше 92 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8; або

б. нуклеотидну послідовність, яка комплементарна щонайменше 19 нуклеотидам, що прямують один за одним, нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, або нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 70 % або щонайменше 80 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 90 %, щонайменше 92 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8; або

С. дволанцюжкову РНК, водночас один ланцюг відповідає:

а. щонайменше 19 нуклеотидам, що прямують один за одним, нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, або нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 70 % або щонайменше 80 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 90 %, щонайменше 92 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8; або

щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, водночас Т замінений на U; або 75

б. нуклеотидної послідовності, яка комплементарна щонайменше 19 нуклеотидам, що прямують один за одним, нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, або нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 60 % ідентичність, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 70 % або щонайменше 80 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 90 %, щонайменше 92 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8, водночас Т замінений на U; або

Д. РНК-специфічну систему CRISPR/Cas, як-от система CRISPR/Cas13a, спрямовану або націлену на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, або щонайменше одну полінуклеотидну послідовність, що кодує (та експресує або здатна експресувати) згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas; або

Е. хімічну сполуку або антибіо, яке змінює (або здатне змінювати) ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим білком F35H, у переважному варіанті виконання цього винаходу – зменшує (або здатне зменшувати) ферментативну активність білка F35H, або яке інгібує (або здатне інгібувати) білок F35H під час взаємодії зі згаданим F35H, або підвищує (або здатне підвищувати) ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим білком F35H.

У певних варіантах виконання цього винаходу рослина не є новим сортом рослини.

В одному аспекті, цей винахід стосується способу отримання або генерування, або продукування рослини чи частини рослини, як-от рослина кукурудзи або сорго, або цукрова тростина, або частини рослини, у переважному варіанті виконання цього винаходу – рослини кукурудзи або частини рослини, що містить (а) пропозицію першої рослини, що має алель QTL, як-от алель QTL, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, як описано в іншому місці цього документа, необов'язково, водночас, згаданий алель QTL розташований на хромосомному інтервалі, у переважному варіанті виконання цього винаходу – на хромосомі 9, що містить і фланкована (молекулярними) маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01, (б) схрещування згаданої першої рослини з другою рослиною, як-от друга рослина, що не має згаданого алеля QTL, (с) вибір потомства рослин, що має згаданий алель QTL, і необов'язково (д) збір згаданої частини рослини від згаданого потомства.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL містить щонайменше один маркерний алель за цим винаходом, як описано в іншому місці цього документа.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL містить мутований ген F35H, як описано в іншому місці цього документа.

В одному аспекті, цей винахід стосується способу отримання або генерування, або продукування рослини чи частини рослини, як-от рослина кукурудзи або сорго, або цукрова тростина, або частини рослини, у переважному варіанті виконання цього винаходу – рослини кукурудзи або частини рослини, що містить (а) пропозицію першої рослини, що має (молекулярний) маркерний алель, як-от (молекулярний) маркерний алель, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, як описано в іншому місці цього документа, необов'язково, водночас, згаданий (молекулярний) маркерний алель розташований на хромосомному інтервалі, у переважному варіанті виконання цього винаходу – на хромосомі 9, що містить і фланкована (молекулярними) маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та50827s01 і та16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями та17117s01 і та61125s01; (Б) схрещування згаданої першої рослини з другою рослиною, як-от друга рослина, що не має згаданого (молекулярного) маркерного алеля, (с) вибір потомства рослин, що має згаданий (молекулярний) маркерний алель, і необов'язково (д) збір згаданої частини рослини від згаданого потомства.

В одному аспекті, цей винахід стосується способу отримання або генерування, або продукування рослини чи частини рослини, як-от рослина кукурудзи або сорго, або цукрова тростина, або частини рослини, що містить (а) пропозицію першої рослини, що має мутований ген F35H, або першої рослини, в якій експресія mРНК та/або білка гена F35H змінена, як описано в іншому місці цього документа, у переважному варіанті виконання цього винаходу – зменшена або (по суті) елімінована, або відсутня, як описано в іншому місці цього документа, необов'язково, водночас, згаданий мутований ген F35H розташований на хромосомному

інтервалі, у переважному варіанті виконання цього винаходу – на хромосомі 9, що містить і фланкована (молекулярними) маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, у переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01, (b) схрещування згаданої першої рослини з другою рослиною, як-от друга рослина, що не має згаданого мутованого гена F35H, (c) вибір потомства рослин, що має згаданий мутований ген F35H, і необов'язково (d) збір згаданої частини рослини від згаданого потомства.

У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL, маркерний алель та/або мутація F35H у першій рослині є в гомозиготному стані. У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL, маркерний алель та/або мутація F35H у першій рослині є в гетерозиготному стані. У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL, маркерний алель та/або мутація F35H у другій рослині є в гетерозиготному стані. У певних варіантах виконання цього винаходу алель QTL, маркерний алель та/або мутація F35H у другій рослині не присутні.

У певних варіантах виконання цього винаходу вибрано потомство, у якого алель QTL, маркерний алель та/або мутований F35H є в гомозиготному стані. У певних варіантах виконання цього винаходу вибрано потомство, у якого алель QTL, маркерний алель та/або мутований F35H є в гетерозиготному стані.

У певних варіантах виконання цього винаходу рослина є кукурудзою або частиною рослини, що походить від кукурудзи.

У певних варіантах виконання цього винаходу рослина є сорго, або частина рослини походить від сорго.

У певних варіантах виконання цього винаходу рослина є цукровою тростиною, або частина рослини походить від цукрової тростини.

У певних варіантах виконання цього винаходу способи отримання рослин або частин рослин, як описано в цьому документі, відповідно до цього винаходу, як-от способи отримання рослин або частин рослин, які мають поліпшену перетравлюваність, включають або містять трансгенез та/або редагування генів, та/або редагування основ, наприклад, що включають CRISPR/Cas, TALEN, ZFN, мегануклеази; (індукований) мутагенез, який може або не може бути випадковим мутагенезом, як-от TILLING. У певних варіантах виконання цього винаходу способи отримання рослин або частин рослин, як описано в цьому документі, відповідно до цього винаходу, як-от способи отримання рослин або частин рослин, які мають поліпшену перетравлюваність, включають або містять застосування РНКі, яка може або не може здійснюватися, містити або включати застосування трансгенів. Наприклад, застосування нетрансгенів може включати нанесення компонентів РНКі, як-от дволанцюжкові siРНК, на рослини або поверхні рослин, наприклад у вигляді спрею. Стабільна інтеграція в геном рослини не потрібна.

У певних варіантах виконання цього винаходу способи отримання рослин або частин рослин, як описано в цьому документі, відповідно до цього винаходу, як-от способи отримання рослин або частин рослин, які мають поліпшену перетравлюваність, не включають або не містять трансгенез, редагування генів, редагування основ та/або мутагенез.

У певних варіантах виконання цього винаходу способи отримання рослин або частин рослин, як описано в цьому документі, відповідно до цього винаходу, як-от способи отримання рослин або частин рослин, які мають поліпшену перетравлюваність, включають, містять або складаються із селекції та вибору.

У певних варіантах виконання цього винаходу способи отримання рослин або частин рослин, як описано в цьому документі, відповідно до цього винаходу, як-от способи отримання рослин або частин рослин, які мають поліпшену перетравлюваність, не включають, не містять або не складаються із селекції та вибору.

В одному аспекті, цей винахід стосується рослини або частини рослини, отриманої або одержуваної способами за цим винаходом, як описано в цьому документі, як-от способи отримання рослин або частин рослин, які мають поліпшену перетравлюваність.

У певних варіантах виконання цього винаходу ген F35H дикого типу або немутований ген F35H містить

(i) нуклеотидну послідовність, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1, 4 або 7;

(ii) нуклеотидну послідовність, що має сДНК, або кодувальну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, 5 або 8;

(iii) нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3, 6 або 9;

(iv) нуклеотидну послідовність, що має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 або 8; наприклад, щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більшу ідентичність послідовностей, у переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 85 % ідентичність послідовностей, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 90 % ідентичність послідовностей або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей;

(v) нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 3, 6 або 9; наприклад, щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більшу ідентичність послідовностей, у переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 85 % ідентичність послідовностей, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 90 % ідентичність послідовностей або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей;

(vi) нуклеотидну послідовність, що гібридується зі зворотним комплементом нуклеотидної послідовності, як визначено в пунктах (i), (ii) або (iii), у жорстких умовах гібридизації; та

(vii) нуклеотидну послідовність, що кодує білок, отриманий з амінокислотної послідовності, кодованої нуклеотидною послідовністю за будь-яким з пунктів (i)–(vi) шляхом заміщення, делеції та/або додавання щонайменше однієї амінокислоти.

У певних варіантах виконання цього винаходу ген F35H дикого типу або немутований ген F35H містить

(i) нуклеотидну послідовність, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1, 4 або 7;

(ii) нуклеотидну послідовність, що має сДНК, або кодувальну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, 5 або 8;

(iii) нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3, 6 або 9;

У певних варіантах виконання цього винаходу ген F35H дикого типу або немутований ген F35H містить

(i) нуклеотидну послідовність, що має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 або 8; наприклад, щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більшу ідентичність послідовностей, у переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 85 % ідентичність послідовностей, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 90 % ідентичність послідовностей або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей; або

(ii) нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 3, 6 або 9; наприклад, щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більшу ідентичність послідовностей, у переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 85 % ідентичність послідовностей, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 90 % ідентичність послідовностей або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей.

У певних варіантах виконання цього винаходу ген F35H дикого типу або немутований ген F35H містить

(i) нуклеотидну послідовність, що має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 2, 5 або 8; наприклад, щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більшу ідентичність послідовностей, у переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 85 % ідентичність послідовностей, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 90 % ідентичність послідовностей або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей; або

(ii) нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 3, 6 або 9; наприклад, щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більшу ідентичність послідовностей, у переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 85 % ідентичність послідовностей, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 90 % ідентичність послідовностей або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей.

У певних варіантах виконання цього винаходу ген F35H дикого типу або немутований ген F35H містить

(i) нуклеотидну послідовність, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1, 4 або 7;

(ii) нуклеотидну послідовність, що має сДНК, або кодувальну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, 5 або 8;

5 (iii) нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3, 6 або 9;

(iv) нуклеотидну послідовність, що має щонайменше 60 % ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 або 8, або SEQ ID NO: 2, 5 або 8; наприклад, щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 10 більшу ідентичність послідовностей, у переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 85 % ідентичність послідовностей, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 90 % ідентичність послідовностей або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей;

(v) нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має щонайменше 60 % 15 ідентичність із послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 3, 6 або 9; наприклад, щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більшу ідентичність послідовностей, у переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 85 % ідентичність послідовностей, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу щонайменше 90 % ідентичність послідовностей або щонайменше 95 % ідентичність 20 послідовностей;

У певних варіантах виконання цього винаходу ген F35H дикого типу або немутований ген F35H містить

(i) нуклеотидну послідовність, що гібридизується зі зворотним комплементом нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 1, 4 або 7, або в SEQ ID NO: 2, 5, або 8, у жорстких 25 умовах гібридизації.

У певних варіантах виконання цього винаходу ген F35H дикого типу або немутований ген F35H містить

(i) нуклеотидну послідовність, що кодує білок, отриманий із поліпептиду, що кодується нуклеотидною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 1, 4 або 7, або в SEQ ID NO: 2, 5 30 або 8, шляхом заміщення, делеції та/або додавання щонайменше однієї амінокислоти.

Фахівцеві в цій області техніки буде зрозуміло, що продукт гена F35H дикого типу або продукт немутованого гена F35H є функціональним продуктом гена, що володіє ферментативною активністю, як визначено в іншому місці цього документа. Фахівцеві в цій області техніки також буде зрозуміло, що варіанти послідовностей, описані вище для F35H 35 дикого типу, не включають зсування рамки зчитування або нонсенс-мутації.

У контексті цього документа мутований F35H або мутація у F35H може містити або може стосуватися будь-якого типу мутації F35H. У певних варіантах виконання цього винаходу мутація змінює експресію білка F35H дикого типу або нативного білка F35H та/або mPHK. У певних варіантах виконання цього винаходу мутація зменшує або елімінує експресію білка F35H 40 (дикого типу або нативного) та/або mPHK, як описано в іншому місці цього документа. Мутації можуть впливати на транскрипцію та/або трансляцію. Мутації можуть відбуватися в екзонах або інтронах. Мутації можуть відбуватися в регуляторних елементах, як-от промотори, енхансери, термінатори, інсулятори тощо. Мутації можуть відбуватися в кодувальних послідовностях. Мутації можуть відбуватися в сайтах сигналу сплайсингу, як-от сайти донора сплайсингу або акцептора сплайсингу. Мутації можуть бути мутаціями зсування рамки зчитування. Мутації можуть бути нонсенс-мутаціями. Мутації можуть бути інсерцією або делецією щонайменше одного нуклеотиду. Мутації можуть бути неконсервативними мутаціями (за яких щонайменше одна амінокислота дикого типу замінена щонайменше однією амінокислотою не дикого типу). Мутації можуть впливати або змінювати функцію білка F35H, наприклад ферментативну 50 активність. Мутації можуть зменшувати або (по суті) елімінувати функцію білка F35H, наприклад ферментативну активність. Зменшена функція, як-от зменшена ферментативна активність, може стосуватися зменшення, приблизно щонайменше на 10 %, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 30 %, у більш переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 50 %, наприклад, щонайменше на 20 %, 40 %, 60 %, 80 % або 55 більше, наприклад, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або більше. (По суті) елімінована функція, як-от (по суті) елімінована ферментативна активність, може стосуватися зменшення щонайменше на 80 %, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше на 90 %, у більш переважному варіанті виконання винаходу – щонайменше на 95 %. Мутації можуть бути домінантними негативними мутаціями. У певних

варіантах виконання цього винаходу мутації оцінюються щодо інбредної лінії кукурудзи PH207, як визначено в іншому місці цього документа.

У певних варіантах виконання цього винаходу мутація F35H є інсерцією щонайменше одного нуклеотиду в кодувальну послідовність. У певних варіантах виконання цього винаходу мутація F35H є нонсенс-мутацією. У певних варіантах виконання цього винаходу мутація F35H призводить до зміненої експресії гена F35H. У певних варіантах виконання цього винаходу мутація F35H призводить до нокауту гена F35H або нокауту mPHK та/або білка F35H. У певних варіантах виконання цього винаходу мутація призводить до зсування рамки зчитування кодувальної послідовності F35H. У певних варіантах виконання цього винаходу мутація призводить до зміненої послідовності білка, кодованої геном F35H.

У певних варіантах виконання цього винаходу мутація F35H є інсерцією, у переважному варіанті виконання цього винаходу – в екзон, у переважному варіанті виконання цього винаходу – інсерцією в перший екзон щонайменше одного нуклеотиду, у переважному варіанті виконання цього винаходу – інсерцією зсування рамки зчитування. У певних варіантах виконання цього винаходу інсерція включає 187 нуклеотидів або приблизно 187 нуклеотидів. У певних варіантах виконання цього винаходу інсерція перебуває між положеннями 97 і 98 гена F35H, представленого нуклеотидною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 1. Фахівець у цій області техніки може визначити відповідне положення в гомологах або ортологах F35H. У певних варіантах виконання цього винаходу інсерція містить або складається з нуклеотидної послідовності, представлені в SEQ ID NO: 10. У певних варіантах виконання цього винаходу мутований ген F35H містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11. В альтернативному варіанті виконання цього винаходу мутація є заміщенням, у переважному варіанті виконання цього винаходу – заміщенням щонайменше однієї нуклеїнової кислоти, що призводить до обміну щонайменше однієї амінокислоти, або призводить до перетворення кодону, що кодує амінокислоту, на стоп-кодон. У переважних варіантах виконання цього винаходу мутований ген F35H містить нуклеотидну послідовність, що кодує одну з амінокислотних послідовностей, вибраних із групи, що складається із SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 або 40. Така нуклеотидна послідовність може бути вибраною з групи, що складається із SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 або 39. Докладнішу інформацію про послідовність можна знайти в Таблиці 3.

Експресія mPHK та/або білка F35H може бути зменшена або елімінована за допомогою мутації самого гена F35H (включно з кодувальним, некодувальним і регуляторним елементом). Способи введення мутацій описано в іншій частині цього документа. В альтернативному варіанті виконання цього винаходу експресія mPHK та/або білка F35H може бути зменшена або елімінована за допомогою (зокрема) втручання в транскрипцію та/або трансляцію, наприклад для зниження або елімінування транскрипції або трансляції mPHK та/або білка. В альтернативному варіанті виконання цього винаходу експресія mPHK та/або білка F35H може бути зменшена або елімінована за допомогою (зокрема) втручання в стабільність mPHK та/або білка, наприклад для зменшення стабільності mPHK та/або білка. Наприклад, mPHK (стабільність) може бути зменшена за допомогою РНКі, як описано в іншому місці цього документа. Також mPHK можна використовувати для здійснення впливу на mPHK (стабільність). У певних варіантах виконання цього винаходу зменшена експресія F35H, яка досягається за допомогою зменшення стабільності mPHK або білка, також охоплюється терміном "мутований" F35H. У певних варіантах виконання цього винаходу зменшена експресія F35H, яка досягається за допомогою зменшення стабільності mPHK або білка, не охоплюється терміном "мутований" F35H.

У певних варіантах виконання цього винаходу (молекулярні) маркерні алелі, асоційовані з поліпшеною перетравлюваністю, як описано в цьому документі, визначаються таким чином:

ma61134xxx є інсерцією щонайменше одного нуклеотиду між положеннями 134254381 і 134254382 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, у переважному варіанті виконання цього винаходу – інсерцією, представленою в SEQ ID NO: 12; та/або

ma61070s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 121588825 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Т, у переважному варіанті виконання цього винаходу – одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 13; та/або

ma30168s02 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 139452428 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Г, у переважному варіанті виконання цього винаходу – одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 14; та/або

ma50827s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 127454426 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 15; та/або

5 ma16983s02 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 137363784 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 16; та/або

10 ma17117s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 132038900 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 17; та/або

15 ma61125s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 135947973 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є A або G, у переважному варіанті виконання цього винаходу – одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 18;

20 у переважному варіанті виконання цього винаходу, водночас PH207 належить до інбредної лінії Zea mays, як описано в роботі "Проект збірки елітної інбредної лінії PH207 дає уявлення про геномну та транскриптомну різноманітність кукурудзи", Хірш та ін., Plant Cell. 2016, листопад; 28(11): 2700-2714. Опубліковано онлайн 2016 1 листопада. doi: 10.1105/tpc.16.00353.

25 У певних варіантах виконання цього винаходу інсерція, асоційована з маркерним алелем ma61134xxx, є інсерцією зсування рамки зчитування. У певних варіантах виконання цього винаходу інсерція, асоційована з маркерним алелем ma61134xxx, є інсерцією нуклеотидної послідовності, представленої SEQ ID NO: 10. У певних варіантах виконання цього винаходу маркерний алель ma61134xxx містить або складається з (безперервної) нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 12.

У певних варіантах виконання цього винаходу маркерний алель ma61070s01 містить або складається з (безперервної) нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 13.

30 У певних варіантах виконання цього винаходу маркерний алель ma30168s02 містить або складається з (безперервної) нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 14.

У певних варіантах виконання цього винаходу маркерний алель ma50827s01 містить або складається з (безперервної) нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 15.

35 У певних варіантах виконання цього винаходу маркерний алель ma16983s02 містить або складається з (безперервної) нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 16.

У певних варіантах виконання цього винаходу маркерний алель ma17117s01 містить або складається з (безперервної) нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 17.

У певних варіантах виконання цього винаходу маркерний алель 61125s01 містить або складається з (безперервної) нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 18.

40 В одному аспекті, цей винахід належить до використання щонайменше одного (молекулярного) маркера, описаного в цьому документі, для ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю. В одному аспекті, цей винахід належить до використання щонайменше одного (молекулярного) маркера, описаного в цьому документі, який здатний визначати щонайменше одну діагностичний маркерний алель для ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю. В одному аспекті, цей винахід належить до визначення щонайменше одного (молекулярного) маркера, описаного в цьому документі, для ідентифікації рослини або частини рослини, що володіє поліпшеною перетравлюваністю.

50 Маркерні алелі за цим винаходом, описані в цьому документі, можуть бути діагностичними маркерними алелями, які можуть бути використані для ідентифікації або вибору рослин чи частин рослин, які володіють поліпшеною перетравлюваністю, у переважному варіанті виконання цього винаходу – поліпшеною перетравлюваністю стерні.

В одному аспекті, цей винахід належить до (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить (молекулярний) маркерний алель за цим винаходом, або комплемент, або зворотний комплемент (молекулярного) маркерного алеля за цим винаходом. У певних варіантах виконання цей винахід належить до полінуклеїнової кислоти, що містить щонайменше 10 безперервних нуклеотидів, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 15 безперервних нуклеотидів або щонайменше 20 безперервних нуклеотидів (молекулярного) маркерного алеля за цим винаходом, або комплемент, або зворотний комплемент (молекулярного) маркерного алеля за цим винаходом. У певних варіантах виконання цей винахід належить до полінуклеїнової кислоти, що містить щонайменше 10 безперервних

нуклеотидів, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше 15 безперервних нуклеотидів або щонайменше 20 безперервних нуклеотидів, представлених у будь-якому із SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18, або комплемент, або зворотний комплемент, представлений у будь-якому із SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18. У певних варіантах виконання цього винаходу полінуклеїнова кислота здатна розрізняти (молекулярний) маркерний алель за цим винаходом й немоллекулярний маркерний алель, наприклад специфічно гібридизуватися з (молекулярним) маркерним алелем за цим винаходом. У певних варіантах виконання цього винаходу полінуклеїнова кислота здатна гібридизуватися з унікальним фрагментом нуклеотиду або ділянкою, представленою в будь-якому із SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18, або з комплементом, або зі зворотним комплементом, представленим у будь-якому із SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18. Треба розуміти, що унікальна ділянка або фрагмент, у переважному варіанті виконання цього винаходу, належить до ділянки або фрагмента, який містить SNP або відповідні маркерні алелі за цим винаходом (як-от маркерні алелі ma61070s01, ma30168s02, ma50827s01, ma16983s02, ma17117s01 або ma61125s01), або до ділянки або фрагмента, який містить 5' або 3' з'єднання вставки маркерного алеля за цим винаходом, або до ділянки або фракції, що міститься в межах вставки маркерного алеля за цим винаходом (як-от маркерний алель ma61134xxx). У певних варіантах виконання цього винаходу полінуклеїнова кислота або її комплемент, або зворотний комплемент НЕ гібридується (по суті) або не зв'язується з (геномною) ДНК, що походить з інбредної лінії кукурудзи PH207. У певних варіантах виконання цього винаходу послідовність полінуклеїнової кислоти або її комплемент, або зворотний комплемент не зустрічається або не присутній в інбредній лінії кукурудзи PH207.

В одному аспекті, цей винахід належить до полінуклеїнової кислоти, здатної специфічно гібридизуватися з (молекулярним) маркерним алелем за цим винаходом, або з його комплементом, або зворотним комплементом.

В окремих випадках виконання цей винахід належить до полінуклеїнової кислоти, що специфічно гібридується з будь-якою з послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18, або з її комплементом, або зворотним комплементом.

У певних варіантах виконання цього винаходу полінуклеїнова кислота є праймером. У певних варіантах виконання цього винаходу полінуклеїнова кислота є зондом.

У певних варіантах виконання цього винаходу полінуклеїнова кислота є алель-специфічною полінуклеїновою кислотою, як-от алель-специфічний праймер або зонд.

У певних варіантах виконання цього винаходу полінуклеїнова кислота містить щонайменше 15 нуклеотидів, наприклад, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, або 25 нуклеотидів, наприклад, щонайменше 30, 35, 40, 45 або 50 нуклеотидів, наприклад щонайменше 100, 200, 300 або 500 нуклеотидів.

Треба розуміти, що "специфічна гібридизація" означає, що полінуклеїнова кислота гібридується з (молекулярним) маркерним алелем (наприклад, у жорстких умовах гібридизації, як визначено в іншому місці цього документа), але (по суті) не гібридується з полінуклеїновою кислотою, яка не містить маркерного алеля, або (по суті) не може бути використана як праймер PCR. Наприклад, у потрібному зчитувальному пристрої сигнал гібридизації з маркерним алелем або PCR-ампліфікація маркерного алеля щонайменше в 5 разів, у переважному варіанті виконання цього винаходу – щонайменше в 10 разів, сильніше або більше, ніж сигнал гібридизації з немаркерним алелем або з будь-якою іншою послідовністю.

В одному аспекті, цей винахід належить до набору, який містить такі полінуклеїнові кислоти, як, наприклад, праймери (який містить прямі та/або зворотні праймери) та/або зонди. Набір також може містити інструкції щодо використання.

Треба розуміти, що у варіантах виконання цього винаходу, що належать до набору прямих і зворотних праймерів, може знадобитися, щоб тільки один з обох праймерів (прямий або зворотний) був здатний розрізняти (молекулярний) маркерний алель за цим винаходом й немаркерний алель, а отже, може бути унікальним. Інший праймер може або не може бути здатним розрізняти (молекулярний) маркерний алель за цим винаходом й немаркерний алель, а отже, може бути унікальним.

В іншому аспекті, цей винахід належить до способу продукування силосованого рослинного матеріалу або корму для тварин, що володіє поліпшеною перетравлюваністю, який передбачає (а) вирощування рослини за цим винаходом, (б) збирання рослини або її частин, (с) необов'язкове подрібнення та/або дроблення рослини та (d) силосування рослини, необов'язково шляхом додавання стимулятора, як-от бактеріальний інокулянт, цукор і фермент.

Крім того, цей винахід належить до силосованого рослинного матеріалу або корму для тварин, продукovanого в згаданий спосіб.

В одному аспекті, цей винахід належить до способу продукування біогазу або біоетанолу, який містить такі етапи: (А) пропозицію рослини або частин рослини за цим винаходом або силосованого рослинного матеріалу за цим винаходом і (b) продукування біогазу або біоетанолу з рослини або силосованого рослинного матеріалу.

Аспекти й варіанти виконання цього винаходу також підтверджуються описаними нижче необмежувальними прикладами.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1

Експеримент з QTL щодо перетравлюваності стерні було здійснено на двох популяціях DH (подвійний гаплоїд). В обох популяціях QTL із сильним ефектом було ідентифіковано в одному й тому ж хромосомному положенні на хромосомі 9 (Фігура 1). Видається, що область QTL не містить жодного з відомих охарактеризованих генів метаболізму лігніну.

Аналізування на основі маркерів із використанням генотипування SNP високої щільності за допомогою SNP-чипа не виявило поліморфізмів між лінією, що містить позитивний алель QTL, та іншими комерційно доступними лініями. Використовуючи цей ефект, було здійснено експеримент із захоплення послідовності з використанням лінії, що несе QTL, і контрольної лінії. Оскільки в той час єдиною геномною еталонною послідовністю була AGPv02, зонди для захоплення послідовностей було розроблено на основі цього еталону. Аналізування даних виявилось дуже складним через високу повторюваність області й частково низький рівень подібності між областю в B73 (AGPv02) та алелем QTL. Унаслідок цього експерименту було розроблено один маркер, ma60405s01, що показує поліморфізм між двома лініями в області QTL.

Для подальшої ідентифікації, в переважному варіанті виконання цього винаходу – поліморфних маркерів, було здійснено WGS (повногеномне секвенування) однієї лінії, яка несе QTL. Вибирали каркаси, що охоплюють мішень, і порівнювали їх з еталонним геномом PH207 ("Проект збірки елітної інбредної лінії PH207 дає уявлення про геномну та транскриптомну різноманітність кукурудзи", Хірш та ін., Plant Cell. 2016, листопад; 28(11): 2700-2714. Опубліковано онлайн 2016 1 листопада. doi: 10.1105/tpc.16.00353). Можна ідентифікувати ще три поліморфних маркери (ma61126d01, ma61134xxx і ma61125s01, див. Фігуру 2). Їхні специфічні алелі QTL унікальні, і їх не можна визначити в жодній лінії KWS, використовуваний для селекції силосної кукурудзи.

Тонке картування QTL звузило область спочатку до 16,7 млн п.о., а на останньому етапі – до близько 719 т.п.о. на еталонній лінії PH207 (див. Фігуру 3 й Таблицю 1). На Фігурі 3 показано два сімейства рекомбінантів, отриманих із лінії QTL (B), схрещеної з лінією, що не несе QTL (A). Зазначене значення DNDF є середнім значенням для всіх членів сімейства з QTL або без QTL відповідно. Маркер, який найкраще асоційований із фенотипом в останніх рекомбінантах, є ma61134xxx. Він є інсерцією з 187 п.о. в гені, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (званий F35H, див. Фігуру 4). Ця інсерція викликає подовження N-кінця білка й ранній стоп-кодон, що призводить, імовірно, до нокауту гена. Відповідний ген AGPv02 експресується в листі та стеблі. Він стоїть на початку метаболізму флавоноїда, забираючи ресурси з метаболічного шляху лігніну.

Таблиця 1

Список маркерів для QTL силосу або гена, як такого

маркер	хром	генетична карта [положення в cM]	звичайна лінія PH207 [положення в п.о.]
ma61070s01	9		121588825
ma50827s01	9		127454426
ma17117s01	9		132038900
ma60405s01	9	55,054	133444836
ma61134xxx	9	55,98	134254381
ma61125s01	9	56,224	135947973
ma16983s02	9		137363784
ma30168s02	9		139452428

У межах області, що містить 133,4-135,9 млн п.о., хромосоми 9 у лінії PH207 усі інші гіпотетичні гени, отримані з внутрішньої маркерної анотації PH207, було перевірено на поліморфізм між лінією QTL і PH207. З понад 100 генів тільки описаний показав поліморфізм. 79 генів були ідентичними. Решта були переважно повторюваними або лише частково

представленими в збірці QTL-лінії.

Капілярний маркер ma61134xxx міг би бути перетвореним на пару доміантних маркерів KASP і на кодомінантний маркер KASP, усі три доступні для використання у визначеному порядку.

Найбільш важливий діагностичний маркер ma61134xxx спрямований на інсерцію в причинний ген. Інсерція присутня в генотипі, що несе QTL силосу, і відсутня в еталонній лінії PH207. У PH207 наступна послідовність не присутня в гені (SEQ ID NO: 10):

CTTCTGCCCAGAAGCGGGCCAGACATTTGAGATTGGGTATTCAAAAATTCAAAAGATTAAAG
AATTTAGTGTTCCTAACGCTATTTTATGCAATCATTTGACAAATTAGTGTTCCTAACACTATAGAT
CACCAAAAACATGGGTATTCAATGAATACCCATGAAACCCCTGGGCCCGCCCATG

Фахівець у цій області техніки може сконструювати маркери для відомих маркерних систем, які дають змогу визначати присутність або відсутність інсерції.

Крім того, фахівець у цій області техніки також може знайти маркери для відомих маркерних систем, які є придатними для подальшого аналізу області QTL силосу, а також маркери, які мають діагностичну цінність, засновані, наприклад, на одонуклеотидних поліморфізмах (SNP) або Інделях (див. приклади в Таблиці 2).

Таблиця 2

Маркерні алелі в лінії QTL

Маркер	Алель лінії QTL
ma61070s01	T (що міститься в SEQ ID NO: 13)
ma50827s01	A (що міститься в SEQ ID NO: 15)
ma17117s01	A (що міститься в SEQ ID NO: 17)
ma61134xxx	Cttctgcccagaagcgggcccagacatttgagattgggtattcaaaaattcaaaagattaaagaatttagtgtt ctaacgctattttatgcaatacattattgacaaattagtggttctaactatagatcaccaaaaacatgggtattc aatgaatacccatgaaa cccccctgggcccgcctatg (SEQ ID NO: 10 (що міститься в SEQ ID NO: 12)
ma61125s01	G (що міститься в SEQ ID NO: 18)
ma16983s02	G (що міститься в SEQ ID NO: 16)
ma30168s02	G (що міститься в SEQ ID NO: 14)

На завершення, цей винахід описує ідентифікацію маркерного гаплотипу, що охоплює 3,8 млн п.о. лінії PH207 (див. Фігуру 2), і містить опис генотипу лінії QTL в області-мішені: Набір маркерів, ідентифікованих під час картування (див. Таблиці 1 і 2), може бути використаним для інтеграції позитивного QTL у будь-який релевантний генетичний фон. Найбільш важливим є діагностичний маркер для інсерції, яка є функціональною мутацією. Однак використання маркерів поза геном в області, яка фланкує, тісно зчеплений з геном, також може бути використано для ідентифікації генотипу лінії QTL. Унікальний гаплотип маркерів (див. Фігуру 2) може використовуватися для різного застосування з використанням маркерів, тобто для інтрогресії ознак за допомогою зворотного схрещування або прямої селекції, а також для моніторингу присутності унікального гаплотипу силосу. Крім того, розроблені маркери можуть бути використані для збільшення генетичної варіації в цій хромосомній області та збереження ефективного алеля силосу. Далі описується ідентифікація гена для мішені: Знання щодо гена і виявленої інсерції (функціональної мутації) може бути використано для збільшення генетичної варіації в цьому локусі або за допомогою TILLING, або за допомогою редагування генома, або за допомогою генетичної модифікації для подальшого посилення ефекту.

ПРИКЛАД 2

Для функціональної валідації здійснюють аналізи із секвенування РНК на листовому матеріалі двох ліній QTL, які несуть мутований F35H у зубчику та кремнієвому фоні. Лінія 5F279 без мутованого F35H слугує контролем. Результати свідчать, що інсерція експресована й викликає зсування рамки зчитування (Фігура 5).

Крім того, було ідентифіковано та спрогнозовано кілька мутантів TILLING для нативного гена F35H у популяції з EMS TILLING лінії PH207 (Таблиця 3). Для валідації було використано два мутанти TILLING (P434L (названий PH207m023a) і W426stop (названий PH207m023b)).

Таблиця 3

Ідентифіковані та спрогнозовані (*) мутанти TILLING

ген	ID (ідентифікаційний номер) мутанта	мутація	гДНК	білок
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023a	P434L	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023b	W426stop	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023c	R252W	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023d	R405H	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023e	P407L	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023f	E427K	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023g	G450R	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023h*	P429S	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023i*	P429L	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023j*	R436C	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023k*	Q44stop	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40

- Уже під час попереднього дослідження було визначено, що ідентифікований ефект QTL можна швидко піддати скринінгу в тепличних умовах. У першому поколінні з насіння від нових ідентифікованих мутантів F35H виростили рослини, вибрали самозапилювані й гомозиготні рослини дикого типу, і гомозиготні рослини-мутанти. Кожен гомозиготний клас представляє один клас. Класи відрізняються різною фіксацією фонових мутацій. З цього вибраного гомозиготного насіння було вирощено рослини для фенотипування в другому поколінні. Таким чином, можна здійснити дослідження й фенотипування різних класів мутантів. Усі класи досліджували на PDNDF (Таблиця 4) та обчислювали середнє значення для класів дикого типу й мутантів. Для групи дикого типу середнє значення становить 56,7, а для групи мутантів – 63,7, що значно вище.

Таблиця 4

Вегетаційний дослід для швидкої валідації Мутантів для гена F35H

ген	мутант, ID	повторюваність	варіанти	PDNDF
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023a	1	20	63,7
F35H-ДИКОГО ТИПУ	PH207m023a	1	20	56,4
F35H-МУТОВАНИЙ	PH207m023b	4	2	64,1
F35H-ДИКОГО ТИПУ	PH207m023b	2	1	62,9

- Мутантні лінії показали ті ж або навіть поліпшені ефекти щодо перетравлюваності. Таким чином, нові ідентифіковані мутації у F35H є варіантами алелів, які значною мірою поліпшують перетравлювання. Зокрема, мутант PH207m023a показав значний ефект (Фігура 6).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> КВС СААТ СЕ ЕНД Ко. КГаА

<120> РОСЛИНИ З ПОЛІПШЕНОЮ ПЕРЕТРАВЛЮВАНІСТЮ ТА МАРКЕРНИМИ ГАПЛОТИПАМИ

<130> KWS0277PCT

<150> EP18169122.1

<151> 2018-04-24

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4215

<212> ДНК

<213> Zea mays

<400> 1

```

atgcagctcg cggcggttggtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgccctt cctctgcctc      60
ctctccaacg tggctcttcg ctgctgctg caccctctctt ctgcgcctc ttcttcggg      120
cgccgggggc agctcccgcc ggggcccacg ggcttgccga tctcgggcgc gctgccactc      180
gtgggcccag ccccgacgc cggcctggcc gcgctgggcg gcaagtacgg tcccatcatg      240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtgggtg gtggcgctgt ccccgcggcg ggcgcggacg      300
ttctcaagg cgttggaagc gcggtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cgcgcggac      360
atcacgtacg ggccggcagaa catggtgttc gccgactacg ggcccaagtg gaagctgatg      420
cggaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcgcggactg ggcgtgctg      480
cggcgcggcg aggcgggcca cgtgctgcgc gcgctggcgg aggcggccgc ggcgcggcgg      540
cccgtgctcg tgcggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca      600
gtgagcaagc ggggtgttga cgcgcagggg gacgactcga acaggtaggg atgggaggtc      660
catgaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagttcct ttggaagaa aagaacatat      720
ttttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttcg ataaagtgtg taaaaaaaat      780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt      840
ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac      900
ttaatgcgat cgtttttctc gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct      960
tgagagatga gtttacctgc ttgtcttita ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca      1020

```

tggaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg	1080
tctatagttg ttgatatat tttattaagg acaccctcca acgtggtggt gtgtagtggt	1140
ggaaggigtg atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtggt	1200
gatgatttaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtcctcta	1260
ttgcaaatgc tagacggaac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa	1320
acttaaaaag atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa	1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggccgct	1440
cgataaataa ttaatgagag tcttgggatt tticcatgcat gaaaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcatct aatataatat ataacgctga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgctgacggg caccgggcatg ttcaacatca gcgacttcgt gccggcgtg	1620
gcgcgtctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgcggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggaccg cgcgcgccag	1740
ggccgcccgg acttcgtcga ccggctccgc gccacgatgg accccggcgc cgcgcgccac	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gcctcatctt cgtaaagctcc	1860
ctgctttttc ctgcacccca accatgcac atcatatgca cttatatttt acacttgctc	1920
ggtttttctt tagtaactaa ctaatccgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtacta	1980
cagcgatggg tcatcggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctc acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtggcg tgtaggtgg agatagtggg tcgagttggt ggaaagacaa tatcaaaacc	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccaccttg tttggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaataa tggttccaat gtaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttcga gtagcacatc caggttgggt tcgatcctct caggggcgaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtccccg tcgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga caccctcga ctagtgacag ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaaaaaag tggagacgta gatatgatag aggttccctt tctaagcaa acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagttta aaaaaaacct taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatata ttatcgagtc gacttttatg gaattattgt	2640

ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt tttttcaagg gatttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttcctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtcgggcata	2940
gggaatgcac tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcctagacta	3060
gaagaattgg tagtcaaate gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcttt cgacacagtg	3120
ataccaaaag tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttcggtgttg gtgtaaacga	3180
ccaaagatgc tgaataatac tgatcgtcac catccgtgaa tctaactttc gacacactgt	3240
taccaaatcc ttcgtaaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat	3300
tttttgtcac taattaacca cactgttttt tgcttgaccg tgacaaaaaa aaactttttt	3360
gtgaagcagt gttgcggtaa accacaacca tcatgaactc acttgccctg tcatatgtac	3420
ttgtaccatc gaacgcgcgc cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcactg	3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actatttttt	3540
ttcggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gtccgcagg acatgttcac ggcgggtacg	3600
gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtgggcg atggcggaga tgctcaagaa cccgaccgtc	3660
atggcgcgcg cgcaaggagg getggaccgc ggggtgggac ggggcggcg cctggaggag	3720
tgggacctgc cgggctctcc ctacctgcag ggggtgtgca aggaggccat ggggtgcac	3780
cgtccacgc cgctcagcct ccgcacttc tccctggacg cctgcgacga cgtcgacggc	3840
taccgcgtcc cggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg cggggacctg	3900
gaggcctggg agaggccctt cgaattccgc ccgagcgct tctgcccgg gggcggcgcg	3960
gagaaggctg accccctggg gaactgcttc gagctcatcc cgttcggcgc cggcgggagg	4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggtg ttcggtgcagt acttcttggg cacgctgctg	4080
cacgcgttcg actgggcctt gcctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc	4140
ggcctcgcgc tgcccaaggc agtgccgctc cgcgcgctcg ccacgcacg gctcgtgccc	4200
gaagcctatg cctga	4215

<210> 2
 <211> 1584
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> «ДНК з SEQ ID NO: 1»

<400> 2
 atgcagctcg cggcgtttgtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgctt cctctgcctc 60
 ctctccacg tggctcttcg ctgctgctg caccctcctt ctgccgcctc ttctctcggg 120
 cggcggggg agctcccgcg gggggcaccg ggcttgccga tctcggggc gctgccactc 180
 gtggggcccag ccccgacgc cggcctgggc ggcttgggc gcaagtaagg tcccatcatg 240
 taactgaaga tgggcacggc cggcgtggtg gtggcgtgt ccccggggc ggcgcgagac 300
 ttctcaagg cgttggaagc ggcgtacgc aaccggccgg ccgtggcgag cggcgggac 360
 atcagtaagc ggccgcagaa catggtgttc gcggactacg ggcccaagtg gaagctgatg 420
 cggaaagctc ccagcgtgca cctgctcggc ggcgcgcggc tcggcgactg ggcgtgctg 480
 cggcggggc aggcgggcca cgtgctggc ggcttgccg aggcgggcgc ggccggcagg 540
 ccgctcgtc tggcggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca 600
 gtgagcaagc ggggtgttcga cggcgagggg gacgactcga acagatacaa ggacatgac 660
 gtgtcgtgc tgaccggcac gggcatgttc aacatcagc acttcgtgc ggcgttggc 720
 cgtctggacc tgcagggcgt gcaggcgaag ctgcggcgcg tccaccgca gttcgacggc 780
 ctcatcacca agctgctggc cgagcacgc gcgacggccg cggaccggc gcgccagggc 840
 cggcgggact tctcgaccg gctcgggcg acgatggagc cggcgccgc cgcgcagac 900
 gagagcggcg agaccatcac cgaggccaac atcaagggc tcatcttcga catgttcacg 960
 ggggtacgg aacgtcgtc gatcctgtg gagtgggcga tggcggagat gctcaagaac 1020
 ccgaccgtca tggcggcggc gcaggaggag ctggaccgc cggtgggcgc gggcggcggc 1080
 ctggaggagt cggacctgc cggcctcccc taactgcagg cggtgtgcaa ggaggccatg 1140
 cggctgcacc cgtccacgc gtcagcctc ccgcacttct ccttggaagc ctgcgacgac 1200
 gtcgacggct acccggtccc ggccaacacc cgcctgctc tcaacgtctg ggccatcggc 1260
 cgggacccgg aggcctggga gaggccctc gaattccgc ccgagcgctt cctgcccggg 1320

```

ggcggcgccg agaaggatga cccctgggg aactgcttcg agctcctccc gttcggcgcc 1380
ggccggagga tctgcgggg gaagctggcg ggcctgggtgt tctgcagta cttcctgggc 1440
acgctgctgc acgcttcga ctggcgctg cctgacggcg aggagaagct ggacatgagc 1500
gagacgttcg gctcgcgct gcccaaggca gtgcgctcc gcgcgctgc cagccacgg 1560
ctcgtgccgg aagcctatgc ctga 1584

```

<210> 3
 <211> 527
 <212> NPT
 <213> Zea mays

<400> 3

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
 1 5 10 15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
 20 25 30

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
 35 40 45

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
 50 55 60

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg
 85 90 95

Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Asn Arg
 100 105 110

Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Arg Gln Asn Met
 115 120 125

Val Phe Ala Asp Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys Leu Ala
 130 135 140

Ser Val His Leu Leu Gly Ala Arg Ala Leu Ala Asp Trp Ala Cys Val
145 150 155 160

Arg Arg Gly Glu Ala Gly His Val Leu Arg Gly Val Ala Glu Ala Ala
165 170 175

Ala Ala Gly Arg Pro Val Val Val Pro Glu Leu Leu Val Cys Ala Leu
180 185 190

Ala Asn Ile Val Gly Gln Ile Thr Val Ser Lys Arg Val Phe Asp Ala
195 200 205

Gln Gly Asp Asp Ser Asn Arg Tyr Lys Asp Met Ile Val Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Gly Thr Gly Met Phe Asn Ile Ser Asp Phe Val Pro Ala Leu Ala
225 230 235 240

Arg Leu Asp Leu Gln Gly Val Gln Ala Lys Leu Arg Arg Val His Arg
245 250 255

Gln Phe Asp Gly Leu Ile Thr Lys Leu Leu Ala Glu His Ala Ala Thr
260 265 270

Ala Ala Asp Arg Ala Arg Gln Gly Arg Pro Asp Phe Val Asp Arg Leu
275 280 285

Arg Ala Thr Met Asp Ala Gly Ala Ala Ala Asp Asp Glu Ser Gly Glu
290 295 300

Thr Ile Thr Glu Val Asn Ile Lys Gly Leu Ile Phe Asp Met Phe Thr
305 310 315 320

Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ile Ile Val Glu Trp Ala Met Ala Glu
325 330 335

Met Leu Lys Asn Pro Thr Val Met Ala Arg Ala Gln Glu Glu Leu Asp
340 345 350

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

355		360		365
Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu His Pro				
370		375		380
Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Leu Asp Ala Cys Asp Asp				
385		390		395 400
Val Asp Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Val Asn Val				
	405		410	415
Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Ala Trp Glu Arg Pro Leu Asp Phe				
	420		425	430
Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala Glu Lys Val Asp Pro				
	435		440	445
Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile				
	450		455	460
Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly				
465		470		475 480
Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys				
	485		490	495
Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro				
	500		505	510
Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala				
	515		520	525

<210> 4
 <211> 5903
 <212> DHK
 <213> Sorghum bicolor

<400> 4	
ccccacgat gtatatgtag ctctgtctgaa aacgggttaaa taataaaaaa agataacaac	60
ggctcccgaga ttctgagtac acagcgccctc atcaccaata taataaacgt cgtgctcgcg	120
gaggcatcct tagcttgggc aggtcctcct ccctagctag ctagcacagt aagccacca	180

tgaagctcgc cgcgttggtc accgaccccg tcgtgctctc ctgcgccttc ctctgcctcc	240
tctctcacct cgtctctcgg tccctgctgc accctttctt tgcgcctctt tctcttggtc	300
ggcgcgcgcg cgcgggcggc caacctccgc cggggccacc gggcctggcg atctctggcg	360
cgttgcact cgtcggccct gcccgcctg cgggcctggc cgcgtggcg cgcaagtag	420
gtcccatcat gtacctgaag atgggcacga cgggcgtcgt ggtggcgtcg tcccgtgctg	480
cggcgaagac gttctcaag gcgttggacg cgaagtagcg caaccggcgg gcggtggcga	540
gcgcgcgcga catcacgtac cggcgccaga acatggtgtt cgcggactac gggcccaagt	600
ggaagctgat gcggaagctc gccagcgtgc acctgctcgg ggcgcgcgcg ctgcgcgact	660
ggcgttgcgt gcggcgcgac gaggcggcgc acctgctcgg cggcgtggcg gaggcggcgc	720
cggcccgcgg gcccgctgct gtgcgggagc tgcctgtgtg cgcgtcgcgc aacatcgtcg	780
ggcagatcac cgtcagcaag cgggtgttcg acgcgcaggg ggtgactca aacagggtgag	840
gctgatcaa agctgcatga aatcctatca acaagacaat gaccatatat atataaggca	900
taaaatccaa gttcatttcg aaaggaaagc acatgttttt cttccaaaat ttcattgatta	960
tccggtgcct taagttggga tgaggtttac aatatctttg aatgggacta gtgagatcag	1020
ttgaactagt tatccttaat taatgcaatg cttgacggaa tgaacatcag cagaccgtta	1080
atgcggaaag cgggggataa aaaaattaaa aagttcagct aggaagctgc tgtcatcggg	1140
tacgtatgag aagactgaag aatcggcatg acgagcactt agtactggca tttagccgga	1200
atgtccttgt tagtcagag agtcgctcac caaaacctga aagcgaaaag agagcgatcg	1260
aaacggcccc tccatcgaca aataataagg agaatcttgt ctttttcat gcatgcattc	1320
atggaaaaaa cacaacctga tcaagtattt ttgcgtctaa catataataa ttctgatacc	1380
atatatgcgt gctgcgtgct gcgtgctgcg tgcaggtaga aggacatgat cgtgtcgtg	1440
ctgacgggca cgggcattgt caacatcagc gacttcgtgc cggcgtggc gcgtctggac	1500
ctgcaggcg tgcaggccaa gctgcggcgg atccaccacc agttcgacgg cctcatcacc	1560
aagctgctgg ccgagcacgc cgcgacggcg gcggaccgcg cgcgccaggg ccgccaggac	1620
ttcgtcgaca ggctccgcgc cactatggac gccggcgcgc acgacgagag cggcgagacc	1680
atcaccgagg tcaacatcaa gggcctcact ttctgaagct ctgcctctct ttatatcttc	1740
ctcaccacca acctctcttc atgcatttat attttaattg ctgccttccc ttgggttgcta	1800

actaaccaac tactaatctg tcgtagctgc aaaaatatgt aatactactg caacaatcga	1860
tcattggccat gggtaactga atcatatact cctccatcc caaattgtaa gtcattccaa	1920
gaattttgaa gagtcaaaact tttcaaagtt tgaccaaatt tatatgataa aataataatt	1980
attatgatar caactaaata tcatttagatt cticccttaat tatattttca tagtatactc	2040
atcttiacgtt acaaatctta gtatttcact ctataatttt ggccaacgt gaaaatgctt	2100
tgactctcca agattcttgg aatgacttar aatttgagat ggaaggagta tatcttcgct	2160
gaaaatgaag tgcacggcat tttgggtgtg cataggagct aagctaagct aagctagtag	2220
ccaccggacc taacggagca ctgacactga ccgaaagctc agcgtgttag gtgaagctgc	2280
tagtggagtt gttggaaaga caatatcaas atcacaatct cgaactcatg agatgatgtg	2340
gggcctgcag ggccggtttt gagtctcca tgatggtagt agctcaaggc ttgtttggtt	2400
caaacattac tagagcaaaa tatggttcaa acattaattg ctaaccgttg aagagtagaa	2460
tgcatatata tgctgtcat gccatggttt tatgagaaga tgcttactat atatttttat	2520
tagataacaa tagggatcac tagatttaat tatctgcga gagaacatac agattttaac	2580
caacctaaat tcacccccgt ctcttgttc tcacggtaga aatataatgt gggtaaaactg	2640
acaaaaaagg catttggttc ctatactttg ttggaaacata tttttaattt gttaggctat	2700
atagcataca gatccaacaa attccacca taaaatatct atcaataagc ataaaagtag	2760
tttaaggaaa tctagaaata ttggaaccac tactagctag aatctgtatg ttttcttagg	2820
attttaattc ctacgaatag aactaaaata tgtaaggaaa acatttccct atcatatttt	2880
gcacaaaaaa aaattctatc gatgcataaa tagtaaaaca cgaaaaatgt tgggacaata	2940
gggacttatt taccccaagg gaaccaaagc acctaaaaat tatacatttc ctgaaggaaa	3000
tttagatagt agttccaaga aaaactagaa aagtggtagc atagatatgc tagggaattc	3060
attccctaag ggaatgagaa tgtatgaaaa ttatacaatt tcaaataagc tctaaagata	3120
aagaggtatt ctcttttctg gaacaaacaa aatatgaaag tgccctcaaa gatcttattg	3180
agtcaacttt tatagaatta tatattgttt ttattatttt taagatggcg tgcaaaatca	3240
agtcataaatt attcagtga agcctcgaga ttctttaagg attaaaaata agtgaagcgg	3300
ttaagattta atcaggaaaa cgatattgga ctctgtcct ccaaccaaac ttgattatga	3360
cgtttttagct taatgttcac tttgtagacg tcggatatat agggatgcga accgaaagga	3420

aaaggctgac gttttaacaa actgcacata tatgttacca gaactcgaat agcagctttg	3480
taagtctcta gaatgttggg gtagttaaca acgtgataga cgatgtaaca cctggaccat	3540
gttattatgt cttttcctag aagaattgta atcaaatcta ttaattaatc aagcaaagaa	3600
ttgaaagcta taaatggcct aaggcaacat ctggttgtga gttgtgtgat taattattgg	3660
tgaatgtcgt gtcagcacta acattattaa ggtcagtctc aatgcatagt ttcattgacac	3720
agttaccaag actataaact aggtaaccga gccacaagag tttcatgggg atgaaactcc	3780
tctctcatct gatgaaactc cttcatttaa tgactctgcc aactcagcaa ttttgcttat	3840
gtggcaccat atttaatgtg catgacactc tcataaaaca tgcattgaga ctggcctaag	3900
gggggtgtta gtgttggact ctttagatcg tctactaggt cgtagatcgg tggggaattt	3960
acttctatit gggataaacc acatagaatt tcatggatct agagagggaat ggaggacgag	4020
aggatgtggt atatactgaa ccataccttt ggggttggcg gagaagcgcg tggtcgaggc	4080
agtggcgggt ggggactttc cgtcgtggc agtgccctcc tctcgatcgg tctagggtta	4140
gatggggact cggggcattg tagcggtgaa ccttgtaact tgtgctctag cctccacct	4200
ctttttata cactgcgcga caggggcctg gcagccaagt tattgggcta gacgcccccg	4260
atcagggcgt ggtcaagggt ccggccaagt ctttggactt gggccagtgg agatcaatct	4320
aacatttagt tcccataaa atacaaaatg tcaactactt tggaatgatg aaatgcaaaa	4380
tatcaaaaat ttcagggttag atccatccaa aatgcagaat ttattgctct cattatagcc	4440
tcttgagact tttttggact tttttggcct cttgaggcca aaatacaaaa tagagaataa	4500
ccacattttt gttaaaaatt ttgcatagta tttattttta ttatgtaaaa taatacacca	4560
aaactcagaa ttttttggga tggaaagggg actaaacacc ccgtgaatct agtcggcaca	4620
atgactcaag caatgaacc actactgttt cagtataagg ttggaaaaca ctgttctcaa	4680
cataacatcg cattgaactct ctctttgtgg gctgtgtggc tttgtgggtc agcttgattg	4740
gagctctta acatatataa catacactgt gcctgctgat gctgagggtg tactgtcatc	4800
aaacacacta aaacagtga ccacaccctt caataatgtc aggtcaact atataaccag	4860
cttatattat atacagtgtt aaacttaaac ccaacccaac gatataaat tcaattgcac	4920
atacttcaa accatgtata tatactctgt tgaaaaaaat tataggagta ataattgttg	4980
cgtgcgacgc atcgtctgct tgcattgacg caggacatgt tcacggggg cacggacacg	5040

```

tcgtccatca tcgtggagtg ggcgatggcg gagatgctca agaaccctgc cgtgatggcg 5100
cggcgccagg aggaagctgga ccgcgtggtg ggcgcgggco gccgcctgga ggaagtcggac 5160
ctgcccagcc tcccctacct gcaggccctc tgcaaggagg ccatgcggct gcaccctgcg 5220
acggcgctca gcttcgccca cttctccttc gaagcctgcg acgaagacgt cgcgcgcggc 5280
ggctaccgcg tcccggccaa caccggctg ctcacaaaca tctgggcat cggccgggac 5340
ccggcggcgt ggaagaagcc cctggagttc cggcccgagc ggttcctgcc gggcggcggc 5400
gcggagaagg tcgaccgat ggggaactgc ttcgagctca tccggttcgg cgcggcagg 5460
aggatctgcg ccgggaagct ggcggcgatg gtgttcgtgc agtacttctt gggcacgctg 5520
ctgcacgctg tcgactggag cttgcctgac ggcgaggaga agctggacat gagcgagacg 5580
ttcggcctcg cgtgcctaa ggctgtgccg ctccgcgcgc tcgtcacgcc acggctcgtg 5640
ccggaagcct acgcctgagc tagctgtcag tggttcgcgt gtgttggtgt tgccttcctg 5700
catacgtaca taacttgta tgaatcctac acttgcatg gttgcctagt accagtattt 5760
gaaattatat acggaccttg catggtttca gttttttgac acaaccgatg atggttgatc 5820
agaagacgga tctgtagagt tgttctttaa caatgcgcta acctatatat caagggactg 5880
tttggttttc catgactaaa att 5903

```

```

<210> 5
<211> 1599
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> кДНК з SEQ ID NO: 4

```

```

<400> 5
atgaagctcg ccgcgttgta caccgacccc gtctgtgctct cctgcgcctt cctctgcctc 60
ctcctccacc tcgtctcccg gtccctgctg cacccttctt ctgcgcctc ttctctggc 120
cgccgcgcgc gcgcggcgcc ccacctcccg ccggggccac cgggcctgcc gatcctggc 180
gcgtgccac tcgtcgcccc tgccccgcct gccggcctgg ccgcgtggc gcgcaagtac 240
ggtcccatca tgtacctgaa gatgggcacg acgggcgtcg tggtggcgtc gtccccgtgc 300
gcggcgaaga cgttctctaa ggcgctggac gcgaagtac ccaaccggcc ggcggtggcg 360
agcgcgcgcg acatcacgta ccggcgcccag aacatgggtgt tcgggacta cgggcccag 420

```

tggaaagtga tgcgaaagct cggcagcgtg caccctgctcg gggcgggggc gctcgccgac 480
 tgggcgtgcg tggggcgaga cgagccgggc caccctgctcc gggcgtgggc gagggggggc 540
 gggcccggc ggcccgctgt cgtgcgggag ctgctcgtgt ggcggtcgc caacatcgtc 600
 gggcagatca ccgtcagcaa gggggtgttc gacgcgcagg gggatgactc aaacaggtaac 660
 aaggacatga tcgtgtcgt gctgacgggc acgggcctgt tcaacatcag cgacttcgtg 720
 ccggcgctgg cggtcttgga cctgcagggc gtgcaggcca agctgcggcg gatccaccac 780
 cagttcgacg gccatcatca caagctgctg gccgagcacg ccgcgacggc gggggaccgc 840
 ggcgcccagg gccgccagga cttcgtcgac aggcctccgc ccacgatgga cgcgggcgc 900
 gacgacgaga gggcgagac catcacgag gtcaacatca agggcctcat cttcgacatg 960
 ttcacggggg gcacggacac gtctccatc atcgtggagt gggcgatggc ggagatgctc 1020
 aagaaccctt ccgtgatggc ggcgcgcag gaggagctgg accgcgtggt gggccgcggc 1080
 cgcgcctgg aggagtcgga cctgcccagc ctcctctacc tgcaggcctg ctgcaaggag 1140
 gccatgcggc tgcaccgctc gacgcgcctc agcctccgc acttctcctt cgacgcctgc 1200
 gacgacgacg tcgcgcggc gggtaccgc gtcccgcca acaccggct gctcatcaac 1260
 atctgggcca tcggccggga ccggcgggc tggaaagaag ccctggagt ccggcccgag 1320
 cggttcctgc cggggcgggc cgcggagaag gtgcaccga tggggaactg cttcgagctc 1380
 atcccgcttc ggcgcggcag gaggatctgc gccgggaagc tggccggcat ggtgttcgtg 1440
 cagtacttcc tgggcacgct gctgcacgc ttgcactgga gcttgctga cggcgaggag 1500
 aagctggaca tgagcgagac gttcggcctc gcgctgcta aggcctgtgc gctcgcgc 1560
 gtcgtcagc cagggctcgt gccggaagcc taagcctag 1599

<210> 6
 <211> 532
 <212> NPT
 <213> Sorghum bicolor
 <400> 6

Met Lys Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Ser Cys Ala
 1 5 10 15
 Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Leu Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro

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

Pro Ala Leu Ala Arg Leu Asp Leu Gln Gly Val Gln Ala Lys Leu Arg
245 250 255

Arg Ile His His Gln Phe Asp Gly Leu Ile Thr Lys Leu Leu Ala Glu
260 265 270

His Ala Ala Thr Ala Ala Asp Arg Ala Arg Gln Gly Arg Gln Asp Phe
275 280 285

Val Asp Arg Leu Arg Ala Thr Met Asp Ala Gly Ala Asp Asp Glu Ser
290 295 300

Gly Glu Thr Ile Thr Glu Val Asn Ile Lys Gly Leu Ile Phe Asp Met
305 310 315 320

Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ile Ile Val Glu Trp Ala Met
325 330 335

Ala Glu Met Leu Lys Asn Pro Ser Val Met Ala Arg Ala Gln Glu Glu
340 345 350

Leu Asp Arg Val Val Gly Arg Gly Arg Arg Leu Glu Glu Ser Asp Leu
355 360 365

Pro Ser Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu
370 375 380

His Pro Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Phe Asp Ala Cys
385 390 395 400

Asp Asp Asp Val Ala Ala Gly Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg
405 410 415

Leu Leu Ile Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Ala Ala Trp Lys
420 425 430

Lys Pro Leu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala
435 440 445

Glu Lys Val Asp Pro Met Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly

450	455	460
Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val		
465	470	475 480
Gln Tyr Phe Leu Gly Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Ser Leu Pro		
	485	490 495
Asp Gly Glu Glu Lys Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu		
	500	505 510
Pro Lys Ala Val Pro Leu Arg Ala Val Val Thr Pro Arg Leu Val Pro		
	515	520 525
Glu Ala Tyr Ala		
530		

<210> 7
 <211> 3752
 <212> DHK
 <213> Sorghum bicolor

<400> 7
 atatagcttg tctgagttcc gagtaacgcag ccgcaggagc gcagcgtgct gcagggtgca 60
 acgcctcacc aggaatataa agccgtcgtc caggagacac ccttagcttg ggaaggctct 120
 cctccctggc acagcacagt agcacgccac catgcagctc gcgcgcttgt gcacgcacc 180
 cctcgtgctc tectgagcct tctctgctt cctctctcac gtgcgcctcc gctccctgct 240
 gcacccctct tctgcctcgt cctccggcgc ccgcggcggc caccaccagc tcccgcggg 300
 gccaccggga ctaccgattc tggcgcgct gccactcgtc ggcccagccc cgcacgcgg 360
 cctggccgcg ctggcgcgca agtacggctc catcatgtac ctgaagatgg gcacgacgg 420
 cgtcgtgggt gcgtcgtccc cggcgcggcg gaggacgttc ctcaaggcgc tggacgcgaa 480
 gtacgccaac cggccggcgg tggcgagcgc cgcgcacatc acgtacgggt gccagaacat 540
 ggtgttcgcc aactacgggc ccaagtggaa gctgatgcgg aagctcgcca gcgtgcacct 600
 gctcggggcg cgcgcgctcg cggactgggc gcacgtgcgg cgcgacgagg cggccacct 660
 gctccgcggc gtggcggagg cggccgcggc ccggcgggcc gtcgtcgtgc cggaggtgct 720
 ggtgtgcgcc ctgcaccaata tcgtcgggca gatcaccgtg agtaagcggg tggtcgacgc 780

acagggggac gagtccaaca ggtcagaact gaaccgaaag gccttttcag tgaatagaat	840
cgctcaccac aatacgaatg tgaatatatgt gtgtgcagggt acaaggacat gatcgtgtca	900
ctgctgactg gcgcgggact gttcaacatc agcgacttcg tgccggcgct ggcgcgctctg	960
gacctgcagg gcgtgcaggc caagctgcgg cgtgtgcacc accagttcga cggcctcacc	1020
accaagctgc tggccgagca cgcgcgcacg gcgcgggacc gcgcgcgcga cggccgcacg	1080
gacttcgtcg acaggctcgg cgcgcgcatt gacgcggcg ctgacganga gagcggcgag	1140
accatcacgg aggtcaacat caagggcctc atcttcgtaa gctcgtttc ctcacctcag	1200
ctacatacat atatactctt tcttctcttc cattgctttc gttgttttat caagtaaagt	1260
aatgcattcc gtgcgggtaa gaatgtaaga tatgcagcag ctagtaccga tcatgaaaga	1320
aagtaactga gaatcttgtg ctcaaaaataa ggcatgtgtt agttccgaaa aaaattttacc	1380
aaaaatttta gccgttaaat taaatcttgc ggcatatata tggagtatia aagatataaa	1440
aataaaaaatt aattacatag ttctgcctgt atttatgaga cgaaccttta aacctagtta	1500
gtttataatt ggacaatatt tgtcaaataa aaataaaaaat gctacagtat ctgaaattcc	1560
aaaattttgt caactgaaca aggccttaga tgcatttagg ccatgtttgg tttcaaatgt	1620
taaagtttat cgctcgacac atcgaatgtt tagtacacat gcatagagta ctaaatatag	1680
actattttat aaactaaaaa cacagctaga gagtaatttg cgagatgaat cttttaaaac	1740
taattaatct atgattagac attaatgtt aaataagatg aaaatgttac aacccaacca	1800
agcaccacct tacgtcgtcg cgttggtgcg gccgagcagg agagttaggt ggactagtgg	1860
gttgttggaa agtgacgac gaagcgaaag cacacattag ctcgagctga tatgttttgt	1920
ttatgggtcta attcataccg tgagggcctg caggttctga gtctttcatg attagtcaag	1980
gtgatatcgg tagctgatgg ctttgtttgg taccaaagtg cagactagag caaaatatgg	2040
ttcaaagtgt gataacattt ggtaccgtga agtgaataga atacctaccg gttgtgccat	2100
ggttgctctc aaaattcatg tttttttaat accccatcta ttttaaatta caagacattt	2160
tgacttttct agataaattg atttttctat gtatctagat atagtgtcta tctaaatgta	2220
tagtaaagat tacatatatt taaaaaagct aaacatttta taattagaat agggggagta	2280
tataattaaa agagagtatc tgtttatagt gatatttctc aagtacagtc cacatacaga	2340
atgcaccgag accattctaa aacctcaaac atgttgcaaa gatctaattgt tctggaacca	2400

```

aaatafatga actgaatata gacgattgaa tcattgggta caacaaatat thtagatttc 2460
aggatctatg accattgata catcaagttg gacgcttgac ttctccgcag ctaccaatgg 2520
tgacgtcaat gacctggagt taatactctt acggagttatt actcgtcctt gcacaaggat 2580
gaccttatac tggccatgaa aatagacata tagacaatgt agggttttatc tagaataatc 2640
actaataaga ataagatgag attgaataac atccaaacag tgtcggatct actcatttgg 2700
ttaattggta actttaccca caaaacactg aagtaattcg tgtccattta attttttccg 2760
tcctatacaa tgtttgcatg caacgcaccc aggacatgtt caccggcgggc accggacacat 2820
cgtcgcacat cgtggagtg ggcgtgtctg aaatgctcaa gaacccgcgc gtcattggcac 2880
gagcgcagga ggagctggac cgcacggctg gccgcggccg ccgcctggaa gagtccgacc 2940
tgcccagcct cccctacctg caggccgtct gcaaggaggc catcgggctg caccgcctga 3000
cgccgctcag cctccgcac ttctccttcg accctgcga cgacgtcggc ggcggctacc 3060
gcgtcccgcc caacacccgg ctgctcatca acgtctgggc catcggccgg gaccggcgga 3120
cgtggggaggc gcccctcgag ttccggccag agcggttcct gccggggggc gggcgggaga 3180
aggtegaccc gatgggggaa tacttcgagc tcctccctt cggcgccggc cggaggatct 3240
gcgcggggaa gctggccggc atggtgttcg tgcagtactt cctgggcacg ctgctgcacg 3300
cgttcaactg gcgcctcgcc gacggcgagg agctggacat gcgcgagacg ttccggctca 3360
cgctgcctaa ggccgtaccg ctccgcgcca ttgtcacgcc gcggctcctg ccggaagcct 3420
atgcttgagt tagttgtcac ttgtcagtct cagtccgcgc tgtggaagga tgatcgggag 3480
gtttgtgctt gccaacctgc atacatatc tgtttatatg tttttttata gaaactacat 3540
ggtaattcatc atatacaca accgcacatc ctctatgctt aattgcaagg catttgatat 3600
ggaaaatcca ccttggattc aatagtttga caactactga tcttactgaa caaatgatta 3660
ttccggctca ttaaaatgaa cttttacagg cagttttgta agaccgttca tgtgttcaa 3720
cttcaagcag taaggcctca tttggttgca tc 3752

```

<210> 8

<211> 1584

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> «ДНК з SEQ ID NO: 7

<400> 8

atgtagctcg ccgcgttgtg catcgacccc ctctgtctct cctggcctt cctctgcctc	60
ctcctccacg tcgcgtccg ctccctgtcg cacccttctt ctgcctctgc ctccggccgc	120
cgcggcggcc accaccagct ccgcgcgggg ccaccgggac taccgatctt cggcgcgtg	180
ccactcgtcg gccacgcccc gcacgcgggc ctggccggcg taggcggcaa gtacgggtcc	240
atcatgtacc tgaagatggg cagcaggggc gtcatgggtg cgtcgtcccc gaggcgggcg	300
aggacgttcc tcaaggcgtt ggacgcgaag taagccaacc ggcggcggtt ggcgagcgcc	360
gccacatca cgtacgggtg ccagaacatg gtgttcgcca actacggggc caagtgggaag	420
ctgatgcgga agctcgccag cgtgcacctg ctggggggcg gcgcgtctgc ggactgggcg	480
cacgtgcggc gcgacgaggg cggccacctg ctccggggcg tagcgagggc ggcgcgggc	540
cggcggcccg tcgtcgtgcc ggagggtgtg gtgtgcggcc tcgccaatat cgtcggggcg	600
atcacctga gtaagcgggt gttcgacgca caggggggag agtccaacag gtacaaggac	660
atgatcgtgt cactgctgac tagcgccggg ctgttcaaca tcagcgactt cgtgccggcg	720
ctggcgcgtc tagacctgca ggcggtgcag gccaaagctgc ggcggtgtga ccaccagttc	780
gacggcctca tcaccaagct gctggccgag cagcccgcca cggcccgcca ccgcgcgcgc	840
gacggccgcc aggaacttct cgacaggctc cgcgccgcca ttgacgcgg cgctgacgac	900
gagagcggcg agaccatcac cgagggtcaac atcaaggggc tcctcttcca catgtttcacg	960
gcgggcacgg acacatcgtc gatcatcgtg gagtggggcg tgtctgaaat gctcaagaac	1020
ccgccgtca tagcacgagc gaggaggag ctggaccgca cggtcggccg cggccggccg	1080
ctggaagagt cggacctgcc cagcctcccc tacctgcagg ccgtctgcaa ggaggccatg	1140
cggctgcacc cgtcgacgcc gtcagcctc ccgcacttct ccttcgagc ctgcgacgac	1200
gtcggcggcg gctaccgctt ccgggccaac acccggttgc tcatcaacgt ctggggccatc	1260
ggcggggacc cggcgacgtg ggaggcgccc ctcgagttcc ggccagagcg gttcctgcgc	1320
ggggccggcg cggagaaggt cgaccgatg gggaactact tcgagctcat ccccttcggc	1380
gccggccgga ggaatctgcg cgggaagctg gccggcatgg tgttcgtgca gtacttctg	1440
ggcacgctgc tgcacgggtt caactggcgc ctgcgcgacg gcgaggagct ggacatgcgc	1500
gagacgttcg ggctcacgct gctaaggccc gtaccgctcc ggcgatttgt cagcccgcg	1560

ctcctgcccgg aagcctatgc ttga

1584

<210> 9

<211> 527

<212> BPT

<213> Sorghum bicolor

<400> 9

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Ile Asp Pro Leu Val Leu Ser Cys Ala
1 5 10 15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
20 25 30

Ser Ser Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gly His His Gln Leu Pro
35 40 45

Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly
50 55 60

Pro Ala Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro
65 70 75 80

Ile Met Tyr Leu Lys Met Gly Thr Thr Gly Val Val Val Ala Ser Ser
85 90 95

Pro Gly Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Lys Tyr Ala
100 105 110

Asn Arg Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Cys Gln
115 120 125

Asn Met Val Phe Ala Asn Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys
130 135 140

Leu Ala Ser Val His Leu Leu Gly Ala Arg Ala Leu Ala Asp Trp Ala
145 150 155 160

His Val Arg Arg Asp Glu Ala Gly His Leu Leu Arg Gly Val Ala Glu
165 170 175

Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Pro	Val	Val	Val	Pro	Glu	Val	Leu	Val	Cys
			180					185					190		
Ala	Leu	Ala	Asn	Ile	Val	Gly	Gln	Ile	Thr	Val	Ser	Lys	Arg	Val	Phe
		195					200					205			
Asp	Ala	Gln	Gly	Asp	Glu	Ser	Asn	Arg	Tyr	Lys	Asp	Met	Ile	Val	Ser
		210					215				220				
Leu	Leu	Thr	Gly	Ala	Gly	Leu	Phe	Asn	Ile	Ser	Asp	Phe	Val	Pro	Ala
225					230					235					240
Leu	Ala	Arg	Leu	Asp	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Ala	Lys	Leu	Arg	Arg	Val
			245						250					255	
His	His	Gln	Phe	Asp	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Ala	Glu	His	Ala
			260					265						270	
Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	Arg	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Gln	Asp	Phe	Val	Asp
		275						280					285		
Arg	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Asp	Ala	Gly	Ala	Asp	Asp	Glu	Ser	Gly	Glu
		290					295				300				
Thr	Ile	Thr	Glu	Val	Asn	Ile	Lys	Gly	Leu	Ile	Phe	Asp	Met	Phe	Thr
305						310				315					320
Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Ile	Ile	Val	Glu	Trp	Ala	Met	Ser	Glu
				325						330				335	
Met	Leu	Lys	Asn	Pro	Pro	Val	Met	Ala	Arg	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp
			340					345					350		
Arg	Thr	Val	Gly	Arg	Gly	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Ser	Asp	Leu	Pro	Ser
		355						360				365			
Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln	Ala	Val	Cys	Lys	Glu	Ala	Met	Arg	Leu	His	Pro
		370					375					380			
Ser	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	His	Phe	Ser	Phe	Asp	Ala	Cys	Asp	Asp

385		390		395		400
Val Gly Gly Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Ile Asn						
	405		410		415	
Val Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Ala Thr Trp Glu Ala Pro Leu Glu						
	420		425		430	
Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Ala Ala Ala Glu Lys Val Asp						
	435		440		445	
Pro Met Gly Asn Tyr Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg						
	450		455		460	
Ile Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu						
465		470		475		480
Gly Thr Leu Leu His Ala Phe Asn Trp Arg Leu Ala Asp Gly Glu Glu						
	485		490		495	
Leu Asp Met Arg Glu Thr Phe Gly Leu Thr Leu Pro Lys Ala Val Pro						
	500		505		510	
Leu Arg Ala Ile Val Thr Pro Arg Leu Leu Pro Glu Ala Tyr Ala						
	515		520		525	

<210> 10
 <211> 187
 <212> DHK
 <213> Zea mays

<400> 10	
cttcgcccc gaagcgggcc cagacatttg agattgggta ttcaaaaatt caaaagatta	60
aagaatttag tgttctaacg ctattttatg caatacatia ttgacaaatt agtgttctaa	120
cactatagat caccaaaaac atgggtattc aatgaatacc catgaaaccc cctggggccc	180
gcccattg	187

<210> 11
 <211> 4402
 <212> DHK
 <213> Zea mays

<400> 11

atgcagctcg cggcgttggtg caccgacccc gtggtgtgtgt gcagcgccctt cctctgcctc	60
ctcctccaag tggctctccg ctgctgtgtg caccctcctt ctgcccagaa gcgggcccag	120
acatttgaga ttgggtattc aaaaattcaa aagattaaag aatttagtgt tctaaagcta	180
ttttatgcaa tacattattg acaaattagt gtcttaaac tatagatcac caaaaacatg	240
ggatttcaat gaatacccat gaaaccccc tgggcccggc catgcttctg ccgcctcttc	300
ctccggggcg ccggggcagc tcccgccggg gccacggggc ctgccgatcc tcggcgcgct	360
gccactcgtg ggcccagccc cgcacgcggg cctggccggc ctggcgcgca agtacggctc	420
catcatgiac ctgaagatgg gcacggcggg cgttggtgtg gcgtcgtccc cgcgcgcggc	480
gcggacgttc ctcaaggcgc tggacgcgg gtacgccaac cggcggcgcg tggcgagcgc	540
cgcggacatc acgtacgggc ggcagaacat ggtgttcgcg gactacgggc ccaagtggaa	600
gctgatgcgg aagctcgcca gcgtgcacct gctcggcgcg cgcgcgctcg cggactgggc	660
gtgcgtgcgg ccggcgcgagg ccggccacgt gctgcgcggc gtggcggagg cggccgcggc	720
cggcaggccc gtctcgtgc cggagctgct cgtgtgcgcc ctgcgcaaca tcgtcgggca	780
gatacacagt agcaagcggg tgttcgacgc gcagggggac gactcgaaca ggtgaggatg	840
ggagggtccat gaaatccatc cagctgtgag catgcataaa agtttcatttg gaaagaaaag	900
aacatatitit tcttacaat ttatgtttac tgtttcttta agtttcgata aagtttgtaa	960
aaaaaattta ggctagtitt aaactccatt taggatttct attttccaaa gaaaaataaa	1020
cgaatttctc ttgaaaaaat gaaaattctt tagaaaaata ggtttctcaa ctagccctca	1080
ataaaaactta atgcgatcgt tttctctgac tctcatcct ctttctctgg ttatctaat	1140
gggtccttga gagatgagtt taactgcttg tcttttatta ttgcaaagac aacatatctg	1200
atgcacatgg aacattgggt cacatgggtg acatatgaaa tcatcaccac tcatttttaa	1260
tctaaagctc atagttgttt gatataatatt attaaaggaca cctccaacg tggtggtgtg	1320
tagtggtgga aggtgttatt tgtaaattga ataatcaact agagacgtta gatctaaaa	1380
gagtgggtgat gatttaatat gtgcaccatg tgcaccagtc ttctatgtgc accagatatg	1440
tctctatttg caaatgctag acggaacacc agctagcact agcagactgt ttatgtggaa	1500
agaaaaaact taaaaagatc agctaggaag ctgctgtcat ctgtacgtat atatggtgaa	1560

gactgaacaa tctgcatgac aagcaaaact tagcttaaaa gcgaaaagag cgatggasac	1620
ggccgctcga taaataatta atgagagtct tgggattttt catgcatgga aaaaaacaaa	1680
gctggcattt ttcatctaata ataatatata acgctgatat catattgagt gcagatacaa	1740
ggacatgata gtgtcgtctg tgaccggcac gggcatgttc aacatcagcg acttcgtgcc	1800
ggcgctggcg cgtctggacc tgcagggcgt gcaggcggaag ctgcggcgcg tccaccgcc	1860
gttcgacggc ctcatcacca agctgctggc cgagcacgcc gcgacggcgc cggaccgcgc	1920
gcgccagggc cgcgggact tctctgacgc gctccgcgcc acgatggacg ccggcgccgc	1980
cgcggacgac gagagcggcg agaccatcac cgagggtcaac atcaaggggc tcatcttcgt	2040
aagctccctg ctttttcttc gcccccaccc atgcatcatc atatgcactt atattttaca	2100
cttgctcggg tttcttttag taactaacta atcgtctgca gctgcgatac acgtagcact	2160
agtactacag cgatgggtca tgggtaactg aatctaagggt gcaatagagt gcacggccgc	2220
gggatcatgg cgtgacatgg gagctaagct aagccagtgg ccacctaacg aaggcactga	2280
ccgaaagctc agtggcgtgt taggtggaga tagtggatcg agttgttgga aagacaatat	2340
caaaaccact ctccaattga tgatgtgtag ggcttcgagt gttttgaatc cactttgttt	2400
ggtcgaacac attactagag tgaaatatgg ttccaatgtt aattgatagc gcgaaagggt	2460
ctctagcgta atgggttaaac cttccgagta gcacatccag gttgggttcg atctctcga	2520
gggcgaattt tcaagctttg ttaaaaaaat tatctcgttg tgccccgtcc gctctcagga	2580
atcgatatcc tacacgacac cttccgacta gtgacagttg attgactcgt tagtgatgag	2640
aagccatgct aaaaaagtgg agacgtagat atgatagagg ttccctttcc taagcaaacg	2700
tgaatgctat gaaaattatg cagtttaaaa aaaactttta agataaacag gaattctctt	2760
ttttggacaa aacaatacga atgcacctcc aaatatctta tcgagtcgac ttttatggaa	2820
ttattgtttt tgttattttc aagatgggag cccaaaatca catacaaatt attcagtga	2880
tgctcgggtg tttttttatt agttaagggc tctcattttt ttcaagggat ttttattttt	2940
ttccaaaaga aaataaacta atctctttta gaaaaatgga aatctattgg agaaatgagg	3000
ttcctaaact agctctaaca gtgagtcagt taatcaggag aagatattag actctgtat	3060
agtgtgcagc aaccacatcc gattctgacg ttttagctta atgttcgcta tgtagacgct	3120
gggcataggg aatgcattgc taccagaaca cgaatgacag ctatgcaagt ctctagaacg	3180

```

ttggagtagt taacaaacgt gatagatgta acctctggat catggtatga tgtcattttcc 3240
tagactagaa gaatttggtag tcaaatacgag caaagtcctcg aaagcacact gggcttttcga 3300
cacagtgata ccaaagatgc tgaaaagaac tgaggcacga taaactgttc ggtgttggtg 3360
taaagacca aagatgctga aaataactga tcgtcaccat ccgtgaatct aacttttcgac 3420
acactgttac caaatccctc gtcaaaatta caggaataat taaggcgttt agacgatgat 3480
aaaccattti ttgtcactaa ttaaccacac tgttctttgc ttgaccgtga caaaaaaaaa 3540
cttttttgtg aagcagtgtt gccgtaaacc acaaccatca tgaactcact tgccttgtca 3600
tatgtacttg taccatcgaa cgcgcgcgcg taagacaatg caccacccct caagtcttag 3660
ctcactgata ccgttaatta agttagataa tgtcgattac tagttgtctt acttcgaact 3720
atttcttttc ggcaaaactga agtaaagaca acgttttgtt ccgcaggaca tgttcacggc 3780
aggtacggac agtcgttcga tcctcgttga gtgggcgatg gccgagatgc tcaagaaccc 3840
gaccgtcatg gccgcgcgcg aggaggagct ggaccgcgcg gtgggcgggg gccggcgcct 3900
agaggagtgc gacctgcccg gcttccctta cctgcaggcg gtatgcaagg agggcatgcg 3960
gttgcacccg tcacgcgcgc tcagcctccc gcactttctc ttggacgcct gcgacgacgt 4020
cgacggctac cgggtcccg gcaacacccg cctgctcgtc aacgtctggg ccatcgggcg 4080
ggacccggag gcctgggaga ggccctcga cttccgccc gagcgcttc tgcccggggg 4140
cggcgcggag aaggctgacc cctgggggaa ctgcttcgag ctcacccgt tggcgcccg 4200
ccggaggatc tgccggggga agctggcggg catggtgttc gtgcagtact tcctgggcac 4260
gctgctgcac gcgttcgaact ggcgcctgcc tgacggcgag gagaagctgg acatgagcga 4320
gacgttcggc ctgcgcctgc ccaaggcagt gccgctccgc gccgtcgcca cggcacggct 4380
cgtgccggaa gcctatgcct ga 4402

```

<210> 12
 <211> 387
 <212> ДНК
 <213> Zea mays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (101)..(287)
 <223> інсерція включає 187 нуклеотидів як присутній у лінії QTL

```

<400> 12
accatgcagc tcgctggcgtt gtgcaccgac cccgtggtgc tgtgcagcgc cttctcttgc      60
ctctctctct acgtggctct cgcctcgttg ctgcaccctc cttctgccc gaagcggggc      120
cagacatttg agattgggta ttcaaaaatt caaaagatta aagaatttag tgttctaacg      180
ctattttatg caatacatta ttgacaaaatt agtggttctaa cactatagat caccaaaaac      240
atgggtattc aatgaatacc catgaaaccc cctggggccc gcccatgctt ctgcgcctc      300
ttctctcggg cgcgcggggc agctcccgcc gggggccacc ggcttgccga tctcgggcgc      360
gttgccactc gtggggcccag ccccgca                                     387

```

```

<210> 13
<211> 201
<212> ДНК
<213> Zea mays

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (101)..(101)
<223> однонуклеотидний поліморфізм

```

```

<400> 13
tgatgaaagc cgtgcaggag taaatagnaa amtggagttg tggcgtgana ctctagaatc      60
caaacgtttt agactcttta gaactaaaac cgaatatata wgttgtgact ttggcactac      120
tacatatgac gaaggagata ttagitttga aggtcaagta gtgccctgna aggatacctt      180
ttggtattta gtatcaatgc t                                           201

```

```

<210> 14
<211> 121
<212> ДНК
<213> Zea mays

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(58)
<223> n e a, c, g або t

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> однонуклеотидний поліморфізм

```

```

<400> 14

```

caaggaacct aggatggggg cggattcatt aacaaggagg ggggccctaa tccccgncg 60
 rtctgcacgg gcaataatct agtcagacc cggagtcagt agaggcggag gacgcgtcac 120
 g 121

<210> 15
 <211> 121
 <212> ДНК
 <213> Zea mays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 <223> однонуклеотидний поліморфізм

<400> 15
 cagcacatat tgtgtgaaa tgaatgagca cactgcatcc atatcaccac tggtagacaa 60
 nggcatagtt taagtcatgt tatgatgtag cgcaccgagc aaggtatttt gacacacata 120
 a 121

<210> 16
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Zea mays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> однонуклеотидний поліморфізм

<400> 16
 aatgtgggaa gagctggagc agcaaatcta gacgicattc aagaagtcga rtatgtaaag 60
 gaagatgcta gaattatata cctccttgaa tgcctccaaa a 101

<210> 17
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Zea mays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> однонуклеотидний поліморфізм

<400> 17
 ctctttctgc agctcgtgat cgagttgtgt gtgctccatt cccaaattat ntatgatcga 60
 ttagtagcgt taggggttaa ccagtagcgg ctgtgtactt g 101

<210> 18
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Zea mays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (101)..(101)
 <223> однонуклеотидний поліморфізм

<400> 18
 ttatggggga ggcagattgt cgtggggggc gggggaggggc gagcttgggg ggcggcgaga 60
 gcgaggagca ttgccgagat tgccatggag taaggggcag ccagagattgc cgcggaggag 120
 agggcgcttg ccgaggcaga ttgccggggg ggaggggggc ttgccgaggc ggagacgtgg 180
 tgaagccgtg gtggacggcc a 201

<210> 19
 <211> 4215
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> геномна ДНК F35H мутанта P434L

<400> 19
 atgcagctcg cggcgttgtg caccgacccc gtgggtgctgt gcagcgctt cctctgcctc 60
 ctctccacg tggctctccg ctgctgctg caccctcctt ctgcgcctc ttctccggg 120
 cgcgcggggc agctcccgcc gggggcaccg ggcctgccga tctcggggc gctgccactc 180
 gtggggcccag ccccgacgc cggcctggcc gcgctggggc gcaagtacgg tcccatcatg 240
 tacctgaaga tgggcacggc cggcgtggtg gtggcgctgt ccccgcgccg ggcggggacg 300
 ttctcaagg cgtggacgc gcggtaagcc aaccggccgg ccgtggcgag cgcggcgga 360
 atcacgtacg ggcggcagaa catggtgttc gcggactacg ggcccaagtg gaagctgatg 420
 cgggaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcggcg tcggggactg ggcgtgcgtg 480
 cggcgcggcg aggcggggca cgtgctgcgc ggcgtggcgg aggcggccgc ggcggcgagg 540

cccgctgtcg	tgcggagct	gctcgtgtgc	gcccctgccca	acatcgtcgg	gcagatcaca	600
gtgagcaagc	ggatgttctga	cgcgcagggg	gacgacttga	acaggtgagg	atgggaggtc	660
catgaaatcc	taccagctgt	gagcatgcat	aaaagttcat	ttggaaagaa	aagaacatat	720
ttttctttaca	aatttatgct	tactgtttct	ttaagtttctg	ataaagtttg	taaaaaaaaat	780
ttaggctagt	ttgaaactcc	atthaggtat	tctattttcc	aaagaaaaat	aaacgaattt	840
ctcttgaaaa	aatgaaaatt	ctttagaaaa	ataggtttctc	aaactagccc	tcaataaaaac	900
ttaatgcgat	cgttttctct	gactctcatt	catctttctc	tggttatcta	attgggtcct	960
tgagagatga	gtttacctgc	ttgtctttta	ttattgcaaa	gacaacatat	ctgatgcaca	1020
tggaacattg	gtgcacatgg	tgacacatg	aaatcatcac	cactcatttt	aaatctaacg	1080
tctatagtgg	tttgatatat	tttattaagg	acacctccca	acgtgggtgg	gtgtagtggg	1140
ggaagggtgt	atgtgtaaat	tgaataatca	actagagacg	ttagatctaa	aatgagtggg	1200
gatgatttaa	tatgtgcacc	atgtgcacca	gtcttctatg	tgaccagat	atgtcctcta	1260
ttgcaaatgc	tagacgggaa	accagctagc	actagcagac	tgtttatgtg	gaaagaaaaa	1320
acttaaaaag	atcagctagg	aagctgctgt	catctgtacg	tatatatggg	gaagactgaa	1380
caatctgcat	gacaagcaaa	acttagctta	aaagcgaaaa	gagcgatgga	aacggccgct	1440
cgataaataa	ttaatgagag	tcttgggatt	tttcatgcat	ggaaaaaaac	aaagctggca	1500
tttttcatct	aatataatat	ataacgctga	tatcatattg	cgtgcagata	caaggacatg	1560
atcgtgtcgc	tgctgaccgg	cacgggcatg	ttcaacatca	gcgacttcgt	gcggcgctg	1620
gcgcgtctgg	acctgcaggg	cgtgcaggcg	aagctggggc	gcgtccaccg	ccagttcgac	1680
ggcctcatca	ccaagctgct	ggcgcagcac	gcgcgcacgg	ccgcggaccg	cgcgcgccag	1740
ggcgcgccgg	acttcgtctga	cgggtccgc	gccacgatgg	acgccggcgc	cgccgcgcac	1800
gacgagagcg	gcgagaccat	caccgaggtc	aacatcaagg	gcctcatctt	cgtaagctcc	1860
ctgctttttc	ctcgccccc	accatgcctc	atcatatgca	cttatatttt	acacttgctc	1920
ggttttcttt	tagtaactaa	ctaactcgtc	gcagctgcga	tacacgtagc	actagtacta	1980
cagcgatggg	tcatcggtaa	ctgaatctaa	ggtgcaatag	agtgcacggc	cgcgggcatca	2040
tggcgtgaca	tgggagctaa	gctaagccag	tggccacctc	acgaaggcac	tgaccgaaag	2100
ctcagtggcg	tgtttaggtgg	agatagtggg	tgcagttgtt	ggaaagacaa	tatcaaaaac	2160

actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccaccttg tttggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaaata tggttccaat gttaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttccga gtagcacatc cagggtgggt tcgattctct cgagggcgaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgccccg tccgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga cacctccga ctagtgacag ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaaaaaag tggagacgta gataatgatag aggttccctt tctaagcaa acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagtta aaaaaaactt taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatato ttatcgagtc gactttttat gaattattgt	2640
ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt tttttcaagg gattttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatctctt ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttccctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactctct tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgtttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtcgggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcttagacta	3060
gaagaattgg tagtcaaatc gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcctt cgacacagtg	3120
ataccaaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttcggtgttg gtgtaaacga	3180
ccaaagatgc tgaataaac tgatcgtcac catcctgtaa tctaactttc gacacactgt	3240
taccaaatac ttctgtaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagaagat gataaacat	3300
tttttgtcac taattaacca cactgttctt tgcttgacg tgacaaaaaa aaactttttt	3360
gtgaagcagt gttgcgtaa accacaacca tcatgaactc acttgcttg tcatatgtac	3420
ttgtaccatc gaacgcgcg cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcactg	3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actatttctt	3540
ttcggcaaac tgaagttaa acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggcgggtaac	3600
gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtgggcg atggcggaga tgctcaagaa cccgaccgtc	3660
atggcgcgcg cgcaggagga gctggaccgc gcggtgggac ggggaccggc cctggaggag	3720
tggacctgc ccggcctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcggctgcac	3780

```

ccgtccacgc cgtccagcct ccgcaccttc tcttggacg cctgcgacga cgtcgacggc 3840
taccgcgtcc cggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg ccgggaccgc 3900
gaggcctggg agaggccccct cgacttcgcg ctcgagcgcct tcttgcccgg gggcggcgcg 3960
gagaaggctg accccctggg gaactgcttc gagtcaccc cgttcggcgc ccgcgggagg 4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggcg ttcgtgcagt acttcctggg cacgctgctg 4080
cacggttctg actggcgccct gcttgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
ggcctcgcgc tgcccaaggc agtgccgctc cgcgcctgag ccacgccacg gctcgtgcgc 4200
gaagcctatg cctga 4215

```

<210> 20

<211> 527

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта P434L

<400> 20

```

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1           5           10          15

```

```

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
          20          25          30

```

```

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
          35          40          45

```

```

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
          50          55          60

```

```

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
65          70          75          80

```

```

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg
          85          90          95

```

```

Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Asn Arg
          100         105         110

```

Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Arg Gln Asn Met
115 120 125

Val Phe Ala Asp Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys Leu Ala
130 135 140

Ser Val His Leu Leu Gly Ala Arg Ala Leu Ala Asp Trp Ala Cys Val
145 150 155 160

Arg Arg Gly Glu Ala Gly His Val Leu Arg Gly Val Ala Glu Ala Ala
165 170 175

Ala Ala Gly Arg Pro Val Val Val Pro Glu Leu Leu Val Cys Ala Leu
180 185 190

Ala Asn Ile Val Gly Gln Ile Thr Val Ser Lys Arg Val Phe Asp Ala
195 200 205

Gln Gly Asp Asp Ser Asn Arg Tyr Lys Asp Met Ile Val Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Gly Thr Gly Met Phe Asn Ile Ser Asp Phe Val Pro Ala Leu Ala
225 230 235 240

Arg Leu Asp Leu Gln Gly Val Gln Ala Lys Leu Arg Arg Val His Arg
245 250 255

Gln Phe Asp Gly Leu Ile Thr Lys Leu Leu Ala Glu His Ala Ala Thr
260 265 270

Ala Ala Asp Arg Ala Arg Gln Gly Arg Pro Asp Phe Val Asp Arg Leu
275 280 285

Arg Ala Thr Met Asp Ala Gly Ala Ala Ala Asp Asp Glu Ser Gly Glu
290 295 300

Thr Ile Thr Glu Val Asn Ile Lys Gly Leu Ile Phe Asp Met Phe Thr
305 310 315 320

Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ile Ile Val Glu Trp Ala Met Ala Glu

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

<210> 21
 <211> 4215
 <212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> геномна ДНК F35H мутанта W426stop

<400> 21

atgcagctcg cggcgttgtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgcctt cctctgcctc	60
ctctccacg tggctctccg ctgctgctg caccctcctt ctgccgcctc ttctctcggg	120
cgcgcggggc agctcccggc gggggcaccg ggcttgccga tctcgggcgc gctgccactc	180
gtggggcccag ccccgacgc cggcctggcc gcgctgggcgc gcaagtacgg tcccatcatg	240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtggtg gtggcgtcgt ccccggcgc gcgcgggacg	300
ttctcaagg cgttggaagc gcggtacgc aaccggccgg ccgtggcgag cgcgcgggac	360
atcacgtacg gcgggcagaa catggtgttc gcggactacg gggccaagtg gaagctgatg	420
cggaaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcgcggactg ggcgtgcgtg	480
cggcgcggcg aggcgggcca cgtgctgcgc gcgctggcgg aggcggccgc ggcgggcagg	540
ccgctcgtcg tgcgggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca	600
gtgagcaagc ggggtgttcga cgggcagggg gacgactcga acaggtgagg atgggaggtc	660
catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagttcat ttggaagaa aagaacatat	720
ttttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttcg ataaagtttg taaaaaaat	780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt	840
ctttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac	900
ttaatgcat cgttttctct gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct	960
tgagagatga gtttacctgc ttgtccttta ttattgcaa gacaacatat ctgatgcaca	1020
tggaaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg	1080
tctatagttg tttgatatat ttatttaagg acacctcca acgtggtggt gtgtagtggg	1140
ggaagggtgtt atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtggt	1200
gatgatttaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtctctta	1260
ttgcaaatgc tagacggaac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa	1320
acttaaaaag atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggg gaagactgaa	1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagatta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggccgct	1440

cgataaataa ttaatgagag tcttgggatt tttcatgcat ggaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcatct aatataatat ataacgctga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgcctgacgg cacgggcatg ttcaacatca gcgacttcgt gccggcgctg	1620
gcgcgtctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgcggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggaccg cgcgcgccag	1740
ggcgcgccgg acttcgtcga ccggctccgc gccacgatgg acgcgggcgc cgcgcgcgac	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gccctcatctt cgttaagctcc	1860
ctgctttttc ctgcaccca accatgcac atcatatgca cttatatttt acacttgctc	1920
ggtttttctt tagtaactaa ctaatccgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtacta	1980
cagcgatggg tcatcggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctt acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtgccg tcttaggtgg agatagtggc tcgagttggt ggaaagacaa tatcaaaacc	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccaccttg tttggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaaata tggttccaat gtttaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttcga gtagcacatc cagggttggt tcgatcctct cgagggcgaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgcccgc tccgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga caccttcga ctagtgcag ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaaaaaag tggagacgta gatatgatag aggttcctt tcttaagcaa acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagttta aaaaaaacit taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatata ttatcgagtc gacttttatg gaattattgt	2640
ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt ttttcaagg gatttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttcctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgttttagc ttaatggtcg ctatgtagac gtcgggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcttagacta	3060

```

gaagaattgg tagtcaaata gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcttt cgacacagtg 3120
ataccaaaaga tgcctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttccggtgttg gtgtaaacga 3180
ccaaagatgc tgaataatac tgatcgtcac catccgtgaa tctaactttc gacacactgt 3240
taccaaatcc ttcgtcaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat 3300
tttttgtcac taattaacca cactgttctt tgcctgaccg tgacaaaaaa aaactttttt 3360
gtgaagcagt gttgccgtaa accacaacca tcattgaactc acttgccctg tcatatgtac 3420
ttgtaccatc gaagcccgcg cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcactg 3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actattttct 3540
ttcggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggccgggtacg 3600
gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtggcg atggcggaga tgcctcaaga cccgaccgtc 3660
atggccgcg cgccaggagga gctggaccgc ggggtgggccc ggggcccggc cctggaggag 3720
tcggacctgc ccggccctcc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gggactgcac 3780
ccgtccacgc cgtcagcct ccgcacttc tcttgggacg cctgcgacga cgtcgacggc 3840
taccggctcc cggcccaaac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg ccgggacccg 3900
gaggccctagg agaggccct ccacttcgc ccgagcgct tctgcccgg gggcggcgcg 3960
gagaaggctc accccctggg gaactgctc gagctcated cgttcggcg ccgcccggagg 4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggtg ttctgtcagt acttcctggg cagctgtctg 4080
cacgcgttcg actggcgctt gctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
ggcctgcgcg tgcccaaggc agtgccgctc cgcgcgctcg ccacgccacg gctcgtgcgc 4200
gaagcctatg cctga 4215

```

<210> 22

<211> 425

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта W426stop

<400> 22

```

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1           5           10           15

```

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

225		230		235		240									
Arg	Leu	Asp	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Ala	Lys	Leu	Arg	Arg	Val	His	Arg
			245						250					255	
Gln	Phe	Asp	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Ala	Glu	His	Ala	Ala	Thr
			260					265						270	
Ala	Ala	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln	Gly	Arg	Pro	Asp	Phe	Val	Asp	Arg	Leu
		275					280					285			
Arg	Ala	Thr	Met	Asp	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Asp	Asp	Glu	Ser	Gly	Glu
	290					295					300				
Thr	Ile	Thr	Glu	Val	Asn	Ile	Lys	Gly	Leu	Ile	Phe	Asp	Met	Phe	Thr
305					310					315					320
Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Ile	Ile	Val	Glu	Trp	Ala	Met	Ala	Glu
				325					330					335	
Met	Leu	Lys	Asn	Pro	Thr	Val	Met	Ala	Arg	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp
			340					345					350		
Arg	Ala	Val	Gly	Arg	Gly	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Ser	Asp	Leu	Pro	Gly
		355					360					365			
Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln	Ala	Val	Cys	Lys	Glu	Ala	Met	Arg	Leu	His	Pro
	370					375					380				
Ser	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	His	Phe	Ser	Leu	Asp	Ala	Cys	Asp	Asp
385				390						395					400
Val	Asp	Gly	Tyr	Arg	Val	Pro	Ala	Asn	Thr	Arg	Leu	Leu	Val	Asn	Val
				405					410					415	
Trp	Ala	Ile	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Ala							
			420					425							

<210> 23
 <211> 4215
 <212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> геномна ДНК F35H мутанта R252W

<400> 23

```

atgcagctcg cggcggtgtg caccgacccc gtgggtgctgt gcagcgccctt cctctgcctc      60
ctctccacg tggctctcgg ctgctgctg caccctcctt ctgcgcctc ttcttcgggg      120
cgccgggggg agctcccgcc gggggcaccg ggctgcccga tctcgggcgc gctgccactc      180
gtggggcccag ccccgacgc cggcctggcc gcgctgggcg gcaagtacgg tcccatcatg      240
tacctgaaga tgggcacggc cggcggtgtg gtgggtgctt ccccgcgccg ggcgcggagc      300
ttctcaagg cgtcggacgc ggggtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cgcgcgggac      360
atcacgtacg ggcggcagaa catggtgttc gcggactacg gcccgaagtg gaagctgatg      420
cggaagctcg ccagcgtgca cctgctcgcc gcgcgcgggc tcgcggactg ggcgtgcgtg      480
cggcgcgggc aggcgggcca cgtactgcgc ggcgtggccg aggcggccgc ggcgggcagg      540
cccgctgctg tgcgggagct gctcgtgtgc gccctgcca acatcgtcgg gcagatcaca      600
gtgagcaagc ggggtgttga cgcgcagggg gacgactcga acaggtgagg atgggaggtc      660
catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagtccat ttggaagaa aagaacatat      720
ttttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttcg ataaagtttg taaaaaaat      780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt      840
ctcttgaaaa aatgaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaac      900
ttaatgcgat cgttttctct gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct      960
tgagagatga gtttacctgc ttgtccttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca      1020
tggaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg      1080
tctatagtig ttgatatat tttaataagg acaccctcca acgtggtggt gtgtagtggg      1140
ggaagggtgtt atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtggg      1200
gatgatitaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtcctcta      1260
ttgcaaatgc tagacggaac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa      1320
acttaaaaaa atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa      1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaasa gagcgatgga aacggccgct      1440

```

cgataaataa ttaatgagag tcttggggatt tttcatgcat ggaaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcatct aatataatat ataacgctga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgtgaccgg cacagggcatg ttcaacatca gcgacttcgt gccggcgctg	1620
gcgcgtcttg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgtggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggaccg cgcgcgccag	1740
ggccgcccgg acttcgtoga ccggctccgc gccacgatgg acgccggcgc gccgcgcgac	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gcctcatctt cgtaagctcc	1860
ctgctttttc ctgcggccca accatgcac atcatatgca cttatatattt acacttgctc	1920
ggtttttctt tagtaactaa ctaatccgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtaacta	1980
cagcgatggg tcatcggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctc acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtgggc tgttagggtg agatagtggg tcgagttgtt ggaaagacaa tatcaaaaac	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccaccttg tttggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaataa tggttccaat gttaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttcga gtagcacatc caggttgggt tcgatactct cgagggcgaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgccccg tccgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga caccttcga ctagtgacag ttgattgaat cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaataaag tggagacgta gatatgatag aggttccctt tccctaagca acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagttta aaaaaaactt taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatatc ttatcgagtc gacttttatg gaattattgt	2640
ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt tttticaagg gattttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttcctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtcgggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcctagacta	3060

```

gaagaattgg tagtcaaata gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcttt cgacacagtg 3120
ataccaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttcggtgttg gtgtaaacga 3180
ccaaagatgc tgaataatac tgatcgtcac catccgtgaa tctaaatttc gacacactgt 3240
taccaaatcc ttggtcaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat 3300
tttttgtcac taattaacca cactgttctt tgcctgaccg tgacaaaaaa aaactttttt 3360
gtgaagcagt gttgcggtaa accacaacca tcatgaactc acttgccctg tcatatgtac 3420
ttgtaccatc gaacgcgcgc cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcactg 3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actattttct 3540
ttcggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggcgggtacg 3600
gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtgggcg atggcggaga tgcacaagaa cccgaccgtc 3660
atggcgcgcg cgcaggaggc gctggaccgc gcggtgggcc ggggcggcg cctggaggag 3720
tcggacctgc cgggcctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcgctgcac 3780
ccgtccacgc cgtcagcct cccgcacttc tcttgggacg cctgcgacga cgtcgaaggc 3840
taccgcgtcc cggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg cggggaccgc 3900
gaggcctggg agaggccctt cgacttcgc cccgagcgct tctgcccgg ggcggcgcg 3960
gagaaggctc accccctggg gaactgcttc gagctcatcc cgttcggcgc cggccggagg 4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggtg ttctgacagt acttcttggg cagcgtgctg 4080
cacgcgttg actggcgctt gctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
ggcctcgcgc tgcccaggc agtgccgctc cgcgcgctg ccacgccacg gctcgtgcg 4200
gaagcctatg cctga 4215

```

<210> 24

<211> 527

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта R252W

<400> 24

```

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1           5           10           15

```

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

Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile
450 455 460

Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly
465 470 475 480

Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys
485 490 495

Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro
500 505 510

Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala
515 520 525

<210> 25
<211> 4215
<212> ДНК
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> геномна ДНК F35H мутанта R405H

<400> 25
atgcagctcg cggcgttgig caccgacccc gtggtgctgt gcagcgccctt cctctgcctc 60
ctctccacg tggctctcgg ctgctgctg caccctcctt ctgcgcctc ttctccggg 120
cgccgcgggc agctcccgcc ggggccaccg ggctgcca tcctcggcgc gctgccactc 180
gtgggcccag ccccgcacgc cggcctggcc gcgctggcgc gcaagtacgg tcccatcatg 240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtggtg gtggcgtcgt ccccgcgcg gcgcgggacg 300
ttctcaagg cgtggacgc gcggtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cgcgcggac 360
atcacgtacg ggccgcagaa catggtgttc gcggactacg ggcccaagtg gaagctgatg 420
cggaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcgcggactg ggcgtgcgtg 480
cggcgcggcg aggcgggcca cgtgctgcgc ggcgtggcgg aggcggccgc ggccggcagg 540
cccgtcgtcg tgccggagct gctcgtgtgc gccctgcga acatcgtcgg gcagatcaca 600
gtgagcaagc ggggtgttga cgcgcagggg gacgactcga acaggtgagg atgggaggtc 660
catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagttcat ttggaaagaa aagaacatat 720

ttttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttctg ataaagtttg taaaaaaaaat	780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt	840
ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac	900
ttaatgcgat cgttttctct gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct	960
tgagagatga gtttaccctg ttgtccttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca	1020
tggaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aatcatcac cactcatttt aactctaacg	1080
tctatagttg tttgatatat tttattaagg acacctcca acgtggtagt gtgtagtgtt	1140
ggaagggtgtt atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtgtt	1200
gatgatttaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtcctcta	1260
ttgcaaatgc tagacgggaa accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa	1320
acttaaaaag atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa	1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggccgct	1440
cgataaataa ttaatgagag tcttgggatt tttcatgcat ggaaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcatct aatataatat ataacgctga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgcagaccgg cacgggcatg ttcaacatca ggcacttcgt gccggcgctg	1620
gccgctctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgcggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggaccg cgcgcgccag	1740
ggccgcccgg acttctctga ccggctccgc gccacgatgg acgccggcgc cgcgcgccac	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gcctcatctt cgtaagctcc	1860
ctgctttttc ctgcaccca accatgcac atcatatgca cttatatttt acacttgctc	1920
ggtttttctt tagtaactaa ctaatcgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtacta	1980
cagcgatggg tcatcggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctc acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtggcg tgttaggtgg agatagtggg tcgagttgtt ggaaagacaa tatcaaaaac	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccaccttg tttagtcgaa	2220
cacattacta gagtgaataa tggttccaat gttaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttcga gtagcacatc caggttgggt tcgatcctct cggggcgcaa	2340

ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgccccg tccgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga caccctccga ctagtgacag ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaaaaaag tggagacgta gatatgatag aggttccctt tcttaagcaa acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagitta aaaaaaactt taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatata ttatcgagtc gacttttatg gaattattgt	2640
ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt tttttcaagg gatttttatt tttttccaaa	2760
agaaaaataa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttcctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgtttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtggggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcttagacta	3060
gaagaattgg tagtcaaata gagcaaatgc ccgaaagcac actgggcctt cgacacagtg	3120
ataccaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttcggtgttg gtgtaaacga	3180
ccaaagatgc tgaataaac tgatcgtcac catcgtgaa tctaactttc gacacactgt	3240
taccaaatac ttctgcaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat	3300
tttttgtcac taattaacca cactgttctt tgcttgaccg tgacaaaaaa aaactttttt	3360
gtgaagcagt gttgccgtaa accacaacca tcatgaactc acttgccctg tcatatgtac	3420
ttgtaccatc gaargccgag cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcactg	3480
atacgcctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actatftctt	3540
ttcggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggccgggtacg	3600
gacaagtcgt cgatcatcgt ggagtgggag atggcggaga tgctcaagaa cccgaccgtc	3660
atggcgcgcg cgcaggagga gctggaccgc gggtgggccc ggggcccggc cctggaggag	3720
tgggaactgc ccggcctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcggctgcac	3780
ccgtccacgc cgtcagcct ccgcacttc tcttgggag cctgcgacga cgtcgacggc	3840
taccaagttc cggccaacac ccgcctgtct gtcaacgtct gggccatcgg ccgggacccg	3900
gaggcctggg agaggccct cgacttcgcg ccgagcgct tctgccccg gggcggcgcg	3960

gagaaggtcg accccctggg gaactgcttc gagctcctcc cgttcggcgc cggccggagg 4020
 atctgcgcgg ggaagctggc gggcatgggtg ttctgtcagt acttctctggg cagctgctg 4080
 cagcggttcg actggcgctt gctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
 ggctctgcgc tgcctaaaggc agtgccgctc cgcgcgctg ccacgccacg gctcgtgccc 4200
 gaagcctatg cctga 4215

<210> 26

<211> 527

<212> ПРТ

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта R405H

<400> 26

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
 1 5 10 15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
 20 25 30

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
 35 40 45

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
 50 55 60

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg
 85 90 95

Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Asn Arg
 100 105 110

Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Arg Gln Asn Met
 115 120 125

Val Phe Ala Asp Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys Leu Ala

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

Arg Ala Val Gly Arg Gly Arg Arg Leu Glu Glu Ser Asp Leu Pro Gly
355 360 365

Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu His Pro
370 375 380

Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Leu Asp Ala Cys Asp Asp
385 390 395 400

Val Asp Gly Tyr His Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Val Asn Val
405 410 415

Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Ala Trp Glu Arg Pro Leu Asp Phe
420 425 430

Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala Glu Lys Val Asp Pro
435 440 445

Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile
450 455 460

Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly
465 470 475 480

Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys
485 490 495

Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro
500 505 510

Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala
515 520 525

<210> 27

<211> 4215

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> геномна ДНК F35H мутанта P407L

<400> 27

atgcagctcg cggcggttggtg caccgacccc gtgggtgctgt gcagcgccctt cctctgcctc	60
ctctctccacg tggctctctcg ctgctgctg caccctcctt ctgccgcctc ttctctcggg	120
cgcgcggggc agctcccgcg gggggccacg ggcctgcccga tctcgggcgc gctgccactc	180
gtggggcccag ccccgcaagc cggcctgggc gcgctgggcgc gcaagtaagg tcccatcatg	240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtgggt gtggcgctgt ccccgcgcg cgcgcgggac	300
ttctctcaagg cgttggacgc gcggtacgc aaccggccgg ccgtggcgag cgcgcgggac	360
atcacgtacg ggcggcagaa catgggtgtt cgggactacg ggcccaagtg gaagctgatg	420
cggaaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcggcgactg ggcgtgcgtg	480
cggcgcgcg cggccgggcca cgtgctgcgc ggcgtggcgagg aggcggccgc ggcgggcagg	540
ccgctgctcg tgcgggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca	600
gtgagcaagc ggggtgttga cgcgcagggg gacgactcga acaggtgagg atgggaggtc	660
catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagttcat ttggaaagaa aagaacatat	720
ttttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttctg ataaagtttg taaaaaaaaat	780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt	840
ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac	900
ttaatgcgat cgtttttctt gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct	960
tgagagatga gtttacctgc ttgtccttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca	1020
tggaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg	1080
tctatagttg tttgatata tttattaaagg acacctcca acgtgggtgg gtgtagtggt	1140
ggaagggtgt atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtggt	1200
gatgatttaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtctctc	1260
ttgcaaatgc tagacgggac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa	1320
acttaaaaag atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa	1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggccgct	1440
cgataaataa ttaatgagag tcttgggatt tttcatgcat ggaaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcatct aatataatat ataacgtga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tcttgaccgg cacgggcatg ttcaacatca gcgacttcgt gcggcgctg	1620

gcgcgtctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgcggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggaccg cgcgcgccag	1740
ggccgcccgg acttcgtcga cgggtccgc gccacgatgg acgcgggcgc cgcgcgcgac	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gcctcatctt cgtaaagctcc	1860
ctgttttttc ctgcggccca accatgcac atcatatgca cttatatatt acacttgctc	1920
ggtttttctt tagtaactaa ctaatccgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtacta	1980
cagcgatggg tcatcggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctc acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtggcg tgttaggtgg agatagtggc tcgagttggt ggaaagacaa tatcaaaaac	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccacctg tttggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaataa tggttccaat gttaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttcga gtagcacatc caggttgggt tcgatcctct cggggcgcaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgccccg tccgtctca ggaatcgata	2400
ttctacagc caccctccga ctagtgacag ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaaaaaag tggagacgta gatatgatag aggttccctt tctaagcaa acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagitta aaaaaaactt taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatata ttatcgagtc gacttttatg gaattattgt	2640
ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt tttttcaagg gatttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttccctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtcgggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcttagacta	3060
gaagaattgg tagtcaaata gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcttt cgacacagtg	3120
ataccaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaaactg ttcggtgttg gtgtaaacga	3180
ccaagatgc tgaaaataac tgatcgtaac catccgtgaa tctaactttc gacacactgt	3240

taccaaatcc ttctgcaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat 3300
 tttttgtcac taatttaacca cactgttctt tgcttgaccg tgacaaaaaa aaactttttt 3360
 gtgaagcagt gttgccgtaa accacaacca tcatgaactc acttgccctg tcatatgtac 3420
 ttgtaccatc gaacgcgcgc cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcaactg 3480
 ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagittg cttacttcga actatttctt 3540
 ttctggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggcgggtaag 3600
 gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtgggcg atggcggaga tgctcaagaa cccgaccgtc 3660
 atggcgcgcg ccgaggagga gctggaccgc gcggtgggac ggggcggcg cctggaggag 3720
 tcggacctgc ccggctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcggtcgcac 3780
 ccgtccacgc cgtcagcct ccgcacttc tccttggacg cctgcgacga cgtcgacggc 3840
 taccggctcc tggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg ccgggaccgc 3900
 gaggcctggg agaggcccc ctgacttcgc ccgagcgt tcctgcccgg gggcggcgcg 3960
 gagaaggctg accccctggg gaactgcttc gagtcctcc cgttcggcgc ccgcccggag 4020
 atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggtg ttctgtcagt acttcttggg caccgtctg 4080
 caccggttcg actgggcct gcctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
 ggctctgcgc tgcctaaggc agtgcgcctc ccgcgcgtcg ccacgccacg gctcgtgcg 4200
 gaagcctatg cctga 4215

<210> 28

<211> 527

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта P407L

<400> 28

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
 1 5 10 15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
 20 25 30

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly

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

Gln Phe Asp Gly Leu Ile Thr Lys Leu Leu Ala Glu His Ala Ala Thr
260 265 270

Ala Ala Asp Arg Ala Arg Gln Gly Arg Pro Asp Phe Val Asp Arg Leu
275 280 285

Arg Ala Thr Met Asp Ala Gly Ala Ala Ala Asp Asp Glu Ser Gly Glu
290 295 300

Thr Ile Thr Glu Val Asn Ile Lys Gly Leu Ile Phe Asp Met Phe Thr
305 310 315 320

Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ile Ile Val Glu Trp Ala Met Ala Glu
325 330 335

Met Leu Lys Asn Pro Thr Val Met Ala Arg Ala Gln Glu Glu Leu Asp
340 345 350

Arg Ala Val Gly Arg Gly Arg Arg Leu Glu Glu Ser Asp Leu Pro Gly
355 360 365

Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu His Pro
370 375 380

Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Leu Asp Ala Cys Asp Asp
385 390 395 400

Val Asp Gly Tyr Arg Val Leu Ala Asn Thr Arg Leu Leu Val Asn Val
405 410 415

Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Ala Trp Glu Arg Pro Leu Asp Phe
420 425 430

Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala Glu Lys Val Asp Pro
435 440 445

Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile
450 455 460

Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly

465	470	475	480
Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys			
	485	490	495
Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro			
	500	505	510
Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala			
	515	520	525

<210> 29
 <211> 4215
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> геномна ДНК F35H мутанта E427K

<400> 29
 atgcagctcg cggcgttggtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgctt cctctgcctc 60
 ctctccacg tggctctcgg ctgcgtgtg caccctctt ctgccgctc ttctccggg 120
 cgcgcggggc agctcccgcc gggggcaccg ggctgcca tctcgggcg gctgccactc 180
 gtgggcccag ccccgcaagc cggcctggcc gcgtggcgc gcaagtacgg tcccatcatg 240
 tacctgaaga tgggcacggc cggcgtgggtg gtggcgtgt ccccgcgcg gcgcgggacg 300
 ttctcaagg cgctggagc gcggtacgcc aaccggcgg ccgtggcgag cgcgcgggac 360
 atcacgtaag ggcggcagaa catggtgttc gcggactac ggcccaagt gaagctgatg 420
 cggaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcgcggactg ggcgtgcgtg 480
 cggcgcggcg aggcgggcca cgtgctgcgc ggcgtggcgg aggcggcgc ggcggcagg 540
 cccgtcgtcg tgccggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca 600
 gtgagcaagc ggggtgtcga cgcgcagggg gacgactcga acaggtgagg atgggaggtc 660
 catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagtcat ttggaaagaa aagaacatat 720
 tttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttcg ataaagtitt taaaaaaaat 780
 ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt 840
 ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac 900

ttaatgcgat cgttttctct gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct	960
tgagagatga gtttacctgc ttgtccttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca	1020
tggaacattg gtcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg	1080
tctatagttg ttigatatat ttatttaagg acaccctcca acgttggtggg gtgtagtggt	1140
ggaagggtgtt atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtggt	1200
gatgatttaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtcctcta	1260
ttgcaaatgc tagacggaac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa	1320
acttaaaaag atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa	1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggccgct	1440
cgataaataa ttaatgagag tcttggggatt ttcatgcat ggaaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcattc aatataatat ataacgctga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgcctgaccg cacgggcctg ttcaacatca gcgacttcgt gccggcgctg	1620
gccgctctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgcggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggaacc cgcgcgccag	1740
ggccgcccgg acttcgtcga ccggctccgc gccacgatgg acgccggcgc cgcgcgcgac	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gccctatctt cgtaagctcc	1860
ctgctttttc ctgcgcccc accatgcac atcatatgca cttatatatt acacttgctc	1920
ggttttctti tagtaactaa ctaatccgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtacta	1980
cagcgatggg tcatcggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctt acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtgggc tgttaggtgg agatagtggg tcgagttgtt ggaaagacaa tatcaaaaac	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccacctg ttggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaataa tggttccaat gtaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttccga gtagcacatc cagggtgggt tcgattctct cgagggcgaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgccccg tccgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga caccctccga ctagtgacag ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaasaaag tggagacgta gatatgatag aggttccctt tctaagcaa acgtgaatgc	2520

tatgaaaatt atgcagttta aaaaaaactt taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatata ttatcgagtc gacttttatg gaattattgt	2640
ttttgtttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt tttttcaagg gattttttatt tttttccaaa	2760
agaaaaataa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttcctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tcogattctg acgttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtccggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcttagacta	3060
gaagaattgg tagtcaaata gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcttt cgacacagtg	3120
ataccaaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttccggtgttg gtgtaaacga	3180
ccaaagatgc tgaataaac tgatcgtcac catccgtgaa tctaactttc gacacactgt	3240
taccaaatcc ttctgcaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat	3300
tttttgtcac taattaacca cactgttctt tgcttgaccg tgacaaaaaa aaactttttt	3360
gtgaagcagt gttgcgtaa accacaacca tcatgaactc acttgccctg tcatatgtac	3420
ttgtaccatc gaacgcgcg cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcactg	3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actatttctt	3540
ttcggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gtccgcagg acatgttcac ggccgggtacg	3600
gacacgtcgt cgtcatcgt ggagtgggcg atggcggaga tgctcaagaa ccgacccgtc	3660
atggcgcgcg ccgaggagga gctggaccgc gcggtgggcc ggggccggcg cctggaggag	3720
tccgacctgc ccggcctccc ctacctgcag gggtgtgca aggaggccat ggggtgcac	3780
ccgtccacgc cgtcagcct ccgcacttc tccctggacg cctgcgacga cgtcgacggc	3840
taccgcgtcc cggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct ggcccatcgg ccgggacccg	3900
gaggcctgga agaggccctt cgaattccgc ccgagcgct tctgcccgg gggcggcgcg	3960
gagaaggctg accccctggg gaactgcttc gagtcacac cgttcggcgc cggcgggagg	4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggtg ttctgtcagt acttccctggg cagcgtgctg	4080
cacgcgttcg actggcgctt gcctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc	4140

ggcctcggcg tgcctcaaggc agtgccgctc cgcgcgctcg ccacgccacg gctcgtgcgc 4200
gaagcctatg cctga 4215

<210> 30
<211> 527
<212> PPT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта E427K

<400> 30

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1 5 10 15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
20 25 30

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
35 40 45

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
50 55 60

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg
85 90 95

Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Asn Arg
100 105 110

Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Arg Gln Asn Met
115 120 125

Val Phe Ala Asp Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys Leu Ala
130 135 140

Ser Val His Leu Leu Gly Ala Arg Ala Leu Ala Asp Trp Ala Cys Val
145 150 155 160

Arg Arg Gly Glu Ala Gly His Val Leu Arg Gly Val Ala Glu Ala Ala
165 170 175

Ala Ala Gly Arg Pro Val Val Val Pro Glu Leu Leu Val Cys Ala Leu
180 185 190

Ala Asn Ile Val Gly Gln Ile Thr Val Ser Lys Arg Val Phe Asp Ala
195 200 205

Gln Gly Asp Asp Ser Asn Arg Tyr Lys Asp Met Ile Val Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Gly Thr Gly Met Phe Asn Ile Ser Asp Phe Val Pro Ala Leu Ala
225 230 235 240

Arg Leu Asp Leu Gln Gly Val Gln Ala Lys Leu Arg Arg Val His Arg
245 250 255

Gln Phe Asp Gly Leu Ile Thr Lys Leu Leu Ala Glu His Ala Ala Thr
260 265 270

Ala Ala Asp Arg Ala Arg Gln Gly Arg Pro Asp Phe Val Asp Arg Leu
275 280 285

Arg Ala Thr Met Asp Ala Gly Ala Ala Ala Asp Asp Glu Ser Gly Glu
290 295 300

Thr Ile Thr Glu Val Asn Ile Lys Gly Leu Ile Phe Asp Met Phe Thr
305 310 315 320

Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ile Ile Val Glu Trp Ala Met Ala Glu
325 330 335

Met Leu Lys Asn Pro Thr Val Met Ala Arg Ala Gln Glu Glu Leu Asp
340 345 350

Arg Ala Val Gly Arg Gly Arg Arg Leu Glu Glu Ser Asp Leu Pro Gly
355 360 365

Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu His Pro

370 375 380

Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Leu Asp Ala Cys Asp Asp
385 390 395 400

Val Asp Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Val Asn Val
405 410 415

Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Ala Trp Lys Arg Pro Leu Asp Phe
420 425 430

Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala Glu Lys Val Asp Pro
435 440 445

Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile
450 455 460

Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly
465 470 475 480

Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys
485 490 495

Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro
500 505 510

Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala
515 520 525

<210> 31
<211> 4215
<212> ДНК
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> геномна ДНК F35H мутанта G450R

<400> 31
atgcagctcg cggcgttgtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgcctt cctctgcctc 60
ctcctccaag tggtctccg ctgctgctg caccctcctt ctgcgcctc ttctccggg 120
cgccgcgggc agctcccgcc ggggccaccg ggctgccga tcctgggcgc gctgccactc 180

gtggggccag ccccgcaagc cggcctggcc ggcgtggcgc gcaagtacgg tcccatcatg	240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtggcg gtggcgctgt ccccgcgccg ggcgcggaacg	300
ttcttcaagg cgcctggaagc gcggtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cgcgcgggac	360
atcacgtacg ggcggcagaa catgggtgtc gcggactacg gggccaagtg gaagctgatg	420
cggaaagctcg ccagcgtgca cctgctcgcc gcgcgcgcgc tcgcggactg ggcggtgcgtg	480
ggcgcgggcg aggcgggcca cgtgctgcgc ggcggtggcg aggcggccgc ggccggcagg	540
ccgctcgtcg tgccggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca	600
gtgagcaagc ggggtgttga cgcgcagggg gacgactcga acagggtgagg atgggaggtc	660
catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagtccat ttggaaagaa aagaacatat	720
ttttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttcg ataaagtttg taaaaaaaaat	780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt	840
ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac	900
ttaatgcgat cgttttctct gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct	960
tgagagatga gtttacctgc ttgtctttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca	1020
tggaaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg	1080
tctatagtthg tttagatatat ttatttaagg acacctcca acgtgggtgg gtgtagtggt	1140
ggaagggtgtt atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtgggt	1200
gatgatitaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtctctta	1260
ttgcaaatgc tagacggaac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa	1320
acttaaaaaa atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa	1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggccgct	1440
cgataaataa ttaatgagag tcttgggatt tttcatgcat ggaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcatct aatataatat ataacgtga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgcagaccgg caccggcatg ttcaacatca gcgacttcgt gccggcgctg	1620
gcgcgtctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgcggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgaagg ccgcggaccg cgcgcgccag	1740
ggcgcgccgg acttcgtgca cgggtcgcgc gccacgatgg acgcgggcgc cgcgcgccag	1800

gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gccatcatctt cgtaagctcc	1860
ctgctttttt ctcgccccca accatgcac ctcatatgca cttatatattt acacttgctc	1920
ggtttttcctt tagtaactaa ctaatccgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtacta	1980
cagcgatggg tcacgggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctt acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtggcg tgtaggtgg agatagtggc tcgagttggtt ggaaagacaa tatcaaaacc	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgttttga atccaccttg tttggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaaata tggttccaat gtttaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttcgga gtagcacatc caggttgggt tcgacccctc cgaggcgcaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgccccg tccgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga caccctccga ctagtgcacg ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaaaaaag tggagacgta gatatgatag aggttccctt tctaagcaa acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagttta aaaaaaactt taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatata ttatcgagtc gaacttttatg gaattattgt	2640
ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagtttaag ggctctcatt tttttcaagg gattttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttccctaa	2820
actagctcta acagtgcagc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgtttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtcgggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcttagacta	3060
gaagaattgg tagtcaaata gagcaaatgc ccgaaagcac actgggcttt cgacacagtg	3120
ataccaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttcggtgttg gtgtaaacga	3180
ccaaagatgc tgaaaataac tgatcgtcac catcgtgaa tctaactttc gacacactgt	3240
taccaaatcc ttctgcaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat	3300
ttttgttcac taattaacca cactgttctt tgcttgaccg tgacaaaaaa aaactttttt	3360
gtgaagcagt gttgcgtaa accacaacca tcatgaactc acttgccctg tcatatgtac	3420

```

ttgtaccatc gaagcccgcg cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcactg 3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagttgt cttacttcga actattttctt 3540
ttcggcgaac tgaagtaaag acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggccgggtacg 3600
gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtggggc atggcggaga tgcacaagaa cccgaccgtc 3660
atggcggcgc cgcaggagga gctggaccgc gcggtggggc gggccggcg cctggaggag 3720
tcggacctgc cgggcctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcgctgcac 3780
ccgtccacgc cgtcagcct cccgcacttc tcttgggacg cctgcgacga cgtcgaaggc 3840
taccgcgtcc cggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg cggggaccgc 3900
gaggcctggg agaggccct cgacttcgc cccgagcgt tctgcccgg gggcggcgcg 3960
gagaaggctg accccctgag gaactgcttc gagctcctcc cgttcggcgc cggccggagg 4020
atctgcggcg ggaagctggc gggcatggtg ttctgcaagt acttctggg cagcctgctg 4080
cagcggttcg actggcgctt gcctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
ggcctcggcg tgcacaaggc agtgcgcgtc cgcgcgctcg ccacgccacg gctcgtgccg 4200
gaagcctatg cctga 4215

```

<210> 32

<211> 527

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта G450R

<400> 32

```

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1           5           10           15

```

```

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
20           25           30

```

```

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
35           40           45

```

```

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
50           55           60

```

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg
85 90 95

Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Asn Arg
100 105 110

Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Arg Gln Asn Met
115 120 125

Val Phe Ala Asp Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys Leu Ala
130 135 140

Ser Val His Leu Leu Gly Ala Arg Ala Leu Ala Asp Trp Ala Cys Val
145 150 155 160

Arg Arg Gly Glu Ala Gly His Val Leu Arg Gly Val Ala Glu Ala Ala
165 170 175

Ala Ala Gly Arg Pro Val Val Val Pro Glu Leu Leu Val Cys Ala Leu
180 185 190

Ala Asn Ile Val Gly Gln Ile Thr Val Ser Lys Arg Val Phe Asp Ala
195 200 205

Gln Gly Asp Asp Ser Asn Arg Tyr Lys Asp Met Ile Val Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Gly Thr Gly Met Phe Asn Ile Ser Asp Phe Val Pro Ala Leu Ala
225 230 235 240

Arg Leu Asp Leu Gln Gly Val Gln Ala Lys Leu Arg Arg Val His Arg
245 250 255

Gln Phe Asp Gly Leu Ile Thr Lys Leu Leu Ala Glu His Ala Ala Thr
260 265 270

Ala Ala Asp Arg Ala Arg Gln Gly Arg Pro Asp Phe Val Asp Arg Leu

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

Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro
500 505 510

Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala
515 520 525

<210> 33
<211> 4215
<212> ДНК
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> геномна ДНК F35H мутанта P4295

<400> 33
atgcagctcg cggcgttgtg caccgacccc gtgggtgctgt gcagcgcctt cctctgcctc 60
ctctccacg tggctctcag ctgctgctg caccctcctt ctgccgcctc ttctccggg 120
cgccgcgggc agctcccgcc ggggccaccg ggctgcca tctcggcgc gctgccactc 180
gtgggcccag ccccgcaagc cggcctggcc gcgtggcgc gcaagtacgg tcccatcatg 240
tacctgaaga tgggcaagc cggcgtggtg gtggcgtcgt ccccgcgccg ggccgggacg 300
ttctcaagg cgctggacgc ggggtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cgccgggac 360
atcacgtac ggccgcagaa catggtgttc gcggactacg ggcccaagtg gaagctgatg 420
cggaagctcg ccagcgtgca cctgctcgcc gcgcgcgcgc tcgaggactg ggctgctgtg 480
cgccgcgggc aggcgggcca cgtgctgcgc gcgtggcgg aggcggccgc ggccggcagg 540
cccgtcgtcg tgcgggagct gctcgtgtgc gccctgcga acatcgtcgg gcagatcaca 600
gtgagcaagc gagggttcga cgcgcagggg gacgactcga acaggtgagg atgggaggtc 660
catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagttcat ttggaaagaa aagaacatat 720
ttttcttaca aatttatgct tactgtttct ttaagtttcg ataaagtttg taacaaaaat 780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt 840
ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac 900
ttaatgcgat cgtttttctt gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct 960
tgagagatga gtttacctgc ttgtccttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca 1020
tggaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg 1080

tctatagtgtg	tttgatatat	tttattaagg	acacccctcca	acgtgggtggt	gtgtagtggt	1140
ggaagggtgtt	atttgtaaat	tgaataatca	actagagacg	ttagatctaa	aatgagtggt	1200
gatgatttaa	tatgtgcacc	atgtgcacca	gtcttctatg	tgcaccagat	atgtcctcta	1260
ttgcaaatgc	tagacggaac	accagctagc	actagcagac	tgtttatgtg	gaaagaaaaa	1320
acttaaaaaag	atcagctagg	aagctgctgt	catctgtacg	tatatatggt	gaagactgaa	1380
caatctgcat	gacaagcaaa	acttagctta	aaagcgaaaa	gagcgatgga	aacggcgcgt	1440
cgataaataa	ttaatgagag	tcttgggatt	tttcatgcat	ggaaaaaaac	aaagctggca	1500
tttttcatct	aatataatat	ataacgctga	tatcatattg	cgtgcagata	caaggacatg	1560
atcgtgtcgc	tgctgacggg	cacgggcatg	ttcaacatca	gcgacttcgt	gcgggcgctg	1620
gcgcgtctgg	acctgcaggg	cgtgcaggcg	aagctgcggc	gcgtccaccg	ccagttcgac	1680
ggcctcatca	ccaagctgct	ggcggagcac	gcgcgcacgg	ccgcggaccg	cgcgcgccag	1740
ggccgcgcgg	acttcgtcga	ccggctccgc	gccacgatgg	acgcgggcgc	cgccgcgcac	1800
gacgagagcg	gcgagaccat	caccgaggtc	aacatcaagg	gcctcatctt	cgtaagctcc	1860
ctgctttttc	ctgcggccca	accatgcata	atcatatgca	cttatatttt	acacttgcct	1920
ggtttttctt	tagtaactaa	ctaatecgtc	gcagctgcga	tacacgtagc	actagtacta	1980
cagcgatggg	tcatcggtaa	ctgaatctaa	ggtgcaatag	agtgcacggc	cgcgggatca	2040
tggcgtgaca	tgggagctaa	gctaagccag	tggccacctc	acgaaggcac	tgaccgaaag	2100
ctcagtggcg	tgtaggtggg	agatagtggg	tcgagttggt	ggaaagacaa	tatcaaaaac	2160
actctccaat	tgatgatgtg	tagggcctgc	agtgttttga	atccaccttg	tttggtcgaa	2220
cacattacta	gagtgaataa	tggttccaat	gttaattgat	agcgcgaaag	ggtctctagc	2280
gtaatggtta	aaccttcgga	gtagcacatc	caggittgggt	togatcctct	cgagggcgaa	2340
ttttcaagct	ttgttaaaaa	aattatctcg	ttgtgccccg	tcgctctcca	ggaatcgata	2400
ttctacacga	cacctccgga	ctagtgcacg	ttgattgact	cgttagtgat	gagaagccat	2460
gctaaaaaag	tggagacgta	gatatgatag	aggttccctt	tcctaagcaa	acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt	atgragttaa	aaaaaaactt	taaagataaa	caggaattct	cttttttggg	2580
acaaacaata	cgaatgcacc	tccaaatata	ttatcgagtc	gaacttttatg	gaattattgt	2640
ttttgttatt	tctaagatgg	gagcccaaaa	tcacatacaa	attattcagt	gaatgcctcg	2700

gtgtttttttt attagtttaag ggctcttcatt tttttcaagg gattttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatctctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttctctaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcttg tatagtgtgc	2880
agcaaccaca tccgattctg acgttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtcgggcata	2940
gggaatgcat tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt	3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcctagacta	3060
gaagaattgg tagtcaaatc gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcttt cgacacagtg	3120
ataccaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttcggtgttg gtgtaaacga	3180
ccaaagatgc tgaaaataac tgatcgtcac catccgtgaa tctaactttc gacacactgt	3240
taccsaatcc ttggtcaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat	3300
tttttgtcac taattaacca cactgtttctt tgcttgaccg tgacaaaaaa aaactttttt	3360
gtgaagcagt gttgcgtaa accacaacca tcatgaactc acttgccttg tcatatgtac	3420
ttgtaccatc gaacgcgcgc cgctaagaca atgcaccacc cttcaagtct tagctcactg	3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actattttctt	3540
ttcggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggcgggtacg	3600
gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtggggc atggcggaga tgctcaagaa cccgaccgtc	3660
atggcgcgcg cgcaggagga gctggaccgc gcggtggggc ggggcgggcg cctggaggag	3720
tgggacctgc ccggcctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcggctgcac	3780
ccgtccacgc cgtcagcct ccgcacttc tccttgggaag cctgcgacga cgtcgaaggc	3840
taccgctgc ccggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg ccgggaccgc	3900
gaggcctggg agaggctcct cgacttcgc ccgagcgct tcctgcccgg gggcggcgcg	3960
gagaaggtag accccctggg gaactgcttc gagctcatcc cgttcgggcg cggccggagg	4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggtg ttctgtcagt acttcctggg cagcctgctg	4080
cacgcgttg actggcgctt gcctgaaggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc	4140
ggcctcgcgc tgcccaaggc agtgccgctc cgcgcgctg ccacgccacg gctcgtgcgc	4200
gaagcctatg cctga	4215

<211> 527

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта P429S

<400> 34

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1 5 10 15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
20 25 30

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
35 40 45

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
50 55 60

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg
85 90 95

Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Asn Arg
100 105 110

Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Arg Gln Asn Met
115 120 125

Val Phe Ala Asp Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys Leu Ala
130 135 140

Ser Val His Leu Leu Gly Ala Arg Ala Leu Ala Asp Trp Ala Cys Val
145 150 155 160

Arg Arg Gly Glu Ala Gly His Val Leu Arg Gly Val Ala Glu Ala Ala
165 170 175

Ala Ala Gly Arg Pro Val Val Val Pro Glu Leu Leu Val Cys Ala Leu

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

Val Asp Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Val Asn Val
405 410 415

Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Ala Trp Glu Arg Ser Leu Asp Phe
420 425 430

Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala Glu Lys Val Asp Pro
435 440 445

Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile
450 455 460

Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly
465 470 475 480

Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys
485 490 495

Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro
500 505 510

Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala
515 520 525

<210> 35
<211> 4215
<212> ДНК
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> геномна ДНК F35H мутанта P429L

<400> 35
atgcagctcg cggcgttgtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgcctt cctctgcctc 60
ctctctccacg tggctctccg ctgctgctg caccctcctt ctgcccctc ttctccggg 120
cgccgcggggc agctcccgcc ggggccaccg ggctgcca tcctgggcgc gctgccctc 180
gtgggcccag ccccgccagc cggcctggcc gcgctggcgc gcaagtacgg tccatcatg 240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtggtg gtggcgtcgt ccccgccgc ggccgggac 300
ttctcaagg cgctggacgc gcgtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cgccgggac 360

atcacgtacg ggcgggcagaa catgggtgttc gcggactacg ggcccaagtg gaagctgatg	420
cgggaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcgcggactg ggcgtgctg	480
cggcgcggcg aggcgggcca cgtgctgcgc ggcgtggcgg aggcggccgc ggcgggcagg	540
cccgctcgtc tgcgggagct gctcgtgtgc gccctcgcca acatcgtcgg gcagatcaca	600
gtgagcaagc ggggtgttcga cgcgcagggg gacgactcga acaggtaggg atgggaggtc	660
catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagttcat ttggaaagaa aagaacatat	720
ttttcttaca aatttatgtc tactgtttct ttaagtcttcg ataaagtttg taaaaaaaaat	780
ttaggctagt ttgaaactcc atttaggatt tctatcttcc aaagaaaaat aaacgaattt	840
ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggctctc aaactagccc tcaataaaac	900
ttaatgcgat cgttttctct gactctcatt catctttctc tggttatcta attgggtcct	960
tgagagatga gtttacctgc ttgtccttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca	1020
tggaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg	1080
tctatagttg tttgatatat ttatttaagg acacctcca acgtggtggt gtgtagtggt	1140
ggaagggtgt atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtggt	1200
gatgatttaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtctctta	1260
ttgcaaatgc tagacggaac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa	1320
acttaaaaag atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa	1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggccgct	1440
cgataaataa ttaatgagag tcttgggatt ttcatgcat ggaaaaaaac aaagctggca	1500
ttttcatct atataatat ataacgctga tctcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgcagaccgg caggggcatg ttcaacatca gcgacttcgt gccggcgcgtg	1620
gcgcgtctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctggcgc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggctctatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggacgc cgcgcgccag	1740
ggccgcccgg acttcgtcga ccggctccgc gccacgatgg acgccggcgc cgcgcgcgac	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gctctatctt cgtaaagctcc	1860
ctgccttttc ctgcgccca accatgcac atcatatgca cttatatttt acacttgctc	1920
ggttttcttt tagtaactaa ctaatcgtc gcagctgcga taacgttagc actagtacta	1980

cagcgatggg	tcacgggtaa	ctgaatctaa	ggtgcaatag	agtgcacggc	cgcgggatca	2040
tggcgtgaca	tgggagctaa	gctaagccag	tggccacctt	acgaaggcac	tgaccgaaag	2100
ctcagtggcg	tgttaggtgg	agatagtggg	tcgagttggt	ggaaagacaa	tatcaaaaacc	2160
actctccaat	tgatgatgtg	tagggcctgc	agtgttttga	atccaccttg	tttggctgaa	2220
cacattacta	gagtgaata	tggttccaat	gttaattgat	agcgcgaaag	ggctctctagc	2280
gtaatggtta	aaccttcga	gtagcacatc	cagggtgggt	tcgactctct	cgaggggcga	2340
ttttcaagct	ttgttaaaaa	aattatctcg	ttgtgccccg	tcgctctca	ggaatcgata	2400
ttctacacga	caccttcga	ctagtgcacg	ttgattgact	cgttagtgat	gagaagccat	2460
gctaaaaaag	tggagacgta	gatatgatag	aggctccctt	tcctaagcaa	acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt	atgcagttta	aaaaaaactt	taaagataaa	caggaattct	cttttttggg	2580
acaaaacaata	cgaatgcacc	tccaaatata	ttatcgagtc	gactttttatg	gaattattgt	2640
ttttgttatt	tctaagatgg	gagcccaaaa	tcacatacaa	attatttcagt	gaatgcctcg	2700
gtgttttttt	attagtaag	ggctctcatt	ttttcaagg	gattttttatt	tttttccaaa	2760
agaaaataaa	ctaactctct	ttagaaaaat	ggaaatctat	tggagaaatg	aggcttctaa	2820
actagctcta	acagtgcagc	agttaatcag	gagaagatat	tagactcttg	tatagtgtgc	2880
agcaaccaca	tcgattctcg	acgttttagc	ttaatgttcg	ctatgtagac	gtcgggcata	2940
gggaatgcat	tgctaccaga	acacgaatga	cagctatgca	agtcctctaga	acgttggaat	3000
agttaaacaaa	cgtgatagat	gtaacctctg	gatcatggta	tgatgtcatt	tcctagacta	3060
gaagaattgg	tagtcaaatc	gagcaaagtc	ccgaaagcac	actgggcctt	cgacacagtg	3120
ataccaaaga	tgctgaaaag	aactgaggca	cgataaaactg	ttcgggtgtt	gtgtaaaacga	3180
ccaaagatgc	tgaaaataac	tgatcgtcac	catcgtgtaa	tctaactttc	gacacactgt	3240
taccaaatcc	ttcgtcaaaa	ttacaggaat	aattaaggcg	cttagacgat	gataaaccat	3300
tttttgtcac	taattaaaca	cactgttctt	tgcttgaccg	tgacaaaaaa	aaactttttt	3360
gtgaagcagt	gttgccgtaa	accacaacca	tcatgaactc	acttgccttg	tcatatgtac	3420
ttgtaccatc	gaacgccg	cgctaagaca	atgcaccacc	cttcaagtct	tagctcactg	3480
ataccgctaa	ttaagttaga	taatgtcgat	tactagtgtg	cttacttcga	actatttctt	3540
ttcggcaaac	tgaagtaaag	acaacgtttt	gttccgcagg	acatgttcac	ggcgggtacg	3600

gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtgggcg atggcggaga tgctcaagaa cccgaccgtc 3660
atggcgcgcg cgcaggagga gctggaccgc gcggtgggcc ggggcggcg cctggaggag 3720
tcggacctgc cgggctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcggctgcac 3780
ccgtccacgc cgtcagcct cccgcacttc tccttggacg cctgcgacga cgtcgacggc 3840
taccgcttcc cggccaacac ccgctgtctc gtcaacgtct gggccatcgg cggggacccg 3900
gaggcctggg agaggctcct cgacttcgcg ccgagcgct tcctgcccgg gggcggcgcg 3960
gagaaggctc accccctggg gaactgtctc gagtcctcc cgttcggcgc cggccggagg 4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggg ttctgtcagt acttcctggg cacgctgtg 4080
cacgcttgc actggcgctt gcctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
ggcctgcgcg tgcccaaggc agtgccgctc cgcgcgtcgc ccacgccacg gctcgtgcg 4200
gaagcctatg cctga 4215

<210> 36

<211> 527

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта P429L

<400> 36

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1 5 10 15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
20 25 30

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
35 40 45

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
50 55 60

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg

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

Thr Ile Thr Glu Val Asn Ile Lys Gly Leu Ile Phe Asp Met Phe Thr
305 310 315 320

Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ile Ile Val Glu Trp Ala Met Ala Glu
325 330 335

Met Leu Lys Asn Pro Thr Val Met Ala Arg Ala Gln Glu Glu Leu Asp
340 345 350

Arg Ala Val Gly Arg Gly Arg Arg Leu Glu Glu Ser Asp Leu Pro Gly
355 360 365

Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu His Pro
370 375 380

Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Leu Asp Ala Cys Asp Asp
385 390 395 400

Val Asp Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Val Asn Val
405 410 415

Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Ala Trp Glu Arg Leu Leu Asp Phe
420 425 430

Arg Pro Glu Arg Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala Glu Lys Val Asp Pro
435 440 445

Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile
450 455 460

Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly
465 470 475 480

Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys
485 490 495

Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro
500 505 510

Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala

515

520

525

<210> 37
 <211> 4215
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> геномна ДНК F35H мутанта R436C

<400> 37
 atgcagctcg cggcgttggtg caccgacccc gtggtgctgt gcagcgccit cctctgcctc 60
 ctctccacg tggctctcgg ctgctgtgtg caccctccit ctgccgcctc ttctccggg 120
 cgcgcggggc agctcccgcc gggggccaccg ggcttgccga tctcgggcgc gctgccactc 180
 gtgggcccag ccccgccacc cggcctgggc gcgctgggcgc gcaagtacgg tcccatcatg 240
 tacctgaaga tgggcacggc cggcgttggtg gtgagctgtg ccccgcgccg ggccgggacg 300
 ttctcaagg cgttggaacc gcggtaccgc aaccggccgg ccgtggcgag cgcgcgggac 360
 atcacgtacg ggccgcagaa catggtgttc gcggactacg ggcccaagtg gaagctgatg 420
 cgggaagctg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcgcggaactg ggctgtgcgtg 480
 cggcgcggcg aggcgggcca cgtgctgcgc ggcttgggcg aggcggccgc ggccggcagg 540
 cccgtcgtcg tgcgggagct gctcgtgtgc gccctgcgca acatcgtcgg gcagatcaca 600
 gtgagcaagc ggggtgttga cgcgcagggg gacgactcga acaggtgagg atgggaggtc 660
 catgaaatcc taccagctgt gagcatgcat aaaagttcat ttggaaagaa aagaacatat 720
 ttttcttaca aatttatgtc tactgtttct ttaagtttcg ataaagtttg taaaaaaaaa 780
 ttaggctagt ttgaaactcc atttaggati tctattttcc aaagaaaaat aaacgaattt 840
 ctcttgaaaa aatgaaaatt ctttagaaaa ataggttctc aaactagccc tcaataaaac 900
 ttaatgcgat cgttttctct gactctcatt catctttctc tggttatcta atggggtcct 960
 tgagagatga gtttacctgc ttgtccttta ttattgcaaa gacaacatat ctgatgcaca 1020
 tggaacattg gtgcacatgg tgcacatatg aaatcatcac cactcatttt aaatctaacg 1080
 tctatagttg tttgatatai ttatttaagg acaccctcca acgtgggtggt gtgtagtggt 1140
 ggaagggtgti atttgtaaat tgaataatca actagagacg ttagatctaa aatgagtggt 1200
 gatgatttaa tatgtgcacc atgtgcacca gtcttctatg tgcaccagat atgtcctcta 1260

ttgcaaatgc tagacggaac accagctagc actagcagac tgtttatgtg gaaagaaaaa	1320
acttaaaaag atcagctagg aagctgctgt catctgtacg tatatatggt gaagactgaa	1380
caatctgcat gacaagcaaa acttagctta aaagcgaaaa gagcgatgga aacggcgcgt	1440
cgataaataa ttaatgagag tcttgggatt tticcatgcat ggaaaaaaac aaagctggca	1500
tttttcatct aatataatat ataacgctga tatcatattg cgtgcagata caaggacatg	1560
atcgtgtcgc tgcctgaccgg cacgggcatg ttcaacatca gcgacttcgt gccggcgcgtg	1620
gcgcgtctgg acctgcaggg cgtgcaggcg aagctgcggc gcgtccaccg ccagttcgac	1680
ggcctcatca ccaagctgct ggccgagcac gccgcgacgg ccgcggaacc gcgcgcgcag	1740
ggccgccccg acttcgtcga ccggctccgc gccacgatgg acgccggcgc gccgcgcgac	1800
gacgagagcg gcgagaccat caccgaggtc aacatcaagg gcctcatctt cgtaagctcc	1860
ctgctttttc ctgcctccca accatgcac atcatatgca cttatatitt acacttgctc	1920
ggtttttctt tagtaactaa ctaatcgtc gcagctgcga tacacgtagc actagtacta	1980
cagcgatggg tcatcggtaa ctgaatctaa ggtgcaatag agtgcacggc cgcgggatca	2040
tggcgtgaca tgggagctaa gctaagccag tggccacctt acgaaggcac tgaccgaaag	2100
ctcagtgggc tgttaggtgg agatagtggg tcgagttggt ggaaagacaa tatcaaaaac	2160
actctccaat tgatgatgtg tagggcctgc agtgitttga atccaccttg ttgggtcgaa	2220
cacattacta gagtgaataa tggttccaat gtttaattgat agcgcgaaag ggtctctagc	2280
gtaatggtta aaccttccga gtagcacatc caggttgggt tcgatcctct cgagggcgaa	2340
ttttcaagct ttgttaaaaa aattatctcg ttgtgccccg tccgctctca ggaatcgata	2400
ttctacacga caccctccga ctagtgcag ttgattgact cgttagtgat gagaagccat	2460
gctaataaag tggagacgta gatatgatag aggttccctt tccaaagcaa acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt atgcagttta aaaaaaactt taaagataaa caggaattct cttttttgga	2580
acaaacaata cgaatgcacc tccaaatctc ttatcgagtc gacttttatg gaattattgt	2640
ttttgttatt tctaagatgg gagcccaaaa tcacatacaa attattcagt gaatgcctcg	2700
gtgttttttt attagttaag ggctctcatt tttttcaagg gatttttatt tttttccaaa	2760
agaaaataaa ctaatcctct ttagaaaaat ggaaatctat tggagaaatg aggttcccaa	2820
actagctcta acagtgagtc agttaatcag gagaagatat tagactcctg tatagtgtgc	2880

```

agcaaccaca tccgattctg acgttttagc ttaatgttcg ctatgtagac gtcgggcata 2940
gggaatgcct tgctaccaga acacgaatga cagctatgca agtctctaga acgttggagt 3000
agttaacaaa cgtgatagat gtaacctctg gatcatggta tgatgtcatt tcttagacta 3060
gaagaattgg tagtcaaatc gagcaaagtc ccgaaagcac actgggcctt cgacacagtg 3120
ataccaaaaga tgctgaaaag aactgaggca cgataaactg ttcggtgttg gtgtaaacga 3180
ccaaagatgc tgaataaac tgatcgtcac catccgtgaa tctaacttc gacacactgt 3240
taccaaatcc ttcgtaaaaa ttacaggaat aattaaggcg cttagacgat gataaaccat 3300
tttttgtcac taattaacca cactgttctt tgcttgaccg tgacaaaaaa aaactttttt 3360
gtgaagcagt gttgccgtaa accacaacca tcatgaactc acttgccctg tcatatgtac 3420
ttgtaccatc gaacgcccgcg cgctaagaca atgcaccacc cttcaagctt tagctcactg 3480
ataccgctaa ttaagttaga taatgtcgat tactagtgtt cttacttcga actatttctt 3540
ttcggcaaac tgaagtaaag acaacgtttt gttccgcagg acatgttcac ggccgggtacg 3600
gacacgtcgt cgatcatcgt ggagtgggcg atggcggaga tgcacaagaa cccgaccgtc 3660
atggcgcgcg cgcaggagga gctggaccgc gcggtgggcc ggggccggcg cctggaggag 3720
tcggacctgc ccggcctccc ctacctgcag gcggtgtgca aggaggccat gcgctgcac 3780
ccgtccacgc cgctcagcct ccgcacttc tcttggaag cctgcgacga cgtcgacggc 3840
taccgcgtcc cggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg ccgggacccg 3900
gaggcctggg agaggccctt cgacttcgcg ccgagtgct tctgcccgg gggcggcgcg 3960
gagaaggtcg accccctggg gaactgctt gagctcatcc cgttcggcg cggccggagg 4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatggtg ttcgtgaggt acttcctggg cagctgctg 4080
cacgcgttcg actggcgctt gcctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
ggcctcgcg tgcccaagc agtgccgctc cggcgctcg ccacgccacg gctcgtgccc 4200
gaagcctatg cctga 4215

```

<210> 38

<211> 527

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта R436C

<400> 38

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1 5 10 15

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
20 25 30

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly Gln Leu Pro Pro Gly
35 40 45

Pro Pro Gly Leu Pro Ile Leu Gly Ala Leu Pro Leu Val Gly Pro Ala
50 55 60

Pro His Ala Gly Leu Ala Ala Leu Ala Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Met
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Met Gly Thr Ala Gly Val Val Val Ala Ser Ser Pro Arg
85 90 95

Ala Ala Arg Thr Phe Leu Lys Ala Leu Asp Ala Arg Tyr Ala Asn Arg
100 105 110

Pro Ala Val Ala Ser Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Gly Arg Gln Asn Met
115 120 125

Val Phe Ala Asp Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Met Arg Lys Leu Ala
130 135 140

Ser Val His Leu Leu Gly Ala Arg Ala Leu Ala Asp Trp Ala Cys Val
145 150 155 160

Arg Arg Gly Glu Ala Gly His Val Leu Arg Gly Val Ala Glu Ala Ala
165 170 175

Ala Ala Gly Arg Pro Val Val Val Pro Glu Leu Leu Val Cys Ala Leu
180 185 190

Ala Asn Ile Val Gly Gln Ile Thr Val Ser Lys Arg Val Phe Asp Ala
195 200 205

Gln Gly Asp Asp Ser Asn Arg Tyr Lys Asp Met Ile Val Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Gly Thr Gly Met Phe Asn Ile Ser Asp Phe Val Pro Ala Leu Ala
225 230 235 240

Arg Leu Asp Leu Gln Gly Val Gln Ala Lys Leu Arg Arg Val His Arg
245 250 255

Gln Phe Asp Gly Leu Ile Thr Lys Leu Leu Ala Glu His Ala Ala Thr
260 265 270

Ala Ala Asp Arg Ala Arg Gln Gly Arg Pro Asp Phe Val Asp Arg Leu
275 280 285

Arg Ala Thr Met Asp Ala Gly Ala Ala Ala Asp Asp Glu Ser Gly Glu
290 295 300

Thr Ile Thr Glu Val Asn Ile Lys Gly Leu Ile Phe Asp Met Phe Thr
305 310 315 320

Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ile Ile Val Glu Trp Ala Met Ala Glu
325 330 335

Met Leu Lys Asn Pro Thr Val Met Ala Arg Ala Gln Glu Glu Leu Asp
340 345 350

Arg Ala Val Gly Arg Gly Arg Arg Leu Glu Glu Ser Asp Leu Pro Gly
355 360 365

Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val Cys Lys Glu Ala Met Arg Leu His Pro
370 375 380

Ser Thr Pro Leu Ser Leu Pro His Phe Ser Leu Asp Ala Cys Asp Asp
385 390 395 400

Val Asp Gly Tyr Arg Val Pro Ala Asn Thr Arg Leu Leu Val Asn Val
405 410 415

Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Glu Ala Trp Glu Arg Pro Leu Asp Phe

420	425	430
Arg Pro Glu Cys Phe Leu Pro Gly Gly Gly Ala Glu Lys Val Asp Pro		
435	440	445
Leu Gly Asn Cys Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile		
450	455	460
Cys Ala Gly Lys Leu Ala Gly Met Val Phe Val Gln Tyr Phe Leu Gly		
465	470	475
Thr Leu Leu His Ala Phe Asp Trp Arg Leu Pro Asp Gly Glu Glu Lys		
485	490	495
Leu Asp Met Ser Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Lys Ala Val Pro		
500	505	510
Leu Arg Ala Val Ala Thr Pro Arg Leu Val Pro Glu Ala Tyr Ala		
515	520	525

<210> 39
 <211> 4215
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність
 <220>
 <223> геномна ДНК F35H мутанта Q44stop

<400> 39	
atgcagctcg cggcggttggtg caccgacccc gtgggtgctgt gcagcgcctt cctctgcctc	60
ctctctccacg tggctctcctg ctgctgctg caccctcctt ctgccgcctc ttctctcggg	120
cggcgcgggt agctcccgcc ggggccaccg ggccctgcga tctcggcgc gctgccactc	180
gtgggcccag ccccgcacgc cggcctggcc gcgctggcgc gcaagtacgg tcccatcatg	240
tacctgaaga tgggcacggc cggcgtggtg gtggcgctgt ccccgcgcg cgcgcggacg	300
ttctcaagg cgctggacgc ggggtacgcc aaccggccgg ccgtggcgag cgcgcggac	360
atcacgtacg ggccgcagaa catggtgttc gggactacg ggcccaagtg gaagctgatg	420
cggaaagctcg ccagcgtgca cctgctcggc gcgcgcgcgc tcgcggactg ggcgctgcgtg	480
cggcgcggcg aggcgggcca cgtgctgcgc ggcggtggcg aggcggcgc ggccggcagg	540

cccgctgctg	tgccggagct	gctcgtgtgc	gccctcgcca	acatcgtcgg	gcagatcaca	600
gtgagcaagc	gggtgttcca	cgcgcagggg	gacgactcca	acagggtgagg	atgggaggtc	660
catgaaatcc	taccagctgt	gagcatgcat	aaaagttcat	ttggaaagaa	aagaacatat	720
ttttcttaca	aatttatgct	tactgtttct	ttaagtittc	ataaagtttg	taaaaaaaaa	780
ttaggcctagt	ttgaaactcc	atttaggatt	tctattttcc	aaagaaaaat	aaacgaattt	840
ctcttgaaaa	aatgaaaatt	ctttagaaaa	ataggttctc	aaactagccc	tcaataaaac	900
ttaatgcgat	cgttttctct	gactctcatt	catctttctc	tggttatcta	attgggtcct	960
tgagagatga	gtttacctgc	ttgtccttta	ttattgcaaa	gacaacatat	ctgatgcaca	1020
tggaacattg	gtgcacatgg	tgacacatag	aaatcatcac	cactcatitt	aatctctaac	1080
tctatagtgg	tttgatatat	tttattaagg	acacctccca	acgtgggtgg	gtgtagtggg	1140
ggaagggtgt	atttgtaaat	tgaataatca	actagagacg	ttagatctaa	aatgagtggg	1200
gatgatattaa	tatgtgcacc	atgtgcacca	gtcttctatg	tgcaccagat	atgtcctcta	1260
ttgcaaatgc	tagacgggac	accagctagc	actagcagac	tgtttatgtg	gaaagaaaaa	1320
acttaaaaaa	atcagctagg	aagctgctgt	catctgtacg	tatatatggg	gaagactgaa	1380
caatctgcat	gacaagcaaa	acttagctta	aaagcgaaaa	gagcgaatga	aacggccgct	1440
cgataaataa	ttaatgagag	tcttgggatt	tttcatgcat	ggaaaaaaaa	aaagctggca	1500
tttttcatct	aataataat	ataacgttga	tatcatattg	cgtgcagata	caaggacatg	1560
atcgtgtctg	tgctgaccgg	cacgggcatg	ttcaacatca	gcgacttcgt	gccggcgctg	1620
gcgcgtctgg	acctgcaggg	cgtgcaggcg	aagctgcggc	gcgtccaccg	ccagttcgac	1680
ggcctcatca	ccaagctgct	ggcggagcac	gccgcgacgg	ccgcggaccg	cgcgcgccag	1740
ggccgccccg	acttcgtcca	ccggctccgc	gccacgatgg	acgcggcgcc	cgcgcgcgac	1800
gacgagagcg	gcgagaccat	caccgaggtc	aacatcaagg	gcctcatctt	cgtaagctcc	1860
ctgctttttc	ctcgccccca	accatgcctc	atcatatgca	cttatatttt	acacttgctc	1920
ggtttttctt	tagtaactaa	ctaattcgtc	gcagctgcga	tacacgttagc	actagtacta	1980
cagcgaatgg	tcatcggtaa	ctgaatctaa	ggtgcaatag	agtcacaggg	cgcgggatca	2040
tggcgtgaca	tgggagctaa	gctaagccag	tggccacctc	acgaaggcac	tgaccgaaag	2100
ctcagtgggc	tgttaggtgg	agatagtggg	tcgagttgtt	ggaaagacaa	tatcaaaaac	2160

actctccaat	tgatgatgtg	tagggcctgc	agtgttttga	atccaccttg	tttggtcgaa	2220
cacattacta	gagtgaata	tggttccaat	gttaattgat	agcgcgaaag	ggctcttagc	2280
gtaatggtta	aaccttccga	gtagcacatc	caggttgagg	tcgatcctct	cgagggcgaa	2340
ttttcaagct	ttgttaaaaa	aattatctcg	ttgtgccccg	tcgctctca	ggaatcgata	2400
ttctacacga	cacctccga	ctagtgacag	ttgattgact	cgttagtgat	gagaagccat	2460
gctaaaaaag	tggagacgta	gatatgatag	aggttccctt	tcctaagcaa	acgtgaatgc	2520
tatgaaaatt	atgcagttta	aaaaaaactt	taaagataaa	cagggaattct	cttttttggg	2580
acaaacaata	cgaatgcacc	tccaaatata	ttatcgagtc	gaacttttatg	gaattattgt	2640
ttttgttatt	tctaagatgg	gagcccaaaa	tcacatacaa	attattcagt	gaatgcctcg	2700
gtgttttttt	attagttaag	ggctctcatt	tttttcaagg	gattttttatt	tttttccaaa	2760
agaaaaataa	ctaactctct	ttagaaaaat	ggaaatctat	tggagaaatg	aggttcctaa	2820
actagctcta	acagtgagtc	agttaatcag	gagaagatat	tagactcctg	tatagtgtgc	2880
agcaaccaca	tcgattctg	acgtttttagc	ttaatgttctg	ctatgtagac	gtcgggcata	2940
gggaatgcat	tgctaccaga	acacgaatga	cagctatgca	agtcctctaga	acgttggagt	3000
agttaacaaa	cgtgatagat	gtaacctctg	gatcatggta	tgatgtcatt	tcctagacta	3060
gaagaattgg	tagtcaaata	gagcaaagtc	ccgaaagcac	actgggcttt	cgacacagtg	3120
ataccaaaaga	tgctgaaaag	aactgaggca	cgataaaactg	ttcgggtgttg	gtgtaaacga	3180
ccaaagatgc	tgaataaac	tgatcgtcac	caticgtgaa	tctaactttc	gacacactgt	3240
taccaaattc	ttcgtcaaaa	ttacaggaat	aattaaggcg	cttagacgat	gataaaccat	3300
tttttgtcac	taattaacca	cactgttctt	tgcttgaccg	tgacaaaaaa	aaactttttt	3360
gtgaagcagt	gttgccgtaa	accacaacca	tcatagaactc	acttgccctg	tcatatgtac	3420
ttgtaccatc	gaacgccgcg	cgctaagaca	atgcaccacc	cttcaagtct	tagctcactg	3480
ataccgctaa	ttaagttaga	taatgtcgat	tactagtgtg	cttacttcga	actatttctt	3540
ttcggcaaac	tgaagttaaag	acaaagtttt	gttcgcgagg	acatgttcac	ggcgggtacg	3600
gacacgtcgt	cgatcatcgt	ggagtgggcg	atggcggaga	tgctcaagaa	cccgaccgtc	3660
atggcgcgcg	cgcaggagga	gctggaccgc	gcggtggacc	ggggccggcg	cctggaggag	3720
tcggacctgc	cgggcctccc	ctacctgcag	gnggtgtgca	aggaggccat	gnggtgtcac	3780

```

ccgtccacgc cgctcagcct cccgcacttc tccttggaag cctgcgacga cgtcgacggc 3840
taccgcgttc cggccaacac ccgcctgctc gtcaacgtct gggccatcgg ccgggacccg 3900
gaggcctggg agaggccctt cgacttcgcg cccgagcgct tcctgcccgg gggcggcgcg 3960
gagaaggtcg accccctggg gaactgcttc gagctcatcc cgttcggcgc cggccggagg 4020
atctgcgcgg ggaagctggc gggcatgggt ttctgtcagt acttcctggg cactgtgctg 4080
cactgcgttc actggcgctt gcctgacggc gaggagaagc tggacatgag cgagacgttc 4140
ggcctcgcgc tgcccaaggc agtgccgctc cgcgccgtcg ccacgccacg gctcgtgccg 4200
gaagcctatg cctga 4215

```

<210> 40

<211> 43

<212> PPT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність F35H мутанта Q44stop

<400> 40

```

Met Gln Leu Ala Ala Leu Cys Thr Asp Pro Val Val Leu Cys Ser Ala
1           5           10          15

```

```

Phe Leu Cys Leu Leu Leu His Val Ala Leu Arg Ser Leu Leu His Pro
          20          25          30

```

```

Pro Ser Ala Ala Ser Ser Ser Gly Arg Arg Gly
          35          40

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини від кукурудзи, що має поліпшену перетравлюваність, який включає:
 - а) скринінг на присутність алеля QTL, як-от алель QTL, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, водночас згаданий алель QTL містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, що
 - 10 призводить до зменшеної або відсутньої експресії mРНК гена та/або білка F35H (наприклад, мутацію нокдаун або нокаут), або мутацію, що призводить до нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H) або білка F35H, що має зменшену ферментативну активність під час трансляції, або білка F35H, що має підвищену ферментативну активність під час трансляції, або
 - 15 б) скринінг на зменшену або відсутню експресію mРНК гена що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) та/або білка F35H або нефункціонального білка F35H (наприклад, усіченого білка F35H) або білка F35H, що має зменшену ферментативну активність, або
 - 20 в) скринінг на присутність мутації, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mРНК гена, що кодує цитохром Р450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), та/або білка F35H або мутації, що призводить до нефункціонального білка F35H або білка F35H, що має зменшену ферментативну активність під час трансляції;

водночас поліпшена перетравлюваність стосується підвищеної перетравлюваності рослини кукурудзи або частини рослини від кукурудзи, що має характеристики а), b) або c) порівняно з рослиною кукурудзи або частиною рослини від кукурудзи, яка не має такої характеристики; та водночас немутований F35H вибирають з групи, що складається з:

- 5 (i) нуклеотидної послідовності, що містить послідовність SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидної послідовності, що має сДНК SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидної послідовності, що кодує амінокислотну послідовність, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 80 % ідентичність із послідовністю SEQ ID NO: 1 або 2;
- 10 (v) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який має щонайменше 80 % ідентичність із послідовністю SEQ ID NO: 3;
- (vi) нуклеотидної послідовності, що гібридується зі зворотним комплементом нуклеотидної послідовності, як визначено в пунктах (i), (ii) або (iii), у жорстких умовах гібридизації.

15 2. Спосіб за п. 1, який включає скринінг на присутність молекулярного маркерного алеля ma61134xxx та/або щонайменше одного молекулярного маркерного алеля, розташованого на хромосомному інтервалі на хромосомі 9, фланкованій маркерними алелями ma61070s01 і ma30168s02, переважно маркерними алелями ma50827s01 і ma16983s02, більш переважно маркерними алелями ma17117s01 і ma61125s01;

20 водночас ma61134xxx є інсерцією одного або більше нуклеотидів між положенням 134254381 і 134254382 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, переважно інсерцією, представленою в SEQ ID NO: 12; та

ma61070s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 121588825 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Т, переважно одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 13; та

25 ma30168s02 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 139452428 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Г, переважно одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 14; та

30 ma50827s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 127454426 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Г, переважно одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 15; та

ma16983s02 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 137363784 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Г, переважно одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 16; та

35 ma17117s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 132038900 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Г, переважно одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 17; та

40 ma61125s01 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 135947973 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Г, переважно одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 18.

3. Рослина кукурудзи або частина рослини від кукурудзи, що має поліпшену перетравлюваність, яка включає:

45 а) алель QTL, асоційований із поліпшеною перетравлюваністю, водночас згаданий алель QTL містить нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mPHK гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до нефункціонального білка F35H або білка F35H, що має зменшену ферментативну активність під час трансляції; або

50 б) нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mPHK гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до нефункціонального білка F35H або білка F35H, що має зменшену ферментативну активність під час трансляції; або

с) нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), який має зменшену або відсутню експресію mPHK гена та/або білка F35H або має зменшену ферментативну активність; або

55 d) молекулу РНКі, спрямовану на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, що націлюється на неї або гібридується з нею, або яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує молекулу РНКі, спрямовану на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, що націлюється на неї або гібридується з нею; або

60 e) РНК-специфічну систему CRISPR/Cas, спрямовану або таку, що націлюється на нуклеотидну послідовність, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), або

щонайменше одну полінуклеотидну послідовність, що кодує згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas;

водночас поліпшена перетравлюваність стосується підвищеної перетравлюваності рослини кукурудзи або частини рослини від кукурудзи, що має характеристики а), b), c), d) або е) порівняно з рослиною кукурудзи або частиною рослини від кукурудзи, яка не має такої характеристики; та

водночас немутований F35H вибирають з групи, що складається з:

(i) нуклеотидної послідовності, що містить послідовність SEQ ID NO: 1;

(ii) нуклеотидної послідовності, що має сДНК SEQ ID NO: 2;

(iii) нуклеотидної послідовності, що кодує амінокислотну послідовність, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3;

(iv) нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 80 % ідентичність із послідовністю SEQ ID NO: 1 або 2;

(v) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який має щонайменше 80 % ідентичність із послідовністю SEQ ID NO: 3; та

(vi) нуклеотидної послідовності, що гібридується зі зворотним комплементом нуклеотидної послідовності, як визначено в пунктах (i), (ii) або (iii), у жорстких умовах гібридизації.

4. Рослина кукурудзи або частина рослини від кукурудзи за п. 3, в якій згадана рослина кукурудзи містить маркерний алель та61134xxx;

водночас та61134xxx є інсерцією одного або більше нуклеотидів між положенням 134254381 і 134254382 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, переважно інсерцією, представленою в SEQ ID NO: 12.

5. Рослина кукурудзи або частина рослини від кукурудзи за п. 3 або 4, в якій згадана рослина кукурудзи містить згаданий алель QTL, згадані маркерні алелі, згадану нуклеотидну послідовність гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, згадану молекулу РНКі або згадану полінуклеотидну послідовність, що кодує молекулу РНКі, згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas та/або згадану щонайменше одну полінуклеотидну послідовність, що кодує РНК-специфічну систему CRISPR/Cas як трансген або як (генно-)відредагований ендеген.

6. Спосіб поліпшення перетравлюваності рослини кукурудзи або частини рослини від кукурудзи, який включає введення через стабільну або тимчасову інтеграцію через трансформацію, інсерцію за допомогою технології редагування генів або модифікацію за допомогою випадкового або цілеспрямованого мутагенезу в геном рослини або частини рослини:

(а) нуклеотидної послідовності гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mРНК гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до нефункціонального білка F35H або білка F35H, що має зменшену ферментативну активність під час трансляції; або

(b) згаданий спосіб включає зменшення експресії mРНК гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) та/або білок F35H, або зменшення ферментативної активності цитохром P450-місного флавоноїда 3',5'-гідроксилази (F35H);

водночас поліпшена перетравлюваність стосується підвищеної перетравлюваності рослини кукурудзи або частини рослини від кукурудзи, що має характеристику а) або b) порівняно з рослиною кукурудзи або частиною рослини від кукурудзи, яка не має такої характеристики; та водночас немутований F35H вибирають з групи, що складається з:

(i) нуклеотидної послідовності, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, 4 або 7;

(ii) нуклеотидної послідовності, що має сДНК SEQ ID NO: 2, 5 або 8;

(iii) нуклеотидної послідовності, що кодує амінокислотну послідовність, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, 6 або 9;

(iv) нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 80 % ідентичність із послідовністю SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 або 8;

(v) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який має щонайменше 80 % ідентичність із послідовністю SEQ ID NO: 3, 6 або 9; та

(vi) нуклеотидної послідовності, що гібридується зі зворотним комплементом нуклеотидної послідовності, як визначено в пунктах (i), (ii) або (iii), у жорстких умовах гібридизації.

7. Спосіб за п. 6 (b), що включає:

(а) введення в нуклеотидну послідовність ендегенного гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), мутації, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mРНК гена та/або білка F35H, або мутації, що призводить до нефункціонального білка F35H або білка F35H, що має зміншену ферментативну активність під час трансляції, або

(b) введення в рослину або частину рослини молекули РНКі, спрямованої на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, що націлюється на неї або гібридується з нею, або полінуклеотидної послідовності, що кодує молекулу РНКі, спрямовану на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, що націлюється на неї або гібридується з нею, або

5 (c) введення в рослину або частину рослини РНК-специфічної системи CRISPR/Cas, спрямованої або що націлюється на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, або щонайменше однієї полінуклеотидної послідовності, що кодує згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas, або

10 (d) введення в рослину або частину рослини хімічної сполуки або антитіла, що зменшує або інгібує ферментативну активність білка F35H під час взаємодії зі згаданим F35H.

8. Спосіб продукування рослини кукурудзи або частини рослини від кукурудзи, що має поліпшену перетравлюваність, який включає:

15 (a) введення через стабільну або тимчасову інтеграцію через трансформацію, інсерцію за допомогою технології редагування генів або модифікацію за допомогою випадкового або цілеспрямованого мутагенезу в геном рослини або частини рослини нуклеотидної послідовності гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H), що має мутацію, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mPHK гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до нефункціонального білка F35H або білка F35H, що має зменшену ферментативну активність під час трансляції, або

20 (b) введення за допомогою випадкового або цілеспрямованого мутагенезу в нуклеотидну послідовність ендегенного гена, що кодує цитохром P450-місний флавоноїд 3',5'-гідроксилази (F35H) мутації, що призводить до зменшеної або відсутньої експресії mPHK гена та/або білка F35H, або мутацію, що призводить до нефункціонального білка F35H або білка F35H, що має зменшену ферментативну активність під час трансляції, або

25 (c) введення через стабільну або тимчасову інтеграцію через трансформацію або інсерцію за допомогою технології редагування генів в рослину або частину рослини молекули РНКі, спрямованої на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, що націлюється на неї або гібридується з нею, або полінуклеотидної послідовності, що кодує молекулу РНКі, спрямовану на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, що націлюється на неї або гібридується з нею, або

30 (d) введення через стабільну або тимчасову інтеграцію через трансформацію або інсерцію за допомогою технології редагування генів в рослину або частину рослини РНК-специфічної системи CRISPR/Cas, спрямованої або такої, що націлюється на нуклеотидну послідовність, що кодує білок F35H, або щонайменше однієї полінуклеотидної послідовності, що кодує згадану РНК-специфічну систему CRISPR/Cas, або

35 (e) введення в рослину або частину рослини хімічної сполуки або антитіла, що зменшує ферментативну активність білка F35H або інгібує білок F35H; і

40 (f) необов'язково, регенерування рослини з частини рослини за будь-яким із пунктів (a)-(e); водночас поліпшена перетравлюваність стосується підвищеної перетравлюваності рослини кукурудзи або частини рослини від кукурудзи, що має характеристики a), b), c), d) або e) порівняно з рослиною кукурудзи або частиною рослини від кукурудзи, яка не має такої характеристики; та

водночас немутований F35H вибирають з групи, що складається з:

45 (i) нуклеотидної послідовності, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, 4 або 7;

(ii) нуклеотидної послідовності, що має сДНК SEQ ID NO: 2, 5 або 8;

(iii) нуклеотидної послідовності, що кодує амінокислотну послідовність, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, 6 або 9;

(iv) нуклеотидної послідовності, що має щонайменше 80 % ідентичність із послідовністю SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 або 8;

50 (v) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, який має щонайменше 80 % ідентичність із послідовністю SEQ ID NO: 3, 6 або 9; і

(vi) нуклеотидної послідовності, що гібридується зі зворотним комплементом нуклеотидної послідовності, як визначено в пунктах (i), (ii) або (iii), у жорстких умовах гібридизації.

9. Рослина або частина рослини, отримана способом за п. 8.

55 10. Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, в якому згадана рослина є рослиною кукурудзи, водночас QTL розташований на хромосомі 9 і містить та/або фланкований маркерними алелями та61070s01 і та30168s02, переважно маркерними алелями та50827s01 та та16983s02, більш переважно маркерними алелями та17117s01 і та61125s01;

- водночас ma61070s01 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 121588825 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або Т, переважно однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 13; та
- 5 ma30168s02 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 139452428 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або G, переважно однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 14; та
- ma50827s01 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 127454426 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або G, переважно однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 15; та
- 10 ma16983s02 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 137363784 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або G, переважно однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 16; та
- ma17117s01 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 132038900 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або G, переважно
- 15 однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 17; та
- ma61125s01 є однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) у положенні 135947973 хромосоми 9, що належить до лінії PH207, водночас згаданий нуклеотид є А або G, переважно однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), представленим у SEQ ID NO: 18.
- 20 11. Спосіб, рослина або частина рослини за будь-яким із попередніх пунктів, в якому мутація є мутацією зі зсуванням рамки зчитування або нонсенс-мутацією, яка призводить до зміненої експресії нуклеотидної послідовності або зміненої ферментативної активності поліпептиду, призводить до зміненої послідовності білка, кодованої нуклеотидною послідовністю, або є інсерцією, делецією або заміщенням щонайменше одного нуклеотиду в області, що кодує, у сигналі сплайсингу або в регуляторному елементі.
- 25 12. Застосування полінуклеїнової кислоти, яка специфічно гібридизується з будь-якою з послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18, або з її комплементом, або зі зворотним комплементом, або алель-специфічної полінуклеїнової кислоти для ідентифікації рослини або частини рослини, що має поліпшену перетравлюваність, або для вибору рослини або частини рослини, яка має поліпшену перетравлюваність, за будь-
- 30 яким із пп. 3-5, переважно за способом за п. 1 або 2.

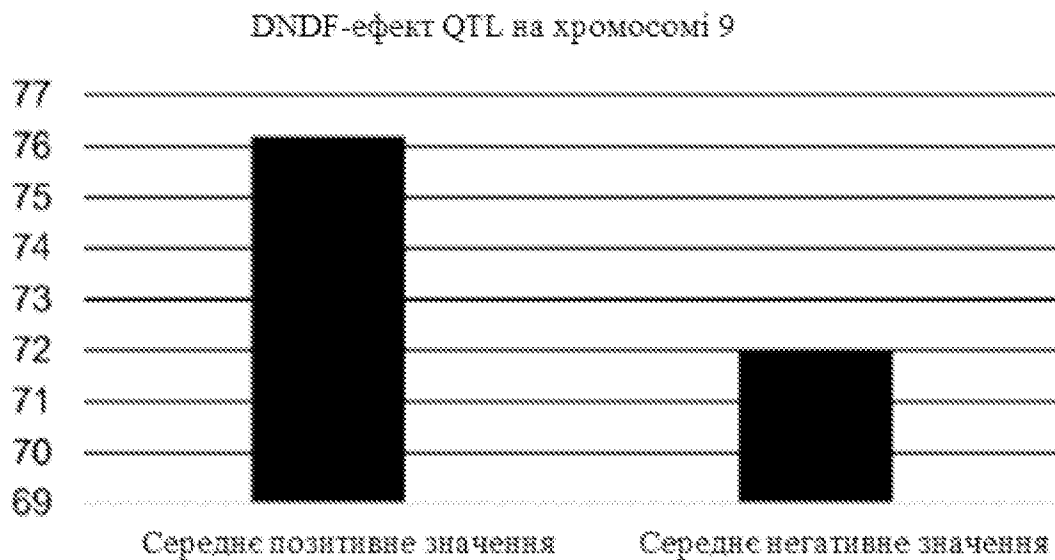
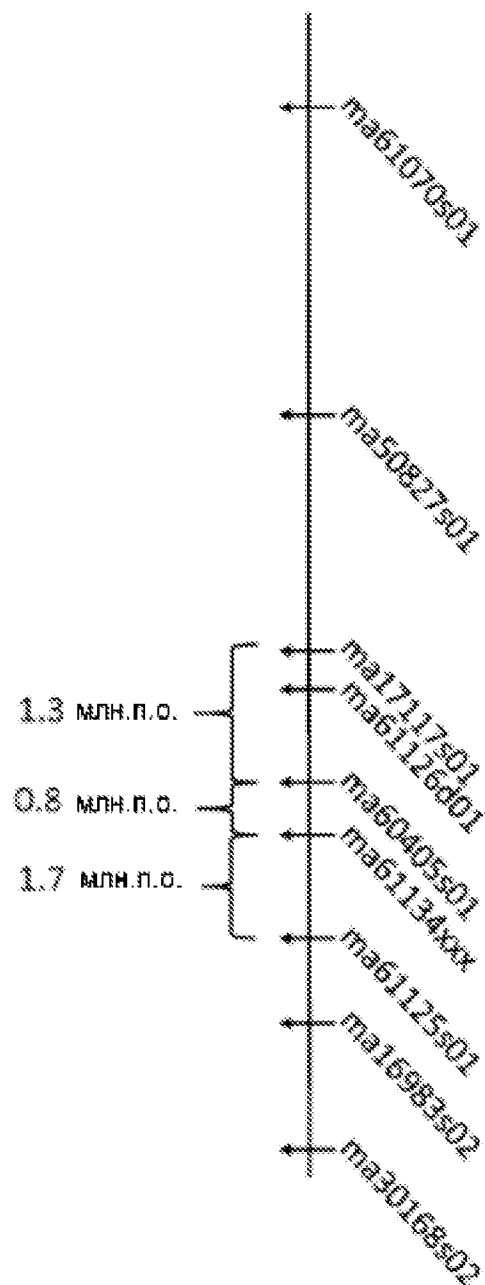


Fig. 1



Фиг. 2

№ в Базі даних ARE	Символ стов	Член сім'ї		msb1125e01	msb63402e01	pze-40079170	msb6222e01	msb6218e01	msb1134xxx	msb6225e01	msb6226e01	msb6211s01	msb61125e01
			Голова комісії ДРДР за регіон										
WVP17-51917002	1	1	62.59	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51917005	1	2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918005	1	3		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918008	1	4		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918011	1	5		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918012	1	6		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918018	1	7		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51919005	1	8	67.05	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51916009	1	9		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51917003	1	10		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51918001	1	11		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51918009	1	12		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51918019	1	13		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51919011	1	14		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51920007	1	15	67.12	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51920017	1	16		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
WVP17-51940003	2	1		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51941009	2	2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51941010	2	3		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51941015	2	4		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51943014	2	5		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51945013	2	6	68.67	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51946003	2	7		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51947008	2	8		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948001	2	9		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948005	2	10		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948007	2	11		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949002	2	12		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949011	2	13	68.67	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949018	2	14		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51940001	2	15		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51941008	2	16		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51941013	2	17		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51941014	2	18		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51942008	2	19		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51942009	2	20		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944002	2	21		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944003	2	22		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944009	2	23		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51945005	2	24		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51945006	2	25		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51946001	2	26		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51946012	2	27		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51948011	2	28		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949003	2	29		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949012	2	30		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949017	2	31		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A

Fig. 3

[illegible]

082	10	80:	1	844	GGAACTCTACCTGCTTGTGACATGCGATGAAAGATTTCAATTTGAGAGGAAAGG	713
082	10	80:	13	881	GGAACTCTACCTGCTTGTGACATGCGATGAAAGATTTCAATTTGAGAGGAAAGG	808
082	10	80:	1	914	AGCATATTTTCTTACAAATTTATGCTTACATTTTCTTAAATTTTCGAGAT	763
082	10	80:	13	951	AGCATATTTTCTTACAAATTTATGCTTACATTTTCTTAAATTTTCGAGAT	810
082	10	80:	1	984	AGCTTTGTAAAGAAATTTTACGCTAGTTTCGAAATTTTATTTAGGATTTCT	813
082	10	80:	13	981	AGCTTTGTAAAGAAATTTTACGCTAGTTTCGAAATTTTATTTAGGATTTCT	1000
082	10	80:	1	814	AGTTTTCGAAAGGAAATTAAGCGAATTTCTCTTGAAGAAATGAAATTTCT	883
082	10	80:	13	1001	AGTTTTCGAAAGGAAATTAAGCGAATTTCTCTTGAAGAAATGAAATTTCT	1050
082	10	80:	1	884	TGCAAAATAGGTTTCTGAACTAGCTTCGAAATTAATGCTTCTCT	913
082	10	80:	13	1081	TGCAAAATAGGTTTCTGAACTAGCTTCGAAATTAATGCTTCTCT	1300
082	10	80:	1	914	TTTCTTGAATTTTATTCATCTTTTCTTGAATTTTCTTGAATTTTCTTGA	963
082	10	80:	13	1181	TTTCTTGAATTTTATTCATCTTTTCTTGAATTTTCTTGAATTTTCTTGA	1350
082	10	80:	1	944	GGGATGATTTTACATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1013
082	10	80:	13	1151	GGGATGATTTTACATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1300
082	10	80:	1	1014	ATGCAATAGGAAATTTGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1063
082	10	80:	13	1281	ATGCAATAGGAAATTTGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1280
082	10	80:	1	1044	GGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1313
082	10	80:	13	1251	GGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1380
082	10	80:	1	1114	CGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1363
082	10	80:	13	1381	CGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1380
082	10	80:	1	1144	AGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1313
082	10	80:	13	1351	AGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1380
082	10	80:	1	1214	CGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1363
082	10	80:	13	1481	CGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1480
082	10	80:	1	1244	CGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1313
082	10	80:	13	1451	CGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1380
082	10	80:	1	1314	AGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1313
082	10	80:	13	1581	AGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1580
082	10	80:	1	1344	ATATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1413
082	10	80:	13	1551	ATATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1480
082	10	80:	1	1314	CGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1413
082	10	80:	13	1581	CGATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1580
082	10	80:	1	1344	ATATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1513
082	10	80:	13	1551	ATATTTTAAAGCTTACGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	1700

Фіг. 4 (продовження)

[illegible]

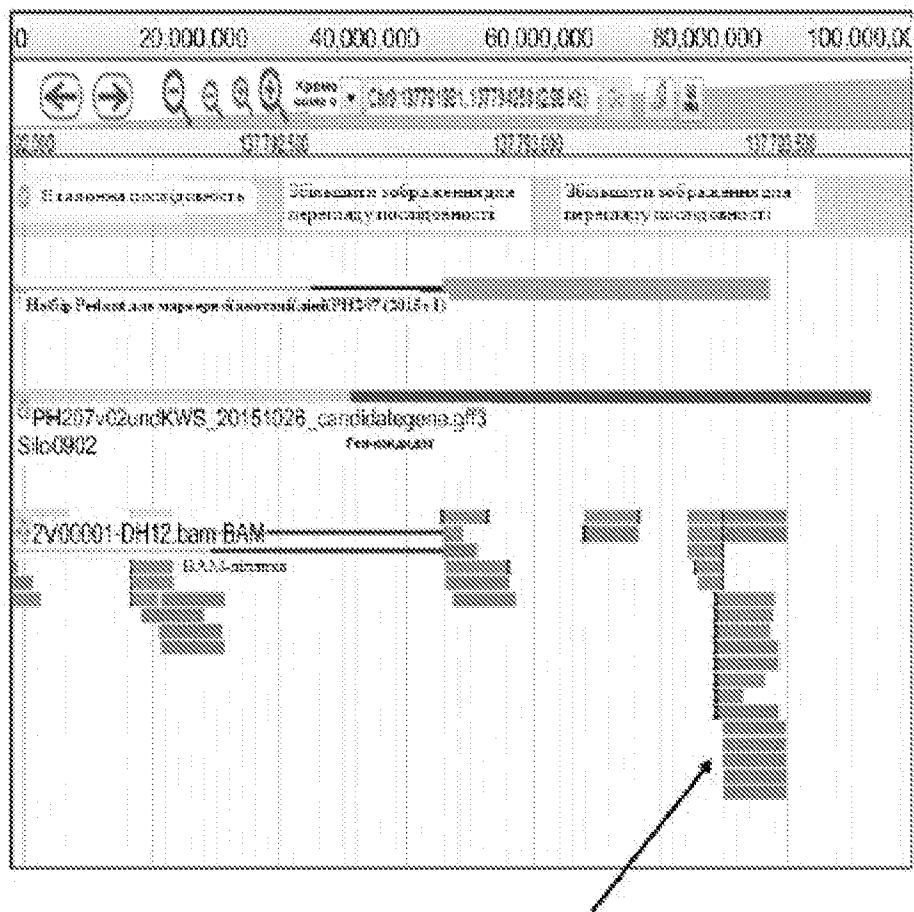
Фіг. 4 (продовження)

[illegible]

Фіг. 4 (продовження)

[illegible]

Фіг. 4 (продовження)



Dir. 5

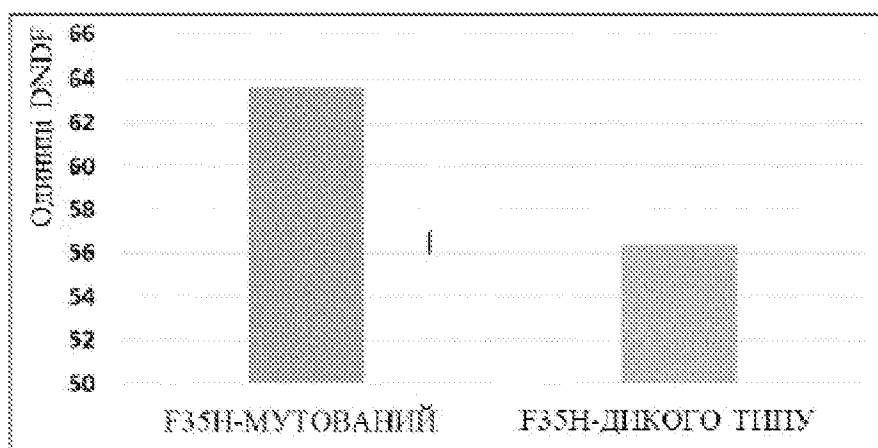


Fig. 6