



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110111** (13) **C2**

(51) МПК (2015.01)

A01H 1/06 (2006.01)**A01H 5/00****A01H 5/10** (2006.01)**C07K 14/415** (2006.01)**C12N 15/82** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

| | | | |
|--|--------------------------------------|--|--|
| (21) Номер заявки: | а 2012 13862 | (72) Винахідник(и): | Ботс Марк (BE), |
| (22) Дата подання заявки: | 02.05.2011 | | Лага Бенджамін (BE), |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: | 25.11.2015 | | Ден Боер Барт (BE) |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 10004680.4, 61/331,057 | (73) Власник(и): | БАЙЄР КРОПСАЄНС НВ, |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 04.05.2010, 04.05.2010 | | J.E. Mommaertslaan 14, B-1831 Diegem, Belgium (BE) |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: | EP, US | (74) Представник: | Федорова Ірина Олександрівна, реєстр. №11 |
| (41) Публікація відомостей про заявку: | 10.01.2013, Бюл.№ 1 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | CHAO LIU ET AL: "A missense mutation in the VHYNP motif of a DELLA protein causes a semi-dwarf mutant phenotype in Brassica napus", THEORETICAL AND APPLIED GENETICS; INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT BREEDING RESEARCH, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 121, no. 2, 11.03.2010, pages 249-258 |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 25.11.2015, Бюл.№ 22 | | |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | PCT/EP2011/002183, 02.05.2011 | | |

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО ПОЛЯГАННЯ ПРИ ЗБЕРЕЖЕННІ ВРОЖАЙНОСТІ ТА НИЗЬКОГО ВМІСТУ ГЛЮКОЗИНОЛАТУ РОСЛИНИ BRASSICA**(57) Реферат:**

Даний винахід стосується рослин *Brassica* зі зменшеною висотою або підвищеною стійкістю до полягання, які містять щонайменше один мутантний алель карликовості кодуючого гена білка DELLA, послідовностей нуклеїнових кислот, що представляють мутантні алелі карликовості DELLA, і мутантних білків карликовості DELLA.

Даний винахід описує спосіб підвищення стійкості до полягання, при збереженні врожайності та низького вмісту глюकोзинолату рослини *Brassica*, який включає введення мутантного алеля карликовості DELLA в геномну ДНК вказаної рослини шляхом трансформації або мутагенезу та селекції вказаних мутантних алелів DELLA, в якому вказаний мутантний алель карликовості DELLA кодує білок з послідовністю, в якій пролін, що відповідає P91, є заміщеним на лейцин.

UA 110111 C2

Галузь техніки

Даний винахід стосується сільськогосподарських рослин і їх частин, зокрема з родини Brassicaceae, зокрема виду Brassica, з поліпшеними агрономічними характеристиками, а конкретніше – з поліпшеною стійкістю до полягання. Цей винахід стосується також білків DELLA, конкретніше репресору білків ga1-3 1 (RGA1), і нуклеїнових кислот, кодуєчих ці білки DELLA. Більш конкретно, цей винахід стосується нуклеїнових кислот, кодуєчих мутантні білки DELLA, точніше мутантних білків RGA1, які зменшують висоту рослин і підвищують їх стійкість до полягання.

Рівень техніки

Полягання, тобто сплюснення стоячих рослин дощем та/або вітром, становить серйозну проблему для багатьох насінневих культур, включаючи олійні, оскільки воно може приводити до труднощів при збиранні врожаю і втрати частини врожаю. Полягання можна зменшити, зменшивши висоту рослин, чого можна досягти шляхом використання регуляторів росту рослин або застосування їх карликових різновидів (Muangprom et al., Molecular Breeding 17: p 101–110, 2006). Під час "зеленої революції" в 60-тих і 70-тих роках минулого сторіччя виробництво зерна пшениці значно збільшилось завдяки використанню карликових мутантів – нових різновидів рослин зі зміненою архітектурою, тобто зменшеної висоти і збільшеного виходу зерна за рахунок біомаси соломи, які є більш стійкими до полягання, оскільки вони аномально реагують на гормон росту рослин гіберелін (GA) (Hedden, Trends Genet. 19, p 5–9, 2003).

Було встановлено, що ці карликові мутанти пшениці відповідають мутаціям набуття функції в гені Rht (Peng et al., Nature 400, p 256-261, 1999), який кодує білок, що належить до родини білків DELLA. Білки DELLA, кодовані геном Rht і його ортологами, в Arabidopsis (GAI, RGA, RGL1 і RGL2), кукурудзі (d8), винограді (VvGAI), ячмені (SLN1) і рисі (SLR1) мають збережену функцію як репресори сигнальної системи GA і росту рослин (Sun and Gubler, Ann. Rev. Plant Biol. 55, p 197-223, 2004). Білки DELLA локалізуються до ядра, що дозволяє припустити, що вони діють як транскрипційні регулятори (Silverstone et al., The Plant Cell 13, p 1555–1565, 2001; Fleck and Harberd, Plant Journal 32, p 935-947, 2002; Gubler et al., Plant Physiology 129, p 191–200, 2002; Itoh et al., The Plant Cell 14, p57–70, 2002; Wen and Chang, Plant Cell 14, p 87-100, 2002). Було показано, що GA ініціює свій сигнальний шлях, викликаючи розкладання білків DELLA (Gomi and Matsuoka, Current opinion in plant biology 6, p 489-493, 2003).

Білки DELLA містять N-термінальний домен DELLA і C-термінальний домен GRAS. Домен GRAS зберігся серед великої родини регуляторних білків, а саме родини GRAS (Pysh et al., The Plant Journal 18, p 111-119, 1999). Цей домен ймовірно є функціональним доменом, очевидно для транскрипційної регуляції. Крім того, було показано, що домен GRAS в білках DELLA є задіяним в зв'язуванні білка F-box (Dill et al., Plant Cell 16: p 1392–1405, 2004). Домен DELLA відіграє певну роль в індукованому GA розкладанні через взаємодію з GID1 Arabidopsis, але не обов'язково в активності цього білка, спрямованій на пригнічення росту (Peng et al., 1999 supra, Griffiths et al., The Plant Cell 18, p 3399–3414, 2006).

Висувалось припущення, що делеція послідовностей DELLA перетворює мутантний білок на конститутивний репресор сигнальної системи GA (Peng et al., Genes & Development 11, p 3194–3205, 1997). Більшість мутацій DELLA для набуття функції локалізуються в домені DELLA (дивись Таблицю 1 для загального уявлення). Делеції або специфічні міссенс-мутації двох збережених мотивів (DELLA та/або VHYNP, показаних на Фіг. 1) в межах домену DELLA роблять мутантні білки резистентними до індукованого GA розкладання, приводячи до нечутливого до GA карликового фенотипу. Мутації в C-термінальному домені GRAS білків DELLA є загалом мутаціями втрати функції і викликають рецесивні слабкі фенотипи в кількох видах рослин, наводячи на думку, що цей C-термінальний домен є важливим для функції його репресора (Peng et al., 1997 supra; Gubler et al., 2002 supra; Itoh et al. supra, 2002; Dill et al., 2004 supra), за певними виключеннями. Що стосується мутантного алеля MUT1 кукурудзи D9, то мутація E600K очевидно є необхідною і достатньою для карликового фенотипу (WO 2007/124312). До того ж, виявилось, що всі мутації карликовості, ідентифіковані у Brassica, локалізовані на C-термінальній ділянці білка RGA1. Muangprom et al. (Plant Physiology 137, p 931–938, 2005) описують нечутливий до GA алель Brassica rapa, названий brga1-d, який відповідає заміщенню Q на R в амінокислотній позиції 328 біля ділянки VHIIID. Виявилось, що напівдомінантний карликовий алель bzh B. napus є результатом заміщення E на K в амінокислотній позиції 546 (WO01/09356).

Під час селекції з карликовим мутантом bzh B. napus виявились труднощі з точним визначенням гомозиготних (карликових; bzh/bzh) і гетерозиготних (напівкарликових; Bzh/bzh) рослин при розділенні потомства через вплив генетичного фону і оточуючого середовища на експресію цієї ознаки (Foisset et al., Theor Appl Genet 91, p 756-761, 1995; Barret et al., Theor Appl

Genet 97, p 828-833, 1998). Також, насіння рапсу напів-карликового гібриду, одержаного при схрещуванні між карликовим мутантом *bzh* і рослиною нормального розміру ("Avenir"), все ще демонструє на 10 % знижену врожайність порівняно зі стандартними різновидами (http://www.international.inra.fr/layout/set/print/partnerships/with_the_private_sector/live_from_the_lab/s/a_semi_dwarf_hybrid_rapeseed_that_is_promised_an_excellent_future).

Коли алель *brrga1-d* *B. rapa* був перенесений схрещуванням в *B. napus*, спостерігалось значне зменшення виходу насіння для інбредних ліній, гомозиготних у відношенні мутантного алеля. Стійкість до полягання суттєво підвищилась у рослин, гомозиготних у відношенні мутантного алеля, але тільки у деяких з гетерозиготних рослин. Крім того, очікувались труднощі у відборі гетерозиготних рослин під час зворотного схрещування, оскільки генетичний фон і оточуюче середовище можуть впливати на експресію ознаки карликовості (Muangprom et al., 2006 *supra*). Вплив на склад олії і вміст глюकोзинолату в насінні цих рослин не досліджувався, хоча відомо, що вміст глюकोзинолату є значно вищим у *B. rapa*.

Було ідентифіковано карлика *B. napus* з швидким циклюванням (Zanewich et al., J Plant Growth Regul 10, p 121-127, 1991; Frick et al., J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119, p 1137-1143, 1994), який має кілька небажаних плейотропних ефектів (Muangprom et al., 2006 *supra*).

Таким чином, існує потреба в альтернативних, особливо нетрансгенних методах поліпшення стійкості до полягання сільськогосподарських рослин, зокрема рослин олійного рапсу, які не чинять негативного впливу на агрономічні характеристики рослин.

Даний винахід вносить суттєвий внесок в існуючий рівень цієї галузі, пропонуючи рослини Brassica, які є стійкими до полягання, в той же час зберігаючи агрономічно прийнятний розвиток рослин. Зокрема, дана заявка описує рослини Brassica, точніше рослини Brassica napus, які містять в своєму геномі мутантний алель RGA1 і які мають зменшену висоту і підвищену стійкість до полягання, в той же час підтримуючи нормальні рівні врожайності, низький вміст глюकोзинолату і стабільний карликовий фенотип, що легко відбирається також в гетерозиготному стані. Цю проблему вирішено, як далі буде описано в різних варіантах здійснення, прикладах і формулі винаходу.

Суть винаходу

В першому варіанті здійснення даний винахід стосується рослини Brassica, яка містить в своєму генотипі щонайменше один мутантний алель гену DELLA, причому вказаний мутантний алель кодує мутантний білок карликовості DELLA, що має амінокислотну послідовність SEQ ID №: 1, яка характеризується тим, що принаймні одну її амінокислоту було модифіковано. Також пропонується рослина Brassica, в якій тією принаймні одною амінокислотою послідовності SEQ ID №: 1, яку було модифіковано, є P (пролін). Переважно пролін заміщується лейцином (L).

В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується рослини Brassica, яка містить мутантний алель карликовості DELLA, де мутантний білок карликовості DELLA з послідовністю SEQ ID №: 1 має амінокислотну послідовність з щонайменше 75 % ідентичністю послідовності з SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 7 або SEQ ID №: 9.

Рослина за цим винаходом є більш стійкою до полягання та/або має зменшену висоту порівняно з рослинами, які не мають вказаного мутантного алеля.

В іншому варіанті здійснення рослина за цим винаходом вибирається з групи, яка складається з *B. juncea*, *B. napus*, *B. rapa*, *B. carinata*, *B. oleracea* і *B. nigra*.

Також пропонується рослинна клітина, насіння або потомство рослини за цим винаходом.

Даний винахід стосується також насіння Brassica, що містить мутантний алель RGA1 *dwf2*, як той, що міститься в насінні, депонованому в NCIMB Limited 18 лютого 2010 року, під номером доступу NCIMB 41697, а також рослини Brassica або її клітини, частини, насіння або потомства, одержаних з такого насіння.

В ще іншому варіанті здійснення даний винахід пропонує мутантний алель карликовості DELLA, кодуючий мутантний білок карликовості DELLA з амінокислотною послідовністю SEQ ID №: 1, яка відрізняється тим, що принаймні одну її амінокислоту було модифіковано. Також пропонується мутантний алель карликовості DELLA, в якому тією принаймні одною амінокислотою послідовності SEQ ID №: 1, яку було модифіковано, є P (пролін). Переважно пролін заміщується лейцином (L).

В іншому варіанті здійснення даний винахід пропонує мутантний алель карликовості DELLA, де мутантний білок карликовості DELLA з послідовністю SEQ ID №: 1 має амінокислотну послідовність з щонайменше 75 % ідентичністю послідовності з SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 7 або SEQ ID №: 9.

Даний винахід пропонує також мутантний білок карликовості DELLA з амінокислотною послідовністю SEQ ID №: 1, яка відрізняється тим, що принаймні одну її амінокислоту було модифіковано. Пропонується також мутантний білок карликовості DELLA, в якому тією

принаймні одною амінокислотою послідовності SEQ ID №: 1, яку було модифіковано, є Р (пролін). Переважно пролін заміщується лейцином (L).

Також пропонується мутантний білок карликовості DELLA з амінокислотною послідовністю SEQ ID №: 1, яка має амінокислотну послідовність з щонайменше 75 % ідентичністю послідовності з SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 7 або SEQ ID №: 9.

В ще іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу перенесення щонайменше одного виділеного мутантного алеля карликовості DELLA від однієї рослини до іншої рослини, який включає наступні етапи:

а. забезпечення першої рослини, що містить щонайменше один виділений мутантний алель карликовості DELLA, як описано раніше, або створення першої рослини, що містить щонайменше один виділений мутантний алель карликовості DELLA, як описано раніше;

б. схрещування цієї першої рослини з другою рослиною, яка не містить такого щонайменше одного виділеного мутантного алеля DELLA і збирання гібридного насіння F1 з цього гібриду; і необов'язково додаткові етапи:

с. ідентифікація рослин F1, які містять цей щонайменше один виділений мутантний алель DELLA;

д. зворотне схрещування рослин F1, які містять цей щонайменше один виділений мутантний алель DELLA, з другою рослиною, яка не містить цього щонайменше одного виділеного мутантного алеля DELLA впродовж принаймні одного покоління (х), і збирання насіння BCх з цих гібридів; і

е. ідентифікація в кожному поколінні BCх рослин, які містять цей щонайменше один виділений мутантний алель DELLA.

Даний винахід стосується також способу одержання рослини за цим винаходом, який включає перенесення щонайменше одного мутантного алеля DELLA від однієї рослини до іншої рослини, у відповідності до вищеописаного способу. Також пропонується спосіб підвищення стійкості до полягання рослини та/або зменшення висоти рослини, який включає перенесення щонайменше одного мутантного алеля карликовості DELLA за цим винаходом в геномну ДНК вказаної рослини.

Рослина у вищеописаних способах може вибиратись з групи, яка складається з *B. juncea*, *B. napus*, *B. rapa*, *B. carinata*, *B. oleracea* і *B. nigra*.

Також пропонується застосування мутантного алеля карликовості DELLA за цим винаходом для одержання рослини зі зменшеною висотою або рослини з підвищеною стійкістю до полягання, а також застосування рослини за цим винаходом для одержання насіння, що містить щонайменше один мутантний алель карликовості DELLA, або для одержання культури олійного рапсу, що містить щонайменше один мутантний алель карликовості DELLA.

Короткий опис малюнків

Фіг. 1: Множинне зіставлення амінокислотних послідовностей *B. napus* (bn) RGA1, *B. rapa* (br) RGA1, *A. thaliana* (at) RGA і GAI. Домен DELLA відповідає амінокислотам (aa) 44-111, а домен GRAS – амінокислотам aa 221-581 білка atRGA. Підкресленими є: I, збережена ділянка I / мотив DELLA; II, збережена ділянка II / мотив VHYNP; III, багата на валін ділянка I; IV, сигнал ядерної локалізації; V, багата на валін ділянка II / ділянка VHID; VI, мотив LXXLL, VII, SH2-подібний домен. Ділянку, що містить мінімальну делецію мотиву VHYNP / збереженої ділянки II, яка є відомою тим, що надає карликовості, на основі d8-mpl, d8-2023 кукурудзи, і SLR1-ΔTVHYNP рису, обведено рамкою. Пролін, що відповідає тому проліну, який було мutowано на лейцин в мутанті *dwf2* *B. napus*, виділено жирним шрифтом.

Загальні дефініції

Термін "послідовність нуклеїнових кислот" (або молекула нуклеїнової кислоти або нуклеотидна послідовність) стосується молекули ДНК або РНК в одно- або двонитчастій формі, зокрема ДНК, кодуєчої білок або фрагмент білка за цим винаходом. "Ендогенна послідовність нуклеїнових кислот" стосується послідовності нуклеїнових кислот, що знаходиться в рослинній клітині, наприклад ендогенний алель гену, кодуєчого білок DELLA, є присутнім в ядерному геномі клітини *Brassica*.

Термін "ген" означає послідовність ДНК, що містить ділянку (транскрибовану ділянку), яка транскрибується в молекулу РНК (наприклад, пре-мРНК, що містить послідовності інтронів, яка після сплайсирования (вирізання інтронів) перетворюється на зрілу РНК) в клітині, функціонально зв'язану з регуляторними ділянками (наприклад, промотором). Отже, ген може містити кілька функціонально пов'язаних послідовностей, таких як промотор, лідерна послідовність 5", що містить наприклад послідовності, задіяні в запуску трансляції, (білок) кодуєчу ділянку (кДНК або геномну ДНК) і не трансьовану послідовність 3", що містить наприклад сайти термінації транскрипції. Термін "ендогенний ген" використовується для

відмежування від "чужого гену", "трансгену" або "химерного гену" і стосується гену від рослини певного роду, виду або різновиду, який не був введений в цю рослину шляхом трансформації (тобто, він не є "трансгеном"), але який звичайно є присутнім в рослинах цього роду, виду або різновиду, або який є введеним в цю рослину з рослин іншого роду, виду або різновиду, в яких він звичайно є присутнім, нормальними методами селекції або шляхом соматичної гібридизації, наприклад шляхом злиття протопластів. Подібно до цього, "ендогенний алель" гену не є алелем, введеним в рослину або рослинну тканину шляхом трансформації цієї рослини, але є, наприклад, створеним шляхом мутагенезу рослини та/або селекції або одержаним шляхом скринінгу природних популяцій рослин.

Терміни "білок" або "поліпептид" використовуються взаємозамінно і стосуються молекул, що містять ланцюг амінокислот без посилання на конкретний спосіб дії, розмір, тривимірну структуру або походження. Отже, "фрагмент" або "частина" білка DELLA все ще може називатись "білком". Термін "виділений білок" використовується для позначення білка, який більше не знаходиться в своєму природному оточенні, наприклад *in vitro* або в рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні.

Як він тут використовується, термін "білок DELLA" стосується білка (білків) або поліпептиду (поліпептидів) з гомологією репресору *ga1-3* (RGA) *A. thaliana*, GA-INSENSITIVE (GAI) білків (нечутливих до гібереліну білків), які включають, не обмежуючись ними, білки Rht пшениці, білки *d8* і *D9* кукурудзи, білок SLENDER RICE1 (SLR1) рису, білки RGA Brassica (наприклад, RGA1 і RGA2), білки RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2 і RGL3 *Arabidopsis*, *Vvgai* винограду і SLN ячменю. Білки DELLA функціонують як ядерні репресори реакцій рослинного гібереліну (GA). Вони типово містять N-термінальний домен DELLA (який відповідає амінокислотам 44-111 білка RGA *A. Thaliana*, представленого послідовністю SEQ ID №: 7) і C-термінальні 2/3 білків, що є дуже подібними до еквівалентної ділянки гаданого фактору транскрипції SCARECROW (SCR) від *Arabidopsis*, яку також називають доменом GRAS (який відповідає амінокислотам 221-581 послідовності SEQ ID №: 7). Домен DELLA містить дві збережені ділянки I і II, які також називають мотивами DELLA і VHYNP (Muangprom et al., 2005 *supra*; Peng et al., 1999 *supra*; WO07/124312). Зіставлення амінокислотних послідовностей різних білків DELLA з індикацією збережених доменів є представленим на Фіг. 1. Відповідні домени або залишки в інших білках DELLA можна визначити, наприклад, за допомогою оптимального зіставлення. Нуклеотидна послідовність амінокислотної послідовності різних білків DELLA є представленою в переліку послідовностей послідовностями SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 7 і SEQ ID №: 9. Відповідні ділянки, домени або залишки в інших послідовностях DELLA можна визначити, наприклад, за допомогою оптимального зіставлення.

Білки DELLA локалізуються в ядрі, де вони пригнічують експресію генів, що реагують на GA. В присутності GA, однак, білки DELLA є мішенями для руйнування. Це було показано зв'язуванням GA з його рецептором (GID1 у рису і GID1a, GID1b і GID1c у *Arabidopsis*), який потім взаємодіє з комплексом убіквітин лігази SCF E3, щоб забезпечити убіквітування і наступне руйнування DELLA (Djakovic-Petrovic et al., *The Plant Journal* 51, p 117–126, 2007). Взаємодія GID1–DELLA специфічно залучає збережені N-термінальні домени I і II білка DELLA (Murase et al., *Nature* 456, p 459-464, 2008), чим пояснюється, чому мутантні білки DELLA, у яких ці домени відсутні, надають GA-нечутливість. Вважається, що утворення комплексу GA-GID1-DELLA викликає конформаційну зміну в C-термінальному домені GRAS білка DELLA, яка стимулює розпізнання субстрату убіквітин лігазою SCFSLY1/GID2 E3, протеасомну деструкцію DELLA і наступну активацію росту (Harberd et al., *The Plant Cell* 21, p 1328–1339, 2009).

Термін "ген DELLA" або "алель DELLA" стосується тут послідовності нуклеїнових кислот, кодуєчих білок DELLA. Гени всіх відомих білків DELLA є безінтронними. Зіставлення нуклеотидної послідовності різних генів/ кодуєчих послідовностей DELLA є представленим на Фіг. 2. Нуклеотидна послідовність різних генів/ кодуєчих послідовностей DELLA є представленою в переліку послідовностей послідовностями SEQ ID №: 2, SEQ ID №: 4, SEQ ID №: 6 і SEQ ID №: 8.

Як він тут використовується, термін "алель" означає будь-яку з однієї або більше альтернативних форм гену в конкретному локусі. В диплоїдній (або амфідиплоїдній) клітині організму алелі даного гену є локалізованими в специфічному місці або локусі на хромосомі. Один алель є присутнім на кожній хромосомі пари гомологічних хромосом.

Як він тут використовується, термін "гомологічні хромосоми" означає хромосоми, які містять інформацію для тих самих біологічних ознак і містять ті самі гени в тих самих локусах, але можливо різні алелі цих генів. Гомологічні хромосоми є хромосомами, які паруються під час мейозу. "Негомологічні хромосоми", що представляють всі біологічні ознаки організму, утворюють комплект, і кількість комплектів у клітині називається плоїдністю. Диплоїдні організми

містять два комплекти негомологічних хромосом, де кожна гомологічна хромосома успадковується від іншого з батьків. У амфідиплоїдних видів існують по суті два комплекти диплоїдних геномів, завдяки чому хромосоми цих двох геномів називаються "гомеологічними хромосомами" (і, подібно до цього, локуси або гени цих двох геномів називаються

5 гомеологічними локусами або генами). Диплоїдний або амфідиплоїдний вид рослин може містити велику кількість різних алелів в якомусь конкретному локусі.

Як він тут використовується, термін "гетерозиготний" означає генетичний стан, існуючий тоді, коли два різні алелі знаходяться в якомусь специфічному локусі, але є розміщеними індивідуально на відповідних парах гомологічних хромосом в клітині. Навпаки, термін

10 "гомологічний", як він тут використовується, означає генетичний стан, існуючий тоді, коли два ідентичні алелі знаходяться в якомусь специфічному локусі, але є розміщеними індивідуально на відповідних парах гомологічних хромосом в клітині.

Як він тут використовується, термін "локус" означає специфічне місце або місця або сайт на хромосомі, де, наприклад, знаходиться ген або генетичний маркер. Наприклад, "локус RGA1"

15 стосується положення на хромосомі, де може знаходитись ген RGA1 (і два алелі RGA1).

Термін "суттєво подібна", як він тут використовується, стосується послідовностей, які мають щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовностей. Такі послідовності нуклеїнових кислот можуть називатись також

20 "значною мірою ідентичними" або "суттєво ідентичними" до послідовностей DELLA, наведених в переліку послідовностей. "Ідентичність послідовностей" двох споріднених нуклеотидних або амінокислотних послідовностей, виражена як відсоток, стосується кількості позицій в цих двох, оптимально зіставлених послідовностях, які мають ідентичні залишки (x100), поділеної на кількість порівнюваних позицій. Пропуск, тобто позиція в зіставленні, де залишок є присутнім в

25 одній послідовності, але не в іншій, вважається позицією з неідентичними залишками. "оптимальне зіставлення" двох послідовностей встановлюється шляхом зіставлення двох послідовностей по всій довжині за алгоритмом глобального зіставлення Needleman і Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol 48(3):443-53) в The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276—277; дивись, наприклад

30 <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) з використанням установок по умовчання (штраф за відкриття пропуску = 10 (для нуклеотидів) / 10 (для білків) і штраф за протяжність пропуску = 0,5 (для нуклеотидів) / 0,5 (для білків)). Для нуклеотидів використовуваною матрицею замін по умовчання є EDNAFULL, а для білків матрицею замін по умовчання є EBLOSUM62.

"Суворі умови гібридизації" можуть використовуватись для ідентифікації нуклеотидних послідовностей, які є значною мірою ідентичними або подібними до даної нуклеотидної послідовності. Суворі умови залежать від послідовності і будуть відрізнятись за різних обставин. Загалом, суворі умови вибираються такими, щоб бути приблизно на 5°C нижче термографічної температури плавлення (T_m) для конкретних послідовностей при визначеній іонній силі і pH. T_m – це температура (при визначеній іонній силі і pH), при якій 50 % цільової послідовності

40 гібридизуються з довершено підібраним зондом. Типово будуть вибиратись такі суворі умови, при яких концентрація солі становить приблизно 0,02 моль/л, а температура становить щонайменше 60°C. Зниження концентрації солі та/або підвищення температури збільшують суворість. Суворі умови для гібридизацій РНК-ДНК (Нозерн блоти з використанням зонду з, наприклад, 100 нуклеотидів) є прикладом тих, які передбачають щонайменше одне промивання

45 в 0,2X SSC при 63 °C впродовж 20 хвилин або еквівалентні умови.

"Умови високої суворості" можуть бути забезпечені, наприклад, гібридизацією при 65 °C у водному розчині, що містить 6x SSC (20x SSC містить 3,0 M NaCl, 0,3 M Na-цитрату, pH 7,0), 5x Denhardt's (100X Denhardt's містить 2 % Ficoll, 2 % полівініл піролідону, 2 % альбуміну бичачої сироватки), 0,5 % натрію додецил сульфату (SDS) і 20 мкг/мл денатурованого ДНК-носія (однонитчаста ДНК спермію риби, з середньою довжиною 120-3000 нуклеотидів) в якості неспецифічного конкурента. Після гібридизації промивання високої суворості може здійснюватись в кілька етапів, з кінцевим промиванням (біля 30 хвилин) при температурі гібридизації в 0,2-0,1x SSC, 0,1 % SDS.

50 "Умови помірної суворості" стосуються умов, еквівалентних гібридизації у вищеописаному розчині, але при температурі біля 60-62°C. Промивання помірної суворості може здійснюватись при температурі гібридизації в 1x SSC, 0,1 % SDS.

"Низька суворість" стосується умов, еквівалентних гібридизації у вищеописаному розчині, але при температурі біля 50-52°C. Промивання низької суворості може здійснюватись при температурі гібридизації в 2x SSC, 0,1 % SDS. Дивись також Sambrook et al. (1989) і Sambrook and Russell (2001).

60

Термін "ортолог" гену або білка стосується тут гомологічного гену або білка, знайденого у іншого виду, який має ту саму функцію, що й цей ген або білок, але (звичайно) розходиться в послідовності з того моменту часу, коли види, що містять ці гени, розійшлись (тобто, гени еволюціонували від спільного предка шляхом видоутворення). Відповідно, ортологи гену DELLA, наприклад ген RGA1 *B. napus*, можуть бути ідентифіковані у інших видів рослин (наприклад, *B. juncea*, *B. napus*, *B. rapa*, *B. carinata*, *B. oleracea* і *B. nigra*) на основі порівнянь обох послідовностей (наприклад, на основі відсотків ідентичності послідовностей для всієї послідовності або для специфічних доменів) та/або функціонального аналізу.

Термін "мутант" або "мутація" стосується, наприклад, рослини або алеля гену, які відрізняються від так званої рослини або алеля/ гену "дикого типу", який стосується типової форми, наприклад, рослини або алеля/ гену, яка найчастіше трапляється в природі. "Рослина дикого типу" стосується рослини з найпоширенішим фенотипом такої рослини в природній популяції. "Алель дикого типу" стосується алеля гену, необхідного для одержання фенотипу дикого типу. Мутантна рослина або алель можуть траплятись в природній популяції або завдячуючи втручанню людини, наприклад у вигляді мутагенезу, а "мутантний алель" стосується алеля гену, необхідного для одержання мутантного фенотипу. Як він тут використовується, термін "мутантний алель DELLA" стосується алеля DELLA, який відрізняється від відповідного алеля дикого типу в одній або більше нуклеотидних позиціях, тобто він містить одну або більше мутацій в своїй послідовності нуклеїнових кислот у порівнянні з алелем дикого типу. Мутантний алель або білок можуть називатись також варіантним алелем або білком.

Мутації в послідовностях нуклеїнових кислот можуть містити, наприклад:

(а) "місценс мутацію", яка є зміною послідовності нуклеїнових кислот, що має своїм результатом заміщення однієї амінокислоти іншою амінокислотою;

(b) "нонсенс мутацію" або "мутацію СТОП кодону", яка є зміною послідовності нуклеїнових кислот, що має своїм результатом введення недозрілого СТОП кодону і відповідно припинення трансляції (одержується усичений білок); рослинні гени містять стоп кодони трансляції "TGA" (UGA в РНК), "TAA" (UAA в РНК) і "TAG" (UAG в РНК); отже, заміщення, вставка або делеція нуклеотиду, які приводять до того, що один з цих кодонів який буде в зрілій мРНК, що транслюється (в рамці зчитування), припинить трансляцію;

(с) "мутація вставки" однієї або більше амінокислот завдяки одному або більше кодонів, які були додані в кодуючу послідовність даної нуклеїнової кислоти;

(d) "мутація делеції" однієї або більше амінокислот завдяки одному або більше кодонів, які були видалені з кодуючої послідовності даної нуклеїнової кислоти;

(е) "мутація зміщення рамки", яка призводить до того, що послідовність нуклеїнових кислот транслюється в іншу рамку по ходу мутації. Мутація зміщення рамки може мати різні причини, такі як вставка, делеція або дуплікація одного або більше нуклеотидів, але також мутації, які порушують сплайсинг пре-мРНК (мутації сайту сплайсингу), можуть викликати зміщення рамки;

(f) "мутації сайту сплайсингу", які змінюють або припиняють правильний сплайсинг послідовності пре-мРНК, що має своїм результатом білок з іншою амінокислотною послідовністю, ніж послідовність дикого типу. Наприклад, один або більше екзонів можуть бути пропущені під час сплайсингу РНК, що дасть білок, у якому відсутні амінокислоти, кодовані пропущеними ексонами. Альтернативно, рамка зчитування може бути зміненою внаслідок неправильного сплайсингу, або може залишитись один або більше інтронів, або можуть утворитись додаткові донори або акцептори сплайсингу, або сплайсинг може початись в іншій позиції (наприклад, в межах інтрону), або можуть генеруватись додаткові сигнали поліаденілування. Правильний сплайсинг пре-мРНК є складним процесом, на який можуть впливати різні мутації в нуклеотидній послідовності генів. У вищих еукаріотів, таких як рослини, основна сплайсингосома вирізає інтрони, що містять GU в сайті сплайсингу 5' (донорний сайт) і AG в сайті сплайсингу 3' (акцепторний сайт). Це правило GU-AG (або правило GT-AG; дивись Lewin, Genes VI, Oxford University Press 1998, spp 885-920, ISBN 0198577788) виконується приблизно в 99 % сайтів сплайсингу ядерних еукаріотичних генів, тоді як інтрони, що містять інші динуклеотиди в сайті сплайсингу 5' і 3', такі як GC-AG і AU-AC, відповідають тільки за приблизно 1 % і 0,1 %, відповідно.

Як він тут використовується, термін "модифікована" у відношенні послідовності нуклеїнових кислот або послідовності амінокислот, стосується однієї або більше мутацій, що приводять до делеції, вставки та/або заміщення однієї або більше нуклеїнових кислот або амінокислот в цій послідовності у порівнянні з відповідною послідовністю нуклеїнових кислот або амінокислот дикого типу.

Як він тут використовується, термін алель "карликовості" стосується мутантного алеля DELLA, що спрямовує експресію мутантного білка DELLA (білка карликовості DELLA), який забезпечує карликовий фенотип (тобто, зменшену висоту) рослини, в якій він експресується, тим самим дозволяючи одержати рослину з підвищеною стійкістю до полягання. Такий мутантний білок карликовості DELLA містить щонайменше одну вставку, делецію та/або заміщення амінокислоти відносно білка дикого типу, що має своїм результатом білок, який не розкладається або розкладається значно менше у відповідь на GA (тобто, є GA-нечутливим), тим самим діючи як конститутивний репресор індукowanego GA росту. Такий мутантний алель, коли експресується в рослині, буде забезпечувати зменшену чутливість рослини до індукowanego GA росту і тим самим давати рослину зменшеної висоти, тобто карликову рослину, та/або рослину з підвищеною стійкістю до полягання. По суті, будь-яка мутація, яка має своїм результатом білок, що містить принаймні одну вставку, делецію та/або заміщення амінокислоти відносно білка дикого типу, може привести до мутантного білка DELLA карликовості. Однак зрозуміло, що мутації в певних частинах кодувальної послідовності білка з більшою ймовірністю приводять до алеля DELLA карликовості, такі як мутації в ділянках ДНК, кодує яких збережені домени, подібні домену DELLA (що містить мотив DELLA, спейсерну ділянку, тобто ділянку між DELLA і VHYNP, та мотив VHYNP).

"Мутація *dwf2*" або "мутантний алель *dwf2*", як ці терміни тут використовуються, стосуються мутації в алелі DELLA, яка приводить до заміщення кодованого білка DELLA проліну, що відповідає P91 амінокислотної послідовності RGA1 B. napus (SEQ ID №: 3), на іншу амінокислоту, переважно лейцин (L). В такому мутантному алелі *dwf2* кодон, що відповідає нуклеотидам 271-273 геномної ДНК RGA1 B. napus/ кодує послідовність (SEQ ID №: 2) було змінено таким чином, що він більше не кодує пролін, а кодує іншу амінокислоту, переважно лейцин (наприклад CCC мутувано до CTC). Визначення відповідних амінокислот або нуклеотидних позицій в іншій послідовності може бути здійснено методом відомим в цій галузі, таким як оптимальне зіставлення, яке вже описувалося.

"Гібереліни" або "GA" – це рослинні гормони які регулюють ріст і впливають на різні процеси розвитку, включаючи видовження стебла, проростання, стан спокою, цвітіння, вираженість статевих ознак, індукцію ферментів, а також старіння листя і плодів. GA – це дитерпеноїдні (дигідроабієтинові) кислоти, які синтезуються терпеноїдним провідним шляхом в пластидах, а потім модифікуються в ендоплазматичному ретикулумі і цитозолі, доки не досягнуть своєї біологічно активної форми. Гіберелінова кислота, яка була першим структурно охарактеризованим гібереліном, є відомою як GA3.

"Карликова рослина" має означати атипову малу рослину. Загалом, така "карликова рослина" має змінену архітектуру в тому відношенні, що вона має статуру або висоту, що є зменшеною від висоти типової рослини приблизно на 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % або більше. Загалом, але не виключно, така карликова рослина характеризується зменшеною довжиною стебла, черешка або стовбура у порівнянні з типовою рослиною. Переваги карликових рослин включають можливість дуже раннього посіву; відсутність необхідності опилювання регуляторами росту через менше видовження стебла до настання зими; краща стійкість до морозів; легкість моніторингу врожаю через менший розмір, що полегшує обробки з метою захисту рослин; підвищена стійкість до полягання; легкість збирання врожаю, менші його втрати і збільшений вихід.

Термін "полягання", як він тут використовується, стосується сплюснення стоячих рослин дощем та/або вітром, внаслідок чого вертушки або стручки опиняються нижче рівня різаків під час збирання врожаю. Полягання типово призводить до труднощів при збиранні врожаю і втрати врожаю/втрати виходу. Отже, "стійкість до полягання" стосується рослин, що є менш схильними до полягання ніж типова рослина. Терміни "підвищена стійкість до полягання" або "зменшене полягання", як вони тут використовуються, стосуються рослин, які менше вражаються поляганням ніж типова рослина. Стійкість до полягання можна оцінювати, наприклад, шляхом визначення відношення висоти незайманої рослини до висоти випрямленої рослини, як наприклад описано Muangprom et al. (1996), або як наприклад описано далі в масштабі 1 до 9. Стійка до полягання рослина має стійкість до полягання, яка збільшується, або полягання, яке зменшується від такого типової рослини приблизно на 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше. Рослина з підвищеною стійкістю до полягання викликає менше труднощів при збиранні врожаю, а значить забезпечує менші втрати врожаю, ніж рослини більш низькою стійкістю до полягання, тим самим поліпшуючи загальний вихід. Підвищена стійкість до полягання може бути результатом зменшеної висоти або статури рослин. Як він тут використовується, термін "зменшена висота" рослини стосується статури або висоти, яка є

зменшеною від такої типової рослини приблизно на 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % або більше.

Термін "мутантний білок DELLA", як він тут використовується, наприклад мутантний білок RGA, стосується білка, кодованого мутантною послідовністю нуклеїнових кислот DELLA ("алелем DELLA" або "геном DELLA"), завдяки чому ця мутація має своїм результатом зміну амінокислотної послідовності цього білка у порівнянні з білком дикого типу. "Білок карликовості DELLA" – це мутантний білок DELLA, який, коли експресується в рослині, буде мати своїм результатом рослину зі зменшеною висотою (тобто, карликову рослину) та/або підвищену стійкість до полягання у порівнянні з рослиною, яка не експресує такий білок. Типово, в такому білку карликовості DELLA амінокислоти або амінокислотні домени, суттєво важливі для здатності білка розкладатись під дією GA, є заміщеними, вилученими або зруйнованими, що робить цей білок GA-нечутливим. Такий білок карликовості DELLA все ще діє як репресор росту. Отже, мутація, яка спричинює до того, що білок DELLA за цим винаходом надає карликового фенотипу, є мутацією набуття функції, завдяки чому мутантний білок DELLA діє як конститутивний репресор росту. Мутантний білок DELLA за цим винаходом не містить білок DELLA з втратою мутації функції, оскільки такі мутації будуть викликати збільшену висоту рослини через втрату репресорної функції DELLA. Мутантний білок DELLA кодується мутантним алелем або геном DELLA.

Приклади мутантних алелей/білків карликовості DELLA є відомими в цій галузі, і огляд таких мутантів представлений в Таблиці 1. Ефект карликовості цих мутацій був підтверджений експресією мутантних білків GAI, що несуть відповідні мутації, у *Arabidopsis* (Willige et al., The Plant Cell 19, p 1209-1220, 2007).

Таблиця 1

Огляд мутантних білків DELLA, які надають карликовий фенотип,
з посиланням на відповідні джерела, які всі є включеними сюди за посиланням

| Вид ген | назва мутанта | мутація | посилання |
|-------------|--------------------|---|---|
| Z.mais | | | |
| d8 | D8-Mpl | Δ 1-105 | Peng et al., 1999 supra |
| | D8-1 | D55G, Δ 56-59 | Peng et al., 1999 supra |
| | D8-2023 | Δ 87-98 | Peng et al., 1999 supra |
| D9 | MUT1 | N11S, R15M, A108T, G427D, INDEL511-525, E600K | WO 07/124312 |
| O.sativa | | | |
| SLR1 | Δ DELLA | Δ 39-55 | Itoh et al., 2002 supra |
| | Δ space | Δ 69-80 | Itoh et al., 2002 supra |
| | Δ TVHYNP | Δ 87-104 | Itoh et al., 2002 supra |
| | Δ polyS/T/V | Δ 175-237 | Itoh et al., 2002 supra |
| T. aestivum | | | |
| Rht-B1a | B1b | Q64stop \rightarrow Δ 1-67 | Peng et al., 1999 supra |
| Rht-D1a | D1b | E64stop \rightarrow Δ 1-67 | Peng et al., 1999 supra |
| H.vulgare | | | |
| SLN1 | sln1d | G46E | Chandler et al., Plant Physiology 129, p181–190, 2002 |
| A.thaliana | | | |
| GAI | gai | Δ 27-43 | Peng et al., 1997 supra |
| RGA | rga- Δ 17 | Δ 44-60 | Dill et al., PNAS 98, p14162–67, 2001 |
| B.rapa | | | |
| RGA1 | brrga1-d | Q328R | Muangprom et al., 2005 supra |
| B. napus | | | |
| RGA1 | bzh | E546K | WO01/09356 |

GA-чутливість білка DELLA можна оцінити, наприклад, за (над)експресією цього білка в рослині методами, відомими в цій галузі, і впливом на висоту рослини або за (тимчасовою) (над)експресією цього білка в рослині або рослинній клітині і розщепленням білка у відповідь на

обробку GA, як описано, наприклад, у Itoh et al., 2002 supra; Gubler et al., 2002 supra, Muangprom et al., 2005 supra. GA-чутливість рослини, що містить (алелі, кодуєчі) білки DELLA, можна оцінити екзогенно, застосувавши GA і визначивши його вплив на висоту рослини, як описано, наприклад у Itoh et al., 2002 supra.

5 "Мутагенез", як цей термін тут використовується, стосується процесу, в якому рослинні клітини (наприклад, певна кількість насіння Brassica або інших частин, таких як пилок і т.п.) піддаються процедурі, яка викликає мутації в ДНК цих клітин, такої як контакт з мутагенним агентом, таким як хімічна речовина (наприклад, етилметилсульфонат (ЕМС), етилнітрозосечовина (ЕНС) і т.п.), альфа-промені, гамма-промені (такі як від джерела Кобальту 60), рентгенівські промені, УФ опромінення і т.п.), або комбінація двох або більше з них. Отже, бажаний мутагенез одного або більше алелів DELLA може бути здійснений шляхом використання хімічних засобів, наприклад за допомогою контакту однієї або більше рослинних тканин з етилметилсульфонатом (ЕМС), етилнітрозосечовиною і т.п., шляхом використання фізичних засобів, наприклад за допомогою рентгенівських променів, гамма-опромінення, такого як від джерела Кобальту 60. Якщо мутації, створювані опроміненням, часто є великими делеціями або іншими об'ємистими ураженнями, такими як транслокації або складні перестройки, то мутації, викликані хімічними мутагенами, часто є більш дискретними ураженнями, такими як точкові мутації. Наприклад, ЕМС алкілує гуанінові основи, що приводить до помилкового спарювання основ: алкілований гуанін буде паруватись з тіміновою основою, що має своїм результатом в основному транзиції G/C до A/T. Після мутагенезу рослини Brassica регенерують з оброблених клітин за допомогою відомих методів. Наприклад, одержане насіння Brassica може бути висіяне у відповідності до звичайних методик вирощування, і після самозапилення на цих рослинах утворюється насіння. Як варіант, здвоєні гаплоїдні ростки можуть видалятися, щоб негайно утворити гомозиготні рослини, наприклад як описано у Coventry et al. (1988, Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canada). Додаткове насіння, яке утворюється в результаті такого самозапилення в цьому або наступному поколінні, може бути зібране і піддане скринінгу на присутність мутантних алелів DELLA. Відомі кілька методик для скринінгу на специфічні мутантні алелі, наприклад DeleteageneTM (Delete-a-gene; Li et al., 2001, Plant J 27: 235-242) використовує аналізи з полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР), щоб відібрати делеційні мутанти, які утворились під час мутагенезу під дією швидких нейтронів. TILLING (targeted induced local lesions in genomes (цільові індуковані локальні ураження в геномах); McCallum et al., 2000, Nat Biotechnol 18:455-457) ідентифікує викликані ЕМС точкові мутації і т.д. Інші методики скринінгу на присутність специфічних мутантних алелів DELLA є описаними в прикладах далі.

35 "(Молекулярний) маркер", як цей термін тут використовується, стосується вимірної генетичної ознаки з фіксованим положенням в геномі, яка звичайно унаслідкується менделівським чином і яка може бути використана для картування тієї характеристики, що становить інтерес. Природа цього маркеру залежить від використовуваного молекулярного аналізу і може бути виявлена на рівні ДНК, РНК і білка. Генетичне картування може здійснюватись з використанням молекулярних маркерів, таких як, але без обмеження ними, RFLP (поліморфізми довжини фрагментів рестрикції; Botstein et al. (1980), Am J Hum Genet 32:314-331; Tanksley et al. (1989), Bio/Technology 7:257-263), RAPD (випадкова ампліфікована поліморфна ДНК; Williams et al. (1990), NAR 18:6531-6535), AFLP (поліморфізми довжини ампліфікованих фрагментів; Vos et al. (1995) NAR 23:4407-4414), SNPs (однонуклеотидні поліморфізми) або мікросателіти (також називаються SSR's; Tautz et al. (1989), NAR 17:6463-6471), технологія InvaderTM (як описано, наприклад, в патенті США № 5,985,557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6,001,567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage, які включено сюди за посиланням), методи виявлення на основі ПЛР або ПЛР зі зворотною транскрипцією, такі як TaqMan® (Applied Biosystems), або інші методи виявлення, такі як SNPlex, і подібні.

50 Про молекулярний маркер кажуть, що він "зчеплений" з геном або локусом, коли маркер і ген або локус мають більшу асоціацію в спадковості, ніж можна було б очікувати з незалежного асортименту, тобто маркер і локус виділяються разом в популяції, що розщеплюється, і знаходяться на тій самій хромосомі. "Зчеплення" стосується відстані між маркером і геном або локусом (або двома локусами або двома маркерами). Чим щільнішим є зчеплення, тим меншою є ймовірність явища рекомбінації між маркером і геном або локусом. Генетична відстань (відстань на генетичній карті) обчислюється за частотами рекомбінації і виражається в сантиморганах (сМ) (Kosambi (1944), Ann. Eugenet. 12:172-175).

Будь-яке посилання на "рослину" або "рослини" за цим винаходом включає також частини рослини (клітини, тканини або органи, насіннєві стручки, насіння, частини, які відрізаються, такі як коріння, листя, квіти, пилок і т.п.), потомство рослин, яке зберігає відмінні ознаки батьків, таке як насіння, одержане шляхом самовідтворення або схрещування, наприклад гібридне насіння (одержане при схрещуванні двох інбредних батьківських ліній), гібридні рослини і частини рослини, одержані з них, якщо не зазначається інше.

"Сільськогосподарська рослина" стосується рослинного виду, що культивується як продуктивна рослина, така як, але не обмежуючись цим, рослина Brassica, включаючи Brassica napus (AACC, 2n=38), Brassica juncea (AABB, 2n=36), Brassica carinata (BBCC, 2n=34), Brassica rapa (синонім B. campestris) (AA, 2n=20), Brassica oleracea (CC, 2n=18) або Brassica nigra (BB, 2n=16). Ця дефініція не охоплює бур'яни, такі як Arabidopsis thaliana.

"Різновид", як цей термін тут використовується згідно конвенції UPOV, стосується групи рослин в єдиному ботанічному таксоні найнижчого відомого рангу, яку можна визначити за експресією ознак, що є результатом даного генотипу або комбінації генотипів, яку можна відрізнити від будь-якої іншої групи рослин за експресією щонайменше однієї з вказаних ознак і яка розглядається як одиниця у відношенні її придатності для розмноження у незмінному вигляді (стабільною).

Як він тут використовується, термін "така, що не трапляється у природі" або "культивована", коли застосовується у відношенні рослини, означає рослину з геномом, який був модифікований людиною. Трансгенна рослина, наприклад, є рослиною, що не трапляється у природі, яка містить екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, наприклад химерний ген, що включає транскрибовану ділянку, яка, коли транскрибується, дає біологічно активну молекулу РНК, що трансліується в білок, такий як білок DELLA за цим винаходом, а значить була модифікована людиною. Крім того, рослина, що містить мутацію в ендегенному гені, наприклад мутацію в ендегенному гені DELLA, (наприклад, в регуляторному елементі або в кодуєчій послідовності) як результат дії мутагенного агента, також вважається неприродною рослиною, оскільки її було генетично модифіковано людиною. Більше того, рослина конкретного виду, такого як Brassica napus, яка містить мутацію в ендегенному гені, наприклад в ендегенному гені DELLA, якого у природі не трапляється у цього конкретного виду рослин, як результат, наприклад, спрямованих процесів виведення і селекції, таких як виведення з використанням маркеру і селекції або інтрогресії з рослиною того самого або іншого виду, такого як Brassica juncea або гара, такою рослиною, яка також вважається такою, що не трапляється у природі. З іншого боку, рослина, яка містить тільки спонтанні мутації або мутації, що трапились природним шляхом, тобто рослина, яку не було генетично модифіковано людиною, не є "рослиною, що не трапляється у природі" за встановленим тут визначенням. Спеціалісту має бути зрозумілим, що хоча рослина, що не трапляється у природі, типово має нуклеотидну послідовність, яка змінена у порівнянні з рослиною, що трапляється у природі, рослина, що не трапляється у природі, також може бути генетично модифікованою людиною без зміни її нуклеотидної послідовності, наприклад шляхом модифікації її профілю метилування.

Як він тут використовується, термін "агрономічно придатний розвиток рослини" стосується розвитку рослини, зокрема рослини олійного рапсу, який не впливає несприятливо на її характеристики за нормальної сільськогосподарської практики, точніше на її приживання у полі, життєвість, час цвітіння, висоту, дозрівання, вихід врожаю, стійкість до хвороб, стійкість до розкривання стручків, вміст і склад олії і т.д.

Як він тут використовується, термін "глюкозинолати" стосується низькомолекулярних глюкозидів, що містять сірку, які продукуються і запасуються майже у всіх тканинах представників Carraales, найважливішими серед яких є група рослин Crucifer (хрестоцвітних). Вони складаються з двох частин – частини глікону і змінної частини, бічного ланцюга глікону, похідного від α -амінокислот. Відомо, що споживання великих кількостей глюкозинолатів і продуктів їх розщеплення є токсичним для тварин і людини (WO97/016559). В Канаді термін "канола" описує олійний рапс з обмеженими рівнями глюкозинолатів і ерукової кислоти в зібраному насінні, точніше після подрібнення висушена на повітрі маса містить менше ніж 30 мікромоль (мкмоль) глюкозинолатів на грам обезжиреного (вільного від олії) шроту (WO/1993/006714). Існують кілька аналізів для визначення як загальних, так і індивідуальних глюкозинолатів, наприклад алкеніл глюкозинолатів) в рослинах або їх частинах (наприклад, Chavadej et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, p 2166-2170, 1994; Leonardo and Becker, Plant Breed. 117: p 97-102, 1998; Wu et al., J. China Cereal Oil Assoc. 17: p 59-62, 2002).

Як він тут використовується, термін "низький вміст глюкозинолатів" стосується вмісту глюкозинолатів в насінні, нижчого ніж 30 мкмоль/г, переважно навіть ще нижчого, тобто нижчого ніж 25 мкмоль/г, нижчого ніж 20 мкмоль/г, нижчого ніж 15 мкмоль/г обезжиреного шроту.

Як він тут використовується, термін "нуклеотидна послідовність SEQ ID №: Z від позиції X до позиції Y" визначає нуклеотидну послідовність, включаючи обидві нуклеотидні кінцеві точки.

Термін "що містить" має інтерпретуватись як такий, що визначає присутність вказаних частин, етапів або компонентів, але не виключає присутності однієї або більше додаткових частин, етапів або компонентів. Отже, рослина, що містить певну ознаку, може містити додаткові ознаки.

Зрозуміло, що коли слово дається в однині (наприклад, рослина або корінець), сюди включається також множина (наприклад, певна кількість рослин, певна кількість корінців). Отже, посилання на якийсь елемент не виключає тієї можливості, що присутнім є більше ніж один елемент, якщо контекст чітко не вимагає, щоб був один і тільки один з елементів. Однина звичайно щось, про що можна сказати "щонайменше один".

Докладний опис винаходу

Мутагенізована популяція рослин *Brassica napus* оцінювалась у відношенні рослин з карликовим фенотипом, тобто зменшеною висотою. Одну таку карликову рослину, яку було названо dwarf2 (dwf2), можна було ідентифікувати як таку, що несе точкову мутацію в геномній ДНК RGA1, яка приводить до амінокислотного заміщення проліну (P) на лейцин (L) (міссенс мутація), що відповідає амінокислотній позиції 91 в білку RGA1 *B. napus* (SEQ ID №: 3). При зворотному схрещуванні такого алеля dwarf2 в елітну лінію *B. napus* карликовий фенотип стабільно підтримувався, хоча негативного впливу на розмір врожаю, який звичайно асоціюється з цим типом мутацій у виду *Brassica*, не спостерігалось. Більше того, рівні глюкозинолатів в насінні від таких рослин виявився значно нижчим ніж тоді, коли подібний карликовий алель brgga1 RGA1 *B. napus* вводився зворотним схрещуванням в ту саму елітну лінію *B. napus*.

Це заміщення P91L відбувається в мотиві/збереженій ділянці II VHYNP (показана на Фіг. 1), яка, як відомо, коли піддається делеції, надає карликового фенотипу кукурудзі і рису. Peng et al. (1999) описують два домінантні мутанти сильної карликовості кукурудзи – mlp і 2038, що містять делецію в білку DELLA D8 амінокислот 1-105 і 87-98, відповідно. Itoh et al. (2002) описують подібний мутант сильної карликовості у рису, який відповідає делеції амінокислот 87-104 білка DELLA SLR1. На основі цих даних можна дійти висновку, що найменша ділянка, яку необхідно піддати делеції, щоб забезпечити карликовий фенотип, має відповідати амінокислотам 92-103 білка RGA1 *B. napus* (поміщено в рамку на Фіг. 1). Винахідниками тепер було встановлено, що модифікація щонайменше однієї з амінокислот на цій мінімальній ділянці є достатньою, щоб надати карликового фенотипу рослинам *Brassica*, які експресують цей варіант білка.

Отже, в першому варіанті здійснення цей винахід пропонує рослину, яка містить в своєму геномі щонайменше один мутантний алель гену DELLA, причому вказаний мутантний алель кодує мутантний білок карликовості DELLA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID №: 1, яка характеризується тим, що принаймні одну амінокислоту вказаної послідовності було модифіковано.

Як вони тут використовуються, терміни "модифікований" або "модифікація" стосуються зміни в амінокислотній послідовності, яка може полягати в заміщенні однієї або більше амінокислот або в делеції або вставці однієї або більше амінокислот. або має своїм результатом конкретне амінокислотне заміщення, делеція або вставка білок DELLA, який надає карликовий фенотип рослині, в якій він експресується, та/або білок DELLA, що є GA-нечутливим, можна тестувати методами, які були описані раніше.

В одному варіанті здійснення така модифікація може включати модифікацію амінокислоти Р (проліну) в амінокислотній послідовності SEQ ID №: 1. Амінокислота Р може бути заміщеною будь-якою іншою амінокислотою або може бути піддана делеції. В іншому варіанті здійснення амінокислота Р може бути модифікованою на L (лейцин).

Має бути зрозумілим, що рослини за цим винаходом мають значно зменшену висоту та/або є значно більш стійкими до полягання у порівнянні з рослинами, що не містять мутантного алеля карликовості DELLA. Переважно, рослини за цим винаходом дають не зменшений вихід врожаю у порівнянні з рослинами, що не містять мутантного алеля карликовості DELLA, і навіть можуть давати кращий вихід через менші втрати при збиранні врожаю. Рослини за цим винаходом також переважно зберігають агрономічно прийнятний розвиток і низький вміст глюкозинолатів в насінні.

Даний винахід пропонує також послідовності нуклеїнових кислот, що представляють алелі карликовості DELLA. Послідовності нуклеїнових кислот алелів DELLA дикого типу є представленими в переліку послідовностей, тоді як мутанти цих послідовностей і послідовності, суттєво подібні до них, є описаними далі і в Прикладах з посиланням на послідовності DELLA дикого типу.

"Послідовності нуклеїнових кислот DELLA" або "варіантні послідовності нуклеїнових кислот DELLA" у відповідності до цього винаходу є послідовностями нуклеїнових кислот, кодуєчими амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 7 або SEQ ID №: 9, або послідовностями нуклеїнових кислот, які мають щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з SEQ ID №: 2, SEQ ID №: 4, SEQ ID №: 6 або SEQ ID №: 8. Ці послідовності нуклеїнових кислот можуть називатись також "суттєво подібними" або "суттєво ідентичними" з послідовностями DELLA, наведеними в переліку послідовностей.

Пропонуються послідовності нуклеїнових кислот мутантних алелів карликовості DELLA (що містять одну або більше мутацій, які приводять до зміни амінокислотної послідовності відповідного білка DELLA, у порівнянні з білком дикого типу) генів DELLA. Такі мутантні алелі (названі алелями della) можуть створюватись та/або ідентифікуватись з використанням різних відомих методів, таких як докладно описані далі, і пропонуються як в ендогенній формі, так і у виділеній формі. В одному варіанті здійснення пропонуються мутантні алелі карликовості DELLA (наприклад, мутантні алелі RGA1) від Brassicaceae, зокрема від видів Brassica, особливо від Brassica napus, але також від інших агрокультур Brassica. Наприклад, види Brassica, що містять A та/або C геном, можуть містити різні алелі генів DELLA, які можна ідентифікувати і перенести в іншу рослину за цим винаходом. Крім цього, можна скористатись методами мутагенезу, щоб генерувати мутації в алелях DELLA дикого типу, тим самим створюючи мутантні алелі карликовості DELLA для застосування за цим винаходом. Оскільки специфічні алелі DELLA можна переносити від однієї рослини іншій шляхом схрещування і селекції, в одному варіанті здійснення пропонуються алелі DELLA в рослині (тобто, ендогенно), наприклад рослині Brassica, переважно рослині Brassica, яка може бути схрещеною з Brassica napus або яка може бути використана для одержання "синтетично" рослини Brassica napus. Гібридизація між різними видами Brassica є описаною в спеціальній літературі, наприклад дивись посилання в Snowdon (2007, Chromosome research 15: 85-95). Міжвидовою гібридизацією можна скористатись, наприклад, для перенесення генів від, наприклад, C геному в B. napus (AACC) до C геному у B. carinata (BBCC), або навіть від, наприклад, C геному в B. napus (AACC) до B геному в B. juncea (AABB) (шляхом спорадичного явища незаконної рекомбінації між їх C і B геномами). "Ресинтезовані" або "синтетичні" лінії Brassica napus можуть бути одержані шляхом схрещування первинних предків, B. oleracea (CC) і B. rapa (AA). Міжвидові, а також міжродові, бар'єри несумісності можуть бути успішно подолані в кросах між культурними видами Brassica та їх родичами, наприклад методами ембріонального спасіння або злиттям протопластів (дивись, наприклад, Snowdon, вище).

Отже, молекули нуклеїнової кислоти, які представляють мутантні алелі карликовості DELLA, можуть містити одну або більше мутацій, таких як мутації міссенс або мутації вставки або делеції, як вже докладно описувалось вище. В основному, будь-яка мутація, що має своїм результатом білок, який містить щонайменше одну амінокислотну вставку, делецію та/або заміщення в послідовності SEQ ID №: 1 відносно білка дикого типу, яка приводить до утворення білка DELLA, який, коли експресується в рослині, забезпечує зменшену висоту цієї рослини та/або підвищену стійкість до полягання цієї рослини (наприклад, шляхом створення білка DELLA, що діє як конститутивний репресор індукованого GA росту) і відповідає алелю карликовості DELLA.

Відповідно, в одному варіанті здійснення пропонуються послідовності нуклеїнових кислот, які містять одну або більше з будь-яких типів мутацій, описаних вище. Будь-яка з описаних мутантних послідовностей нуклеїнових кислот пропонується per se (у виділеній формі), як і рослини і частини рослини, що містять такі послідовності ендогенно.

Мутантні алелі DELLA можуть бути генеровані (наприклад, індуковані мутагенезом) та/або ідентифіковані за допомогою широкого кола методів, які є звичайними в цій галузі, наприклад з використанням методів на основі ПЛР для ампліфікації всієї DELLA геномної або цДНК.

Після мутагенезу рослини вирощуються з обробленого насіння або регенерується з оброблених клітин з використанням відомих методів. Наприклад, мутагенізоване насіння може висіватись у відповідності до звичайних методик вирощування і після самозапилення на таких рослинах формується насіння. Як варіант, подвійні гаплоїдні ростки можуть бути екстраговані з оброблених мікроспор або клітин пилку, щоб негайно одержати гомозиготні рослини, наприклад як описано у Coventry et al. (1988, Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Канада).

Додаткове насіння, яке утворюється як результат такого самозапилення в теперішньому або наступному поколінні, може бути зібране і піддане скринінгу на присутність мутантних алелів DELLA з використанням методів, що є звичайними в цій галузі, наприклад методів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (ампліфікація алелів DELLA) або методів на основі гібридизації, наприклад аналізу саузерн блот, скринінг бібліотеки BAC і т.п., або прямим секвенуванням алелів DELLA. Щоб здійснити скринінг на присутність точкових мутацій (так званих одиничних нуклеотидних поліморфізмів або SNP) в мутантних алелях DELLA, можна скористатись звичайними в цій галузі методами виявлення SNP, наприклад методами на основі оліголігації, методами, що базуються на видовженні ланцюга на одну основу, такими як піросеквенування, або методами на основі відмінностей в рестрикційних сайтах, таких як TILLING.

Ідентифіковані мутантні алелі потім можна піддати секвенуванню, а послідовності можна порівняти з алелем дикого типу, щоб ідентифікувати мутацію (мутації). Необов'язково, проводиться тестування того, або функціонує мутантний алель як мутантний алель DELLA, що індукує карликовість. Як вже зазначалось. За допомогою цього підходу можна ідентифікувати велику кількість мутантних алелів DELLA (і рослин, що містять один або більше з них). Бажані мутантні алелі можна потім перенести в інші рослини методами схрещування і селекції, як докладніше буде описано далі.

Мутантні алелі DELLA або рослини (або частини рослини), що містять мутантні алелі DELLA, можуть бути ідентифіковані або виявлені методом, відомим в цій галузі, таким як пряме секвенування, аналізи на основі ПЛР або аналізи, що базуються на гібридизації. Як варіант, можна також розробити методи з використанням запропонованої тут специфічної інформації про конкретні мутантні алелі DELLA. Такі альтернативні методи виявлення включають методи виявлення ампліфікації лінійних сигналів, які базуються на інвазивному розщепленні конкретних структур нуклеїнової кислоти і відомі також як технологія Invader™ (як описано, наприклад, в патентах США №№ 5,985,557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6,001,567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage, які включені сюди за посиланням), методи виявлення на основі ЗТ-ПЛР, такі як Taqman, або інші методи виявлення, такі як SNPlex.

Має бути зрозумілим, що мутантні алелі DELLA за цим винаходом можуть також використовуватись для створення трансгенних рослин. Наприклад, мутантний алель може бути перенесений в рослину або рослинну клітину будь-яким методом, відомим в цій галузі, таким як трансформація. Мутантний алель може бути використаний в комбінації зі своїм власним ендегенним промотором або може бути використаний в химерному гені, де він може бути функціонально зв'язаним з промотором, що експресується рослиною. Такий химерний ген може також містити додаткові регуляторні елементи, такі як інтрони, послідовності термінації транскрипції і поліаденілювання і т.п.

Інші види, різновиди, виведені лінії або дикі поповнення можуть бути піддані скринінгу на інші гени/алелі DELLA з такою самою або подібною нуклеотидною послідовністю або її варіантами, як вже описувалось. До того ж, зрозуміло, що нуклеотидні послідовності DELLA та їх варіанти (або фрагменти того або іншого) можуть ідентифікуватись *in silico*, шляхом скринінгу баз даних щодо нуклеотидних послідовностей у відношенні суттєво подібних послідовностей. Більш того, послідовність нуклеїнових кислот, кодуюча білок DELLA, може бути синтезована хімічним шляхом.

Даний винахід пропонує також мутантний білок карликовості DELLA, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID №: 1 і який відрізняється тим, що принаймні одну амінокислоту вказаної послідовності було модифіковано.

Отже, мутантні білки DELLA за цим винаходом містять одне або більше амінокислотних заміщень, вставок або делецій на ділянці, яка відповідає SEQ ID №: 1, що має своїм результатом білок, який, коли експресується в рослині, надає цій рослині карликовий фенотип.

Амінокислотні послідовності мутантних білків карликовості DELLA за цим винаходом або їх варіантів є амінокислотними послідовностями, що мають щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з послідовностями SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 7 або SEQ ID №: 9. Ці амінокислотні послідовності можуть називатись також "суттєво подібними" або "суттєво ідентичними" з послідовностями DELLA, наведеними в переліку послідовностей. В одному варіанті здійснення мутантні амінокислотні послідовності DELLA пропонуються в рослині (тобто, ендегенно). Поряд з ними, пропонуються виділені амінокислотні послідовності DELLA (наприклад, виділені з рослини або створені синтетичним шляхом), а також варіанти і фрагменти будь-якої з них.

В одному варіанті здійснення модифікація амінокислотної послідовності, представленої SEQ ID №: 1, може включати модифікацію амінокислоти Р (проліну). Амінокислота Р може бути заміщеною будь-якою іншою амінокислотою (амінокислотами) або може бути піддана делеції. В іншому варіанті здійснення амінокислота Р може бути модифікованою на L (лейцин).

5 Інші види, різновиди, виведені лінії або дикі поповнення можуть бути піддані скринінгу на інші білки DELLA з такими ж амінокислотними послідовностями або їх варіанти, як описувалось вище. Крім того, зрозуміло, що амінокислотні послідовності DELLA та їх варіанти (або фрагменти того або іншого) можуть ідентифікуватись *in silico*, шляхом скринінгу баз даних щодо амінокислотних послідовностей у відношенні суттєво подібних послідовностей.

10 В одному з варіантів здійснення цього винаходу пропонуються також рослинні клітини, що містять мутантні алелі і білки DELLA за цим винаходом. В об'єм даного винаходу включені також гамети, насіння, ембріони (зиготні або соматичні), потомство або гібриди рослин, що містять мутантні алелі DELLA за цим винаходом, які одержуються традиційними методами виведення.

15 Цей винахід пропонує також насіння Brassica, що містить мутантний алель *dwf2 RGA1*, як включене насіння, депоноване в NCIMB Limited 18 лютого 2010 року під номером доступу NCIMB 41697. Також пропонуються рослина Brassica або її клітина, частина, насіння або потомство, одержані з вищеописаного насіння, тобто які містять той самий мутантний алель *dwf2 RGA1*, що й депоноване насіння.

20 Даний винахід стосується також перенесення одного або більше конкретних мутантних алелів DELLA від однієї рослини до іншої рослини, рослин, що містять такі мутантні алелі DELLA, потомство, одержаного від таких рослин, а також рослинних клітин, частин рослини і насіння, одержаних від таких рослин.

25 Відповідно, в одному варіанті здійснення цього винаходу пропонується спосіб перенесення щонайменше одного виділеного мутантного алеля карликовості DELLA від однієї рослини до іншої рослини, який включає наступні етапи:

а. забезпечення першої рослини, яка містить щонайменше один мутантний алель DELLA, як описано вище, або створення першої рослини, як описано вище (де ця перша рослина є гомозиготною або гетерозиготною у відношенні одного мутантного алеля DELLA);

30 б. схрещування першої рослини, яка містить щонайменше один мутантний алель DELLA, з другою рослиною, що не містить щонайменше одного мутантного алеля DELLA, збирання з кросу насіння (де це насіння є гетерозиготним у відношенні мутантного алеля DELLA, коли перша рослина була гомозиготною у відношенні цього мутантного алеля DELLA, і де половина насіння є гетерозиготною, а половина – азиготною у відношенні мутантного алеля DELLA, тобто такою, що не містить його, коли перша рослина була гетерозиготною у відношенні цього мутантного алеля DELLA);

і необов'язково додаткові етапи:

с. ідентифікація рослин F1, що містять один або більше виділених мутантних алелів DELLA, як описано вище;

40 д. зворотне схрещування рослин F1, що містять принаймні один виділений мутантний алель карликовості DELLA, з другою рослиною, що не містить щонайменше одного виділеного мутантного алеля DELLA, впродовж одного або більше поколінь (х), збирання насіння BCх з кросів; і

45 е. ідентифікація в кожному поколінні рослин BCх, які містять щонайменше один виділений мутантний алель DELLA, як описано вище.

В іншому варіанті здійснення даний винахід пропонує спосіб одержання рослини, зокрема продуктивної рослини Brassica, такої як рослина Brassica napus, яка містить щонайменше один мутантний алель карликовості DELLA, але яка переважно зберігає агрономічно прийнятний розвиток, який включає перенесення алелів DELLA за цим винаходом в одну рослину, як описано вище.

50 В ще іншому варіанті здійснення цього винаходу пропонується спосіб одержання рослини, зокрема продуктивної рослини Brassica, такої як B. juncea, B. napus, B. rapa, B. carinata, B. oleracea і B. nigra, що є стійкою до полягання при збереженні агрономічно прийнятного розвитку, який включає перенесення алелів DELLA за цим винаходом в цю рослину, як описано вище.

55 Також пропонуються способи підвищення стійкості до полягання рослини та/або зменшення висоти рослини, які включають перенесення щонайменше одного мутантного алеля карликовості DELLA за цим винаходом в геномну ДНК вказаної рослини.

Даний винахід стосується також застосування мутантного алеля карликовості DELLA за цим винаходом для одержання рослини з підвищеною стійкістю до полягання, зокрема продуктивної рослини Brassica, такої як рослина Brassica napus.

60

Даний винахід стосується також застосування рослини, зокрема продуктивної рослини Brassica, такої як рослина Brassica napus, для одержання насіння, що містить щонайменше один мутантний алель карликовості DELLA, або для одержання агрокультури олійного рапсу, що містить щонайменше один мутантний алель карликовості DELLA.

5 Даний винахід додатково пропонує процес одержання карликових рослин Brassica та їх насіння, який включає етап схрещування рослини, що складається по суті з рослинних клітин, які містять варіантний алель за цим винаходом, з іншою рослиною або з самою собою, де цей процес додатково включає ідентифікацію або відбір рослин-потомків або насіння, що містять варіантний алель за цим винаходом, і збирання насіння. Ідентифікація бажаних рослин-потомків
10 може здійснюватись з використанням описаних тут молекулярних маркерів.

Також пропонується спосіб одержання олії або макухи з рослин Brassica, що містять варіантні алелі за цим винаходом, який включає етапи, відомі в цій галузі, для екстракції і обробки олії з насіння рослини олійного рапсу.

15 Даний винахід також пропонує процес для підвищення стійкості до полягання і відповідно одержання їх насіння, який включає етапи одержання рослин Brassica, що містять мутантний алель, як описано в цій заяві, і посіву вказаних рослин Brassica у полі.

Також пропонуються способи підвищення стійкості до полягання або кількості насіння, що збирається з рослин Brassica, які включають введення варіантного алеля, як його описано в цій заявці, в геном рослин Brassica.

20 Зрозуміло, що стійкість до полягання та/або вихід врожаю рослин за цим винаходом, зокрема рослин dwf2, можна далі поліпшити (через адитивний або синергічний ефект з алелем /білком карликовості DELLA) за рахунок обробки певними регуляторами росту рослин (PGR) або їх комбінаціями. Регулятором росту рослин може бути будь-яка сполука або суміш сполук, що здатна впливати на пророщування, ріст, дозрівання або розвиток рослин, плодів або потомства.
25 Регулятори росту рослин можна поділити на різні підкласи, як це здійснено далі:

- анти-ауксин, наприклад клофібрин [2-(4-хлорфенокси)-2-метилпропанова кислота] і 2,3,5-три-йод бензойна кислота;

- ауксин, наприклад 4-CPA (4-хлорфенокси оцтова кислота), 2,4-D (2,4-дихлорфенокси оцтова кислота), 2,4-DB [4-(2,4-дихлорфенокси) масляна кислота], 2,4-DEP {tris[2-(2,4-дихлорфенокси)етил] фосфіт}, дихлорпроп, фенопроп, IAA (β-індол оцтова кислота), IBA (4-індол-3-іл масляна кислота), нафталін ацетамід, α-нафталін оцтова кислота, 1-нафтол, нафтокси оцтова кислота, калію нафтенат, натрію нафтенат, 2,4,5-T [(2,4,5-трихлорфенокси) оцтова кислота];

- цитокін, наприклад 2iP [N-(3-метил бат-2-еніл)-1H-пурин-6-амін], бензиладенін, кінетин, зеатин;

- дефоліанти, наприклад кальцію ціанамід, диметіпін, ендотал, етефон, мерфос, метоксурон, пентахлорфенол, тидіазурон, трибуфос;

- інгібітори етилену, наприклад авіглїцин, авіглїцин-гідрохлорид, 1-метил циклопропен;

- генератори етилену, наприклад ACC (1-аміно циклопропан карбонова кислота), етацелазил, етефон, гліюксим;

- гібереліни, наприклад гібереліни A1, A4, A7, гіберелінові кислота (= гіберелін A3);

- інгібітори росту, наприклад абсцизова кислота, анцимідол, бутралін, карбарил, хлорфоній або відповідний хлорид, хлорпрофам, дікегулак, натрію дікегулак, флуметралін, флуоридамід, фосамін, гліфозин, ізопірімол, жасминова кислота, малеїнова кислота, гідразин або його калієва сіль, мепікват або відповідний хлорид, піпроктаніл або відповідний бромід, про-гідрожасмон, рorham, 2,3,5-три-йод бензойна кислота;

- морфактини, наприклад хлорфлурен, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, дихлорфлуренол, флуренол;

- сповільнювачі або модифікатори росту, наприклад хлормекват, хлормекват-хлорид, дамінозид, Флурпримідол, мефлуїдид, мефлуїдид-діоламін, паклобутразол, ципроконазол, тетциклаїс, уніконазол, уніконазол-P;

- стимулятори росту, наприклад бразиностероїди (наприклад, бразинолід), форхлорфенурон, гімексазол, 2-аміно-6-оксипурин-похідне, похідні індолінону, 3,4-дизаміщені похідні малеїміду і похідні азепінону;

- некласифіковані PGR, наприклад бензофлуор, бумінафос, карвон, ціобутид, клофенцет, калію клофенс, клоксифонак, натрію клоксифонак, цикланілід, циклогексимід, епохолеон, етихлосат, етилен, фенрідазон, гептопаргїл, голосульф, інабенфід, каретазан, свинцю арсенат, метасульфокарб, прогексадіон, кальцію прогексадіон, піданон, сінтофен, триапентенон, тринексапак і тринексапак-етил;

- та інші PGR, наприклад 2,6-диізопропилнафталін, клопроп, 1-нафтил етилефір оцтової кислоти, ізопротіолан, MCPB-етил [4-(4-хлор-о-толілокси) етил ефір масляної кислоти], N-ацетилтіазрлідін-4-карбонова кислота, n-деканол, пеларгонова кислота, N-фенілфталімінова кислота, текназен, триаконтанол, 2,3-дигідро-5,6-дифеніл-1,4-оксатин, 2-ціано-3-(2,4-дихлорфеніл)акрилова кислота, 2-гідразиноетанол, алорак, амідохлор, BTS 44584 [диметил(4-піперидинокарбонілокси-2,5-ксиліл)сульфоній-толуол-4-сульфонат], хлорамбен, хлорфлурен, хлорфлурен-метил, дікамба-метил, дихлорфлуренол, дихлорфлуренол-метил, димексано, етацелазил, гексафлуор ацетон-тригідрат, N-(2-етил-2Н-піразол-3-іл)-N'-фенілсечовина, N-m-толілфталамінова кислота, N-піролідіносукцин-амінова кислота, 3-tert-бутил фенокси оцтової кислоти пропиловий ефір, піданон, натрію (Z)-3-хлоракрилат.

Кращим вибором є хлормекват, хлормекват-хлорид, цикланлід, диметилів, етефон, флуметралін, флурпримідол, інабенфід, мепікват, мепікват хлорид, 1-метил циклопропен, панклобутразол, прогексадіон-кальцій, про-гідрожасмон, трибуфос, тридіазурон, тринексапак, тринексапак-етил або уніконазол.

Особливо доцільними в якості регуляторів росту рослин є тринексапак-етил, хлормекват-хлорид і панклобутразол для використання з рослинами за цим винаходом, зокрема рослинами dwf2.

Рослини за цим винаходом або їх насіння можуть оброблятися гербіцидами, такими як Клопіралід, Диклофоп, Флуазіфоп, Глүфосинат, Гліфосат, Метазахлор, Трифлуралін, Етаметсульфурон, Квінмерак, Квізалофоп, Клетодим, Тепралоксидим.

Рослини за цим винаходом або їх насіння можуть оброблятися також фунгіцидами, такими як Азоксистробін, Біксафен, Боскалід, Карбендазим, Ципроконазол, Дифеноконазол, Димоксистробін, Епоксиконазол, Флуазінам, Флуопірам, Флуокастробін, Флусілазол, Флуксапіроксад, Іпродіон, Ізопіразам, Мепікват-хлорид, Метконазол, Метоміностробін, Паклобутразол, Пентіопірад, Піоксистробін, Прохлораз, Протіоконазол, Піраклостробін, Тебуконазол, Тіофанат-метил, Трифлуксистробін, Вінклозолін.

Рослини за цим винаходом або їх насіння можуть оброблятися також інсектицидами, такими як Карбофуран, Тіаклоприд, Дельтаметрин, Імідаклоприд, Клотіанідин, Тіаметоксам, Ацетаміприд, Динетофуран, β-Цифлутрин, гамма і лямбда Цигалотрин, тау-Флувалеріат, Етипрол, Спіносад, Спіноторам, Флүбендіамід, Ринаксіпір, Ціазіпір, 4-[[6-Хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5Н)-он.

Даний винахід також стосується процесу нанесення гербіциду або інсектициду або фунгіциду, зокрема гербіциду або інсектициду або фунгіциду з вищенаведених переліків, на рослину або насіння рослини, що містить будь-який варіантний алель, як його описано в інших частинах цієї заявки.

Наступні приклади, що не є обмежувачими, описують характеристики рослин олійного рапсу, одержаних у відповідності до даного винаходу. Коли не вказується інше, всі молекулярні методи і методики на основі рекомбінантної ДНК здійснюються згідно стандартних протоколів, як описано в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY та в томах 1 і 2 книги Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, США. Стандартні матеріали і методи для молекулярної роботи з рослинами є описаними в роботі *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) by R.D.D. Croy, опублікованій BIOS Scientific Publications Ltd (Велика Британія) і Blackwell Scientific Publications, Велика Британія.

В описі і прикладах містяться посилання на наступні послідовності:

Послідовності

SEQ ID №: 1: Збережена консенсусна послідовність ділянки II на основі зіставлення амінокислотних послідовностей білків RGA1 B. napus, RGA1 B. rapa, RGA і GAI A. thaliana, D8 і D9 кукурудзи, SLR1 рису, Rht пшениці і SLN1 ячменю.

SEQ ID №: 2: Геномна ДНК /кодуюча послідовність гену RGA1 від Brassica napus.

SEQ ID №: 3: Амінокислотна послідовність білка RGA1 від Brassica napus.

SEQ ID №: 4: Геномна ДНК /кодуюча послідовність гену RGA1 від Brassica rapa.

SEQ ID №: 5: Амінокислотна послідовність білка RGA1 від Brassica rapa.

SEQ ID №: 6: Геномна ДНК /кодуюча послідовність гену RGA від Arabidopsis thaliana.

SEQ ID №: 7: Амінокислотна послідовність білка RGA від Arabidopsis thaliana.

SEQ ID №: 8: Геномна ДНК /кодуюча послідовність гену GAI від Arabidopsis thaliana.

SEQ ID №: 9: Амінокислотна послідовність білка GAI від Arabidopsis thaliana.

Приклади

Приклад 1: Одержання карликових рослин Brassica з використанням випадкового (неспецифічного) мутагенезу

Мутагенізовану популяцію *Brassica napus* було одержано наступним чином:

- 30000 насінин від елітної лінії весняного олійного рапсу (насіння M0) були піддані набуханню впродовж двох годин на вологому фільтрувальному папері в деіонізованій або дистильованій воді. Половину насіння обробили 0,8 % EMS, а половину – 1 % EMS (Sigma: M0880) та інкубували впродовж 4 годин.

- Мутагенізоване насіння (насіння M1) тричі промили і висушили під витяжкою впродовж ночі. 30000 рослин M1 були вирощені у ґрунті і самозапилені для одержання насіння M2. Насіння M2 було зібране з кожної індивідуальної рослини M1.

- 5000 рослин M2, одержаних від різних рослин M1, були вирощені і піддані аналізу на присутність рослин з карликовим фенотипом (тобто, зменшеної висоти).

- Карликові рослини були ідентифіковані в мутантній популяції з подібним фенотипом як рослини *B. napus*, у яких алель *Brrga1-d* був зворотно схрещеним, але дещо сильнішим (тобто, більш зменшеної висоти). Карликовий фенотип ідентифікованих рослин є напів-домінантним, тобто ці гетерозиготи демонструють проміжний карликовий фенотип у порівнянні з гомозиготними мутантами і сегрегантами дикого типу.

Приклад 2: Ідентифікація карликових мутантних алелів

- З ідентифікованих карликових рослин були приготовлені зразки ДНК з листяного матеріалу кожної індивідуальної рослини M2 за методикою CTAB (Doyle and Doyle, 1987, *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15).

- Щоб ідентифікувати геномну позицію мутацій EMS, зв'язаних з карликовим фенотипом, було здійснено аналіз генетичного картування BSA. Карликова мутація, названа *dwf2*, виявилась локалізованою на хромосомі N06, в 109.99 cM, що близько до повідомлюваної позиції (R6) гену *Brrga1* (Muangprom and Osborn., *Theor Appl Genet* 108, p 1378–1384, 2004; Muangprom et al., 2005 supra).

- Для підтвердження того, що RGA1 дійсно є причинним геном мутації *dwf2*, ген RGA1 мутанта *dwf2* було піддано скринінгу прямим секвенуванням з використанням стандартних методів секвенування (Agowa), і послідовності аналізувались у відношенні присутності точкових мутацій з використанням програмного забезпечення NovoSNP (VIB Antwerp).

- Було встановлено, що алель RGA1 мутанта *dwf2* містить мутацію C на T в позиції 272 геномної/кодуючої послідовності у порівнянні з послідовностями RGA1 дикого типу (SEQ ID №: 2), кодуючу амінокислотну послідовність, що включає заміщення Pro на Leu в позиції 91, у порівнянні з амінокислотною послідовністю RGA1 дикого типу (SEQ ID №: 3).

- Насіння, що містить алель *dwf2* (позначене 07MBBN000265), було депоновано в NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, AB21 9YA, Велика Британія) 18 лютого 2010 року, під номером доступу NCIMB 41697.

В якості висновку можна зазначити, що вищенаведені приклади показують, як можуть бути створені карликові рослини *Brassica* і як можуть бути ідентифіковані відповідні мутантні алелі. Крім того, рослинний матеріал, який містить такі мутантні алелі, може бути використаний для перенесення вибраних мутантних алелів в іншу рослину, як описано в наступних прикладах.

Приклад 3: Ідентифікація рослини *Brassica*, що містить мутантний алель RGA1

- Рослини *Brassica*, що містять мутацію в гені RGA1, ідентифіковану в Прикладах 1 і 2, були ідентифіковані наступним чином:

- Для кожного мутантного алеля RGA1, ідентифікованого в зразку ДНК рослини M2, було вирощено щонайменше 48 рослин M2, одержаних від тієї ж рослини M1, що й рослина M2, яка містить мутацію RGA1, і зі зразків листя були приготовлені зразки ДНК кожної індивідуальної рослини M2.

- Зразки ДНК були піддані скринінгу на присутність ідентифікованих точкових мутацій RGA1, як описано вище в Прикладі 2.

- Гетерозиготні і гомозиготні (як визначено на основі електроферограм) рослини M2, що містять одну й ту саму мутацію, були піддані самозапиленню і зворотному схрещуванню, після чого було зібране насіння BC1.

Приклад 4: Виявлення та/або перенесення мутантних алелів RGA1 в (елітні) лінії *Brassica*

- Ідентифікований мутант *dwf2* алеля RGA1 було перенесено в (елітну) селекційну лінію *Brassica napus* за наступною методикою: Рослину, що містить алель мутанта *dwf2* (донорська рослина), було схрещено з (елітною) лінією *Brassica* (елітний батько / рекурентний батько) або різновидом, у якого відсутній мутантний алель RGA1. Було використано наступну схему інтрогресії (+ = алель дикого типу, – = мутантний алель):

Початковий крос: - / - (донорська рослина) X + / + (елітний батько)

Рослина F1: + / -

Крос BC1: + / - X + / + (рекурентний батько)

Рослини BC1: 50 % +/- і 50 % +/+

Були відібрані 50 % +/-.

Крос BC2: +/- (рослина BC1) X +/+ (рекурентний батько)

Рослини BC2: 50 % +/- і 50 % +/+

5 Були відібрані 50 % +/-.

Зворотне схрещування повторюється, доки BC3 до BC5

Рослини BC3-5: 50 % +/- і 50 % +/+

Були відібрані 50 % +/-.

Крос BC3-5 S1: +/- X +/-

10 Рослини BC3-5 S1: 25 % +/+, 50 % +/- і 25 % -/-

Були відібрані індивідуальні рослини BC3-5 S1 або BC3-5 S2 +/+, +/- і -/- рослини.

Подібно до цього, мутантний алель RGA1 Brrga1-d B. rapa (Muangprom et al., 2005 supra) було перенесено в ту саму (елітну) селекційну лінію B. napus.

15 Для відбору рослин зі специфічним генотипом RGA1 (+/+, +/- або -/-) може бути використане пряме секвенування стандартними методами секвенування, відомими в цій галузі, такими як ті, що описані в Прикладі 2. Як варіант, такий відбір можна здійснити за допомогою молекулярних маркерів (наприклад, AFLP, PCR, Invader™, TaqMan® і т.п.) у відношенні мутантного алеля RGA1 і алеля RGA1 дикого типу.

Приклад 5: Оцінка мутантних фенотипів dwf2 і Brrga1

20 Рослини BC5-S2 Dwf2, одержані в Прикладі 4, були вирощені у полі в трьох місцях А, В і С в Бельгії і Канаді (по три ділянки в кожному місці) і потім проаналізовані у відношенні висоти, стійкості до полягання і виходу врожаю. Полягання оцінювалось за візуальною шкалою від 1 до 9, де бал 9 означає відсутність полягання (всі рослини прямостоячі), а бал 1 означає сильне полягання (всі рослини полегли). Більш того, вміст глюкозинолатів в шроті з насіння цих рослин, з якого видалена олія, визначався з використанням спектрофотометра NIRSystems 6500 для ближньої частини інфрачервоного діапазону від 1098 до 2492 нм. Усереднені результати представлені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Результати польових випробувань рослин BC5S2 dwf2

| | Бельгія | | | | | | | | | | | |
|----------|---------|-----|-----|-----------|-----|------|-------|------|------|---------------|------|------|
| | Висота | | | Полягання | | | Вихід | | | Глюкозинолати | | |
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| -/- | 65 | 63 | 64 | 9,0 | 9,0 | 9,0 | 2680 | 2707 | 2693 | 15,1 | 16,2 | 15,6 |
| +/- | 92 | 91 | 91 | 9,0 | 9,0 | 9,0 | 2645 | 2806 | 2725 | 15,2 | 16,0 | 15,6 |
| +/+ | 128 | 124 | 126 | 6,0 | 8,0 | 7,0 | 2673 | 2570 | 2622 | 14,3 | 16,1 | 15,2 |
| контроль | 131 | 123 | 127 | 5,5 | 7,5 | 6,5 | 2755 | 2654 | 2704 | 14,8 | 15,8 | 15,3 |
| CV | 5,0 | 3,0 | 4,0 | 16,8 | 6,6 | 13,7 | 21,0 | 6,0 | 15,0 | 4,8 | 4,3 | 4,5 |
| LSD | 6,0 | 4,0 | 4,0 | 1,6 | 0,7 | 0,9 | 730 | 214 | 335 | 0,9 | 0,9 | 0,6 |
| | Канада | | | | | | | | | | | |
| | Висота | | | Полягання | | | Вихід | | | Глюкозинолати | | |
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| -/- | 65 | 64 | 60 | nd | nd | nd | 2471 | 2384 | 4169 | 8,4 | 9,5 | nd |
| +/- | 91 | 84 | 73 | nd | nd | nd | 3132 | 3307 | 4083 | 9,3 | 10,9 | nd |
| +/+ | 101 | 105 | 105 | nd | nd | nd | 3103 | 3239 | 3659 | 11,0 | 13,5 | nd |
| контроль | 101 | 110 | 100 | nd | nd | nd | 2970 | 3306 | 3883 | 11,7 | 12,5 | nd |
| CV | 5,6 | 4,5 | 4,7 | - | - | - | 7,2 | 4,8 | 8,9 | 20,5 | 3,0 | - |
| LSD | 5,8 | 4,6 | 4,4 | - | - | - | 232 | 162 | 420 | 2,5 | 0,0 | - |

30 Висота: висота рослини в кінці цвітіння (см); Полягання: полягання при дозріванні (1 = полегло, 9 = прямостояче); Вихід: вихід насіння на ділянку (г); Глюкозинолати: загальний вміст глюкозинолатів в сухому насінні; CV: коефіцієнт варіації; LSD: найменша суттєва відстань ($p < 0,05$); nd: не визначалось.

35 Можна бачити, що алель dwf2 впливав на висоту рослини дозо-залежним чином, дозволяючи легко провести розмежування між рослинами різних генотипів (-/-, +/- та +/+). З іншого боку, полягання зменшилось однаково у гомозиготних і гетерозиготних рослин dwf2, засвідчуючи, що одного алеля dwf2 вже достатньо, щоб одержати рослини з підвищеною стійкістю до полягання. Більше того, суттєвої різниці (тобто, зменшення) не спостерігалось у

відношенні виходу врожаю між гомозиготними і гетерозиготними мутантами, з одного боку, та сегрегантами дикого типу і елітним контролем, з іншого. Вміст глюкозинолатів в насінні завжди був нижчим ніж 30 мікромолів на грам, що є граничним значенням для канолі.

Отже, на відміну від раніше ідентифікованих алелів *brrga1-d* і *bzh*, які асоціюються зі зниженим виходом врожаю в інбредних лініях (Muangprom et al., 2006 supra) і гібридах ("Avenir"), навіть в гомозиготній формі в інбредних лініях, даний алель *dwf2* вже працює так само добре у відношенні виходу врожаю, як і елітна контрольна лінія. Очікується, що вихід насіння ще більше зросте в гібридних кросах з алелем *dwf2*.

Щоб оцінити вплив фону В. гара на склад насіннєвої олії в зворотних схрещуваннях з алелем *brrga1-d*, насіння від різних зворотних схрещувань *brrga1* і *dwf2* з Прикладу 4 висіяли в теплиці і насіння, одержане від рослин, вирощених з цього насіння, аналізували на вміст глюкозинолатів (Таблиця 3).

Таблиця 3

Вміст глюкозинолатів в насіннєвій олії
гомозиготних рослин *brrga1-d* BC5S2 і *dwf2* BC2S3 (-/-) та сегрегантів дикого типу (+/+),
а також індивідуального потомства (25 % +/+, 50 % +/-, 25 % -/-) рослин *brrga1-d* BC9 (+/-)

| алель | зворотне схрещування | генотип | глюкозинолати |
|-----------------|----------------------|---------------------------------|---------------|
| <i>brrga1-d</i> | BC5S2 | -/- | 36,1 |
| | | +/+ | 36,4 |
| <i>dwf2</i> | BC2S3 | -/- | 19,3 |
| | | +/+ | 17,9 |
| <i>brrga1-d</i> | BC9 | 25 % -/ 50 % +/- 25 % +/+ | 30,1 |
| | | | 21,9 |
| | | | 14,3 |
| | | | 30,2 |
| | | | 25,9 |
| | | | 20,8 |
| | | | 22,1 |

Ці результати демонструють, що вже в ранніх зворотних схрещуваннях мутанти *dwf2* мають значно більш сприятливий вміст глюкозинолатів у насіннєвій олії, ніж мутанти *brrga1-d* в більш просунутих зворотних схрещуваннях. Високий вміст глюкозинолатів у насіннєвій олії мутантів BC5S2 *brrga1-d*, а також сегрегантів дикого типу свідчить про те, що фенотип з високим вмістом глюкозинолатів походить від фону гара. Більш просунуте зворотне схрещування BC9 показує, що високий вміст глюкозинолатів все ще залишається у більшій частини потомства (яке, можливо, містить алель *brrga1-d*, тобто у рослин -/- і +/-), вказуючи на те, що ця ознака все ще тісно пов'язана з алелем *brrga1-d* і що ймовірно буде неможливо розділити локуси *brrga1-d* і глюкозинолату навіть в подальших зворотних схрещуваннях.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БАЙЕР БІОСАЄНС Н.В.
БОТС, Марк
ЛАГА, Бенджамін
ДЕН БОЕР, Барт

<120> РОСЛИНИ BRASSICA ЗІ ЗМІНЕНОЮ АРХІТЕКТУРОЮ
<130> BCS 10-2003

<160> 9

<170> Патент у версії 3.3

<210> 1
<211> 12
<212> ПЗТ
<213> Штучна

<220>
<223> консенсусна послідовність

<220>
<221> Asp або Glu
<222> (4)..(4)

<220>
<221> Ala або Ser або Thr
<222> (11)..(11)

<220>
<221> Glu або Asp
<222> (12)..(12)

<400> 1

Leu Ala Thr Xaa Thr Val His Tyr Asn Pro Xaa Xaa
1 5 10

<210> 2
<211> 1719
<212> ДНК
<213> Brassica napus

<220>
<221> КП
<222> (1)..(1719)

<220>
<221> варіація
<222> (271)..(273)
<223> Pro на Leu в dwf2

<220>
<221> варіація
<222> (272)..(272)
<223> C на T в dwf2

<400> 2
atg aag agg gat ctt cat cag ttc caa ggt ccc aac cac ggg aca tca
Met Lys Arg Asp Leu His Gln Phe Gln Gly Pro Asn His Gly Thr Ser

48

| 1 | 5 | 10 | 15 | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| atc gcc ggt tct tcc act tct tcc cct gcg gtg ttt ggt aaa gac aag | | | | 96 |
| Ile Ala Gly Ser Ser Thr Ser Ser Pro Ala Val Phe Gly Lys Asp Lys | 20 | 25 | 30 | |
| atg atg atg gtc aaa gaa gaa gaa gac gac gag ctt cta gga gtc ttg | | | | 144 |
| Met Met Met Val Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Leu Leu Gly Val Leu | 35 | 40 | 45 | |
| ggt tac aag gtt agg tct tct gag atg gct gag gtt gcg ttg aaa ctc | | | | 192 |
| Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Glu Val Ala Leu Lys Leu | 50 | 55 | 60 | |
| gag cag ctt gag acg atg atg ggt aac gct caa gaa gac ggt tta gct | | | | 240 |
| Glu Gln Leu Glu Thr Met Met Gly Asn Ala Gln Glu Asp Gly Leu Ala | 65 | 70 | 75 | 80 |
| cac ctc gcg acg gat act gtt cat tac aac ccc gct gag ctt tac tcg | | | | 288 |
| His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro Ala Glu Leu Tyr Ser | 85 | 90 | 95 | |
| tgg ctt gat aac atg ctc acg gag ctt aac cca ccc gct gca acg acc | | | | 336 |
| Trp Leu Asp Asn Met Leu Thr Glu Leu Asn Pro Pro Ala Ala Thr Thr | 100 | 105 | 110 | |
| gga tct aac gct ttg aac ccg gag att aat aat aat aat aat aac tcg | | | | 384 |
| Gly Ser Asn Ala Leu Asn Pro Glu Ile Asn Asn Asn Asn Asn Ser | 115 | 120 | 125 | |
| ttt ttc acc gga ggc gac ctc aaa gcg att cct gga aac gcg gtt tgt | | | | 432 |
| Phe Phe Thr Gly Gly Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asn Ala Val Cys | 130 | 135 | 140 | |
| cgc aga tct aat cag ttc gcg ttt gcg gtt gat tcg tcg agt aat aag | | | | 480 |
| Arg Arg Ser Asn Gln Phe Ala Phe Ala Val Asp Ser Ser Ser Asn Lys | 145 | 150 | 155 | 160 |
| cgt ttg aaa ccg tcc tcg agc cct gat tcg atg gtt aca tct cca tca | | | | 528 |
| Arg Leu Lys Pro Ser Ser Ser Pro Asp Ser Met Val Thr Ser Pro Ser | 165 | 170 | 175 | |
| cct gct gga gtt ata gga acg acg gtt aca acc gtg acc gag tca act | | | | 576 |
| Pro Ala Gly Val Ile Gly Thr Thr Val Thr Thr Val Thr Glu Ser Thr | 180 | 185 | 190 | |
| cgt cct tta atc ctg gtc gac tcg cag gac aac gga gtg cgt cta gtc | | | | 624 |
| Arg Pro Leu Ile Leu Val Asp Ser Gln Asp Asn Gly Val Arg Leu Val | 195 | 200 | 205 | |
| cac gcg ctt atg gcc tgc gct gaa gcc gtg cag agc agc aac ttg act | | | | 672 |
| His Ala Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Ser Ser Asn Leu Thr | 210 | 215 | 220 | |
| cta gcg gag gct ctc gtt aag cag att ggt ttc ttg gcc gtc tct caa | | | | 720 |
| Leu Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser Gln | 225 | 230 | 235 | 240 |
| gcc gga gcc atg agg aaa gtc gcc acg tac ttc gcc gaa gct ctc gcg | | | | 768 |
| Ala Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala | 245 | 250 | 255 | |
| cgg agg atc tac cgc ctc tct ccg ccg cag acg cag atc gat cac tct | | | | 816 |
| Arg Arg Ile Tyr Arg Leu Ser Pro Pro Gln Thr Gln Ile Asp His Ser | | | | |

| 260 | 265 | 270 | |
|---|-----|-----|------|
| tta tcc gat act ctc cag atg cac ttc tac gag act tgc cct tac ctc Leu Ser Asp Thr Leu Gln Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu 275 280 285 | | | 864 |
| aag ttc gct cac ttc acg gcg aat cag gcg att ctc gag gct ttc gaa Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Glu 290 295 300 | | | 912 |
| ggg aag aag aga gtc cac gtc atc gat ttc tcg atg aac caa ggg ctt Gly Lys Lys Arg Val His Val Ile Asp Phe Ser Met Asn Gln Gly Leu 305 310 315 320 | | | 960 |
| cag tgg ccc gcg ctt atg caa gcc ctt gcg ttg agg gaa gga ggt cct Gln Trp Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Glu Gly Gly Pro 325 330 335 | | | 1008 |
| ccg agt ttc agg tta acc gga att ggt cct ccc gcg gcg gat aac tcc Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly Ile Gly Pro Pro Ala Ala Asp Asn Ser 340 345 350 | | | 1056 |
| gat cat ctc cat gaa gtt gga tgt aag ttg gct cag ctc gcg gag gcg Asp His Leu His Glu Val Gly Cys Lys Leu Ala Gln Leu Ala Glu Ala 355 360 365 | | | 1104 |
| att cac gtc gag ttt gag tat cgt ggc ttt gtt gct aat agc tta gct Ile His Val Glu Phe Glu Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Ser Leu Ala 370 375 380 | | | 1152 |
| gat ctt gat gcc tcg atg ctt gag ctt aga ccg agt gaa acc gaa gct Asp Leu Asp Ala Ser Met Leu Glu Leu Arg Pro Ser Glu Thr Glu Ala 385 390 395 400 | | | 1200 |
| gtg gcg gtt aac tct gtt ttc gag ctc cac aag ctc cta ggc cgt acc Val Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg Thr 405 410 415 | | | 1248 |
| ggt ggg ata gag aaa gtc ttc ggc gtt gtg aaa cag att aaa ccg gtg Gly Gly Ile Glu Lys Val Phe Gly Val Val Lys Gln Ile Lys Pro Val 420 425 430 | | | 1296 |
| att ttc acg gtt gtt gag caa gaa tcg aat cat aac ggt ccg gtt ttc Ile Phe Thr Val Val Glu Gln Glu Ser Asn His Asn Gly Pro Val Phe 435 440 445 | | | 1344 |
| tta gac cgg ttt act gaa tcg ctg cat tat tat tcg acg ttg ttt gat Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp 450 455 460 | | | 1392 |
| tcc ttg gaa ggt gct ccg agt agc caa gat aaa gtt atg tcg gaa gtt Ser Leu Glu Gly Ala Pro Ser Ser Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val 465 470 475 480 | | | 1440 |
| tat tta ggg aaa cag att tgc aat ctg gtg gct tgc gaa ggt ccg gac Tyr Leu Gly Lys Gln Ile Cys Asn Leu Val Ala Cys Glu Gly Pro Asp 485 490 495 | | | 1488 |
| cgt gtt gag aga cat gag acg ctg agt caa tgg tcg aac ccg ttc ggt Arg Val Glu Arg His Glu Thr Leu Ser Gln Trp Ser Asn Arg Phe Gly 500 505 510 | | | 1536 |
| tcg tcc ggt ttt gcg ccg gcg cat ctc ggg tct aac gcg ttt aag caa Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala His Leu Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln | | | 1584 |


```

515          520          525
gcg agt acg ctt ttg gct ttg ttt aat gga ggc gaa ggt tat cgt gtg 1632
Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg Val
530          535          540

gag gag aat aat ggg tgt ttg atg ttg agt tgg cac act cga ccg ctc 1680
Glu Glu Asn Asn Gly Cys Leu Met Leu Ser Trp His Thr Arg Pro Leu
545          550          555          560

ata acc acc tcc gct tgg aag ctc tcg gcg gtg cac tga 1719
Ile Thr Thr Ser Ala Trp Lys Leu Ser Ala Val His
565          570

<210> 3
<211> 572
<212> IIIT
<213> Brassica napus

<400> 3

Met Lys Arg Asp Leu His Gln Phe Gln Gly Pro Asn His Gly Thr Ser
1          5          10          15

Ile Ala Gly Ser Ser Thr Ser Ser Pro Ala Val Phe Gly Lys Asp Lys
20          25          30

Met Met Met Val Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Leu Leu Gly Val Leu
35          40          45

Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Glu Val Ala Leu Lys Leu
50          55          60

Glu Gln Leu Glu Thr Met Met Gly Asn Ala Gln Glu Asp Gly Leu Ala
65          70          75          80

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

Trp Leu Asp Asn Met Leu Thr Glu Leu Asn Pro Pro Ala Ala Thr Thr
100          105          110

Gly Ser Asn Ala Leu Asn Pro Glu Ile Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser
115          120          125

Phe Phe Thr Gly Gly Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asn Ala Val Cys
130          135          140

Arg Arg Ser Asn Gln Phe Ala Phe Ala Val Asp Ser Ser Ser Asn Lys
145          150          155          160

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

```


Pro Ala Gly Val Ile Gly Thr Thr Val Thr Thr Val Thr Glu Ser Thr
180 185 190

Arg Pro Leu Ile Leu Val Asp Ser Gln Asp Asn Gly Val Arg Leu Val
195 200 205

His Ala Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Ser Ser Asn Leu Thr
210 215 220

Leu Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser Gln
225 230 235 240

Ala Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala
245 250 255

Arg Arg Ile Tyr Arg Leu Ser Pro Pro Gln Thr Gln Ile Asp His Ser
260 265 270

Leu Ser Asp Thr Leu Gln Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu
275 280 285

Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Glu
290 295 300

Gly Lys Lys Arg Val His Val Ile Asp Phe Ser Met Asn Gln Gly Leu
305 310 315 320

Gln Trp Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Glu Gly Gly Pro
325 330 335

Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly Ile Gly Pro Pro Ala Ala Asp Asn Ser
340 345 350

Asp His Leu His Glu Val Gly Cys Lys Leu Ala Gln Leu Ala Glu Ala
355 360 365

Ile His Val Glu Phe Glu Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Ser Leu Ala
370 375 380

Asp Leu Asp Ala Ser Met Leu Glu Leu Arg Pro Ser Glu Thr Glu Ala
385 390 395 400

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

Gly Gly Ile Glu Lys Val Phe Gly Val Val Lys Gln Ile Lys Pro Val
420 425 430

Ile Phe Thr Val Val Glu Gln Glu Ser Asn His Asn Gly Pro Val Phe
435 440 445

Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp
450 455 460

Ser Leu Glu Gly Ala Pro Ser Ser Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val
465 470 475 480

Tyr Leu Gly Lys Gln Ile Cys Asn Leu Val Ala Cys Glu Gly Pro Asp
485 490 495

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

Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala His Leu Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln
515 520 525

Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg Val
530 535 540

Glu Glu Asn Asn Gly Cys Leu Met Leu Ser Trp His Thr Arg Pro Leu
545 550 555 560

Ile Thr Thr Ser Ala Trp Lys Leu Ser Ala Val His
565 570

<210> 4
<211> 1722
<212> ДНК
<213> Brassica rapa

<220>
<221> КП
<222> (1)..(1722)

<400> 4
atg aag agg gat ctt cat cag ttc caa ggt ccc aac cac ggg aca tca 48
Met Lys Arg Asp Leu His Gln Phe Gln Gly Pro Asn His Gly Thr Ser
1 5 10 15

atc gcc ggt tct tcc act tct tcc cct gcg gtg ttt ggt aaa gac aag 96
Ile Ala Gly Ser Ser Thr Ser Ser Pro Ala Val Phe Gly Lys Asp Lys
20 25 30

atg atg atg gtt aag gaa gaa gaa gac gac gag ctt cta gga gtc ttg 144
Met Met Met Val Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Leu Leu Gly Val Leu
35 40 45

ggt tac aag gtt agg tct tcg gag atg gct gag gtt gcg ttg aaa ctc 192
Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Glu Val Ala Leu Lys Leu
50 55 60

| | |
|---|-----|
| gag cag ctt gag acg atg atg ggt aac gct caa gaa gac ggt tta gct Glu Gln Leu Glu Thr Met Met Gly Asn Ala Gln Glu Asp Gly Leu Ala 65 70 75 80 | 240 |
| cac ctc gcg acg gat act gtt cat tac aac ccc gct gag ctt tac tcg His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro Ala Glu Leu Tyr Ser 85 90 95 | 288 |
| tgg ctt gat aac atg ctc acg gag ctt aac cca ccc gct gca acg acc Trp Leu Asp Asn Met Leu Thr Glu Leu Asn Pro Pro Ala Ala Thr Thr 100 105 110 | 336 |
| ggg tct aac gct ttg aac ccg gag att aat aat aat aat aat aat aac Gly Ser Asn Ala Leu Asn Pro Glu Ile Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn 115 120 125 | 384 |
| tcg ttt ttc acc gga ggc gac ctc aaa gcg att cct gga aac gcg gtt Ser Phe Phe Thr Gly Gly Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asn Ala Val 130 135 140 | 432 |
| tgt cgc aga tct aat cag ttc gcg ttt gcg gtt gat tcg tcg agt aat Cys Arg Arg Ser Asn Gln Phe Ala Phe Ala Val Asp Ser Ser Ser Asn 145 150 155 160 | 480 |
| aag cgt ttg aaa ccg tcc tcg agc cct gat tcg atg gtt aca tct cca Lys Arg Leu Lys Pro Ser Ser Ser Pro Asp Ser Met Val Thr Ser Pro 165 170 175 | 528 |
| tca cct gct gga gtt ata gga acg acg gtt aca acc gtg acc gag tca Ser Pro Ala Gly Val Ile Gly Thr Thr Val Thr Val Thr Glu Ser 180 185 190 | 576 |
| act cgt cct tta atc ctg gtc gac tcg cag gac aac gga gtg cgt cta Thr Arg Pro Leu Ile Leu Val Asp Ser Gln Asp Asn Gly Val Arg Leu 195 200 205 | 624 |
| gtc cac gcg ctt atg gcc tgc gct gaa gcc gtg cag agc agc aac ttg Val His Ala Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Ser Ser Asn Leu 210 215 220 | 672 |
| act cta gcg gag gct ctc gtt aag cag att ggt ttc tta gcc gtc tct Thr Leu Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser 225 230 235 240 | 720 |
| caa gcc gga gcc atg agg aaa gtc gcc acg tac ttc gcc gaa gct ctc Gln Ala Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu 245 250 255 | 768 |
| gcg cgg cgg atc tac cgc ctc tct ccg ccg cag acg cag atc gat cac Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Leu Ser Pro Pro Gln Thr Gln Ile Asp His 260 265 270 | 816 |
| tct cta tcc gat act ctc cag atg cac ttc tac gag act tgc cct tac Ser Leu Ser Asp Thr Leu Gln Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr 275 280 285 | 864 |
| ctc aag ttc gct cac ttc acg gcg aat cag gcc atc ctc gag gct ttc Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe 290 295 300 | 912 |
| gaa ggg aag aag aga gtc cac gtc atc gat ttc tcg atg aac caa ggg Glu Gly Lys Lys Arg Val His Val Ile Asp Phe Ser Met Asn Gln Gly 305 310 315 320 | 960 |

| | |
|---|------|
| ctt cag tgg ccc gcg ctt atg caa gcc ctc gcg ttg agg gaa gga ggt Leu Gln Trp Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Glu Gly Gly 325 330 335 | 1008 |
| cct ccg agt ttc agg tta acc gga atc ggt cct ccc gcg gcg gat aac Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly Ile Gly Pro Pro Ala Ala Asp Asn 340 345 350 | 1056 |
| tcc gat cat ctc cac gaa gtt gga tgt aag ttg gct cag ctc gcg gag Ser Asp His Leu His Glu Val Gly Cys Lys Leu Ala Gln Leu Ala Glu 355 360 365 | 1104 |
| gcg att cac gtc gag ttt gag tat cgt gcc ttt gtt gct aat agc tta Ala Ile His Val Glu Phe Glu Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Ser Leu 370 375 380 | 1152 |
| gct gat ctt gat gct tcg atg ctt gag ctt aga ccg agt gaa acc gaa Ala Asp Leu Asp Ala Ser Met Leu Glu Leu Arg Pro Ser Glu Thr Glu 385 390 395 400 | 1200 |
| gct gtg gcg gtt aac tct gtt ttc gag ctt cac aag ctt cta ggc cgt Ala Val Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg 405 410 415 | 1248 |
| acc ggt ggg ata gag aaa gtc ttc gcc gtt gtg aaa cag att aaa ccg Thr Gly Gly Ile Glu Lys Val Phe Gly Val Val Lys Gln Ile Lys Pro 420 425 430 | 1296 |
| gtg att ttc acg gtt gtt gag caa gaa tcg aat cat aac ggt ccg gtt Val Ile Phe Thr Val Val Glu Gln Glu Ser Asn His Asn Gly Pro Val 435 440 445 | 1344 |
| ttc tta gac ccg ttt act gaa tcg ctg cat tat tat tcg acg ttg ttt Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe 450 455 460 | 1392 |
| gat tcc ttg gaa ggt gct ccg agt agc caa gat aaa gtc atg tcg gaa Asp Ser Leu Glu Gly Ala Pro Ser Ser Gln Asp Lys Val Met Ser Glu 465 470 475 480 | 1440 |
| gtt tac tta ggg aaa cag att tgc aat ctg gtg gct tgc gaa ggt ccg Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile Cys Asn Leu Val Ala Cys Glu Gly Pro 485 490 495 | 1488 |
| gac cgt gtt gag aga cac gag acg ctg agt cag tgg tcg aac ccg ttc Asp Arg Val Glu Arg His Glu Thr Leu Ser Gln Trp Ser Asn Arg Phe 500 505 510 | 1536 |
| ggt tcg tcc ggt ttt gcg ccg gcg cat ctc ggg tct aac gcg ttt aag Gly Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala His Leu Gly Ser Asn Ala Phe Lys 515 520 525 | 1584 |
| caa gcg agt acg ctt ttg gct ttg ttt aat gga gcc gaa ggt tat cgt Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg 530 535 540 | 1632 |
| gtg gag gag aat aat ggg tgt ttg atg ttg agt tgg cac act cga ccg Val Glu Glu Asn Asn Gly Cys Leu Met Leu Ser Trp His Thr Arg Pro 545 550 555 560 | 1680 |
| ctc ata acc acc tcc gct tgg aag ctc tcg gct gtg cac tga Leu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Lys Leu Ser Ala Val His 565 570 | 1722 |

<210> 5
 <211> 573
 <212> M3T
 <213> Brassica rapa

 <400> 5

 Met Lys Arg Asp Leu His Gln Phe Gln Gly Pro Asn His Gly Thr Ser
 1 5 10 15

 Ile Ala Gly Ser Ser Thr Ser Ser Pro Ala Val Phe Gly Lys Asp Lys
 20 25 30

 Met Met Met Val Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Leu Leu Gly Val Leu
 35 40 45

 Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Glu Val Ala Leu Lys Leu
 50 55 60

 Glu Gln Leu Glu Thr Met Met Gly Asn Ala Gln Glu Asp Gly Leu Ala
 65 70 75 80

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

 Trp Leu Asp Asn Met Leu Thr Glu Leu Asn Pro Pro Ala Ala Thr Thr
 100 105 110

 Gly Ser Asn Ala Leu Asn Pro Glu Ile Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn
 115 120 125

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

 Cys Arg Arg Ser Asn Gln Phe Ala Phe Ala Val Asp Ser Ser Ser Asn
 145 150 155 160

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

 Ser Pro Ala Gly Val Ile Gly Thr Thr Val Thr Thr Val Thr Glu Ser
 180 185 190

 Thr Arg Pro Leu Ile Leu Val Asp Ser Gln Asp Asn Gly Val Arg Leu
 195 200 205

 Val His Ala Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Ser Ser Asn Leu
 210 215 220


```

Thr Leu Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser
225                230                235                240

Gln Ala Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu
                245                250                255

Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Leu Ser Pro Pro Gln Thr Gln Ile Asp His
                260                265                270

Ser Leu Ser Asp Thr Leu Gln Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr
                275                280                285

Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe
290                295                300

Glu Gly Lys Lys Arg Val His Val Ile Asp Phe Ser Met Asn Gln Gly
305                310                315                320

Leu Gln Trp Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Glu Gly Gly
                325                330                335

Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly Ile Gly Pro Pro Ala Ala Asp Asn
                340                345                350

Ser Asp His Leu His Glu Val Gly Cys Lys Leu Ala Gln Leu Ala Glu
355                360                365

Ala Ile His Val Glu Phe Glu Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Ser Leu
370                375                380

Ala Asp Leu Asp Ala Ser Met Leu Glu Leu Arg Pro Ser Glu Thr Glu
385                390                395                400

Ala Val Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg
                405                410                415

Thr Gly Gly Ile Glu Lys Val Phe Gly Val Val Lys Gln Ile Lys Pro
                420                425                430

Val Ile Phe Thr Val Val Glu Gln Glu Ser Asn His Asn Gly Pro Val
                435                440                445

Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe
450                455                460

Asp Ser Leu Glu Gly Ala Pro Ser Ser Gln Asp Lys Val Met Ser Glu
465                470                475                480

```


Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile Cys Asn Leu Val Ala Cys Glu Gly Pro
485 490 495

Asp Arg Val Glu Arg His Glu Thr Leu Ser Gln Trp Ser Asn Arg Phe
500 505 510

Gly Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala His Leu Gly Ser Asn Ala Phe Lys
515 520 525

Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg
530 535 540

Val Glu Glu Asn Asn Gly Cys Leu Met Leu Ser Trp His Thr Arg Pro
545 550 555 560

Leu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Lys Leu Ser Ala Val His
565 570

<210> 6
<211> 1764
<212> ДНК
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> КΠ
<222> (1)..(1764)

<400> 6
atg aag aga gat cat cac caa ttc caa ggt cga ttg tcc aac cac ggg 48
Met Lys Arg Asp His His Gln Phe Gln Gly Arg Leu Ser Asn His Gly
1 5 10 15
act tct tct tca tca tca tca atc tct aaa gat aag atg atg atg gtg 96
Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ile Ser Lys Asp Lys Met Met Met Val
20 25 30
aaa aaa gaa gaa gac ggt gga ggt aac atg gac gac gag ctt ctc gct 144
Lys Lys Glu Glu Asp Gly Gly Gly Asn Met Asp Asp Glu Leu Leu Ala
35 40 45
gtt tta ggt tac aaa gtt agg tca tcg gag atg gcg gag gtt gct ttg 192
Val Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Glu Val Ala Leu
50 55 60
aaa ctc gaa caa tta gag acg atg atg agt aat gtt caa gaa gat ggt 240
Lys Leu Glu Gln Leu Glu Thr Met Met Ser Asn Val Gln Glu Asp Gly
65 70 75 80
tta tct cat ctc gcg acg gat act gtt cat tat aat ccg tcg gag ctt 288
Leu Ser His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro Ser Glu Leu
85 90 95
tat tct tgg ctt gat aat atg ctc tct gag ctt aat cct cct cct ctt 336
Tyr Ser Trp Leu Asp Asn Met Leu Ser Glu Leu Asn Pro Pro Pro Leu
100 105 110

| | |
|---|------|
| ccg gcg agt tct aac ggt tta gat ccg gtt ctt cct tcg ccg gag att Pro Ala Ser Ser Asn Gly Leu Asp Pro Val Leu Pro Ser Pro Glu Ile 115 120 125 | 384 |
| tgt ggt ttt ccg gct tcg gat tat gac ctt aaa gtc att ccc gga aac Cys Gly Phe Pro Ala Ser Asp Tyr Asp Leu Lys Val Ile Pro Gly Asn 130 135 140 | 432 |
| gcg att tat cag ttt ccg gcg att gat tct tcg tct tcg tcg aat aat Ala Ile Tyr Gln Phe Pro Ala Ile Asp Ser Ser Ser Ser Asn Asn 145 150 155 160 | 480 |
| cag aac aag cgt ttg aaa tca tgc tcg agt cct gat tct atg gtt aca Gln Asn Lys Arg Leu Lys Ser Cys Ser Ser Pro Asp Ser Met Val Thr 165 170 175 | 528 |
| tcg act tcg acg ggt acg cag att ggt gga gtc ata gga acg acg gtg Ser Thr Ser Thr Gly Thr Gln Ile Gly Gly Val Ile Gly Thr Thr Val 180 185 190 | 576 |
| acg aca acc acc acg aca acg acg gcg gcg ggt gag tca act cgt tct Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Gly Glu Ser Thr Arg Ser 195 200 205 | 624 |
| gtt atc ctg gtt gac tcg caa gag aac ggt gtt cgt tta gtc cac gcg Val Ile Leu Val Asp Ser Gln Glu Asn Gly Val Arg Leu Val His Ala 210 215 220 | 672 |
| ctt atg gct tgt gca gaa gca atc cag cag aac aat ttg act cta gcg Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Ile Gln Gln Asn Asn Leu Thr Leu Ala 225 230 235 240 | 720 |
| gaa gct ctt gtg aag caa atc gga tgc tta gct gtg tct caa gcc gga Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Cys Leu Ala Val Ser Gln Ala Gly 245 250 255 | 768 |
| gct atg aga aaa gtg gct act tac ttc gcc gaa gct tta gcg cgg cgg Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg 260 265 270 | 816 |
| atc tac cgt ctc tct ccg ccg cag aat cag atc gat cat tgt ctc tcc Ile Tyr Arg Leu Ser Pro Pro Gln Asn Gln Ile Asp His Cys Leu Ser 275 280 285 | 864 |
| gat act ctt cag atg cac ttt tac gag act tgt cct tat ctt aaa ttc Asp Thr Leu Gln Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe 290 295 300 | 912 |
| gct cac ttc acg gcg aac caa gcg att ctc gaa gct ttt gaa ggt aag Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Glu Gly Lys 305 310 315 320 | 960 |
| aag aga gta cac gtc att gat ttc tcg atg aac caa ggt ctt caa tgg Lys Arg Val His Val Ile Asp Phe Ser Met Asn Gln Gly Leu Gln Trp 325 330 335 | 1008 |
| cct gca ctt atg caa gct ctt gcg ctt cga gaa gga ggt cct cca act Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Glu Gly Gly Pro Pro Thr 340 345 350 | 1056 |
| ttc cgg tta acc gga att ggt cca ccg gcg ccg gat aat tct gat cat Phe Arg Leu Thr Gly Ile Gly Pro Pro Ala Pro Asp Asn Ser Asp His 355 360 365 | 1104 |

| | |
|---|------|
| ctt cat gaa gtt ggt tgt aaa tta gct cag ctt gcg gag gcg att cac Leu His Glu Val Gly Cys Lys Leu Ala Gln Leu Ala Glu Ala Ile His 370 375 380 | 1152 |
| gta gaa ttc gaa tac cgt gga ttc gtt gct aac agc tta gcc gat ctc Val Glu Phe Glu Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Ser Leu Ala Asp Leu 385 390 395 400 | 1200 |
| gat gct tcg atg ctt gag ctt aga ccg agc gat acg gaa gct gtt gcg Asp Ala Ser Met Leu Glu Leu Arg Pro Ser Asp Thr Glu Ala Val Ala 405 410 415 | 1248 |
| gtg aac tct gtt ttt gag cta cat aag ctc tta ggt cgt ccc ggt ggg Val Asn Ser Val Phe Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg Pro Gly Gly 420 425 430 | 1296 |
| ata gag aaa gtt ctc ggc gtt gtg aaa cag att aaa ccg gtg att ttc Ile Glu Lys Val Leu Gly Val Val Lys Gln Ile Lys Pro Val Ile Phe 435 440 445 | 1344 |
| acg gtg gtt gag caa gaa tcg aac cat aac gga ccg gtt ttc tta gac Thr Val Val Glu Gln Glu Ser Asn His Asn Gly Pro Val Phe Leu Asp 450 455 460 | 1392 |
| cgg ttt act gaa tcg tta cat tat tat tcg act ctg ttt gat tcg ttg Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu 465 470 475 480 | 1440 |
| gaa gga gtt ccg aat agt caa gac aaa gtc atg tct gaa gtt tac tta Glu Gly Val Pro Asn Ser Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val Tyr Leu 485 490 495 | 1488 |
| ggg aaa cag att tgt aat ctg gtg gct tgt gaa ggt cct gac aga gtc Gly Lys Gln Ile Cys Asn Leu Val Ala Cys Glu Gly Pro Asp Arg Val 500 505 510 | 1536 |
| gag aga cac gaa acg ttg agt caa tgg gga aac ccg ttt ggt tcg tcc Glu Arg His Glu Thr Leu Ser Gln Trp Gly Asn Arg Phe Gly Ser Ser 515 520 525 | 1584 |
| ggt tta gcg ccg gca cat ctt ggg tct aac gcg ttt aag caa gcg agt Gly Leu Ala Pro Ala His Leu Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser 530 535 540 | 1632 |
| atg ctt ttg tct gtg ttt aat agt ggc caa ggt tat cgt gtg gag gag Met Leu Leu Ser Val Phe Asn Ser Gly Gln Gly Tyr Arg Val Glu Glu 545 550 555 560 | 1680 |
| agt aat gga tgt ttg atg ttg ggt tgg cac act cgt cca ctc att acc Ser Asn Gly Cys Leu Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Thr 565 570 575 | 1728 |
| acc tcc gct tgg aaa ctc tcg acg gcg gcg tac tga Thr Ser Ala Trp Lys Leu Ser Thr Ala Ala Tyr 580 585 | 1764 |

<210> 7
 <211> 587
 <212> Π3T
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 7

Met Lys Arg Asp His His Gln Phe Gln Gly Arg Leu Ser Asn His Gly
1 5 10 15

Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ile Ser Lys Asp Lys Met Met Met Val
20 25 30

Lys Lys Glu Glu Asp Gly Gly Gly Asn Met Asp Asp Glu Leu Leu Ala
35 40 45

Val Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Glu Val Ala Leu
50 55 60

Lys Leu Glu Gln Leu Glu Thr Met Met Ser Asn Val Gln Glu Asp Gly
65 70 75 80

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

Tyr Ser Trp Leu Asp Asn Met Leu Ser Glu Leu Asn Pro Pro Pro Leu
100 105 110

Pro Ala Ser Ser Asn Gly Leu Asp Pro Val Leu Pro Ser Pro Glu Ile
115 120 125

Cys Gly Phe Pro Ala Ser Asp Tyr Asp Leu Lys Val Ile Pro Gly Asn
130 135 140

Ala Ile Tyr Gln Phe Pro Ala Ile Asp Ser Ser Ser Ser Ser Asn Asn
145 150 155 160

Gln Asn Lys Arg Leu Lys Ser Cys Ser Ser Pro Asp Ser Met Val Thr
165 170 175

Ser Thr Ser Thr Gly Thr Gln Ile Gly Gly Val Ile Gly Thr Thr Val
180 185 190

Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Gly Glu Ser Thr Arg Ser
195 200 205

Val Ile Leu Val Asp Ser Gln Glu Asn Gly Val Arg Leu Val His Ala
210 215 220

Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Ile Gln Gln Asn Asn Leu Thr Leu Ala
225 230 235 240

Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Cys Leu Ala Val Ser Gln Ala Gly
245 250 255

Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg
260 265 270

Ile Tyr Arg Leu Ser Pro Pro Gln Asn Gln Ile Asp His Cys Leu Ser
275 280 285

Asp Thr Leu Gln Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe
290 295 300

Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Glu Gly Lys
305 310 315 320

Lys Arg Val His Val Ile Asp Phe Ser Met Asn Gln Gly Leu Gln Trp
325 330 335

Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Glu Gly Gly Pro Pro Thr
340 345 350

Phe Arg Leu Thr Gly Ile Gly Pro Pro Ala Pro Asp Asn Ser Asp His
355 360 365

Leu His Glu Val Gly Cys Lys Leu Ala Gln Leu Ala Glu Ala Ile His
370 375 380

Val Glu Phe Glu Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Ser Leu Ala Asp Leu
385 390 395 400

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

Val Asn Ser Val Phe Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg Pro Gly Gly
420 425 430

Ile Glu Lys Val Leu Gly Val Val Lys Gln Ile Lys Pro Val Ile Phe
435 440 445

Thr Val Val Glu Gln Glu Ser Asn His Asn Gly Pro Val Phe Leu Asp
450 455 460

Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu
465 470 475 480

Glu Gly Val Pro Asn Ser Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val Tyr Leu
485 490 495

Gly Lys Gln Ile Cys Asn Leu Val Ala Cys Glu Gly Pro Asp Arg Val
500 505 510

Glu Arg His Glu Thr Leu Ser Gln Trp Gly Asn Arg Phe Gly Ser Ser
515 520 525

Gly Leu Ala Pro Ala His Leu Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser
530 535 540

Met Leu Leu Ser Val Phe Asn Ser Gly Gln Gly Tyr Arg Val Glu Glu
545 550 555 560

Ser Asn Gly Cys Leu Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Thr
565 570 575

Thr Ser Ala Trp Lys Leu Ser Thr Ala Ala Tyr
580 585

<210> 8
<211> 1599
<212> DHK
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1599)

<400> 8
atg aag aga gat cat cat cat cat cat cat caa gat aag aag act atg 48
Met Lys Arg Asp His His His His His His Gln Asp Lys Lys Thr Met
1 5 10 15
atg atg aat gaa gaa gac gac ggt aac ggc atg gat gag ctt cta gct 96
Met Met Asn Glu Glu Asp Asp Gly Asn Gly Met Asp Glu Leu Leu Ala
20 25 30
gtt ctt ggt tac aag gtt agg tca tcc gaa atg gct gat gtt gct cag 144
Val Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Asp Val Ala Gln
35 40 45
aaa ctc gag cag ctt gaa gtt atg atg tct aat gtt caa gaa gac gat 192
Lys Leu Glu Gln Leu Glu Val Met Met Ser Asn Val Gln Glu Asp Asp
50 55 60
ctt tct caa ctc gct act gag act gtt cac tat aat ccg gcg gag ctt 240
Leu Ser Gln Leu Ala Thr Glu Thr Val His Tyr Asn Pro Ala Glu Leu
65 70 75 80
tac acg tgg ctt gat tct atg ctc acc gac ctt aat cct ccg tcg tct 288
Tyr Thr Trp Leu Asp Ser Met Leu Thr Asp Leu Asn Pro Pro Ser Ser
85 90 95
aac gcc gag tac gat ctt aaa gct att ccc ggt gac gcg att ctc aat 336
Asn Ala Glu Tyr Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asp Ala Ile Leu Asn
100 105 110
cag ttc gct atc gat tcg gct tct tcg tct aac caa ggc ggc gga gga 384
Gln Phe Ala Ile Asp Ser Ala Ser Ser Ser Asn Gln Gly Gly Gly Gly
115 120 125
gat acg tat act aca aac aag cgg ttg aaa tgc tca aac ggc gtc gtg 432

| | |
|---|------|
| Asp Thr Tyr Thr Thr Asn Lys Arg Leu Lys Cys Ser Asn Gly Val Val | |
| 130 135 140 | |
| gaa acc act aca gcg acg gct gag tca act cgg cat gtt gtc ctg gtt | 480 |
| Glu Thr Thr Thr Ala Thr Ala Glu Ser Thr Arg His Val Val Leu Val | |
| 145 150 155 160 | |
| gac tcg cag gag aac ggt gtg cgt ctc gtt cac gcg ctt ttg gct tgc | 528 |
| Asp Ser Gln Glu Asn Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys | |
| 165 170 175 | |
| gct gaa gct gtt cag aaa gag aat ctg act gta gcg gaa gct ctg gtg | 576 |
| Ala Glu Ala Val Gln Lys Glu Asn Leu Thr Val Ala Glu Ala Leu Val | |
| 180 185 190 | |
| aag caa atc gga ttc tta gcc gtt tct caa atc gga gcg atg aga aaa | 624 |
| Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser Gln Ile Gly Ala Met Arg Lys | |
| 195 200 205 | |
| gtc gct act tac ttc gcc gaa gct ctc gcg cgg cgg att tac cgt ctc | 672 |
| Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Leu | |
| 210 215 220 | |
| tct ccg tcg cag agt cca atc gac cac tct ctc tcc gat act ctt cag | 720 |
| Ser Pro Ser Gln Ser Pro Ile Asp His Ser Leu Ser Asp Thr Leu Gln | |
| 225 230 235 240 | |
| atg cac ttc tac gag act tgt cct tat ctc aag ttc gct cac ttc acg | 768 |
| Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr | |
| 245 250 255 | |
| gcg aat caa gcg att ctc gaa gct ttt caa ggg aag aaa aga gtt cat | 816 |
| Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Gln Gly Lys Lys Arg Val His | |
| 260 265 270 | |
| gtc att gat ttc tct atg agt caa ggt ctt caa tgg ccg gcg ctt atg | 864 |
| Val Ile Asp Phe Ser Met Ser Gln Gly Leu Gln Trp Pro Ala Leu Met | |
| 275 280 285 | |
| cag gct ctt gcg ctt cga cct ggt ggt cct cct gtt ttc cgg tta acc | 912 |
| Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Val Phe Arg Leu Thr | |
| 290 295 300 | |
| gga att ggt cca ccg gca ccg gat aat ttc gat tat ctt cat gaa gtt | 960 |
| Gly Ile Gly Pro Pro Ala Pro Asp Asn Phe Asp Tyr Leu His Glu Val | |
| 305 310 315 320 | |
| ggg tgt aag ctg gct cat tta gct gag gcg att cac gtt gag ttt gag | 1008 |
| Gly Cys Lys Leu Ala His Leu Ala Glu Ala Ile His Val Glu Phe Glu | |
| 325 330 335 | |
| tac aga gga ttt gtg gct aac act tta gct gat ctt gat gct tcg atg | 1056 |
| Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Thr Leu Ala Asp Leu Asp Ala Ser Met | |
| 340 345 350 | |
| ctt gag ctt aga cca agt gag att gaa tct gtt gcg gtt aac tct gtt | 1104 |
| Leu Glu Leu Arg Pro Ser Glu Ile Glu Ser Val Ala Val Asn Ser Val | |
| 355 360 365 | |
| ttc gag ctt cac aag ctc ttg gga cga cct ggt gcg atc gat aag gtt | 1152 |
| Phe Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg Pro Gly Ala Ile Asp Lys Val | |
| 370 375 380 | |
| ctt ggt gtg gtg aat cag att aaa ccg gag att ttc act gtg gtt gag | 1200 |


```

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

cag gaa tcg aac cat aat agt ccg att ttc tta gat cgg ttt act gag      1248
Gln Glu Ser Asn His Asn Ser Pro Ile Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu
                405                410                415

tcg ttg cat tat tac tcg acg ttg ttt gac tcg ttg gaa ggt gta ccg      1296
Ser Leu His Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Val Pro
                420                425                430

agt ggt caa gac aag gtc atg tcg gag gtt tac ttg ggt aaa cag atc      1344
Ser Gly Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile
                435                440                445

tgc aac gtt gtg gct tgt gat gga cct gac cga gtt gag cgt cat gaa      1392
Cys Asn Val Val Ala Cys Asp Gly Pro Asp Arg Val Glu Arg His Glu
                450                455                460

acg ttg agt cag tgg agg aac ccg ttc ggg tct gct ggg ttt gcg gct      1440
Thr Leu Ser Gln Trp Arg Asn Arg Phe Gly Ser Ala Gly Phe Ala Ala
465                470                475                480

gca cat att ggt tcg aat gcg ttt aag caa gcg agt atg ctt ttg gct      1488
Ala His Ile Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala
                485                490                495

ctg ttc aac ggc ggt gag ggt tat ccg gtg gag gag agt gac ggc tgt      1536
Leu Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg Val Glu Glu Ser Asp Gly Cys
                500                505                510

ctc atg ttg ggt tgg cac aca cga ccg ctc ata gcc acc tcg gct tgg      1584
Leu Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp
                515                520                525

aaa ctc tcc acc aat
Lys Leu Ser Thr Asn
530

<210> 9
<211> 533
<212> Π3T
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

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

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

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

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

Leu Ser Gln Leu Ala Thr Glu Thr Val His Tyr Asn Pro Ala Glu Leu

```


| 65 | 70 | 75 | 80 |
|---|-----|-----|-----|
| Tyr Thr Trp Leu Asp Ser Met Leu Thr Asp Leu Asn Pro Pro Ser Ser | 85 | 90 | 95 |
| Asn Ala Glu Tyr Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asp Ala Ile Leu Asn | 100 | 105 | 110 |
| Gln Phe Ala Ile Asp Ser Ala Ser Ser Ser Asn Gln Gly Gly Gly Gly | 115 | 120 | 125 |
| Asp Thr Tyr Thr Thr Asn Lys Arg Leu Lys Cys Ser Asn Gly Val Val | 130 | 135 | 140 |
| Glu Thr Thr Thr Ala Thr Ala Glu Ser Thr Arg His Val Val Leu Val | 145 | 150 | 155 |
| Asp Ser Gln Glu Asn Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys | 165 | 170 | 175 |
| Ala Glu Ala Val Gln Lys Glu Asn Leu Thr Val Ala Glu Ala Leu Val | 180 | 185 | 190 |
| Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser Gln Ile Gly Ala Met Arg Lys | 195 | 200 | 205 |
| Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Leu | 210 | 215 | 220 |
| Ser Pro Ser Gln Ser Pro Ile Asp His Ser Leu Ser Asp Thr Leu Gln | 225 | 230 | 235 |
| Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr | 245 | 250 | 255 |
| Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Gln Gly Lys Lys Arg Val His | 260 | 265 | 270 |
| Val Ile Asp Phe Ser Met Ser Gln Gly Leu Gln Trp Pro Ala Leu Met | 275 | 280 | 285 |
| Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Val Phe Arg Leu Thr | 290 | 295 | 300 |
| Gly Ile Gly Pro Pro Ala Pro Asp Asn Phe Asp Tyr Leu His Glu Val | 305 | 310 | 315 |
| Gly Cys Lys Leu Ala His Leu Ala Glu Ala Ile His Val Glu Phe Glu | | | |


```

325          330          335
Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Thr Leu Ala Asp Leu Asp Ala Ser Met
340          345          350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Leu Ser Thr Asn
530

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб підвищення стійкості до полягання при збереженні врожайності та низького вмісту глюкозинолату рослини *Brassica*, який включає введення мутантного алеля карликовості DELLA в геномну ДНК вказаної рослини шляхом трансформації або мутагенезу та селекції вказаних мутантних алелів DELLA,
- 10 в якому вказаний мутантний алель карликовості DELLA кодує білок DELLA з послідовністю SEQ ID NO: 3, в якій пролін, що відповідає P91, є заміщеним на лейцин.
2. Спосіб за п. 1, в якому вказана рослина вибирається з групи, яка складається з *B. juncea*, *B. napus*, *B. rapa*, *B. carinata*, *B. oleracea* і *B. nigra*.


```

bnRGA1 MKRDLHQFQG--PNHGTISIAGSSTSSPAVFGKDKMMVKEED-----DELLGVLGYKV 52
brRGA1 MKRDLHQFQG--PNHGTISIAGSSTSSPAVFGKDKMMVKEED-----DELLGVLGYKV 52
atRGA  MKRDHHQFQGRLSNHGTSSSSSSIS-----KDKMMVKEEDGGGNMDEL LAVLGYKV 54
atGAI  MKRDHHHHHQ-----DKKTMMNEEDDNG--MDELLAVLGYKV 38
      **** *:.; ..* **::;:* *****

bnRGA1 RSSEMAEVALKLEQLETMMGNAQEDGLAHLATDTVHYNPAELYSWLDNMLTELNPAAATT 112
brRGA1 RSSEMAEVALKLEQLETMMGNAQEDGLAHLATDTVHYNPAELYSWLDNMLTELNPAAATT 112
atRGA  RSSEMAEVALKLEQLETMMSNVQEDGLSHLATDTVHYNPSELYSWLDNMLSELNPPPLPA 114
atGAI  RSSEMAADVAKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTDLNPP--- 94
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
      I II

bnRGA1 GSNALNPEINNINN--SFFTGGDLKAIPGNAVCRRSNQFAFAVDSSSNKRLKPSSSPDSM 171
brRGA1 GSNALNPEINNINN--SFFTGGDLKAIPGNAVCRRSNQFAFAVDSSSNKRLKPSSSPDSM 172
atRGA  SSNGLDPLPSPEICGFPASDYDLKVIPGNAIYQFPAIDSSSSNNQNKRLKSCSSPDSM 174
atGAI  SSN-----AEYDLKAIPGDALN---QFAIDSSSSNQGGGDTYTTNK 135
      .** : ****:*****: : ...*: : .

bnRGA1 VTSPSP---AGVIGTTVT---ESTRPLILVDSQDNGVRLVHALMACAEAVQS 220
brRGA1 VTSPSP---AGVIGTTVT---ESTRPLILVDSQDNGVRLVHALMACAEAVQS 221
atRGA  VTSTSTGTQIGGVIGTTVT-----TAAGESTRSVILVDSQENGVRVHALMACAEAIQQ 234
atGAI  RLKCSN---GVVETTTATAE-----STRHVVLVDSQENGVRVHALMACAEAVQK 182
      . * ** : **::* *****:*****:*****:*****:*****:*****
      III

bnRGA1 SNLTLAEALVKQIGFLAVSQAGAMRKVATYFAEALARRIYRLSPQTQIDHSLSDTLQMH 280
brRGA1 SNLTLAEALVKQIGFLAVSQAGAMRKVATYFAEALARRIYRLSPQTQIDHSLSDTLQMH 281
atRGA  NNLTAEALVKQIGCLAVSQAGAMRKVATYFAEALARRIYRLSPQONQIDHCLSDTLQMH 294
atGAI  ENLTVAEALVKQIGFLAVSQIGAMRKVATYFAEALARRIYRLSPSQSPIDHSLSDTLQMH 242
      .***:***** ***** ***** *****:*****:*****:*****:*****
      IV

bnRGA1 FYETCPYLKFAHFTANQAILAEAFEGKKRVHVIDFSMNQGLQWPALMQALALREGGPPSFR 340
brRGA1 FYETCPYLKFAHFTANQAILAEAFEGKKRVHVIDFSMNQGLQWPALMQALALREGGPPSFR 341
atRGA  FYETCPYLKFAHFTANQAILAEAFEGKKRVHVIDFSMNQGLQWPALMQALALREGGPPSFR 354
atGAI  FYETCPYLKFAHFTANQAILAEAFQGGKKRVHVIDFSMSQGLQWPALMQALALREGGPPVFR 302
      *****:*****:*****:***** ***** **
      V

bnRGA1 LTGIGPPAADNSDHLHEVGCKLAQLAEAIHVEFEYRGFVANSLADLDASMLELRPSETEA 400
brRGA1 LTGIGPPAADNSDHLHEVGCKLAQLAEAIHVEFEYRGFVANSLADLDASMLELRPSETEA 401
atRGA  LTGIGPPAPDNSDHLHEVGCKLAQLAEAIHVEFEYRGFVANSLADLDASMLELRPSOTEA 414
atGAI  LTGIGPPAPDNFDYLHEVGCKLAHLAEAIHVEFEYRGFVANTLADLDASMLELRPSEIES 362
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
      VI VII

bnRGA1 TLFDSLEGAPSSQDKVMSEVYLQKQICNLVACEGPDVERHETLSQWSNRFSSGFAPAH 520
brRGA1 TLFDSLEGAPSSQDKVMSEVYLQKQICNLVACEGPDVERHETLSQWSNRFSSGFAPAH 521
atRGA  TLFDSLEGVPNSQDKVMSEVYLQKQICNLVACEGPDVERHETLSQWGNRFSSGLAPAH 534
atGAI  TLFDSLEGVPSSQDKVMSEVYLQKQICNVVACDGPDRVERHETLSQWRNRFSSAGFAAAH 482
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
      LGSNAFKQASTLLALFNGGEGYRVEENNGCLMLSWHTRPLITTSAWKLSAVH- 572
brRGA1 LGSNAFKQASTLLALFNGGEGYRVEENNGCLMLSWHTRPLITTSAWKLSAVH- 573
atRGA  LGSNAFKQASMLLSVFNSGQGYRVEESNGCLMLGWHTRPLITTSAWKLSTAAY 587
atGAI  IGSNAFKQASMLLALFNGGEGYRVEESDGCMLMLGWHTRPLIATSAWKLSTN-- 533
      :***** **::**:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Фиг. 1

```

bnRGA1 LGSNAFKQASTLLALFNGGEGYRVEENNGCLMLSWHTRPLITTSAWKLSAVH- 572
brRGA1 LGSNAFKQASTLLALFNGGEGYRVEENNGCLMLSWHTRPLITTSAWKLSAVH- 573
atRGA  LGSNAFKQASMLLSVFNSGQGYRVEESNGCLMLGWHTRPLITTSAWKLSTAAY 587
atGAI  IGSNAFKQASMLLALFNGGEGYRVEESDGCMLMLGWHTRPLIATSAWKLSTN-- 533
      :***** **::**:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Фиг. 1 (продовження)

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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