

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090273** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.10.30**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2014.11.05**

---

(54) **СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ РАЗМЕРА СЕМЯН И ОРГАНОВ У РАСТЕНИЙ**

---

(31) **1319876.7**

(72) Изобретатель:

(32) **2013.11.11**

**Беван Майкл, Дюмениль Джек (GB)**

(33) **GB**

(62) **201690831; 2014.11.05**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**Нилова М.И. (RU)**

**ПЛАНТ БИОСАЙЕНС ЛИМИТЕД  
(GB)**

---

(57) Настоящее 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.

**A2**

**202090273**

**202090273**

**A2**

## СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ РАЗМЕРА СЕМЯН И ОРГАНОВ У РАСТЕНИЙ

### Область техники

- 5 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  
10 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); Dinnyen, 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  
15 (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  
20 органов является значительно большей. Это свидетельствует о том, что растениям  
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.

25

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  
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 одиннадцать локусов, влияющих на массу и/или длину семян в продуктах  
скрещивания между изолятами Ler 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 U S A* 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.

### 30 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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

30 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.

- 5 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.
- 10 Растение может демонстрировать увеличенную урожайность или усиление связанного с урожайностью признака по сравнению с контролями.

#### Краткое описание чертежей

- На фигуре 1 представлены характеристики восьми остатков, связывающих цинк (1 – 8),  
15 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 фигуре 2 представлена топология координации Zn в LIM-домене. Фиолетовые  
20 круги обозначают остатки, связывающие Zn. Полуконсервативные алифатические/объемные остатки показаны зеленым цветом, неконсервативные остатки, расположенные на постоянном расстоянии, – красным. Пунктирные желтые круги обозначают переменное число остатков (X), возможное в пространстве.

- 25 На фигуре 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  
30 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 фигуре 4 представлен эффект мутации *lim8* на размер семян у расы Col.

5

#### Подробное описание вариантов реализации изобретения

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

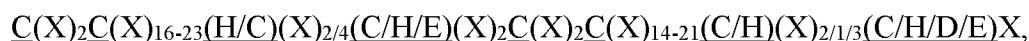
DA1 представляет собой рецептор убиквитина растений, который подробно описан в публикациях Li et al (2008), Wang, et al (2012) и WO2009/047525.

15

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

20

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



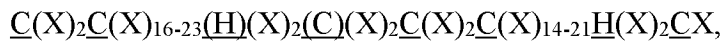
25

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.

30

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  
5 Zn, подчеркнуты.

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

10 CAGCNMEIGHGRFLNCLNSLWHHPECFRCYGCSQPISEYEFSTSGNYPFHKACY  
(SEQ ID NO: 3; остатки, координирующие Zn, подчеркнуты)

Другие LIM-домены включают LIM-домен согласно аминокислотной  
последовательности DA1, представленной в таблице 1 (пунктирный квадрат),  
15 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  
20 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-  
25 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  
30 (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).

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

10 CX<sub>2</sub>CX<sub>16-23</sub>HX<sub>7</sub>CX<sub>2</sub>HX<sub>7</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>19</sub>CX<sub>2</sub>C

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

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

20 CXVCX<sub>16-23</sub>HPFWX<sub>3</sub>YCPXHX<sub>7</sub>CCSCERXEX<sub>5</sub>YX<sub>2</sub>LXDXXRLCXXC

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

- 25 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)X<sub>4</sub>YX<sub>2</sub>LXD(G/F/N)R(R/K/S/W)LC(L/R/V)(E/K)C

30



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

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

10 CDVCSHFIPTNHAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHENDATPRCCSCERMEPRNTRYVELN  
DGRKLCLEC (SEQ ID NO: 31)

Другие LIM-подобные домены включают LIM-домен согласно аминокислотной последовательности DA1, представленной в таблице 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  
 5 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  
 10 198 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  
 15 878 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  
 20 644 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).

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

Помимо LIM-домена и консервативной карбокси-концевой области, белок DA1 может  
 30 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)

5 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;

10 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;

15 . отсутствует или представляет собой любую аминокислоту, и

- представляет собой любую аминокислоту.

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

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения белок DA1 может содержать:

25 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 NO 4 – 7 или 9 – 27, изложенных выше, и  
30 содержащую мотив EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEEQ или EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEQ 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 таблице 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 белка DA1, изложенной в настоящей заявке.

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.

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

10 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.

15 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.

20 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.

30 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 настоящей заявке.

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.

5

Например, вариант нуклеотидной последовательности может представлять собой гомолог эталонной последовательности DA1, изложенной в настоящей заявке, и может отличаться от эталонной нуклеотидной последовательности DA1 одним или несколькими добавлениями, вставками, делециями или заменами одного или  
10 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,  
15 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  
20 95% или по меньшей мере 98%. Идентичность последовательности описана в настоящей заявке.

Идентичность последовательности обычно определяют на основании алгоритма GAP (Wisconsin Package, Accelrys, San Diego, USA). В GAP используется алгоритм  
25 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  
30 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).

- 5 Сравнение последовательностей можно проводить по всей длине соответствующей последовательности, описанной в настоящей заявке.

Нуклеотидную последовательность DA1, которая представляет собой вариант эталонной последовательности нуклеиновой кислоты DA1, изложенной в настоящей заявке, 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2, 6,5% SDS (додецилсульфате натрия), 10% сульфате декстрана и завершающую промывку при температуре 55°C в 0,1x 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2, 6,5% SDS, 10% сульфате декстрана и завершающую промывку при температуре 60°C в 0,1x SSC, 0,1% SDS.

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

30

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 настоящей заявке.

5 LIM-домен, LIM-подобный домен или как LIM-домен, так и LIM-подобный домен белка DA1 для применения, описанного в настоящей заявке, могут являться инактивированными или нарушенными («белок DA1 с нарушенным LIM»).

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

15 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.

20 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.

25 Нарушенный или инактивированный LIM-домен или LIM-подобный домен может быть неспособен координировать Zn или образовывать мотивы «цинкового пальца», что препятствует осуществлению функции домена, т.е. нарушенный LIM- или LIM-подобный домен неспособен опосредовать белок-белковые взаимодействия. Например, нарушенный LIM-домен или LIM-подобный домен может быть неспособен внутримолекулярно взаимодействовать с С-концевой областью белка DA1 для  
30 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.

- 5 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  
10 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  
15 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 1651-1658; 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,  
20 270-2). 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).

- 25 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  
30 содержать мутацию одного или нескольких остатков, координирующих Zn, или предполагаемых остатков, координирующих Zn, например, остатка цистеина или гистидина в окружении SxxC 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, координирующих 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, 5 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 Y, С на G или 10 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 15 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 таблице 1.

Инактивированный или нарушенный LIM-домен может содержать мутацию одного 20 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.

25 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 домене, представленном в любой из SEQ ID 30 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 домене 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 G 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 таблице 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 настоящей заявке, 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 таблице 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 НЕММН (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)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEEQ (SEQ ID NO: 33) или EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEQ (SEQ ID NO: 34) в пределах С-концевой области.

Данные, приведенные в настоящей заявке, 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); WO2009/047525; 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*.

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

10 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.

15 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).

20 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 У.

25 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.

- 5 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.
- 10 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
- 15 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
- 20 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

25 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

30 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, имидазолиноны, 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, pp 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 таковой, 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 собой трансформация  
5 клеток растений с применением минимальной конструкции экспрессии гена согласно, например, европейскому патенту № EP1407000B1, включенному в настоящую заявку посредством ссылки с данной целью.

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

Трансформация агробактериями представляет собой способ, широко применяемый  
15 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,  
20 274-276; 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;  
25 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; WO92/14828; Nilsson, O. et al (1992) *Transgenic Research* 1, 209-220).

30

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 9012096, 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.

10 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).

15 После трансформации растение можно регенерировать, например, из отдельных клеток, ткани каллюса 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.

25 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  
30 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.

- 5 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
- 10 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,

15 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-

20 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.

25 *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

30 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)

(Urnov, 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)).

- 5 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
- 10 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.

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

- 20 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), WO2009/047525).

- 25 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), WO2009/047525). Белки EOD1 содержат домен EOD. Домен EOD растений
- 30 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 настоящей заявке (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 таблице 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.

5

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.

10

15 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.

20

Белки EOD1 и кодирующие нуклеиновые кислоты, экспрессия или активность которых может быть уменьшена, как описано в настоящей заявке, 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.

25

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

30

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.

10

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

15

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

20

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.

25

Белки DA1 с нарушенным LIM можно экспрессировать, как описано в настоящей заявке, в любом виде растений. Примеры растений, подходящих для применения согласно любому аспекту настоящего изобретения, описанному в настоящей заявке, 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,

30

маис, рис, сою, горох, сорго, подсолнечник, помидор, картофель, перец, хризантему, гвоздику, лен, коноплю и рожь.

5 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.

10 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.

15 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.

20

Подходящее растение может быть получено посредством способа, описанного выше.

25 Помимо растения, полученного посредством способа, описанного в настоящей заявке, 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,

30 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 настоящей заявке 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 настоящей заявке 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 настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Содержание всех записей баз данных, упоминаемых в настоящей спецификации, также включено в настоящую заявку 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 двух часов при 220 об./мин. Колбу вынимали из инкубатора, добавляли IPTG (изопропилтиогалактозид, Melford MB1008) до конечной концентрации 1 мМ, после чего инкубировали культуру при температуре 28°C (и 220 об./мин.) в течение еще трех часов.

После данной фазы роста культуры центрифугировали при 4500g в течение 10 минут, супернатанты отбрасывали, и осадок ресуспендировали при температуре 4°C в 2,5 мл буфера TGH (50 мМ HEPES (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1% Triton-X-100, 10% глицерол, 1 мМ DTT (дителиотреитол), 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 десять секунд, разделенных интервалами по 20 секунд, после чего центрифугировали при 12000g в течение 20 минут, 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 минут 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 мМ TRIS-глицин (pH 8,0), 10 мМ восстановленного глутатиона) в течение более 30 минут при температуре 4°C с последующим анализом методом вестернблоттинга.

## 1.2 Вестернблоттинг

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 2x буфером для образца Лэмли (Bio-Rad Ltd 161-0737), который помещали в термоблок при температуре 96°C в течение 10 минут, а затем наносили в промытые лунки в геле в аликвотах по 10 мкл или 20 мкл. Гели анализировали при 160 В в течение 60 минут 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 мМ TRIS, 192 мМ глицин, 10% (об./об.) метанол) и выдерживали при 90 В в течение 70 минут при температуре 4°C.

После переноса мембрану промывали в течение 10 минут в 50 мл ФБР (фосфатный буферный раствор, 140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 одного часа при комнатной температуре или в течение ночи при температуре 4°C. Первичные антитела разводили в блокирующем растворе до соответствующей концентрации (см. таблицу 2.9) и инкубировали с мембраной (10 мл на мембрану при легком перемешивании) в течение одного часа перед пятью промывками 50 мл ФБРТ (ФБР с Tween, 140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 промокивали 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 пять минут, высушивали, как описано ранее, и помещали в рентгеновскую кассету для пленок под лист рентгеновской пленки (Fuji Film X-RAY, 18 x 24 см (FujiFilm 497772RXNO)). Рентгеновскую пленку проявляли с применением настольной проявочной машины для рентгеновских пленок Konica SRX-101 (Konica 106931659).

10

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

### 15 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]

25

## 30 2. Результаты

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

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

10 Однако неожиданно было обнаружено, что при введении расе Col арабидопсиса вариант DA1 с мутантным LIM-доменом (в дальнейшем обозначаемый «DA1lim8») вызывает доминантный негативный фенотип размера органа, эквивалентный мутанту da-1 (фиг. 4). Полученные результаты демонстрируют, что LIM-домен DA1 не вовлечен в гомодимеризацию DA1.

15 Для получения мутанта DA1lim84 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).

20 Рекомбинантные белки-приманки, меченные GST, инкубировали с рекомбинантными белками-добычей, меченными FLAG, с последующей преципитацией меченных GST белков-приманок на гранулах глутатион-сефарозы. Затем очищенные белки элюировали и проводили анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и иммуноблотинга. Способность  $\beta$ -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.

30 Данные эксперименты по коиммунопреципитации *in vitro* продемонстрировали, что DA1lim8 способен связываться с белком DA1 дикого типа (фигура 3), и что фенотип размера семян lim8 у расы Col эквивалентен таковому для da1-1 (фигура 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 CxxH 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.

```

Si_GI-514815267.pro -----
Bd_GI-357157184.pro -----
Br_DA1b.pro -----
5 Br_DA1a.pro -----
At_GI-15221983.pro -----
Tc_GI-508722773.pro -----
Gm_GI-356564241.pro -----
10 Gm_GI-356552145.pro -----
Vv_GI-302142429.pro -----
Vv_GI-359492104.pro -----
Sl_GI-460385048.pro -----
Os_GI-218197709.pro -----
15 Os_GI-115466772.pro -----
Bd_GI-357160893.pro -----
Bd_GI-357164660.pro -----
Sb_GI-242092232.pro -----
Zm_GI-212275448.pro -----
At_GI-240256211.pro -----
20 At_GI-145360806.pro -----
At_GI-22326876.pro MEPPAARVTPSIKADCShSVNIICEETVLHSLVSHLSAALRREGISVFVDACGLQETKFF 60
At_GI-30698242.pro -----
At_GI-30698240.pro -----
25 At_GI-15240018.pro -----
At_GI-334188680.pro -----

Si_GI-514815267.pro -----
30 Bd_GI-357157184.pro -----
Br_DA1b.pro -----
Br_DA1a.pro -----
At_GI-15221983.pro -----
Tc_GI-508722773.pro -----
35 Gm_GI-356564241.pro -----
Gm_GI-356552145.pro -----
Vv_GI-302142429.pro -----
Vv_GI-359492104.pro -----
40 Sl_GI-460385048.pro -----
Os_GI-218197709.pro -----
Os_GI-115466772.pro -----
Bd_GI-357160893.pro -----
Bd_GI-357164660.pro -----
Sb_GI-242092232.pro -----
45 Zm_GI-212275448.pro -----
At_GI-240256211.pro -----
At_GI-145360806.pro -----
At_GI-22326876.pro SIKQnQPLTDGARVLVVVISDEVEFYDPWFPKFLKVIQGWQNNGHVVVVPFYGVDSLTRV 120
At_GI-30698242.pro -----
At_GI-30698240.pro -----
50 At_GI-15240018.pro -----
At_GI-334188680.pro -----

Si_GI-514815267.pro -----
55 Bd_GI-357157184.pro -----
Br_DA1b.pro -----
Br_DA1a.pro -----
At_GI-15221983.pro -----
Tc_GI-508722773.pro -----
60 Gm_GI-356564241.pro -----
Gm_GI-356552145.pro -----
Vv_GI-302142429.pro -----
Vv_GI-359492104.pro -----
65 Sl_GI-460385048.pro -----
Os_GI-218197709.pro -----
Os_GI-115466772.pro -----
Bd_GI-357160893.pro -----
Bd_GI-357164660.pro -----
70 Sb_GI-242092232.pro -----
Zm_GI-212275448.pro -----
At_GI-240256211.pro -----
At_GI-145360806.pro -----
At_GI-22326876.pro YGWANSWLEAEKLTSHQSKILSNNVLTDSSELVEEIVRDVYGKLYPAERVGIYARLLEIEK 180
75 At_GI-30698242.pro -----
At_GI-30698240.pro -----
At_GI-15240018.pro -----

```

```

At_GI-334188680.pro -----

5  Si_GI-514815267.pro -----
   Bd_GI-357157184.pro -----
   Br_DA1b.pro -----
   Br_DA1a.pro -----
   At_GI-15221983.pro -----
10  Tc_GI-508722773.pro -----
   Gm_GI-356564241.pro -----
   Gm_GI-356552145.pro -----
   Vv_GI-302142429.pro -----
   Vv_GI-359492104.pro -----
15  Sl_GI-460385048.pro -----
   Os_GI-218197709.pro -----
   Os_GI-115466772.pro -----
   Bd_GI-357160893.pro -----
   Bd_GI-357164660.pro -----
20  Sb_GI-242092232.pro -----
   Zm_GI-212275448.pro -----
   At_GI-240256211.pro -----
   At_GI-145360806.pro -----
   At_GI-22326876.pro ----- LLYKQHRDIRSIGIWGMPGIGKTTLAKAVFNHMSTDYDASCFTIENFDEAFHKEGLHRLLK 240
   At_GI-30698242.pro -----
25  At_GI-30698240.pro -----
   At_GI-15240018.pro -----
   At_GI-334188680.pro -----

30  Si_GI-514815267.pro -----
   Bd_GI-357157184.pro -----
   Br_DA1b.pro -----
   Br_DA1a.pro -----
35  At_GI-15221983.pro -----
   Tc_GI-508722773.pro -----
   Gm_GI-356564241.pro -----
   Gm_GI-356552145.pro -----
   Vv_GI-302142429.pro -----
40  Vv_GI-359492104.pro -----
   Sl_GI-460385048.pro -----
   Os_GI-218197709.pro -----
   Os_GI-115466772.pro -----
   Bd_GI-357160893.pro -----
45  Bd_GI-357164660.pro -----
   Sb_GI-242092232.pro -----
   Zm_GI-212275448.pro -----
   At_GI-240256211.pro -----
   At_GI-145360806.pro -----
50  At_GI-22326876.pro ----- ERIGKILKDEFDIESSYIMRPTLHRDKLYDKRILVVLDDVDRDSLAAESFLKRLDWFGSGS 300
   At_GI-30698242.pro -----
   At_GI-30698240.pro -----
   At_GI-15240018.pro -----
   At_GI-334188680.pro -----

55  Si_GI-514815267.pro -----
   Bd_GI-357157184.pro -----
   Br_DA1b.pro -----
   Br_DA1a.pro -----
60  At_GI-15221983.pro -----
   Tc_GI-508722773.pro -----
   Gm_GI-356564241.pro -----
   Gm_GI-356552145.pro -----
65  Vv_GI-302142429.pro -----
   Vv_GI-359492104.pro -----
   Sl_GI-460385048.pro -----
   Os_GI-218197709.pro -----
   Os_GI-115466772.pro -----
70  Bd_GI-357160893.pro -----
   Bd_GI-357164660.pro -----
   Sb_GI-242092232.pro -----
   Zm_GI-212275448.pro -----
   At_GI-240256211.pro -----
75  At_GI-145360806.pro -----
   At_GI-22326876.pro ----- LIIITSVDKQVFAFCQINQIYTVQGLNVHEALQLFSQSVFGINEPEQNDRKLSMKVIDYV 360
   At_GI-30698242.pro -----
   At_GI-30698240.pro -----

```



```

At_GI-15240018.pro -----
At_GI-334188680.pro -----

5   Si_GI-514815267.pro -----
    Bd_GI-357157184.pro -----
    Br_DAlb.pro -----
    Br_DAla.pro -----
10  At_GI-15221983.pro -----
    Tc_GI-508722773.pro -----
    Gm_GI-356564241.pro -----
    Gm_GI-356552145.pro -----
    Vv_GI-302142429.pro -----
    Vv_GI-359492104.pro -----
15  Sl_GI-460385048.pro -----
    Os_GI-218197709.pro -----
    Os_GI-115466772.pro -----
    Bd_GI-357160893.pro -----
    Bd_GI-357164660.pro -----
20  Sb_GI-242092232.pro -----
    Zm_GI-212275448.pro -----
    At_GI-240256211.pro -----
    At_GI-145360806.pro -----
25  At_GI-22326876.pro      NGNPLALSIYGRELMGKSEMETAFFELKHCPLKIQDVLKNAYSALSNEKNIVLDIAF 420
    At_GI-30698242.pro -----
    At_GI-30698240.pro -----
    At_GI-15240018.pro -----
    At_GI-334188680.pro -----

30  Si_GI-514815267.pro -----
    Bd_GI-357157184.pro -----
    Br_DAlb.pro -----
    Br_DAla.pro -----
35  At_GI-15221983.pro -----
    Tc_GI-508722773.pro -----
    Gm_GI-356564241.pro -----
    Gm_GI-356552145.pro -----
    Vv_GI-302142429.pro -----
40  Vv_GI-359492104.pro -----
    Sl_GI-460385048.pro -----
    Os_GI-218197709.pro -----
    Os_GI-115466772.pro -----
    Bd_GI-357160893.pro -----
45  Bd_GI-357164660.pro -----
    Sb_GI-242092232.pro -----
    Zm_GI-212275448.pro -----
    At_GI-240256211.pro -----
    At_GI-145360806.pro -----
50  At_GI-22326876.pro      FFKGETVNYVMQLLEESHYFPRLAIDVLVDKCVLTISENTVQMNLIQDTCQEIFNGEIE 480
    At_GI-30698242.pro -----
    At_GI-30698240.pro -----
    At_GI-15240018.pro -----
    At_GI-334188680.pro -----

55  Si_GI-514815267.pro -----
    Bd_GI-357157184.pro -----
    Br_DAlb.pro -----
60  Br_DAla.pro -----
    At_GI-15221983.pro -----
    Tc_GI-508722773.pro -----
    Gm_GI-356564241.pro -----
    Gm_GI-356552145.pro -----
65  Vv_GI-302142429.pro -----
    Vv_GI-359492104.pro -----
    Sl_GI-460385048.pro -----
    Os_GI-218197709.pro -----
    Os_GI-115466772.pro -----
70  Bd_GI-357160893.pro -----
    Bd_GI-357164660.pro -----
    Sb_GI-242092232.pro -----
    Zm_GI-212275448.pro -----
    At_GI-240256211.pro -----
75  At_GI-145360806.pro -----
    At_GI-22326876.pro      TCTRMWEPSRIRYLLEYDELEGSGETKAMPKSGLVAEHIESIFLDTSNVKFDVKHDAFKN 540
    At_GI-30698242.pro -----

```

At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----

5

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----

10

At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----

15

Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----

20

Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----

25

At\_GI-22326876.pro -----  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----

MFNLKFLKIYNSCSKYISGLNFPKGLDLSLPYELRLLHWENYPLQSLPQDFDFGHLVKLSM 600

30

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----

35

At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----

40

Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----

45

Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----

50

At\_GI-22326876.pro -----  
At\_GI-30698242.pro -----  
At\_GI-30698240.pro -----  
At\_GI-15240018.pro -----  
At\_GI-334188680.pro -----

PYSQLHKLGTTRVKDLVMLKRLLILSHSLQLVECDILIIYAQNIELIDLQGCTGLQRFDPDTSQ 660

55

Si\_GI-514815267.pro -----  
Bd\_GI-357157184.pro -----  
Br\_DAlb.pro -----  
Br\_DAla.pro -----

60

At\_GI-15221983.pro -----  
Tc\_GI-508722773.pro -----  
Gm\_GI-356564241.pro -----  
Gm\_GI-356552145.pro -----  
Vv\_GI-302142429.pro -----

65

Vv\_GI-359492104.pro -----  
Sl\_GI-460385048.pro -----  
Os\_GI-218197709.pro -----  
Os\_GI-115466772.pro -----  
Bd\_GI-357160893.pro -----

70

Bd\_GI-357164660.pro -----  
Sb\_GI-242092232.pro -----  
Zm\_GI-212275448.pro -----  
At\_GI-240256211.pro -----  
At\_GI-145360806.pro -----  
At\_GI-22326876.pro -----

75

-----MGDRP 5

LQNLRVVNLSGCTEIKCFSGVPPNIEELHLQGTREIREIPIFNATHPPKVKLDRKKLWNL 720

	At_GI-30698242.pro	-----	
	At_GI-30698240.pro	-----	
	At_GI-15240018.pro	-----	
5	At_GI-334188680.pro	-----	
	Si_GI-514815267.pro	-----	
	Bd_GI-357157184.pro	-----	
10	Br_DAlb.pro	-----	
	Br_DAla.pro	-----	
	At_GI-15221983.pro	-----	
	Tc_GI-508722773.pro	-----	
	Gm_GI-356564241.pro	-----	
15	Gm_GI-356552145.pro	-----	
	Vv_GI-302142429.pro	-----	
	Vv_GI-359492104.pro	-----	
	Sl_GI-460385048.pro	-----	
	Os_GI-218197709.pro	DMGAGVALRFSHNDWTLEEDSKALHFLQPDLVLF	TGDYGNENVQLVKISIDLQLPKAAIL 65
20	Os_GI-115466772.pro	-----	
	Bd_GI-357160893.pro	-----	
	Bd_GI-357164660.pro	-----	
	Sb_GI-242092232.pro	-----	
	Zm_GI-212275448.pro	-----	
25	At_GI-240256211.pro	-----	
	At_GI-145360806.pro	-----	
	At_GI-22326876.pro	ENFSDVEHIDLECVTNLATVTSNNHVMGKLVCLNMKYCSNLRGLPDMVSLES	LKVLYLSG 780
	At_GI-30698242.pro	-----	
	At_GI-30698240.pro	-----	
30	At_GI-15240018.pro	-----	
	At_GI-334188680.pro	-----	
	Si_GI-514815267.pro	-----	
35	Bd_GI-357157184.pro	-----	
	Br_DAlb.pro	-----	
	Br_DAla.pro	-----	
	At_GI-15221983.pro	-----	
	Tc_GI-508722773.pro	-----	
40	Gm_GI-356564241.pro	-----	
	Gm_GI-356552145.pro	-----	
	Vv_GI-302142429.pro	-----	
	Vv_GI-359492104.pro	-----	
	Sl_GI-460385048.pro	-----	
45	Os_GI-218197709.pro	GNHDCWHTYQFSEKKVDRVQLQLES	LGQHVGYKCLDFPTIKLSVVGGRPFSCGGNRIFR 125
	Os_GI-115466772.pro	-----	
	Bd_GI-357160893.pro	-----	
	Bd_GI-357164660.pro	-----	
	Sb_GI-242092232.pro	-----	
50	Zm_GI-212275448.pro	-----	
	At_GI-240256211.pro	-----	
	At_GI-145360806.pro	-----	
	At_GI-22326876.pro	CSELEKIMGFPRNLKKLYVGGTAIRELP	QLPNSLEFLNAHGCKHLKSINLDFEQLPRHFI 840
	At_GI-30698242.pro	-----	
55	At_GI-30698240.pro	-----	
	At_GI-15240018.pro	-----	
	At_GI-334188680.pro	-----	
60	Si_GI-514815267.pro	-----	
	Bd_GI-357157184.pro	-----	
	Br_DAlb.pro	-----	
	Br_DAla.pro	-----	
	At_GI-15221983.pro	-----	
65	Tc_GI-508722773.pro	-----	
	Gm_GI-356564241.pro	-----	
	Gm_GI-356552145.pro	-----	
	Vv_GI-302142429.pro	-----	
	Vv_GI-359492104.pro	-----	
70	Sl_GI-460385048.pro	-----	
	Os_GI-218197709.pro	PKLLSKWYGVNDMAESAKRIYDAATNAPKEHAVILLAHNGPTGLGSRMEDICGRD	WVAGG 185
	Os_GI-115466772.pro	-----	
	Bd_GI-357160893.pro	-----	
	Bd_GI-357164660.pro	-----	
75	Sb_GI-242092232.pro	-----	
	Zm_GI-212275448.pro	-----	
	At_GI-240256211.pro	-----	
	At_GI-145360806.pro	-----	

```

At_GI-22326876.pro      FSNCYRFSSQVIAEFVEKGLVASLARAKQEELIKAPEVIICIPMDTRQRSSFRLQAGRNA 900
At_GI-30698242.pro      -----
At_GI-30698240.pro      -----MPISDVASLVGGAALGAPLSE 21
At_GI-15240018.pro      -----MASDYSSDDEGFGEKVGVLIG 21
5  At_GI-334188680.pro      -----MWCLSCFKPSTKHDP 15

Si_GI-514815267.pro      -----
Bd_GI-357157184.pro      -----
10 Br_DA1b.pro              -----
   Br_DA1a.pro              -----
   At_GI-15221983.pro        -----
   Tc_GI-508722773.pro        -----
   Gm_GI-356564241.pro        -----
15 Gm_GI-356552145.pro        -----
   Vv_GI-302142429.pro        -----
   Vv_GI-359492104.pro        -----
   Sl_GI-460385048.pro        -----
   Os_GI-218197709.pro        GDHGDPDLEQAI SDLQRETGVSIPLVVFHGMHKS LAYGRGLRKMIAFGANRTIYLNQAVV 245
20 Os_GI-115466772.pro        -----
   Bd_GI-357160893.pro        -----
   Bd_GI-357164660.pro        -----
   Sb_GI-242092232.pro        -----
   Zm_GI-212275448.pro        -----
25 At_GI-240256211.pro        -----
   At_GI-145360806.pro        -----
   At_GI-22326876.pro        MTDLVPWMQKPI SGFMSVVVS FQDDYHNDVGLRIRCVGTWKTWNNQPDRIVERFFQCWA 960
30 At_GI-30698242.pro        -----
   At_GI-30698240.pro        IFKLVIEEAKKVKDFKP ----- L 39
   At_GI-15240018.pro        EKDRFEAETIHVIEVSQ ----- H 39
   At_GI-334188680.pro        SEDRFEEETNIVTGIS ----- 31

Si_GI-514815267.pro      -----
Bd_GI-357157184.pro      -----
35 Br_DA1b.pro              -----
   Br_DA1a.pro              -----
   At_GI-15221983.pro        -----
   Tc_GI-508722773.pro        -----
40 Gm_GI-356564241.pro        -----
   Gm_GI-356552145.pro        -----
   Vv_GI-302142429.pro        -----
   Vv_GI-359492104.pro        -----
   Sl_GI-460385048.pro        -----
45 Os_GI-218197709.pro        PRVNHAQSSRQPAISTSEKTGLEGLTGLMVPTSRRAFTIVDLFEGAVEKISEVWVTVDGAR 305
   Os_GI-115466772.pro        -----
   Bd_GI-357160893.pro        -----
   Bd_GI-357164660.pro        -----
   Sb_GI-242092232.pro        -----
50 Zm_GI-212275448.pro        -----
   At_GI-240256211.pro        -----
   At_GI-145360806.pro        -----MSSSSSSSSSSPSSSYGVARVS 22
55 At_GI-22326876.pro        PTEAPKVVDHI FVLYDTKMHPSDSEENHISMWAHEVKFEFHTVSGENNPLGASCKVTEC 1020
   At_GI-30698242.pro        -----
   At_GI-30698240.pro        SQDLASTMERLVPFI FNEIDMMQGSNRGTSELKVLTEETMERAGEMVHKCSRIQWYSIACK 99
   At_GI-15240018.pro        EADIQKAKQRS LATHEAEKLDLATHEAEQLDLAIQEF SRQEEEEERRRTRELENDALAN 99
   At_GI-334188680.pro        -----LYEDVILRQRSEADQIEWAIQDSFNPQE---TSRCRQREDDQIAR 75

Si_GI-514815267.pro      -----MGWLSKIFKGSVN-RVSRGHYNGNSHE----GYS 29
Bd_GI-357157184.pro      -----MGWLNKIFKGSVN-RVSRGNYDGNWHD----GNS 29
60 Br_DA1b.pro              -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 33
   Br_DA1a.pro              -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 33
   At_GI-15221983.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 32
65 Tc_GI-508722773.pro        -----MDWIKKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 25
   Gm_GI-356564241.pro        -----MGWLSRIFKGSDHKNLSEGHYYKEDA----GY 29
   Gm_GI-356552145.pro        -----MGWLSRIFKGSDHKNLSEGHYYKEDA----GY 29
   Vv_GI-302142429.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 28
   Vv_GI-359492104.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 28
70 Sl_GI-460385048.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 28
   Os_GI-218197709.pro        TELEQELVLYKQPHKSVPSNIAI WSTMGWLTKFFRGSTH-KISEGQYHSKPAEETIWNPG 364
   Os_GI-115466772.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 33
   Bd_GI-357160893.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 33
   Bd_GI-357164660.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 33
75 Sb_GI-242092232.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 33
   Zm_GI-212275448.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 33
   At_GI-240256211.pro        -----MGWLNKIFKGSNQ-RHPLGNEHYHHNGGYYENYP 33

```

	At_GI-145360806.pro	HISNPCIFGEVGSSSSTYRDKKWKLMKVVSKLFKSGSNGGSGAHTNHPPQFQEDENM	82
	At_GI-22326876.pro	GVEVITAATGDTSVSGIIRESETITIEEKEDTIDEEDTPLLRSRKPPEETNRSRSSLQ	1080
	At_GI-30698242.pro		
	At_GI-30698240.pro	ALYTREIKA--INQDFLKFCQIQLIQRNQLQYMRSMGMASVSTKADLLSDIGNEFSK	157
5	At_GI-15240018.pro	VLQHEERE-----RLINKKTALEDEEELLARTLEESLKENRRRKMFEQVKNKDEQ	150
	At_GI-334188680.pro	GLQYVEET-----ELDKSVVDEED-----QQ	96
	Si_GI-514815267.pro	TQHTKSY-----	36
10	Bd_GI-357157184.pro	SENIR-----	34
	Br_DAlb.pro	-HEHS-----EPSAETDA-----DHT	48
	Br_DAla.pro	-HDEPSADTDPDPDPDPDE-----THT	52
	At_GI-15221983.pro	TASHDDEPSAADTDADNDP-----HHT	55
	Tc_GI-508722773.pro	EDPHP-----QF	32
15	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
20	Os_GI-218197709.pro	SNSAVVTMVYPLESTFGQLDLLLLLATDLRQLVIDDVCCKLRQQAQPVHLHMYSQLQLLQ	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
25	Zm_GI-212275448.pro	SSSPVVT-----	40
	At_GI-240256211.pro	RYSAEGSDFDKKEIECAIALSLS-----EQEHVIPQDDKGGKIIIE	73
	At_GI-145360806.pro	VFPLPPS-----	89
	At_GI-22326876.pro	LSSTSSKVRSKGNVFWKWLGCFF-----LQPKNLRSRRTTALEEA	1122
	At_GI-30698242.pro		
30	At_GI-30698240.pro	LCLVAQPEVVTKFWLKRPLMELKMLFEDGV-----VTVVVSAPYALGKTTTLVTK	207
	At_GI-15240018.pro	LALIVQESLNMEEYPIR-LEEYK-----SISRRAPLDVDEQ-FAKA	189
	At_GI-334188680.pro	LSKIVEESLKE-----	107
	Si_GI-514815267.pro	-----GAHGNEDE-----DMDHAIALSLEEQDRKGAIDTEHHLDE-----ED	74
35	Bd_GI-357157184.pro	-----GAYDESDNE-----DIDRAIALSLAEEDPNKGAIIDPDYS-----	70
	Br_DAlb.pro	QEPSTSEETWNGKENE-----EVDRVIALSILEE-ENQRPETNTG-----	88
	Br_DAla.pro	QEPSTSEEDTS-GQENE-----DIDRAIALSLIENSQQQTNNTCAN-----	93
	At_GI-15221983.pro	QEPSTSEDNTSNDQENE-----DIDRAIALSLLEE--NQEQTSISG-----	94
40	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--EQKGGKVID-----	69
45	Sl_GI-460385048.pro	---STAEDSWSEIE-----EIDRAIAISLSEE--EQKGGKVID-----	66
	Os_GI-218197709.pro	TSHAHQHGDVPSEFDNE-----DIARAISSLLEEEQRKAKAIEKD-----	465
	Os_GI-115466772.pro	-----DVPSEFDNE-----DIARAISSLLEEEQRKAKAIEKD-----	73
	Bd_GI-357160893.pro	-----DVLSEFDNE-----DIDRAIALSLSEE--QRKSGTGKD-----	72
	Bd_GI-357164660.pro	-----YALSEFDNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKSGTGKD-----	73
50	Sb_GI-242092232.pro	-----DIFSEFNNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKAKTIDKD-----	73
	Zm_GI-212275448.pro	-----DILSEFNNE-----DIDRAIALSLSEEEQRKAKTIDKD-----	73
	At_GI-240256211.pro	YKSETEEDDDDEDEEYMQRAQLEAAE-----EERRVAQAQIEEBEKRRAEQALETEKLLAK	133
	At_GI-145360806.pro	---SLDDRSRGARDKE-----ELDRSISLSLADN-TKRPHGYGWS-----	125
	At_GI-22326876.pro	LEEALKEREKLEDTREL-----QIALIESKKIKKIQADERDQIKHADER-----	1167
55	At_GI-30698242.pro	---MVRKRQEEDEKI-----EIERVKEESLKLAKQAEKRRLEESKEQ-----	41
	At_GI-30698240.pro	LCHDADVKEKFKQIFFI-----SVSKFPNVRLIGHKLEHIGCKANAYEN-----	252
	At_GI-15240018.pro	VKESLKNKGKQGFED-----QVKKDEQLALIVQESLNMVESPRLLEN-----	234
	At_GI-334188680.pro	-----KGKSKQFED-----QVNDQEQALMVQESLYMVELSAQLEED-----	145
	Si_GI-514815267.pro	EQLARALQENTSPTLDEDEQLAR-----ALQESMNDHEP	108
60	Bd_GI-357157184.pro	-----LEEDEQLAR-----ALHESLNTGSP	90
	Br_DAlb.pro	-----AWKHAM-MDDDEQLAR-----AIQESMIARN-	113
	Br_DAla.pro	-----AGKYAM-VDEDEQLAR-----AIQESMVVGT	119
65	At_GI-15221983.pro	-----KYSMPVDEDEQLAR-----ALQESMVVGN	119
	Tc_GI-508722773.pro	-----DEYQLEDEDEQLAR-----ALQESLNFEP	94
	Gm_GI-356564241.pro	-----ILSLQTLLEDEDEQLAR-----AIEQSLNLESP	96
	Gm_GI-356552145.pro	-----DYRSQLEDEDEQLAR-----AIEQSLNLESP	98
	Vv_GI-302142429.pro	-----NEFQLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	92
70	Vv_GI-359492104.pro	-----L-DNEFQLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
	Sl_GI-460385048.pro	-----SESQLEDEDEQLAR-----ALQESLNIESP	90
	Os_GI-218197709.pro	-----MHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	487
	Os_GI-115466772.pro	-----MHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
	Bd_GI-357160893.pro	-----LHLDEDEDEQLAR-----AIHESLNIESP	94
75	Bd_GI-357164660.pro	-----QHLDEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
	Sb_GI-242092232.pro	-----MHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95
	Zm_GI-212275448.pro	-----MHLEDEDEQLAR-----AIQESLNIESP	95

	At_GI-240256211.pro	ARLEEEEMRRSKAQLEEDDELLAK-----ALQESMNVGSP	167
	At_GI-145360806.pro	-----MDNNRDFPR-----PFHGGLNPSSF	145
	At_GI-22326876.pro	-----EQRKHSKDHEEEIEESNEKEEERRHSKDYVIEELVLKGGKRRKQLDDDKADEKEQ	1221
	At_GI-30698242.pro	-----GKRIQVDDD-----QLAKTTSKDKGQ	62
5	At_GI-30698240.pro	-----DLDAMLYIQQLLKQLGRNGSILLVLDV-----WAEESLLQKFL	292
	At_GI-15240018.pro	-----NNISTRAPVDEDEQLAK-----AVEESLKGKGQ	262
	At_GI-334188680.pro	-----KNISTIPPLNEDAQLQK-----VIWESAKGKGQ	173
10	Si_GI-514815267.pro	PR-----QHIPIEDVHSESAPASSLPPYVFPNGSRVCA	142
	Bd_GI-357157184.pro	PH-----QNVPVVDVPSERVPTREPPPVLSSGFRAICA	124
	Br_DAlb.pro	----GTT-----YDFGNAY-----GNGHMHGGGNVYDNGDIYYPPIAFSMDFRICA	156
	Br_DAla.pro	PRQKHGSS-----YDIGNAYGAGDVYGNHMHGGGNVYANGDIYYPRTAFPMDFRICA	173
	At_GI-15221983.pro	PRHKSGST-----YDNGNAYGAGDLYGNHMYGGGNVYANGDIYYPPIFQMDFRICA	173
15	Tc_GI-508722773.pro	P-----QYENANMYQMPVHFPMGYRICA	118
	Gm_GI-356564241.pro	P-----RYGNENMYQPIQYFPLG--ICA	118
	Gm_GI-356552145.pro	P-----RYGNENMYQPIQYFPMGSRICA	122
	Vv_GI-302142429.pro	PQ-----HGNGN-----GNGNIYQPIFPFYSTGFRAICA	120
	Vv_GI-359492104.pro	PQ-----HGNGN-----GNGNIYQPIFPFYSTGFRAICA	123
20	Sl_GI-460385048.pro	PQ-----HVSRRNDHGGGNVYGNFNHYHVPFPYASFRVICA	126
	Os_GI-218197709.pro	-----PRARENGNANGGNMYQPLPFMFSSGFRAICA	517
	Os_GI-115466772.pro	-----PRARENGNANGGNMYQPLPFMFSSGFRAICA	125
	Bd_GI-357160893.pro	PCARDNGSPPH--ARDNSSPPHARENSSHPARENGLANGGNSIQHSPFMSSGFRAICA	151
	Bd_GI-357164660.pro	-----PRAREKSSHPARENGSANGGNSYQL--PLMFSSGFRAICA	133
25	Sb_GI-242092232.pro	P-----PSRENGSANGGNAYHPLPFMFSSGFRAICA	125
	Zm_GI-212275448.pro	PRRNGSAN-----GGTMYHPPRETGNAYQPPRENGSANGGNAYHPLPFMFSSGFRAICA	148
	At_GI-240256211.pro	P-----RYDPGNILQPYPFPLPSSHRIIV	191
	At_GI-145360806.pro	IP-----PYEPSYQYRRRQRIDG	163
	At_GI-22326876.pro	IKH-----SKDHVEE-----EVNPPLSKCK	1241
30	At_GI-30698242.pro	INH-----SKDVVEE-----DVPNPPS-I	80
	At_GI-30698240.pro	IQLPDYKILVTSRFEFSTFGPTFHLKPLIDDEVECRDEIEENEKLP---EVNPPLSMCG	348
	At_GI-15240018.pro	IKQ-----SKDEVEGDGMLL-----ELNPPPSLGG	287
	At_GI-334188680.pro	IEH-----FKDPVEEDGNLPRVDLNVNHPHSIID	202
35	Si_GI-514815267.pro	GCKTPIGQGRFLSCMDSVWHHPQCFRCYGCDDIPISEYEFVAVHE---DHAYHRSCYKERF-H	198
	Bd_GI-357157184.pro	GCNNPIGNRFLSCMDSVWHHPQCFRCFACNKPISEYEFAMHE---NQPYHKSCYKDFE-H	180
	Br_DAlb.pro	GCNMEIGHGRFLNCLNALWHPQCFRCYGCSDHPISSEYEFSTSG---NYPFHKACYKERY-H	212
	Br_DAla.pro	GCNMEIGHGRFLNCLNALWHPQCFRCYGCSDHPISSEYEFSTSG---NYPFHKACYKERY-H	229
40	At_GI-15221983.pro	GCNMEIGHGRFLNCLNALWHPQCFRCYGCSDHPISSEYEFSTSG---NYPFHKACYKERY-H	229
	Tc_GI-508722773.pro	GCNTEIGHGRFLNCLNALFWHPQCFRCHACNLPISDYEFMSG---NYRFHKSCYKERY-H	174
	Gm_GI-356564241.pro	GCYTEIGFGRFLNCLNALFWHPQCFRCHACNLPISDYEFSTSG---NYPYHKSCYKESY-H	174
	Gm_GI-356552145.pro	GCYTEIGYGRFLNCLNALFWHPQCFRCHACNLPISDYEFSTSG---NYPYHKSCYKESY-H	178
	Vv_GI-302142429.pro	GCNTEIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHGCGYPISDYEYSMNG---NYPYHKSCYKEHY-H	176
45	Vv_GI-359492104.pro	GCNTEIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHGCGYPISDYEYSMNG---NYPYHKSCYKEHY-H	179
	Sl_GI-460385048.pro	GCSTEIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHACNQPISDYEFMSG---NYPYHKTCYKEHY-H	182
	Os_GI-218197709.pro	GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHACNQPIYDYEFMSG---NHPYHKTCYKERF-H	573
	Os_GI-115466772.pro	GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHACNQPIYDYEFMSG---NHPYHKTCYKERF-H	181
	Bd_GI-357160893.pro	GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHACNQPIYDYEFMSG---NHPYHKTCYKERF-H	207
50	Bd_GI-357164660.pro	GCHSEIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHGCSQPIYDYEFMSG---NHPYHKTCYKERF-H	189
	Sb_GI-242092232.pro	GCHREIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHACNQPIYDYEFMSG---NHPYHKTCYKEQF-H	181
	Zm_GI-212275448.pro	GCHREIGHGRFLSCMGAVWHHPQCFRCHACNQPIYDYEFMSG---NHPYHKTCYKEQF-H	204
	At_GI-240256211.pro	GQAEIGHGRFLSCMGVWHHPQCFCCNACDKPIIDYEFMSG---NRPYHKLCYKEQH-H	247
	At_GI-145360806.pro	GCNSDIGSGNYLGCMTGFHHPQCFRCHSCGYALTEHEEFLSG---TKPYHKLCYKELT-H	219
55	At_GI-22326876.pro	DCKSAIEDGISINAYGSVWHHPQCFCCLRCPREPIAMNEISDLR---GMYHKPCYKELR-H	1296
	At_GI-30698242.pro	DGKSEIGDGTSVN-----PRCLCFHCHRPFVHMHELK-----GKFHIDCYKEYYRN	128
	At_GI-30698240.pro	GCNSAVKHEESVNILGVLWHPGCFCCRSCKPIAIHELENHVSNSRGKFKHKSCYER---404	
	At_GI-15240018.pro	GCNFAVEHGGSVNILGVLWHPGCFCCRACHKPIAIHDIENHVSNSRGKFKHKSCYER---343	
	At_GI-334188680.pro	GCKSAIEYGRSVHALGVNWHHPQCFCCRYCDKPIAMHEFS---NTKGRCHITCYERSH--256	
60		* * * * *	
	Si_GI-514815267.pro	PKCDVCNSFIPTNKNGLIEYRAHPFWMQKYCPSHENDGTPRCCSCERMEPKHSQYITLDD	258
	Bd_GI-357157184.pro	PKCDVCKDFIPTNKDGLIEYRAHPFWMQKYCPSHEDDGTTPRCCSCERMEPTDIKYIRLDD	240
	Br_DAlb.pro	PKCDVCSLFIPTNHAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDATPRCCSCERMEPRNTGYFELND	272
65	Br_DAla.pro	PKCDVCSLFIPTNHAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDATPRCCSCERMEPRNTGYFELND	289
	At_GI-15221983.pro	PKCDVCSHFIPTNHAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDATPRCCSCERMEPRNTRYVELND	289
	Tc_GI-508722773.pro	PKCDVCNDFIPTNPAGLIEYRAHPFWIQKYCPSHEHDTTPRCCSCERMEPQDTGYVALND	234
	Gm_GI-356564241.pro	PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWIQKYCPTHEHDGTTPRCCSCERMESQEAGYIALKD	234
	Gm_GI-356552145.pro	PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWIQKYCPTHEHDGTTPRCCSCERMESQEAGYIALKD	238
70	Vv_GI-302142429.pro	PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDTTPRCCSCERMEPRDTRYVALND	236
	Vv_GI-359492104.pro	PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDTTPRCCSCERMEPRDTRYVALND	239
	Sl_GI-460385048.pro	PKCDVCKHFIPTNPAGLIEYRAHPFWVQKYCPTHEHDGTTPRCCSCERMESQEAGYIALDD	242
	Os_GI-218197709.pro	PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLLDD	633
	Os_GI-115466772.pro	PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLLDD	241
75	Bd_GI-357160893.pro	PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLLDD	267
	Bd_GI-357164660.pro	PKCDVCKQFIPTNAGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLLDD	249
	Sb_GI-242092232.pro	PKCDVCKQFIPTNMNGLIEYRAHPFWLQKYCPSHEVDGTTPRCCSCERMEPRESRYVLLDD	241



	Bd_GI-357164660.pro	YGLPRLLTGSILAHEMMHAWLRLK-----GYRTLSPDI	397
	Sb_GI-242092232.pro	YGLPRLLTGSILAHEMMHAWLRLK-----GYRTLSPDV	389
	Zm_GI-212275448.pro	YGLPRLLTGSILAHEMMHAWLRLK-----GYRTLSPDV	411
5	At_GI-240256211.pro	YGLPRLLTGSILAHEMMHAWLRLN-----GYPNLRPEV	456
	At_GI-145360806.pro	YGLPRLLTGAILAHHELMHGWLRLN-----GFRNLNPEV	427
	At_GI-22326876.pro	YGLPRLLTGYILAHEMMHAYLRLN-----GYRNLNMVL	1507
	At_GI-30698242.pro	YGLPRLLTGYILAHEMMHAWLRLN-----GYKNLKLEL	337
	At_GI-30698240.pro	YGLPRLLTGYILAHEMMHAWLRLN-----GHMNLNLI	603
10	At_GI-15240018.pro	YGLPRLLTGYILAHEMMHAYLRLN-----GHRNLNLI	545
	At_GI-334188680.pro	YGLPRLLTGYILAHEMMHAWLRLNGTTSTQFVFANQYGESSQLKVLFLGITGYRNLKLEL	487
		:***** ** *****:*.:.**.	*. *
	Si_GI-514815267.pro	EEGICQVLAHLWLESEITSGSGSMATTSAASSS-----SSTS--SSSKKGA-KTEFEKRL	458
15	Bd_GI-357157184.pro	EEGICQVLSHMWLESEI IAGASGNTASTVSPSS-----SSAP--TSSKKGA-KTEFEKRL	440
	Br_DAlb.pro	EEGICQVMAHKWLEAEALAGSRNSNAASSSSSS-----Y----GGVKKGP-RSQYERKL	467
	Br_DAla.pro	EEGICQVMAHKWLEAEALAGSRNSNVASSSSSS-----RGVKKGP-RSQYERKL	485
	At_GI-15221983.pro	EEGICQVMAHKWLEAEALAGSTNSNAASSSSSS-----QGLKKGP-RSQYERKL	485
	Tc_GI-508722773.pro	EEGICQVLAHMWLLTQLEYAS--SSNVASASSSA-----S-----SRLQKKG-RPQFEGKL	431
20	Gm_GI-356564241.pro	EEGICQVLAHMWLESELSASGSNFVSASSSSA-----S-----HTSRKKG-RPQFEGKL	427
	Gm_GI-356552145.pro	EEGICQVLSHMWLESELSASGSNFVSASSSSA-----S-----HTSRKKG-RPQFEGKL	431
	Vv_GI-302142429.pro	EEGICQVLAYMWLDAELTSGSGR-----SQCKERL	415
	Vv_GI-359492104.pro	EEGICQVLAYMWLDAELTSGSGSNV--PSTSSAS-----TSSKGA-GSQCKERL	435
	Sl_GI-460385048.pro	EEGICQVLAHMWLETQIASISSNGGASTSSGM-----SSSKQGI-RSPFERKL	439
	Os_GI-218197709.pro	EEGICQVLAHMWIESEI IAGSGSNGASTSSSS-----AS----TSSKKG-RSQFERKL	831
25	Os_GI-115466772.pro	EEGICQVLAHMWIESEI IAGSGSNGASTSSSS-----AS----TSSKKG-RSQFERKL	439
	Bd_GI-357160893.pro	EEGICQVLAHMWIESEI IAGSSSNAASTSSSS-----SS----ISSKKG-RSQFERKL	465
	Bd_GI-357164660.pro	EEGICQVLAHMWIESEI TAGSGSNAASTSSSST-----S-----SKKGG-RSQFERKL	444
	Sb_GI-242092232.pro	EEGICQVLAHLWIESEI IAGSGSGAASSSSSGSS-----SS----MSSKAG-RSQFEHKL	439
30	Zm_GI-212275448.pro	EEGICQVLAHMWIESEI IAGSGSSAASSSSSGSS-----SS----TSSKKG-RSQFEHKL	461
	At_GI-240256211.pro	EEGICQVLAHMWLESETYAGSTLVDIASSSSSA-----VVS---ASSKKE-RSDFEKKL	507
	At_GI-145360806.pro	EEGICQVLSYMWLESEVLSDPSTRNLPSTSSVA-----TSSSSSFSNKKGG-KSNVEKKL	481
	At_GI-22326876.pro	EEGLCQVLGYMWLECCQTYVFD-----TATIASSS--SSRTPPLSTTTSSKKVD-PDFEKKL	1560
	At_GI-30698242.pro	EEGLCQALGLRWLESQTFASDAAAAAVASSSFSSTAPPAAITSKKSDDSWIFEKKL	397
	At_GI-30698240.pro	EEGICQVLGHLWLESQTYATADTTADAAASASSS---SSRTPPAASAKKGE-WSDFDKKL	659
35	At_GI-15240018.pro	EEGICQVLGHLWLDSTYATADATADASSASS---SSRTPPAASAKKGE-WSDFDKKL	601
	At_GI-334188680.pro	EEGICQVLGHMWLESQTYYS---SSAAASSASS---SSRTP--AANASKGA-QSDYEKKL	538
		***:*.:. *:	. : *
40	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--LPKTLEHIQMTGRFPV-----	532 SEQ 7
	At_GI-15221983.pro	GEFFKHQIESDASPVYGDGFRAGRLAVHKYG--LRKTLEHIQMTGRFPV-----	532 SEQ 8
45	Tc_GI-508722773.pro	GEFFKHQIESDTPVYGDGFRAGHQAVYKYG--LRRTLEHIRMTGRFPY-----	478 SEQ 9
	Gm_GI-356564241.pro	GEFFKHQIESDIPVYGDGFRAGQKAVRKYG--LQRTLHHIRMTGTFFPY-----	474 SEQ 10
	Gm_GI-356552145.pro	GEFFKHQIESDIPVYGGGFRAGQKAVSKYG--LQRTLHHIRMTGTFFPY-----	478 SEQ 11
	Vv_GI-302142429.pro	GQFFKHQIESDTSLVYAGFRAGHQAVLKYG--LPATLKHIHLTGNFPY-----	462 SEQ 12
	Vv_GI-359492104.pro	GQFFKHQIESDTSLVYAGFRAGHQAVLKYG--LPATLKHIHLTGNFPY-----	482 SEQ 13
50	Sl_GI-460385048.pro	GDFFKHQIESDTSPIYNGFRAGNQAVALKYG--LERTLDHIRMTGTFFPY-----	486 SEQ 14
	Os_GI-218197709.pro	GDFFKHQIESDTSMAVYGDGFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRLGTFFPF-----	878 SEQ 15
	Os_GI-115466772.pro	GDFFKHQIESDTSMAVYGDGFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRLGTFFPF-----	486 SEQ 16
	Bd_GI-357160893.pro	GDFFKHQIESDTSVAYNGFRSNGQAVLQYG--LKRTLEHIWLTGTWPF-----	512 SEQ 17
	Bd_GI-357164660.pro	GDFFKHQIESDTSVAYGDGFRAGNQAVALQYG--LKRTLEHIRLGTLPF-----	491 SEQ 18
55	Sb_GI-242092232.pro	GDFFKHQIETDTSMAVYGGFRAGNRAVLQYG--LKRTLEHIRLGTFFPF-----	486 SEQ 19
	Zm_GI-212275448.pro	GDFFKHQIETDTSMAVYGDGFRITGNRAVLHYG--LKRTLEHIRLGTFFPF-----	508 SEQ 20
	At_GI-240256211.pro	GEFFKHQIESDSSAYGDGFRQGNQAVLKHG--LRRTLDHIRLGTFFP-----	553 SEQ 21
	At_GI-145360806.pro	GEFFKHQIAHDASPAYGGGFRAANAACKYG--LRRTLDHIRLGTFFPL-----	528 SEQ 22
	At_GI-22326876.pro	VNFCKHQIETDESPFFGDGFRKVNKMMASNNHSLKDTLKEIISISKTPQYSKL	1613 SEQ 23
	At_GI-30698242.pro	VEFCMNQIKEDDPSVYGLGFKQVYEMMVSNYNIKDTLKDIVSASNATPPDSTV	450 SEQ 24
60	At_GI-30698240.pro	VEFCNKQIETDESPVYGLGFRVNMVNTNS--SLQETLKEILRR-----	702 SEQ 25
	At_GI-15240018.pro	VEFCNKQIETDSDSPVYGLGFRVNMVNTNS--SLQETLKEILRQR-----	644 SEQ 26
	At_GI-334188680.pro	VEFCNKQIETDSDSPVYGVGRKVNQMVSDS--SLHKILKSIQHWTKPDSNL-587	SEQ 27

Таблица 1. Выравнивание белков DA1 (SEQ ID NO: 4 - 27)



```

Pt_GI-224059640.pro -----MEVHYMNTDFPYTTTESFMDFFEGGLTHAPV 30
Rc_GI-255582236.pro -----MEVHYINTGFPYTVTESFLDFEGLSHVPV 30
5 Pp_GI-462414664.pro -----MNGN--QQMDVHYIDTDFPYTPTESFMDFFGGVTHVPM 36
Tc_GI-508704801.pro -----MNGN--RQMEVHYIDTDFPYTATESFMDFFEGGLTHVPV 36
Vv_GI-359487286.pro -----MNGN--RQMEVHYINTGFPYITITESFMDFFEGGLGHVPV 36
Gm_GI-356548935.pro -----MNDG--RQMGVHYVDAGFPYAVNDNFVDFQGFTHVPV 36
10 Gm_GI-356544176.pro -----MNDG--RQMGVNYVDAGFPYAVNENFVDFQGFTHVPV 36
At_EOD1.pro -----MNGDNRPVEDAHYTETGFPYAATGSYMDFFGGAAQGPL 38
Cr_GI-482561003.pro -----MNGD-RPVEDAHYTEAEFPYAASGSYIDFYGGAPQGPL 37
Sb_GI-242042045.pro -----MNSC--RQMEVHYINTGFPYITITESFMDFFEGGLTYAHA 36
Zm_GI-223973923.pro -----MNSS--RQMEVHYINTGFPYITITESFMDFFEGGLTYAHA 36
15 Zm_GI-226496789.pro -----MTSS--RQMEVHYINTGFPYITITESFMDFFEGGLTYAHA 36
Os_GI-222624282.pro MTESHERDTEVTRWQVHDPSEGMNGS--RQMEVHYINTGFPYITITESFMDFFEGGLTYAHA 58
Os_GI-115451045.pro -----MNGS--RQMEVHYINTGFPYITITESFMDFFEGGLTYAHA 36
Bd_GI-357113826.pro -----MNGS--RQMEVHYINTGFPYITITESFMDFFEGGLTYAHA 36
Sl_GI-460410949.pro -----MNWN--QQTEIYYTNGAMPYNSIGSFMDFFGGVTYDHV 36
* : : ** . : * : *

Pt_GI-224059640.pro NYAHNGPMHD---QDNAYWSMN-MNAYKFGFSGLGSTSYSP---YEVNDNLPMDVSRM 83
Rc_GI-255582236.pro HYAHTGQVLDQ-VQENAYWSMN-MNAYKYGFSGPGST-YYDP---YEVNDNLPMDVSRM 84
25 Pp_GI-462414664.pro NYGHAMPMD---QETAYWSMN-MHSYKFGSPGSGNSYYGNY---YEVNDHLPMDVSRM 90
Tc_GI-508704801.pro NYTHTVPMQD---QENIYWWSM-MNAYKFGFSGPEST-FYSP---YEVSDHLPMDVSRM 91
Vv_GI-359487286.pro NYAQAEAMHNQSIQENFYWTMN-MNSYKFGFSGPGST-YYGP---YDVNEHVPGEVSRM 88
Gm_GI-356548935.pro NYAFAGSIPD---QESVYWSMN-MNPKFGLSGPGSTSYSS---YEVNGHLPMEIDRA 89
Gm_GI-356544176.pro NYAFAGSIPD---QESVYWSMN-MNPKFGLSGPGSTSYSS---YEVNGHLPMEIDRA 89
At_EOD1.pro NYDHAATMHP---QDNLYWTMN-TNAYKFGFSGSDNASFYGS---YDMNDHLSRMSIGRT 87
30 Cr_GI-482561003.pro NYAHAGTM-----DNLYWTMN-TNAYKFGFSGSDNPSFYNS---YDMTDHLSRMSIGRT 91
Sb_GI-242042045.pro DFALMDGFQD---QGNPYWAMMHTNSYKYGYSGPG--NYYPYAHVYDIDDYMRADGGRR 91
Zm_GI-223973923.pro DFALMDGFQD---QGNPYWAMMHTNSYKYGYSGPG--NYYSYAHVYDIDDYMRADGGRR 91
Zm_GI-226496789.pro DFALMDGFQD---QGNPYWMMHTNSYKYGYSGSG--NYYSYAHAYDIDDYMRADGGRR 91
Os_GI-222624282.pro DFAIADAFHD---QANPYWAMMHTNSYKYGYSGAG--NYYSYGHVYDMDYMRADGGRR 113
35 Os_GI-115451045.pro DFAIADAFHD---QANPYWAMMHTNSYKYGYSGAG--NYYSYGHVYDMDYMRADGGRR 91
Bd_GI-357113826.pro DFAIADAFQD---QANPYWMMQTNNSYKYGYSGAS--NYYSYGHVYDMDYMRADGGRR 91
Sl_GI-460410949.pro NYIFADPPYA---QES-LYPSISTNPKYKFGYSEAGSFYDYDREYVNDHVSIGIEEHDR 92
. : . : . : * : * : * :

Pt_GI-224059640.pro AWEYPSVV-----IKALWQDDVDPDT 104
Rc_GI-255582236.pro TWEYPSVVN-MEEATPTDQSEGDVAVGVHASPEECIPN-HT-SGDS PQGVWQDDVDPDN 141
40 Pp_GI-462414664.pro TWEHPSVMN-SEEPANIDSHPEEED-AVAEAAPEECIQN-QQ-NTNTSQVWQEDIDDPDN 146
Tc_GI-508704801.pro TWDY PSTLN-SEEPATIDMQPGGEAVVGIHAIPEECITN-HQ-SNSNSQVWQDNIDDPDN 145
Vv_GI-359487286.pro PWEYPSMI-VEEPTTITETQPTGNEVMNVHAIPEECSPN-HY-SATSSQAIWQDNVDPDN 148
Gm_GI-356548935.pro EWEYPTITITVEEPATDTPRRDGTSMQTIPEECSPN-HHESNSSQVIWQDNIDDPDN 148
45 Gm_GI-356544176.pro EWEYPTITITVEEPATDTPRRDGTSMQTIPEECSPN-HHESNSSQVIWQDNIDDPDN 148
At_EOD1.pro NWDYHPMVNVADDPENTVRSVQIGDTEHSEAECEIAN-EH-PPDSPQVSWQDDIDPDT 149
Cr_GI-482561003.pro NWEYHPMVNVDD-PDITLARSVQIGDSDHSEAECEIAN-EH-DPDSPQVSWQDDIDPDT 144
Sb_GI-242042045.pro VWDNTPANNVDSANVVLQGS-EAPRTANTTTEECIQQ-VHQS PGSPHVWQDNIDDPDN 149
Zm_GI-223973923.pro IWDNTPPVNVDSANVVLQGG-EAPHTTNTINKECIQQ-VHQS PGSPQVWQDNIEPDN 149
50 Zm_GI-226496789.pro TWDNTPPVNVDSANVVLQGG-EAPRTANTTSEDCIQQ-VHQS PGSPQVWQDNIDDPDN 149
Os_GI-222624282.pro IWDNATPVNNTESPNVVLQGG-ETPHANTSSSTEECIQQVHQNSSSPQVIWQDNIDDPDN 172
Os_GI-115451045.pro IWDNATPVNNTESPNVVLQGG-ETPHANTSSSTEECIQQVHQNSSSPQVIWQDNIDDPDN 150
Bd_GI-357113826.pro IWDNPTPASNTDTPNVVLQGAAPRASSTTEECIQQPVHQNSSSPQVWQDNVDPDN 151
Sl_GI-460410949.pro HLENPTTTVNVAANVHRE---EISGNSLNTNSVECPRG--QINTRDSEVWQDNIDDPDN 147
: . : . : * : * : * :

Pt_GI-224059640.pro MTYEELVDLGETVGTQSKGLSPELISLLPTSKCKFGSFFSRKRS-ERCVIQCMKYKRGD 163
Rc_GI-255582236.pro MTYEELLDLGETVGTQSRGLSQELISLLPTSKCKFRSFFLRKKAG-ERCVIQCMRYKRGD 200
60 Pp_GI-462414664.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSDELIISLLPTSKYKCGSFFSRKKS-ERCVIQCMRYKRGD 205
Tc_GI-508704801.pro MTYEELLDLGETIGSQSRGLSQELISLLPTSKCKFGSFFSTKR---ERCVIQCMRYKRG 202
Vv_GI-359487286.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSQEHLISLLPTCRYKSGRLFSRKRSA-ERCVIQCMGYKRGD 207
Gm_GI-356548935.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSQELISLLPTSKYKFGSLFKRKNSSG-KRCVICQMTYRRGD 207
Gm_GI-356544176.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSQELISLLPTSKYKFGNLFKRKNSSG-KRCVICQMTYRRGD 207
At_EOD1.pro MTYEELVELGEAVGTESRGLSQELISLLPTKYYKFGSIFSRKRAG-ERCVIQCLKYKIGE 208
65 Cr_GI-482561003.pro MTYEELVELGEAVGTESRGLSQELISLLPTKYYKFGSIFSRKRAG-ERCVIQCLKYKIGE 203
Sb_GI-242042045.pro MTYEELLDLGEVVGTSRGLSQERISLLPVTKYKCG-FFSRKKTREERCVIQCMYRRGN 208
Zm_GI-223973923.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSQERISLLPVTKYKCG-FFSRKKTREERCVIQCMYRRGN 208
Zm_GI-226496789.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSQECISLLPVTKYKCG-FFSRKKTREERCVIQCMYRRGN 208
Os_GI-222624282.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSQERISLLPVTKYKCG-FFSRKKTREERCVIQCMYRRGN 231
70 Os_GI-115451045.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSQERISLLPVTKYKCG-FFSRKKTREERCVIQCMYRRGN 209
Bd_GI-357113826.pro MTYEELLDLGEAVGTQSRGLSQERISLLPVTKYKCG-FFSRKKTREERCVIQCMYRRGD 210
Sl_GI-460410949.pro MTYEELLELGEAVGTQSRGLSQNQLISLLPVTKYKCG-FFSRKKTREERCVIQCMYKRRKD 206
*****:***:***:***:***: * . ** : * : * . :*****: * : :

```

	Pt_GI-224059640.pro	KQIKLLCKHAYHSECITKWLGINVKCPVONDEVFGEEESRN-----	203
	Rc_GI-255582236.pro	KQMKLPCKHVYHSECISKWLGINKVCPVONNEVFGEDSRH-----	240
	Pp_GI-462414664.pro	RQINLPCKHVYHSECISKWLGINKVCPVONLEVSGEESRH-----	245
5	Tc_GI-508704801.pro	QQMKLPCKHVYHSQCITKWLKINKICPVONNEVFGEEESRH-----	242
	Vv_GI-359487286.pro	RQIKLPCKHVYHTDCGTKWLTINKVCPVONIEVFGEEESRH-----	247
	Gm_GI-356548935.pro	QQMKLPCSHVYHGECITKWLKINKKCPVONTEVFGEEESTH-----	247
	Gm_GI-356544176.pro	QQMKLPCSHVYHGECITKWLKINKKCPVONTEVFGEEESTH-----	247
	At_EOD1.pro	RQMNLPCKHVYHSECISKWLSINKVCPVONSEVFGEPSIH-----	248
10	Cr_GI-482561003.pro	RQMNLPCKHVYHSECISKWLSINKVCPVONTEVFGDPSIH-----	243
	Sb_GI-242042045.pro	LQMTLPCKHVYHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPGDEPKRQ----	249
	Zm_GI-223973923.pro	LQMTLPCKHVYHASCVTRWLGINKVCPVCFAEVPGEDPEAMSQQL	253
	Zm_GI-226496789.pro	LQITLPCKHVYHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPGEDSLRQ----	249
	Os_GI-222624282.pro	LQMTLPCKHVYHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPGDEPKRQ----	272
	Os_GI-115451045.pro	LQMTLPCKHVYHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPGDEPKRQ----	250
15	Bd_GI-357113826.pro	LQMALPCKHVYHASCVTRWLSINKVCPVCFAEVPSSEEPSRQ----	251
	Sl_GI-460410949.pro	QOVTLPCKHVYHAGCGSRWLSINKACPICTEYVINTSKR-----	246
		*: * *.*.** * ::** *** **:* ** : .	

Таблица 2 (SEQ ID NO 38 - 53)

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

к ответу на уведомление Экспертизы от 08 июля 2020 г.

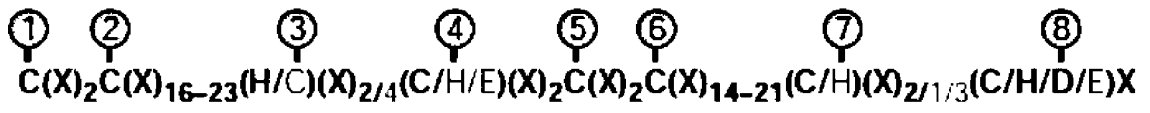
1. Способ увеличения урожайности растения или усиления связанного с урожайностью признака у растения, включающий:
  - экспрессию белка DA1 в клетках указанного растения,
  - причем аминокислотная последовательность указанного белка DA1 содержит мутацию, которая нарушает или инактивирует LIM-домен или LIM-подобный домен белка DA1.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный белок DA1 экспрессируют из гетерологичной кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты в одной или нескольких клетках растения.
3. 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, которая кодирует белок DA1,
  - причем аминокислотная последовательность указанного белка DA1 содержит мутацию, которая нарушает или инактивирует LIM-домен или LIM-подобный домен белка DA1, или
  - введение в нуклеотидную последовательность клетки растения, кодирующую белок DA1, мутации, вследствие которой LIM-домен или LIM-подобный домен белка DA1 становится нарушенным или инактивированным, и
  - регенерацию растения из клетки растения.
4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное растение, экспрессирующее белок DA1, характеризуется увеличенной продолжительностью жизни, размером органов и/или размером семян по сравнению с контролями.
5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный белок DA1 с инактивированным LIM- и/или LIM-подобным доменом характеризуется нарушенной активностью пептидазы по сравнению с белком DA1 дикого типа.
6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанный LIM-домен белка DA1 является инактивированным.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанный инактивированный LIM-домен белка DA1 содержит одно или несколько изменений последовательности по сравнению с LIM-доменом дикого типа, которые инактивируют активность или функцию LIM-домена.
8. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что указанный LIM-домен дикого типа содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.
9. Способ по любому из пп. 6-8, отличающийся тем, что указанный LIM-домен дикого типа содержит два мотива «цинкового пальца», и изменения последовательности устраняют один или оба мотива «цинкового пальца».
10. Способ по любому из пп. 7-9, отличающийся тем, что указанные изменения последовательности включают мутацию одного или нескольких остатков, координирующих Zn, в LIM-домене.
11. Способ по любому из пп.7-10, отличающийся тем, что указанные изменения последовательности включают мутацию одного или нескольких остатков, не координирующих Zn, в LIM-домене.
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанные остатки в LIM-домене, не координирующие Zn, расположены в пределах 4 остатков от остатка в LIM-домене, координирующего Zn.
13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанные остатки в LIM-домене, не координирующие Zn, расположены на 4 или более остатков дальше от остатка в LIM-домене, координирующего Zn.
14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что указанный LIM-подобный домен белка DA1 является инактивированным.
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанный инактивированный LIM-подобный домен белка DA1 содержит одно или несколько изменений последовательности по сравнению с LIM-подобным доменом дикого типа, которые инактивируют активность или функцию LIM-подобного домена.

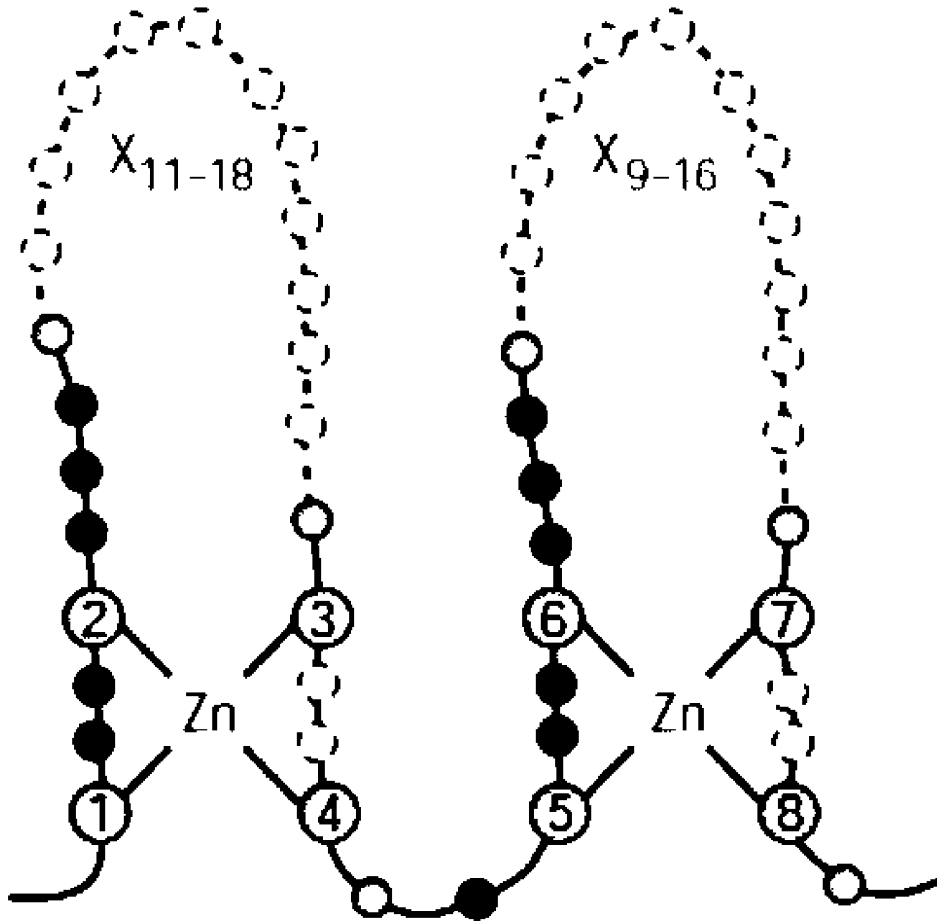
16. Способ по п. 14 или п. 15, отличающийся тем, что указанный LIM-подобный домен дикого типа содержит последовательность SEQ ID NO: 28, 29, 30 или 31.
17. Способ по любому из пп. 14-16, отличающийся тем, что указанный LIM-подобный домен дикого типа содержит два мотива «цинкового пальца», и изменения последовательности устраняют один или оба мотива «цинкового пальца».
18. Способ по любому из пп. 14-17, отличающийся тем, что указанные изменения последовательности включают мутацию одного или нескольких остатков, координирующих Zn, в LIM-подобном домене.
19. Способ по любому из пп. 14-16, отличающийся тем, что указанные изменения последовательности включают мутацию одного или нескольких остатков, не координирующих Zn, в LIM-подобном домене.
20. Способ п. 19, отличающийся тем, что указанные остатки, не координирующие Zn, в LIM-подобном домене расположены в пределах 4 остатков от остатка, координирующего Zn, в LIM-домене.
21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанные другие остатки в LIM-подобном домене расположены на 4 или более остатков дальше от консервативного остатка цистеина в LIM-подобном домене.
22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что указанный белок DA1 содержит С-концевую область, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 20% остаткам с 229 по 532 SEQ ID NO: 8.
23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанная С-концевая область содержит мотив металлопептидазы HEMMH (SEQ ID NO: 32).
24. Способ по п. 22 или п. 23, отличающийся тем, что указанная С-концевая область содержит аминокислотную последовательность EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEEQ (SEQ ID NO: 33) или EK(X)<sub>8</sub>R(X)<sub>4</sub>SEQ (SEQ ID NO: 34).

25. Способ по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что указанный белок DA1 содержит домен UIM1 согласно SEQ ID NO: 35 и домен UIM2 согласно SEQ ID NO: 36.
26. Способ по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что указанный белок DA1 содержит одно или нескольких изменений последовательности по сравнению с последовательностью DA1 дикого типа, которые нарушают или инактивируют активность или функцию LIM-домена.
27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанная последовательность DA1 дикого типа содержит аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 4 – 27 или представляет собой вариант указанной последовательности.
28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанная последовательность DA1 дикого типа содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере 50% любой из SEQ ID NO: 4 – 27.
29. Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая указанный белок DA1, функционально связана с гетерологичным промотором.
30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что указанный промотор представляет собой тканеспецифичный промотор или индуцибельный промотор.
31. Способ по любому из пп. 29-30, отличающийся тем, что указанная нуклеиновая кислота, кодирующая белок DA, содержится в одном или нескольких векторах.
32. Способ по любому из пп.1-31, отличающийся тем, что указанное растение или клетка растения дефицитны по экспрессии или активности EOD1.
33. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок DA1, имеющий нарушенный или инактивированный домен LIM или домен, подобный LIM.
34. Нуклеиновая кислота по п. 33, функционально связанная с гетерологичной регуляторной последовательностью.
35. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.33 или п.34.

36. Клетка растения, содержащая гетерологичную нуклеиновую кислоту по п.33 или 34 или вектор по п.35.
37. Растение, содержащее клетку растения по п.36.
38. Растение по п.37, которое получено способом по любому из пп. 1-32.
39. Пропагул, необязательно семя, трансгенного растения по п. 37.
40. Применение вектора по п. 35 в способе увеличения урожайности растения.

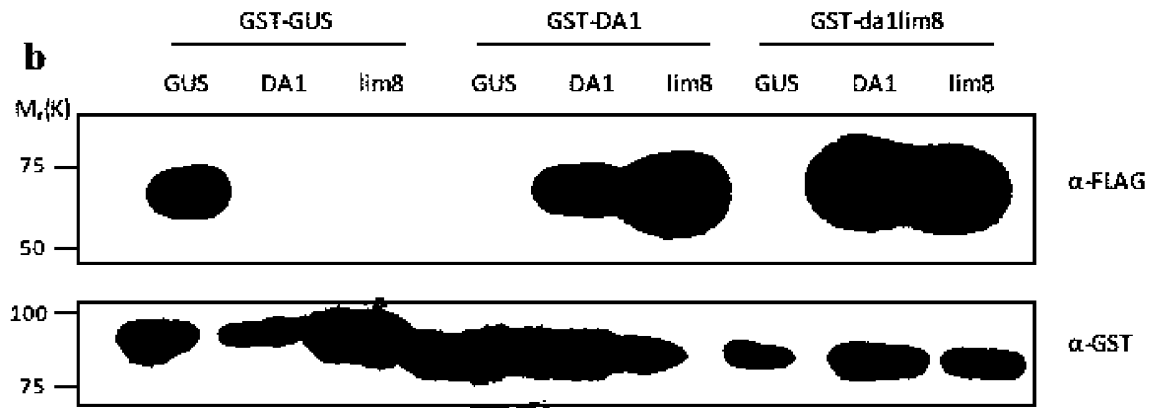


Фигура 1

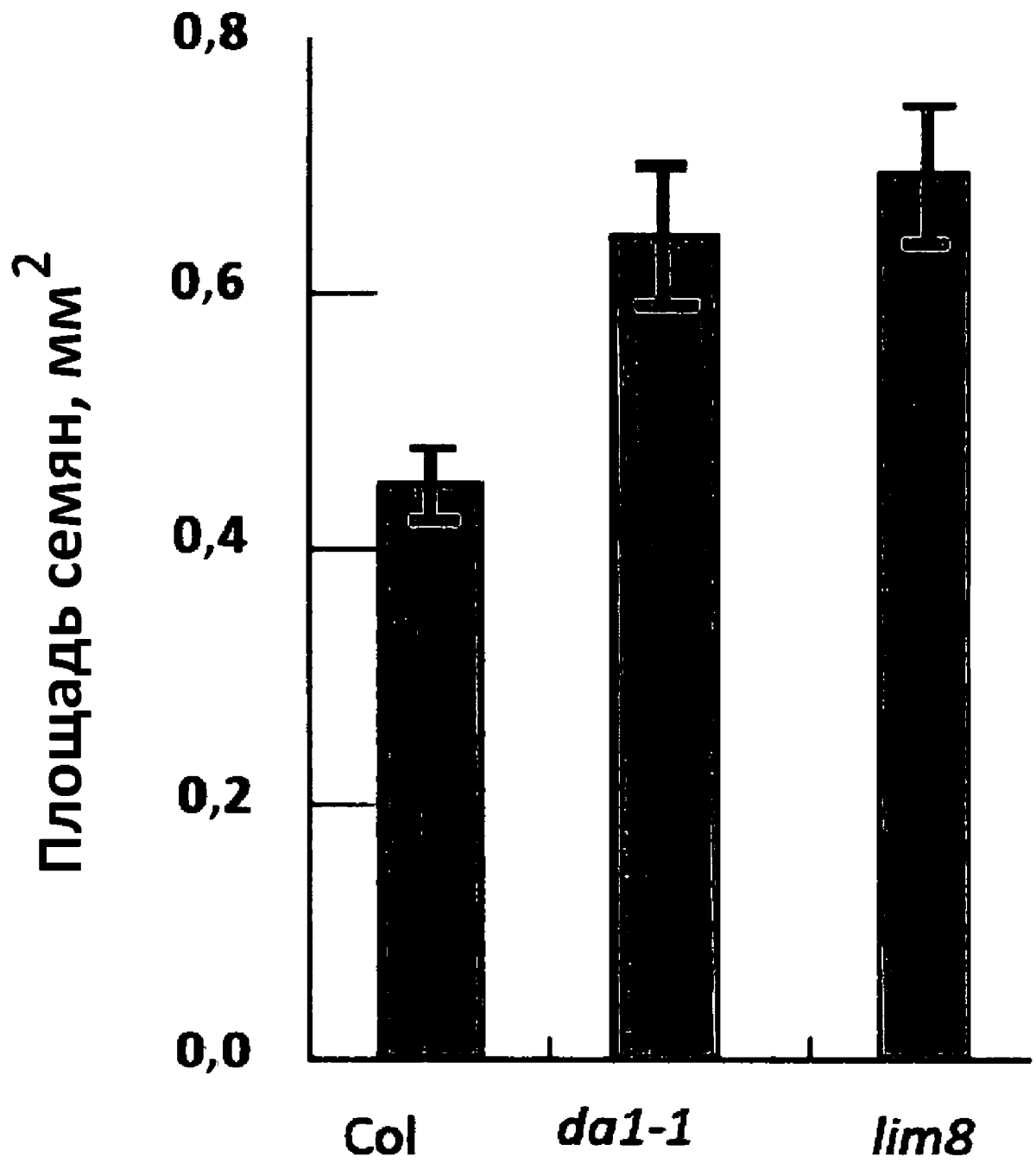


Фигура 2





Фигура 3



Фигура 4