

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036049**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.18

(21) Номер заявки
201690831

(22) Дата подачи заявки
2014.11.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/415 (2006.01)**
C12N 15/82 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ РАЗМЕРА СЕМЯН И ОРГАНОВ У РАСТЕНИЙ

(31) **1319876.7**

(32) **2013.11.11**

(33) **GB**

(43) **2016.11.30**

(86) **PCT/GB2014/053296**

(87) **WO 2015/067943 2015.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПЛАНТ БИОСАЙЕНС ЛИМИТЕД
(GB)**

(72) Изобретатель:
Беван Майкл, Дюмениль Джек (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A1-2009094717**

WO-A1-2009047525

T. XIA ET AL.: "The Ubiquitin Receptor DA1 Interacts with the E3 Ubiquitin Ligase DA2 to Regulate Seed and Organ Size in Arabidopsis", THE PLANT CELL ONLINE, vol. 25, no. 9, 1 September 2013 (2013-09-01), pages 3347-3359, XP055146588, ISSN: 1040-4651, DOI: 10.1105/tpc.113.115063, page 3353, column 2, lines 10-53; figure 6b

LI YUNHAI ET AL.: "Control of final seed and organ size by the DA1 gene family in Arabidopsis thaliana", GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, PLAINVIEW, NY, US, vol. 22, no. 10, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 1331-1336, XP002512707, ISSN: 0890-9369, DOI: 10.1101/GAD.463608, the whole document

WENJUAN FANG ET AL.: "Maternal control of seed size by EOD3/CYP78A6 in Arabidopsis thaliana", THE PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 70, no. 6, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 929-939, XP002694140, ISSN: 0960-7412, DOI: 10.1111/J.1365-313X.2012.04907.X, Retrieved from the Internet: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2012.04907.x/pdf> [retrieved on 2012-04-02], abstract

(57) Изобретение относится к экспрессии белка DA1 с мутацией, которая нарушает или инактивирует LIM-домен или LIM-подобный домен, в клетках растения. Данная экспрессия может увеличить урожайность или усилить связанный с урожайностью признак растения. Предложены способы, растения и клетки растений.

B1**036049****036049****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам изменения размеров семян и органов растений, например, для улучшения урожайности растений.

Уровень техники

Размер семян и органов является важным с точки зрения агрономии и экологии признаком, который находится под генетическим контролем (Alonso-Blanco, C. PNAS USA, 96, 4710-7 (1999); Song, X.J. Nat. Genet. 39, 623-30 (2007); Weiss, J. Int. J. Dev. Biol. 49, 513-25 (2005); Dinneny, J.R. Development, 131, 1101-10 (2004); Disch, S. Curr. Biol. 16, 272-9 (2006); Science, 289, 85-8 (2000); Horiguchi, G. Plant. J. 43, 68-78 (2005); Hu, Y. Plant. J. 47, 1-9 (2006); Hu, Y. Plant. Cell. 15, 1951-61 (2003); Krizek, B.A. Dev. Genet. 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. PNAS USA, 97, 942-7 (2000); Nath, U. Science, 299, 1404-7 (2003); Ohno, C.K. Development, 131, 1111-22 (2004); Szecsi, J. Embo J. 25, 3912-20 (2006); White, D.W. PNAS USA, 103, 13238-43 (2006); Horvath, B.M. Embo J. 25, 4909-20 (2006); Garcia, D. Plant Cell. 17, 52-60 (2005). Конечный размер семян и органов является постоянным в пределах конкретного вида, тогда как межвидовая вариативность размера семян и органов является значительно большей. Это свидетельствует о том, что растениями свойственны регуляторные механизмы, скоординированно и своевременно контролирующие рост семян и органов. Однако, несмотря на важность размера семян и органов, о молекулярных и генетических механизмах, контролирующих конечный размер семян и органов у растений, известно немного.

Генетическую регуляцию размера семян исследовали у растений, в том числе у помидоров, сои, маиса и риса, с применением картирования локуса количественных признаков (quantitative trait locus, QTL). В опубликованной на сегодняшний день литературе сообщается об обнаружении двух генов (Song, X.J. Nat. Genet. 39, 623-30 (2007); Fan, C. Theor. Appl. Genet. 112, 1164-1171 (2006)), соответствующих двум крупным QTL, отвечающим за размер зерен риса, хотя молекулярные механизмы функционирования данных генов до конца не изучены. У арабидопсиса были картированы 11 локусов, влияющих на массу и/или длину семян в продуктах скрещивания между изолятами Leg и Cvi (Alonso-Blanco, 1999 ссылка выше), но соответствующие гены не были обнаружены. В недавно проведенных исследованиях было показано, что AP2 и ARF2 вовлечены в контроль размера семян. Однако, к сожалению, мутанты *ap2* и *arf2* характеризуются меньшей фертильностью, чем дикий тип (Schruff, M.C. Development, 137, 251-261 (2006); Ohto, M.A. PNAS USA, 102, 3123-3128 (2005); Jofuku, K.D. PNAS USA, 102, 3117-3122 (2005)). Кроме того, исследования с применением мутантных растений позволили обнаружить несколько положительных и отрицательных регуляторов, влияющих на размер органов посредством воздействия на пролиферацию или размножение клеток (Krizek, B.A. Dev. Genet. 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 942-7 (2000); Nath, U. Science, 299, 1404-7 (2003); Ohno, C.K. Development, 131, 1111-22 (2004); Szecsi, J. Embo J. 25, 3912-20 (2006); White, D.W. PNAS USA, 103, 13238-43 (2006); Horvath, B.M. Embo J. 25, 4909-20 (2006); Garcia, D. Plant Cell, 17, 52-60 (2005). Horiguchi, G. Plant J. 43, 68-78 (2005); Hu, Y. Plant J. 47, 1-9 (2006); Dinneny, J.R. Development, 131, 1101-10 (2004)).

Известно, что на размер семян влияют несколько факторов, вовлеченных в активности, связанные с убиквитином. Фактор, ограничивающий рост, DA1, представляет собой рецептор убиквитина и содержит два убиквитин-взаимодействующих мотива (ubiquitin interaction motif, UIM), которые связывают убиквитин *in vitro*, и у мутанта *dal-1* образуются большие семена в результате влияния на материнские покровы семяпочки (Li et al., 2008). Мутации в энхансере *dal-1* (EOD1), который кодирует убиквитин-лигазу E3 BIG BROTHER (BB) (Disch et al., 2006; Li et al., 2008), синергетически усиливают фенотип размера семян *dal-1*. Это свидетельствует, что DA1 действует синергетически с EOD1/BB при осуществлении контроля размера семян.

Обнаружение дополнительных факторов, контролирующих итоговый размер семян и органов, не только улучшит понимание механизмов контроля размера у растений, но может также найти значительное практическое применение, например, для улучшения урожайности культур и биомассы растений для получения биотоплива.

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что нарушение LIM-домена и/или LIM-подобного домена в белках DA1 растений не препятствует гомодимеризации или активности DA, а вместо этого предоставляет доминантно-негативный фенотип.

В аспекте настоящего изобретения предложен способ увеличения урожайности растения или усиления связанного с урожайностью признака у растения, включающий осуществление экспрессии белка DA1, содержащего инактивированный LIM-домен или LIM-подобный домен, в клетках указанного растения.

Белок DA1 может содержать одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью дикого типа, которые нарушают или инактивируют LIM-домен или LIM-подобный домен белка DA1.

Экспрессия белка DA1 с нарушенным или инактивированным LIM-доменом или LIM-подобным доменом усиливает один или несколько связанных с урожайностью признаков и увеличивает урожайность растения.

Белок DA1, который содержит инактивированный LIM-домен или LIM-подобный домен, можно экспрессировать из кодирующей последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты в одной или

нескольких клетках растения или можно экспрессировать из кодирующей последовательности эндогенной нуклеиновой кислоты в одной или нескольких клетках растения.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения растения с увеличенной урожайностью и/или с одним или несколькими усиленными признаками, связанными с урожайностью, включающий

введение в клетку растения гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок DA1, который содержит инактивированный LIM-домен или LIM-подобный домен; или

введение в нуклеотидную последовательность клетки растения, кодирующую белок DA1, мутации, вследствие которой LIM-домен или LIM-подобный домен белка DA1 становится инактивированным; и регенерацию растения из клетки растения.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена клетка растения, содержащая гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок DA1, который содержит инактивированный LIM-домен или LIM-подобный домен.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено растение, содержащее одну или несколько клеток растения, которые содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок DA1, который содержит инактивированный LIM-домен или LIM-подобный домен.

Растение может демонстрировать увеличенную урожайность или усиление связанного с урожайностью признака по сравнению с контролями.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены характеристики восьми остатков, связывающих цинк (1-8), и расстояния между ними в LIM-домене, установленные в результате анализа 135 последовательностей LIM человека. Редко наблюдаемые участки (<10%) консервативной последовательности и топография LIM-домена.

На фиг. 2 представлена топология координации Zn в LIM-домене. Круги с цифрой внутри (①) обозначают остатки, связывающие Zn. Полуконсервативные алифатические/объемные остатки показаны (○), неконсервативные остатки, расположенные на постоянном расстоянии, - (●). Пунктирные круги (⊖) обозначают переменное число остатков (X), возможное в пространстве.

На фиг. 3 представлены результаты иммунопреципитации *in vitro*, которые демонстрируют связывание dallim8 с DA1 дикого типа. Экспрессированные в *E.coli* белки-приманки, меченные GST (глутатион-S-трансферазой), инкубировали с экспрессированными в *E.coli* белками-добычей, меченными меткой FLAG, с последующей очисткой на гранулах глутатион-сефарозы и анализом методом иммуноблоттинга для обнаружения GST и FLAG. FLAG-DA1 и FLAG-dallim8 были выделены совместно с GST-DA1 и GST-dallim8 (дорожки 5, 6, 8, 9), но не с отрицательным контролем GST-GUS (дорожки 2, 3); данные результаты свидетельствуют, что введения мутации в LIM-домен DA1 недостаточно для устранения физического взаимодействия между белками DA1.

На фиг. 4 представлен эффект мутации lim8 на размер семян у расы Col.

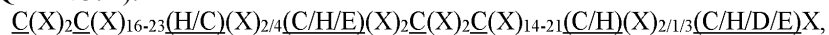
Подробное описание вариантов реализации изобретения

Настоящее изобретение относится к экспрессии белков DA1, в которых LIM- или LIM-подобный домен является нарушенным или инактивированным (в настоящем документе в совокупности называются белками DA1 с нарушенным LIM), у растений. Данная экспрессия может быть пригодной для изменения признаков растения, которые влияют на урожайность, таких как размер семян и органов.

DA1 представляет собой рецептор убиквитина растений, который подробно описан в публикациях Li et al. (2008), Wang, et al. (2012) и WO 2009/047525.

Белки DA1 характеризуются наличием LIM-домена, LIM-подобного домена, консервативного C-концевого домена и одного или нескольких UIM-доменов.

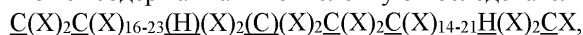
LIM-домен содержит два мотива "цинкового пальца" и может содержать аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 1):



где X представляет собой любую аминокислоту и остатки, координирующие Zn, подчеркнуты.

Остатки в LIM-домене, координирующие Zn, могут представлять собой C, H, D или E, предпочтительно C.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения LIM-домен может содержать мотивы CXXC, HXXCXXCXXC и HxxC, где X представляет собой любую аминокислоту. Например, LIM-домен может содержать аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 2):



где X представляет собой любую аминокислоту и остатки, координирующие Zn, подчеркнуты.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения LIM-домен может содержать аминокислотную последовательность LIM-домена AtDA1 (SEQ ID NO: 3):



где остатки, координирующие Zn, подчеркнуты.

Другие LIM-домены включают LIM-домен согласно аминокислотной последовательности DA1, представленной в табл. 1 (пунктирный квадрат), например, остатки со 141 по 193 SEQ ID NO: 4

(Si_GI-514815267.pro), остатки со 123 по 175 SEQ ID NO: 5 (Bd_GI-357157184.pro), остатки со 155 по 207 SEQ ID NO: 6 (Br_DA1b.pro), остатки со 172 по 224 SEQ ID NO: 7 (Br_DA1a.pro), остатки со 172 по 224 SEQ ID NO: 8 (At_GI-15221983.pro), остатки со 117 по 169 SEQ ID NO: 9 (Tc_GI-508722773.pro), остатки со 117 по 169 SEQ ID NO: 10 (Gm_GI-356564241.pro), остатки со 121 по 173 SEQ ID NO: 11 (Gm_GI-356552145.pro), остатки со 119 по 171 SEQ ID NO: 12 (Vv_GI-302142429.pro), остатки со 122 по 174 SEQ ID NO: 13 (Vv_GI-359492104.pro), остатки со 125 по 177 SEQ ID NO: 14 (Sl_GI-460385048.pro), остатки с 516 по 568 SEQ ID NO: 15 (Os_GI-218197709.pro), остатки со 124 по 176 SEQ ID NO: 16 (Os_GI-115466772.pro), остатки со 150 по 202 SEQ ID NO: 17 (Bd_GI-357160893.pro), остатки со 132 по 184 SEQ ID NO: 18 (Bd_GI-357164660.pro), остатки со 124 по 176 SEQ ID NO: 19 (Sb_GI-242092232.pro), остатки со 147 по 199 SEQ ID NO: 20 (Zm_GI-212275448.pro), остатки со 190 по 242 SEQ ID NO: 21 (At_GI-240256211.pro), остатки со 162 по 214 SEQ ID NO: 22 (At_GI-145360806.pro), остатки с 1240 по 1291 SEQ ID NO: 23 (At_GI-22326876.pro), остатки с 80 по 122 SEQ ID NO: 24 (At_GI-30698242.pro), остатки с 347 по 402 SEQ ID NO: 25 (At_GI-30698240.pro), остатки с 286 по 341 SEQ ID NO: 26 (At_GI-15240018.pro) или остатки с 202 по 252 SEQ ID NO: 27 (At_GI-334188680.pro).

Последовательности LIM-домена можно обнаружить с применением стандартных методик анализа последовательности (например, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

LIM-подобный домен содержит два мотива "цинкового пальца" и может содержать мотивы CXXC, HXXXXXXXXCXXH и CxxC, где X представляет собой любую аминокислоту. Например, LIM-подобный домен может содержать аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 28):

CX₂CX₁₆₋₂₃HX₇CX₂HX₇CX₂CX₁₉CX₂C

где X представляет собой любую аминокислоту, остатки, координирующие Zn, подчеркнуты сплошной чертой и предполагаемые остатки, координирующие Zn, подчеркнуты пунктиром.

Предпочтительно LIM-подобный домен может содержать аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 29):

CXVCX₁₆₋₂₃HPFWX₃YCPXHX₇CCSCERXEX₅YX₂LXDXXRLCXXC

где X представляет собой любую аминокислоту, остатки, координирующие Zn, подчеркнуты сплошной чертой и предполагаемые остатки, координирующие Zn, подчеркнуты пунктиром.

Более предпочтительно LIM-подобный домен может содержать аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 30):

C(D/E/Y/H)VCXX(F/K)(I/K/F)(P/S/Отсутствует)(T/R/V/Отсутствует)(N/T/Отсутствует)XX(G/Отсутствует)(L/I/M/G)(R/K/I)(E/G/K/T)(Y/F)(R/H/S/N/K)(A/C/E/I/N)HPFWX(Q/E)(K/T/R)YCP(F/V/I/S/T)H(E/D)XD(G/K/R/S/A)T(P/T/A)(R/K)CCSCER(M/L)E(P/S/H)X₄YX₂LXD(G/F/N)R(R/K/S/W)LC(L/R/V)(E/K)C

где X представляет собой любую аминокислоту, остатки, координирующие Zn, подчеркнуты сплошной чертой и предполагаемые остатки, координирующие Zn, подчеркнуты пунктиром.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения LIM-подобный домен может содержать аминокислотную последовательность LIM-подобного домена AtDA1:

CDVCSHFIPNTNHAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDATPRCCSCERMEPRNTRYVELN

DGRKLCLEC (SEQ ID NO: 31)

Другие LIM-подобные домены включают LIM-домен согласно аминокислотной последовательности DA1, представленной в табл. 1 (сплошной квадрат), например, остатки с 200 по 266 SEQ ID NO: 4 (Si_GI-514815267.pro), остатки со 182 по 248 SEQ ID NO: 5 (Bd_GI-357157184.pro), остатки с 214 по 280 SEQ ID NO: 6 (Br_DA1b.pro), остатки с 231 по 297 SEQ ID NO: 7 (Br_DA1a.pro), остатки с 231 по 297 SEQ ID NO: 8 (At_GI-15221983.pro), остатки со 176 по 242 SEQ ID NO: 9 (Tc_GI-508722773.pro), остатки со 176 по 242 SEQ ID NO: 10 (Gm_GI-356564241.pro), остатки со 180 по 246 SEQ ID NO: 11 (Gm_GI-356552145.pro), остатки со 178 по 244 SEQ ID NO: 12 (Vv_GI-302142429.pro), остатки со 181 по 247 SEQ ID NO: 13 (Vv_GI-359492104.pro), остатки со 184 по 250 SEQ ID NO: 14 (Sl_GI-460385048.pro), остатки с 575 по 641 SEQ ID NO: 15 (Os_GI-218197709.pro), остатки со 183 по 149 SEQ ID NO: 16 (Os_GI-115466772.pro), остатки с 209 по 275 SEQ ID NO: 17 (Bd_GI-357160893.pro), остатки со 191 по 257 SEQ ID NO: 18 (Bd_GI-357164660.pro), остатки со 183 по 249 SEQ ID NO: 19 (Sb_GI-242092232.pro), остатки с 206 по 272 SEQ ID NO: 20 (Zm_GI-212275448.pro), остатки с 249 по 315 SEQ ID NO: 21 (At_GI-240256211.pro), остатки с 221 по 287 SEQ ID NO: 22 (At_GI-145360806.pro), остатки с 1298 по 1363 SEQ ID NO: 23 (At_GI-22326876.pro), остатки со 130 по 176 SEQ ID NO: 24 (At_GI-30698242.pro), остатки с 406 по 465 SEQ ID NO: 25 (At_GI-30698240.pro), остатки с 345 по 404 SEQ ID NO: 26 (At_GI-15240018.pro) или остатки с 256 по 319 SEQ ID NO: 27 (At_GI-334188680.pro).

Последовательности LIM-подобного домена в других белках DA1 можно обнаружить с применением стандартных методик анализа последовательности, используя информацию, приведенную выше (например, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

Помимо LIM-домена и LIM-подобного домена, белок DA1 может дополнительно содержать карбокси-концевую область, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 20%,

по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% аминокислот идентичную последовательности остатков со 198 по 504 SEQ ID NO: 4, остатков со 180 по 487 SEQ ID NO: 5, остатков с 212 по 514 SEQ ID NO: 6, остатков с 229 по 532 SEQ ID NO: 7, остатков с 229 по 532 SEQ ID NO: 8, остатков со 174 по 478 SEQ ID NO: 9, остатков со 174 по 474 SEQ ID NO: 10, остатков со 178 по 478 SEQ ID NO: 11, остатков со 176 по 462 SEQ ID NO: 12, остатков со 179 по 482 SEQ ID NO: 13, остатков со 182 по 486 SEQ ID NO: 14, остатков с 573 по 878 SEQ ID NO: 15, остатков со 181 по 486 SEQ ID NO: 16, остатков с 207 по 512 SEQ ID NO: 17, остатков со 189 по 491 SEQ ID NO: 18, остатков со 181 по 486 SEQ ID NO: 19, остатков с 204 по 508 SEQ ID NO: 20, остатков с 247 по 553 SEQ ID NO: 21, остатков с 219 по 528 SEQ ID NO: 22, остатков с 1296 по 1613 SEQ ID NO: 23, остатков со 128 по 450 SEQ ID NO: 24, остатков с 404 по 702 SEQ ID NO: 25, остатков с 343 по 644 SEQ ID NO: 26 или остатков с 256 по 587 SEQ ID NO: 27.

Карбокси-концевая область белка DA1 может содержать мотив активного сайта металлопептидазы HEMMH (SEQ ID NO: 32).

Карбокси-концевая область может дополнительно содержать мотив EK(X)₈R(X)₄SEEQ (SEQ ID NO: 33) или EK(X)₈R(X)₄SEQ (SEQ ID NO: 34), расположенный между LIM-доменом и мотивом HEMMH.

Помимо LIM-домена и консервативной карбокси-концевой области, белок DA1 может содержать домен UIM1 и домен UIM2. Домены UIM1 и UIM2 могут быть расположены между N-концом и LIM-доменом белка DA1.

Домен UIM1 может состоять из последовательности SEQ ID NO: 35, а домен UIM2 может состоять из последовательности SEQ ID NO: 36.

p---pLpbAl pb.Sbp-.pp p (SEQ ID NO: 35)

p---pLpbAl pb.Sbp-spp p (SEQ ID NO: 36),

где p представляет собой остаток полярной аминокислоты, например, C, D, E, H, K, N, Q, R, S или T;

b представляет собой остаток большой аминокислоты, например, E, F, H, I, K, L, M, Q, R, W или Y;

s представляет собой остаток небольшой аминокислоты, например, A, C, D, G, N, P, S, T или V;

l представляет собой остаток алифатической аминокислоты, например, I, L или V;

. отсутствует или представляет собой любую аминокислоту;

- представляет собой любую аминокислоту.

Дополнительные примеры последовательностей доменов UIM1 и UIM2 можно обнаружить с применением стандартных методик анализа последовательности, описанных в настоящем документе (например, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения белок DA1 может содержать

LIM-домен согласно SEQ ID NO: 1;

LIM-подобный домен согласно SEQ ID NO: 28;

C-концевую область, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 20% остаткам с 229 по 532 SEQ ID NO: 8, или эквивалентную область любой из SEQ ID NO: 4-7 или 9-27, изложенных выше, и содержащую мотив EK(X)₈R(X)₄SEEQ или EK(X)₈R(X)₄SEQ и мотив HEMMH, домен UIM SEQ ID NO: 35 и домен UIM SEQ ID NO: 36.

Белок DA1 может содержать аминокислотную последовательность белка DA1 растения, представленную в табл. 1 (SEQ ID NO: 4-27), или может представлять собой аллель или вариант одной из данных последовательностей, который обладает активностью DA1.

Например, белок DA1 может содержать аминокислотную последовательность AtDA1, AtDAR1, AtDAR2, AtDAR3, AtDAR4, AtDAR5, AtDAR6, AtDAR7, BrDA1a, BrDA1b, BrDAR1, BrDAR2, BrDAR3-7, BrDAL1, BrDAL2, BrDAL3, OsDA1, OsDAR2, OsDAL3, OsDAL5, PpDAL1, PpDAL2, PpDAL3, PpDAL4, PpDAL5, PpDAL6, PpDAL7, PpDAL8, SmDAL1, SmDAL2 или ZmDA1 (ACR35367.1 GI:238008664), предпочтительно AtDA1, AtDAR1 BrDA1a, BrDA1b, OsDA1 или ZmDA1 либо аллель или вариант одной из данных последовательностей.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения белок DA1 может содержать аминокислотную последовательность AtDA1 (SEQ ID NO: 8; AT1G19270; NP_173361.1 GI: 15221983) или может представлять собой аллель или вариант данной последовательности, который обладает активностью DA1.

Другие последовательности белка DA1, которым свойственны характерные особенности, изложенные выше, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие DA1, можно обнаружить с применением стандартных инструментов для анализа последовательности в любых видах растений, представляющих интерес.

Белок DA1 у видов растений, представляющих интерес, может содержать аминокислотную последовательность, которая представляет собой вариант эталонной аминокислотной последовательности бел-

ка DA1, изложенной в настоящем документе.

Белок DA1, который представляет собой гомолог или вариант эталонной последовательности DA1 растения, такой как любая из SEQ ID NO: 4-27, может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% эталонной последовательности.

Конкретные варианты аминокислотной последовательности, которые возникают у видов растений, могут отличаться от эталонной последовательности, изложенной в настоящем документе, в результате вставки, добавления, замены или делеции 1 аминокислоты, 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50 или более 50 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид DA1, который представляет собой вариант последовательности AtDA1 согласно любой из SEQ NO: 4-27, может содержать LIM-домен, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3, и LIM-подобный домен, содержащий последовательность SEQ ID NO: 31.

Нуклеиновая кислота, кодирующая белок DA1, может содержать нуклеотидную последовательность, изложенную в записи базы данных, которую выбирают из группы, включающей NM_101785.3 GI:42562170 (AtDA1); NM_001057237.1 GI:115454202 (OsDA1); BT085014.1 GI: 238008663 (ZmDA1), или может представлять собой аллель или вариант одной из данных последовательностей, которые кодируют активный белок DA1.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая белок DA1, может содержать нуклеотидную последовательность AtDA1 (NM_101785.3 GI: 42562170), ZmDA1 (BT085014.1 GI: 238008663), OsDA1 (NM_001057237.1 GI:115454202) или может представлять собой аллель или вариант любой из данных последовательностей, кодирующих белок с активностью DA1.

Нуклеиновая кислота, которая кодирует белок DA1 у видов растений, представляющих интерес, может содержать нуклеотидную последовательность, которая представляет собой вариант эталонной нуклеотидной последовательности DA1, изложенной в настоящем документе.

Полипептиды DA1 и кодирующие нуклеиновые кислоты можно обнаружить в видах растений, в частности культурных растений, таких как пшеница, ячмень, маис, рис и другие сельскохозяйственные растения, с применением общепринятых методик анализа последовательности.

Например, вариант нуклеотидной последовательности может представлять собой гомолог эталонной последовательности DA1, изложенной в настоящем документе, и может отличаться от эталонной нуклеотидной последовательности DA1 одним или несколькими добавлениями, вставками, делециями или заменами одного или нескольких нуклеотидов в нуклеиновой кислоте, например 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50 или более 50, что приводит к добавлению, вставке, делеции или замене одной или нескольких аминокислот в кодируемом белке. Разумеется, также включены изменения в нуклеиновой кислоте, которые не влияют на кодируемую аминокислотную последовательность. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок DA1, может содержать последовательность, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 20% или по меньшей мере 30% с последовательностью эталонной нуклеиновой кислоты, предпочтительно по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98%. Идентичность последовательности описана в настоящем документе.

Идентичность последовательности обычно определяют на основании алгоритма GAP (Wisconsin Package, Accelrys, San Diego, USA). В GAP используется алгоритм Нидлмана-Вунша для выравнивания двух полных последовательностей, который увеличивает до максимума количество совпадений и уменьшает до минимума количество пропусков. Как правило, используют параметры по умолчанию со штрафом за введение пропуска ("gap creation penalty") 12 и штрафом за удлинение пропуска ("gap extension penalty") 4. Применение GAP может быть предпочтительным, однако можно использовать и другие алгоритмы, например BLAST (в котором используется способ Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:405-410), FASTA (в котором используется способ Pearson and Lipman (1988), PNAS USA, 85:2444-2448) или алгоритм Смита-Вотермана (Smith and Waterman (1981), J. Mol Biol. 147:195-197) либо программу TBLASTN, Altschul et al. (1990) ссылка выше, как правило, с использованием параметров по умолчанию. В частности, можно применять алгоритм psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997), 25:3389-3402).

Сравнение последовательностей можно проводить по всей длине соответствующей последовательности, описанной в настоящем документе.

Нуклеотидную последовательность DA1, которая представляет собой вариант эталонной последовательности нуклеиновой кислоты DA1, изложенной в настоящем документе, можно селективно гибридизовать в строгих условиях с данной эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью, комплементарной указанной последовательности.

Строгие условия включают, например, в случае гибридизации последовательностей, которые являются идентичными приблизительно на 80-90%, гибридизацию в течение ночи при температуре 42°C в 0,25 М Na₂HPO₄, pH 7,2, 6,5% SDS (додецилсульфате натрия), 10% сульфате декстрана и завершающую промывку при температуре 55°C в 0,1× SSC (цитрате и хлориде натрия), 0,1% SDS. Условия, подходящие для обнаружения последовательностей, которые идентичны более чем приблизительно на 90%, включают гибридизацию в течение ночи при температуре 65°C в 0,25 М Na₂HPO₄, pH 7,2, 6,5% SDS, 10% сульфате декстрана и завершающую промывку при температуре 60°C в 0,1× SSC, 0,1% SDS.

Альтернативный вариант, который может быть особенно пригодным в случае препаратов нуклеиновой кислоты растений, представляет собой 5× раствор SSPE (конечная концентрация 0,9 М NaCl, 0,05 М фосфат натрия, 0,005 М EDTA, pH 7,7), 5× раствор Денхардта, 0,5% SDS при температуре 50°C или 65°C в течение ночи. Промывки можно проводить в 0,2× SSC/0,1% SDS при температуре 65°C или при температуре 50-60°C в 1× SSC/0,1% SDS, при необходимости.

Белки DA1 и кодирующие нуклеиновые кислоты можно обнаружить в видах растений, в частности культурных растений, таких как пшеница, ячмень, маис, рис и другие сельскохозяйственные растения, с применением общепринятых методик анализа последовательности и/или сравнения с эталонными последовательностями, изложенными в настоящем документе.

LIM-домен, LIM-подобный домен или как LIM-домен, так и LIM-подобный домен белка DA1 для применения, описанного в настоящем документе, могут являться инактивированными или нарушенными ("белок DA1 с нарушенным LIM").

LIM-домены и LIM-подобные домены, которые подробно описаны выше, можно обнаружить в пределах любого белка DA1 с применением стандартных методик анализа последовательности.

Белок DA1 с инактивированным или нарушенным LIM-доменом или LIM-подобным доменом может демонстрировать нарушенную, например увеличенную или активированную, пептидазную активность. Например, инактивация или нарушение LIM-домена или LIM-подобного домена может уменьшить или предотвратить взаимодействие домена с С-концевой областью белка DA1 и ингибирование пептидазной активности DA1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок DA1 с инактивированным или нарушенным LIM-доменом или LIM-подобным доменом может демонстрировать уменьшенную стабильность в клетке растения после убиквитинилирования по сравнению с белком DA1 дикого типа.

Нарушенный или инактивированный LIM-домен или LIM-подобный домен может быть не способен координировать Zn или образовывать мотивы "цинкового пальца", что препятствует осуществлению функции домена, т.е. нарушенный LIM- или LIM-подобный домен не способен опосредовать белок-белковые взаимодействия. Например, нарушенный LIM-домен или LIM-подобный домен может быть не способен внутримолекулярно взаимодействовать с С-концевой областью белка DA1 для ингибирования пептидазной активности.

Инактивированный или нарушенный LIM-домен или LIM-подобный домен может содержать изменение или мутацию последовательности, которая устраняет один или несколько мотивов "цинкового пальца" в LIM- или LIM-подобном домене.

Аминокислотная последовательность белка DA1 может быть изменена или мутирована посредством вставки, замены или делеции одной или нескольких аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа с целью инактивировать LIM-домен или LIM-подобный домен. Например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более аминокислот могут быть изменены, например делетированы или замещены, по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения могут быть изменены от 1 до 30, от 1 до 20 или от 1 до 10 остатков.

Единичные замены аминокислот в пределах LIM-доменов и LIM-подобных доменов достаточны, чтобы вызвать фенотип нокаута LIM. LIM-домены, например, можно инактивировать посредством мутаций остатков, координирующих Zn, или других остатков в пределах LIM-домена (McIntosh et al. (1998), *Am. J. Human Genet.* 63:1651-16581; Clough et al. (1999), *Human mutation*, 14:459-465; Hamlington et al. (2001), *Human mutation*, 18:458-464; Taira et al., *Nature*, 1994, 372, 677-9; Agulnick et al., *Nature*, 1996, 384, 270-2). LIM-подобные домены можно также инактивировать в результате мутаций остатков, координирующих Zn (т.е. консервативных остатков Cys), или других остатков в пределах LIM-подобного домена (Yang et al. *Plant Journal*, (2010), 63, 283-296).

Подходящие инактивирующие или нарушающие мутации расположены предпочтительно в пределах LIM-домена или LIM-подобного домена или поблизости от данных доменов.

Инактивированный или нарушенный LIM-домен или LIM-подобный домен может содержать мутацию одного или нескольких остатков, координирующих Zn, или предполагаемых остатков, координирующих Zn, например остатка цистеина или гистидина в окружении CxxC или CXXH, и/или мутацию одного или нескольких аминокислотных остатков, не координирующих Zn.

Инактивированный или нарушенный LIM-домен может содержать мутацию одного или нескольких из первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого и восьмого остатков, координи-

рующих Zn, в LIM-домене, представленном в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 выше. Например, инактивированный или нарушенный LIM-домен может содержать мутацию одного или нескольких остатков цистеина в мотиве CXXC или остатков цистеина или гистидина в мотиве HXXC, например остатков цистеина/гистидина, представленных в положениях 1, 4, 22, 25, 28, 31, 49 и 52 SEQ ID NO: 3 и подчеркнутых в SEQ ID NO: 1 и 2 выше. LIM-домен указанного белка DA1 может содержать мутацию одного или нескольких подчеркнутых остатков LIM-домена DA1, представленного выше, предпочтительно C141, C144, H162, C165, C168, C171, H189 и C192 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 4, C123, C126, H144, C147, C150, C153, H171 и C174 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 5, C155, C158, H176, C179, C182, C185, H203 и C206 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 6, C172, C175, H193, C196, C199, C202, H220 и C223 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 7, C172, C175, H193, C196, C199, C202, H220 и C223 в последовательности AtDA1 согласно SEQ ID NO: 8, C117, C120, H138, C141, C144, C147, H165 и C168 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 9, C177, C180, H198, C201, C204, C207, H225 и C228 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 10, C121, C124, H142, C145, C148, C151, H169 и C172 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 11, C119, C122, H140, C143, C146, C149, H167 и C170 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 12, C122, C125, H143, C146, C149, C152, H170 и C173 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 13, C125, C128, H146, C149, C152, C155, H173 и C176 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 14, C516, C519, H537, C540, C543, C546, H564 и C567 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 15, C124, C127, H145, C148, C151, C154, H172 и C175 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 16, C150, C153, H171, C174, C177, C180, H198 и C201 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 17, C132, C135, H153, C156, C159, C162, H180 и C183 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 18, C124, C127, H145, C148, C151, C154, H172 и C175 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 19, C147, C150, H168, C172, C175, C178, H196 и C199 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 20, C190, C193, H211, C204, C207, C210, H228 и C231 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 21, C162, C165, H183, C186, C189, C192, H210 и C213 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 22, C1240, C1243, H1261, C1264, C1267, C1270, H1287 и C1290 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 23, C347, C350, H368, C371, C374, C377, H398 и C401 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 25, C286, C289, H307, C310, C313, C316, H337 и C340 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 26, C201, C204, H222, C225, C228, C231, H248 и C251 в последовательности DA1 согласно SEQ ID NO: 27 или эквивалентных остатков цистеина в другой последовательности белка DA1.

Например, белок DA1 с нарушенным LIM может содержать замену С на У, С на Г или другие замены в одном или нескольких из данных положений.

Остатки, координирующие Zn, в пределах LIM-домена белка DA1 можно обнаружить с применением стандартных анализов последовательности. Остатки цистеина и гистидина, эквивалентные C172, C175, H193, C196, C199, C202, H220 и C223 в SEQ ID NO: 8, представляют собой остатки последовательности, находящиеся в том же окружении в другой последовательности белка DA1, которые можно обнаружить с применением стандартных анализов последовательности, представленной в табл. 1.

Инактивированный или нарушенный LIM-домен может содержать мутацию одного или нескольких остатков, не координирующих Zn, в LIM-домене, представленном в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 выше. Остаток, не координирующий Zn, может быть расположен в пределах 4 остатков от остатка, координирующего Zn, в последовательности LIM-домена или может быть расположен на 4 или более остатков дальше от остатка, координирующего Zn.

Инактивированный или нарушенный LIM-подобный домен может содержать мутацию одного или нескольких из первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого и восьмого остатков, координирующих Zn, или предполагаемых остатков, координирующих Zn, в LIM-подобном домene, представленном в любой из SEQ ID NO: 28-31 выше. Например, инактивированный или нарушенный LIM-подобный домен может содержать мутацию одного или нескольких остатков цистеина в мотиве CXXC или остатка цистеина или гистидина в мотиве CXXH, например, остатков цистеина/гистидина, представленных в положениях 1, 4, 29, 32, 40, 43, 63 или 66 SEQ ID NO: 31 и подчеркнутых в SEQ ID NO: 28-31 выше. Два из трех предполагаемых остатков, координирующих Zn, H252, C260, H263 в LIM-подобном домene отвечают за координацию Zn (т.е. H252 и C260; H252 и H263; или C260 и H263). LIM-подобный домен указанного белка DA1 может содержать мутацию одного или нескольких подчеркнутых остатков AtDA1 LIM-подобного домена, представленного выше, предпочтительно, C232, C235, H252, C260, H263, C271, C274, C294 и/или C297 последовательности AtDA1 согласно SEQ ID NO: 8, или эквивалентных остатков цистеина в последовательности другого белка DA1. Например, белок DA1 с нарушенным LIM может содержать замены С на У, С на Г или другие замены в одном или нескольких из данных положений.

Остатки цистеина, эквивалентные C232, C235, H252, C260, H263, C271, C274, C294 и C297 в SEQ ID NO: 8, представляют собой остатки последовательности, находящиеся в том же окружении в различных последовательностях белка DA1, которые можно обнаружить с применением стандартных анализов последовательности, представленной в табл. 1.

Инактивированный или нарушенный LIM-подобный домен может содержать мутацию одного или нескольких остатков в LIM-подобном домене, отличных от консервативных остатков цистеина или гистидина, показанных в SEQ ID NO: 28 - SEQ ID NO: 31 выше. Подходящие остатки могут быть расположены в пределах 4 остатков от консервативного остатка цистеина или гистидина в последовательности LIM-подобного домена или могут быть расположены на 4 или более остатков дальше от консервативного остатка цистеина или гистидина.

Некоторые предпочтительные мутации включают преобразование остатка, координирующего Zn, в LIM- или LIM-подобном домене, такого как цистеин или гистидин, в нейтральную аминокислоту, такую как глицин.

Специалисту будут очевидны другие мутации, которые нарушают мотивы "цинкового пальца" и являются подходящими для устранения LIM- или LIM-подобной функции в белке DA1. В отличие от мутаций в других доменах в пределах белка DA1, мутации LIM-домена и LIM-подобного домена дестабилизируют белок DA1 в присутствии его взаимодействующего партнера EOD1 в клетке растения. Вследствие этого подходящие мутации LIM-домена и LIM-подобного домена можно обнаружить посредством определения стабильности мутантного белка DA1 в присутствии EOD1 с применением стандартных методик проведения экспериментов. Уменьшение стабильности по сравнению с DA1 дикого типа свидетельствует, что мутация нарушает LIM- или LIM-подобный домен.

Белок DA1 с нарушенным LIM, описанный в настоящем документе, может содержать консервативный остаток R, расположенный в аминокислотной последовательности DA1 в положении, которое является эквивалентным положению 358 в SEQ ID NO: 8 DA1 *A. thaliana*, положению 333 в SEQ ID NO: 8 DA1 *Z. mays* или эквивалентным положению в другой аминокислотной последовательности DA1, например, в последовательности DA1 согласно табл. 1 (консервативный остаток R отмечен стрелкой). Консервативный остаток R, который расположен в аминокислотной последовательности DA1 в положении, которое эквивалентно положению 358 в SEQ ID NO: 8 DA1 *A. thaliana* или положению 333 в DA1 *Z. mays* согласно SEQ ID NO: 20, расположен в положении в пределах аминокислотной последовательности DA1, которое соответствует R333 в SEQ ID NO:20 и R358 в SEQ ID NO:8, т.е. находится в том же положении относительно других мотивов и доменов белка DA1. Консервативный остаток R расположен между LIM-доменом и мотивом пептидазы HEMMH (SEQ ID NO: 32) С-концевой области и является полностью консервативным и находящимся в том же окружении в последовательностях белков DA1. Консервативный остаток R может содержаться в мотиве EK(X)₈R(X)₄SEEQ (SEQ ID NO: 33) или EK(X)₈R(X)₄SEQ (SEQ ID NO: 34) в пределах С-концевой области.

Данные, приведенные в настоящем документе, демонстрируют, что LIM-домен и LIM-подобный домен не опосредуют гомодимеризацию DA1, и белок DA1 с нарушенным LIM сохраняет способность к связыванию с DA1 дикого типа.

Экспрессия белка DA1 с нарушенным LIM в одной или нескольких клетках растения уменьшает активность DA1 в клетках и усиливает признаки растения, связанные с урожайностью, такие как размер семян или органов (см., например, публикации Li et al. (2008); WO 2009/047525; Wang et al. 2012), посредством этого увеличивая урожайность растений. Растение, экспрессирующее белок DA1 с нарушенным LIM, может характеризоваться фенотипом *dal-1* или фенотипом, подобным *dal-1*.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок DA1 с нарушенным LIM можно экспрессировать из гетерологичной нуклеиновой кислоты в одной или нескольких клетках растения.

Белок DA1 с нарушенным LIM можно экспрессировать в одной или нескольких клетках растения с применением любой пригодной методики, и подходящие методики хорошо известны в данной области техники.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую белок DA1 с нарушенным LIM, можно экспрессировать рекомбинантным способом в том же виде или разновидности растения, из которого изначально была выделена данная нуклеиновая кислота, или в другом виде или разновидности растения (т.е. в гетерологичном растении).

Предложенные нуклеиновые кислоты могут являться двух- или одноцепочечными и могут представлять собой кДНК или геномную ДНК или РНК. Нуклеиновая кислота может являться полностью или частично синтетической, в зависимости от цели. Разумеется, специалист понимает, что, если нуклеиновая кислота содержит РНК, последовательность, эталонная представленной последовательности, должна быть сконструирована как эталонная последовательность к эквиваленту РНК с заменой Т на U.

Термин "гетерологичный" указывает, что ген/последовательность нуклеотидов, о которых идет речь, или последовательность, регулирующая ген/последовательность, о которых идет речь, были введены в указанные клетки растения или его предка с применением способов генной инженерии или рекомбинантных способов, т.е. посредством вмешательства человека. Нуклеотидные последовательности, которые являются гетерологичными по отношению к клетке растения, могут являться не существующими в природе в клетках данного типа, разновидности или вида (т.е. экзогенными или чужеродными) или могут представлять собой последовательности, которые не присутствуют в природе в данном внутриклеточном или геномном окружении клеток, или могут представлять собой последовательности, которые в природе

не регулируются в клетках, т.е. которые функционально связаны с искусственным регуляторным элементом.

Нуклеиновая кислота, кодирующая белок DA1 с нарушенным LIM, может быть функционально связана с гетерологичной регуляторной последовательностью, такой как промотор, например конститутивный, индуцибельный, тканеспецифичный промотор или промотор, специфичный к стадии развития, как описано выше.

Нуклеиновая кислота, кодирующая белок DA1 с нарушенным LIM, может содержаться в конструкции нуклеиновой кислоты или векторе. Конструкция или вектор являются предпочтительно подходящими для трансформации клетки растения и/или экспрессии в клетке растения. Вектор представляет собой, среди прочего, любую плазмиду, космиду, фаг или бинарный вектор *Agrobacterium* в двух- или одноцепочечной линейной или циклической форме, который может являться самопередающимся или мобилизуемым либо может не являться таковым и которым можно трансформировать прокариотического или эукариотического хозяина, в частности растение-хозяин, посредством интеграции в геном клетки или внехромосомного существования (например, автономно реплицирующаяся плазида с точкой начала репликации).

Конкретно включены "шаттл-векторы", под которыми подразумевают ДНК-носитель, способный от природы или в результате конструирования к репликации в двух различных организмах, которые могут быть выбраны из *Actinomyces* и родственных видов, бактерий и эукариотических клеток (например, клеток высших растений, млекопитающих, дрожжей или грибов).

Конструкция или вектор, содержащие нуклеиновую кислоту, описанные выше, не обязательно должны содержать промотор или другую регуляторную последовательность, в особенности, если вектор предназначен для введения нуклеиновой кислоты в клетки для рекомбинации в геном.

Конструкции и векторы могут дополнительно содержать селективируемые генетические маркеры, состоящие из генов, которые обеспечивают селективируемые фенотипы, например устойчивость к антибиотикам, таким как канамицин, гигромицин, фосфинотрицин, хлорсульфурон, метотрексат, гентамицин, спектиномицин, имидазолины, глифосат и d-аминокислоты.

Специалисты в данной области техники могут сконструировать векторы и разработать протоколы для экспрессии рекомбинантных генов, например, в клетке микроорганизмов или растений. Можно выбрать или сконструировать подходящие векторы, содержащие соответствующие регуляторные последовательности, включая последовательности промотора, терминирующие фрагменты, последовательности полиаденилирования, последовательности энхансера, гены-маркеры и другие последовательности, при необходимости. Подробные указания см., например, в руководствах *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edition, Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press и *Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al. eds. John Wiley & Sons, 1992. Конкретные процедуры и векторы, которые ранее с большим успехом использовали у растений, описаны в публикациях Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984), 12, 8711-8721 и Guerineau and Mullineaux, (1993), *Plant transformation and expression vectors*. In: *Plant Molecular Biology Labfax* (Croy RRD ed) (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, p. 121-148.

При введении выбранной генетической конструкции в клетку следует принять во внимание определенные факторы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Нуклеиновая кислота, которую будут встраивать, должна быть собрана в конструкции, содержащей эффективные регуляторные элементы, которые будут управлять транскрипцией. Должен иметься способ переноса конструкции в клетку. После того, как конструкция окажется под мембраной клетки, произойдет либо не произойдет интеграция в эндогенный хромосомный материал. Наконец, предпочтительным целевым типом клеток является такой, клетки которого можно регенерировать в целые растения.

Предпочтительно применение конструкции и способа трансформации, которые усиливают экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей белок DA1 с нарушенным LIM- или LIM-подобным доменом. Интеграция одной копии гена в геном клетки растения может быть полезной для минимизации эффектов подавления экспрессии гена. Аналогично, в этом отношении может быть полезным контроль полноты интеграции. Особенный интерес в этой связи представляет трансформация клеток растений с применением минимальной конструкции экспрессии гена согласно, например, европейскому патенту № EP 1407000B1, включенному в настоящее описание посредством ссылки с данной целью.

Методики, хорошо известные специалистам в данной области техники, можно применять для введения конструкций нуклеиновой кислоты и векторов в клетки растений для получения трансгенных растений, обладающих признаками, описанными в настоящем документе.

Трансформация агробактериями представляет собой способ, широко применяемый специалистами в данной области техники для трансформации видов растений. Получение стабильных и фертильных трансгенных растений на сегодняшний день является рутинным в данной области техники (см., например, публикации Toriyama, et al. (1988), *Bio/Technology* 6, 1072-1074; Zhang, et al. (1988), *Plant Cell Rep.* 7, 379-384; Zhang, et al. (1988), *Theor Appl Genet.* 76, 835-840; Shimamoto, et al. (1989), *Nature*, 338, 274-276; Datta, et al. (1990), *Bio/Technology* 8, 736-740; Christou, et al. (1991), *Bio/Technology* 9, 957-962; Peng, et al. (1991), *International Rice Research Institute*, Manila, Philippines 563-574; Cao, et al. (1992), *Plant Cell Rep.* 11,

585-591; Li, et al. (1993), *Plant Cell Rep.* 12, 250-255; Rathore, et al. (1993), *Plant Molecular Biology*, 21, 871-884; Fromm, et al. (1990), *Bio/Technology* 8, 833-839; Gordon-Kamm, et al. (1990), *Plant Cell*, 2, 603-618; D'Halluin, et al. (1992), *Plant Cell*, 4, 1495-1505; Walters, et al. (1992), *Plant Molecular Biology*, 18, 189-200; Koziel, et al. (1993), *Biotechnology* 11, 194-200; Vasil, I.K. (1994), *Plant Molecular Biology*, 25, 925-937; Weeks, et al. (1993), *Plant Physiology* 102, 1077-1084; Somers, et al. (1992), *Bio/Technology*, 10, 1589-1594; WO 92/14828; Nilsson, O. et al. (1992), *Transgenic Research*, 1, 209-220).

Другие способы, такие как баллистическая трансфекция или бомбардировка микрочастицами (US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), электропорация (EP 290395, WO 8706614), микроинъекция (WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green et al. (1987), *Plant Tissue and Cell Culture*, Academic Press), непосредственное поглощение ДНК (DE 4005152, WO 90/12096, US 4684611), поглощение ДНК, опосредованное липосомами (например, Freeman et al. *Plant Cell Physiol.* 29: 1353 (1984)), или способ с применением вортекса (например, Kindle, PNAS U.S.A. 87:1228 (1990d)) могут быть предпочтительными, если трансформация агробактериями является малоэффективной или неэффективной, например, у некоторых видов голосеменных. Обзор физических способов трансформации клеток растений приведен в публикации Oard, 1991, *Biotech. Adv.* 9:1-11.

В качестве альтернативы, для увеличения эффективности процесса трансформации можно применять комбинацию различных методик, например бомбардировку микрочастицами, покрытыми агробактериями (EP-A-486234), или баллистическую трансфекцию для образования повреждений и последующего совместного культивирования с агробактериями (EP-A-486233).

После трансформации растение можно регенерировать, например, из отдельных клеток, ткани каллуса или листовых дисков, что является стандартом в данной области техники. Практически любое растение можно полностью регенерировать из клеток, тканей и органов растения. Обзор доступных методик приведен в руководствах Vasil et al., *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol I, II and III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984 и Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989.

Конкретный выбор технологии трансформации будет определяться эффективностью такой технологии трансформировать определенные виды растений, а также опыта и предпочтений лица, реализующего настоящее изобретение на практике, и конкретной предпочтительной методологией. Специалисту очевидно, что конкретный выбор системы трансформации для введения нуклеиновой кислоты в клетки растений не является важным для настоящего изобретения или не является ограничивающим настоящее изобретение, как и выбор методики для регенерации растения.

После трансформации клетку растения, которая экспрессирует белок DA1 с нарушенным LIM, можно обнаружить и/или отобрать. Растение можно регенерировать из клетки растения.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения можно ввести мутацию в последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок DA1, в геноме клетки растения, вследствие чего нуклеиновая кислота будет кодировать белок DA1 с нарушенным LIM. Например, можно ввести мутацию в последовательность, кодирующую LIM-домен или LIM-подобный домен белка DA1. Затем из мутантной клетки можно регенерировать растение.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую белок DA1, можно подвергнуть мутации посредством вставки, замены или делеции одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа. Например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов могут быть изменены по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа с целью инактивировать кодируемый LIM- или LIM-подобный домен. Мутации инактивируют или нокаутируют LIM-домен и/или LIM-подобный домен и находятся предпочтительно в области последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей LIM-домен или LIM-подобный домен. Предпочтительные мутации не вызывают сдвигов рамки считывания.

Методики мутагенеза, инактивации или нокаута целевых генов хорошо известны в данной области техники (см., например, руководства *In Vitro Mutagenesis Protocols*; *Methods in Molecular Biology* (2nd edition) Ed Jeff Braman; Sambrook J. et al. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th Edition) CSH Press; *Current Protocols in Molecular Biology*; Ed Ausubel et al. (2013), Wiley). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутации в целевую последовательность, кодирующую DA1, можно ввести с применением методик геномного редактирования, например методик на основе нуклеазы, направляемой РНК, такой как методика на основе CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats - короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), методик на основе нуклеаз "цинковых пальцев" (zinc-finger nucleases, ZFN) и эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (transactivator-like effector nucleases, TALEN) (Umov, F.D. et al. *Nature reviews. Genetics*, 11, 636-646 (2010); Joung, J.K. et al. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 14, 49-55 (2013); Gasiunas, G. et al. PNAS USA, 109, E2579-2586 (2012); Cong, L. et al. *Science*, 339, 819-823 (2013)).

Растение, которое экспрессирует белок DA1 с нарушенным LIM, описанный выше (т.е. белок DA1 с инактивированным или нарушенным LIM-доменом или LIM-подобным доменом), можно размножить половым путем или вегетативно либо вырастить для получения потомка или потомства. Потомка или потомство растения, регенерированного из одной или нескольких клеток, можно размножить половым

путем или вегетативно либо вырастить. Растение либо его потомка или потомство можно скрестить с другим растениями или с самим собой.

Растение либо его потомка или потомство можно исследовать на предмет размера семян, размера органов и/или урожайности растений по сравнению с контролями.

У растения, которое экспрессирует белок DA1 с нарушенным LIM, описанный в настоящем документе, может наблюдаться увеличенный размер семян и/или органов по сравнению с контролями, и такое растение может характеризоваться большей урожайностью.

Эффект доминантно-негативных аллелей DA1 на связанные с урожайностью признаки растений является усиленным у растений, которые являются дефицитными по экспрессии или активности EOD1 (Li et al. (2008), WO 2009/047525).

Белок DA1 с нарушенным LIM можно экспрессировать, как описано выше, у растения, которое является дефицитным по экспрессии или активности EOD1.

Белки EOD1 представляют собой убиквитин-лигазы E3 растений (Disch et al. (2006), Li et al. (2008), WO 2009/047525). Белки EOD1 содержат домен EOD. Домен EOD растений может состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37:

(E/K)RCVICQ(L/M)(K/R/G/T/E)Y(K/R)(R/I)(G/K)(D/N/E)(R/Q/K/L)Q(I/M/V)(K/N
/T/A)L(L/P)C(K/S)H(V/A)YH(S/T/G/A)(E/Q/D/S/G)C(I/G/T/V)(S/T)(K/R)WL(G/T/
S)INK(V/I/A/K)CP(V/I)C (SEQ ID NO: 37)

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения белок EOD1 может содержать домен EOD, содержащий аминокислотную последовательность остатков со 150 по 192 SEQ ID NO: 38, остатков со 187 по 229 SEQ ID NO: 39, остатков со 192 по 234 SEQ ID NO: 40, остатков со 189 по 231 SEQ ID NO: 41, остатков со 194 по 236 SEQ ID NO: 42, остатков со 194 по 236 SEQ ID NO: 43, остатков со 194 по 236 SEQ ID NO: 44, остатков со 195 по 237 SEQ ID NO: 45, остатков со 189 по 231 SEQ ID NO: 46, остатков со 195 по 237 SEQ ID NO: 47, остатков со 195 по 237 SEQ ID NO: 48, остатков со 195 по 237 SEQ ID NO: 49, остатков с 218 по 260 SEQ ID NO: 50, остатков со 196 по 238 SEQ ID NO: 51, остатков со 197 по 239 SEQ ID NO: 52 или остатков со 193 по 235 SEQ ID NO: 53.

Дополнительные подходящие последовательности домена EOD можно обнаружить с применением стандартных методик анализа последовательности, описанных в настоящем документе (например, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

Белок EOD1, экспрессия или активность которого уменьшена в клетке растения, экспрессирующей белок DA1 с нарушенным LIM, может содержать аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 38-53, изложенных в табл. 2. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения белок EOD1 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 (AtEOD1) или SEQ ID NO: 50 или 51 (OsEOD1) либо может представлять собой вариант данной последовательности, который сохраняет активность убиквитин-лигазы E3.

Белок EOD1, который представляет собой вариант любой из SEQ ID NO: 38-53 или другой эталонной последовательности EOD1, может содержать аминокислотную последовательность, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% эталонной последовательности EOD1.

Белок EOD, который представляет собой вариант любой из SEQ ID NO: 38-53, может дополнительно содержать домен EOD, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37. Примеры подходящих последовательностей изложены выше.

Нуклеиновая кислота, кодирующая белок EOD1, может содержать нуклеотидную последовательность, изложенную в записи базы данных, которую выбирают из группы, включающей XM_002299911.1 GI:224059639 (PtEOD1); XM_002531864.1 GI:255582235 (RcEOD1); XM_002279758.2 GI:359487285 (VvEOD1); XM_003542806.1 GI:356548934 (GmEOD1a); XM_003540482.1 GI:356544175 (GmEOD1b); XM_002468372.1 GI:242042044 (SbEOD1); NM_001147247.1 GI:226496788 (ZmEOD1) или NP_001030922.1 GI:79316205 (AtEOD1; At3g63530), или может представлять собой вариант одной из данных последовательностей.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая белок EOD1 у растения, может кодировать AtEOD1 или OsEOD1 либо может представлять собой вариант указанных последовательностей.

Белки EOD1 и кодирующие нуклеиновые кислоты, экспрессия или активность которых может быть уменьшена, как описано в настоящем документе, можно легко обнаружить в любом виде растений, представляющих интерес, в частности в культурном растении, таком как пшеница, ячмень, маис, рис и другие сельскохозяйственные растения, с применением общепринятых методик анализа последовательности.

Подходящие способы уменьшения экспрессии или активности EOD1 хорошо известны в данной области техники.

Например, активность EOD1 можно уменьшить, предпочтительно устранить, посредством введения мутации, такой как делеция, вставка или замена, в положение, соответствующее положению 44 в SEQ ID NO: 45, например, посредством замены А на Т. Положение в последовательности белка EOD1, эквивалентное положению 44 в SEQ ID NO: 45, можно обнаружить с применением стандартных анализов последовательности и инструментов выравнивания.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экспрессию белка EOD1 можно уменьшить в клетках растения посредством экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая кодирует или транскрибирует супрессорную нуклеиновую кислоту, например супрессорную молекулу РНК или РНКи, в клетках указанного растения. Супрессорная РНК подавляет экспрессию белка EOD1 в клетках растения, которое экспрессирует DA1 с нарушенным LIM.

Подходящая последовательность РНКи может соответствовать фрагменту эталонной нуклеотидной последовательности EOD1, изложенной в настоящем документе, или может представлять собой вариант указанной последовательности.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения в последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок EOD1, в геноме клетки растения можно ввести нокаут- или нокаун-мутацию, в результате которой экспрессия или активность EOD1 уменьшается. Затем из мутантной клетки можно регенерировать растение.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую EOD1, можно подвергнуть мутации посредством вставки, замены или делеции одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа. Например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов могут быть изменены по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа.

Белки DA1 с нарушенным LIM можно экспрессировать, как описано в настоящем документе, в любом виде растений. Примеры растений, подходящих для применения согласно любому аспекту настоящего изобретения, описанному в настоящем документе, включают однодольные и двудольные высшие растения, например сельскохозяйственные или культурные растения, такие как растения, которые выбирают из группы, включающей *Lithospermum erythrorhizon*, *Taxus* spp, табак, тыкву, морковь, овощную культуру рода капуста, дыню, перец однолетний, виноград, салат, клубнику, масличную культуру рода капуста, сахарную свеклу, пшеницу, ячмень, маис, рис, сою, горох, сорго, подсолнечник, помидор, картофель, перец, хризантему, гвоздику, лен, коноплю и рожь.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено трансгенное растение, которое экспрессирует белок DA1 с нарушенным LIM, как описано выше.

Растение может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок DA1 с нарушенным LIM.

Один или несколько признаков растения, связанных с урожайностью, могут быть улучшены, увеличены или усилены в растении по сравнению с контрольными растениями, которые не экспрессируют белок DA1 с нарушенным LIM. Связанные с урожаем признаки могут включать продолжительность жизни, размер органа и размер семени.

Растение может обладать увеличенной урожайностью по сравнению с контрольными растениями дикого типа (т.е. идентичными растениями, которые не экспрессируют белок DA1 с нарушенным LIM). Например, масса семян (например, зерен) или другого продукта растительного происхождения на единицу площади может быть увеличена по сравнению с контрольными растениями.

Подходящее растение может быть получено посредством способа, описанного выше.

Помимо растения, полученного посредством способа, описанного в настоящем документе, настоящее изобретение охватывает любой клон такого растения, семена, самоопыленное или гибридное потомство и потомков, а также любую часть или побег, служащий для вегетативного размножения, любого из указанных объектов, такие как черенки и семена, которые можно применять для воспроизведения либо полового или вегетативного размножения. Также настоящее изобретение охватывает растение, которое представляет собой потомка, полученного в результате полового или вегетативного размножения, клон или потомка такого растения или любую часть или побег, служащий для вегетативного размножения, указанного растения, потомка, клона или потомства.

Растение согласно настоящему изобретению может представлять собой растение, которое не способно передавать один или несколько признаков потомству. Могут быть исключены разновидности растений, в особенности разновидности растений, регистрируемые согласно правилам регистрации новых сортов растений (Plant Breeders Rights).

"И/или" в настоящем документе следует интерпретировать как конкретное указание на каждый из двух указанных признаков или компонентов в сочетании с другим или без другого. Например, "А и/или В" следует интерпретировать как конкретное указание на каждый из (i) А, (ii) В и (iii) А и В так, как если бы каждый из данных вариантов был указан в настоящем документе индивидуально.

Если контекст не диктует обратное, описания и определения свойств, изложенных выше, не ограничены никаким конкретным аспектом или вариантом реализации настоящего изобретения и применяются эквивалентно ко всем описанным аспектам и вариантам реализации.

Все документы, упоминаемые в настоящей спецификации, включены в настоящее описание посред-

ством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Содержание всех записей баз данных, упоминаемых в настоящей спецификации, также включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Такие записи включают версии любой последовательности, которые существуют на дату подачи настоящей заявки.

Эксперименты

1. Методы.

1.1. Анализ коиммунопреципитации.

Все белки-приманки для данных исследований были помечены GST (глутатион-S-трансферазой), и гранулы глутатион-сефарозы (GE Life Science 17-0756-01) использовали для аффинной адсорбции данных белков.

В колбу, содержащую 10 мл среды LB с соответствующими антибиотиками, инокулировали штамм BL21 с соответствующей экспрессирующей конструкцией в исходном растворе глицерола и оставляли выращивать в течение ночи при температуре 37°C и при 220 об/мин. На следующее утро 10 мл прекультуры использовали для инокуляции в колбу, содержащую LB объемом 100 мл (в соотношении 1:100) и данную культуру инкубировали при температуре 37°C в течение 2 ч при 220 об/мин. Колбу вынимали из инкубатора, добавляли IPTG (изопропилтиогалактозид, Melford MB 1008) до конечной концентрации 1 mM, после чего инкубировали культуру при температуре 28°C (и 220 об/мин) в течение еще 3 ч.

После данной фазы роста культуру центрифугировали при 4500g в течение 10 мин, супернатанты отбрасывали и осадок ресуспендировали при температуре 4°C в 2,5 мл буфера TGH (50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 10% глицерол, 1 mM DTT (дитиотреитол), 1 таблетка полного ингибитора протеазы, не содержащего EDTA (complete EDTA-free protease inhibitor, на 50 мл, Roche 11873580001)). Затем бактериальную суспензию обрабатывали ультразвуком (на льду) в течение четырех циклов длительностью по 10 с, разделенных интервалами по 20 с, после чего центрифугировали при 12000g в течение 20 мин, чтобы осадить весь клеточный дебрис. Выделенные образцы после обработки ультразвуком хранили на льду, пока не была приготовлена 50% суспензия промытых гранул глутатион-сефарозы (GE Life Sciences 17-0756-01) согласно инструкциям производителя. Затем 20 мкл 50% суспензии глутатион-сефарозы объединяли с 2,5 мл экстракта белка из клеток, экспрессирующих белок-приманку (меченный GST), и с 2,5 мл экстракта белка из клеток, экспрессирующих белок-добычу (меченный HA-/FLAG-/HIS). Данную смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 4°C на вращающемся столе, после чего гранулы глутатион-сефарозы промывали пять раз избытком (500 мкл) буфера TGH (согласно инструкциям производителя). После промывки белки элюировали 35 мкл буфера для элюирования GST (50 mM TRIS-глицин (pH 8,0), 10 mM восстановленного глутатиона) в течение более 30 мин при температуре 4°C с последующим анализом методом вестерн-блоттинга.

1.2. Вестерн-блоттинг.

20, 12 или 4-20% заранее приготовленные SDS-полиакриламидные гели (RunBlue NXG02012, NXG01227, NXG42027) погружали в буфер для анализа RunBlue SDS-TRIS-трицин (RunBlue NXB0500) в резервуарах для геля (Atto Japan AE6450). Образцы смешивали с 2× буфером для образца Лэмли (Bio-Rad Ltd 161-0737), который помещали в термоблок при температуре 96°C в течение 10 мин, а затем наносили в промытые лунки в геле в аликвотах по 10 или 20 мкл. Гели анализировали при 160 В в течение 60 мин вместе с аликвотой предварительно окрашенной "лесенки" маркеров молекулярной массы PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, от 10 до 250 кДа (Fermentas 26619) объемом 3 мкл. При необходимости, на данной стадии гели окрашивали.

Перенос проводили с применением набора Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad 170-3836). Гели удаляли из стеклянного каркаса и клали сверху на губку (из набора Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell), два листа хроматографической бумаги (VWR WHAT3030-917) и промытую метанолом PVDF (поливинилиденфторидную) мембрану (Roche Diagnostics 03010040001). Пузырьки воздуха между гелем и мембраной удаляли, после чего на гель клали два дополнительных листа ватманской бумаги и губку и всю полученную конструкцию закрывали в контейнере для удерживания геля (из набора Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell), погружали в буфер для переноса (25 mM TRIS, 192 mM глицин, 10% (об./об.) метанол) и выдерживали при 90 В в течение 70 мин при температуре 4°C. После переноса мембрану промывали в течение 10 мин в 50 мл ФБР (фосфатный буферный раствор, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) при комнатной температуре и встряхивали в 50 мл блокирующего раствора (5% (мас./об.) сухого молока, 0,1% (об./об.) Tween-20) в течение 1 ч при комнатной температуре или в течение ночи при температуре 4°C. Первичные антитела разводили в блокирующем растворе до соответствующей концентрации (см. табл. 2.9) и инкубировали с мембраной (10 мл на мембрану при легком перемешивании) в течение 1 ч перед пятью промывками 50 мл ФБРТ (ФБР с Tween, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,1 % (об./об.) Tween-20, pH 7,3) при комнатной температуре. Если требовалось вторичное антитело, этапы окрашивания и промывки повторяли.

Промытую мембрану держали пинцетом и аккуратно промокали один угол на промокательной бумаге, чтобы удалить избыток влаги. Затем мембрану помещали в чашку Петри и обрабатывали субстратом пероксидазы (SuperSignal West FEMTO Max. Sensitivity substrate (Fisher Scientific PN34095)) в

количестве 800 мкл субстрата на мембрану. Мембраны оставляли в данном субстрате на 5 мин, высушивали, как описано ранее, и помещали в рентгеновскую кассету для пленок под лист рентгеновской пленки (Fuji Film X-RAY, 18×24 см (FujiFilm 497772RXNO)). Рентгеновскую пленку проявляли с применением настольной проявочной машины для рентгеновских пленок Konica SRX-101 (Konica 106931659).

При необходимости, после проведения анализа мембраны промывали в 50 мл ФБРТ и окрашивали 10 мл раствора Ponceau S (Sigma-Aldrich P7170) в течение 30 мин после одной промывки в 50 мл ФБРТ и высушивали при комнатной температуре.

1.3. Определение размера семян.

Площадь семян использовали в качестве репрезентативного показателя размера семян. Семена раскидывали в чашке Петри и сканировали против белого фона с применением настольного сканера (Hewlett Packard Scanjet 4370) при высоком разрешении (<3600 точек на дюйм). Изображения хранили в виде черно-белых изображений размером 8 бит и анализ изображений проводили с применением программного обеспечения ImageJ. Открывали программу ImageJ и устанавливали порог (Ctrl+Shift+T) так, чтобы все семена были полностью красными, затем выбирали все семена с помощью инструмента "прямоугольного выбора" и выбирали вариант анализа (Analyze > Analyze Particles). В диалоговом окне устанавливали размер порога, чтобы исключить из анализа меньшие (отличные от семян) структуры и крупные структуры, такие как агрегаты семян. Длину и ширину семян рассчитывали посредством подгонки овала к каждому семени (Analyze > Set measurements > Fit ellipse). При выборе данного варианта анализ выдает "Большее" и "Меньшее" значение, соответствующее длине и ширине овала, представляя наиболее длинную и наиболее широкую части семени. [J1].

2. Результаты.

LIM-домены (Prosite: PS00478) представляют собой тандемные домены "цинкового пальца", которые выступают в качестве платформы для белок-белковых взаимодействий (фиг. 1).

С помощью программного обеспечения для прогнозирования доменов, доступного в сети интернет (Pfam, SMART, PROSITE), было спрогнозировано наличие одного LIM-домена в DA1 (аминокислоты (AK) 170-230 AtDA1), который, как предполагалось, вовлечен в опосредование предполагаемой гомодимеризации DA1-DA1 (Li et al., 2008).

Однако неожиданно было обнаружено, что при введении расе Col арабидопсиса вариант DA1 с мутантным LIM-доменом (в дальнейшем обозначаемый "DAllim8") вызывает доминантный негативный фенотип размера органа, эквивалентный мутанту da-1 (фиг. 4). Полученные результаты демонстрируют, что LIM-домен DA1 не вовлечен в гомодимеризацию DA1.

Для получения мутанта DAllim84 ключевые аминокислоты, координирующие цинк (C172, C175, C199 и C202), преобразовывали в глицин. Согласно прогнозу данные мутации устраняют мотив "цинкового пальца", который образуется в результате координации Zn участками остатков цистеина (C).

Рекомбинантные белки-приманки, меченные GST, инкубировали с рекомбинантными белками-добычей, меченными FLAG, с последующей преципитацией меченных GST белков-приманок на гранулах глутатион-сепарозы. Затем очищенные белки элюировали и проводили анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и иммуноблоттинга. Способность β-глюкуронидазы (GUS) образовывать гомотетрамер использовали для получения положительного контроля GST-GUS по сравнению с FLAG-GUS. Также использовали два набора отрицательных контролей, которые представляли собой GST-GUS по сравнению с FLAG-добыча и GST-приманка по сравнению с FLAG-GUS.

Данные эксперименты по коиммунопреципитации *in vitro* продемонстрировали, что DAllim8 способен связываться с белком DA1 дикого типа (фиг. 3) и что фенотип размера семян lim8 у расы Col эквивалентен таковому для da1-1 (фиг. 4).

Затем последовательности белков DA1 анализировали с применением двухэтапного анализа прогнозирования доменов. Сначала проводили начальный скрининг для обнаружения гомологии (HHPred) с целью обнаружения белков с подобными доменами и структурами. После этого проводили скрининг для прогнозирования доменов (Pfam, SMART, PROSITE), при котором данные белки использовали в качестве искомой последовательности. Данная стратегия позволила установить, что область аминокислот 230-297 AtDA1 обладает значительной структурной гомологией с LIM-доменами других белков (включая белок LHX3 LIM/гомеобокса мыши). Данный новый предполагаемый домен был назван LIM-подобным доменом.

Предполагаемая вторая пара аминокислот, координирующих цинк в LIM-подобном домене DA1, не была обнаружена с применением классического программного обеспечения для прогнозирования доменов (Pfam, SMART, PROSITE) вследствие значительного отклонения последовательности от канонического участка LIM. При анализе спаривания CxH в положении аминокислот 261-264 в последовательности AtDA1 было очевидно, что вставка в первый домен "цинкового пальца" и межпальцевую область вызывает значительное отклонение последовательности от консенсусного участка LIM, в результате чего длина "пальца" составляет 24 АК и длина межпальцевой области составляет 7 АК (вместо 16-23 АК и 2 АК, соответственно).

Вследствие этого LIM-подобный домен представляет собой второй "цинковый палец", который содержит LIM-домен в пределах белка DA1.

Таблица 1

Выравнивание белков DAI (SEQ ID NO: 4-27)

Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	MEPPAARVTPSIKADCSHSVNIICEETVLHSLVSHLSAALRREGISVFVDACGLQETKFF	60
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	SIKQNPPLTDGARVLVVVISDEVEFYDPWFPKFLKVIQGWQNNGHVVVPVFGVDSLTRV	120
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	YGWANSWLEAEKLTSHQSKILSNNVLTDSSELVEEIVRDVYGKLYPAERVGIYARLLEIEK	180
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	

At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	LLYKQHRDIRSIGIWGMPGIGKTTLAKAVFNHMS TDYDASCFIENFDEAFHKEGLHRLK 240
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	ERIGKILKDEFDI ESSYIMRPTLHRDKLYDKRILVVLDDVRDSLAAESFLKRLDWFGSGS 300
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	LIITTSVDKQVFAFCQINQIYTVQGLNVHEALQLFSQSVFGINEPEQNDRKLSMKVIDYV 360
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	

At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	NGNPLALSIYGRELMGKKSEMETAFFELKHCPPLKIQDVLKNAYSALS DNEKNIVLDIAF 420
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	FFKGETVNYVMQLLEESHYFPRLAIDLVLVDKCVLTISENTVQMNNLIQDTCQEIFNGEIE 480
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	TCTRMWEPSRIRYLLEYDELEGSETKAMPKSGLVAEHIESIFLDTSNVKFDVKHDAFKN 540
At_GI-30698242.pro	-----	

At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	MFNLKFLKIYNSCSKYISGLNFPKGLDSLPEYELRLHWHENYPLQSLPQDFDFGHLVKLSM	600
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	PYSQLHKLGTFRVKDLVMLKRLILSHSLQLVECDILIIYAQNIELIDLQGCTGLQRFDPDTSQ	660
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----MGDRP	5
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	LQNLRVVNLSGCTEIKCFSGVPPNIEELHLQGTRIREIPIFNATHPPKVKLDRKKLWNL	720
At_GI-22326876.pro	-----	

At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	
At_GI-22326876.pro	-----	
At_GI-30698242.pro	-----	
At_GI-30698240.pro	-----	
At_GI-15240018.pro	-----	
At_GI-334188680.pro	-----	
Si_GI-514815267.pro	-----	
Bd_GI-357157184.pro	-----	
Br_DAlb.pro	-----	
Br_DAla.pro	-----	
At_GI-15221983.pro	-----	
Tc_GI-508722773.pro	-----	
Gm_GI-356564241.pro	-----	
Gm_GI-356552145.pro	-----	
Vv_GI-302142429.pro	-----	
Vv_GI-359492104.pro	-----	
Sl_GI-460385048.pro	-----	
Os_GI-218197709.pro	-----	
Os_GI-115466772.pro	-----	
Bd_GI-357160893.pro	-----	
Bd_GI-357164660.pro	-----	
Sb_GI-242092232.pro	-----	
Zm_GI-212275448.pro	-----	
At_GI-240256211.pro	-----	
At_GI-145360806.pro	-----	

DMGAGVALRFSHNDWTLEEDSKALHFLQPDVLVFTG DYGNENVQLVKSI SDLQLPKAAIL 65

ENFSDVEHIDLEC VTNLATVTSNNHVMGKLVCLNMKYCSNLRGLPDMVSLES LKVLVLSG 780

GNHDCWHTYQFSEKKVDRVQLQLESLGEQHVGYKCLDFPTIKLSVVGGRPFSCGGNRIFR 125

CSELEKIMGFPRNLKKLYVGGTAIRELPQLPNSLEFLNAHGCKHLKSINLD FEQLPRHFI 840

PKLLSKWYGVNDMAESAKRIYDAATNAPKEHAVILLAHNGPTGLGSRMEDICGRDWVAGG 185

```

At_GI-22326876.pro      FSNCYRFSSQVIAEFVEKGLVASLARAKQEELIKAPEVIICIIPMDTRQRSSFRLQAGRNA 900
At_GI-30698242.pro      -----
At_GI-30698240.pro      -----MPISDVASLVGGAALGAPLSE 21
At_GI-15240018.pro      -----MASDYYSDDDEGFGEKVGLIG 21
At_GI-334188680.pro     -----MWCLSCFKPSTKHDP 15

Si_GI-514815267.pro     -----
Bd_GI-357157184.pro     -----
Br_DA1b.pro             -----
Br_DA1a.pro             -----
At_GI-15221983.pro      -----
Tc_GI-508722773.pro     -----
Gm_GI-356564241.pro     -----
Gm_GI-356552145.pro     -----
Vv_GI-302142429.pro     -----
Vv_GI-359492104.pro     -----
Sl_GI-460385048.pro     -----
Os_GI-218197709.pro     GDHGDPLDLEQAISDLQRETGVSIPLVVFHGMHKSLAYGRGLRKMIAFGANRTIYLNNAV 245
Os_GI-115466772.pro     -----
Bd_GI-357160893.pro     -----
Bd_GI-357164660.pro     -----
Sb_GI-242092232.pro     -----
Zm_GI-212275448.pro     -----
At_GI-240256211.pro     -----
At_GI-145360806.pro     -----
At_GI-22326876.pro      MTDLVPWMQKPISGFSMSVVVSFQDDYHNDVGLRIRCVGWKTWNNQPDRIVERFFQCWA 960
At_GI-30698242.pro      -----
At_GI-30698240.pro      IFKLVIEEAKVKDFKP-----L 39
At_GI-15240018.pro      EKDRFEAETIHVIEVSQ-----H 39
At_GI-334188680.pro     SEDRFEETNIVTGIS-----31

Si_GI-514815267.pro     -----
Bd_GI-357157184.pro     -----
Br_DA1b.pro             -----
Br_DA1a.pro             -----
At_GI-15221983.pro      -----
Tc_GI-508722773.pro     -----
Gm_GI-356564241.pro     -----
Gm_GI-356552145.pro     -----
Vv_GI-302142429.pro     -----
Vv_GI-359492104.pro     -----
Sl_GI-460385048.pro     -----
Os_GI-218197709.pro     PRVNHAQSSSRQPAISTSEKTGLEGLTGLMVPTSRAFTIVDLFEGAVEKISEVWVTVGDAR 305
Os_GI-115466772.pro     -----
Bd_GI-357160893.pro     -----
Bd_GI-357164660.pro     -----
Sb_GI-242092232.pro     -----
Zm_GI-212275448.pro     -----
At_GI-240256211.pro     -----
At_GI-145360806.pro     -----
At_GI-22326876.pro      PTEAPKVVDHIFVLYDTKMHPDSEENHISMWAHEVKFEFHTVSGENNPLGASCKVTEC 1020
At_GI-30698242.pro      -----
At_GI-30698240.pro      SQDLASTMERLVPFI FNEIDMMQGGSNRGTSSELKVLTTETMERAGEMVHKCSRIQWYSIAKK 99
At_GI-15240018.pro      EADIQKAKQRSLATHEAEKLDLATHEAEQLDLAIQEFSSRQEEEEERRRTRELENAQIAN 99
At_GI-334188680.pro     -----LYEDVILRQRRSEADQIEWAIQDSFNPQE---TSRCRQREEDDQIAR 75

Si_GI-514815267.pro     -----MGWLSKIFKGSVN-RVSRGHYNGNSHE---GYS 29
Bd_GI-357157184.pro     -----MGWLNKIFKGSVN-RVSRGNYDGNWHD---GNS 29
Br_DA1b.pro             -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYENYP 33
Br_DA1a.pro             -----MGWFNKFIFKGSTQ-RFRLGNDHDHN---GYYSYP 31
At_GI-15221983.pro      -----MGWFNKFIFKGSNQ-RLRVGNNKHNNH-VYYDNYP 32
Tc_GI-508722773.pro     -----MDWIKKIFKGAH-KFSEG---HHHG---NYV 25
Gm_GI-356564241.pro     -----MGWLSRIFKGS DHNKLSEGHYYKEDA---GYV 29
Gm_GI-356552145.pro     -----MGWLSRIFKGS DHNKLSEGHYYKEDA---GYV 29
Vv_GI-302142429.pro     -----MGWLNKIFKGS SH-KISEGNYHG RYQ---GDT 28
Vv_GI-359492104.pro     -----MGWLNKIFKGS SH-KISEGNYHG RYQ---GDT 28
Sl_GI-460385048.pro     -----MGWLNKIFRGS SH-KISEGQYDWRCE---GDT 28
Os_GI-218197709.pro     TELEQELVLYKQPHKSVPSNIAIWSTMGWLT KFFRGSTH-KISEGQYH SKPAEETIWN GP 364
Os_GI-115466772.pro     -----MGWLT KFFRGSTH-KISEGQYH SKPAEETIWN GP 33
Bd_GI-357160893.pro     -----MGWLT KIFRGSTY-KISEGQRSRPAEEAVWNEP 33
Bd_GI-357164660.pro     -----MGWLT KFFRGSTH-NISEGQDQSKPAEETVWNEP 33
Sb_GI-242092232.pro     -----MGWLT KFFRGSTH-NISEGQYHSRPAEDTAWNEP 33
Zm_GI-212275448.pro     -----MGWLT KFFRGSTH-NISEEQYHSRPAEDTAWNEP 33
At_GI-240256211.pro     -----MGWLT KILKGSSH-KFSDGQCNGRYREDRNLEGP 33

```

At_GI-145360806.pro	HISNPCIFGEVSSSSSTYRDKKWKLMKWSKLFKSGSNGGGSGAHTNHHPPQFQEDENM	82
At_GI-22326876.pro	GVEVITAATGDTSVSGIIRESETITIEKEDTIDEEDTPLLSRKPEETNRSRSSSELQK	1080
At_GI-30698242.pro		
At_GI-30698240.pro	ALYTREIKA--INQDFLKFCQIELQLIQRNQLQYMRSMGMASVSTKADLLSDIGNFESK	157
At_GI-15240018.pro	VLQHEERE-----RLINKKTALEDEDEELLARTLEESLKENNRKRMFEEQVKNKDEQ	150
At_GI-334188680.pro	GLQVVEET-----ELDKSVVDEED-----QQ	96
Si_GI-514815267.pro	TQHTKSY-----	36
Bd_GI-357157184.pro	SENIR-----	34
Br_DAlb.pro	-HEHS-----EPSAETDA-----DHT	48
Br_DAla.pro	-HDEPSADTDPDPDPDPDE-----THT	52
At_GI-15221983.pro	TASHDDEPSAADTDADNDEP-----HHT	55
Tc_GI-508722773.pro	EDPHP-----QF	32
Gm_GI-356564241.pro	LPSTS-----	34
Gm_GI-356552145.pro	LPSTS-----	34
Vv_GI-302142429.pro	VQNEP-----	33
Vv_GI-359492104.pro	VQNEP-----	33
Sl_GI-460385048.pro	EEDDP-----	33
Os_GI-218197709.pro	SNSAVVTMVYPLESTFGQLDLLLATDLRQLVIDDVDCCKLRQQAQPVHLHMYSQLQLLQ	424
Os_GI-115466772.pro	SNSAVVT-----	40
Bd_GI-357160893.pro	SSSTVVT-----	40
Bd_GI-357164660.pro	SSSTAVN-----	40
Sb_GI-242092232.pro	SSSPVVT-----	40
Zm_GI-212275448.pro	SSSPVVT-----	40
At_GI-240256211.pro	RYSAEAGSDFDKKEIECAIALSLS-----EQEHVIPQDDKGKKIIE	73
At_GI-145360806.pro	VFPLPPS-----	89
At_GI-22326876.pro	LSSTSSKVRSGKNVFWKWLGCFF-----LQPKNLRSRSRRTALEEA	1122
At_GI-30698242.pro		
At_GI-30698240.pro	LCLVAQPEVVTKFWLKRPLMELKMLFEDGV-----VTVVVSAPYALGKTTLVTK	207
At_GI-15240018.pro	LALIVQESLNMEEYPIR-LEEYK-----SISRRAPLDVDEQ-FAKA	189
At_GI-334188680.pro	LSKIVEESLKE-----	107
Si_GI-514815267.pro	-----GAHGNEDE-----DMDHAIALSLSEQDQRKGKAIDTEHHLDE-----ED	74
Bd_GI-357157184.pro	-----GAYDESDNE-----DIDRAIALSLAEEDPNKGKAIIDPDYS-----	70
Br_DAlb.pro	QEPSTSEETWNGKENE-----EVDRVIALSILEE-ENQRPETNTG-----	88
Br_DAla.pro	QEPSTSEEDTS-GQENE-----DIDRAIALSLIENSQGGTNNNTCAAN-----	93
At_GI-15221983.pro	QEPSTSEDNTSNDQENE-----DIDRAIALSLLEE--NQEGTSISG-----	94
Tc_GI-508722773.pro	NAPSVS-GDAWQELENE-----DVDRAIALSLLGE--SQKGRKVID-----	70
Gm_GI-356564241.pro	GVTN-----NQNE-----DIDRAIALSLVEESRRANNVNGER-----	69
Gm_GI-356552145.pro	GVTNDAWNQSQNQNE-----DIDRAIALSLVEETQKANNVN-----	73
Vv_GI-302142429.pro	----SCSGDVWAETENE-----DIDRAIALSLSEE--EQKGGKVID-----	68
Vv_GI-359492104.pro	----SCSGDVWAETENE-----DIDRAIALSLSEE--EQKGGKVIDE-----	69
Sl_GI-460385048.pro	----STAEDSWSEIE-----DIDRAIALSLSEE--EQKGGKVID-----	66
Os_GI-218197709.pro	TSHAHQHGDVPSEFDNE-----DIARAIISLSLLEEEQRKAKAIEKD-----	465
Os_GI-115466772.pro	-----DVPSEFDNE-----DIARAIISLSLLEEEQRKAKAIEKD-----	73
Bd_GI-357160893.pro	-----DVLSEFDNE-----DIDRAIALSLSEE-QRKSkgTGkd-----	72
Bd_GI-357164660.pro	-----YALSEFDNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKSkgTGkd-----	73
Sb_GI-242092232.pro	-----DIFSEFNNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKAKTIDKD-----	73
Zm_GI-212275448.pro	-----DILSEFNNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKAKAIDKD-----	73
At_GI-240256211.pro	YKSETEEDDDDEDEDEEYMQRAQLEAAEEEEERRVAQAQIEEEEKRRAEQLEETEKLAK	133
At_GI-145360806.pro	----SLDDRSRGARDKE-----ELDRSISLSLADN-TKRPHGYGWS-----	125
At_GI-22326876.pro	LEEALKEREKLEDREL-----QIALIESKKIKKIKQADERDQIKHADER----	1167
At_GI-30698242.pro	----MVRKRQEEDEKI-----EIERVKEESLKLAKQAEKRRLESKEQ----	41
At_GI-30698240.pro	LCHDADVKEKFKQIFFI-----SVSKFPNVRLIGHKLEHIGCKANEYEN-----	252
At_GI-15240018.pro	VKESLKNKGKQFEDE-----QVKKDEQLALIVQESLNMVESPRLLEN----	234
At_GI-334188680.pro	-----KGKSKQFEDD-----QVENDEQQALMVQESLYMVLSAQLEED----	145
Si_GI-514815267.pro	EQLARALQENTSPTLDEDEQLAR-----ALQESMNDEHP	108
Bd_GI-357157184.pro	-----LEEDEQLAR-----ALHESLNTGSP	90
Br_DAlb.pro	-----AWKHAM-MDDDEQLAR-----AIQESMIARN-	113
Br_DAla.pro	-----AGKYAM-VDEDEQLAR-----AIQESMVVGNT	119
At_GI-15221983.pro	-----KYSMPVDEDEQLAR-----ALQESMVVGNS	119
Tc_GI-508722773.pro	-----DEYQLEDEQLAR-----ALQESLNFEPP	94
Gm_GI-356564241.pro	-----ILSLQTLLEDEQLAR-----AIEQSLNLESP	96
Gm_GI-356552145.pro	-----DYRSQLEDEQLAR-----AIEQSLNLESP	98
Vv_GI-302142429.pro	-----NEFQLEDEQLAR-----AIQESLNIESP	92
Vv_GI-359492104.pro	-----L-DNEFQLEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
Sl_GI-460385048.pro	-----SESQLEDEQLAR-----ALQESLNIESP	90
Os_GI-218197709.pro	-----MHLEDEQLAR-----AIQESLNIESP	487
Os_GI-115466772.pro	-----MHLEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
Bd_GI-357160893.pro	-----LHLEDEQLAR-----AIHESLNIESP	94
Bd_GI-357164660.pro	-----QHLEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
Sb_GI-242092232.pro	-----MHLEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
Zm_GI-212275448.pro	-----MHLEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95

```

At_GI-240256211.pro  ARLEEEEMRRSKAQLEEDELLAK-----ALQESMNVGSP 167
At_GI-145360806.pro  -----MDNNRDFPR-----PFHGGNLPSSF 145
At_GI-22326876.pro   -----EQRKHSKDHEEEIESNEKEERRHSKDYVIEELVLKGGKRRQLDDDKADEKEQ 1221
At_GI-30698242.pro   -----GKRIQVDD-----QLAKTTSKDKGQ 62
At_GI-30698240.pro   -----DLDAMLYIQQLLKQLGRNGSILLVLDDV-----WAEESLLQKFL 292
At_GI-15240018.pro   -----NNISTRAPVDEDEQLAK-----AVEESLKGKGQ 262
At_GI-334188680.pro  -----KNISTIPPLNEDAQLQK-----VIWESAKGKGQ 173

```

```

Si_GI-514815267.pro  PR-----QHIPIEDVHSESAPASSLPPYVFTNGSRVCA 142
Bd_GI-357157184.pro  PH-----QNVPPVDVPSERVPTREPPPPVFLSSGFRA 124
Br_DAlb.pro          -----GTT-----YDFGNAY-----GNGHMHGGGNVYDNGDIYYPRPIAFSMDFRICA 156
Br_DAla.pro          PRQKHGSS-----YDIGNAYGAGDVYGNHMHGGGNVYANGDIYYPRPTAFPMDFRICA 173
At_GI-15221983.pro   PRHKS GST-----YDNGNAYGAGDLYGNHMYGGGNVYANGDIYYPRPITFQMDFRICA 173
Tc_GI-508722773.pro  P-----QYENANMYQMPVHFPMGYRICA 118
Gm_GI-356564241.pro  P-----RYGNENMYQPPIQYFPLG--ICA 118
Gm_GI-356552145.pro  P-----RYGNENMYQPPIQYFPMGSRICA 122
Vv_GI-302142429.pro  PQ-----HGNGN-----GNGNIYQPIPFYPYSTGFRICA 120
Vv_GI-359492104.pro  PQ-----HGNGN-----GNGNIYQPIPFYPYSTGFRICA 123
Sl_GI-460385048.pro  PQ-----HVS RNDHGGGNVYGNNGFYHVPFPYSASFVICA 126
Os_GI-218197709.pro  -----PRARENGNANGGNMYQPLPFMFSSGFRTICA 517
Os_GI-115466772.pro  -----PRARENGNANGGNMYQPLPFMFSSGFRTICA 125
Bd_GI-357160893.pro  PCARDNGSPPH---ARDNSSPPHARENSSHPARENGIANGGNSIQHSPPFMFSSGFRTICA 151
Bd_GI-357164660.pro  -----PRAREKSSHPARENGSANGGNSYQL-PLMFSSGFRTICA 133
Sb_GI-242092232.pro  P-----PSRENGSANGGNAYHPLPFMFSSGFRAICA 125
Zm_GI-212275448.pro  PRRNGSAN-----GGTMYHPPRETGNAYQPPRENGSANGGNAYHPLPFMFSSGFRAICA 148
At_GI-240256211.pro  P-----RYDPGNILQYPFLLIPSSHRTICV 191
At_GI-145360806.pro  IP-----PYEPSYQYRRRQRIICG 163
At_GI-22326876.pro   IKH-----SKDHVEE-----EVNPPLSKKEIC 1241
At_GI-30698242.pro   INH-----SKDVVEE-----DVNPPPS-I 80
At_GI-30698240.pro   IQLPDYKILVTSRFETTSFGPTFHLKPLIDDEVECRDEIEENEKLP---EVNPPLSMKEIC 348
At_GI-15240018.pro   IKQ-----SKDEVEGDGMILL---ELNPPPSLKEIC 287
At_GI-334188680.pro  IEH-----FKDPVEEDGNLPRVDLNVNHPHSICD 202

```

```

Si_GI-514815267.pro  GCKTPIGQGRFLSCMDSVWHPPQCFRCYGC DIPISEYEFAMHE--DHAYHRSCYKERF-H 198
Bd_GI-357157184.pro  GCNNPIGNRFLSCMDSVWHPPQCFRCFACNKPISSEYEFAMHE--NQPYHKSCYKDFH-H 180
Br_DAlb.pro          GCNMEIGHGRFLNCLNALWHPPQCFRCYGC SHPISEYEFSTSG--NYPFHKACYKERF-H 212
Br_DAla.pro          GCNMEIGHGRFLNCLNALWHPECFRCYGC RHPITSEYEFSTSG--NYPFHKACYRERY-H 229
At_GI-15221983.pro   GCNMEIGHGRFLNCLNSLWHPECFRCYGC SQPISSEYEFSTSG--NYPFHKACYRERY-H 229
Tc_GI-508722773.pro  GCNTEIGHGRFLNCLNAFWHPECFRCHACNLPI SDYEFMSG--NYRFHKSCYKERY-H 174
Gm_GI-356564241.pro  GCYTEIGHGRFLNCLNAFWHPECFRCHACNLPI SDYEFSTSG--NYPYHKSCYKESY-H 174
Gm_GI-356552145.pro  GCYTEIGHGRFLNCLNAFWHPECFRCHACNLPI SDYEFSTSG--NYPYHKSCYKESY-H 178
Vv_GI-302142429.pro  GCNTEIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHGCGYPI SDYEYSMNG--NYPYHKSCYKEHY-H 176
Vv_GI-359492104.pro  GCNTEIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHGCGYPI SDYEYSMNG--NYPYHKSCYKEHY-H 179
Sl_GI-460385048.pro  GCSTEIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHACNQPI SDYEFMSG--NYPYHKTCYKEHY-H 182
Os_GI-218197709.pro  GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHACNQPI YDYEFSMSG--NHYPHKTCYKERF-H 573
Os_GI-115466772.pro  GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHACNQPI YDYEFSMSG--NHYPHKTCYKERF-H 181
Bd_GI-357160893.pro  GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHACNQPI YDYEFSMSG--NHYPHKTCYKERF-H 207
Bd_GI-357164660.pro  GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHGCSQPI YDYEFSMSG--NHYPHKTCYKERF-H 189
Sb_GI-242092232.pro  GCHREIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHACNQPI YDYEFSMSG--NHYPHKTCYKEQF-H 181
Zm_GI-212275448.pro  GCHREIGHGRFLSCMGAVWHPECFRCHACNQPI YDYEFSMSG--NHYPHKTCYKEQF-H 204
At_GI-240256211.pro  GCQAEIGHGRFLSCMGVWHPECFCCNACDKPII DYEFMSG--NRPYHKLCYKEQH-H 247
At_GI-145360806.pro  GCNSDIGSGNYLGCMTGFHPECFRCHSCGYAITEHEFSLSG--TKPYHKLCFKELT-H 219
At_GI-22326876.pro   DCKSAIEDGISINAYGSVWHPPQCFCLRCREPIAMNEISDLR---GMYHKPCYKELR-H 1296
At_GI-30698242.pro   DGKSEIGDGTSVN-----PRCLCFHCHRPFVMHEILKK---GKFHIDCYKEYYRN 128
At_GI-30698240.pro   GCNSAVKHESVNILGVLWHPGCFCCRCSDKPIAIEHELENHVSNSRGKFKHKSCEYER--- 404
At_GI-15240018.pro   GCNFAVEHGGSVNIGVLWHPGCFCCRACHKPIAIEDIENHVSNSRGKFKHKSCEYER--- 343
At_GI-334188680.pro  GCKSAIEYGRSVHALGVNWHPECFCCRYCDKPIAMHEFS---NTKGRCHITCYERSH-- 256

```

```

Si_GI-514815267.pro  PKCDVCNSFIPTNKNGLIEYRAHPFWMQKYCPSHENDGTPRCCSCERMEPKHSQYITLDD 258
Bd_GI-357157184.pro  PKCDVCKDFIPTNKGDLIEYRAHPFWMQKYCPSHEDDGTTPRCCSCERMEPTDIKYIRLDD 240
Br_DAlb.pro          PKCDVCSLFIPTNHAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDATPRCCSCERMEPRNTGYFELND 272
Br_DAla.pro          PKCDVCSLFIPTNHAGLIGYRAHPFWVQKYCPSHEHDATPRCCSCERMEPRNTGVVELND 289
At_GI-15221983.pro   PKCDVCSHFIPITNHAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDATPRCCSCERMEPRNTRYVELND 289
Tc_GI-508722773.pro  PKCDVCNDFIPTNPAGLIEYRAHPFWIQKYCPSHEHDSPTRCCSCERMEPRDTRYVALND 234
Gm_GI-356564241.pro  PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWIQKYCPTHEHDGTTPRCCSCERMESQEAGYIALKD 234
Gm_GI-356552145.pro  PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWIQKYCPTHEHDGTTPRCCSCERMESQEAGYIALKD 238
Vv_GI-302142429.pro  PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDSPTRCCSCERMEPRDTRYVALND 236
Vv_GI-359492104.pro  PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDSPTRCCSCERMEPRDTRYVALND 239
Sl_GI-460385048.pro  PKCDVCKHFIPTNAAGLIEYRAHPFWSQKYCPFHEHDGTTPRCCSCERMEPRDTRYIALDD 242
Os_GI-218197709.pro  PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLDD 633
Os_GI-115466772.pro  PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLDD 241
Bd_GI-357160893.pro  PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLDD 267
Bd_GI-357164660.pro  PKCDVCKQFIPTNTNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLDD 249
Sb_GI-242092232.pro  PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLDD 241

```

GRRLCLECLHTAIMD	TNECQPLYIDIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEAEKI	318
GRKLCLECLTSATMD	SECQHLYMDIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAEAKS	300
GRKLCLECLDSSVMD	TFCQCPPLYLQIQEFYEGNLTVEQV	PLLLVERQALNEAREG	332
GRKLCLECLDSSVMD	TFCQCPPLYLQIQEFYEGFMKVEQD	VPLLLVERQALNEAREGEKN	349
GRKLCLECLDSSVMD	TMCQCPPLYLQIQFNFYEGNMNKVEQV	PLLLVERQALNEAREGEKN	349
GRKLCLECLDSSVMD	TMCQCPPLYLDLEIFYEGNMNKVEQV	PLLLVERQALNEAREGEKN	294
GRKLCLECLDSSIMD	TNECQPLHADIQRFYDSLNMKLDQOI	PLLLVERQALNEAREGEKN	294
GRKLCLECLDSSAIMD	TNECQPLHADIQRFYDSLNMKLDQOI	PLLLVERQALNEAREGEKN	298
GRKLCLECLDSSAIMD	TNECQPLYLDIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEGEKS	296
GRKLCLECLDSSAIMD	TNECQPLYLDIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEGEKS	299
GRKLCLECLDSSAIMD	TSCQCPPLYDIQEFYEGNMNKVEQKV	PLLLVERQALNEAMDGERH	303
GRKLCLECLDSSVMD	TSECQPLYLEIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEGEKT	692
GRKLCLECLDSSVMD	TSECQPLYLEIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEGEKT	301
GRKLCLECLDSSVMD	TTECQPLYLEIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEGEKT	327
GRKLCLECLDSSVMD	TTECQPLYLEIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEGEKT	309
GRKLCLECLDSSVMD	TNECQPLYLEIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEGEKA	301
GRKLCLECLDSSVMD	TNDCCQPLYLEIQEFYEGNMNKVEQQV	PLLLVERQALNEAMEGEKA	324
GRKLCLECLDSSAIMD	TNECQPLYLEIQEFYEGNMNKVEQOI	PMLLVVERQALNEAMEGEKH	367
GRSLCECMEHTAITD	TGECQPLYHAIRDYDEGMYMKLDQOI	PMLLVQREALNDIAIVEKN	339
FRWLCRECMSSAIMD	SDCCPLHFEIRREFFEGLHMKIEEEF	PVYLVEKALNKAEEKEKI	1415
FRWLCECMGSAVMD	TNECQPLHFEIRREFFEGFLNKVDKE	FALLLVKEKALNKAEEEEKI	248
GRWLCECG-KSAMD	TNECQPLYDMRDFEFLNMKIEKEF	PLILVRKELLNK--KEEKI	514
GRWLCECMSSAVMD	SDCCPLHFDMDRDFEFLNMKIEKEF	PFLLVKEKALNKAEEKEKI	456
NRWLVCVCMCAVMD	TTECQPLHFEIRREFFGSLNMKIEKEF	PFLLVKEKALNKAEEKEKI	371

[illegible]

YGLPRLLTGSI LAHEMMHAYLR LK	----	GYRTLSP EV	406
YGLPRLQTGSI LAHEMMHAYLR LK	----	GYRSLSPQV	388
FGLPRLLTGSI LAHEMMHAWMR LK	----	GFRPLSQDV	418
FGLPRLLTGSI LAHEMMHAWMR LK	----	GFRTLSQDV	438
FGLPRLLTGSI LAHEMMHAWMR LK	----	GFRTLSQDV	437
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWMR LQ	----	GFRTLSQDV	383
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWLR LK	----	GYRTLSQDV	378
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWLR LK	----	GYRTLSQDV	382
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWLR LN	----	GYRTLAQDV	385
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWLR LN	----	GYRTLAQDV	388
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWLR LR	----	GYRTLSQDV	391
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWLR LK	----	GYRTLSPDV	781
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWLR LK	----	GYRTLSPDV	389
YGLPRLLTGSI LAHEMMHAWLR LK	----	GYRTLSP EI	415

```

Bd_GI-357164660.pro      YGLPRLLTGSILAHEMMHAWLRK-----GYRTLSPDI 397
Sb_GI-242092232.pro      YGLPRLLTGSILAHEMMHAWLRK-----GYRTLSPDV 389
Zm_GI-212275448.pro      YGLPRLLTGSILAHEMMHAWLRK-----GYRTLSPDV 411
At_GI-240256211.pro      YGLPRLLTGSILAHEMMHAWLRN-----GYPNLRPEV 456
At_GI-145360806.pro      YGLPRLLTGAILAHELMHGWLRLN-----GFRNLNPEV 427
At_GI-22326876.pro       YGLPRLLTGYILAHEMMHAYLRLN-----GYRNLNMVL 1507
At_GI-30698242.pro       YGLPRLLTGYILAHEMMHAWLRN-----GYKNLKLLEL 337
At_GI-30698240.pro       YGLPRLLTGYILAHEMMHAWLRN-----GHMNLNNIL 603
At_GI-15240018.pro       YGLPRLLTGYILAHEMMHAYLRLN-----GHRNLNNIL 545
At_GI-334188680.pro      YGLPRLLTGYILAHEMMHAWLRNGTTSTQFVFANQYGESSQLKVLFLITGYRNLKLLEL 487
:***** ** *****:*. :*. :

Si_GI-514815267.pro      EEGICQVLHLWLESEITSGSGSMATTSAASSS-----SSTS--SSSKKGA-KTEFEKRL 458
Bd_GI-357157184.pro      EEGICQVLSHMWLESEIIAGASGNTASTSVPPSS-----SSAP--TSSKKGA-KTEFEKRL 440
Br_DAlb.pro              EEGICQVMAHKWLEAELAAGSRNSNAASSSSSS-----Y-----GGVKKGP-RSQYERKL 467
Br_DAla.pro              EEGICQVMAHKWLEAELAAGSRNSNVASSSSS-----RGVKKGP-RSQYERKL 485
At_GI-15221983.pro       EEGICQVMAHKWLDLAELAAGSTNSNAASSSSSS-----QGLKKGP-RSQYERKL 485
Tc_GI-508722773.pro      EEGICQVLAHMWLLTQLEYAS--SSNVASASSSA-----S-----SRLQKGP-RPQFEGKL 431
Gm_GI-356564241.pro      EEGICQVLAHMWLESELSSASGSNFVSASSSSA-----S-----HTSRKGP-RPQFERKL 427
Gm_GI-356552145.pro      EEGICQVLSHMWLESELSSASGSNFVSASSSSA-----S-----HTSRKGP-RPQFERKL 431
Vv_GI-302142429.pro      EEGICQVLAYMWLDLAELTSGSGR-----SQCERKL 415
Vv_GI-359492104.pro      EEGICQVLAYMWLDLAELTSGSGSNV--PSTSSAS-----TSSKKGA-GSQCERKL 435
Sl_GI-460385048.pro      EEGICQVLAHMWLEQTQIASISSNGGASTSSGM-----SSSKQGI-RSPFERKL 439
Os_GI-218197709.pro      EEGICQVLAHMWIESEIIAGSGSNGASTSSSSS-----AS----TSSKKGP-RSQYERKL 831
Os_GI-115466772.pro      EEGICQVLAHMWIESEIIAGSGSNGASTSSSSS-----AS----TSSKKGP-RSQYERKL 439
Bd_GI-357160893.pro      EEGICQVLAHMWIESEIMAGSSSNAASTSSSSS-----SS----ISSKKGP-RSQYERKL 465
Bd_GI-357164660.pro      EEGICQVLAHMWIESEITAGSGSNAASTSSSSS-----S-----SKKGP-RSQYERKL 444
Sb_GI-242092232.pro      EEGICQVLHLWIESEIMAGSGSNAASTSSSSS-----SS----MSSKKGP-RSQYERKL 439
Zm_GI-212275448.pro      EEGICQVLAHMWIESEIMAGSGSNAASTSSSSS-----SS----TSSKKGP-RSQYERKL 461
At_GI-240256211.pro      EEGICQVLAHMWLESETYAGSTLVDIASSSSSA-----VVS---ASSKKGP-RSQYERKL 507
At_GI-145360806.pro      EEGICQVLSYMWLESEVLSDPSTRNLPSTSSVA-----TSSSSSFSNKKGP-KSNVEKRL 481
At_GI-22326876.pro       EEGLCQVLGYMWLECYTYFD----TATIASSS--SSRTPPLSTTSKKVD--PSDFEKL 1560
At_GI-30698242.pro       EEGLCQALGLRWLESQTFSTDAAAAAAASSSSSSTAPPAAITSKKSDWSIFEKRL 397
At_GI-30698240.pro       EEGICQVLGHLWLESQTYATADTTADAASASSS---SSRTPPAASAKKGE-WSDFDKRL 659
At_GI-15240018.pro       EEGICQVLGHLWLDQTYATADATADASSSASS---SSRTPPAASAKKGE-WSDFDKRL 601
At_GI-334188680.pro      EEGICQVLGHMWLESQTYYS---SSAAASSASS---SSRTP--AANASKKGA-QSDYEKRL 538
***:*. :. * : : :

Si_GI-514815267.pro      GEFFKHQIETDPSVAYGDGFRAGMRAVERYG--LRSTLDHIKLTGSFP----- 504 SEQ 4
Bd_GI-357157184.pro      GAFIKNQIETDSSVEYGDGFRAGNRAVERYG--LRSTLDHMKITGSFPY----- 487 SEQ 5
Br_DAlb.pro              GEFFKHQIESDASPVYGDGFRAGRLAVNKYG--LWRTLEHIQMTGRFPV----- 514 SEQ 6
Br_DAla.pro              GEFFKHQIESDASPVYGDGFRAGRLAVNKYG--LPKLEHIQMTGRFPV----- 532 SEQ 7
At_GI-15221983.pro       GEFFKHQIESDASPVYGDGFRAGRLAVHXYG--LRKLEHIQMTGRFPV----- 532 SEQ 8
Tc_GI-508722773.pro      GEFFKHQIESDTSVPYGDGFRAGHQAVYKYG--LRRLEHIRMGTGRFPY----- 478 SEQ 9
Gm_GI-356564241.pro      GEFFKHQIESDISPVYGDGFRAGQKAVRKYG--LQRTLHHIRMGTGRFPY----- 474 SEQ 10
Gm_GI-356552145.pro      GEFFKHQIESDISPVYGGGFRAGQKAVSKYG--LQRTLHHIRMGTGRFPY----- 478 SEQ 11
Vv_GI-302142429.pro      GQFFKHQIESDTSLVYAGGFRAGHQAVLKYG--LPATLKHIHLTGNFPY----- 462 SEQ 12
Vv_GI-359492104.pro      GQFFKHQIESDTSLVYAGGFRAGHQAVLKYG--LPATLKHIHLTGNFPY----- 482 SEQ 13
Sl_GI-460385048.pro      GDFFKHQIESDTSPLYGNFRAGNQAVLKYG--LERTLDHIRMGTGRFPY----- 486 SEQ 14
Os_GI-218197709.pro      GDFFKHQIESDTSMAVGDFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRTGTGTFP----- 878 SEQ 15
Os_GI-115466772.pro      GDFFKHQIESDTSMAVGDFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRTGTGTFP----- 486 SEQ 16
Bd_GI-357160893.pro      GDFFKHQIESDTSVAYGNFRSGNQAVLQYG--LKRTLEHIWLTGTWPF----- 512 SEQ 17
Bd_GI-357164660.pro      GDFFKHQIESDTSVAYGDGFRAGNQAVLQYG--LKRTLEHIRTGTLPF----- 491 SEQ 18
Sb_GI-242092232.pro      GDFFKHQIETDTSMAVGDFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRTGTGTFP----- 486 SEQ 19
Zm_GI-212275448.pro      GDFFKHQIETDTSMAVGDFRTGNRAVLHYG--LKRTLEHIRTGTGTFP----- 508 SEQ 20
At_GI-240256211.pro      GEFFKHQIESDSSAYGDGFRQGNQAVLKHG--LRRTLDHIRTGTGTFP----- 553 SEQ 21
At_GI-145360806.pro      GEFFKHQIAHDASPAYGGGFRAANAAACKYG--LRRTLDHIRTGTGTFP----- 528 SEQ 22
At_GI-22326876.pro       VNFCKHQIETDESPPFGDGRKVNKMMASNNHSLKDTLKEIISISKTPQYSKL 1613 SEQ 23
At_GI-30698242.pro       VEFCKMNQIETDSSPVYGLGFKQVYEMMVSNNNYIKDTLKDIVSASNATPDSTV 450 SEQ 24
At_GI-30698240.pro       VEFCKNQIETDESPPVYGLGFRVTNEMVTNS--SLQETLKEILRRR----- 702 SEQ 25
At_GI-15240018.pro       VEFCKNQIETDSSPVYGLGFRVTNEMVTNS--SLQETLKEILRRR----- 644 SEQ 26
At_GI-334188680.pro      VEFCKDQIETDSSPVYGVGRKVNQMVSDS--SLHKILKSIQHWTKPDSNL-587 SEQ 27

```

SEQ ID NO: 38-53

- 25 -

Pt_GI-224059640.pro	KQIKLLCKHAYHSECITKWLGINVCVPCVNDDEVFGEEESRN-----	203
Rc_GI-255582236.pro	KQMKLPCKHVVYHSECISKWLGINKVCPCVNNNEVFGEDSRH-----	240
Pp_GI-462414664.pro	RQINLPCKHVVYHSECISKWLGINKVCPCVNNLEVSAGEESRH-----	245
Tc_GI-508704801.pro	QQMKLPCKHVVYHSQCITKWLSINKVCPCVNNNEVFGEEESRH-----	242
Vv_GI-359487286.pro	RQIKLPCKHVVYHDCGKWLTKINKVCPCVNIIEVFGEEESRH-----	247
Gm_GI-356548935.pro	QQMKLPCKSHVVYHSECITKWLSINKKCPVCNTEVFGEEESTH-----	247
Gm_GI-356544176.pro	QQMKLPCKSHVVYHSECITKWLSINKKCPVCNTEVFGEEESTH-----	247
At_EOD1.pro	RQMNLPCKHVVYHSECISKWLSINKVCPCVNSEVFGEPDSIH-----	248
Cr_GI-482561003.pro	RQMNLPCKHVVYHSECISKWLSINKVCPCVNTTEVFGDPSIH-----	243
Sb_GI-242042045.pro	LQMTLPCKHVVYHASCVTRWLSINKVCPCVFAEVPGDPEPKRQ----	249
Zm_GI-223973923.pro	LQMTLPCKHVVYHASCVTRWLGINKVCPCVFAEVPGEDPEAMSQQL	253
Zm_GI-226496789.pro	LQITLPCKHVVYHASCVTRWLSINKVCPCVFAEVPGEDSLRQ----	249
Os_GI-222624282.pro	LQMTLPCKHVVYHASCVTRWLSINKVCPCVFAEVPGDPEPKRQ----	272
Os_GI-115451045.pro	LQMTLPCKHVVYHASCVTRWLSINKVCPCVFAEVPGDPEPKRQ----	250
Bd_GI-357113826.pro	LQMALPCKHVVYHASCVTRWLSINKVCPCVFAEVPSEEPSRQ----	251
Sl_GI-460410949.pro	QQVTLPCKHVVYHAGCGSRWLSINKACPLCYTEVVINTSKR-----	246

*: * *.** * ::** ** *: * : .

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения растения с увеличенной урожайностью, включающий

введение в клетку растения гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутантный белок DA1, причем аминокислотная последовательность указанного мутантного белка DA1 по меньшей мере на 80% идентична последовательности белка DA1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-27, при этом в указанном мутантном белке DA1 мутирован остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C172, C175, H193, C196, C199, C202, H220 или C223 в SEQ ID NO: 8, или остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C232, C235, H252, C260, H263, C271, C274, C294 или C297 в SEQ ID NO: 8, причем в результате указанной мутации не происходит образования одного или более мотивов "цинковые пальцы"; или

введение мутации в кодирующую белок DA1 нуклеотидную последовательность в клетке растения, такой, что указанная последовательность в результате кодирует мутантный белок DA1, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности белка DA1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-27, причем в указанном мутантном белке DA1 мутирован остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C172, C175, H193, C196, C199, C202, H220 или C223 в SEQ ID NO: 8, или остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C232, C235, H252, C260, H263, C271, C274, C294 или C297 в SEQ ID NO: 8, причем в результате указанной мутации не происходит образования одного или более мотивов "цинковые пальцы"; и

регенерацию растения из указанной клетки растения.

2. Способ по п.1, согласно которому указанная гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный мутантный белок DA1 содержит в С-концевой области последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из следующих последовательностей:

остаткам с 198 по 504 SEQ ID NO: 4,
остаткам с 180 по 487 SEQ ID NO: 5,
остаткам с 212 по 514 SEQ ID NO: 6,
остаткам с 229 по 532 SEQ ID NO: 7,
остаткам с 229 по 532 SEQ ID NO: 8,
остаткам с 174 по 478 SEQ ID NO: 9,
остаткам с 174 по 474 SEQ ID NO: 10,
остаткам с 178 по 478 SEQ ID NO: 11,
остаткам с 176 по 462 SEQ ID NO: 12,
остаткам с 179 по 482 SEQ ID NO: 13,
остаткам с 182 по 486 SEQ ID NO: 14,
остаткам с 573 по 878 SEQ ID NO: 15,
остаткам с 181 по 486 SEQ ID NO: 16,
остаткам с 207 по 512 SEQ ID NO: 17,
остаткам с 189 по 491 SEQ ID NO: 18,
остаткам с 181 по 486 SEQ ID NO: 19,
остаткам с 204 по 508 SEQ ID NO: 20,
остаткам с 247 по 553 SEQ ID NO: 21,
остаткам с 219 по 528 SEQ ID NO: 22,
остаткам с 1296 по 1613 SEQ ID NO: 23,
остаткам с 128 по 450 SEQ ID NO: 24,
остаткам с 404 по 702 SEQ ID NO: 25,
остаткам с 343 по 644 SEQ ID NO: 26 или

остаткам с 256 по 587 SEQ ID NO: 27.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанная С-концевая область содержит мотив металло-пептидазы HEMMH (SEQ ID NO: 32).

5. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что мутантный белок DA1 содержит С-концевую область, которая имеет аминокислотную последовательность EK(X)₈R(X)₄SEEQ (SEQ ID NO: 33) или EK(X)₈R(X)₄SEQ (SEQ ID NO: 34), где X независимо представляет собой любую аминокислоту.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанный мутантный белок DA1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 4-27.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанное растение или клетка растения являются дефицитными по экспрессии или активности энхансера da1 - (EOD1).

8. Способ по любому из пп.1-7, включающий осуществление полового или вегетативного размножения растения, экспрессирующего указанный белок DA1.

9. Способ по п.8, включающий выращивание потомка или потомства растения, экспрессирующего указанный белок DA1.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что указанное растение представляет собой высшее растение, в частности сельскохозяйственное растение, которое выбрано из группы, включающей *Lithospermum erythrorhizon*, *Taxus* spp, табак, тыквы, морковь, овощную культуру рода капуста, дыни, перцы однолетние, виноград, салат, клубнику, масличную культуру рода капуста, сахарную свеклу, пшеницу, ячмень, маис, рис, сою, горох, сорго, подсолнечник, помидор, картофель, перец, хризантему, гвоздику, лен, коноплю и рожь.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что указанный мутантный белок DA1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-27, причем в указанном мутантном белке DA1 мутирован остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C172, C175, H193, C196, C199, C202, H220 или C223 в SEQ ID NO: 8, или остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C232, C235, H252, C260, H263, C271, C274, C294 или C297 в SEQ ID NO: 8, причем в результате указанной мутации не происходит образования одного или более мотивов "цинковые пальцы".

12. Клетка растения, содержащая гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую мутантный белок DA1, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности белка DA1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-27, причем в указанном мутантном белке DA1 мутирован остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C172, C175, H193, C196, C199, C202, H220 или C223 в SEQ ID NO: 8, или остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C232, C235, H252, C260, H263, C271, C274, C294 или C297 в SEQ ID NO: 8, причем в результате указанной мутации не происходит образования одного или более мотивов "цинковые пальцы".

13. Клетка растения по п.12, отличающаяся тем, что указанный мутантный белок DA1 содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 4-27, причем в указанном мутантном белке DA1 мутирован остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C172, C175, H193, C196, C199, C202, H220 или C223 в SEQ ID NO: 8, или остаток цистеина или гистидина, соответствующий остаткам C232, C235, H252, C260, H263, C271, C274, C294 или C297 в SEQ ID NO: 8, причем в результате указанной мутации не происходит образования одного или более мотивов "цинковые пальцы".

14. Растение, содержащее клетку растения по п.12 или 13, при этом указанное растение имеет увеличенную урожайность.



Фиг. 1

