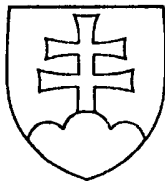


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

(21) Číslo dokumentu:

2385-92

- (22) Dátum podania: 30.07.92
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 07/737 851
(32) Dátum priority: 31.07.91
(33) Krajina priority: US
(43) Dátum zverejnenia: 11.07.95
(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. 6 :

C 12 N 15/29,
C 12 N 15/64,
15/82

(71) Prihlasovateľ: American Cyanamid Company, Wayne, NJ, US;

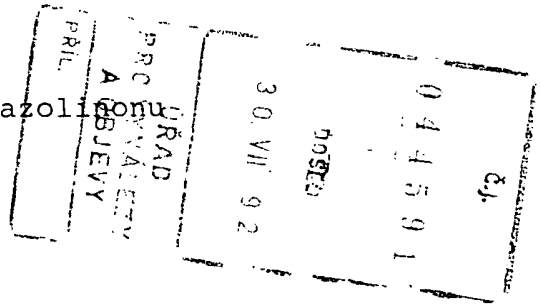
(72) Pôvodca vynálezu: Dietrich Gabriele Elfriede, Rocky Hill, NJ, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Mutanty AHAS rezistentné voči imidazolinónu**

(57) Anotácia:
Gény jednoklíčnolistových rastlín kódujú mutantný enzým AHAS vykazujúci špecifickú rezistenciu voči imidazolinonovým herbicídum. Ako príklad týchto génov je možné uviesť sekvencie DNA kukurice, ktoré kódujú substitúciu aminokyseliny v polohe 621 enzýmu AHAS divokého typu. Mutantný gén sa môže použiť na transformáciu iných rastlín, za účelom dosiahnutia rezistencie voči herbicídum. Hostiteľské bunky a vektory obsahujúce tento gén sú užitočné pri transformačných postupoch.

Mutantní AHAS rezistentní vůči imidazolinonu

Oblast techniky



Vynález se týká nových sekvencí DNA, které kódují nové variantní formy enzymu acetoxykyselina syntázy (dále AHAS). Enzym AHAS je kritickým enzymem, který je rutinně produkován v různých rostlinách a širokém rozsahu mikroorganismů. Normální funkce AHAS je inhibována imidazolinonovými herbicidy. Nové enzymy AHAS, kódované mutantními sekvencemi DNA však působí normálním katalytickým účinkem i za přítomnosti imidazolinonových herbicidů a v důsledku toho dodávají rostlinám nebo mikroorganismům, které je obsahují, rezistenci vůči tomuto herbicidu.

Nové sekvence DNA jsou odvozeny z kukuřice a obsahují v poloze 621 normální sekvence AHAS substituci aminokyseliny. Tato substituce v sekvenci genu AHAS má za následek vznik plně funkčního enzymu, ale činí enzym specificky rezistentním vůči inhibici různými imidazolinonovými herbicidy. Dostupnost těchto variantních sekvencí poskytuje prostředek pro transformaci různých plodin za účelem dosažení rezistence vůči imidazolinonovým herbicidům a kromě toho, poskytuje nové selektovatelné markery pro použití v jiných typech experimentů genetické transformace.

Dosavadní stav techniky

Použití herbicidů v zemědělství je v současné době velmi rozšířeno. Ačkoliv existuje značný počet sloučenin, které účinně ničí plevel, ne všechny herbicidy jsou schopny se selektivně zaměřit na nežádoucí rostliny, ve srovnání s plodinami a zároveň být netoxické vůči zvířatům. Často je zapotřebí se rozhodnout pro sloučeniny, které jsou jednoduše méně toxické vůči plodinám než vůči pleveli. Aby byly tyto obtíže odstraněny,

zaměřil se zemědělský výzkum intenzivně na vývoj plodin, které jsou rezistentní vůči herbicidům.

Důležitým aspektem vývoje herbicidní rezistence je porozumění, na jaký cíl herbicid působí, po němž následuje manipulace postižené biochemické dráhy v plodinové rostlině tak, aby se bylo možno vyhnout inhibičnímu účinku, za současného zachování normální biologické funkce rostliny. Jeden z prvních objevů biologického mechanismu herbicidů se týkal série strukturně nepodobných herbicidních sloučenin, t.j. imidazolinonů, sulfonylmočovin a triazolopyrimidinů. Nyní je známo (Shaner a další, *Plant Physiol.* 76: str. 545 až 546, 1984; US patent č. 4 761 373), že všechny tyto herbicidy inhibují růst rostlin tím, že interferují s esenciálním enzymem, který je důležitý pro růst rostlin, acetoxykyselina syntázou (AHAS; stejný enzym bývá někdy označován termínem "acetolacetát syntáza" či ALS). AHAS je důležitý pro syntézu aminokyselin isoleucinu, leucinu a valinu.

Je známo, že enzym AHAS je přítomný ve vyšších rostlinách a zároveň byl zjištěn v různých mikroorganismech, jako jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a enterických bakteriích *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Byl také dobře charakterizován genetický základ produkce normálního AHAS v mnohých z těchto druhů. Tak například, jak v *E. coli*, tak v *S. typhimurium* existují tři isosymy AHAS, přičemž dva z nich jsou citlivé vůči herbicidům, zatímco třetí nikoliv. Každý z těchto isosimů obsahuje jednu velkou a jednu malou podjednotku proteinu a mapováním jsou zařazeny do operonů ILvIH, ILvGM a ILvBN. V kvasinkách byl jediný isosym AHAS mapován do místa ILV2. V každém případě byly identifikovány senzitivní a rezistentní formy a byly stanoveny sekvence různých alel (Friden a další., *Nucl. Acid Res.* 13: 3979-3993, 1985; Lawther a další., *PNAS USA* 78: 922-928, 1982; Squires a další., *Nucl. Acids Res* 11: 5299-5313, 1983; Wek a další; *Nucl. Acids Res* 13: 4011-4027, 1985; Falco a Dumas, *Genetics* 109, 21-35, 1985; Falco a další *Nucl. Acids Res* 13; 4011-4027, 1985).

V tabáku je funkce AHAS kódována dvěma nepřipojenými geny SuRA a SuRB. Tyto dva geny jsou v podstatě identické, jak na úrovni nuklotidů, tak na úrovni aminokyselin maturovaného proteinu, ačkoliv se N-terminální, předpokládaná transitní oblast odlišuje podstatněji (Lee a další, EMBO J. 7 : str. 1241 - 1248, 1988). Arabidopsis na druhé straně obsahuje jediný gen AHAS, který byl také úplně sekvenován (Mazur a další, Plant Physiol. 85: 1110 - 1117, 1987). Porovnání sekvencí genů AHAS ve vyšších rostlinách ukazuje na vysoký stupeň konzervace určitých oblastí této sekvence. Konkrétně existuje přinejmenším 10 oblastí konzervace sekvence. Nedávno se předpokládalo, že tyto konzervované oblasti jsou kritické, pokud se týče funkce enzymu a že zachování této funkce je závislé na podstatné konzervaci sekvence.

Nedávno bylo oznámeno (US patent č. 5 013 659), že mutanty, vykazující herbicidní rezistenci, obsahují mutace v alespoň jedné aminokyselině v jedné nebo více těchto konzervovaných oblastí. Zejména se zjistilo, že substituce určité aminokyseliny za aminokyselinu divokého typu v těchto specifických místech proteinové sekvence AHAS je tolerována a skutečně se projevuje dosažením herbicidní rezistence rostliny, která takovou mutaci obsahuje, při zachování katalytické funkce enzymu. Popsané mutace kódují buď křížovou rezistenci vůči imidazolinonům a sulfonylmočovinám nebo specifickou rezistenci vůči sulfonylmočovinám, nebyly však zveřejněny mutace, které by byly specifické pro imidazolinony. Bylo prokázáno, že k takovým mutacím dochází u tabáku jak na místě SuRA, tak na místě SuRB. Podobné mutace byly také izolovány u Arabidopsis a kvasinek.

Imidazolinon-specifická rezistence byla oznámena u mnoha různých rostlin v jiných pramenech. V US patentu č. 4 761 373 byl obecně popsán modifikovaný AHAS, jakožto základ herbicidní rezistence rostlin a konkrétně zde jsou uvedeny určité imidazolinon-rezistentní linie kukuřice. Haughn a další (Mol.Gen. Genet. 211 : 266 - 271, 1988) oznámili přítomnost podobného

fenotypu v *Arabidopsis*. Sathasivan a další (Nucl. Acid Res. 18: 2 188, 1990) zjistili, že imidazolinon-specifická rezistence u *Arabidopsis* je založena na mutaci v poloze 653 normální sekvence AHAS. Nyní byl v souvislosti s tímto vynálezem izolován gen kódující imidazolinon-specifickou rezistenci u jednoděložných rostlin a bylo zjištěno, že je založen na substituci jediné aminokyseliny v sekvenci aminokyselin AHAS divokého typu jednoděložných rostlin.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou nové sekvence nukleových kyselin, kódující funkční enzymy AHAS jednoděložných rostlin, které jsou necitlivé vůči imidazolinonovým herbicidům. Tyto sekvence obsahují mutaci v kodonu, který kóduje aminokyselinu serin v poloze 621 sekvence AHAS kukuřice nebo v odpovídající poloze sekvencí jiných monokotyledonů. Je známo, že jiné monokotyledony, jako je pšenice, také vykazují imidazolinon-specifické mutace (například ATCC č. 40994 - 97). U kukuřice obsahuje tato sekvence divokého typu v této poloze serin. V přednostním provedení tohoto vynálezu je serin nahrazen asparaginem, nicméně však existují i alternativní možnosti substituce serinu kyselinou aspartovou, kyselinou glutamovou, glutaminem a tryptofanem. Nárokované sekvence jsou sice původně odvozeny z monokotyledonů, jsou však užitečné i při způsobech produkce imidazolinon-rezistentních buněk rostlin jakéhokoliv typu. Při těchto metodách se buňka cílové rostliny transformuje jednou nebo více pozměněnými sekvencemi podle vynálezu. Alternativně se pro vytvoření mutantů v buňkách rostlin nebo semenech, obsahujících sekvenci nukleových kyselin, kódující imidazolinon-necitlivý AHAS, používá mutageneze. V případě mutantních buněk rostlin izolovaných z tkáňové kultury, se pak regenerují rostliny, které obsahují charakteristický znak rezistence nebo necitlivosti (insenzitivity) vůči imidazolinonům. Do rozsahu vynálezu spadají také buňky rostlin, bakteriální buňky, houbové buňky, buněčné tkáňové kultury, dospělé rostliny a semena

rostlin, které obsahují mutantní sekvenci nukleových kyselin a které exprimují funkční imidazolinon-rezistentní enzymy AHAS.

Dostupnost těchto nových herbicidně rezistentních rostlin umožňuje vyvinout nové metody pěstování plodin za přítomnosti imidazolinonů. Místo toho, aby se pěstovaly nerezistentní rostliny, mohou se pole osít rezistentními rostlinami získanými mutací nebo transformací mutantními sekvencemi podle tohoto vynálezu, načež se pole obvyklým způsobem ošetří imidazolinony, aniž by došlo k poškození plodiny.

Mutantní nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu také poskytují nové selektovatelné markery pro použití při transformačních experimentech. Sekvence nukleových kyselin, která kóduje rezistentní AHAS, se připojí k druhému genu před transferem do hostitelské buňky a celý konstrukt se transformuje do hostitele. Předpokládané transformované buňky se potom nechají růst v kultuře za přítomnosti inhibičních množství herbicidu. U buněk, které přežijí, existuje vysoká pravděpodobnost, že došlo k úspěšnému zabudování požadovaného druhého genu. Alternativně se může postupovat tak, že se gen rezistentního AHAS ko-transformuje na nezávislém plasmidu s požadovaným genem, přičemž přibližně u 50 % všech transformantů je možno očekávat, že získaly oba geny.

Následuje vysvětlení některých pojmů, kterých se používá v tomto popisu a v nárocích. Pod pojmem "funkční" nebo "normální" enzym AHAS se rozumí enzym AHAS, který je schopen katalyzovat první supeň syntetické dráhy vedoucí k esenciálním aminokyselinám isoleucinu, leucinu a valinu. Pod pojmem sekvence AHAS "divokého typu" se rozumí sekvence, která je přítomná v imidazolinon-senzitivním členu daného druhu. Pod pojmem "rezistentní" rostlina se rozumí rostlina, která produkuje mutantní, ale funkční enzym AHAS a která je schopna dosáhnout zralosti při růstu za přítomnosti imidazolinonů o koncentraci, která normálně vykazuje inhibiční účinek. Poj-

mu "rezistentní" se v souvislosti s rostlinami používá v tomto popisu také ve významu "tolerantní", t.j. jedná se o rostliny, které fenotypicky vykazují nepříznivé, ale nikoliv lethální reakce vůči imidazolinonům.

Přehled obrázků na výkrese

Na obr. 1 je uveden graf závislosti aktivity enzymu AHAS u desetidenních semenáčků kukuřice (kukuřice linie A619 nebo XI12) na koncentraci imazethapyru (Pursuit^(R) A) nebo chlorsulfuronu (Oust^(R) B). Aktivita herbicidně rezistentního AHAS se vypočítá jako procentický podíl aktivity AHAS za nepřítomnosti inhibitoru. Směrodatná odchylka při těchto pokusech činí 10 %.

Na obr. 2 je znázorněna Southernova analýza genomových klonů ve fágu EMBL3. Fágy 12-1A (z W22), 12-7A, 18-8A, 12-11 a 12-17A (z XI12) se štěpí XbaI nebo Sall, provede se separace na 1% agarózovém gelu, přenos na nitrocelulózu a hybridizace s cDNA fragmentem AHAS, jako nukleotidovou sondou.

Na obr. 3 je uvedena Southernova analýza genomové DNA z linií kukuřice XI12, XA17, QJ22, A188 a B73. DNA se vyštěpí XbaI, separuje na 1% agarózovém gelu, přenesse na nitrocelulózu a hybridizuje s cDNA fragmentem AHAS, jako nukleotidovou sondou.

Na obr. 4 je znázorněna restriční mapa plazmidu pCD8A. Gen mutantního AHAS z XI12 se subklonuje jako 8kb fragment PstI do vektoru pKS(+). Umístění a orientace genu AHAS je znázorněna šipkou. Restriční místa PstI, XhoI, HindIII, XbaI a ClaI jsou označena symboly.

Na obr. 5 je znázorněn gel pro sekvenování nukleotidů s nekódujícím vláknem (A) a se sekvencí dvouvláknové DNA (B)

klonů AHAS W22/4-4, B73/10-4 a XI12/8A v oblasti aminokyselin 614 až 633. Umístění přechodu cytosin-thymidin je označeno šipkou.

Na obr. 6 jsou uvedeny nukleotidové a dedukované aminokyselinové sekvence mutantního genu AHAS XI12/8A.

Na obr. 7 je uvedeno seřazení sekvence nukleotidů genů XI12/8A, B73/7-4 a W22/1A als 2. Znakem (*) je označena základní změna způsobující mutaci v poloze 621, znakem (#) jsou označeny změny ve srovnání se sekvencí B73/7-4 a znakem (>) jsou označeny "tiché změny".

Na obr. 8 je uvedeno seřazení sekvencí aminokyselin genů XI12/BA, B73/7-4 a W22/1A als 2. Znakem (*) je označena základní změna způsobující mutaci v poloze 621, znakem (#) jsou označeny změny ve srovnání se sekvencí B73/7-4 a znakem (>) jsou označeny "tiché změny".

Gen podle tohoto vynálezu je izolovatelný z kukuřice linie XI12 (semena jsou uložena v Americké sbírce typových kultur /American Type Culture Collection - ATCC/ pod přírůstkovým číslem 75 051). Tento gen se vloží do plasmidu pXI12/8A (uloženého ve sbírce ATCC pod přírůstkovým číslem 68 643). Tento gen je také izolovatelný z jakéhokoliv jiného imidazolinon-specifického herbicidně rezistentního mutantu, jako je kukuřice line QJ22 (uložená ve sbírce ATCC pod přírůstkovým číslem 40 129) nebo různých rostlin pšenice (semena uložena ve sbírce ATCC pod čísly 40 994, 40 995, 40 996 a 40 997). Vytvoří se knihovna genomové DNA, například ve fágu EMBL-3 s DNA z jednoho imidazolinon-rezistentního mutantu, přednostně takového, který je homozygní, pokud se týče charakteristického znaku rezistence a provede se skrínig se sondou z nukleových kyselin obsahující celou sekvenci AHAS divokého typu nebo její část.

U kukuřice se gen AHAS nalézá na dvou místech als1 a als2 (Burr a Burr, Trends in Genetics 7: 55 - 61, 1991). Homologie mezi těmito dvěma místy je na úrovni nukleotidů 95%. Mutace v XI12 se mapováním zařadí na místo als2 na chromosom 5, kdežto nemutantní gen se mapováním zařadí na místo als1 na chromosom 4 (Newhouse a další., "Imidazolinone-resistant crops"). V The Imidiazolinone Herbicides, Shaner a O'Connor (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA - v tisku) jsou Southernovou analýzou identifikovány některé klony obsahující mutantní gen als2 a některé klony obsahující nemutantní gen als1. Oba typy se subklonují do sekvenačních vektorů a sekvenují se dideoxy-sekvenační metodou.

Sekvenováním a porovnáním genů AHAS divokého typu a mutantního se zjistí rozdíl v jediném nukleotidu v kodonu kódujícím aminokyselinu v poloze 621 (viz obr. 5). Konkrétně, kodon AGT, kódující serin v divokém typu, je změněn na kodon AAT, kódující asparagin v mutantním AHAS (viz obr. 8). Mutantní gen AHAS se jinak podobá genu divokého typu, kódujícímu protein obsahující 638 aminokyselin, z nichž prvních čtyřicet tvoří přechodový peptid, o němž se předpokládá, že se při transportu do chloroplastu in vivo odštěpí. Sekvence nemutantního genu als1 z XI12 se zdá být totožná se sekvencí genu als1 z B73.

Mutantní geny podle tohoto vynálezu dodávají odolnost vůči midazolinonovým herbicidům, ale nikoliv vůči sulfonylmočovinovým herbicidům. Typy herbicidů, vůči kterým se dosahuje rezistence, jsou popsány například v US patentech č. 4 188 487, 4 201 565, 4 221 586, 4 297 128, 4 554 013, 4 608 079, 4 638 068, 4 747 301, 4 650 514, 4 698 092, 4 701 208, 4 709 036, 4 752 323, 4 772 311 a 4 798 619,

Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že sekvence nukleových kyselin, která je znázorněna na obr. 6, není jedinou sekvencí, které je možno použít pro dodání imidazolinon-specifické rezistence. Rovněž se může použít takových sekvencí nukle-

ových kyselin, které kódují stejný protein, ale které v důsledku degenerace genetického kódu mají odlišnou nukleotidovou sekvenci. Do rozsahu vynálezu také spadají geny kódující sekvence AHAS, v nichž je přítomna výše uvedená mutace, ale které také kódují jednu nebo více tichých změn aminokyselin v těch částech molekuly, které se nepodílejí na rezistenci nebo katalytické funkci. Do rozsahu také spadají genové sekvence z jiných imidazolinon-rezistentních monokotyledonů, které obsahují mutaci v odpovídající oblasti těchto sekvencí.

Do rozsahu vynálezu tedy spadají také genové sekvence s takovými změnami, které mají za následek tvorbu chemicky ekvivalentní aminokyseliny v určitém místě. Tak například, kodon pro aminokyselinu alanin, což je hydrofobní aminokyselina, je možno snadno nahradit kodonem kódujícím jiný hydrofobní zbytek, jako například glycin nebo kodonem kódujícím hydrofobnější zbytek, jako například valin, leucin nebo isoleucin. Podobně je možno očekávat, že se získá biologicky ekvivalentní produkt, jestliže se provede výměna jednoho negativně nabitého zbytku za jiný, jako je například výměna kyseliny aspartové za kyselinu glutamovou, nebo výměna jednoho pozitivně nabitého zbytku za jiný, jako je například výměna lysinu za arginin. Do rozsahu vynálezu také spadají chimerické geny, v nichž je substituovaná část genu AHAS z kukuřice rekombinována s nezměněnými částmi normálních genů AHAS z jiných druhů. Jestliže se tedy v tomto popisu a nárocích používá pojmu "gen AHAS imidazolinon-specifické rezistentní kukuřice", rozumí se tím kterékoliv z těchto alternativních provedení, stejně tak jako sekvence znázorněná na obr. 6.

Izolované DNA sekvence AHAS podle tohoto vynálezu jsou užitečné pro transformaci rostlin cílových plodin, jimž se má dodat rezistence vůči imidazolinonům. Pro dosažení přímé nebo nepřímé transformace vyšších rostlin exogenní DNA je v současné době k dispozici velká řada technik a do rozsahu tohoto vynálezu spadá použití jakékoliv z nich, kterou se může nová sekvence zabudovat do genomu hostitele, přičemž

dochází k ustálené dědičnosti. Znak imidazolinon-specifické rezistence se dědí jakožto jediný dominantní jaderný gen. Úroveň rezistence vůči imidazolinonům se zvyšuje, je-li gen přítomen v homozygním stavu. Takové rostliny kukuřice mají například úroveň rezistence přibližně 1 000 x vyšší než nereizistentní rostliny. Rostliny, v nichž je gen přítomen v heterozygním stavu však mají rezistenci pouze asi 50 až 500násobnou ve srovnání s nereizistentními rostlinami.

Transformaci rostlinných buněk je možno zprostředkovat použitím vektorů. Obvyklou metodou, které se při transformaci používá je metoda, při níž se cizí gen zavádí do buňky cílové rostliny pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, tak například, mutantní sekvence AHAS se vloží do plasmidového vektoru obsahující lemuující sekvence v Ti-plasmidu T-DNA. Tento plasmid se potom transformuje do *E. coli*. Proveďte se triparentální spojení (mating) tohoto kmene, kmene *agrobacterium* obsahujícího odzbrojený (disarmed) Ti-plasmid obsahující virulentní funkce potřebné pro provedení přenosu T-DNA sekvencí obsahujících AHAS do chromosomu cílové rostliny a druhého kmene *E. coli*, obsahujícího plasmid, v němž jsou přítomny sekvence potřebné pro mobilizaci přenosu konstruktu AHAS z *E. coli* do *agrobacterium*. Rekombinantního kmene *agrobacterium*, který obsahuje potřebné sekvence pro transformaci rostliny, se použije pro infekci listových disků. Disky se nechají růst na selekčním mediu a identifikují se úspěšně transformované regeneranty. Získané rostliny jsou rezistentní vůči účinkům herbicidu, pokud se nechají růst v jeho přítomnosti. Vhodným prostředkem pro přenos exogenní DNA jsou také rostlinné viry.

Může se také použít postupu, přiněmž buňky rostliny přijímají DNA přímo. Obvykle se postupuje tak, že se protoplasty cílové rostliny umístí do kultury za přítomnosti DNA, která má být přenesena a činidla podporujícího přijímání DNA protoplastem. Jako užitečná činidla tohoto typu je možno uvést polyethylenglykol nebo fosforečnan vápenatý.

Alternativně je možno stimulovat přijímání DNA elektroporací. Při této metodě se používá elektrického pulzu pro dočasné otevření pórů v buněčné membráně protoplastu, přičemž těmito póry se potom do buněk vtáhne DNA z obklopujícího roztoku. Podobně se může pro přímé dodání DNA do buňky a přednostně do buněčného jádra, použít mikroinjekcí.

Při každé z výše uvedených technik dochází k transformaci buněk rostliny v kultuře. Po provedené transformaci je nutno z buněk rostliny regenerovat celé rostliny. Techniky regenerace zralých rostlin z callu nebo protoplastové kultury jsou nyní velmi dobře známé u velkého počtu různých druhů (viz například Handbook of Plant Cell Culture, sv.1 - 5, 1983 - 1989, McMillan, New York, USA). Jestliže se tedy již dosáhne transformace, regenerace zralých rostlin z transformovaných buněk rostliny představuje postup spadající do rozsahu dosavadního stavu techniky.

Nyní jsou také k dispozici alternativní metody, které nutně nevyžadují použití izolovaných buněk a tedy technik regenerace rostlin, pro provedení transformace. Tyto metody bývají označovány jako " balistické" nebo metody " urychlování částic", při nichž se do buněk rostliny vstřelují kovové částice povlečené DNA buď pomocí náplně střelného prachu (Kleina další, Nature 327 : str. 70 - 73, 1987) nebo pomocí elektrického výboje (EPO 270 356). Tímto způsobem je možno stabilně transformovat sekvencí DNA, která je předmětem zájmu, buňky rostliny v kultuře nebo reprodukční orgány nebo buňky rostliny, například pyl.

U některých dvojděložných a jednoděložných rostlin je přímý příjem DNA přednostní metodou transformace. Tak například, u kukuřice, se buněčná stěna kultivovaných buněk rozštěpí v pufru pomocí jednoho nebo více enzymů degradujících stěnu buňky, jako je celulóza, hemicelulóza a pektináza, za účelem izolace životaschopných protoplastů. Protoplasty se několikrát promyjí aby se odstranily enzymy a potom se smíchají s

plazmidovým vektorem, obsahujícím gen, který je předmětem zájmu. Buňky je možno transformovat pomocí PEG (například 20% PEG 4 000) nebo elektroporací. Protoplasty se umístí na nitrocelulózový filtr a kultivují na mediu s uloženými buňkami kukuřice, které slouží jako živné kultury. Po dvou až čtyřech týdnech se kultury v nitrocelulózovém filtru umístí na medium obsahující přibližně 0,32 μ M imidazolinonu a na tomto mediu se udržují po dobu 1 až 2 měsíců. Nitrocelulózo- vé filtry s buňkami rostlin se každé dva týdny přenášejí na čestvé médium s herbicidy a živnými buňkami. Netransformované buňky přestanou růst a po několika týdnech odumírají.

Předloženého vynálezu je možno použít pro transformaci v podstatě jakéhokoliv typu rostlin a to jak jednoděložných tak dvouděložných. Z plodin, u nichž je možno takové transformace pro dosažení herbicidní rezistence použít, je například možno uvést kukuřici, pšenici, rýži, proso, ječmen, oves, čirok, slunečnici, batáty, vojtěšku, cukrovou řepu, druhy Brassica, rajčata, papriku, soju, tabák, tykev, brambory, hrách, podzemnici olejnou, bavlník nebo kakaovník. Nových sekvencí je také možno používat pro transformaci okrasných druhů rostlin, jako jsou růže a dřevnatých rostlin, jako je borovice a topol.

Nové sekvence podle vynálezu jsou také užitečné jako selektovatelné markery při studiích genetiky rostlin. Tak například, při transformaci rostliny by bylo možno sekvence kódující rezistenci vůči imidazolinonům, připojit k genu, který je předmětem zájmu, jehož se má použít pro transformaci cílové imidazolinon-senzitivní rostlinné buňky. Do buňky rostliny se potom zavede konstrukt, který obsahuje jak gen, který je předmětem zájmu, tak imidazolinon-rezistentní sekvence a buňky rostliny se potom nechají růst za přítomnosti inhibičního množství imidazolinonu. Alternativně se může postupovat tak, že se druhý gen, který je předmětem zájmu ko-transformuje na separátním plasmidu, do buněk hostitele. Buňky rostliny, které tento postup přežijí, budou pravděpodobně obsahovat jak gen rezistence, tak gen, který je předmětem zájmu a tudíž, pouze

transformanty přežijí selekční proces za použití herbicidu. Potvrzení úspěšné transformace a exprese obou genů se může provést Southernovou hybridizací genomové DNA, PCR nebo pozorováním fenotypické exprese genů.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádaném ohledu neomezují.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Potvrzení herbicidní rezistence celé rostliny na XI12

Rostliny XI12 se ošetří herbicidy v době 10 dnů do stadia V3 listu (4 - 5 listů, z nichž 3 obsahují viditelné liguly). Imazethapyr se aplikuje v dávkách 2 000, 500, 250, 125 a 62,5 g/ha. Chlorsulfuron se aplikuje v dávkách 32, 16, 8, 4 a 2 g/ha. Rostliny se ošetří postemergentně za použití objemu postřiku 400 l/ha. Po postřiku se rostliny umístí do skleníku, kde se dále sledují.

Při všech stupních ošetření imazethapyrem zůstávají rostliny XI12 neovlivněny. Při tom však není pozorována zvýšená rezistence vůči chlorsulfuronu. Rostliny XI12 tedy vykazují selektivní rezistenci vůči imidazolinonu, na úrovni celé rostliny (viz obr. 1).

Rezistence rostlin XI12 je dědičná ve formě jediné dominantní alely nukleárního genu. Heterozygně rezistentní rostliny XI12 se samoopylí. Potomstvo se rozdělí v poměru 3 : 1 (rezistentní : susceptibilní) jak lze očekávat v případě jediné dominantní alely jaderného genu. Při této studii se segregující semenáčky postříkají postemergentně lethální dávkou imazethapyru (125 nebo 250 g/ha) za použití postřiko-

vacích postupů popsaných výše, za účelem segregace podle rezistence.

P ř í k l a d 2

Extrakce AHAS

Semena rostlin XI12 se zasejí do země ve skleníku, v němž se udržuje teplota ve dne i v noci 26,7 °C při 15 hodinové osvětlovací periodě. Rostliny se sklídí 2 týdny po zasetí. Pro extrakci AHAS se použije hlavní části výhonu. 5 g tkáně se v kapalném dusíku rozdrtí na prášek, který se potom homogenizuje s pufrem pro stanovení AHAS, který sestává z 100 mM pufru na bázi fosforečnanu draselného (pH 7,5), obsahujícího 10 mM pyruvátu, 5 mM chloridu hořečnatého, 5 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové, 100 uM FAD (flavinadenindinukleotid), 1 mM valinu, 1 mM leucinu, 10 % glycerolu a 10 mM cysteinu. Homogenát se 10 minut odstřeďuje při otáčkách 10 000 min⁻¹ a 3 ml získaného supernatantu se nanese na ekvilibrovaný sloupec Bio-Rad Econo-Desalting (10 DG). Eluce se provádí 4 ml pufru pro zkoušení AHAS.

Aktivita AHAS se měří stanovením obsahu produktu, acetolacetátu, po konverzi dekarboxylací za přítomnosti kyseliny na acetoin. Standardní reakční směsi obsahují enzym v 50 mM pufru na bázi fosforečnanu draselného (pH 7,0), který obsahuje 100 mM pyruvátu sodného, 10 mM chloridu hořečnatého, 1 mM difosforečnanu thiaminu, 10 uM FAD a vhodné koncentrace různých inhibitorů. Získaná směs se inkubuje při 37 °C, po dobu 1 až 3 hodin, v závislosti na druhu prováděného pokusu. Na konci této inkubační periody se reakce zastaví přidávkem kyseliny sírové v takovém množství, aby se ve zkumavce dosáhlo konečné koncentrace 0,85 % kyseliny sírové. Reakční produkt se nechá dekarboxylovat při 60 °C v průběhu 15 minut. Vytvořený acetoin se stanoví inkubací s kreatinem (0,17%) a 1-naftolem

(1,7% roztok v 4N hydroxidu sodném). Absorpce barevného komplexu, který vznikne, se měří při 520 nm.

Aktivita AHAS z linií B73, A619 nebo jiných linií kukuřice divokého typu je vysoce citlivá vůči inhibici imazethapyrem (Pursuit^(R)) s hodnotou I_{50} $1 \mu\text{M}$ (viz obr. 1). V kontrastu s tímto zjištěním vykazuje XI12 70 až 80% aktivitu enzymu při nejvyšších koncentracích (100 μM) produktu Pursuit^(R) nebo Arsenal^(R) (imazepyr) a přibližně 70% za přítomnosti produktu Scepter^(R) (imazequin). Tento výsledek ukazuje na stonásobné zvýšení tolerance aktivity AHAS z XI12 vůči imazethapyru, ve srovnání s aktivitou AHAS z A619 in vitro. Senzitivita aktivity AHAS z těchto dvou linií vůči sulfonylmočovinám poskytuje zcela odlišný obrázek. Za přítomnosti produktu Oust^(R) (sulfometuron methyl) o koncentraci 100 nM činí aktivita AHAS z XI12 pouze 15 až 20 %. Aktivita AHAS z A619 za přítomnosti výrobku Oust^(R) je 5 až 10% a za přítomnosti výrobku Pursuit^(R) 15 - 20% (viz obr. 1).

P ř í k l a d 3

Klonování genů AHAS XI12

Zasejí se semena mutantu XI12 získaného z tkáňové kultury imidazolinon-rezistentní kukuřice. Rostliny získané z těchto semen jsou segregující pro mutantní fenotyp AHAS. Aby se získalo homozygně rezistentní osivo, provede se samoopylení populace rostlin mutantu XI12. Semena jsou homozygní, pokud se týče mutantního genu AHAS po selekci na herbicidní rezistenci prováděnou tři po sobě následující vegetační cykly. Homozygní semena se shromáždí a použije se jich pro vypěstování semenáčků, které slouží pro izolaci genu AHAS.

DNA se extrahuje ze sedm dnů starých etiolovaných semenáčků homozygní linie XI12. 60 g rostlinné tkáně se v kapalném

dusíku rozdrtí na prášek, který se převede do 108 ml extrakčního pufru pro DNA (1,4 M chloridu sodného, 2,0 % Ctab /hexadecyltrimethylamoniumbromid/, 100 mM Tris-Cl o pH 8,0, 20 mM ethyldiamintetraoctové kyseliny a 2 % merkaptoethanolu) a 54 ml vody. Suspenze se inkubuje 30 minut při 50 až 60 °C a potom se extrahuje stejným množstvím chloroformu. DNA se vysráží přidávkem stejného množství srážecího pufru (1 % Ctab, 50 mM Tris-Cl o pH 8,0 a 10 mM ethyldiamintetraoctové kyseliny). Genomová DNA se přečistí odstředováním při vysoké rychlosti v 6,6M roztoku chloridu cesného a ethidiumbromidu (rotor Ti80, otáčky 50 000 min⁻¹, 20 °C, 24 hodin). Přečištěná DNA se extrahuje butanolem, který je nasycen solí a 25 hodin dialýzuje proti 3 dávkám, vždy po 1 litru dialyzačního pufru (10 mM Tris-Cl o pH 8,0, 1 mM ethyldiamintetraoctové kyseliny a 0,1M chloridu sodného). Spektrofotometricky se stanoví koncentrace genomové DNA z XI12, která činí 310 mg/ml. Výtěžek je 0,93 mg.

Genomové DNA z XI12 se použije pro vytvoření genomové knihovny ve fágu EMBL-3. DNA se částečně rozštěpí pomocí Mbol a získané fragmenty se separují na sacharózovém gradientu, za účelem získání fragmentů 8 až 22 kb, které se potom klonují do místa BamH1 EMBL-3. Po získání 2,1 x 10⁶ nezávislých klonů se knihovna jednou amplifikuje. Titr knihovny je podle analýzy 9 x 10¹⁰ pfu/ml.

Za účelem získání nukleotidových sond pro analýzu knihovny XI12 se pomocí 800 nt BamH1 nukleotidová sondy izolované z genomového klonu AHAS z Arabidopsis třídí cDNA knihovna W22 (divokého typu) v lambda gtl1 (zakoupeno od firmy Clontech Inc., California, USA). Fágy se nanosou v hustotě 50 000 pfu/15cm miska, přenesou se na nitrocelulókové filtry, předhybridizují se v 6 x SSC, 0,2% SDS po dobu 2 hodin a hybridizují se s nukleotidovou sondou AHAS z Arabidopsis v 6 x SSC, 0,2% SDS přes noc. Identifikuje se 1 pozitivní fág, který se dále pře-

čistí a použije se ho pro subklonování 1,1 kb fragmentu EcoRI. 1,1kb fragment EcoRI se subklonuje do pGemA-4 a použije se ho jako nukleotidové sondy pro identifikaci genů AHAS XI12.

Genomová knihovna XI12 se nanese na 12 15cm misek (koncentrace 50 000 pfu/misku) a třídí se pomocí nukleotidové sondy cDNA AHAS W22. Filtry se předhybridizují (2 hodiny) a hybridizují (přes noc)v Churchově pufru (0,5 M fosforečnan sodný, 1,1 mM ethyldiamintetraoctové kyseliny, 1 % BSA a 7 % SDS při 65 °C, načež se promyjí při 65 °C dvakrát SSC, 0,2% SDS a 0,3 x SSC, 0,2 % SDS. Získá se 12 pozitivních plaků z celkem $7,5 \times 10^5$ zkoumaných pfu a 5 pozitivních klonů se dále čistí a izoluje podle Chisholma (BioTechniques 7: 21 - 23, 1989). Southernovou analýzou (viz obr. 2) se zjistí, že fágové klony představují 2 typy klonů AHAS. Klony typu 1 obsahují 1 velký (větší než 6,5 kb) fragment XbaI, který se hybridizuje se sondou cDNA AHAS. Klony typu 2 obsahují 2,7 a 3,7 kb fragmenty XbaI, které se hybridizují se sondou cDNA AHAS. Southernova analýza genomu XI12 DNA ukazuje, že XbaI fragmenty získané rozštěpením genomové DNA a hybridizací se sondou cDNA AHAS odpovídají XbaI fragmentům identifikovaným ve fágových klonech XI12 (viz obr. 3). Restrikční štěpení a Southernova analýza také ukazují, že z 5 klonů AHAS představuje 1 mutantní geny als2 a 4 představují als1 gen.

Geny AHAS odpovídající mutantnímu místu na chromozomu 5 (klon 12/8A) a nemutantnímu místu na chromozomu 4 (klon 12/17A) se subklonují jako fragment PstI (klon/8A) nebo jako fragment XbaI (12/17A) do sekvenačního vektoru pBluescript II KSml3(+) (pKS+; Stratagene). Jak 2,7kb tak 3,7kb XbaI fragment z fágu 12/17A obsahuje 1 úplnou kopii genů AHAS, které se identifikují. Sekvence každé z nich se získá dideoxy-sekvenováním (za použití sekvenačních souprav Pharmacia T7), přičemž se používá primerů, které jsou komplementární ke kódující sekvenci AHAS).

Metody extrakce DNA, klonování genomové knihovny a třídění knihovny jsou stejné jako metody popsané v souvislosti s genomovou DNA XI12. Geny AHAS z B73 se subklonují do sekvenačního vektoru pKS+ ve formě Xbal fragmentů a sekvenují se. Sekvence se získá dideoxy-sekvenováním, za použití primerů, které jsou komplementární vůči kódující sekvenci AHAS, jak je to popsáno u genu AHAS z SI12.

Roztřídí se genomová knihovna W22 v EMBL3 (zakoupená od firmy Clontech Inc., California, USA). Fágy se nanesou na misky při hustotě 50 000 pfu/18cm miska. Potom se přenesou na nitrocelulóзовé filtry a hybridizují se sondou cDNA AHAS W22, popsanou výše (přehybridizační a hybridizační podmínky: 6 x SSC, 0,5% SDS, 1X Denhardova DNA z telecího thymu 100 mg/ml, 65 °C; promývací podmínky : 3X x SSC, 0,2% SDS 2 hodiny při 65 °C a 0,3 x SSC, 0,2% SDS 2 hodiny). Identifikují se a dále přečistí dva pozitivní fágy (12/1A a 12/4-4).

Genomový klon 12/1A z W22 se subklonuje ve formě Sall fragmentů 0,78 kb (pGemA-4) a 3,0 kb (pGemA-14 ; Promega) do vektoru pGem-A2 a ve formě 6,5kb fragmentu Xbal do vektoru pKS+ (pCD200). Sekvence kódujícího vlákna genu AHAS W22 se získá dideoxy-sekvenováním hnízdových (nested) delecí vytvořených ze subklonů pGem A-14 a pGem A-4 fágu 12-1A. Této sekvence se použije pro sestavení oligonukleotidů, které jsou komplementární vůči nekódujícímu vláknu AHAS. Sekvence nekódujícího vlákna se získá dideoxy-sekvenováním klonu pCD200 za použití primerů, které jsou komplementární vůči kódujícímu vláknu. Při komplementaci sekvenování genu AHAS W22 se vytvoří primery obou vláken DNA a použije se jich pro sekvenování genů AHAS izolovaných z genomových knihoven XI12 a B73.

P ř í k l a d 4

Klonování genů AHAS QJ22

Také se určí sekvence genu kódujícího AHAS v linii kukuřice QJ22, která je selektivně rezistentní vůči imidazolionům. Ve vektoru EMBL3 se vytvoří genomová knihovna QJ22. Knihovna fágu 800 000 se zkoumá pomocí 850-nukleotidového fragmentu SalI/ClaI, izolovaného z klonu AHAS (A-4), odvozeného z linie kukuřice W22 divokého typu. Získá se 5 pozitivních fágů, které se podrobí druhému kolu skríningu, za účelem částečné purifikace fágu. Částečně purifikovaný fág se analyzuje PCR, aby se zjistilo, zda některý klon představuje gen als1 QJ22. Takové klony se identifikují jako 3,7kb fragment XbaI s gen-specifickým místem SmaI v poloze 495. Při druhém skríningu se zjistí přítomnost jednoho pozitivního klonu, který má tyto vlastnosti.

PCR produkt se purifikuje za použití obchodně dostupné soupravy (Magic PCR Preps) od firmy Promega a přečištěná DNA se sekvenuje pomocí sekvenačního systému na bázi TAQ polymerázy "fmol", také od firmy Promega. Analýza sekvence obou vláken DNA mutantní AHAS QJ22 vykazuje nukleotidový přechod od G do A v kodonu pro aminokyselinu 621. Tato mutace je totožná s mutací pozorovanou u XI12. Zbytek sekvence je typický pro gen als1.

V Ý S L E D K Y

Sekvence mutantních genů AHAS se porovná se sekvencemi získanými z linií kukuřice divokého typu B73 a W22 (viz obr.7). Mutantní gen XI12 (XI12/8A) a mutantní gen QJ22 jsou shodné s genem divokého typu, s výjimkou změny aminokyseliny v poloze 621, kde došlo k jednomu přechodu nukleotidu od AGT k AAT (viz obr. 8). Gen mutantu XI12 (XI12/8A) se liší od genu divo-

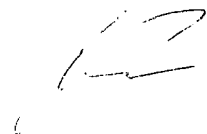
kého typu B73/7-4 přídatným rozdílem v poloze 63. Na druhé straně, nemutantní kmen AHAS XI12, klonovaný v XI12/17A je zcela homologický s odpovídajícím genem B73/10-2 v oblasti kódující maturovaný protein AHAS (data nejsou uvedena).

U l o ž e n í b i o l o g i c k ý c h
m a t e r i á l ů

Ve sbírce American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20857, USA (ATCC) jsou uloženy následující biologické materiály:

E. coli XLI Blue harboring plasmid pX12/8A, uložen 3. července 1991, pod přírůstkovým číslem ATCC 68643;

Semena kukuřice XI12, uložena 16. července 1991, pod přírůstkovým číslem ATCC 75051.



PRIL.	ÚŘAD PRŮMYŠLELY A OBJEVY	20. 1. 93	0 0 2 1 8 9	č.j. N 2385-92
-------	--------------------------------	-----------	-------------	----------------

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sekvence nukleových kyselin monokotyledonů, kódující funkční enzym AHAS, kterýžto enzym obsahuje v poloze 621 sekvence AHAS kukuřice divokého typu substituci aminokyseliny nebo který obsahuje homologickou substituci v sekvenci AHAS jiného jednoděložného druhu rostliny.

2. Sekvence podle nároku 1, kde monokotyledon je kukuřice a substituován je asparagin v poloze 621 enzymu AHAS kukuřice divokého typu.

3. Funkční enzym AHAS monokotyledonů, který zahrnuje vzhledem k enzymu AHAS monokotyledonů divokého typu substituci aminokyseliny, kterážto substituce uděluje enzymu imidazolinon-specifickou rezistenci.

4. Enzym podle nároku 3, kde monokotyledonem je kukuřice a substituce se nalézá v poloze 621 enzymu AHAS kukuřice divokého typu.

5. Enzym podle nároku 4, kde substituovanou aminokyselinou je asparagin.

6. Transformační vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 1.

7. Hostitelská buňka obsahující sekvenci nukleových kyselin podle nároku 1, nebo vektor podle nároku 6.

8. Hostitelská buňka podle nároku 7, kterou je rostlinná nebo bakteriální buňka.

9. Imidazolinon-specificky rezistentní zralá rostlina obsahující sekvenci nukleových kyselin podle nároku 1 nebo

její semena nebo pyl.

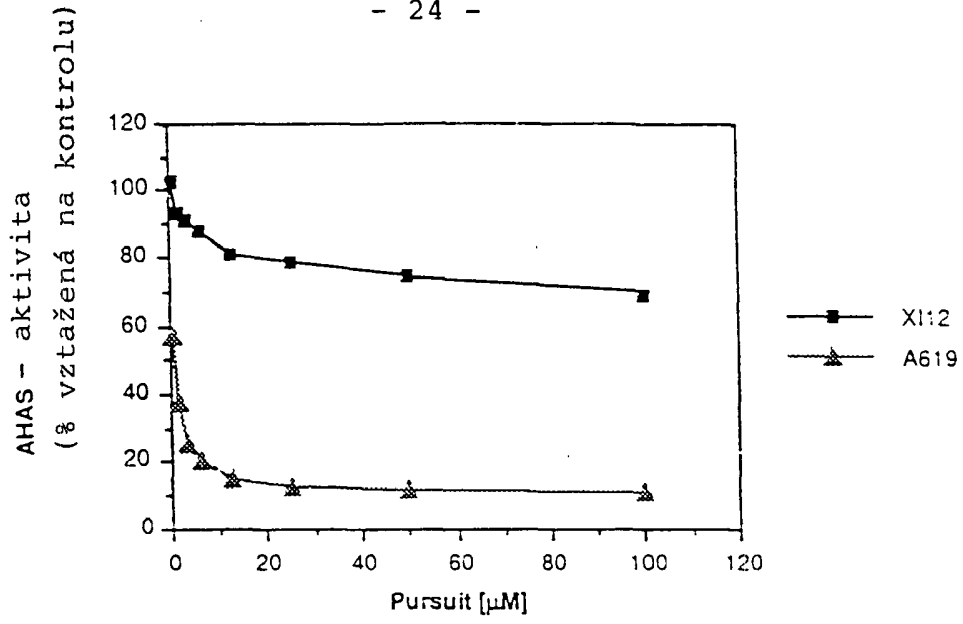
10. Způsob udělování imidazolinon-specifické rezistence buňkám rostlin, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do buňky rostliny zavede sekvence nukleových kyselin podle nároku 1.

11. Způsob pěstování imidazolinon-specifických rezistentních rostlin, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pěstuje rostlina produkující enzym podle nároku 3, za přítomnosti inhibičního množství imidazolinonu.

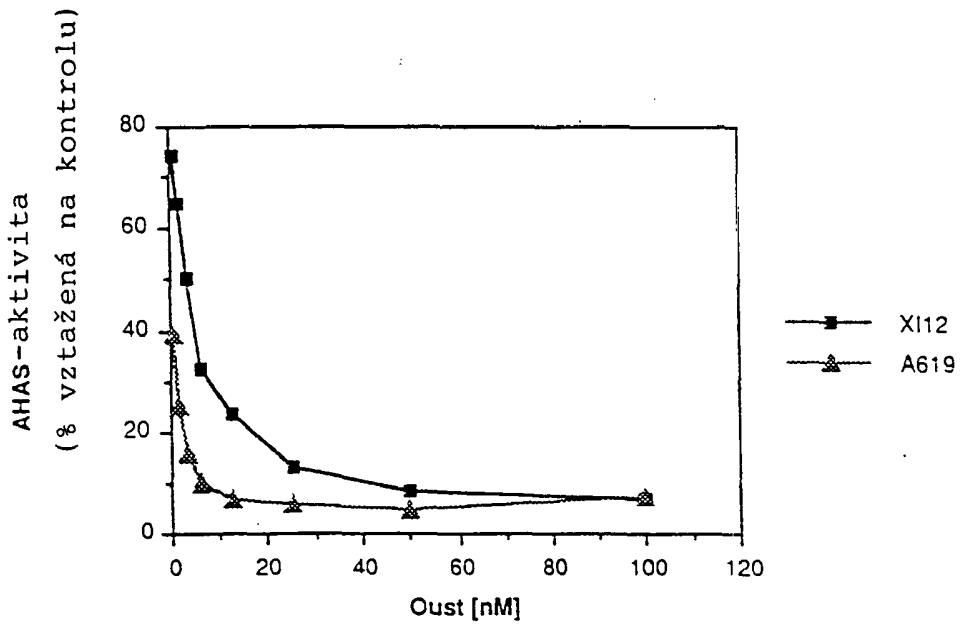
12. Způsob selekce hostitelských buněk, které jsou úspěšně selektovány genem, který je předmětem zájmu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do zvolených hostitelských buněk zavede gen, který je předmětem zájmu, připojený k sekvenci nukleových kyselin podle nároku 1 nebo gen, který je předmětem zájmu, nepřipojený, ale za přítomnosti sekvence nukleových kyselin podle nároku 1, buňky se pěstují za přítomnosti inhibičního množství imidazolinonu, načež se identifikují buňky, které přežily, jakožto buňky obsahující gen, který je předmětem zájmu.

13. Konstrukt nukleových kyselin obsahující sekvenci podle nároku 1, připojenou ke genu, který kóduje agronomicky užitečný charakteristický znak.

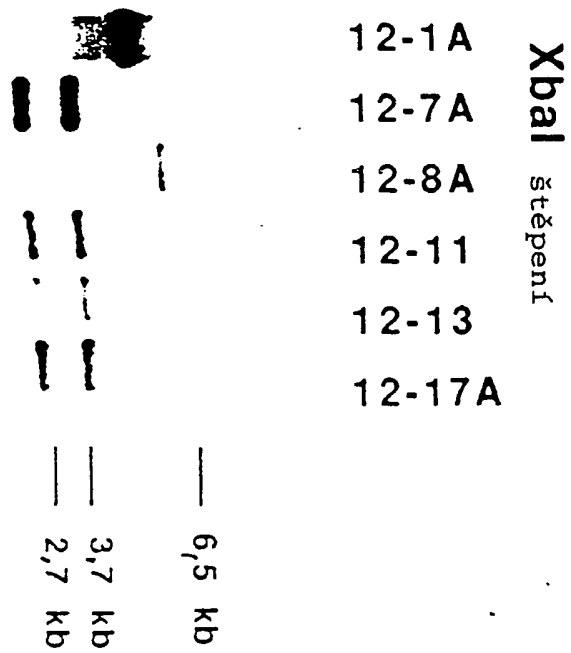
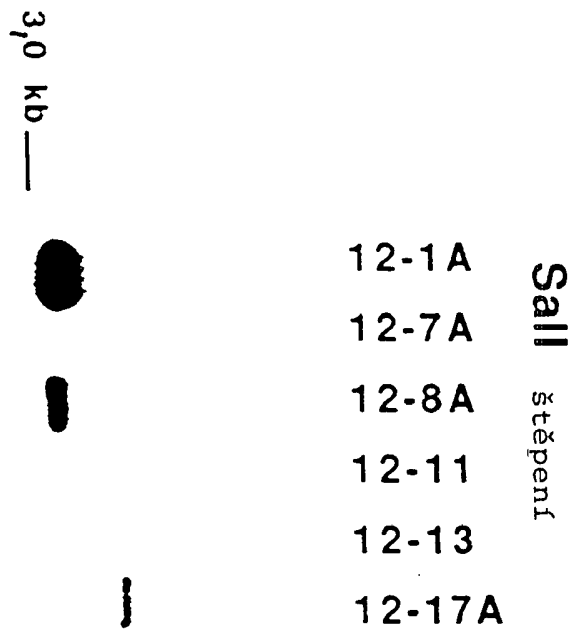
A

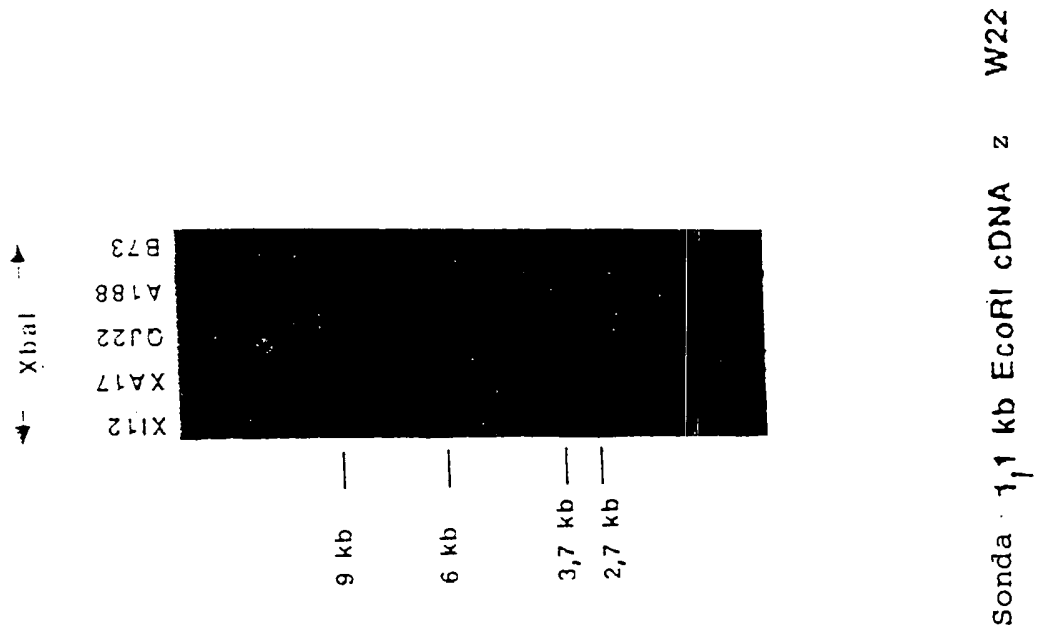


B

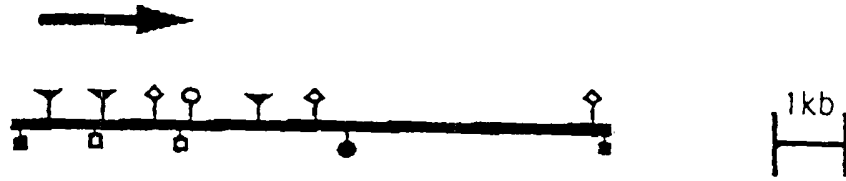


Obr. 1





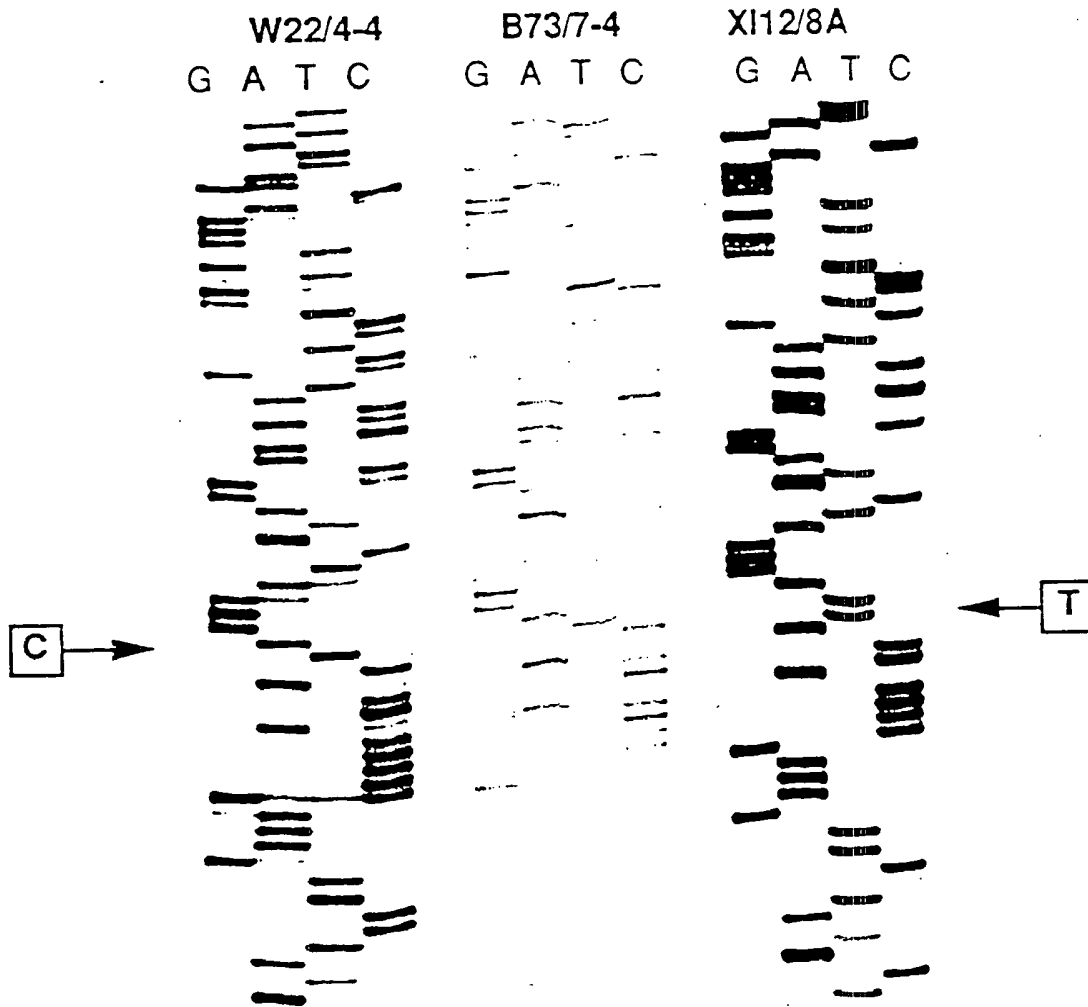
Obr. 3



- ┐ Sall
- ▣ XhoI
- ◇ HindIII
- XbaI
- ClaI
- PstI

Obr. 4

A



B

W22/1A a. B73/7-4
sekvence

5'TAGTG3'
3'ATCTG 5'

XI12/8A sekvence

5'TAATG3'
3'ATAC5'

40	50	60	70	80	90
*	*	*	*	*	*
ATG GCC ACC GCC GCC GCC GCG TCT ACC GCG CTC ACT GGC GCC ACT ACC GCT GCG					
Met Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ser Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Thr Ala Ala					
100	110	120	130	140	
*	*	*	*	*	
CCC AAG GCG AGG CGC CGG GCG CAC CTC CTG GCC ACC CGC CGC GCC CTC GCC GCG					
Pro Lys Ala Arg Arg Arg Ala His Leu Leu Ala Thr Arg Arg Ala Leu Ala Ala					
150	160	170	180	190	
*	*	*	*	*	
CCC ATC AGG TGC TCA GCG GCG TCA CCC GCC ATG CCG ATG GCT CCC CCG GCC ACC					
Pro Ile Arg Cys Ser Ala Ala Ser Pro Ala Met Pro Met Ala Pro Pro Ala Thr					
200	210	220	230	240	250
*	*	*	*	*	*
CCG CTC CGG CCG TGG GGC CCC ACC GAT CCC CGC AAG GGC GCC GAC ATC CTC GTC					
Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val					
260	270	280	290	300	
*	*	*	*	*	
GAG TCC CTC GAG CGC TGC GGC GTC CGC GAC GTC TTC GCC TAC CCC GGC GGC GCG					
Glu Ser Leu Glu Arg Cys Gly Val Arg Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala					
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
TCC ATG GAG ATC CAC CAG GCA CTC ACC CGC TCC CCC GTC ATC GCC AAC CAC CTC					
Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Ala Asn His Leu					
370	380	390	400	410	
*	*	*	*	*	
TTC CGC CAC GAG CAA GGG GAG GCC TTT GCG GCC TCC GGC TAC GCG CGC TCC TCG					
Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ser Ser					
420	430	440	450	460	
*	*	*	*	*	
GGC CGC GTC GGC GTC TGC ATC GCC ACC TCC GGC CCC GGC GCC ACC AAC CTT GTC					
Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val					
470	480	490	500	510	520
*	*	*	*	*	*
TCC GCG CTC GCC GAC GCG CTG CTC GAT TCC GTC CCC ATG GTC GCC ATC ACG GGA					
Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly					
530	540	550	560	570	
*	*	*	*	*	
CAG GTG CCG CGA CGC ATG ATT GGC ACC GAC GCC TTC CAG GAG ACG CCC ATC GTC					
Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val					
580	590	600	610	620	630

* * * * *

GAG GTC ACC CGC TCC ATC ACC AAG CAC AAC TAC CTG GTC CTC GAC GTC GAC GAC
Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Asp Asp

640 650 660 670 680
* * * * *
ATC CCC CGC GTC GTG CAG GAG GCT TTC TTC CTC GCC TCC TCT GGT CGA CCG GGG
Ile Pro Arg Val Val Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly

690 700 710 720 730
* * * * *
CCG GTG CTT GTC GAC ATC CCC AAG GAC ATC CAG CAG CAG ATG GCG GTG CCT GTC
Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val

740 750 760 770 780 790
* * * * *
TGG GAC AAG CCC ATG AGT CTG CCT GGG TAC ATT GCG CGC CTT CCC AAG CCC CCT
Trp Asp Lys Pro Met Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro

800 810 820 830 840
* * * * *
GCG ACT GAG TTG CTT GAG CAG GTG CTG CGT CTT GTT GGT GAA TCC CGG CGC CCT
Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro

850 860 870 880 890 900
* * * * *
GTT CTT TAT GTT GGC GGT GCG TGC GCA GCA TCT GGT GAG GAG TTG CGA CGC TTT
Val Leu Tyr Val Gly Gly Ala Cys Ala Ala Ser Gly Glu Glu Leu Arg Arg Phe

910 920 930 940 950
* * * * *
GTG GAG CTG ACT GGA ATC CCG GTC ACA ACT ACT CTT ATG GGC CTC GGC AAC TTC
Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe

960 970 980 990 1000
* * * * *
CCC AGC GAC GAC CCA CTG TCT CTG CGC ATG CTA GGT ATG CAT GGC ACG GTG TAT
Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr

1010 1020 1030 1040 1050 1060
* * * * *
GCA AAT TAT GCA GTG GAT AAG GCC GAT CTG TTG CTT GCA CTT GGT GTG CGG TTT
Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Arg Phe

1070 1080 1090 1100 1110
* * * * *
GAT GAT CGT GTG ACA GGG AAG ATT GAG GCT TTT GCA AGC AGG GCT AAG ATT GTG
Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val

1120 1130 1140 1150 1160 1170
 * * * * * *
 CAC GTT GAT ATT GAT CCG GCT GAG ATT GGC AAG AAC AAG CAG CCA CAT GTG TCC
 His Val Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser

1180 1190 1200 1210 1220
 * * * * *
 ATC TGT GCA GAT GTT AAG CTT GCT TTG CAG GGC ATG AAT GCT CTT CTT GAA GGA
 Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Ala Leu Leu Glu Gly

1230 1240 1250 1260 1270
 * * * * *
 AGC ACA TCA AAG AAG AGC TTT GAC TTT GGC TCA TGG AAC GAT GAG TTG GAT CAG
 Ser Thr Ser Lys Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser Trp Asn Asp Glu Leu Asp Gln

1280 1290 1300 1310 1320 1330
 * * * * * *
 CAG AAG AGG GAA TTC CCC CTT GGG TAT AAA ACA TCT AAT GAG GAG ATC CAG CCA
 Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Ser Asn Glu Glu Ile Gln Pro

1340 1350 1360 1370 1380
 * * * * *
 CAA TAT GCT ATT CAG GTT CTT GAT GAG CTG ACG AAA GGC GAG GCC ATC ATC GGC
 Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Gly

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * * *
 ACA GGT GTT GGG CAG CAC CAG ATG TGG GCG GCA CAG TAC TAC ACT TAC AAG CGG
 Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg

1450 1460 1470 1480 1490
 * * * * *
 CCA AGG CAG TGG TTG TCT TCA GCT GGT CTT GGG GCT ATG GGA TTT GGT TTG CCG
 Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro

1500 1510 1520 1530 1540
 * * * * *
 GCT GCT GCT GGT GCT TCT GTG GCC AAC CCA GGT GTT ACT GTT GTT GAC ATC GAT
 Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp

1550 1560 1570 1580 1590 1600
 * * * * * *
 GGA GAT GGT AGC TTT CTC ATG AAC GTT CAG GAG CTA GCT ATG ATC CGA ATT GAG
 Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Met Ile Arg Ile Glu

1610 1620 1630 1640 1650
 * * * * *
 AAC CTC CCG GTG AAG GTC TTT GTG CTA AAC AAC CAG CAC CTG GGG ATG GTG GTG
 Asn Leu Pro Val Lys Val Phe Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val

1660	1670	1680	1690	1700	1710
*	*	*	*	*	*
CAG TGG GAG GAC AGG TTC TAT AAG GCC AAC AGA GCG CAC ACA TAC TTG GGA AAC					
Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn					
	1720	1730	1740	1750	1760
	*	*	*	*	*
	CCA GAG AAT GAA AGT GAG ATA TAT CCA GAT TTC GTG ACG ATC GCC AAA GGG TTC				
	Pro Glu Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe				
	1770	1780	1790	1800	1810
	*	*	*	*	*
	AAC ATT CCA GCG GTC CGT GTG ACA AAG AAG AAC GAA GTC CGC GCA GCG ATA AAG				
	Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Asn Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys				
1820	1830	1840	1850	1860	1870
*	*	*	*	*	*
AAG ATG CTC GAG ACT CCA GGG CCG TAC CTC TTG GAT ATA ATC GTC CCA CAC CAG					
Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln					
	1880	1890	1900	1910	1920
	*	*	*	*	*
	GAG CAT GTG TTG CCT ATG ATC CCT AAT GGT GGG GCT TTC AAG GAT ATG ATC CTG				
	Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu				
	1930	1940	1950	1960	
	*	*	*	*	
	GAT GGT GAT GGC AGG ACT GTG TAC TGATC TAAAA TCCAG CAAG				
	Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr				

	10	20	30	40	50	60
XI12/8A	AACCC TCGCG CCGCC	TCCGA GACAG CCGCC	GCAAC CATGG CCACC	GCCGC CGCCG CGTCT		
W22/1A	AACCC TCGCG CCGCC	TCCGA GACAG CCGCC	GCAAC CATGG CCACC	GCCGC CGCCG CGTCT	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	AACCC TCGCG CCGCC	TCCGA GACAG CCGCC	GCAAC CATGG CCACC	GCCGC CGCCG CGTCT	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	AACCC TCGCG CCGCC	TCCGA GACAG CCGCC	GCAAC CATGG CCACC	GCCGC CGCCG CGTCT		

	70	80	90	100	110	120
XI12/8A	ACCGC GCTCA CTGGC	GCCAC TACCG CTGGC	CCCAA GGCGA GGCGC	CGGGC GCACC TCCTG		
W22/1A	ACCGC GCTCA CTGGC	GCCAC TACCG CTGGC	CCCAA GGCGA GGCGC	CGGGC GCACC TCCTG	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	ACCGC GCTCA CTGGC	GCCAC TACCG CTGGC	CCCAA GGCGA GGCGC	CGGGC GCACC TCCTG	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	ACCGC GCTCA CTGGC	GCCAC TACCG CTGGC	CCCAA GGCGA GGCGC	CGGGC GCACC TCCTG		

	130	140	150	160	170	180
XI12/8A	GCCAC CCGCC GCGCC	CTCGC CGCGC CCATC	AGGTG CTCAG CGGGC	TCACC CGCCA TGCCG		
W22/1A	GCCAC CCGCC GCGCC	CTCGC CGCGC CCATC	AGGTG CTCAG CGGGC	TCACC CGCCA TGCCG	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	GCCAC CCGCC GCGCC	CTCGC CGCGC CCATC	AGGTG CTCAG CGGGC	TCACC CGCCA TGCCG	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	GCCAC CCGCC GCGCC	CTCGC CGCGC CCATC	AGGTG CTCAG CGGGC	TCACC CGCCA TGCCG		

	190	200	210	220	230	240
XI12/8A	ATGGC TCCCC CGGCC	ACCCC GCTCC GGCCG	TGGGG CCCCA CCGAT	CCCCG CAAGG GCGCC		
W22/1A	ATGGC TCCCC CGGCC	ACCCC GCTCC GGCCG	TGGGG CCCCA CCGAT	CCCCG CAAGG GCGCC	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	ATGGC TCCCC CGGCC	ACCCC GCTCC GGCCG	TGGGG CCCCA CCGAT	CCCCG CAAGG GCGCC	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	ATGGC TCCCC CGGCC	ACCCC GCTCC GGCCG	TGGGG CCCCA CCGAT	CCCCG CAAGG GCGCC		

	250	260	270	280	290	300
XI12/8A	GACAT CCTCG TCGAG	TCCCT CGAGC GCTGC	GGCGT CCGCG ACGTC	TTCGC CTACC CCGGC		
W22/1A	GACAT CCTCG TCGAG	TCCCT CGAGC GCTGC	GGCGT CCGCG ACGTC	TTCGC CTACC CCGGC	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	GACAT CCTCG TCGAG	TCCCT CGAGC GCTGC	GGCGT CCGCG ACGTC	TTCGC CTACC CCGGC	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	GACAT CCTCG TCGAG	TCCCT CGAGC GCTGC	GGCGT CCGCG ACGTC	TTCGC CTACC CCGGC		

	310	320	330	340	350	360
XI12/8A	GGCGC GTCCA TGGAG	ATCCA CCAGG CACTC	ACCGG CTCCC CCGTC	ATCGC CAACC ACCTC		
W22/1A	GGCGC GTCCA TGGAG	ATCCA CCAGG CACTC	ACCGG CTCCC CCGTC	ATCGC CAACC ACCTC	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	GGCGC GTCCA TGGAG	ATCCA CCAGG CACTC	ACCGG CTCCC CCGTC	ATCGC CAACC ACCTC	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	GGCGC GTCCA TGGAG	ATCCA CCAGG CACTC	ACCGG CTCCC CCGTC	ATCGC CAACC ACCTC		

	370	380	390	400	410	420
XI12/8A	TTCCG CCACG AGCAA GGGGA GGCCT TTGCG GCCTC CGGCT ACGCG CGCTC CTCGG GCCGC					
W22/1A	TTCCG CCACG AGCAA GGGGA GGCCT TTGCG GCCTC CGGCT ACGCG CGCTC CTCGG GCCGC					
B73/7-4	TTCCG CCACG AGCAA GGGGA GGCCT TTGCG GCCTC CGGCT ACGCG CGCTC CTCGG GCCGC					
XI12/8A	TTCCG CCACG AGCAA GGGGA GGCCT TTGCG GCCTC CGGCT ACGCG CGCTC CTCGG GCCGC					

	430	440	450	460	470	480
XI12/8A	GTCGG CGTCT GCATC GCCAC CTCCG GCCCC GGCGC CACCA ACCTT GTCTC CGCGC TCGCC					
W22/1A	GTCGG CGTCT GCATC GCCAC CTCCG GCCCC GGCGC CACCA ACCTT GTCTC CGCGC TCGCC					
B73/7-4	GTCGG CGTCT GCATC GCCAC CTCCG GCCCC GGCGC CACCA ACCTT GTCTC CGCGC TCGCC					
XI12/8A	GTCGG CGTCT GCATC GCCAC CTCCG GCCCC GGCGC CACCA ACCTT GTCTC CGCGC TCGCC					

	490	500	510	520	530	540
XI12/8A	GACGC GCTGC TCGAT TCCGT CCCCC TGGTC GCCAT CACGG GACAG GTGCC GCGAC GCATG					
W22/1A	GACGC GCTGC TCGAT TCCGT CCCCC TGGTC GCCAT CACGG GACAG GTGCC GCGAC GCATG					
B73/7-4	GACGC GCTGC TCGAT TCCGT CCCCC TGGTC GCCAT CACGG GACAG GTGCC GCGAC GCATG					
XI12/8A	GACGC GCTGC TCGAT TCCGT CCCCC TGGTC GCCAT CACGG GACAG GTGCC GCGAC GCATG					

	550	560	570	580	590	600
XI12/8A	ATTGG CACCG ACGCC TTCCA GGAGA CGCCC ATCGT CGAGG TCACC CGCTC CATCA CCAAG					
W22/1A	ATTGG CACCG ACGCC TTCCA GGAGA CGCCC ATCGT CGAGG TCACC CGCTC CATCA CCAAG					
B73/7-4	ATTGG CACCG ACGCC TTCCA GGAGA CGCCC ATCGT CGAGG TCACC CGCTC CATCA CCAAG					
XI12/8A	ATTGG CACCG ACGCC TTCCA GGAGA CGCCC ATCGT CGAGG TCACC CGCTC CATCA CCAAG					

	610	620	630	640	650	660
XI12/8A	CACAA CTACC TGGTC CTCGA CGTCG ACGAC ATCCC CCGCG TCGTG CAGGA GGCTT TCTTC					
W22/1A	CACAA CTACC TGGTC CTCGA CGTCG ACGAC ATCCC CCGCG TCGTG CAGGA GGCTT TCTTC					
B73/7-4	CACAA CTACC TGGTC CTCGA CGTCG ACGAC ATCCC CCGCG TCGTG CAGGA GGCTT TCTTC					
XI12/8A	CACAA CTACC TGGTC CTCGA CGTCG ACGAC ATCCC CCGCG TCGTG CAGGA GGCTT TCTTC					

	670	680	690	700	710	720
XI12/8A	CTCGC CTCCT CTGGT CGACC GGGGC CGGTG CTTGT CGACA TCCCC AAGGA CATCC AGCAG					
W22/1A	CTCGC CTCCT CTGGT CGACC GGGGC CGGTG CTTGT CGACA TCCCC AAGGA CATCC AGCAG					
B73/7-4	CTCGC CTCCT CTGGT CGACC GGGGC CGGTG CTTGT CGACA TCCCC AAGGA CATCC AGCAG					
XI12/8A	CTCGC CTCCT CTGGT CGACC GGGGC CGGTG CTTGT CGACA TCCCC AAGGA CATCC AGCAG					

	730	740	750	760	770	780
XI12/8A	CAGAT GCGCG TGCCT	GTCTG GGACA AGCCC	ATGAG TCTGC CTGGG	TACAT TGCGC GCCTT		
W22/1A	CAGAT GCGCG TGCCT	GTCTG GGACA AGCCC	ATGAG TCTGC CTGGG	TACAT TGCGC GCCTT	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	CAGAT GCGCG TGCCT	GTCTG GGACA AGCCC	ATGAG TCTGC CTGGG	TACAT TGCGC GCCTT	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	CAGAT GCGCG TGCCT	GTCTG GGACA AGCCC	ATGAG TCTGC CTGGG	TACAT TGCGC GCCTT		

	790	800	810	820	830	840
XI12/8A	CCCAA GCCCC CTGCG	ACTGA GTTGC TTGAG	CAGGT GCTGC GTCTT	GTTGG TGAAT CCCGG		
W22/1A	CCCAA GCCCC CTGCG	ACTGA GTTGC TTGAG	CAGGT GCTGC GTCTT	GTTGG TGAAT CCCGG	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	CCCAA GCCCC CTGCG	ACTGA GTTGC TTGAG	CAGGT GCTGC GTCTT	GTTGG TGAAT CgCGG	11111 11111 11111	11111 11111 1 111
XI12/8A	CCCAA GCCCC CTGCG	ACTGA GTTGC TTGAG	CAGGT GCTGC GTCTT	GTTGG TGAAT CCCGG		

	850	860	870	880	890	900
XI12/8A	CGCCC TG TTC TTTAT	GTTGG CCGTG CGTGC	GCAGC ATCTG GTGAG	GAGTT GCGAC GCTTT		
W22/1A	CGCCC TG TTC TTTAT	GTTGG CCGTG GCTGC	GCAGC ATCTG GTGAG	GAGTT GCGAC GCTTT	11111 11111 11111	11 11 11111 11111 11111 11111 11111 11111
B73/7-4	CGCCC TG TTC TTTAT	GTTGG CCGTG GCTGC	GCAGC ATCTG GTGAG	GAGTT GCGAC GCTTT	11111 11111 11111	11 11 11111 11111 11111 11111 11111 11111
XI12/8A	CGCCC TG TTC TTTAT	GTTGG CCGTG GCTGC	GCAGC ATCTG GTGAG	GAGTT GCGAC GCTTT		

	910	920	930	940	950	960
XI12/8A	GTGGA GCTGA CTGGA	ATCCC GGTCA CAACT	ACTCT TATGG GCCTC	GGCAA CTTCC CCAGC		
W22/1A	GTGGA GCTGA CTGGA	ATCCC GGTCA CAACT	ACTCT TATGG GCCTC	GGCAA CTTCC CCAGC	11111 11111 11111	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111
B73/7-4	GTGGA GCTGA CTGGA	ATCCC GGTCA CAACT	ACTCT TATGG GCCTC	GGCAA CTTCC CCAGC	11111 11111 11111	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111
XI12/8A	GTGGA GCTGA CTGGA	ATCCC GGTCA CAACT	ACTCT TATGG GCCTC	GGCAA CTTCC CCAGC		

	970	980	990	1000	1010	1020
XI12/8A	GACGA CCCAC TGTCT	CTGCG CATGC TAGGT	ATGCA TGGCA CGGTG	TATGC AAATT ATGCA		
W22/1A	GACGA CCCAC TGTCT	CTGCG CATGC TAGGT	ATGCA TGGCA CGGTG	TATGC AAATT ATGCA	11111 11111 11111	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111
B73/7-4	GACGA CCCAC TGTCT	CTGCG CATGC TAGGT	ATGCA TGGCA CGGTG	TATGC AAATT ATGCA	11111 11111 11111	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111
XI12/8A	GACGA CCCAC TGTCT	CTGCG CATGC TAGGT	ATGCA TGGCA CGGTG	TATGC AAATT ATGCA		

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
XI12/8A	GTGGA TAAGG CCGAT	CTGTT GCTTG CACTT	GGTGT GCGGT TTGAT	GATCG TGTGA CAGGG		
W22/1A	GTGGA TAAGG CCGAT	CTGTT GCTTG CACTT	GGTGT GCGGT TTGAT	GATCG TGTGA CAGGG>	11111 11111 11111	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111
B73/7-4	GTGGA TAAGG CCGAT	CTGTT GCTTG CACTT	GGTGT GCGGT TTGAT	GATCG cGTGA CAGGG>	11111 11111 11111	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111
XI12/8A	GTGGA TAAGG CCGAT	CTGTT GCTTG CACTT	GGTGT GCGGT TTGAT	GATCG TGTGA CAGGG		

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
XI12/8A	AAGAT TGAGG CTTTT GCAAG CAGGG CTAAG ATTGT GCACG TTGAT ATTGA TCCGG CTGAG					
W22/1A	AAGAT TGAGG CTTTT GCAAG CAGGG CTAAG ATTGT GCACG TTGAT ATTGA TCCGG CTGAG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
B73/7-4	AAGAT TGAGG CTTTT GCAAG CAGGG CTAAG ATTGT GCACG TTGAT ATTGA TCCGG CTGAG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	AAGAT TGAGG CTTTT GCAAG CAGGG CTAAG ATTGT GCACG TTGAT ATTGA TCCGG CTGAG					

	1150	1160	1170	1180	1190	1200
XI12/8A	ATTGG CAAGA ACAAG CAGCC ACATG TGTCC ATCTG TGCAG ATGTT AAGCT TGCTT TGCAG					
W22/1A	ATTGG CAAGA ACAAG CAGCC ACATG TGTCC ATCTG TGCAG ATGTT AAGCT TGCTT TGCAG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
B73/7-4	ATTGG CAAGA ACAAG CAGCC ACATG TGTCC ATCTG TGCAG ATGTT AAGCT TGCTT TGCAG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	ATTGG CAAGA ACAAG CAGCC ACATG TGTCC ATCTG TGCAG ATGTT AAGCT TGCTT TGCAG					

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
XI12/8A	GGCAT GAATG CTCTT CTTGA AGGAA GCACA TCAA GAAGA GCTTT GACTT TGGCT CATGG					
W22/1A	GGCAT GAATG CTCTT CTTGA AGGAA GCACA TCAA GAAGA GCTTT GACTT TGGCT CATGG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
B73/7-4	GGCAT GAATG CTCTT CTTGA AGGAA GCACA TCAA GAAGA GCTTT GACTT TGGCT CATGG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	GGCAT GAATG CTCTT CTTGA AGGAA GCACA TCAA GAAGA GCTTT GACTT TGGCT CATGG					

	1270	1280	1290	1300	1310	1320
XI12/8A	AACGA TGAGT TGGAT CAGCA GAAGA GGGAA TTCCC CCTTG GGTAT AAAAC ATCTA ATGAG					
W22/1A	AACGA TGAGT TGGAT CAGCA GAAGA GGGAA TTCCC CCTTG GGTAT AAAAC ATCTA ATGAG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
B73/65	AACGA TGAGT TGGAT CAGCA GAAGA GGGAA TTCCC CCTTG GGTAT AAAAC ATCTA ATGAG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	AACGA TGAGT TGGAT CAGCA GAAGA GGGAA TTCCC CCTTG GGTAT AAAAC ATCTA ATGAG					

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
XI12/8A	GAGAT CCAGC CACAA TATGC TATTC AGGTT CTTGA TGAGC TGACG AAAGG CGAGG CCATC					
W22/1A	GAGAT CCAGC CACAA TATGC TATTC AGGTT CTTGA TGAGC TGACG AAAGG CGAGG CCATC					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
B73/7-4	GAGAT CCAGC CACAA TATGC TATTC AGGTT CTTGA TGAGC TGACG AAAGG CGAGG CCATC					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	GAGAT CCAGC CACAA TATGC TATTC AGGTT CTTGA TGAGC TGACG AAAGG CGAGG CCATC					

	1390	1400	1410	1420	1430	1440
XI12/8A	ATCGG CACAG GTGTT GGGCA GCACC AGATG TGGGC GGCAC AGTAC TACAC TTACA AGCGG					
W22/1A	ATCGG CACAG GTGTT GGGCA GCACC AGATG TGGGC GGCAC AGTAC TACAC TTACA AGCGG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
B73/7-4	ATCGG CACAG GTGTT GGGCA GCACC AGATG TGGGC GGCAC AGTAC TACAC TTACA AGCGG					
	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	ATCGG CACAG GTGTT GGGCA GCACC AGATG TGGGC GGCAC AGTAC TACAC TTACA AGCGG					

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
XI12/8A	CCAAG GCAGT GGTGG TCTTC AGCTG GTCTT GGGGC TATGG GATTT GGTTT GCCGG CTGCT					
W22/1A	CCAAG GCAGT GGTGG TCTTC AGCTG GTCTT GGGGC TATGG GATTT GGTTT GCCGG CTGCT					
B73/7-4	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	CCAAG GCAGT GGTGG TCTTC AGCTG GTCTT GGGGC TATGG GATTT GGTTT GCCGG CTGCT					

	1510	1520	1530	1540	1550	1560
XI12/8A	GCTGG TGCTT CTGTG GCCAA CCCAG GTGTT ACTGT TGTTG ACATC GATGG AGATG GTAGC					
W22/1A	GCTGG TGCTT CTGTG GCaAA CCCAG GTGTT ACTGT TGTTG ACATC GATGG AGATG GTAGC					
B73/7-4	11111 11111 11111 11111 11111 1111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	GCTGG TGCTT CTGTG GCCAA CCCAG GTGTT ACTGT TGTTG ACATC GATGG AGATG GTAGC					

	1570	1580	1590	1600	1610	1620
XI12/8A	TTTCT CATGA ACGTT CAGGA GCTAG CTATG ATCCG AATTG AGAAC CTCCC GGTGA AGGTC					
W22/1A	TTTCT CATGA ACGTT CAGGA GCTAG CTATG ATCCG AATTG AGAAC CTCCC GGTGA AGGTC					
B73/7-4	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 1111 11111					
XI12/8A	TTTCT CATGA ACGTT CAGGA GCTAG CTATG ATCCG AATTG AGAAC CTCCC GGTGA AGGTC					

	1630	1640	1650	1660	1670	1680
XI12/8A	TTTGT GCTAA ACAAC CAGCA CCTGG GGATG GTGGT GCAGT GGGAG GACAG GTTCT ATAAG					
W22/1A	TTTGT GCTAA ACAAC CAGCA CCTGG GGATG GTGGT GCAGT GGGAG GACAG GTTCT ATAAG					
B73/7-4	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 1111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	TTTGT GCTAA ACAAC CAGCA CCTGG GGATG GTGGT GCAGT GGGAG GACAG GTTCT ATAAG					

	1690	1700	1710	1720	1730	1740
XI12/8A	GCCAA CAGAG CGCAC ACATA CTTGG GAAAC CCAGA GAATG AAAGT GAGAT ATATC CAGAT					
W22/1A	GCCAA CAGAG CGCAC ACATA CTTGG GAAAC CCAGA GAATG AAAGT GAGAT ATATC CAGAT					
B73/7-4	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	GCCAA CAGAG CGCAC ACATA CTTGG GAAAC CCAGA GAATG AAAGT GAGAT ATATC CAGAT					

	1750	1760	1770	1780	1790	1800
XI12/8A	TTCGT GACGA TCGCC AAAGG GTTCA ACATT CCAGC GGTCC GTGTG ACAA GAAGA ACGAA					
W22/1A	TTCGT GACGA TCGCC AAAGG GTTCA ACATT CCAGC GGTCC GTGTG ACAA GAAGA ACGAA					
B73/7-4	11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111 11111					
XI12/8A	TTCGT GACGA TCGCC AAAGG GTTCA ACATT CCAGC GGTCC GTGTG ACAA GAAGA ACGAA					

	1810	1820	1830	1840	1850	1860						
XI12/8A	GTCCG	CGCAG	CGATA	AAGAA	GATGC	TCGAG	ACTCC	AGGGC	CGTAC	CTCTT	GGATA	TAATC
W22/1A	GTCCG	CGCAG	CGATA	AAGAA	GATGC	TCGAG	ACTCC	AGGGC	CGTAC	CTCTT	GGATA	TAATC
	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111
B73/7-4	GTCCG	CGCAG	CGATA	AAGAA	GATGC	TCGAG	ACTCC	AGGGC	CGTAC	CTCTT	GGATA	TAATC
	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111
XI12/8A	GTCCG	CGCAG	CGATA	AAGAA	GATGC	TCGAG	ACTCC	AGGGC	CGTAC	CTCTT	GGATA	TAATC

	1870	1880	1890	1900	1910	1920						
XI12/8A	GTCCC	ACACC	AGGAG	CATGT	GTTGC	CTATG	ATCCC	TAATG	GTGGG	GCTTT	CAAGG	ATATG
W22/1A	GTCCC	ACACC	AGGAG	CATGT	GTTGC	CTATG	ATCCC	TA _g TG	GTGGG	GCTTT	CAAGG	ATATG
	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111
B73/7-4	GTCCC	ACACC	AGGAG	CATGT	GTTGC	CTATG	ATCCC	TA _g TG	GTGGG	GCTTT	CAAGG	ATATG
	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11 11	11111	11111	11111	11111	11111
XI12/8A	GTCCC	ACACC	AGGAG	CATGT	GTTGC	CTATG	ATCCC	TAATG	GTGGG	GCTTT	CAAGG	ATATG

	1930	1940	1950	1960						
XI12/8A	ATCCT	GGATG	GTGAT	GGCAG	GACTG	TGTAC	TGATC	TAAAA	TCCAG	CAAG
W22/1A	ATCCT	GGATG	GTGAT	GGCAG	GACTG	TGTAC	TGATC	TAAAA	TCCAG	CAAG>
	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	1111
B73/7-4	ATCCT	GGATG	GTGAT	GGCAG	GACTG	TGTAC	TGATC	TAAAA	TCCAG	CAAG>
	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	11111	1111
XI12/8A	ATCCT	GGATG	GTGAT	GGCAG	GACTG	TGTAC	TGATC	TAAAA	TCCAG	CAAG

	10	20	30	40	50	60						
XI12/8A	MATAA	AASTA	LTGAT	TAAPK	ARRRA	HLLAT	RRALA	APIRC	SAASP	AMPMA	PPATP	LRPWG
W22/1A	MATAA	AASTA	LTGAT	TAAPK	ARRRA	HLLAT	RRALA	APIRC	SAASP	AMPMA	PPATP	LRPWG
B73/7-4	MATAA	AASTA	LTGAT	TAAPK	ARRRA	HLLAT	RRALA	APIRC	SAASP	AMPMA	PPATP	LRPWG
XI12/8A	MATAA	AASTA	LTGAT	TAAPK	ARRRA	HLLAT	RRALA	APIRC	SAASP	AMPMA	PPATP	LRPWG

	70	80	90	100	110	120						
XI12/8A	PTDPR	KGADI	LVESL	ERCGV	RDVFA	YPGGA	SMEIH	QALTR	SPVIA	NHLFR	HEOGE	AFAAS
W22/1A	PTDPR	KGADI	LVESL	ERCGV	RDVFA	YPGGA	SMEIH	QALTR	SPVIA	NHLFR	HEOGE	AFAAS
B73/7-4	PTDPR	KGADI	LVESL	ERCGV	RDVFA	YPGGA	SMEIH	QALTR	SPVIA	NHLFR	HEOGE	AFAAS
XI12/8A	PTDPR	KGADI	LVESL	ERCGV	RDVFA	YPGGA	SMEIH	QALTR	SPVIA	NHLFR	HEOGE	AFAAS

	130	140	150	160	170	180						
XI12/8A	GYARS	SGRVG	VCIAT	SGPGA	TNLVS	ALADA	LLDSV	PMVAI	TGQVP	RRMIG	TDAFQ	ETPIV
W22/1A	GYARS	SGRVG	VCIAT	SGPGA	TNLVS	ALADA	LLDSV	PMVAI	TGQVP	RRMIG	TDAFQ	ETPIV
B73/7-4	GYARS	SGRVG	VCIAT	SGPGA	TNLVS	ALADA	LLDSV	PMVAI	TGQVP	RRMIG	TDAFQ	ETPIV
XI12/8A	GYARS	SGRVG	VCIAT	SGPGA	TNLVS	ALADA	LLDSV	PMVAI	TGQVP	RRMIG	TDAFQ	ETPIV

	190	200	210	220	230	240						
XI12/8A	EVTRS	ITKHN	YLVLD	VDDIP	RVVQE	AFFLA	SSGRP	GPVLV	DIPKD	IQQQM	AVPVW	DKPMS
W22/1A	EVTRS	ITKHN	YLVLD	VDDIP	RVVQE	AFFLA	SSGRP	GPVLV	DIPKD	IQQQM	AVPVW	DKPMS
B73/7-4	EVTRS	ITKHN	YLVLD	VDDIP	RVVQE	AFFLA	SSGRP	GPVLV	DIPKD	IQQQM	AVPVW	DKPMS
XI12/8A	EVTRS	ITKHN	YLVLD	VDDIP	RVVQE	AFFLA	SSGRP	GPVLV	DIPKD	IQQQM	AVPVW	DKPMS

	250	260	270	280	290	300						
XI12/8A	LPGYI	ARLPK	PPATE	LLEQV	LRLVG	ESRRP	VLYVG	GGCAA	SGEEL	RRFVE	LTGIP	VTTTL
W22/1A	LPGYI	ARLPK	PPATE	LLEQV	LRLVG	ESRRP	VLYVG	GGCAA	SGEEL	RRFVE	LTGIP	VTTTL
B73/7-4	LPGYI	ARLPK	PPATE	LLEQV	LRLVG	ESRRP	VLYVG	GGCAA	SGEEL	RRFVE	LTGIP	VTTTL
XI12/8A	LPGYI	ARLPK	PPATE	LLEQV	LRLVG	ESRRP	VLYVG	GGCAA	SGEEL	RRFVE	LTGIP	VTTTL

	310	320	330	340	350	360
XI12/8A	MGLGN FPSDD PLSLR	MLGMH GTVYA NYAVD	KADLL LALGV RFDDR	VTGKI EAFAS RAKIV		
W22/1A	MGLGN FPSDD PLSLR	MLGMH GTVYA NYAVD	KADLL LALGV RFDDR	VTGKI EAFAS RAKIV	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	MGLGN FPSDD PLSLR	MLGMH GTVYA NYAVD	KADLL LALGV RFDDR	VTGKI EAFAS RAKIV	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	MGLGN FPSDD PLSLR	MLGMH GTVYA NYAVD	KADLL LALGV RFDDR	VTGKI EAFAS RAKIV		

	370	380	390	400	410	420
XI12/8A	HVDID PAEIG KNKQP	HVSIC ADVKL ALQGM	NALLE GSTSK KSFDF	GSWND ELDQQ KREFF		
W22/1A	HVDID PAEIG KNKQP	HVSIC ADVKL ALQGM	NALLE GSTSK KSFDF	GSWND ELDQQ KREFF	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	HVDID PAEIG KNKQP	HVSIC ADVKL ALQGM	NALLE GSTSK KSFDF	GSWND ELDQQ KREFF	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	HVDID PAEIG KNKQP	HVSIC ADVKL ALQGM	NALLE GSTSK KSFDF	GSWND ELDQQ KREFF		

	430	440	450	460	470	480
XI12/8A	LGYKT SNEEI QPOYA	IQVLD ELTKG EAIIG	TGVGQ HQMWA AQYYT	YKRPR QWLSS AGLGA		
W22/1A	LGYKT SNEEI QPOYA	IQVLD ELTKG EAIIG	TGVGQ HQMWA AQYYT	YKRPR QWLSS AGLGA	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	LGYKT SNEEI QPOYA	IQVLD ELTKG EAIIG	TGVGQ HQMWA AQYYT	YKRPR QWLSS AGLGA	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	LGYKT SNEEI QPOYA	IQVLD ELTKG EAIIG	TGVGQ HQMWA AQYYT	YKRPR QWLSS AGLGA		

	490	500	510	520	530	540
XI12/8A	MGFGL PAAAG ASVAN	PGVTV VDIDG DGSFL	MNVQE LAMIR IENLP	VKVFV LNNQH LGMVV		
W22/1A	MGFGL PAAAG ASVAN	PGVTV VDIDG DGSFL	MNVQE LAMIR IENLP	VKVFV LNNQH LGMVV	11111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	MGFGL PAAAG ASVAN	PGVTV VDIDG DGSFL	MNVQE LAMIR IENLP	VKVFV LNNQH LGMVV	11111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	MGFGL PAAAG ASVAN	PGVTV VDIDG DGSFL	MNVQE LAMIR IENLP	VKVFV LNNQH LGMVV		

	550	560	570	580	590	600
XI12/8A	QWEDR FYKAN RAHTY	LGNPE NESEI YPDFV	TIAKG FNIPA VRVTK	KNEVR AAIKK MLETP		
W22/1A	QWEDR FYKAN RAHTY	LGNPE NESEI YPDFV	TIAKG FNIPA VRVTK	KNEVR AAIKK MLETP	1 111 11111 11111	11111 11111 11111
B73/7-4	QWEDR FYKAN RAHTY	LGNPE NESEI YPDFV	TIAKG FNIPA VRVTK	KNEVR AAIKK MLETP	1 111 11111 11111	11111 11111 11111
XI12/8A	QWEDR FYKAN RAHTY	LGNPE NESEI YPDFV	TIAKG FNIPA VRVTK	KNEVR AAIKK MLETP		

	610	620	630
XI12/8A	GPYLL DIIVP HQEHV	LPMIP NGGAF KDMIL	DGDGR TVY*
W22/1A	GPYLL DIIVP HQEHV	LPMIP NGGAF KDMIL	DGDGR TVY>
B73/7-4	GPYLL DIIVP HQEHV	LPMIP NGGAF KDMIL	DGDGR TVY>
XI12/8A	GPYLL DIIVP HQEHV	LPMIP NGGAF KDMIL	DGDGR TVY