

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091928** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.10.28**

(51) Int. Cl. *A01H 5/10* (2018.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)  
*A01H 6/46* (2018.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.02.13**

---

(54) **СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

---

(31) PCT/CN2018/076831;  
PCT/CN2018/087850

(32) 2018.02.14; 2018.05.22

(33) CN

(86) PCT/GV2019/050376

(87) WO 2019/158911 2019.08.22

(71) Заявитель:

**ИНСТИТУТ ОФ ДЖИНЕТИКС  
ЭНД ДИВЕЛОПМЕНТАЛ  
БАЙОЛОДЖИ ЧАЙНИЗ АКАДЕМИ  
ОФ САЙЕНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:

**Фу Сяндун, Ли Шань, У Кунь, Тянь  
Юнхан, Лю Цянь (CN)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к способам повышения поглощения азота, ассимиляции азота, эффективности использования азота, а также урожая в растении без влияния на высоту растения, причем способ включает повышение экспрессии или уровней регулирующего рост фактора (GRF). Также описаны генетически измененные растения, характеризующиеся описанным выше фенотипом, а также способы получения таких растений.

---

**A1**

**202091928**

**202091928**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 563799EA/23

### СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

#### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способам повышения поглощения азота, ассимиляции азота, эффективности использования азота, а также урожая растения, без влияния на высоту растения, причем способ включает повышение экспрессии или уровней регулирующего рост фактора (GRF). Также описаны генетически измененные растения, характеризующиеся описанным выше фенотипом, а также способы получения таких растений.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОМУ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Сельскохозяйственная "зеленая революция" 1960-х увеличила урожай злаковых, обеспечила пищей растущую мировую популяцию и была запущена быстрым перениманием полумарликовых сортов зеленой революции (GRV)<sup>1-3</sup>. Большинство современных элитных сортов пшеницы и риса сохранили гены полумарликовости, характерные для GRV<sup>4-6</sup>. Однако использование (N) азота из почвы полумарликовыми GRV является неэффективным<sup>7</sup>, и высокий урожай значительно зависит от поступления удобрений с N, которое является не только значительным расходом на производство, но также неприемлемо повреждает окружающую среду. Таким образом, разработка новых сортов, которые являются высокоурожайными при снижении внесения удобрения с N, таким образом, является стратегической постоянной сельскохозяйственной целью, имеющей неотложное мировое значение<sup>1,8</sup>.

Таким образом, существует необходимость в повышении поглощения азота, а также урожая, в коммерчески важных зерновых культурах, таких как рис и пшеница, но более важно, в полумарликовых сортах зеленой революции без утраты пользы полумарликовости с точки зрения урожайности. Настоящее изобретение направлено на эту потребность.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для достижения повышения эффективности использования питательных веществ в GRV необходимо понять регуляторную взаимосвязь между ростом и метаболизмом. На сегодняшний день молекулярные механизмы, лежащие в основе этой взаимосвязи, остаются по большей части неизвестными. В рамках настоящего изобретения авторы изобретения демонстрируют, что регулирующий рост фактор 4 риса (OsGRF4) взаимодействует непосредственно с ингибитором роста DELLA и что это взаимодействие обеспечивает гомеостатическую совместную регуляцию равновесия углерода (C)-азота (N). В то время как OsGRF4 стимулирует и интегрирует фиксацию C, ассимиляцию N и пролиферацию клеток, DELLA ингибирует их. Накопление DELLA в GRV смещает равновесие в сторону полумарликовости со сниженной ассимиляцией N. Напротив, авторы изобретения продемонстрировали, что увеличенное содержание OsGRF4 в GRV изменяет

равновесие OsGRF4-DELLA в пользу увеличенной ассимиляции С (углерод) и N (азот) без утраты усиливающей урожай карликовости. Таким образом, модулирование координации роста и метаболизма растений повышает эффективность использования N и урожайность, позволяя стратегическую селекцию для стабильно растущей мировой пищевой безопасности.

В первом аспекте изобретения предусматривается способ повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении, причем способ включает повышение экспрессии или уровней регулирующего рост фактора (GRF) или повышение активности регулирующего рост фактора.

В следующем варианте осуществления способ дополнительно включает повышение урожайности зерна в растении. Предпочтительно повышение урожая зерна выбрано из повышения количества зерен на метелку или на растение и/или увеличение массы 1000 зерен.

В другом варианте осуществления способ дополнительно включает усиление ассимиляции С, как описано ниже.

В другом аспекте изобретения предусматривается способ получения растения с увеличенным поглощением азота, и/или ассимиляцией азота, и/или эффективностью использования азота, причем способ включает повышение экспрессии или уровней регулирующего рост фактора (GRF) или повышение активности регулирующего рост фактора. Предпочтительно, растение также имеет увеличенный урожай и/или увеличенную ассимиляцию С.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает определение повышения по меньшей мере одного из поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота и урожая зерна.

В другом варианте осуществления способ дополнительно включает регенерацию растения и скрининг в отношении повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота и урожая зерна.

В одном варианте осуществления способ включает внесение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в одну нуклеиновую кислоту, кодирующую GRF и/или промотор GRF. Предпочтительно, мутация представляет собой замену. В одном варианте осуществления мутация представляет собой участок связывания микро-РНК (мкРНК, miRNA), предпочтительно участок связывания мкРНК396. В альтернативном варианте осуществления мутация находится в промоторе GRF.

Предпочтительно, GRF представляет собой GRF4 или его функциональный вариант или гомолог. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или ее функционального варианта или его гомолога. Предпочтительно, нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1 или 2 или их функционального варианта или их гомолога. В следующем варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая промотор GRF, содержит или состоит из SEQ ID NO: 7 или 8 или их функционального

варианта или их гомолога.

В одном варианте осуществления мутацию вносят с использованием направленной модификации генома, предпочтительно ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9.

В альтернативном варианте осуществления способ включает введение и экспрессию в растении конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеиновую кислоту GRF. Предпочтительно, конструкция нуклеиновой кислоты GRF функционально связана с регуляторной последовательностью. Более предпочтительно, регуляторная последовательность представляет собой конститутивный промотор. Еще более предпочтительно, регуляторная последовательность представляет собой промотор GRF, как определено в SEQ ID NO: 9, или его функциональный вариант или его гомолог. Предпочтительно, нуклеиновая кислота GRF кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или 6 или их функционального варианта или их гомолога. Более предпочтительно, нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5.

В одном варианте осуществления указанное увеличение поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и/или урожая, и/или метаболизма С происходит относительно растения дикого типа или контрольного растения. Предпочтительно, поглощение азота, и/или ассимиляция азота, и/или эффективность использования азота возрастают в побегах, и/или корнях растения. Более предпочтительно, поглощение азота и/или ассимиляция азота и/или эффективность использования азота возрастают в условиях низкого или высокого содержания азота, предпочтительно в условиях низкого содержания азота.

В предпочтительном варианте осуществления высота растения не изменяется.

В другом аспекте изобретения предусматривается генетически измененное растение, его часть или клетка растения, где экспрессия или уровень регулирующего роста фактора (GRF) или активность GRF возрастают по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением, и где растение характеризуется увеличением по меньшей мере одного из поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением. Предпочтительно, растение также имеет увеличенный выход и/или увеличенную ассимиляцию С.

В одном варианте осуществления растение экспрессирует конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту GRF. Предпочтительно, конструкция нуклеиновой кислоты содержит регуляторную последовательность. Более предпочтительно, регуляторная последовательность представляет собой конститутивный промотор. В одном варианте осуществления регуляторная последовательность представляет собой промотор GRF, как определено в SEQ ID NO: 9, или его функциональный вариант или гомолог.

В альтернативном варианте осуществления растение содержит по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одной нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид



GRF и/или промотор GRF. Предпочтительно, мутация представляет собой замену. Более предпочтительно, мутацию вносят с использованием направленной модификации генома, предпочтительно ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9. В одном варианте осуществления мутация находится в участке связывания микро-РНК (мкРНК), предпочтительно в участке связывания мкРНК396. В другом варианте осуществления мутация находится в промоторе GRF.

В одном варианте осуществления часть растения представляет собой зерно или семя.

В другом аспекте изобретения предусматривается способ идентификации и/или селекции растения, которое имеет увеличенное поглощение азота, и/или ассимиляцию азота, и/или эффективность использования азота, предпочтительно по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением, причем способ включает выявление в растении или зародышевой плазме растения по меньшей мере одного полиморфизма по меньшей мере в одном гене GRF или промоторе GRF и отбор указанного растения или его потомства. Предпочтительно, полиморфизм представляет собой замену. Более предпочтительно, способ дополнительно включает интрогрессирование хромосомной области, содержащей по меньшей мере один полиморфизм в гене или промоторе GRF, во второе растение или зародышевую плазму растения для получения подвергнутого интрогрессированию растения или зародышевой плазмы растения.

В следующем аспекте изобретения предусматривается конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеиновую кислоту GRF, где нуклеиновая кислота GRF кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF, содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или 6 или их функционального варианта или гомолога, и предпочтительно регуляторной последовательности. Предпочтительно, регуляторная последовательность представляет собой конститутивный промотор. В одном варианте осуществления регуляторная последовательность представляет собой промотор GRF, как определено в SEQ ID NO: 9, или его функциональный вариант или его гомолог. Более предпочтительно, нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5.

В другом аспекте изобретения предусматривается вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании.

В следующем аспекте изобретения предусматривается клетка-хозяин, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании. Предпочтительно, клетка представляет собой бактериальную клетку или клетку растения.

В другом аспекте изобретения предусматривается трансгенное растение, экспрессирующее конструкцию нуклеиновой кислоты или вектор, как описано в настоящем описании.

В другом аспекте изобретения предусматривается применение конструкции нуклеиновой кислоты, как определено в настоящем описании, для повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении.

В следующем аспекте изобретения предусматривается способ повышения

поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и/или урожая, и/или ассимиляции С в растении, причем способ включает модулирование экспрессии и/или активности GRF, где способ включает внесение по меньшей мере одной мутации в ген GRF, где ген GRF содержит или состоит из

a. последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, как определено в SEQ ID NO: 3; или

b. последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в SEQ ID NO: 1 или 2; или

c. последовательности нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% общей идентичностью последовательность либо с (a), либо с (b); или

d. последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид GRF, который способен гибридизоваться в жестких условиях, как определено в настоящем описании, с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно любому из (a)-(c).

В следующем аспекте изобретения предусматривается конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один ДНК-связывающий домен, который может связываться по меньшей мере с одним геном GRF.

В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере один протоспейсерный элемент, и где последовательность протоспейсерного элемента выбрана из SEQ ID NO: 50, 53, 58, 61, 66, 69, 74, 77, 82, 86, 91, 94, 99, 102, 107, 110, 115, 118, 123, 126, 131, 134, 139, 142, 147, 150, 155, 158, 163, 166, 171, 174, 179, 182, 187 и 190 или последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 50, 53, 58, 61, 66, 69, 74, 77, 82, 86, 91, 94, 99, 102, 107, 110, 115, 118, 123, 126, 131, 134, 139, 142, 147, 150, 155, 158, 163, 166, 171, 174, 179, 182, 187 и 190.

В следующем варианте осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность РНК CRISPR (crRNA), где указанная последовательность cr-РНК содержит последовательность протоспейсерного элемента и дополнительные нуклеотиды.

В следующем варианте осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую транскриптивную РНК (tracr-РНК), где предпочтительно tracr-РНК определена в SEQ ID NO:46, или ее функциональный вариант.

В другом варианте осуществления конструкция кодирует по меньшей мере одну одиночную гидовую РНК (огРНК), где указанная огРНК содержит последовательность tracr-РНК и последовательность cr-РНК, где огРНК содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 51, 54, 59, 62, 67, 70, 75, 78, 83, 87, 92, 95, 100, 103, 108, 111, 116, 119, 124, 127, 132, 135, 140, 143, 148, 151, 156, 159, 164, 167, 172, 175, 180, 183, 188 и 191 или их варианта.

Предпочтительно, конструкция функционально связана с промотором. Более предпочтительно, промотор представляет собой конститутивный промотор.

В одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент CRISPR. Предпочтительно, фермент CRISPR представляет собой белок Cas. Более предпочтительно, белок Cas представляет собой Cas9 или его функциональный вариант.

В альтернативном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты кодирует эффектор TAL. Предпочтительно, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую эндонуклеазу или ее домен расщепления ДНК. Более предпочтительно эндонуклеаза представляет собой FokI.

В другом аспекте изобретения предусматривается молекула одиночной гидовой (ог)РНК, где указанная огРНК содержит последовательность cr-РНК и последовательность tracr-РНК, где последовательность cr-РНК может связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 49, 52, 57, 60, 65, 68, 73, 76, 81, 85, 90, 93, 98, 101, 106, 109, 114, 117, 122, 125, 130, 133, 138, 141, 146, 149, 154, 157, 162, 165, 170, 173, 178, 181, 186 и 189 или их варианта.

В другом аспекте изобретения предусматривается конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая донорную ДНК-нуклеиновую кислоту, выбранную из SEQ ID NO: 48, 56, 64, 72, 80, 84, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 145, 153, 161, 169, 177 и 185 или их варианта, где указанная донорная ДНК-нуклеиновая кислота функционально связана с регуляторной последовательностью. Предпочтительно, конструкция дополнительно содержит по меньшей мере одну огРНК, выбранную из SEQ ID NO: 51, 54, 59, 62, 67, 70, 75, 78, 83, 87, 92, 95, 100, 103, 108, 111, 116, 119, 124, 127, 132, 135, 140, 143, 148, 151, 156, 159, 164, 167, 172, 175, 180, 183, 188 и 191, предпочтительно функционально связанную с регуляторной последовательностью. Более предпочтительно, конструкция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую фермент CRISPR, предпочтительно функционально связанный с регуляторной последовательностью.

В другом аспекте предусматривается выделенная клетка растения, трансфицированная по меньшей мере одной конструкцией нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, или по меньшей мере одной огРНК, как описано в настоящем описании.

В следующем аспекте изобретения предусматривается выделенная клетка растения, трансфицированная по меньшей мере одной конструкцией нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании и второй конструкцией нуклеиновой кислоты, где указанная вторая конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Cas, предпочтительно белок Cas9 или его функциональный вариант. В одном варианте осуществления вторая конструкция нуклеиновой кислоты трансфицирована до, после или одновременно с конструкцией нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании, предпочтительно содержащей

только нуклеиновую кислоту оГРНК.

В другом аспекте изобретения предусматривается генетически модифицированное растение, где указанное растение содержит трансфицированную клетку, описанную в настоящем описании.

В следующем аспекте изобретения предусматривается генетически модифицированное растение, как описано в настоящем описании, где нуклеиновая кислота, кодирующая оГРНК, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая белок Cas, встроена в стабильной форме.

В другом аспекте изобретения предусматривается способ увеличения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и/или урожая, и/или ассимиляции С в растении, причем способ включает введение и экспрессию в растении конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании, или оГРНК, описанной в настоящем описании, где предпочтительно указанное увеличение происходит относительно контрольного растения или растения дикого типа.

В другом варианте осуществления предусматривается применение конструкции нуклеиновой кислоты, как определено в настоящем описании, или оГРНК, как описано в настоящем описании, для увеличения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении. Предпочтительно, конструкция нуклеиновой кислоты или оГРНК повышает экспрессию и/или активность GRF в растении.

В другом аспекте изобретения предусматривается способ получения генетически модифицированного растения, как описано в настоящем описании, причем способ включает:

- а. выбор части растения;
- б. трансфекцию по меньшей мере одной клетки части растения согласно (а) конструкцией нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании;
- с. регенерацию по меньшей мере одного растения, происходящего из трансфицированной клетки или клеток; путем селекции одного или нескольких растений, полученных согласно (б), которые демонстрируют увеличенную экспрессию по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты GRF в указанном растении.

В последнем аспекте изобретения предусматривается способ увеличения метаболизма углерода и/или пролиферации клеток в растениях (а также, необязательно, как описано выше, метаболизма азота), причем способ включает увеличение экспрессии или увеличение уровней GRF4. В одном варианте осуществления метаболизм углерода выбран из по меньшей мере одного из фотосинтеза, передачи сигнала углерода, передачи сигнала сахара, и нагрузки сахарозой или нагрузки флоэмы. В другом варианте осуществления пролиферация клеток включает деление клеток. В частности, способ может включать увеличение экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм углерода и/или клеточную передачу сигнала (например, циклин-зависимые киназы). В одном варианте

осуществления увеличение пролиферации клеток увеличивает ширину листьев и стеблей, но предпочтительно не высоту стеблей.

В одном варианте осуществления любого из описанных выше аспектов нуклеиновая кислота GRF кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или 6 или их функционального варианта или их гомолога. Предпочтительно, нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5. В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая промотор GRF, содержит или состоит из SEQ ID NO: 7 или 8, или их функционального варианта или их гомолога.

В одном варианте осуществления GRF представляет собой GRF4 или его гомолог или ортолог.

В одном варианте осуществления любого из описанных выше аспектов азот находится в нитрате или аммонии.

В другом аспекте изобретения предусматривается растение, полученное или получаемое любым из способов, описанных в настоящем описании.

В одном варианте осуществления любого из описанных выше аспектов растение представляет собой однодольное или двудольное растение. Предпочтительно, растение выбрано из риса, кукурузы, пшеницы, ячменя, сорго, картофеля, томата, сои и *V. parvus*. Более предпочтительно, растение представляет собой рис. Еще более предпочтительно рис представляет собой сорт indica или japonica.

### **ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Изобретение далее описано с помощью следующих неограничивающих чертежей:

**На фиг.1 показано, что накопление DELLA ингибирует ростовой ответ на N и поглощение N в GRV риса и пшеницы.** **a**, Высота растений риса, выращенных в различных режимах поступления N. **b**, Высота растений пшеницы, выращенных в различных режимах поступления N. Данные (a, b) представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=30). **c**, Показатель поглощения корнями риса  $^{15}\text{NH}_4^+$  при низком (0,375 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; LN) и высоком (1,25 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; HN) поступлении N. **d**, Уровень поглощения корнями пшеницы  $^{15}\text{NO}_3^-$  при низком (0,375 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; LN) и высоком (1,25 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; HN) поступлении N. Данные (c, d) представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=9). Статистический анализ проводили с использованием множественных ранговых критериев Дункана, одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями ( $P > 0,05$ ).

**На фиг.2 показано, что OsGRF4 регулирует поглощение  $\text{NH}_4^+$  и ростовой ответ на доступность N в рисе.** **a**, Сортовые показатели поглощения  $^{15}\text{NH}_4^+$  (в порядке от наименьшего к наибольшему, слева направо) в растениях, выращенных при высоком поступлении N (1,25 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). **b**, Показатели LOD из анализа QTL показателей поглощения  $^{15}\text{NH}_4^+$  в популяции NJ6 $\times$ NH73 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>, распределенные по 12 хромосомам риса. Указаны основные пики (qNGR1 и qNGR2). **c**, показатели поглощения  $^{15}\text{NH}_4^+$ . Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=9). **d**, накопление OsGRF4,

выявленное с использованием антитела против OsGRF4. HSP90 служит в качестве контроля нагрузки. **e**, Относительное содержание мРНК OsGRF4 в корнях NJ6, выращенных при увеличении уровня поступления N (0,15N, 0,1875 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,3N, 0,375 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,6N, 0,75 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 1N, 1,25 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). Содержание, выраженное относительно 1N (=1). **f**, Выявленное с использованием антитела против OsGRF4 накопление белка OsGRF4 в NJ6 при различных уровнях поступления N (как в **i**). HSP90 служит в качестве контроля нагрузки. **g**, Видимый фенотип мутантных растений с потерей функции *osgrf4*. Масштабная метка, 15 см. **h**, Показатели поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> при увеличении поступления N (как в **i**). Данные представлены в качестве среднего значения ±s.e.m. (n=9). **i**, Биомассы (сухой вес) растений, выращенных при увеличении поступления N. Данные представлены в качестве среднего значения ±s.e.m. (n=3). В статистическом анализе использовались множественные ранговые критерии Дункана, одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями (P > 0,05; панели **c**, **h** и **i**).

**На фиг.3 показано, что OsGRF4 является основным координатором экспрессии генов метаболизма N.** **a**, Фенотипы зрелых растений. Масштабная метка, 15 см. **b**, Показатели поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> и <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Данные представлены в качестве среднего значения ±s.e.m. (n=9). В статистическом анализе использовались множественные ранговые критерии Дункана, одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями (P > 0,05). **c**, Активность глутаминсинтазы (GS) и нитратредуктазы (NR) в побегах растений риса в условиях затопляемого рисового поля при увеличении поступления N. Данные представлены в качестве среднего значения ±s.e.m. (n=3). **d**, Анализ с использованием РНК-секвенирования. 4883 генов имели количества транскриптов, соответствующие подавлению регуляции, в NJ6-sd1 (против NJ6), 5395 генов имели количества транскриптов, соответствующие повышению регуляции, в NJ6-OsGRF4<sup>ngr2</sup> (против NJ6), причем они имели 642 гена. **e**, Содержание мРНК в корнях относительно NJ6 (=1). Данные представлены в качестве среднего значения ±s.e.m. (n=3). **f**, Содержание мРНК в побегах относительно NJ6. Данные представлены в качестве среднего значения ±s.e.m. (n=3). **g**, Мотивы последовательности, обогащенные ChIP-seq с Flag-меченым OsGRF4. **h**, EMSA демонстрируют связывание OsGRF4-His с WT, но не с мутантными (M1-M5) формами центрального мотива GCGG. **i**, ChIP-ПЦР с Flag-OsGRF4 увеличивает количество GCGG-содержащих промоторных фрагментов (обозначенных \*). **j-k**, OsGRF4 активирует слитые конструкции *промотор::люцифераза* в анализах временной транскрипции. Данные представлены в качестве среднего значения ±s.e.m. (n=3; панели **e-f**, **i-k**).

**На фиг.4 показано, что конкурентные взаимодействия OsGRF4-OsGIF1-OsSLR1 координируют поглощение и ассимиляцию NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.** **a**, Показатели поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в растениях, обработанных 100 мкМ GA (GA<sub>3</sub>) и/или 2 мкМ паклобутразолом (PAC). Данные представлены в качестве среднего значения ±s.e.m. (n=9). **b**, Относительное содержание мРНК в корнях растений, обработанных GA и/или

паклобутазолом (РАС). Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **с**, Степень опосредуемого ChIP-ПЦР OsGRF4 увеличения количества GCGG-содержащих промоторных фрагментов из сортов OsAMT1.1 (фрагмент 5) и OsGS1.2 (фрагмент 2) (показанные на фиг.2i) в ответ на обработку GA и/или РАС. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **д**, Анализ BiFC выявил взаимные взаимодействия между SLR1, OsGRF4 и OsGIF1 в ядрах эпидермальных клеток листьев табака. Масштабная метка, 60 мкм. **е**, Эксперименты Co-IP с Flag-меченным SLR1 и HA-меченным OsGRF4 или HA-меченным OsGIF1. **ф**, Изображения FRET. Донорная группа: только OsGIF1-CFP; Акцепторная группа: только OsGRF4-YFP; группы FRET: OsGIF1-CFP и OsGRF4-YFP с SLR1 или без него. Масштабная метка, 200 мкм. **г**, Среднее значение данных N-FRET для каналов OsGIF1-CFP и OsGRF4-YFP. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=6). Полученные с использованием t-критерия Стьюдента величины *P*. **h**, Анализ EMSA показывает, что связывание слитого белка OsGRF4-His с содержащим GCGG-мотив фрагментом ДНК из промотора OsAMT1.1 стимулируется посредством OsGIF1, но ингибируется посредством SLR1. **и**, Анализ транскрипции. OsGRF4-активируемая стимуляция слитых конструкций промотор pOsAMT1.1 и pOsGS1.2::люцифераза усиливается посредством OsGIF1 и ингибируется посредством SLR1. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=6). В статистическом анализе использовались множественные ранговые критерии Дункана, одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями ( $P>0,05$ ; панели **а-с**, и **и**).

**На фиг.5 показано, что антагонизм OsGRF4-SLR1 регулирует ассимиляцию углерода и рост растений.** **а**, Относительное содержание мРНК, транскрибированных с генов, регулирующих фиксацию С. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). Содержание, выраженное относительно уровня в NJ6-sd1. **б**, Анализ ChIP-ПЦР. На диаграмме представлены промоторы OsPsbS1, OsTPS1 и OsSWEET11 и области, использованные для ChIP-ПЦР. **с**, Анализ транскрипции. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=9). **д**, Относительное содержание мРНК, транскрибированных с генов, регулирующих клеточный цикл. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). Содержание выражено относительно уровня в NJ6-sd1. **е**, Анализ ChIP-ПЦР. На диаграмме представлены промоторы OscycA1.1 и Oscdc2Os-3 и области, используемые для ChIP-ПЦР. **ф**, Анализ транскрипции. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=12). В статистическом анализе использовались множественные ранговые критерии Дункана, одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями ( $P>0,05$ ).

**На фиг.6 показано, что повышенное содержание OsGRF4 увеличивает урожай зерна и эффективность использования N в GRV риса и пшеницы без увеличения высоты зрелого растения.** **а**, Фенотипы зрелых растений риса 9311 и 9311-OsGRF4<sup>ngr2</sup>, выращенных в условиях затопляемых полей при низком (LN: 60 кг/га) и высоком (HN: 210 кг/га) поступлении N. Масштабная метка, 15 см. **б**, Рост растений NIL, выращенных в

условиях затопляемых полей при увеличении поступления N. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=30). **с**, Урожай зерна выращенных на полях растений в ответ на увеличение поступления N. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. для шести участков (каждый график содержал 220 растений) на линию на уровень N. В статистическом анализе использовались множественные ранговые критерии Дункана, одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями ( $P > 0,05$ ; панели **б**, **с**). **д**, Доля распределения N в различных органах надземных частей растений, представленных на **б**. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=30). **е**, Соотношение C:N для растений, представленных на **б**. **ф**, Зрелые растения пшеницы KN199 и KN199 p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP. Масштабная метка, 15 см. **г**, Поперечное сечение верхних междоузлий растений пшеницы (слева) KN199 и (справа) KN199 p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP. Масштабная метка, 2 мм. **h**, Сравнение длины колосьев растений пшеницы KN199 и KN199 p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP. Масштабная метка, 5 см. **и**, Накопление биомассы. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=12). **ж**, Показатели поглощения  $^{15}\text{NO}_3^-$  в корнях для генотипов, как указано. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=9). **к**, Сравнение распределения N в различных органах надземных частей растений. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=9). **л**, Концентрации N. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=20). **м**, Урожайи зерна растений пшеницы KN199 и KN199 p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=30). **н**, Количество зерен на колос. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=30). **о**, Индекс урожайности растений пшеницы KN199 и KN199 p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=6). Для получения значений P использовали t-критерий Стьюдента (панели **е**, **и**, **ж** и **л-о**).

**На фиг.7 показано, что аллельная вариация в локусе OsGRF4 влияет на содержание мРНК OsGRF4 и поглощение  $^{15}\text{NH}_4+$  в корнях.** **а**, Позиционное клонирование указывает на эквивалентность OsGRF4 с qNGR2 (N-опосредуемый ростовой ответ 2). На последовательных картах показано прогрессирующее сужение области qNGR2 (серые точки, с использованием рекомбинационных точек разрыва и связанных ДНК-маркеров) до области размером ~2,7 т.п.н. на хромосоме 2, фланкированной молекулярными маркерами L17 и L18 и перекрывающей ген-кандидат LOC\_Os02g47280 (также известный как OsGRF4). Показаны начальный ATG (нуклеотид 1) и близкий TGA (нуклеотид 3385) OsGRF4, вместе с кодирующей белок последовательностью ДНК (CDS, жирные черные столбики). Участок-мишень для OsmiR396 указан посредством \*. **б**, Показатели ответа  $^{15}\text{NH}_4+$  для корней потомства BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (полученного в результате скрещивания NJ6×NM73), гомозиготного или гетерозиготного по OsGRF4<sup>NGR2</sup> или OsGRF4<sup>ngr2</sup>, выращенного в условиях высокой концентрации N (1,25 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=9). Одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями ( $P>0,05$ ). **с**, Содержание мРНК OsGRF4 в растениях (генотипы как показано) относительно



содержания в NJ6 (=1). Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **d**, Природное аллельное варьирование в локусе OsGRF4. Показано нуклеотидное положение относительно начального ATG OsGRF4. SNP, являющиеся общими между сортами NM73 и RD23, выделены. Показаны последовательности, репрезентативные для гаплотипов промотора OsGRF4 A, B и C (см. основной текст). **e**, Содержание мРНК OsGRF4 в различных сортах риса. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). Все данные о содержании представляют собой данные относительно содержания мРНК Actin2 в рисе. **f**, мРНК OsGRF4 в отобранных сортах риса, выращенных в условиях высокого (1N) или низкого (0,3N) содержания N. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). Все данные о содержании являются относительно данных о содержании в 1N (=1).

**На фиг.8 показано, что содержание OsmiR396 не увеличивается на поддающемся обнаружению уровне посредством увеличения поступления N.** Относительное содержание представителей семейства OsmiR396 риса в растениях NJ6, выращенных при различных уровнях поступления N (0,15N, 0,1875 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,3N, 0,375 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,6N, 0,75 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 1N, 1,25 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), показанное относительно содержания в растениях, выращенных в условиях 1N (=1). Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3).

**На фиг.9 представлено формирование посредством CRISPR/cas9 мутанта риса с потерей функции OsGRF4 (osgrf4).** **a**, Структура экзон-интрон OsGRF4, демонстрирующая положение внесенной посредством CRISPR/cas9 делеции 91 п.н. в экзоне 1 и интроне 1 мутантного аллеля osgrf4. **b**, Последовательность белков, кодируемых OsGRF4 (WT) и мутантными аллелями osgrf4. Делеция в osgrf4 приводит к тому, что он правильно кодирует первые 11 аминокислот OsGRF4, но белок с aberrантной последовательностью после них. **c**, Содержание мРНК OsGRF4 в WT (OsGRF4) против мутанта osgrf4, показанное относительно содержания в WT (=1). Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **d**, Выявленное с использованием антитела против OsGRF4 накопление белка OsGRF4 в мутанте osgrf4. HSP90 служит в качестве контроля нагрузки.

**На фиг.10 представлены фенотипические признаки и признаки урожайности изогенных линий NJ6, NJ6-sd1 и NJ6-sd1-OsGRF4<sup>ngr2</sup>.** **a**, Высота зрелого растения. **b**, Количество отростков на растение. **c**, Количество зерен на колос. **d**, Ширина флагового листа. **e**, Ширина стебля (соломины), выраженная в качестве диаметра верхнего междоузлия. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=16; панели a-e). **f**, Урожай зерна на растение. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m., оцененные для шести участков (каждый участок содержал 220 растений) на линию. Одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями (P > 0,05).

**На фиг.11 показано, что OsGRF4 регулирует экспрессию множества генов метаболизма NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.** **a**, Относительное содержание в корнях мРНК OsAMT1.2 в NIL для

генотипов, как указано. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **b**, Активность глутаминсинтазы (GS) в корнях. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **c**, Относительное содержание в побегах мРНК OsFd-GOGAT. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). Содержание показано относительно содержания в растениях NJ6 (=1; панели а, с). **d**, Активность глутаминсинтазы (GS) в побегах. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **e-h**, ChIP-ПЦР с Flag-OsGRF4 увеличивает количество GCGG-содержащих промоторных фрагментов (обозначенных \*) из промоторов OsAMT1.2, OsGS2, OsNADH-GOGAT2 и OsFd-GOGAT. На диаграммах представлены предполагаемые промоторы и фрагменты OsAMT1.2, OsGS2, OsNADH-GOGAT2 и OsFd-GOGAT (1-6). **i-l**, OsGRF4 активирует слитые конструкции *промотор::люцифераза* (**i**) pOsAMT1.2, (**j**) pOsGS2 (**k**) pOsNADH-GOGAT2 и (**l**) pOsFd-GOGAT в анализе временной трансактивации. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3).

**На фиг.12 показано, что OsGRF4 регулирует экспрессию множества генов метаболизма NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.** **a**, Относительное содержание в корнях мРНК OsNRT1.1B и OsNRT2.3a, кодирующих переносчики поглощения NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **b**, Относительное содержание в побегах мРНК OsNPF2.4, OsNIA1, OsNIA3 и OsPRS1, кодирующих переносчики NO<sub>3</sub><sup>-</sup> и ферменты ассимиляции. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). Содержание показано относительно содержания в NJ6-sd1 (=1; панели a-b). **c-e**, ChIP-ПЦР с Flag-OsGRF4 увеличивает количество GCGG-содержащих промоторных фрагментов (обозначенных \*) из (**c**) промоторов генов OsNRT1.1B и OsNRT2.3a, кодирующих переносчик поглощения NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (**d**) промотора гена OsNPF2.4, кодирующего переносчик NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, и (**e**) промоторов генов OsNIA1, OsNIA3 и OsPRS1, кодирующих фермент ассимиляции NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **f-g**, OsGRF4 активирует слитые конструкции *промотор::люцифераза* (**f**) pOsNRT1.1B и pOsNRT2.3 (**g**) pOsNPF2.4, pOsNIA1, pOsNIA3 и pOsPRS1 в анализе временной трансактивации. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3).

**На фиг.13 показано, что GA стимулирует активность GS.** **a**, Активность GS в корнях растений риса в возрасте 2 недель, которые обрабатывали 100 мкМ GA (GA<sub>3</sub>) и/или 2 мкМ паклобутазолом (PAC), генотипы являются такими, как указано. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **b**, Активность GS в побегах растений, обработанных 100 мкМ GA (GA<sub>3</sub>) и/или 2 мкМ паклобутазолом (PAC), генотипы являются такими, как указано. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3).

**На фиг.14 представлена визуализация посредством BiFC взаимодействий SLR1-OsGIF1-OsGRF4.** **a**, Детали для конструкций, экспрессирующих OsGRF4 и варианты с делецией конкретных доменов. OsGRF4 содержит домены QLQ (Gln, Leu, Gln) и WRC (Trp, Arg, Cys), положения являются такими, как указано. **b**, Анализ BiFC. Конструкции, экспрессирующие OsGRF4 или варианты с делецией (как в **a**), меченные на

N-конце посредством YFP, совместно трансформировали в эпидермальные клетки листьев табака вместе с конструкциями, экспрессирующими OsGIF1 или SLR1, меченные на C-конце посредством YFP, соответственно. Масштабная метка, 60 мкм. **с**, Анализ BiFC. Конструкции, экспрессирующие OsGRF1 или родственный белок семейства OsGRF, меченный на N-конце посредством YFP, совместно трансформировали в эпидермальные клетки листьев табака вместе с конструкцией, экспрессирующей SLR1, меченный на C-конце посредством YFP. Масштабная метка, 60 мкм.

**На фиг.15 показано, что SLR1 ингибирует самостимуляцию посредством OsGRF4 мРНК OsGRF4 и содержания белка OsGRF4. а**, ChIP-ПЦР OsGRF4-опосредуемое увеличение содержания GCGG-содержащих промоторных фрагментов OsGRF4. **б**, OsGRF4-активируемая стимуляция транскрипции со слитых конструкций *промотор::люцифераза* pOsGRF4, усиливается посредством OsGIF1 и ингибируется посредством SLR1. **с**, содержание мРНК OsGRF4, генотипы растений являются такими, как указано. **д**, содержание OsGRF4 (как определяют посредством антитела против OsGRF4), генотипы растений, как указано. **е**, эффект GA и PAC на содержание мРНК OsGRF4. **ф**, Графическое представление того, как GA увеличивает содержание OsGRF4. В отсутствие GA SLR1 ингибирует стимуляцию посредством OsGRF4-OsGIF1 транскрипции OsGRF4. В присутствии GA SLR1 разрушается посредством опосредуемой протеасомами деградации, это способствовало активируемой OsGRF4-OsGIF1 транскрипции OsGRF4.

**На фиг.16 показано, что OsGRF4 регулирует экспрессию множества генов, регулирующих метаболизм C и клеточный цикл. а**, Относительное содержание в побегах транскриптов отдельных генов, регулирующих фотосинтез, передачу сигнала углеродом и транспорт сахарозы/нагрузку флоэмы в растениях NJ6-sd1-OsGRF4<sup>ngr2</sup> относительно содержания в растениях NJ6-sd1 (=1). Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3). **б**, Относительное содержание в побегах транскриптов отдельных генов, регулирующих прохождение клеточного цикла в растениях NJ6-sd1-OsGRF4<sup>ngr2</sup> относительно содержания в растениях NJ6-sd1 (=1). Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=3).

**На фиг.17 показано, что природное аллельное варьирование OsGRF4 ассоциировано с варьированием морфологии растений и зерен и урожайности зерна. а**, Полиморфизмы ДНК в промоторной области OsGRF4. Выделенные зеленым цветом области указывают на три уникальных варианта SNP, ассоциированных с фенотипическим варьированием NM73 и RD23. **б**, Ящичковые диаграммы для высоты растений, длины зерен, ширины зерен, количества зерен на колос и урожайности зерна для сортов риса, содержащих различные гаплотипы промотора OsGRF4 (Напр.; А, В или С). Все данные для растений, выращенных в условиях нормального удобрения на затопляемых полях<sup>21</sup>. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (А, n=74; В, n=28; С, n=123). Одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями ( $P > 0,05$ ).

На фиг.18 показаны агрономические признаки, проявляемые растениями 9311 и 9311-OsGRF4<sup>ngr2</sup>, выращиваемыми при различных уровнях внесения удобрения N. **a**, Ширина флагового листа. **b**, Ширина стебля верхнего междоузлия. **c**, Количество зерен на колос. **d**, масса 1000 зерен. **e**, индекс урожайности. **f**, сухая биомасса на растение. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=30). Для получения значений P использовали t-критерий Стьюдента.

На фиг.19 показаны показатели захвата N корнями для растений 9311 и 9311-OsGRF4<sup>ngr2</sup>, выращиваемых при различных уровнях внесения удобрения N. **a**, поглощение  $^{15}\text{NH}_4^+$ . **b**, поглощение  $^{15}\text{NO}_3^-$ . Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=30). Для получения величин P использовали t-критерий Стьюдента.

На фиг.20 показано распределение минеральных питательных веществ в различных органах надземных частей растений 9311 и 9311-OsGRF4<sup>ngr2</sup>, выращенных при различных уровнях внесения удобрения N. **a**, распределение N. **b**, распределение P (фосфор). **c**, распределение K (калий). **d**, распределение Ca (кальций). **e**, распределение S (сера). **f**, распределение Mg (магний). Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=9).

На фиг.21 представлен рост, поглощение N и урожайность зерна WYJ7-dep1 и трансгенных растений WYJ7-dep1, экспрессирующих конструкцию p35::OsGRF4ngr2-GFP, при различных уровнях внесения удобрения N. **a**, Высота зрелых растений. Масштабная метка, 15 см. **b-d**, Показатели поглощения корнями для (**b**)  $^{15}\text{NH}_4^+$  (**c**)  $^{15}\text{NO}_3^-$  и (**d**)  $^{15}\text{NH}_4^+$  и  $^{15}\text{NO}_3^-$  в комбинации. Растения риса, выращенные в условиях низкого содержания N (0,3N, 0,375 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) и высокого содержания N (1N, 1,25 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), соответственно. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=9). Одинаковые строчные буквы обозначают незначимые отличия между средними значениями ( $P > 0,05$ ). **e**, высота зрелых растений. **f**, дата колошения. **g**, число побегов на растение. **h**, количество зерен на колос. **i**, урожай зерна на растение. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$ s.e.m. (n=30). Для получения величин P использовали t-критерий Стьюдента (панели **e-i**).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение далее описано дополнительно. В следующих абзацах различные аспекты изобретения определены более подробно. Каждый аспект, определенный таким образом, можно комбинировать с любым другим аспектом или аспектами, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или преимущественный, можно комбинировать с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или преимущественные.

Для применения настоящего изобретения на практике могут быть использованы, если нет иных указаний, общепринятые способы ботаники, микробиологии, культуры тканей, молекулярной биологии, химии, биохимии и технологии рекомбинантных ДНК, биоинформатики, которые известны в данной области. Такие способы полностью объяснены в литературе.

Как используют в рамках изобретения, слова "нуклеиновая кислота", "последовательность нуклеиновой кислоты", "нуклеотид", "молекула нуклеиновой кислоты" или "полинуклеотид" включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномная ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), встречающиеся в природе, мутантные, синтетические молекулы ДНК или РНК, и аналоги ДНК или РНК, полученные с использованием нуклеотидных аналогов. Они могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Такие нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими, кодирующие последовательности для структурных генов, антисмысловые последовательности и некодирующие регуляторные последовательности, которые не кодируют мРНК или белковые продукты. Эти термины также охватывают ген. Термин "ген" или "последовательность гена" используют в широком значении для обозначения нуклеиновой кислоты ДНК, ассоциированной с биологической функцией. Таким образом, гены могут включать интроны и экзоны, как в геномной последовательности, или могут содержать только кодирующую последовательность, как в кДНК, и/или могут включать кДНК в комбинации с регуляторными последовательностями.

Термины "полипептид" и "белок" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к аминокислотам в полимерной форме любой длины, связанным пептидными связями.

Термин "промотор", как правило, относится к контролирующей последовательности нуклеиновой кислоты, находящейся выше точки начала транскрипции гена и вовлеченной в связывание РНК-полимеразы и других белков, и, тем самым, направление транскрипции функционально связанной нуклеиновой кислоты. Вышеупомянутые термины охватывают последовательности регуляции транскрипции, происходящие из классического эукариотического геномного гена (включая ТАТА-боксы, который требуется для точной инициации транскрипции, с последовательностью бокса ССААТ или без нее) и дополнительные регуляторные элементы (т.е. выше активирующих последовательностей, энхансеров и сайленсеров), которые изменяют экспрессию генов в ответ на стимулы, обусловленные развитием, и/или внешние стимулы, или тканеспецифическим образом. Также в этот термин включена последовательность регуляции транскрипции классического прокариотического гена, и в этом случае она может включать последовательность бокса -35 и/или последовательности регуляции транскрипции бокса -10.

Аспекты изобретения вовлекают технологию рекомбинации ДНК и исключают варианты осуществления, которые основаны исключительно на получении растений традиционными способами селекции.

Термин "GRF" относится к регулируемому фактору роста, специфическому для растений фактору транскрипции. Предпочтительно GRF представляет собой GRF4. В одном примере GRF представляет собой GRF4 риса (также называемый OsGRF4) или его ортолог.

Термин "азот", как используют в рамках изобретения, может включать нитрат ( $\text{NO}_3^-$ ) и/или аммоний ( $\text{NH}_4^+$ ).

Для целей изобретения "генетически измененное растение" или "мутантное растение" представляет собой растение, которое генетически изменено по сравнению со встречающимся в природе растением дикого типа (WT). В одном варианте осуществления мутантное растение представляет собой растение, которое изменено по сравнению со встречающимся в природе растением дикого типа (WT), с использованием способа мутагенеза, такого как любой из способов мутагенеза, описанных в настоящем описании. В одном варианте осуществления способ мутагенеза представляет собой направленную модификацию генома или редактирование генома. В одном варианте осуществления геном растений изменен по сравнению с последовательностями дикого типа с использованием способа мутагенеза. Такие растения имеют измененный фенотип, как описано в настоящем описании, такой как повышенный метаболизм азота. Таким образом, в этом примере повышенный метаболизм азота обеспечивается присутствием измененного генома растения, например, мутантного эндогенного гена GRF или промотора. В одном варианте осуществления осуществляют специфическое нацеливание на последовательность эндогенного промотора или гена с использованием направленной модификации генов, и присутствие последовательности мутантного гена или промотора не обеспечивается присутствием трансгенов, экспрессируемых в растении. Таким образом, генетически измененное растение может быть описано как свободное от трансгенов.

Тем не менее, в альтернативном варианте осуществления генетически измененное растение представляет собой трансгенное растение. Для целей изобретения "трансгенный", "трансген" или "рекомбинантный" означает, в отношении, например, последовательности нуклеиновой кислоты, экспрессирующей кассеты, генной конструкции или вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, или организма, трансформированного последовательностями нуклеиновых кислот, экспрессирующими кассетами или векторами согласно изобретению, все этих конструкции, полученные рекомбинантными способами, в которых либо

(а) последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие белки, пригодные в способах, либо

(b) последовательность(и) генетического контроля, которая функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты по изобретению, например, промотор, либо

(с) а) и b) не находятся в их природном генетическом окружении или модифицированы рекомбинантными способами, причем для модификации является возможным, чтобы модификация имела форму, например, замены, вставки, делеции, инверсии или инсерции одного или нескольких нуклеотидных остатков.

Под естественным генетическим окружением понимают природный геномный или хромосомный локус в исходном растении или присутствие в геномной библиотеке. В случае геномной библиотеки естественное генетическое окружение последовательности

нуклеиновой кислоты предпочтительно сохраняется, по меньшей мере частично. Окружение фланкирует последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с одной стороны и имеет длину последовательности по меньшей мере 50 п.н., предпочтительно по меньшей мере 500 п.н., особенно предпочтительно по меньшей мере 1000 п.н., наиболее предпочтительно по меньшей мере 5000 п.н. Встречающаяся в природе экспрессирующая кассета - например встречающаяся в природе комбинация природного промотора последовательности нуклеиновой кислоты с соответствующей последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, пригодный в способах по настоящему изобретению, как определено выше - становится трансгенной экспрессирующей кассетой, когда экспрессирующая кассета модифицирована неприродными синтетическими ("искусственными") способами, такими как, например, мутагенная обработка. Подходящие способы описаны, например, в US 5565350 или WO 00/15815, обе из которых включены в качестве ссылок.

Растение согласно всем аспектам изобретения, описанным в настоящем описании, может представлять собой однодольное или двудольное растение. Предпочтительно, растение представляет собой сельскохозяйственную культуру. Под сельскохозяйственной культурой подразумевают любое растение, которое выращивают в коммерческом масштабе для употребления и использования человеком. В предпочтительном варианте осуществления растение представляет собой злак. В другом варианте осуществления растение представляет собой *Arabidopsis*.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления растение выбрано из риса, кукурузы, пшеницы, ячменя, сорго, декоративной капусты, сои, картофеля и томата. В одном варианте осуществления растение представляет собой GRV (полукарликовый сорт зеленой революции). В наиболее предпочтительном варианте осуществления растение представляет собой рис, предпочтительно сортов *japonica* или *indica*. В этом примере сорт *indica* предпочтительно содержит мутантный аллель *sd1*, который обеспечивает стабилизацию подавляющих рост белков DELLA (DELLA), и более предпочтительно сорт *indica* выбран из TQ, NJ11, ZF802, MH63, CY1, HHZ, GC2, HJX74, ZS97B, MH86, GLA4, WXQ, GF3, SKZ, SH527, XAZ9, FAZ, TZL1, 78130, 93-11, SH881, LTZ, LTP, QXJZ, HY33, 8B, EJQ, QGH, XAZ4, H410, EYL1, YFZ, EYF и SG1. В другом примере сорт *japonica* содержит вариант субъединицы (*dep1*) *Gγ*, например, WJY7-*dep1*. В другом варианте осуществления растение представляет собой пшеницу и предпочтительно растение содержит мутантный аллель *Rht*, который обеспечивает стабилизацию DELLA, например, китайскую пшеницу GRV KN199.

Термин "растение", как используют в рамках изобретения, охватывает целые растения, предков и потомков таких растений, и части растения, включая семена, плоды, побеги, стебли, листья, корни (включая клубни), цветки, ткани и органы, где каждый из вышеупомянутых содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, или содержит описанные в настоящем описании мутации. Термин "растение" также охватывает клетки растений, суспензионные культуры, ткани каллюса, зародыши,

меристематические области, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры, вновь где каждый из вышеупомянутых содержит конструкцию нуклеиновой кислоты или мутации, как описано в настоящем описании.

Изобретение также относится к пожинаемым частям растения по изобретению, как описано в настоящем описании, но не ограничиваясь ими, семена, листья, плоды, цветки, стебли, корни, корневища, клубни и луковицы. Аспекты изобретения также относятся к продуктам, полученным, предпочтительно прямо полученным, из пожинаемой части такого растения, таким как сухие гранулы или порошки, масло, жир и жирные кислоты, крахмал или белки. Другим продуктом, который может быть получен из пожинаемых частей растения по изобретению, является биодизель. Изобретение также относится к пищевым продуктам и пищевым добавкам, содержащим растение по изобретению или его части. В одном варианте осуществления продукты питания могут представлять собой корма для животных. В другом аспекте изобретения предусматривается продукт, полученный из растения, как описано в настоящем описании, или из его части.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления часть растения или пожинаемый продукт представляет собой семя или зерно. Таким образом, в следующем аспекте изобретения предусматривается семя, полученное из генетически измененного растения, как описано в настоящем описании.

В альтернативном варианте осуществления часть растения представляет собой пыльцу, побег или потомка генетически измененного растения, описанного в настоящем описании. Таким образом, в следующем аспекте изобретения предусматривается пыльца, побег или потомок, полученные из генетически измененного растения, как описано в настоящем описании.

Контрольное растение, как используют в рамках изобретения согласно всем из аспектов изобретения, представляет собой растение, которое не модифицировано способами по изобретению. Таким образом, в одном варианте осуществления контрольное растение не имеет повышенную экспрессию нуклеиновой кислоты GRF и/или измененную активность полипептида GRF, как описано выше. В альтернативном варианте осуществления растение не является генетически модифицированным, как описано выше. В одном варианте осуществления контрольное растение представляет собой растение дикого типа. Контрольное растение, как правило, относится к тому же виду растений, предпочтительно имеющему тот же генетический фон, что и модифицированное растение.

#### **Способы повышения поглощения азота**

В первом аспекте изобретения предусматривается способ повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении, причем способ включает повышение экспрессии или уровней регулирующего рост фактора (GRF), или повышение активности регулирующего рост фактора.

"Увеличение", как используют в рамках изобретения, может относиться к увеличению, составляющему по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 или 95% или более по сравнению с контрольным



растением. Указанное увеличение может происходить в корнях и/или побегах растения.

Термин "эффективность использования азота" или NUE может быть определен как урожай культуры (например, урожай зерна). Альтернативно NUE может быть определена как сельскохозяйственная NUE, которая означает урожай зерна/N. Общая эффективность использования N растениями включает как эффективность поглощения, так и эффективность утилизации, и она может быть вычислена как  $U_p E$ . В одном варианте осуществления NUE возрастает на 5%-50% или более по сравнению с контрольным растением.

Термин "ассимиляция азота" может быть определен как образование органических соединений азота из неорганического азота.

Увеличение по меньшей мере одного из поглощения азота, ассимиляции азота и эффективности использования азота может быть обозначено в настоящем описании как увеличение метаболизма азота.

В следующем варианте осуществления способ дополнительно включает увеличение выхода, предпочтительно урожая зерна, в растении. Таким образом, способ включает увеличение по меньшей мере одного из поглощения азота, ассимиляции азота и NUE в растении и увеличение урожая.

Термин "урожай", как правило, означает поддающееся измерению достижение экономической ценности, как правило, связанное с конкретной культурой, с площадью и с периодом времени. Отдельные части растения прямо обеспечивают урожай на основе их количества, размера и/или массы. Фактический урожай представляет собой урожай на квадратный метр культуры в год, который определяется путем деления общей продукции в год (включает как пожинаемую, так и оцененную продукцию) на количество квадратных метров посева.

Термин "увеличенный урожай", как определяют в рамках настоящего изобретения, может подразумевать включение любых или по меньшей мере одного из следующих, и его можно определять путем оценки одного или нескольких из (a) увеличенной биомассы (вес) одной или нескольких частей растения, являющихся надземными (пожинаемые части), или увеличенной биомассы корней, увеличенного объема корней, увеличенной длины корней, увеличенного диаметра корней, или увеличенной длины корней, или увеличенной биомассы любой другой пожинаемой части. Увеличенная биомасса может быть выражена как г/растение или кг/гектар, (b) увеличенного урожая семян на растение, которое может включать одно или несколько из увеличения биомассы (вес) семян на растение или на индивидуальной основе, (c) увеличенной скорости налива семян, (d) увеличенного количества налитых семян, (e) увеличенного индекса урожайности, который может быть выражен как соотношение урожая пожинаемых частей, таких как семена, к общей биомассе, (f) увеличенной жизнеспособности/эффективности проращивания, (g) увеличенного количества, или размера, или массы семян или стручков, или бобов или зерен, (h) увеличенного объема семян (который может быть результатом изменения композиции (т.е. липиды (также обозначаемые в настоящем описании как масла)), общего

содержания и композиции белков и углеводов, (i) увеличенной (индивидуальной или средней) площади семян, (j) увеличенной (индивидуальной или средней) длины семян, (k) увеличенного (индивидуального или среднего) периметра семян, (l) увеличенного роста или увеличенного ветвления, например, соцветий на большем количестве ветвей, (m) увеличенного свежего веса или налива зерна, (n) увеличенной массы початка, (o) увеличенной массы тысячи зерен (TKW), которая может быть получена из подсчитанного количества налитых семян и их общей массы, и может быть результатом увеличения размера семян и/или массы семян, (p) увеличенного количества бесплодных отростков на растении, и (q) более твердых или более сильных соломин или стеблей. Все параметры являются параметрами относительно растения дикого типа или контрольного растения.

В предпочтительном варианте осуществления указанный увеличенный урожай включает увеличение по меньшей мере одного из числа зерен на колос или на растение и/или увеличения массы 1000 зерен. Урожай является увеличенным относительно контрольного растения или растения дикого типа. Например, урожай увеличен на 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% по сравнению с контрольным растением или растением дикого типа. Таким образом, увеличение урожая зерна можно измерять путем оценки одного или нескольких из числа зерен на колос или на растение и массы тысячи зерен. Квалифицированный специалист способен измерять любой из приведенных выше параметров урожая с использованием известных в данной области способов.

Термины "семя" и "зерно", как используют в рамках изобретения, могут использоваться взаимозаменяемо. Термины "увеличивать", "улучшать" или "усиливать", как используют в рамках изобретения, также являются взаимозаменяемыми.

В следующем варианте осуществления способ дополнительно включает увеличение ассимиляции С в растении. Увеличение является таким, как определено выше.

В предпочтительном варианте осуществления GRF представляет собой GRF4 (регулирующий рост фактор 4) или его гомолог или ортолог. В одном варианте осуществления GRF4 представляет собой GRF4 или OsGRF4 риса.

Как используют в рамках изобретения, термин "увеличение экспрессии" означает увеличение уровней для нуклеотидов, и "увеличение уровней", как используют в рамках изобретения, означает увеличение белковых уровней GRF.

Как также используют в настоящем описании, "увеличение активности" GRF означает увеличение биологической активности GRF, например, увеличение активности транскрипции GRF (т.е. способности GRF связывать и увеличивать транскрипцию его генов-мишеней). В одном варианте осуществления GRF представляет собой GRF4, и GRF4 действует в транскрипционном комплексе с GIF1, который связывает и стимулирует транскрипцию генов-мишеней, таких как гены, вовлеченные в метаболизм N, C и в пролиферацию клеток. Этот комплекс ингибируется посредством SLR1. SLR1 также снижает накопление GRF4 посредством ингибирования транскрипции GRF4. Таким образом, в одном варианте осуществления увеличение активности GRF, в частности

GRF4, может включать увеличение экспрессии или активности GIF1 или его ортолога и/или снижение или прекращение экспрессии или активности SLR1 или его ортолога. Таким образом, в альтернативном аспекте способ может включать внесение по меньшей мере одной мутации в ген SLR1 и/или GIF1 или его гомолог, или внесение дополнительной копии гена GIF или его гомолога, и/или снижение или увеличение активности SLR1 и GIF1, соответственно. Альтернативно способ может включать внесение и экспрессию в нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую GIF1. Авторы изобретения также показали в рамках настоящей заявки, что GA (гибберелловая кислота) стимулирует опосредуемое протеасомами разрушение SLR1. Таким образом, в одном варианте осуществления активность SLR1 может опосредоваться GA.

В одном варианте осуществления экспрессия, или уровни, или активность GRF возрастают на вплоть то или более чем 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с уровнем в растении дикого типа или контрольном растении.

Способы определения уровня экспрессии и/или активности GRF хорошо известны специалисту в данной области. В частности, увеличение можно определять любым из стандартных способов, известных специалисту в данной области. Например, увеличение экспрессии и/или содержания GRF может искажать показатель уровней белка и/или нуклеиновой кислоты, и может быть измерено любым способом, известным специалисту в данной области, таким как, но не ограничиваясь ими, любая форма гель-электрофореза или хроматографии (например, ВЭЖХ). Поскольку GRF кодирует фактор транскрипции, в одном варианте осуществления способ может включать измерение профиля транскрипции GRF (против дикого типа или контроля) с использованием способов, стандартных в данной области, таких как, но не ограничиваясь ими, РНК-seq и CHIP-seq.

В предпочтительном варианте осуществления способ не влияет на высоту растения. Таким образом, способ увеличивает по меньшей мере одно из поглощения азота, ассимиляции азота и NUE, и необязательно урожая и/или ассимиляции C, но не имеет эффекта на высоту растения. В результате способ не влияет на пользу полукарликовости, которая является характерной для GRV.

В одном варианте осуществления способ может включать внесение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в одну нуклеиновую кислоту, кодирующую GRF, и/или промотор GRF. В одном варианте осуществления способ включает внесение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в один эндогенный ген, кодирующий GRF, предпочтительно GRF4 или промотор GRF4. Альтернативно способ может включать вставку по меньшей мере одной или нескольких дополнительных копий нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид GRF или его гомолог или вариант, так чтобы указанная последовательность была функционально связана с регуляторной последовательностью.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует GRF4, как определено в SEQ ID NO: 3, или его функциональный вариант или гомолог. В следующем варианте осуществления нуклеиновая кислота содержит или состоит из

последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в SEQ ID NO: 1 или 2, или ее функционального варианта или ее функционального гомолога.

Под "промотором GRF" или "промотором GRF4" подразумевают область размером по меньшей мере 5 т.п.н., предпочтительно по меньшей мере 2,5 т.п.н., более предпочтительно по меньшей мере 1 т.п.н. выше кодона ATG GRF, предпочтительно ORF (открытая рамка считывания) GRF4. В одном варианте осуществления последовательность промотора GRF4 содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в SEQ ID No: 7 (гаплотип А) или 8 (гаплотип С), или ее функционального варианта или ее гомолога.

В описанных выше вариантах осуществления "эндогенная" нуклеиновая кислота может относиться к нативной или природной последовательности в геноме растения. В одном варианте осуществления эндогенная последовательность гена GRF4 содержит или состоит из SEQ ID NO: 1 или 2 и кодирует аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID NO: 3, или ее гомологи. Также в объем изобретения входят функциональные варианты (как определено в настоящем описании) и гомологи идентифицированных выше последовательностей. Примеры гомологов GRF4 представлены в SEQ ID NO: 4-39 и 192-201. Таким образом, в одном варианте осуществления гомолог кодирует полипептид, выбранный из SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 и 39, или гомолог содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35 и 38. В другом варианте осуществления гомолог промотора GRF содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 192-201.

Термин "вариант" или "функциональный вариант", как используют в рамках изобретения в отношении любой из SEQ ID NO: 1-201, относится к последовательности варианта гена или части последовательности гена, которая сохраняет биологическую функцию полной последовательности не варианта. Функциональный вариант также включает вариант представляющего интерес гена, который имеет изменения последовательности, которые не влияют на функцию, например, в неконсервативных остатках. Также включен вариант, который является по существу идентичным, т.е. имеет только некоторые изменения последовательности, например, в неконсервативных остатках, по сравнению с последовательностями дикого типа, как показано в настоящем описании, и является активным. Изменения последовательности нуклеиновой кислоты, которые приводят к продуцированию отличающейся аминокислоты в данном участке, которая не влияет на функциональные свойства кодируемого полипептида, хорошо известны в данной области. Например, кодон для аминокислоты аланина, гидрофобной аминокислоты, может быть заменен кодоном, кодирующим другой менее гидрофобный остаток, такой как глицин, или более гидрофобный остаток, такой как валин, лейцин или изолейцин. Аналогично, также можно ожидать, что изменения, которые приводят к замене одного отрицательно заряженного остатка другим, такие как аспарагиновая кислота на глутаминовую кислоту, или одного положительно заряженного остатка другим, такие как

лизин на аргинин, также могут обеспечивать функционально эквивалентный продукт. Также можно ожидать, что нуклеотидные изменения, которые приводят к изменению N-концевых и C-концевых частей полипептидной молекулы, изменят активность полипептида. Каждая из предложенных модификаций является стандартным навыком в данной области, также как и определение сохранения биологической активности кодируемых продуктов.

Как используют в любом из аспектов изобретения, описанных в настоящем описании, "вариант" или "функциональный вариант" обладает по меньшей мере 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере 99% общей идентичностью последовательности с не являющейся вариантом последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью.

Термин "гомолог", как используют в рамках изобретения, также обозначает промотор GRF или ортолог гена GRF из другого вида растений. Гомолог может иметь, в порядке увеличения предпочтительности, по меньшей мере 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% общую идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью соответствующей, SEQ ID NO: 3, или с последовательностями нуклеиновых кислот, показанными в SEQ ID NO: 1 или 2. В одном варианте осуществления общая идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 37%. В одном варианте осуществления общая идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, наиболее предпочтительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере 99%.

Также в объем изобретения входят функциональные варианты гомологов GRF, как определено выше.

Полипептид GRF кодирует фактор транскрипции, который характеризуется по меньшей мере консервативным доменом QLQ (глутамин, лейцин, глутамин) и доменом WRC (триптофан, аргинин и цистеин). В одном варианте осуществления гомолог или вариант также может иметь по меньшей мере один из домена WRC и QLQ. Таким образом, в одном варианте осуществления гомолог или вариант кодирует полипептид GRF4, обладающий по меньшей мере 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%,

50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общей идентичностью последовательности с аминокислотой, соответствующей SEQ ID NO: 3, и имеет по меньшей мере один из домена WRC и QLQ.

Две нуклеиновые кислоты или полипептидные последовательности называют "идентичными", если последовательность нуклеотидов или аминокислотных остатков, соответственно, в двух последовательностях является одинаковой при выравнивании на максимальное соответствие, как описано ниже. Термины "идентичный" или процентная "идентичность" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании на максимальное соответствие на протяжении окна сравнения при определении с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или посредством выравнивания вручную и визуального исследования. Когда процент идентичности последовательностей используют применительно к белкам или пептидам, является общепризнанным, что положения остатков, которые не являются идентичными, часто различаются посредством консервативных аминокислотных замен, где аминокислотные остатки заменены другими аминокислотными остатками со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность) и, таким образом, не изменяют функциональных свойств молекулы. Когда последовательности отличаются консервативными заменами, процентную идентичность последовательностей можно корректировать в сторону повышения для внесения поправки на консервативную природу замены. Средства проведения этой коррекции хорошо известны специалистам в данной области. Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости присваивают координаты подпоследовательностей, и назначают параметры программы с алгоритмом выравнивания последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию или можно назначать альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процентную идентичность последовательностей для исследуемой последовательности относительно эталонной последовательности на основе параметров программы. Неограничивающими примерами алгоритмов, которые пригодны для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0.

Подходящие гомологи можно идентифицировать посредством сравнения последовательностей и идентификации консервативных доменов. В данной области

существуют прогностические факторы, которые можно использовать для идентификации таких последовательностей. Функцию гомолога можно идентифицировать, как описано в настоящем описании, и квалифицированный специалист, таким образом, способен подтвердить функцию, например, при сверхэкспрессии в растении.

Таким образом, нуклеотидные последовательности по изобретению и описанные в настоящем описании также можно использовать для выделения соответствующих последовательностей из других организмов, в частности, других растений, например, сельскохозяйственных культур. Таким образом, способы, такие как ПЦР, гибридизация и т.п., можно использовать для идентификации таких последовательностей на основе их гомологии последовательности с последовательностями, описанными в настоящем описании. Топологию последовательностей и структуру характерных доменов также можно рассматривать при идентификации и выделении гомологов. Последовательности можно выделять, исходя из их идентичности последовательностей с целой последовательностью или с ее фрагментами. В способах гибридизации всю или часть известной нуклеотидной последовательности используют в качестве зонда, который селективно гибридизуется с другими соответствующими нуклеотидными последовательностями, присутствующими в популяции клонированных фрагментов геномной ДНК или фрагментов кДНК (т.е., геномных библиотек или библиотек кДНК) из выбранного растения. Зонды гибридизации могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды, и они могут быть мечены поддающейся обнаружению группой или любым другим поддающимся детекции маркером. Способы получения зондов для гибридизации и конструирования библиотек кДНК и геномных библиотек в основном известны в данной области и описаны в Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Library Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Гибридизацию таких последовательностей можно проводить при жестких условиях. Под "жесткими условиями" или "жесткими условиями гибридизации" подразумевают условия, в которых зонд гибридизуется с его последовательностью-мишенью в поддающейся обнаружению большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза относительно фонового уровня). Жесткие условия зависят от последовательности и различаются в различных обстоятельствах. Посредством контроля жесткости гибридизации и/или условий промывания можно идентифицировать последовательности-мишени, которые на 100% комплементарны зонду (использование гомологичного зонда). Альтернативно жесткость можно корректировать, чтобы позволить некоторое несоответствие последовательностей, чтобы определять более низкую степень сходства (использование гетерологичного зонда). Как правило, длина зонда составляет менее чем приблизительно 1000 нуклеотидов, предпочтительно менее 500 нуклеотидов.

Как правило, жесткие условия представляют собой условия, при которых концентрация соли составляет менее чем приблизительно 1,5 М ион Na, как правило,

концентрацию приблизительно от 0,01 до 1,0 М ионов Na (или других солей) при pH 7,0-8,3, и температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, более 50 нуклеотидов). Длительность гибридизации, как правило, составляет менее чем приблизительно 24 часа, обычно приблизительно 4-12 часов. Жестких условий также можно достигать добавлением дестабилизаторов, таких как формамид.

В следующем варианте осуществления вариант, как используют в рамках изобретения, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид GRF, как определено в настоящем описании, который способен гибридизоваться в жестких условиях, как определено в настоящем описании, с последовательностью нуклеиновой кислоты, как определено в SEQ ID NO: 1 или 2.

В одном варианте осуществления предусматривается способ увеличения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении, как описано в настоящем описании, причем способ включает повышение экспрессии и/или активности GRF, как описано в настоящем описании, где способ включает внесение по меньшей мере одной мутации в ген и/или промотор гена GRF, где ген GRF содержит или состоит из

a. последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, как определено в одной из SEQ ID NO:3, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 и 39; или

b. последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в одной из SEQ ID NO: 1, 2, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38 и 192-201; или

c. последовательности нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% общей идентичностью последовательности либо с (a), либо с (b); или

d. последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид GRF, как определено в настоящем описании, которая способна гибридизоваться в жестких условиях, как определено в настоящем описании, с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно любому из (a)-(c).

и где промотор GRF содержит или состоит из

e. последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в одной из SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 192-201;

f. последовательности нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере 99% общей идентичностью последовательности с (e); или

g. последовательности нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться в жестких условиях, как определено в настоящем описании, с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно любому из (e)-(f).



В одном варианте осуществления мутация, которую вносят в эндогенный ген GRF или его промотор для повышения биологической активности и/или уровней экспрессии гена или белка GRF, может быть выбрана из следующих типов мутаций:

1. "миссенс-мутация", которая представляет собой изменение последовательности нуклеиновой кислоты, которое приводит к замене аминокислоты другой аминокислотой;

2. "нонсенс-мутация" или "мутация СТОП-кодона", которая представляет собой изменение последовательности нуклеиновой кислоты, которое приводит к внесению преждевременного СТОП-кодона и, таким образом, к завершению трансляции (приводящему к укороченному белку); гены растений содержат стоп-кодоны трансляции "TGA" (UGA в РНК), "TAA" (UAA в РНК) и "TAG" (UAG в РНК); таким образом, любая нуклеотидная замена, инсерция, делеция, которая приводит к тому, что один из этих кодонов находится в зрелой транслируемой мРНК (в рамке считывания), завершит трансляцию.

3. "инсерционная мутация" одной или нескольких аминокислот вследствие присоединения одного или нескольких кодонов в кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты;

4. "делеционная мутация" одной или нескольких аминокислот вследствие удаления одного или нескольких кодонов в кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты;

5. "мутация со сдвигом рамки считывания", приводящая к последовательности нуклеиновой кислоты, транслируемой в отличающейся рамке считывания ниже мутации. Мутация со сдвигом рамки считывания может иметь различные причины, такие как инсерция, делеция или дупликация одного или нескольких нуклеотидов.

6. мутация "участка сплайсинга, которая представляет собой мутацию, которая приводит к инсерции, делеции или замене нуклеотида в участке сплайсинга.

7. "инверсная" мутация, которая представляет собой поворот последовательности нуклеиновой кислоты на сто восемьдесят градусов.

Однако наиболее предпочтительно мутация представляет собой замену, т.е. замену одного основания другим, отличающимся основанием.

Такой измененный полипептид GRF может приводить к доминантному или полудоминантному аллелю с приобретением функции, как определено в настоящем описании.

Мутация в эндогенном гене может включать по меньшей мере одну мутацию в любом из следующих участков: кодирующая область гена GRF, предпочтительно экзона 3; участок связывания микро-РНК (мкРНК), предпочтительно участок связывания miR396; интронная последовательность, предпочтительно интрон 2 и/или интрон 3; и/или участок сплайсинга, 5'-UTR, 3'-UTR, сигнал терминации, акцепторный участок связывания или участок связывания рибосомы.

В одном примере участок связывания или распознавания miR396 содержит или состоит из следующей последовательности или ее варианта, как определено в настоящем описании:

CCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAA: SEQ ID NO: 45

Предпочтительно мутация представляет собой любую мутацию, которая препятствует расщеплению последовательности посредством микроРНК и, таким образом, ее последующей деградации. Это приводит к повышению уровней как мРНК, так и белка GRF. В одном варианте осуществления мутация представляет собой замену.

В конкретном варианте осуществления мутация представляет собой одну или обе из следующих:

- Т на А в положении 4 SEQ ID NO: 45 или гомологичном ему положении;
- С на А в положении 5 SEQ ID NO: 45 или гомологичном ему положении.

В дополнительном или альтернативном варианте осуществления мутация находится в интроне 2 и/или интроне 3 и представляет собой по меньшей мере одну из следующих:

- А на G в положении 724 или 725 SEQ ID NO: 1 или гомологичном ему положении;
- Т на С в положении 1672 SEQ ID NO: 1 или гомологичном ему положении.

Альтернативно или в дополнение по меньшей мере к одной из описанных выше мутаций в эндогенном гене, мутация находится в промоторе GRF. Предпочтительно указанная мутация представляет собой любую мутацию, которая повышает экспрессию GRF. В одном примере мутация представляет собой по меньшей мере одну или любую комбинацию из следующих мутаций. Первые положения представляют собой положения в промоторе гаплотипа А (например, промотор, который содержит или состоит из SEQ ID NO: 7 или его варианта). Последние положения представляют собой положения в промоторе гаплотипа С (например, промотор, который содержит или состоит из SEQ ID NO: 8 или его варианта).

- замена С на Т в положении -941 или -935 от иницирующего кодона GRF или в положении 60 SEQ ID NO: 7 или положении 66 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замена Т на А в положении -884 или положении -878 от иницирующего кодона GRF, или в положении 118 SEQ ID NO: 7 или в положении 124 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замена С на Т в положении -855 или -849 от иницирующего кодона GRF или в положении 148 SEQ ID NO: 7 или в положении 154 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замена С на Т в положении -847 или -841 от иницирующего кодона GRF или в положении 157 SEQ ID NO: 7 или положении 163 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замена С на Т в положении -801 или -795 от иницирующего кодона GRF или в положении 204 SEQ ID NO: 7 или в положении 210 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замена С на Т в положении -522 или -516 от иницирующего кодона GRF или в

положении 484 SEQ ID NO: 7 или в положении 489 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замена G на C в положении -157 от иницирующего кодона GRF или в положении 850 SEQ ID NO: 7 или в положении 516 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

В одном варианте осуществления мутация представляет собой

- замену T на A в положении -884 или в положении -878 от иницирующего кодона GRF, или в положении 118 SEQ ID NO: 7, или в положении 124 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении; и

- замену C на T в положении -847 или -841 от иницирующего кодона GRF, или в положении 157 SEQ ID NO: 7, или в положении 163 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замену C на T в положении -801 или -795 от иницирующего кодона GRF, или в положении 204 SEQ ID NO: 7, или в положении 210 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении.

Промотор GRF, содержащий все три из описанных выше полиморфизмов, может быть известен как гаплотип В.

В одном варианте осуществления промотор GRF содержит по меньшей мере одну из следующих последовательностей и способ включает внесение по меньшей мере одной мутации, предпочтительно по меньшей мере одной замены, по меньшей мере в одну из этих последовательностей:

- САААСТ
- ТТСТАА
- СТААТТ
- АТАСАА
- ТТАСАГ
- АСАТАС
- АСТТАС
- ТААТТТ

В одном примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 192 и мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, по меньшей мере в одной из следующих последовательностей, присутствующих в SEQ ID NO: 192:

- САААСТ
- ТТСТАА
- СТААТТ

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 193 и мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, по меньшей мере в одной из следующих последовательностей, присутствующих в SEQ ID NO: 193:

- АТАСАА

- TTCTAA

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 194 и мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, по меньшей мере в одной из следующих последовательностей, присутствующих в SEQ ID NO: 194:

- СТААТТ

- АТАСАА

- TTCTAA

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 195 мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, в следующей последовательности, присутствующей в SEQ ID NO: 195:

- TTCTAA

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 196 и мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, в следующей последовательности, присутствующей в SEQ ID NO: 196:

- АТАСАА

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 197 и мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, в следующей последовательности, присутствующей в SEQ ID NO: 197:

- TTCATAA

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 198 мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, по меньшей мере в одной из следующих последовательностей, присутствующих в SEQ ID NO: 198:

- СТААТТ

- АТАСАА

- TTACAG

- TTCTAA

- САААСТ

- АСАТАС

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 199 мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, по меньшей мере в одной из следующих последовательностей, присутствующих в SEQ ID NO: 199:

- АСАТАС

- TTCTAA

- АСТТАС

- ATACAA

- CAAACT

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 200 мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, по меньшей мере в одной из следующих последовательностей, присутствующих в SEQ ID NO: 200:

- TTCTAA

- СТААТТ

- АСТТАС

- TTACAG

- ТААТТТ

В другом примере промотор GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 201 мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, предпочтительно по меньшей мере одну замену, по меньшей мере в одной из следующих последовательностей, присутствующих в SEQ ID NO: 201:

- АСАТАС

- CAAACT

- ATACAA

- TTCTAA

- СТААТТ

Под "по меньшей мере одной мутацией" подразумевают, что, когда ген GRF присутствует в качестве более чем одной копии или гомолога (с той же самой или несколько отличающейся последовательностью), существует по меньшей мере одна мутация по меньшей мере в одном гене. Предпочтительно все гены являются мутантными.

В одном варианте осуществления мутацию вносят с использованием направленного редактирования генома. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу и растению, которое получено способами генной инженерии, как описано выше, и не охватывает встречающиеся в природе сорта или получение растений традиционными способами селекции.

Направленная модификация генома или направленное редактирование генома представляет собой способ инженерии генома, в котором используются направленные двухцепочечные разрывы (DSB) ДНК для стимуляции редактирования генома посредством событий рекомбинации, опосредуемых гомологичной рекомбинацией (HR). Для достижения эффективного редактирования генома посредством внесения сайт-специфических DSB ДНК можно использовать четыре основных класса приспособляемых ДНК-связывающих белков: мегануклеазы, происходящие из микробных подвижных генетических элементов, ZF-нуклеазы на основе эукариотических факторов транскрипции, подобные активаторам транскрипции эффекторы (TALE) из бактерий *Xanthomonas*, и РНК-направляемая ДНК-эндонуклеаза Cas9 из CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные кластерами) бактериальной

адаптивной иммунной системы типа II. Все из мегануклеаз, белков ZF и TALE распознают специфические последовательности ДНК посредством взаимодействий белок-ДНК. В то время как мегануклеазы сочетают в себе нуклеазу и ДНК-связывающие домены, белки ZF и TALE состоит из индивидуальных модулей, нацеливающих на 3 или 1 нуклеотид (нт) ДНК, соответственно. ZF и TALE могут быть собраны в желаемых комбинациях и связаны с нуклеазным доменом FokI для направления нуклеолитической активности на определенные геномные локусы.

При доставке в клетки-хозяева посредством бактериальной системы секреции типа III, эффекторы TAL проникают в ядро, связываются с эффектор-специфическими последовательностями в промоторах генов-хозяев и активируют транскрипцию. Их специфичность нацеливания определяется центральным доменом тандема, повторами из 33-35 аминокислот. После него следует один укороченный повтор из 20 аминокислот. Большинство исследованных встречающихся в природе эффекторов TAL имеют от 12 до 27 полных повторов.

Эти повторы отличаются друг от друга только двумя соседними аминокислотами, их повторяющийся вариабельный двойной остаток (RVD). RVD определяет какой единичный нуклеотид будет распознаваться эффектором TAL: один RVD соответствует одному нуклеотиду, причем каждый из четырех наиболее распространенных RVD предпочтительно ассоциирован с от одного до четырех оснований. Встречающиеся в природе участки распознавания однотипно предшествуются T, который требуется для активности эффектора TAL. Эффекторы TAL могут быть слиты с каталитическим доменом нуклеазы FokI с образованием нуклеазы эффектора TAL (TALEN), которая вносит направленные двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) *in vivo* для редактирования геном. Использование этой технологии в редактировании генома хорошо описано в данной области, например, в US 8440431, US 8440432 и US 8450471. Cermak T et al. описывают набор специализированных плазмид, которые можно использовать в способе клонирования Golden Gate для сборки множества фрагментов ДНК. Как описано в этом источнике литературы, в способе Golden Gate используются эндонуклеазы рестрикции типа III, которые осуществляют расщепление вне их участков распознавания, создавая уникальные выступающие концы из 4 п.н. Клонированию способствует расщепление и лигирование в одной и той же реакционной смеси, поскольку правильная сборка устраняет участок распознавания ферментом. Сборка специализированной эффекторной конструкции TALEN или TAL вовлекает две стадии: (i) сборка повторяющихся модулей в промежуточные наборы из 1-10 повторов и (ii) соединение промежуточных наборов в остов с образованием конечной конструкции. Таким образом, с использованием способов, известных в данной области, является возможным конструирование эффектора TAL, который нацелен на ген или промоторную последовательность GRF, как описано в настоящем описании.

Другим способом редактирования генома, который можно использовать в соответствии с различными аспектами изобретения, является CRISPR. Использование

этой технологии в редактировании генома хорошо описано в данной области, например, в US 8697359 и ссылках, цитированных в нем. В кратком изложении, CRISPR представляет собой микробную нуклеазную систему, вовлеченную в защиту против вторгающихся фагов и плазмид. Локусы CRISPR в микробных хозяевах содержат комбинацию CRISPR-ассоциированных (Cas) генов, а также некодирующих элементов РНК, способных программировать специфичность CRISPR-опосредуемого расщепления нуклеиновых кислот (огРНК). Было идентифицировано три типа (I-III) систем CRISPR среди широкого диапазона бактериальных хозяев. Одним ключевым признаком каждого локуса CRISPR является присутствие набора повторяющихся последовательностей (прямых повторов), между которыми находятся короткие участки не повторяющихся последовательностей (спейсеров). Некодирующий набор CRISPR транскрибируется и расщепляется в прямых повторах на короткие cr-РНК, содержащие индивидуальные спейсерные последовательности, которые направляют нуклеазы Cas на участок-мишень (протоспейсер). CRISPR типа II является одной из наиболее хорошо охарактеризованных системы, и она осуществляет направленное внесение двухцепочечных разрывов ДНК за четыре последовательных стадии. Сначала набор из двух некодирующих РНК, пре-cr-РНК и tracr-РНК, транскрибируется с локуса CRISPR. Затем tracr-РНК гибридизуется с повторяющимися областями пре-cr-РНК и опосредует процессинг пре-cr-РНК в зрелые cr-РНК, содержащие индивидуальные спейсерные последовательности. На третьем этапе зрелый комплекс cr-РНК:tracr-РНК направляет Cas9 на ДНК-мишень посредством образования пар Уотсона-Крика между спейсером на cr-РНК и протоспейсером на ДНК-мишени рядом с соседним с протоспейсером мотивом (PAM), что является дополнительным требованием для распознавания мишени. Наконец, Cas9 опосредует расщепление ДНК-мишени, внося двухцепочечный разрыв в протоспейсере.

Одним значительным преимуществом системы CRISPR-Cas9 по сравнению с общепринятым нацеливанием на ген и другими программируемыми эндонуклеазами является простота мультиплексирования, где в множество генов можно одновременно вносить мутацию просто с использованием множества огРНК, каждая из которых нацелена на отличающийся ген. Кроме того, когда используют огРНК, фланкирующие геномную область, промежуточный фрагмент может быть удаляться или инвертироваться (Wiles et al., 2015).

Таким образом, Cas9 является характерным белком системы CRISPR-Cas типа II, и он представляет собой крупную мономерную ДНК-нуклеазу, направляемую к последовательности ДНК-мишени, соседней с последовательностью PAM (смежный с протоспейсером мотив) посредством комплекса из двух некодирующих РНК: РНК CRISPR (cr-РНК) и транскрибирующей cr-РНК (tracr-РНК). Белок Cas9 содержит два нуклеазных домена, гомологичных нуклеазам RuvC и HNH. Нуклеазный домен HNH расщепляет комплементарную цепь ДНК, в то время как RuvC-подобный домен расщепляет некомплементарную цепь и в результате в ДНК-мишень вносится тупой разрыв. Гетерологичная экспрессия Cas9 вместе с огРНК может вносить сайт-

специфические двухцепочечные разрывы (DSB) в геномную ДНК живых клеток из различных организмов. Для применений в эукариотических организмах используют кодон-оптимизированные версии Cas9, которые первоначально происходят из бактерий *Streptococcus pyogenes*.

Одиночная гидовая РНК (огРНК) является вторым компонентом системы CRISPR/Cas, который образует комплекс с нуклеазой Cas9. огРНК представляет собой синтетическую химеру РНК, образуемую путем слияния cr-РНК с tracr-РНК. Гидовая последовательность огРНК, находящаяся на ее 5'-конце, обеспечивает специфичность ДНК-мишени. Таким образом, посредством модификации гидовой последовательности возможно создать огРНК с различной специфичностью к мишени. Каноническая длина гидовой последовательности составляет 20 п.н. В растениях огРНК экспрессируются с использованием промоторов РНК-полимеразы III растений, таких как U6 и U3. Таким образом, с использованием способов, известных в данной области, возможно сконструировать молекулы огРНК, которые нацелены на ген GRF или его промоторную последовательность, как описано в настоящем описании.

В одном варианте осуществления в способе используются конструкции огРНК (и матричная или донорная ДНК), подробно определенные ниже, для направленного внесения SNP или мутации, в частности, одной из замен, описанных в настоящем описании, в ген GRF и/или его промотор. Как объяснено ниже, введение матричной цепи ДНК, за которым следует опосредуемый огРНК разрыв в двухцепочечной ДНК, можно использовать для внесения конкретной направленной мутации (т.е. SNP) в ген с использованием направляемой гомологией репарации. В альтернативном варианте осуществления по меньшей мере одну мутацию можно вносить в ген GRF и/или его промотор, в частности, в положениях, описанных выше, с использованием любого способа CRISPR, известного специалисту в данной области. В другом примере огРНК (например, как описано в настоящем описании) можно использовать с модифицированным белком Cas9, таким как никаза Cas9 или nCas9 или "мертвая" Cas9 (dCas9), слитым с "Редактором оснований", таким как фермент, например дезаминаза, такая как цитидиндезаминаза, или TadA (трРНК-аденозиндезаминаза) или ADAR или APOBEC. Эти ферменты способны заместить одно основание другим. В результате делеции в ДНК не происходит, однако вносится единичная замена (Kim et al., 2017; Gaudelli et al. 2017).

В одном примере мутацию вносят в участок связывания мкРНК396 с использованием следующих последовательностей огРНК и последовательностей нуклеиновых кислот донорной ДНК, как описано в настоящем описании:

Таблица 1: Конструкции CRISPR для внесения мутации ТС на АА в участке распознавания мкРНК396.

Культура	Нуклеиновая кислота огРНК	Последовательность донорной ДНК
----------	------------------------------	------------------------------------



	(SEQ ID NO)	(SEQ ID NO)
Рис	51 и/или 54	48
Кукуруза	116 и/или 119	113
Кукуруза	124 и/или 127	121
Пшеница	132 и/или 135	129
Пшеница	140 и/или 143	137
Пшеница	148 и/или 151	145
Ячмень	156 и/или 159	153
Сорго	164 и/или 167	161
Соя	172 и/или 175	169
V.Napus	180 и/или 183	177
Томат	188 и/или 191	185

В другом примере по меньшей мере одну мутацию вносят по меньшей мере в одно положение в промоторе GRF с использованием следующих последовательностей оgРНК и последовательностей донорной нуклеиновой кислоты ДНК, как описано в настоящем описании:

Таблица 2: Конструкции CRISPR для внесения мутаций в промотор OsGRF4

<b>Положение (относительно иницирующего ATG GRF4)</b>	<b>SNP кодона</b>	<b>Нуклеиновая кислота оgРНК (SEQ ID NO)</b>	<b>Последовательность донорной ДНК (SEQ ID NO)</b>
-884 (Т на А)		59 и/или 62	56
-847 (С на Т)		67 и/или 70	64
-801 (С на Т)		75 и/или 78	72
-884 и -847 (ТС на АТ)		83 и/или 87	80
-884 и -801 (ТС на АТ)		92 и/или 95	89
-884, -847 и -801(ТСС на АТТ)		100 и/или 103	97
-847 и -801 (СС на ТТ)		108 и/или 111	105

Плазмиды, экспрессирующие Cas9, для применения в способах по изобретению, можно конструировать, как описано в литературе уровня техники.

После проведения направленного редактирования генома можно использовать методики быстрого высокопроизводительного скрининга для анализа продуктов амплификации в отношении присутствия мутации в гене GRF и/или его промоторе, и, в частности, в положениях, описанных выше. После идентификации мутации в представляющем интерес гене семена растения M2, содержащие эту мутацию,

выращивают во взрослые растения M3 и подвергают скринингу в отношении фенотипических характеристик, ассоциированных с геном-мишенью GRF4. Таким образом, можно идентифицировать мутантов с увеличенной экспрессией или уровнями GRF, и в результате увеличенным метаболизмом азота по сравнению с контролем.

Растения, полученные или получаемые таким способом, которые содержат функциональную мутацию в эндогенном гене GRF или его промоторном локусе, также входят в объем изобретения.

В альтернативном аспекте изобретения способ включает введение и экспрессию в растении конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеиновую кислоту GRF. Предпочтительно, нуклеиновая кислота GRF функционально связана с регуляторной последовательностью.

В соответствии со всеми аспектами изобретения, включая способ, описанный выше, и включая растения, способы и применения, как описано ниже, термин "регуляторная последовательность" используют в настоящем описании взаимозаменяемо с термином "промотор" и все термины также следует понимать в широком контексте как относящиеся к регуляторным последовательностям нуклеиновых кислот, способным обеспечивать экспрессию последовательностей, с которыми они лигированы. Термин "регуляторная последовательность" также охватывает синтетическую слитую молекулу или производное, которые обеспечивают, активируют или усиливают экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в клетке, ткани или органе.

В одном варианте осуществления промотор может представлять собой конститутивный или сильный промотор.

"Конститутивный промотор" относится к промотору, который является транскрипционно активным в ходе большинства, но не обязательно всех, фаз роста и развития и в большинстве условий окружающей среды, по меньшей мере в одной клетке, ткани или органе. Примеры конститутивных промоторов включают промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV35S или 19S), промотор актина риса, промотор убиквитина кукурузы, малую субъединицу рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксылазы/оксигеназы, промотор гистона H3 кукурузы или люцерны, промотор OCS, SAD1 или 2, GOS2 или любой промотор, который обеспечивает усиленную экспрессию.

"Сильный промотор" относится к промотору, который обеспечивает увеличенную экспрессию или сверхэкспрессию гена. Примеры сильных промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор CaMV-35S, CaMV-35Somega, UBQ1 убиквитина арабидопсиса, убиквитина риса, актина или алкогольдегидрогеназы 1 кукурузы (Adh-1).

Альтернативно промотор может представлять собой промотор GRF4, предпочтительно промотор гаплотипа В. В одном варианте осуществления промотор гаплотипа В содержит или состоит из последовательности, как определено в SEQ ID NO: 9, или ее функционального варианта.

Термин "функционально связанный", как используют в рамках изобретения,

относится к функциональной связи между промоторной последовательностью и представляющим интерес геном, так что промоторная последовательность способна инициировать транскрипцию представляющего интерес гена.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота GRF кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или 6, или их функционального варианта или гомолога, как определено выше. Более предпочтительно, нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5 или их функционального варианта или гомолога, как определено выше.

В одном варианте осуществления растение-потомок стабильно трансформировано конструкцией нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании, и содержит экзогенный полинуклеотид, который наследственным образом сохраняется в клетке растения. Способ может включать стадии подтверждения того, что конструкция является стабильно встроенной. Способ может включать дополнительную стадию сбора семян выбранного растения-потомка.

В следующем варианте осуществления способ может дополнительно включать по меньшей мере одну или несколько стадий оценки фенотипа трансгенно или генетически измененного растения, в частности, измерение или оценку повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и/или урожая, где предпочтительно указанное повышение происходит относительно контрольного растения или растения дикого типа.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота и регуляторная последовательность происходят из одного семейства растений. В другом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты и регуляторная последовательность происходят из различных семейств, родов или видов растений.

В следующем варианте осуществления описанных выше способов, способ повышает поглощение азота, и/или ассимиляцию азота, и/или эффективность использования азота, и/или урожай в условиях низкого поступления N (например, 180 кг N/га или ниже, предпочтительно от 180 до 120 кг N/га, и еще более предпочтительно 120 кг N/га или ниже). Таким образом, в одном варианте осуществления способ повышает поглощение азота, и/или ассимиляцию азота, и/или эффективность использования азота, и/или урожай в условиях азотного стресса. В другом варианте осуществления способ повышает поглощение азота, и/или ассимиляцию азота, и/или эффективность использования азота, и/или урожай в условиях нормального (например, 210 кг/N га) или высокого поступления N (выше 300 кг/N га).

#### **Генетически измененные или модифицированные растения и способы получения таких растений**

В другом аспекте изобретения предусматривается генетически измененное растение, его часть или клетка растения, характеризующиеся тем, что растение имеет увеличенную экспрессию или активность нуклеиновой кислоты или полипептида GRF по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением. Более предпочтительно,

растение также характеризуется увеличением по меньшей мере одного из поглощения азота, ассимиляции азота и NUE в растении. Еще более предпочтительно, растение дополнительно характеризуется увеличением урожая. Растение, дополнительно или альтернативно, может характеризоваться увеличением ассимиляции C.

В одном варианте осуществления растение содержит по меньшей мере одну мутацию в гене GRF и/или его промоторе. Предпочтительно, мутация представляет собой замену и еще более предпочтительно мутация представляет собой одну из мутаций, описанных выше. В следующем варианте осуществления мутация внесена с использованием направленного редактирования генома, вновь как описано выше.

В другом варианте осуществления растение экспрессирует полинуклеотид, "экзогенный" для индивидуального растения, т.е. полинуклеотид, который введен в растение любым способом, отличным от полового скрещивания. Примеры способов, посредством которого этого можно достигать, описаны ниже. В одном варианте осуществления способа экзогенная нуклеиновая кислота экспрессируется в растении, которая представляет собой конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептидную последовательность, как определено в SEQ ID NO: 3, или ее гомолог или функциональный вариант, и которая не является эндогенной для указанного растения, но происходит из другого вида растения. Например, конструкция OsGRF4 может экспрессироваться в другом растении, которое не является рисом. Альтернативно эндогенная конструкция нуклеиновой кислоты экспрессируется в трансгенном растении. Например, конструкция OsGRF4 может экспрессироваться в рисе. Таким образом, в одном варианте осуществления растение экспрессирует нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептидную последовательность, как определено в SEQ ID NO: 3, или ее гомолог или функциональный вариант. В любом из этих вариантов осуществления растение представляет собой трансгенное растение.

В другом аспекте изобретения предусматривается способ получения трансгенного растения, отличающийся тем, что растение демонстрирует увеличение поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно, кроме того, повышение урожая и/или ассимиляции C, как описано в настоящем описании. Предпочтительно, способ включает введение и экспрессию конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, как определено в SEQ ID NO: 3, или его гомолог или функциональный вариант, в растении или клетке растения. В одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в SEQ ID NO: 1 или 2, или ее гомолога или функционального варианта.

Способы трансформации для получения трансгенного растения по изобретению известны в данной области. Таким образом, в соответствии с различными аспектами изобретения, конструкцию нуклеиновой кислоты, как определено в настоящем описании, вводят в растения и экспрессируют в качестве трансгена. Конструкцию нуклеиновой

кислоты вводят в указанное растение посредством процесса, называемого трансформацией. Термины "введение" или "трансформация", упоминаемые в настоящем описании, охватывают перенос экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяина независимо от способа, используемого для переноса. Ткань растения, способная к последующему клональному размножению, как посредством органогенеза, так и посредством эмбриогенеза, может быть трансформирована генетической конструкцией по настоящему изобретению, и из нее может быть регенерировано целое растение. Конкретная выбранная ткань может варьироваться в зависимости от систем клонального размножения, доступных или наиболее пригодных для конкретного подвергаемого трансформации вида. Иллюстративные ткани-мишени включают листовые диски, пыльцу, зародыши, семядоли, гипокотили, макрогаметофиты, каллюсную ткань, существующую меристематическую ткань (например, апикальная меристема, пазушная почка и корневые меристемы), и индуцированную меристематическую ткань (например, меристема семядоли и меристема гипокотыля). Полинуклеотид можно временно или стабильно вводить в клетку-хозяина, и он может оставаться не встроенным, например, в качестве плазмиды. Альтернативно он может встраиваться в геном хозяина. Затем полученную трансформированную клетку растения можно использовать для регенерации трансформированного растения способом, известным специалисту в данной области.

Трансформация растений в настоящее время является рутинной технологией для многих видов. Преимущественно любой из нескольких способов трансформации можно использовать для внесения представляющего интерес гена в подходящую клетку-предшественника. Способы, описанные для трансформации и регенерации растений из тканей растения или клеток растений, можно использовать для временной или для стабильной трансформации. Способы трансформации включают использование липосом, электропорацию, химические вещества, которые повышают поглощение свободной ДНК, инъекцию ДНК прямо в растение, бомбардировку из генной пушки, трансформацию с использованием вирусов или пыльцы и микроинъекцию. Способы могут быть выбраны из способа с кальцием/полиэтиленгликолем для протопластов, электропорации протопластов, микроинъекции в материал растений, бомбардировки покрытыми ДНК или РНК частицами, инфицирования (неинтегративными) вирусами и т.п. Трансгенные растения, включая трансгенные культурные растения, предпочтительно получают посредством опосредуемой *Agrobacterium tumefaciens* трансформации.

Для селекции трансформированных растений растительный материал, полученный при трансформации, подвергают условиям селекции, так чтобы трансформированные растения можно было отличить от нетрансформированных растений. Например, семена, полученные описанным выше образом, можно сеять и после первоначального периода проращивания подвергать подходящей селекции путем опрыскивания. Следующей возможностью является выращивание семян, в подходящих случаях после стерилизации, на чашках с агаром с использованием подходящего селективного агента, так что только трансформированные семена могут вырасти в растения. Альтернативно

трансформированные растения подвергают скринингу в отношении присутствия селективного маркера. После переноса ДНК и регенерации, предположительно трансформированные растения также можно оценивать, например с использованием саузерн-блоттинга, в отношении присутствия представляющего интерес гена, количества копий и/или геномной организации. Альтернативно или дополнительно, мониторинг уровней экспрессии вновь введенной ДНК можно проводить с использованием нозерн-блоттинга и/или вестерн-блоттинга, оба из которых хорошо известны специалистам в данной области.

Полученные трансформированные растения можно размножать различными способами, такими как клональное размножение или способы классического разведения. Например, трансформированное растение первого поколения (или T1) можно подвергать самоопылению и отбирать гомозиготные трансформанты второго поколения (или T2), а затем растения T2 можно далее размножать посредством классических способов разведения. Полученные трансформированные организмы могут иметь различные формы. Например, они могут представлять собой химеры трансформированных клеток и нетрансформированных клеток; клональные трансформанты (например, все клетки, трансформированные так, чтобы они содержали экспрессирующую кассету); привитые части трансформированных и нетрансформированных тканей (например, в растениях трансформированная корневая система, привитая к нетрансформированному черенку).

Кроме того, способ может включать регенерацию трансгенного растения из растения или клетки растения, где трансгенное растение содержит в его геноме последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 1 или 2, или нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок GRF, как определено в SEQ ID NO: 3, и получение растения-потомка, происходящего из трансгенного растения, где указанный потомок демонстрирует по меньшей мере одной из повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно дополнительно повышение урожая и/или ассимиляции С.

В другом аспекте изобретения предусматривается способ получения генетически измененного растения, как описано в настоящем описании. В одном варианте осуществления способ включает внесение по меньшей мере одной мутации в ген GRF и/или промотор GRF предпочтительно по меньшей мере одной клетки растения с использованием любого способа мутагенеза, описанного в настоящем описании. Предпочтительно указанный способ дополнительно включает регенерацию растения из мутантной клетки растения.

Кроме того, способ может включать селекцию одного или нескольких мутантных растений, предпочтительно для дальнейшего размножения. Предпочтительно указанные отобранные растения содержат по меньшей мере одну мутацию в гене GRF и/или промоторной последовательности. В одном варианте осуществления указанные растения характеризуются повышенными уровнями экспрессии GRF и/или повышенными уровнями активности полипептида GRF. Уровни экспрессии и/или активности GRF можно

определять любым стандартным способом, известным специалисту в данной области. Увеличение является таким, как описано в настоящем описании.

Отобранные растения можно размножить различными способами, например, способами клонального размножения или классического разведения. Например, трансформированное растение первого поколения (или T1) можно подвергать самоопылению и отбирать гомозиготные трансформанты второго поколения (или T2), а затем растения T2 можно далее размножить классическими способами разведения. Полученные трансформированные организмы могут иметь различные формы. Например, они могут представлять собой химеры трансформированных клеток и нетрансформированных клеток; клональные трансформанты (например, все клетки, трансформированные для того, чтобы они содержали экспрессирующую кассету); привитые части трансформированных и нетрансформированных тканей (например, в растениях трансформированная корневая система, привитая к нетрансформированному черенку).

В следующем варианте осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, способ может дополнительно включать по меньшей мере одну или несколько из стадий оценки фенотипа трансгенного или генетически измененного растения, количественное определение по меньшей мере одного из увеличения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно, кроме того, урожая и/или ассимиляции C и сравнение указанного фенотипа для определения увеличения по меньшей мере одного из поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно, кроме того, урожая и/или ассимиляции C в растении дикого типа или в контрольном растении. Иными словами, способ может вовлекать стадию скрининга растений в отношении желаемого фенотипа.

В следующем аспекте изобретения предусматривается растение, полученное или получаемое описанными выше способами.

### **Конструкции для редактирования генома для применения со способами направленной модификации генома**

Под "cr-РНК" или CRISPR-РНК подразумевают последовательность РНК, которая содержит протоспейсерный элемент и дополнительные нуклеотиды, комплементарные tracr-РНК.

Под "tracr-РНК" (трансактивирующая РНК) подразумевают последовательность РНК, которая гибридизуется с cr-РНК и связывает фермент CRISPR, такой как Cas9, тем самым активируя нуклеазный комплекс для внесения двухцепочечных разрывов в конкретные участки в геномной последовательности по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты GRF1 или промоторной последовательности.

Под "протоспейсерным элементом" подразумевают часть cr-РНК (или ogРНК), которая комплементарна последовательности геномной ДНК-мишени, обычно длиной приблизительно 20 нуклеотидов. Он может быть известен как спейсерная или

нацеливающая последовательность.

Под "донорной последовательностью" подразумевают последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит все необходимые элементы для внесения конкретной замены в последовательность-мишень, предпочтительно с использованием направляемой гомологией репарации или HDR. В одном варианте осуществления донорная последовательность содержит последовательность матрицы репарации для внесения по меньшей мере одного SNP. Предпочтительно последовательность матрицы репарации фланкирована по меньшей мере одним, предпочтительно левым и правым плечом, более предпочтительно приблизительно 100 п.н. каждый, которые идентичны последовательности-мишени. Более предпочтительно плечо или плечи дополнительно фланкированы двумя последовательностями-мишенями гРНК, которые содержат мотивы PAM, так что донорная последовательность может высвободиться посредством Cas9/гРНК.

Под "огРНК" (одиночная гидовая РНК) подразумевают комбинацию tracr-РНК и cr-РНК в одной молекуле РНК, предпочтительно также включающую линкерную петлю (которая связывает tracr-РНК и cr-РНК в одну молекулу). "огРНК" также может быть обозначена как "гРНК" и в контексте настоящего изобретения эти термины являются взаимозаменяемыми. огРНК или гРНК обеспечивают как специфичность нацеливания, так и способность к посадке/связывания для нуклеазы Cas. гРНК может относиться к двойной молекуле РНК, содержащей молекулу cr-РНК и молекулу tracr-РНК.

Под "эффектором TAL" (подобный активатору транскрипции (TAL) эффектор) или TALE подразумевают белковую последовательность, которая может связывать последовательность геномной ДНК-мишени (последовательность в гене GRF1 или его промоторе) и которая может быть слита с доменом расщепления эндонуклеазы, такой как FokI, с образованием эффекторных нуклеаз TAL, или TALEN, или мегануклеаз, с образованием мега-TAL. Белок TALE состоит из центрального домена, который ответственен за связывание ДНК, сигнала ядерной локализации и домена, который активирует транскрипцию гена-мишени. ДНК-связывающий домен состоит из мономеров, и каждый мономер может связывать один нуклеотид в нуклеотидной последовательности-мишени. Мономеры представляют собой тандемные повторы из 33-35 аминокислот, две из которых, находящиеся в положениях 12 и 13, являются в высокой степени вариабельными (вариабельный двойной остаток, RVD). Именно RVD ответственны за распознавание единичного специфического нуклеотида. HD нацелен на цитозин; NI нацелен на аденин, NG нацелен на тимин и NN нацелен на гуанин (хотя NN также может связываться с аденином с более низкой специфичностью).

В другом аспекте изобретения предусматривается конструкция нуклеиновой кислоты, где конструкция нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере один ДНК-связывающий домен, где ДНК-связывающий домен может связываться с последовательностью в гене GRF, где указанная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 49, 52, 57, 60, 65, 68, 73, 76, 81, 85, 90, 93, 98, 101, 106, 109, 114, 117, 122, 125, 130,



133, 138, 141, 146, 149, 154, 157, 162, 165, 170, 173, 178, 181, 186 и 189. В одном варианте осуществления указанная конструкция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность-специфическую нуклеазу (SSN), такую как белок FokI или Cas.

В одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере один протоспейсерный элемент, где последовательность протоспейсерного элемента выбрана из SEQ ID No: 50, 53, 58, 61, 66, 69, 74, 77, 82, 86, 91, 94, 99, 102, 107, 110, 115, 118, 123, 126, 131, 134, 139, 142, 147, 150, 155, 158, 163, 166, 171, 174, 179, 182, 187 и 190 или ее варианта.

В следующем варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую cr-РНК. Как определено выше, последовательность cr-РНК может содержать протоспейсерные элементы, как определено выше, и предпочтительно дополнительные нуклеотиды, которые комплементарны tracr-РНК. Подходящая последовательность для дополнительных нуклеотидов известна специалисту в данной области, поскольку она определяется выбором белка Cas.

В другом варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность tracr-РНК. Вновь, подходящая последовательность tracr-РНК будет известна специалисту в данной области, поскольку эта последовательность определяется выбором белка Cas. Тем не менее, в одном варианте осуществления указанная последовательность содержит или состоит из последовательности, как определено в SEQ ID NO: 46, или ее варианта.

В следующем варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует ogРНК (или гРНК). Вновь, как уже обсуждалось, ogРНК, как правило, содержит последовательность cr-РНК, последовательность tracr-РНК и предпочтительно последовательность линкерной петли. В предпочтительном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность ogРНК, как определено в любой из SEQ ID NO: 51, 54, 59, 62, 67, 70, 75, 78, 83, 87, 92, 95, 100, 103, 108, 111, 116, 119, 124, 127, 132, 135, 140, 143, 148, 151, 156, 159, 164, 167, 172, 175, 180, 183, 188 и 191, или ее вариант.

В следующем варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок расщепления эндорибонуклеазой. Предпочтительно эндорибонуклеаза представляет собой Csy4 (также известную как Cas6f). Когда конструкция нуклеиновой кислоты содержит множество последовательностей нуклеиновых кислот ogРНК, конструкция может содержать одно и то же количество участков расщепления эндорибонуклеазой. В другом варианте осуществления участок расщепления находится с 5'-стороны от последовательности нуклеиновой кислоты ogРНК. Таким образом, каждая последовательность нуклеиновой кислоты ogРНК фланкируется

участком расщепления эндорибонуклеазой.

Термин "вариант" относится к нуклеотидной последовательности, где нуклеотиды являются по существу идентичными одной из описанных выше последовательностей. Вариант может быть достигнут посредством модификаций, таких как инсерция, замена или делеция одного или нескольких нуклеотидов. В предпочтительном варианте осуществления вариант обладает по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичностью с любой из описанных выше последовательностей. В одном варианте осуществления идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления идентичность последовательности составляет 100%. Идентичность последовательностей может быть определена с помощью любой из известных программ выравнивания последовательностей, известных в данной области.

Изобретение также относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, функционально связанную с подходящим промотором растений. Подходящий промотор растений может представлять собой конститутивный или сильный промотор, или может представлять собой тканеспецифический промотор. В одном варианте осуществления подходящие промоторы растений выбраны из, но не ограничиваясь ими, промотора вируса курчавости желтых листьев цеструма (CmYLCV) или промотора убиквитина 1 проса (PvUbi1), промотора U6 РНК-полимеразы III (TaU6) пшеницы, промотора CaMV35S, промотора U6 пшеницы или убиквитина кукурузы (например Ubi1). В одном варианте осуществления промотор представляет собой р35S (SEQ ID NO: 40) или рUbi (SEQ ID NO: 41).

Конструкция нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует фермент CRISPR. Под "ферментом CRISPR" подразумевают РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу, которая может ассоциировать с системой CRISPR. В частности, такой фермент связывается с последовательностью tracr-РНК. В одном варианте осуществления фермент CRISPR представляет собой белок Cas ("CRISPR-ассоциированный белок"), предпочтительно Cas9 или Cpf1, более предпочтительно Cas9. В конкретном варианте осуществления Cas9 представляет собой кодон-оптимизированный Cas9, и более предпочтительно, имеет последовательность, описанную в SEQ ID NO: 42, или ее функциональный вариант или гомолог. В другом варианте осуществления фермент CRISPR представляет собой белок из семейства белков-кандидатов класса 2, таких как C2c1, C2C2 и/или C2c3. В одном варианте осуществления белок Cas представляет собой белок из *Streptococcus pyogenes*. В альтернативном варианте осуществления белок Cas может представлять собой белок из любого из *Staphylococcus aureus*, *Neisseria*

meningitides, *Streptococcus thermophiles* или *Treponema denticola*.

Термин "функциональный вариант", как используют в рамках изобретения применительно к Cas9, относится к варианту последовательности гена Cas9 или части последовательности гена, которые сохраняют биологическую функцию полной последовательности не варианта, например, действует в качестве ДНК-эндонуклеазы, или распознавание или/и связывание с ДНК. Функциональный вариант также включает вариант представляющего интерес гена, который имеет изменения последовательности, которые не влияют на функцию, например, неконсервативные остатки. Также охватывается вариант, который является по существу идентичным, т.е. имеет только некоторое варьирование последовательности, например, в неконсервативных остатках, по сравнению с последовательностями дикого типа, как показано в настоящем описании, и является биологически активным. В одном варианте осуществления функциональный вариант SEQ ID NO.42 обладает по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% общей идентичностью последовательности с аминокислотой, соответствующей SEQ ID NO: 42. В следующем варианте осуществления белок Cas9 модифицирован для повышения активности.

Подходящие гомологи или ортологи можно идентифицировать посредством сравнения последовательностей и идентификации консервативных доменов. Функция гомолога или ортолога может быть идентифицирована, как описано в настоящем описании, и квалифицированный специалист, таким образом, способен подтвердить функцию при экспрессии в растении.

В следующем варианте осуществления белок Cas9 модифицирован для повышения активности. Например, в одном варианте осуществления белок Cas9 может содержать аминокислотную замену D10A, эта никаза расщепляет только цепь ДНК, которая комплементарна гРНК и распознается ей. В альтернативном варианте осуществления блок Cas9 альтернативно или дополнительно может содержать замену аминокислоты H840A, эта никаза расщепляет только цепь ДНК, которая не взаимодействует с гРНК. В этом варианте осуществления Cas9 может использоваться с парой (т.е. двумя) молекул огРНК (или конструкцией, экспрессирующей такую пару) и в результате может расщеплять область-мишень на противоположной цепи ДНК с возможностью повышения специфичности в 100-1500 раз. В следующем варианте осуществления белок Cas9 может содержать замену D1135E. Белок Cas9 также может представлять собой вариант VQR. Альтернативно белок Cas может содержать мутацию в обоих нуклеазных доменах, HNH и RuvC-подобном, и, таким образом, является каталитически неактивным. Вместо расщепления цепи-мишени этот каталитический неактивный белок Cas можно использовать для предупреждения процесса элонгации транскрипции, что приводит к потере функции неполностью транслированных белков при совместной экспрессии с молекулой огРНК. Примером каталитически неактивного белка является мертвый Cas9 (dCas9), вызванный точковой мутацией в RuvC и/или нуклеазными доменами HNH (Komor et al., 2016 и Nishida et al., 2016).

В следующем варианте осуществления белок Cas, такой как Cas9, может быть дополнительно слит с эффектором репрессии, таким как гистон-модифицирующий/ДНК-метилирующий фермент или Редактор оснований, такой как цитидиндезаминаза (Komor et al. 2016) для обеспечения сайт-направленного мутагенеза, как описано выше. В последнем случае фермент цитидиндезаминаза не индуцирует разрывы дцДНК, но опосредует конвертирование цитидина в уридин, тем самым обеспечивая замену С на Т (или G на А). Этот подход может быть особенно ценным для внесения полиморфизмов в положениях -855, -847, -801 и -522, описанных выше.

В следующем варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит эндорибонуклеазу. Предпочтительно эндорибонуклеаза представляет собой Csy4 (также известную как Cas6f) и более предпочтительно кодон-оптимизированную csy4, например, как определено в SEQ ID NO: 43. В одном варианте осуществления, когда конструкция нуклеиновой кислоты содержит белок cas, конструкция нуклеиновой кислоты может содержать последовательности для экспрессии эндорибонуклеазы, такой как Csy4, экспрессируемой в качестве 5'-концевой слитой конструкции Р2А (используемой в качестве самоотщепляющегося пептида) с белком cas, таким как Cas9.

В одном варианте осуществления белок cas, эндорибонуклеаза и/или слитая конструкция эндорибонуклеаза-cas могут быть функционально связаны с подходящим промотором растений. Подходящие промоторы растений уже описаны выше, однако в одном варианте осуществления он может представлять собой промотор убиквитина 1 *Zea Mays*.

Подходящие способы получения нуклеиновых кислот CRISPR и векторных систем известны и, например, опубликованы в Molecular Plant (Ma et al., 2015, Molecular Plant, DOI:10.1016/j.molp.2015.04.007), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В альтернативном аспекте изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует эффектор TAL, где указанный эффектор нацелен на последовательность GRF, выбранную из SEQ ID NO 40, 49, 52, 57, 60, 65, 68, 73, 76, 81, 85, 90, 93, 98, 101, 106, 109, 114, 117, 122, 125, 130, 133, 138, 141, 146, 149, 154, 157, 162, 165, 170, 173, 178, 181, 186 и 189. Способы конструирования эффектора TAL хорошо известны специалистам в данной области, с учетом наличия последовательности-мишени. Примеры подходящих способов приведены в Sanjana et al. и Cermak T et al, оба из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок. Предпочтительно, указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит две последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующих эффектор TAL, с образованием пары TALEN. В следующем варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность-специфическую нуклеазу (SSN). Предпочтительно такая SSN представляет собой эндонуклеазу, такую как FokI. В следующем варианте осуществления TALEN собирают способом клонирования Golden Gate в виде одной плазмиды или конструкции нуклеиновой кислоты.

В другом аспекте изобретения предусматривается молекула огРНК, где молекула огРНК содержит последовательность cr-РНК и последовательность tracr-РНК и где последовательность cr-РНК может связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 49, 52, 57, 60, 65, 68, 73, 76, 81, 85, 90, 93, 98, 101, 106, 109, 114, 117, 122, 125, 130, 133, 138, 141, 146, 149, 154, 157, 162, 165, 170, 173, 178, 181, 186 и 189 или их варианта. "Вариант" является таким, как определено в настоящем описании. В одном варианте осуществления молекула огРНК может содержать по меньшей мере одну химическую модификацию, например, которая повышает ее стабильность и/или аффинность связывания с последовательность-мишенью или последовательности cr-РНК с последовательностью tracr-РНК. Такие модификации хорошо известны специалисту в данной области и включают, например, но не ограничиваясь ими, модификации, описанные в Rahdar et al., 2015, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. В этом примере cr-РНК может содержать модификацию фосфоротиоатного остова, такую как замены на 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me) и S-ограниченный этил (сЕТ).

В другом аспекте изобретения предусматривается выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует протоспейсерный элемент (как определено в любой из SEQ ID NO: 41, 50, 53, 58, 61, 66, 69, 74, 77, 82, 86, 91, 94, 99, 102, 107, 110, 115, 118, 123, 126, 131, 134, 139, 142, 147, 150, 155, 158, 163, 166, 171, 174, 179, 182, 187 и 190) или его вариант, или огРНК (как описано в любой из SEQ ID NO: 51, 54, 59, 62, 67, 70, 75, 78, 83, 87, 92, 95, 100, 103, 108, 111, 116, 119, 124, 127, 132, 135, 140, 143, 148, 151, 156, 159, 164, 167, 172, 175, 180, 183, 188 и 191, или их вариант).

В другом аспекте изобретения предусматривается конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность матрицы репарации, функционально связанную с регуляторной последовательностью, как определено в настоящем описании. В одном варианте осуществления последовательность матрицы репарации содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 47, 53, 63, 71, 79, 88, 96, 104, 112, 120, 128, 136, 144, 152, 160, 168, 176 и 184 или их варианта. Регуляторная последовательность является такой, как определено в настоящем описании.

В другом аспекте изобретения предусматривается другая конструкция нуклеиновой кислоты, где конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность донорной ДНК. В одном варианте осуществления последовательность донорной ДНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 48, 56, 64, 72, 80, 84, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 145, 153, 161, 169, 177 и 185 или их варианта. В следующем предпочтительном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну, предпочтительно две, последовательности нуклеиновых кислот огРНК, как определено в настоящем описании и более предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты Cas, как определено в настоящем описании. В одном варианте по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты огРНК, нуклеиновой кислоты Cas и донорной ДНК функционально

связаны с одной и той же регуляторной последовательностью. В альтернативном варианте осуществления по меньшей мере одна нуклеиновая кислота оgРНК, нуклеиновая кислота Cas и последовательность донорной ДНК функционально связаны с различными регуляторными последовательностями. Например, по меньшей мере одна нуклеиновая кислота оgРНК может быть функционально связана с промотором U3, а Cas - с промотором Ubi. В этом варианте осуществления нуклеиновые кислоты оgРНК, экспрессированные с конструкции, используют для внесения двухцепочечного разрыва в последовательность-мишень, который затем репарируется с использованием HDR и последовательности донорной ДНК, как описано в Sun et al. (2016). Этот способ можно использовать для встраивания по меньшей мере одной, но предпочтительно по меньшей мере двух, замен в последовательность-мишень.

В другом аспекте изобретения предусматривается растение или его часть или по меньшей мере одна выделенная клетка растения, трансфицированная по меньшей мере одной конструкцией нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании. Cas9 и оgРНК можно комбинировать или они могут находиться в отдельных экспрессирующих векторах (или конструкциях нуклеиновой кислоты, такие термины используют взаимозаменяемо). Аналогично, последовательность Cas9, оgРНК и донорной ДНК можно комбинировать или они могут находиться в отдельных экспрессирующих векторах. Иными словами, в одном варианте осуществления выделенную клетку растения трансфицируют единичной конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей оgРНК и Cas9, или оgРНК, Cas9 и последовательность донорной ДНК, как подробно описано выше. В альтернативном варианте осуществления выделенную клетку растения трансфицируют двумя или тремя конструкциями нуклеиновых кислот, причем первая конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну оgРНК, как определено выше, вторая конструкция нуклеиновой кислоты содержит Cas9 или ее функциональный вариант или гомолог, и необязательно третья конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность донорной ДНК, как определено выше. Вторая и/или третья конструкция нуклеиновой кислоты может быть трансфицирована до, после или одновременно с первой и/или второй конструкцией нуклеиновой кислоты. Преимущество отдельной второй конструкции, содержащей белок Cas, состоит в том, что конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая по меньшей мере одну оgРНК, может быть в паре с любым типом белка Cas, как описано в настоящем описании, и, таким образом, не ограничивается единичной функцией Cas (как было бы в случае, когда как Cas, так и оgРНК кодируются на одной и той же конструкцией нуклеиновой кислоты).

В одном варианте осуществления сначала проводят трансфекцию конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей белок Cas, и она стабильно встраивается в геном, а затем проводят вторую трансфекцию конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту оgРНК. В альтернативном варианте осуществления растение или его часть, или по меньшей мере одну выделенную клетку растения трансфицируют мРНК, кодирующей белок Cas, и совместно трансфицируют по

меньшей мере с одной конструкцией нуклеиновой кислоты, как определено в настоящем описании.

Экспрессирующие векторы Cas9 для применения в рамках настоящего изобретения можно конструировать, как описано в данной области. В одном примере экспрессирующий вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, как определено в SEQ ID NO: 42, или ее функциональный вариант или гомолог, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с подходящим промотором. Примеры подходящих промоторов включают промотор актина, CaMV35S, U6 пшеницы или убиквитина кукурузы (например, Ubi1).

Также в объем изобретения входит применение конструкций нуклеиновых кислот (конструкций CRISPR), описанных выше, или молекул оГРНК в любом из описанных выше способов. Например, предусматривается применение описанных выше конструкций CRISPR или молекул оГРНК для повышения экспрессии или активности GRF, как описано в настоящем описании.

Таким образом, в следующем аспекте изобретения предусматривается способ повышения экспрессии и/или активности GRF, причем способ включает введение и экспрессию любой из описанных выше конструкций или введение молекулы оГРНК, как также описано выше, в растение. Иными словами, также предусматривается способ повышения экспрессии и/или активности GRF, как описано в настоящем описании, где способ включает внесение по меньшей мере одной мутации в эндогенный ген GRF и/или его промотор с использованием CRISPR/Cas9, в частности, конструкций CRISPR (нуклеиновая кислота), описанных в настоящем описании.

Соответственно, в следующем аспекте изобретения предусматривается способ получения растения с аллелем  $GRF^{ngr2}$ , причем способ включает введение и экспрессию любой конструкции нуклеиновой кислоты, как определено выше, или введение молекулы оГРНК, как также определено выше, в растение.

В альтернативном аспекте настоящего изобретения предусматривается выделенная клетка растения, трансфицированная по меньшей мере одной молекулой оГРНК, как описано в настоящем описании.

В следующем аспекте изобретения предусматривается генетически модифицированное или отредактированное растение, содержащее трансфицированную клетку, описанную в настоящем описании. В одном варианте осуществления конструкция или конструкции нуклеиновой кислоты могут встраиваться в стабильной форме. В альтернативном варианте осуществления конструкция или конструкции нуклеиновой кислоты не встраиваются (т.е. экспрессируются временно). Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления генетически модифицированное растение свободно от какой-либо оГРНК и/или нуклеиновой кислоты белка Cas. Иными словами, растение является свободным от трансгена.

Термины "введение", "трансфекция" или "трансформация", упоминаемые в настоящем описании, охватывают перенос экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяина,

независимо от способа, используемого для переноса. Ткань растения, способная к последующему клональному размножению, как посредством органогенеза, так и посредством эмбриогенеза, можно трансформировать генетической конструкцией по настоящему изобретению, и из нее можно регенерировать целое растение. Конкретная выбранная ткань варьируется в зависимости от систем клонального размножения, доступных и наиболее пригодных для конкретного подвергаемого трансформации вида. Иллюстративные ткани-мишени включают листовые диски, пыльцу, зародыши, семядоли, гипокотили, макрогаметофиты, каллюсную ткань, существующую меристематическую ткань (например, апикальная меристема, пазушная почка и корневые меристемы), и индуцированную меристематическую ткань (например, меристема семядоли и меристема гипокотыля). Затем полученное трансформированное растение можно использовать для регенерации трансформированного растения способами, известными специалистам в данной области.

Перенос чужеродных генов в геном растения называют трансформацией. Трансформация растений в настоящее время является рутинным способом во многих видах. Любой из нескольких способов трансформации, известных специалисту в данной области, можно использовать для внесения представляющей интерес конструкции нуклеиновой кислоты или молекулы оГРНК в подходящую предковую клетку. Способы, описанные для трансформации и регенерации растений из тканей растений или клеток растений, можно использовать для временной или для стабильной трансформации.

Способы трансформации включают применение липосом, электропорацию, химические вещества, которые повышают поглощение свободной ДНК, инъекцию ДНК непосредственно в растение (микроинъекция), генные пушки (или биолистические системы доставки частиц (биолистика)), как описано в примерах, липофекцию, трансформацию с использованием вирусов или пыльцы и микропроектию. Способы могут быть выбраны из способа с кальцием/полиэтиленгликолем для протопластов, опосредуемой ультразвуком трансфекции генов, оптической или лазерной трансфекции, трансфекции с использованием карбидкремниевых волокон, электропорацию протопластов, микроинъекцию в растительный материал, бомбардировку ДНК- или РНК-покрытыми частицами, инфицирование (неинтегрированными) вирусами и т.п. Трансгенные растения также можно получать посредством опосредуемой *Agrobacterium tumefaciens* трансформации, включая, но не ограничиваясь ими, использование способа погружения цветков/вакуумной инфильтрации *Agrobacterium*, как описано в Clough & Bent (1998), включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Таким образом, в одном варианте осуществления по меньшей мере одну конструкцию нуклеиновой кислоты или молекулу оГРНК, как описано в настоящем описании, можно вводить по меньшей мере в одну клетку растения с использованием любого из описанных выше способов. В альтернативном варианте осуществления любую из конструкций нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, можно сначала транскрибировать с образованием предварительно собранного рибонуклеопротеина Cas9-



огРНК, а затем доставлять по меньшей мере в одну клетку растения с использованием любого из описанных выше способов, таких как липофекция, электропорация или микроинъекция.

Необязательно, для селекции трансформированных растений растительный материал, полученный при трансформации, как правило подвергают условиям селекции, так чтобы трансформированные растения можно было отличить от нетрансформированных растений. Например, семена, полученные описанным выше способом, можно высевать и после первоначального периода проращивания подвергать селекции посредством опрыскивания. Следующей возможностью является выращивание семян, в подходящих случаях после стерилизации, на чашках с агаром с использованием подходящего селективного агента, так что только трансформированные семена могут вырасти в растения. Как описано в примерах, подходящим маркером может быть бар-фосфинотрицин или PPT. Альтернативно трансформированные растения подвергают скринингу в отношении присутствия селективного маркера, такого как, но не ограничиваясь ими, GFP, GUS ( $\beta$ -глюкуронидаза). Другие примеры хорошо известны специалисту в данной области. Альтернативно селекцию не проводят и семена, полученные описанным выше способом, высевают и выращивают, и определяют уровни экспрессии или белка GRF1 в соответствующий момент времени с использованием стандартных способов в данной области. Эта альтернатива, в которой не осуществляют введения трансгенов, является предпочтительной для получения свободных от трансгенов растений.

После переноса и регенерации ДНК предположительно трансформированные растения также можно оценивать, например, с использованием ПЦР для детекции присутствия представляющего интерес гена, количества копий и/или геномной организации. Альтернативно или дополнительно, мониторинг уровней встраивания и экспрессии вновь введенной ДНК можно проводить с использованием саузерн-блоттинга, нозерн-блоттинга и/или вестерн-блоттинга, все из которых известны специалистам в данной области.

Полученные трансформированные растения можно размножать различными способами, такими как способы клонального размножения или классического разведения. Например, трансформированное растение первого поколения (или T1) можно подвергать самоопылению и отбирать гомозиготных трансформантов второго поколения (или T2), а затем растения T2 можно размножать способами классического разведения.

Конкретные протоколы использования описанных выше конструкций CRISPR известны специалисту в данной области. В качестве одного примера, подходящий протокол описан в Ma & Liu ("CRISPR/Cas-based multiplex genome editing in monocot and dicot plants"), включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В следующем родственном аспекте изобретения также предусматривается способ получения генетически модифицированного растения, как описано в настоящем описании, причем способ включает

а. выбор части растения;

б. трансфекцию по меньшей мере одной клетки части растения согласно (а) по меньшей мере одной конструкцией нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, или по меньшей мере одной молекулой ogРНК, как описано в настоящем описании, с использованием способов трансфекции или трансформации, описанных выше;

с. регенерацию по меньшей мере одного растения, происходящего из трансфицированной клетки или клеток;

д. селекцию одного или нескольких растений, полученных согласно (с), которые демонстрируют увеличенную экспрессию или функцию GRF, предпочтительно GRF4.

В следующем варианте осуществления способ также включает стадию скрининга генетически модифицированного растения в отношении SSN (предпочтительно CRISPR)-индуцированных мутаций в последовательности гена или промотора GRF. В одном варианте осуществления способ включает получение образца ДНК из трансформированного растения и проведение амплификации ДНК для детекции мутации по меньшей мере в одной последовательности гена или промотора GRF.

В следующем варианте осуществления способы включают получение стабильных растений T2, предпочтительно гомозиготных по мутации (т.е. мутации по меньшей мере в одной последовательности гена или промотора GRF).

Растения, которые имеют мутацию по меньшей мере в одной последовательности гена или промотора GRF, также можно скрещивать с другим растением, также содержащим по меньшей мере одну отличающуюся мутацию по меньшей мере в одной последовательности гена или промотора GRF с получением растений с дополнительными мутациями в последовательности гена или промотора GRF1. Комбинации будут понятны специалисту в данной области. Таким образом, этот способ можно использовать для получения растений T2 с мутациями на всех или увеличенном количестве гомеологов, по сравнению с количеством гомеологичных мутаций в одном растении T1, трансформированном, как описано выше.

Растение, полученное или получаемое способами, описанными выше, также входит в объем изобретения.

Генетически измененное растение по настоящему изобретению также можно получить путем переноса любой из последовательностей по изобретению посредством скрещивания, например, с использованием пыльцы генетически измененного растения, описанного в настоящем описании, для опыления растения дикого типа или контрольного растения, или для опыления гинеция растений, описанных в настоящем описании, другой пылью, которая не содержит мутацию по меньшей мере в одной из последовательности гена или промотора GRF. Способы получения растения по изобретению не ограничиваются исключительно способами, описанными в этом разделе; например, можно проводить генетическую трансформацию зародышевых клеток из колоса пшеницы, как упоминалось, но без необходимости в регенерации растения после этого.

**Способ скрининга растений в отношении природных фенотипов увеличенного**

### **поглощения азота и урожая зерна**

В следующем аспекте изобретения предусматривается способ скрининга популяции растений и идентификации и/или селекции растения, которое содержит или экспрессирует аллель *ngt GRF*, как описано в настоящем описании. Альтернативно предусматривается способ скрининга популяции растений и идентификации и/или селекции растения, которое имеет увеличенное поглощение азота, и/или ассимиляцию азота, и/или эффективность использования азота, и необязательно, кроме того, увеличенный урожай и/или ассимиляцию С. В любом аспекте способ включает детекцию в растении или зародышевой плазме растения по меньшей мере одного полиморфизма в гене и/или промоторе *GRF*. Предпочтительно, указанный скрининг включает определение присутствия по меньшей мере одного полиморфизма, где указанный полиморфизм представляет собой по меньшей мере одну инсерцию, и/или по меньшей мере одну делецию и/или замену, более предпочтительно замену.

В одном конкретном варианте осуществления указанный полиморфизм может содержать одну из следующих замен:

- замену С на Т в положении -941 или -935 от иницирующего кодона *GRF* или в положении 60 SEQ ID NO: 7 или в положении 66 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замену Т на А в положении -884 или -878 от иницирующего кодона *GRF* или в положении 118 SEQ ID NO: 7 или в положении 124 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замену С на Т в положении -855 или -849 от иницирующего кодона *GRF* или в положении 148 SEQ ID NO: 7 или в положении 154 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замену С на Т в положении -847 или -841 от иницирующего кодона *GRF* или в положении 157 SEQ ID NO: 7 или в положении 163 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замену С на Т в положении -801 или -795 от иницирующего кодона *GRF* или в положении 204 SEQ ID NO: 7 или в положении 210 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замену С на Т в положении -522 или -516 от иницирующего кодона *GRF* или в положении 484 SEQ ID NO: 7 или в положении 489 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замену G на C в положении -157 от иницирующего кодона *GRF* или в положении 850 SEQ ID NO: 7 или в положении 516 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

В предпочтительном варианте осуществления мутация представляет собой

- замену Т на А в положении -884 или -878 от иницирующего кодона *GRF* или в положении 118 SEQ ID NO: 7 или в положении 124 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении; и

- замену С на Т в положении -847 или -841 от иницирующего кодона GRF или в положении 157 SEQ ID NO: 7 или в положении 163 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении;

- замену С на Т в положении -801 или -795 от иницирующего кодона GRF или в положении 204 SEQ ID NO: 7 или в положении 210 SEQ ID NO: 8; или гомологичном ему положении.

Как описано выше, промотор GRF, содержащий все три из описанных выше полиморфизмов, может быть известен как гаплотип В.

Подходящие тесты для оценки присутствия полиморфизма хорошо известны специалисту в данной области и включают, но не ограничиваются ими, электрофорез, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP), случайно амплифицированные полиморфные ДНК (RAPD), полимеразную цепную реакцию с произвольными праймерами (AP-ПЦР), фингерпринтинг с амплификацией ДНК (DAF), амплифицированные области с охарактеризованной последовательностью (SCAR), анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (AFLP), простые повторы последовательностей (SSR - которые также называют микросателлитами), и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). В одном варианте осуществления используют генотипирование с использованием конкретной аллель-специфической ПЦР (KASP).

В одном варианте осуществления способ включает

а) получение образца нуклеиновой кислоты из растения и

б) проведение амплификации нуклеиновых кислот для одного или нескольких аллелей GRF или промотора GRF

с использованием одной или нескольких пар праймеров.

В следующем варианте осуществления способ может дополнительно включать интродукцию хромосомной области, содержащей по меньшей мере полиморфизм GRF, во второе растение или зародышевую плазму растения для получения подвергнутого интродукции растения или зародышевой плазмы растения. Предпочтительно указанное второе растение будет проявлять повышение поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно, кроме того, урожая и/или ассимиляции С.

Таким образом, в следующем аспекте изобретения предусматривается способ повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно кроме того урожая и/или ассимиляции С в растении, причем способ включает

а. скрининг популяции растений в отношении по меньшей мере одного растения с полиморфизмом GRF, как описано в настоящем описании;

б. дальнейшее модулирование экспрессии или активности полипептида GRF, как описано в настоящем описании, в указанном растении путем внесения по меньшей мере одной мутации в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую GRF и/или по меньшей мере одной мутации в промотор GRF, как описано в настоящем описании.

### **Конструкции GRF<sup>ngf</sup>**

Как обсуждается в настоящем описании, авторы изобретения неожиданно идентифицировали, что сверхэкспрессия GRF, в частности GRF4, повышает метаболизм азота, а также урожай в растениях.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предусматривается конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, как определено в SEQ ID NO: 3, или его функциональный вариант или гомолог, где указанная последовательность функционально связана с регуляторной последовательностью. Предпочтительно указанная регуляторная последовательность представляет собой тканеспецифический промотор или конститутивный промотор. Функциональный вариант или гомолог является таким, как определено выше. Подходящие промоторы также описаны выше. Однако в одном варианте осуществления промотор может представлять собой промотор гаплотипа В, как описано в настоящем описании. Предпочтительно, этот промотор содержит или состоит из SEQ ID NO: 9 или ее варианта.

В другом аспекте изобретения предусматривается вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, описанную выше.

В следующем аспекте изобретения предусматривается клетка-хозяин, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты. Клетка-хозяин может представлять собой бактериальную клетку, такую как *Agrobacterium tumefaciens*, или выделенную клетку растения. Изобретение также относится к культуральной среде или набору, содержащим культуральную среду или выделенную клетку-хозяина, как описано ниже.

В другом варианте осуществления предусматривается трансгенное растение, экспрессирующее конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано выше. В одном варианте осуществления указанная конструкция нуклеиновой кислоты стабильно встраивается в геном растения.

Последовательность нуклеиновой кислоты вводят в указанное растение способом, называемым трансформацией, как описано выше.

В другом аспекте изобретение относится к применению конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, для повышения по меньшей мере одного из поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно, кроме того, урожая и/или ассимиляции С.

В следующем аспекте изобретения предусматривается способ повышения по меньшей мере одного из поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно, кроме того, урожая и/или ассимиляции С, причем способ включает введение и экспрессию в указанном растении конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании.

В другом аспекте изобретения предусматривается способ получения растения с увеличением по меньшей мере одного из поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и необязательно, кроме того, урожая и/или

ассимиляции С, причем способ включает введение и экспрессию в указанном растении конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании. Указанное повышение происходит относительно контрольного растения или растения дикого типа.

В то время как в вышеуказанном описании приведено общее описание объекта, охватываемого объемом настоящего изобретения, включая способы, а также наилучший способ его осуществления, его получения и применения, следующие примеры приведены, чтобы далее позволить специалистам в данной области применять настоящее изобретение на практике и предоставить полное письменное его описание. Однако специалистам в данной области будет понятно, что детали этих примеров не следует истолковывать как ограничивающие изобретение, объем которого должен быть воспринят из формулы изобретения и ее эквивалентов, прилагаемых к описанию. Различные следующие аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения станут очевидными специалистам в данной области ввиду настоящего описания.

"И/или", когда используется в настоящем описании, следует понимать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Например "А и/или В" следует понимать как конкретное описание каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждый из этих случаев был индивидуально указан в настоящем описании.

Если контекст не указывает на иное, описание и определения признаков, указанных выше, не ограничиваются конкретным аспектом или вариантом осуществления изобретения и в равной степени применимы ко всем аспектам и вариантам осуществления, которые описаны.

Вышеуказанная заявка и все документы и номера доступа последовательностей, цитированных в них или в ходе их рассмотрения ("цитированные в заявках документы") и все документы, цитированные или упоминаемые в цитированных в заявках документах, и все документы, цитированные или упоминаемые в настоящем описании ("цитированные в настоящем описании документы"), и все документы, цитированные или упоминаемые в цитированных в настоящем описании документах, вместе с любыми инструкциями изготовителя, описаниями, спецификациями продуктов и технологическими картами для любых продуктов, упоминаемых в настоящем описании или в любом документе, включенном в настоящее описание в качестве ссылки, включены в настоящее описание в качестве ссылки и могут быть использованы для применения настоящего изобретения на практике. Более конкретно, все упоминаемые документы включены в качестве ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что каждый индивидуальный документ включен в качестве ссылки.

Изобретение далее описано в следующем неограничивающем примере.

#### ПРИМЕР 1

Растения интегрируют регуляцию метаболической ассимиляции с регуляцией роста. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этой координированной интеграции, мало понятны. Для улучшения этого понимания авторы изобретения

систематически анализировали рост и ассимиляторные свойства мутантных аллелей злаковых сортов, характерных для "зеленой революции" 1960-х. Зеленая революция повысила урожайность, обеспечила пищей растущую мировую популяцию и была частично запущена быстрым перениманием полукарликовых сортов зеленой революции (GRV)<sup>1-3</sup>. Полукарликовость GRV вызывается накоплением подавляющих рост белков DELLA (DELLA), обеспечиваемым мутантными аллелями Rht (пшеница)<sup>4,5</sup> и sd1 (рис indica)<sup>6,7</sup>. В нормальных растениях фитогормон гиббереллин (GA) стимулирует деструкцию DELLA, таким образом, стимулируя рост<sup>8,9</sup>. Однако в GRV разрушение DELLA ингибируется. Мутантные DELLA GRV пшеницы<sup>4</sup> выдерживают GA-стимулируемое разрушение, в то время как sd1 вызывает снижение содержания GA и последующее накопление DELLA SLR1<sup>10</sup>. В обоих случаях накопленные DELLA ингибируют рост, вызывая полукарликовость и итоговую резистентность к снижающему урожаю "полеганию" (придавливание растений ветром и дождем)<sup>3</sup>.

Резистентность GRV к полеганию возрастает, поскольку мутантные аллели Rht и sd1 обеспечивают частичную нечувствительность роста к возрастающему поступлению азота (N). Например, высота риса indica Nanjing6 (NJ6) возрастает в ответ на увеличение поступления N, однако этот ответ снижен в изогенных растениях NJ6-sd1 (фиг.1a). Полукарликовая мутантная пшеница Rht-B1b имеет сходные свойства (по сравнению с изогенной пшеницей Rht-B1a (WT); фиг.1b). В то время как накопление GRV DELLA ингибирует вегетативный ростовой ответ на N, распределение N в зерна продолжает, обеспечивая как повышенный пожинаемый урожай, так и сниженный риск полегания в результате увеличенного поступления N. Эти повышающие урожай свойства привели к быстрому распространению культивации GRV за последние 50 лет<sup>2</sup>, и обеспечили сохранение мутантных аллелей sd1 и Rht в современных элитных сортах<sup>4,5,11</sup>.

Однако частичная нечувствительность GRV к N ассоциирована со сниженной эффективностью использования N<sup>12</sup>. Более того, мутантные аллели sd1 и Rht ингибируют поглощение N. Например, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> является основной формой N, ассимилируемой анаэробно растущими корнями риса на затопляемых полях<sup>13</sup>, и скорость поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> сама по себе регулируется посредством N, снижаясь при высоком поступлении N (HN; фиг.1c). Авторы изобретения обнаружили, что NJ6-sd1 демонстрирует сниженную скорость поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, в условиях как низкого, так и высокого N (фиг.1c). Учитывая, что нитрат (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) представляет собой форму N, преимущественно поглощаемую в относительно аэробных условиях почвы<sup>14</sup>, скорость поглощения <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> пшеницей RhtB1b аналогично снижена (фиг.1d). Таким образом, в дополнение к полукарликовости и сниженной стимуляции роста посредством N, накопление DELLA GRV обеспечивает снижение поглощения N. Следовательно, достижение высокого урожая GRV требует избыточного использования подачи удобрения N, которая неприемлемо разрушает окружающую среду (например, посредством стока с сельскохозяйственных площадей<sup>15</sup>). Разработка новых GRV, которые имеют высокий урожай, несмотря на снижение поступления N, таким образом, является неотложной глобальной рациональной

сельскохозяйственной целью<sup>1,16</sup>. Авторы изобретения обосновали, что систематический анализ метаболизма N в GRV может позволить установление того, как рост и ассимиляция координируются, и что это открытие может в свою очередь обеспечить разработку новых GRV, имеющих повышенную эффективность использования N.

### **OsGRF4 противодействует SLR1-опосредуемому ингибированию поглощения аммония (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) рисом**

Сначала авторы изобретения исследовали показатели поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в 36 содержащих sd1 сортах indica, обнаружив варьирование в ~3 раза (фиг.2а). Интересно, что некоторые GRV с более высокой урожайностью (например, 9311) не демонстрируют наибольшие показатели поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, несмотря на наличие преобладающих площадей китайского риса indica на протяжении многих лет. Авторы изобретения отобрали NM73 (демонстрирующий наиболее высокий показатель поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; фиг.2а) для анализа локуса количественных признаков (QTL), обнаружив два пика LOD-показателя (qNGR1 и qNGR2, фиг.2b). Аллель qngr1 NM73 ассоциирован с относительно низким показателем поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, и он совпадает по положению на карте с sd1<sup>6,7</sup> (см. фиг.1с). Однако молекулярная идентичность аллеля qngr2 NM73, ассоциированного с относительно высоким показателем поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, была неизвестной.

Позиционное картирование локализовало qngr2 на OsGRF4<sup>17-19</sup> (фиг.7а), что позволило предположить о ранее неизвестной функции регуляции поглощения NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Более того, гетерозиготность по аллелю NM73 (OsGRF4<sup>ngr2</sup>) обеспечивает более высокий показатель поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, чем гомозиготность по аллелю NJ6 (OsGRF4<sup>NGR2</sup>; фиг.7b), демонстрируя, что OsGRF4<sup>ngr2</sup> полудоминантным образом повышает поглощение NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Изогенная линия NJ6-OsGRF4<sup>ngr2</sup> демонстрировала ожидаемый более высокий показатель поглощения NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (против NJ6; фиг. 2с), и увеличение содержания как мРНК OsGRF4, так и белка OsGRF4 (фиг.2d; фиг.7с), что согласуется с полудоминантностью OsGRF4<sup>ngr2</sup>. Более того, РНК-и снижала относительно высокий показатель поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в NJ6-OsGRF4<sup>ngr2</sup> (фиг.2е; фиг.7с), таким образом, подтверждая эквивалентность qngr2 и OsGRF4. Наконец, трансгенная экспрессия кодирующей OsGRF4 мРНК из нативного OsGRF4g<sup>ngr2</sup> или конститутивных промоторов Actin1 риса обеспечивала увеличение показателей поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в NJ6 (фиг.2с; фиг.7с). Таким образом, OsGRF4<sup>ngr2</sup> обеспечивает увеличенное поглощение <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в NM73, и противодействует репрессивным эффектам sd1 (которые являются следствием накопления белка SLR1 DELLA риса).

Сравнение аллелей OsGRF4<sup>NGR2</sup> (NJ6) и OsGRF4<sup>ngr2</sup> (NM73) выявило множество SNP (однонуклеотидные полиморфизмы; фиг.7а, d). Два из SNP OsGRF4<sup>ngr2</sup> (фиг.7d; положения 1187T>A и 1188C>A в экзоне 3) препятствуют опосредуемому OsmiR396 расщеплению мРНК OsGRF4<sup>ngr217-19</sup>, увеличивая содержание мРНК OsGRF4 и содержание OsGRF4 (фиг.2d; фиг.7с), и стимулируя поглощение NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Тем не менее, различные RD23, которые также демонстрируют относительно высокий показатель поглощения <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (фиг.2а), содержат аллель OsGRF4, лишенный 1187A и 1188A. Однако RD23 и NM73 имеют три общих SNP промотора OsGRF4 (-884T>A, -847C>T и -801C>T; фиг.7d). В



целом, авторы изобретения обнаружили три гаплотипа промотора OsGRF4 (А, как в 9311; В, с -884А, -847Т и -801Т, как в NM73 и RD23; и С, распространенный в зародышевой плазме japonica, например, сорта Nipponbare; фиг.7d). Интересно, что содержание мРНК OsGRF4 является более высоким в сортах TZZL1 и RD23 (оба из которых содержат гаплотип В), чем в элитных сортах, содержащих гаплотипы А или С (фиг.7е). Это указывает на то, что показатель поглощения  $\text{NH}_4^+$  в RD23 является относительно высоким (фиг.1а), поскольку гаплотип В промотора обеспечивает относительно высокие уровни мРНК OsGRF4, в то время как NM73 имеет еще более высокий показатель поглощения  $\text{NH}_4^+$ , поскольку он сочетает в себе эффект гаплотипа В промотора с резистентностью OsmiR396, сообщаемой 1187А и 1188А<sup>17-19</sup>.

Важно, что авторы изобретения обнаружили, что, хотя OsGRF4 регулирует поглощение  $\text{NH}_4^+$ , он в свою очередь регулируется поступлением N. Содержание мРНК OsGRF4 в NJ6 снижается при повышении поступления N (фиг.2е), вероятно, вследствие снижения транскрипции OsGRF4 (содержание OsmiR396 не возрастает на поддающемся обнаружению уровне при повышении поступления N; фиг.8), таким образом снижая содержание OsGRF4 (фиг.2f). Поскольку увеличенное содержание OsGRF4 повышает поглощение  $\text{NH}_4^+$  (фиг.2с, d), стимуляция повышения содержания OsGRF4 посредством низкого N обеспечивает регуляцию по принципу обратной связи гомеостаза N. В частности, ответ в виде повышенного содержания мРНК OsGRF4 на низкое поступление N значительно повышается в сортах (например, TZZL1 и RD23), содержащих гаплотип В промотора (фиг.7f). Наконец, мутант *osgrf4*, полученный с использованием CRISPR/cas9<sup>20</sup> лишен OsGRF4 (фиг.9) и демонстрирует полукарликовость (фиг.2g), сниженный приток  $^{15}\text{NH}_4^+$  (фиг.2h), сниженную опосредуемую N регуляцию по принципу обратной связи скорости поглощения  $^{15}\text{NH}_4^+$  (фиг.2h) и сниженное зависимое от N накопление биомассы (фиг.2i). Таким образом, OsGRF4 представляет собой N-регулируемый регулятор транскрипции, стимулирующий как скорость поглощения  $\text{NH}_4^+$ , так ростовой ответ на поступление N, и противодействующий ингибиторным эффектам *sd1* (SLR1) на эти процессы.

### **Конкурентные взаимодействия OsGRF4, SLR1 и OsGIF1 регулируют ассимиляцию $\text{NH}_4^+$**

Далее авторы изобретения определили, как активность OsGRF4 и активность SLR1 противодействуют друг другу при регуляции ассимиляции  $\text{NH}_4^+$ , сначала выявив, что изогенная линия NJ6-*sd1*-OsGRF4<sup>ngr2</sup> сохраняет карликовость, число побегов на растение и число зерен на колос, обеспечиваемые *sd1* (SLR1; фиг.3а; фиг.10а-с), в то время как ширина листьев и стебля увеличивается (фиг.10d, e). Однако, урожай зерна в NJ6-*sd1*-OsGRF4<sup>ngr2</sup> возрастает (фиг.10f). Более того, множественные подавляемые *sd1* свойства поглощения и ассимиляции N дерепрессируются посредством OsGRF4<sup>ngr2</sup>. Во-первых, показатель поглощения  $^{15}\text{NH}_4^+$  для NJ6-*sd1*-OsGRF4<sup>ngr2</sup> является более высоким, чем для NJ6-*sd1* (и сходным с NJ6), причем поглощение  $^{15}\text{NO}_3^-$  изменяется сходным образом (фиг.3b). Во-вторых, активность ключевых ферментов ассимиляции N, таких как

глутаминсинтаза побегов (GS; ассимиляция  $\text{NH}_4^+$ )<sup>21</sup> и нитратредуктаза (NR; ассимиляция  $\text{NO}_3^-$ )<sup>22</sup> при различных уровнях поступления N является значительно более высокой в NJ6-sd1-OsGRF4<sup>ngr2</sup>, чем в NJ6-sd1, и сходной с NJ6 (Фиг.3с). Таким образом, OsGRF4 стимулирует поглощение и ассимиляцию N, в то время как SLR1 ингибирует их.

Анализ с использованием полнотранскриптомного секвенирования РНК далее идентифицировал 642 гена с повышением содержания транскрипта (посредством OsGRF4) в NJ6-OsGRF4<sup>ngr2</sup> и с его снижением (посредством SLR1) в NJ6-sd1 (против NJ6) (фиг.3d), включая множество генов, связанных с поглощением и ассимиляцией N. Например, кОТ-ПЦР подтвердила повышенное содержание мРНК, кодирующей переносчики поглощения  $\text{NH}_4^+$  (например, OsAMT1.1 и OsAMT1.2<sup>13</sup>) в NJ6-sd1-OsGRF4<sup>ngr2</sup>, против снижения содержания в NJ6-sd1 (фиг.3е; фиг.11а). Аналогично, содержание мРНК, кодирующих ферменты ассимиляции  $\text{NH}_4^+$  корней и побегов (например, OsGS1.2<sup>23</sup>, OsGS2 и OsNADH-GOGAT2) и соответствующую ферментативную активность, было повышенным в NJ6-sd1-OsGRF4<sup>ngr2</sup> (фиг.3е, f; фиг.11b-d). Далее авторы изобретения продемонстрировали, что OsGRF4 усиливает метаболизм N посредством активации транскрипции. ChIP-seq увеличивал содержание нескольких мотивов (фиг.3g), причем содержание мотива GGCGGCGGCGGC, общего для множества промоторов генов метаболизма N, увеличивалось в наибольшей степени. EMSA продемонстрировал связывание OsGRF4-His с интактными, но мутантными фрагментами промотора OsAMT1.1 (фиг.3h), и ChIP-ПЦР подтвердила специфическую ассоциацию *in vivo* OsGRF4 с GCGG-содержащими промоторными фрагментами из множества генов поглощения и ассимиляции  $\text{NH}_4^+$ , включая OsAMT1.1 и OsGS1.2 (фиг.3i; фиг.11e-h). Наконец, OsGRF4 активирует транскрипцию с промоторов OsAMT1.1 и OsGS1.2 в анализе трансаактивации (фиг.3j, k; фиг.11i-l). Далее, фокусирование на связанных с  $\text{NO}_3^-$  генах, кОТ-ПЦР, ChIP, анализах трансаактивации и определении активности ферментов подтвердило, что поглощение и ассимиляция  $\text{NO}_3^-$  стимулируются посредством опосредуемой OsGRF4 активации транскрипции (фиг.3b, c; фиг.12). Таким образом, OsGRF4 является общим транскрипционным активатором метаболизма N, и он противодействует ингибиторным эффектам SLR1.

Поскольку GA стимулирует опосредуемое протеасомами разрушение SLR1<sup>8,9</sup>, авторы изобретения далее исследовали, как GA, SLR1 и OsGRF4 регулируют метаболизм N. GA повышает показатели поглощения  $^{15}\text{NH}_4^+$  NJ6 и NJ6-sd1 до сходных высоких уровней (фиг.4а). Также, в то время как ингибитор биосинтеза GA паклубутразол (PAC)<sup>24</sup> снижает поглощение  $^{15}\text{NH}_4^+$  в NJ6 и NJ6-sd1, GA устраняет этот эффект (фиг.4а). Таким образом, накопление SLR1 (вследствие sd1 или PAC) снижает поглощение  $\text{NH}_4^+$ , в то время как сниженное накопление SLR1 (вследствие GA) повышает его. Более того, дифференциальное накопление SLR1 по-разному регулирует содержание мРНК, кодирующих функции поглощения и ассимиляции  $\text{NH}_4^+$ : содержание мРНК OsAMT1.1 и OsGS1.2 увеличивается посредством GA, снижается посредством PAC и восстанавливается до более высоких уровней посредством комбинирования GA и PAC

(фиг.4b). Далее авторы изобретения обнаружили, что РАС снижает, в то время как ГА способствует увеличению содержания в ChIP-ПЦР содержащих мотив GCGG фрагментов из промоторов OsAMT1.1 и OsGS1.2 (фиг.4c). Таким образом, накопление SLR1 ингибирует, в то время как сниженное содержание SLR1 стимулирует связывание OsGRF4 с промоторами OsAMT1.1 и OsGS1.2 (фиг.4c), таким образом, влияя на уровни мРНК OsAMT1.1 и OsGS1.2, поглощение  $\text{NH}_4^+$  и ассимиляцию  $\text{NH}_4^+$  (фиг.4a, b; фиг.13).

OsGRF4 взаимодействует с коактиваторами OsGIF (GRF-взаимодействующий фактор)<sup>17</sup>. BiFC (фиг.4d) и Co-IP (фиг.4e) продемонстрировали взаимодействие *in vivo* между OsGRF4, OsGIF1 и SLR1. Взаимодействия OsGRF4 вовлекают консервативный домен QLQ<sup>17</sup> (фиг.14a, b), и SLR1 взаимодействует со всеми OsGRF и OsGIF риса (фиг.14c). FRET *in vivo* продемонстрировал, что эти взаимодействия являются конкурентными, причем SLR1 ингибирует взаимодействие OsGRF4-OsGIF1 (фиг.4f, g). Кроме того, EMSA продемонстрировал, что взаимодействие OsGRF4-OsGIF1 стимулирует связывание OsGRF4 с содержащим мотив GCGG промоторным фрагментом OsAMT1.1, и что SLR1 ингибирует эту стимуляцию (фиг.4h). Таким образом, SLR1 ингибирует опосредуемую OsGRF4-OsGIF1 активацию транскрипции с промоторов OsAMT1.1 и OsGS1.2 (фиг.4i). Более того, SLR1 ингибирует самоактивацию транскрипции OsGRF4-OsGIF1 с промотора OsGRF4 (фиг.15a, b), вызывая снижение содержания мРНК OsGRF4 и содержания OsGRF4 в NJ6-sd1 (против NJ6; фиг.15c, d), и содержание мРНК OsGRF4 регулируется посредством ГА (фиг.15e, f). Таким образом, SLR1 противодействует стимулирующим эффектам OsGRF4 в отношении метаболизма N двумя путями. Во-первых, накопление SLR1 снижает накопление OsGRF4 (посредством ингибирования транскрипции OsGRF4). Во-вторых, SLR1 ингибирует образование комплексов OsGRF4-OsGIF1, таким образом, снижая транскрипцию OsGRF4-активируемых генов метаболизма N.

### **Взаимодействие OsGRF4-SLR1 интегрирует ассимиляционный метаболизм и рост**

В то время как уже давно известно, что показатели поглощения N сопряжены со скоростью фотосинтетической фиксации углерода (C)<sup>25</sup>, уравнивающий молекулярный механизм, который соединяет метаболизм C и N, остается неизвестным. Поскольку взаимодействие OsGRF4-SLR1 регулирует ассимиляцию N, авторы изобретения определили, регулирует ли он также ассимиляцию C. Сначала, данные РНК-seq (фиг.3d) и сравнения посредством количественной ОТ-ПЦР NJ6-sd1-OsGRF4<sup>ngr2</sup> и NJ6-sd1 показали, что OsGRF4 активирует, в то время как SLR1 подавляет, множество генов, кодирующих компоненты механизмов фотосинтеза (например, OsCAB1, OsPsbS1 и другие; фиг.5a; фиг.16a), передачи сигнала сахаров (например, OsTPS1; фиг.5a) и транспорта сахарозы/нагрузки флоэмы (например, OsSWEET11 и другие; фиг.5a; фиг.16a). Кроме того, OsGRF4 связывается *in vivo* с содержащими GCGG промоторными фрагментами из OsPsbS1, OsTPS1 и OsSWEET11 (фиг.5b), в то время как SLR1 ингибирует активацию комплексом OsGRF4-OsGIF1 транскрипции с промоторов pOsPsbS1, pOsTPS1

и pOsSWEET11 (фиг.5с). Таким образом, авторы изобретения заключили, что сбалансированная антагонистическая взаимосвязь между OsGRF4 и SLR1 регулирует ассимиляцию как N, так и C, и обеспечивает регуляторную координирующую связь между ними.

Поскольку SLR1 ингибирует рост, авторы изобретения также определили регулирует ли взаимодействие OsGRF4-SLR1 пролиферацию клеток, продемонстрировав, что OsGRF4 активирует, в то время как SLR1 подавляет, множество генов, стимулирующих деление клеток, включая гены, кодирующие циклин-зависимые протеинкиназы cdc2 (например, OsscycA1;1 и Osscdc20s-3<sup>26,27</sup>) и другие (фиг.5d; фиг.16b). Кроме того, OsGRF4 связывается *in vivo* с GCGG-содержащими промоторными фрагментами из OsscycA1;1 и Osscdc20s-3 (фиг.5e), и GA стимулирует, в то время как SLR1 ингибирует, активацию комплексом OsGRF4-OsGIF1 транскрипции с промоторов pOsscycA1;1 и pOsscdc20s-3 (фиг.5f). Авторы изобретения сделали заключение, что равновесие антагонизма OsGRF4-SLR1 модулирует опосредуемую GA регуляцию клеточной пролиферации и обеспечивает координированную контролируемую связь, которая интегрирует рост, метаболизм N и C.

#### **Повышенное содержание OsGRF4 увеличивает устойчивый урожай GRV риса и пшеницы**

Гаплотип В промотора OsGRF4 (фиг.7d) существует в полученных путем селекции сортах *indica*, но не в современных элитных сортах *indica* или *japonica*. Тем не менее, из 225 образцов<sup>28</sup>, сорта, имеющие гаплотип В, продемонстрировали относительно высокий потенциал урожайности (фиг.17). Авторы изобретения далее оценивали возможное влияние аллельного варьирования OsGRF4 на эффективность использования N *indica* и урожай зерна, путем конструирования изогенной линии 9311-OsGRF4<sup>ngr2</sup> (имеющей фон высокоурожайного sd1-содержащего риса *indica* 9311; фиг.6а). Как ранее было обнаружено в NJ6-sd1 (фиг.3а), OsGRF4<sup>ngr2</sup> не влияет на обеспечиваемый sd1 полукарликовый фенотип 9311 при низких, средних и высоких уровнях поступления N (фиг.6а, б), но не увеличивает ширину листьев и стебля (фиг.18а, б). Также, увеличенное поглощение и ассимиляция N, обеспечиваемые OsGRF4<sup>ngr2</sup> (фиг.19), хотя и не влияют на высоту растения (фиг.6а, б), увеличивают урожай зерна 9311 и эффективность использования N. Урожай зерна возрастал в 9311-OsGRF4<sup>ngr2</sup> (против 9311) при диапазоне уровней поступления N, причем значительная стимуляция урожайности наблюдалась при относительно низких уровнях поступления N (фиг.6с). Эти увеличения урожая были следствием увеличения количества зерен на растение, степень которого возрастала при снижении поступления N (фиг.18с), и увеличения массы 1000 зерен<sup>17-19</sup> (фиг.18d). Кроме того, индекс урожайности изменялся мало (фиг.18е), предположительно, поскольку повышение биомассы (фиг.18f) уравнивает повышение урожая зерна. В то время как тотальный N в надземных частях растений 9311-OsGRF4<sup>ngr2</sup> был существенно более высоким, чем в 9311 (фиг.6d), соотношение распределения N в зерна (относительно вегетативных органов) не возрастало в значительной степени в 9311-OsGRF4<sup>ngr2</sup> (фиг.20а).

Соотношение равновесия C/N также оставалось неизменным (как и ожидалось, поскольку OsGRF4 согласованно стимулирует метаболизм как C, так и N; фиг.6е). Наконец, OsGRF4<sup>ngr2</sup> имел небольшой эффект на распределение других минеральных питательных веществ в растениях (фиг.20b-f). Эти результаты указывают на то, что увеличенное содержание OsGRF4, обеспечиваемое OsGRF4<sup>ngr2</sup>, частично разъединяет регуляцию посредством GA удлинения стебля (высоты растения) и метаболическую регуляцию N. Ассимиляция питательных веществ и урожай зерна GRV риса indica, таким образом, возрастали, в частности, при низких уровнях удобрения N.

Далее авторы изобретение определяли, повышает ли увеличенное содержание OsGRF4 аналогичным образом урожай зерна и эффективность использования N в GRV риса и пшеницы. Гетеротримерные комплексы G-белков (субъединицы G $\alpha$ , G $\beta$  и G $\gamma$ ) опосредуют ответы на множество внешних стимулов в различных организмах. Полукарликовость GRV китайского риса Japonica обеспечивается вариантом субъединицы (dep1-1) G $\gamma$ <sup>29</sup>, который снижает вегетативный ростовой ответ на N и повышает эффективность использования N<sup>21</sup>. Что касается indica, авторы изобретения обнаружили, что увеличенное содержание OsGRF4 (OsGRF4-GFP в трансгенных изогенных растениях japonica WJY7-dep1-1<sup>29</sup>, экспрессирующих p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP) не подавляла обеспечиваемую dep1-1 полукарликовость (фиг.21a), но не повышало показатели поглощения как <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, так и <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (фиг.21b-d). Кроме того, в то время как ответы в виде высоты растения, даты колошения и числа побегов на растение при различных уровнях поступления N оставались неизменными (фиг.21e-g), экспрессия p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP увеличивала как число зерен на колос (при низком N; фиг.21h), так и урожай зерна (фиг.21i) WJY7-dep1-1. Таким образом, повышенное содержание OsGRF4 повышает эффективность использования N и урожай элитных сортов риса indica и japonica.

Наконец, полукарликовость высокоурожайной китайской пшеницы GRV KN199 обеспечивается посредством мутантного аллеля Rht-B1b<sup>4,5</sup>. Как и в рисе, трансгенная экспрессия p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP не увеличивала высоту растения KN199 (фиг.6f), но увеличивала диаметр стебля и толщину оболочки (фиг.6g), длину колоса (фиг.6h) и накопление биомассы (фиг.6i). Кроме того, p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP увеличивал показатель поглощения KN199 <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (фиг.6j), тотальный N в надземных частях растения (фиг.6k) и концентрацию N в шелушенном зерне (фиг.6l). p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP также повышала урожай KN199 (фиг.6m) путем увеличения количества зерен на колос (фиг.6n), без влияния на индекс сбора (фиг.6o). Увеличенное содержание OsGRF4, таким образом, повышает урожай зерна и эффективность использования N в GRV пшеницы без влияния на полезную полукарликовость, сообщаемую мутантными аллелями Rht. Действительно, увеличенная ширина стебля и толщина оболочки, обеспечиваемая p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP (фиг.6g), вероятно, повысит прочность стебля, обеспечиваемую мутантными аллелями Rht, таким образом, дополнительно снижая потерю урожая в результате полегания. В заключение, увеличенное содержание OsGRF4 повышает урожай зерна GRV риса и

пшеницы, выращенных при умеренных уровнях удобрения N.

### **Обсуждение**

Авторы изобретения описали совокупные достижения в фундаментальной науке растений и стратегическом разведении растений. Во-первых, авторы изобретения показали, что взаимодействие OsGRF4-DELLA интегрирует регуляцию роста и метаболизма растений. OsGRF4 регулирует гомеостаз N посредством транскрипционной регуляции множества генов поглощения и ассимиляции N, и является N-регулируемым координатором метаболизма N в растениях. Важно, что OsGRF4 также координирует метаболизм C и рост. Поскольку содержание OsGRF4 само по себе является регулируемым посредством N, OsGRF4 интегрирует гомеостатический контроль метаболизма N с контролем роста и метаболизма C. Хотя уже давно предполагается их существование, принадлежность таких интеграторов ранее не была известной. Наконец, антагонистическое равновесное регуляторное взаимодействие между OsGRF4 и репрессором роста DELLA является ключевым аспектом механизма, посредством которого OsGRF4 координирует рост и метаболизм растений. По существу, физические взаимодействия DELLA-OsGRF4-OsGIF1 позволяют DELLA ингибировать активацию посредством OsGRF4-OsGIF1 промоторов генов-мишеней и сбалансированное антагонистическое взаимодействие OsGRF4-DELLA, таким образом, интегрирует скоординированную регуляцию роста и метаболизма растений.

Во-вторых, авторы изобретения показали, что увеличение содержания OsGRF4 в GRV изменяет равновесие OsGRF4-DELLA, таким образом, частично прекращая эффекты DELLA (см. также ссылку 30) в отношении роста и метаболизма GRV. В частности, увеличенное содержание OsGRF4 повышает ассимиляцию N и пролиферацию клеток GRV. Увеличенная пролиферация клеток увеличивает ширину листьев и стеблей, но имеет слабый эффект на высоту стебля. Практическим следствием этого с точки зрения разведения растений является то, что это позволяет усиленную ассимиляцию питательных веществ GRV без потери полезной карликовости, сообщаемой накоплением DELLA. Таким образом, можно достигать повышения эффективности использования N GRV, без потери урожая в результате усиления полегания. Авторы изобретения сделали заключение, что генетическое изменение OsGRF4 (и других ортологов злаковых) в настоящее время должно стать основной целью для селекционеров для повышения урожая культуры и эффективности использования питательных веществ. Такое усиление позволит будущие зеленые революции, стабильное увеличение урожая, и тем не менее снижение разрушающего окружающую среду использования N в сельском хозяйстве.

### **СПОСОБЫ**

**Растительные материалы и условия полевого выращивания.** Подробное описание зародышевой плазмы риса, использованной для позиционного клонирования и анализа гаплотипов, приведено в литературе<sup>28,21,31</sup>. Анализ QTL и клонирование на основе картирования проводили с использованием популяции, полученной в результате скрещивания между NM73 и сортом риса indica NJ6 (рекуррентный родитель). Растения

почти изогенной линии (NIL), содержащие отличающиеся комбинации аллелей *qngr2* и *sd1*, выводили путем скрещивания  $NM73 \times NJ6$  и  $NM73 \times 9311$  F<sub>1</sub> шесть раз с *NJ6*, *NJ6-sd1* и *9311* в качестве рекуррентных родителей, соответственно. Выращенные в полевых полях NIL и трансгенные растения риса выращивали в стандартных условиях затопления с расстоянием между растениями 20 см на трех экспериментальных участках Institute of Genetics and Developmental Biology, находящихся в Линшуге (провинция Хайнань), Хэфэе (Провинция Аньхой) и Пекине. Выращенные в полевых условиях растения пшеницы (китайская пшеница GRV KN199 и трансгенные производные) высевали в ходе зимнего посевного сезона в Experimental Station of the Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences (Шицзячжуан, провинция Хэбэй).

**Гидропонные условия культивирования.** Гидропонные условия культивирования модифицировали из условий Liu (2004)<sup>32</sup>. Семена дезинфицировали в 20% растворе гипохлорита натрия в течение 30 мин, тщательно промывали деионизированной водой, а затем проращивали во влажном перлите. Затем 7-дневные ростки извлекали и пересаживали в горшки с PVC, содержавшие раствор питательных веществ 40 L+N (1,25 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,5 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,75 мМ K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,667 мМ MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 40 мкМ Fe-EDTA (Na), 19 мкМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 9,1 мкМ MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,15 мкМ ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,16 мкМ CuSO<sub>4</sub> и 0,52 мкМ (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, pH 5,5). Композиции растворов питательных веществ, содержавшие различные уровни предоставляемого N, были следующими: 1N, 1,25 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,6N, 0,75 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,3N, 0,375 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,15N, 0,1875 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Все растворы питательных веществ заменяли два раза в неделю, pH доводили до 5,5 каждые сутки. Температуру поддерживали на уровне 30°C днем и 22°C ночью, и относительная влажность составляла 70%.

**Позиционное клонирование *qNGR2*.** Клонирование на основе картирования *qngr2* было основано на популяциях 1,849 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> и 3,124 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, полученных путем обратного скрещивания между *NM73* и сортом риса *indica NJ6* (с *NJ6* в качестве рекуррентного родителя).

**Трансгенные конструкции.** Кодировующую белок OsGRF4<sup>NGR2</sup> последовательность (вместе с интронными последовательностями) амплифицировали из *NJ6*. Кодировующую OsGRF4<sup>ngr2</sup> последовательность (вместе с интронами и промоторными областями, лежащими на ~3 т.п.н. выше участка начала транскрипции) амплифицировали из *NM73*. Затем эти амплифицированные фрагменты встраивали в векторы pActin::nos<sup>33</sup> и pCAMBIA1300 (CAMBIA, www.cambia.org), чтобы соответственно получить конструкции pActin::OsGRF4<sup>NGR2</sup> и pOsGRF4<sup>ngr2</sup>::OsGRF4<sup>ngr2</sup>. Полноразмерную кДНК OsGRF4<sup>ngr2</sup> вносили в векторы p35S::GFP-nos и p35S::Flag-nos<sup>31</sup>, чтобы соответственно получить конструкции p35S::OsGRF4<sup>ngr2</sup>-GFP и p35S::flag-OsGRF4<sup>ngr2</sup>. Фрагмент кДНК OsGRF4<sup>ngr2</sup> размером 300 п.н. амплифицировали и использовали для конструирования трансгена pActin::RNAi-OsGRF4, как описано в литературе<sup>29</sup>. Конструкции гРНК, требуемые для конструирования аллеля OsGRF4 с обеспеченной посредством CRISPR/Cas9 потерей функции (*osgrf4*) в генетическом фоне WYJ7 получали, как описано в литературе<sup>20,31</sup>.

Трансгенные растения риса и пшеницы получали посредством *Agrobacterium*-опосредуемой трансформации, как описано в литературе<sup>29</sup>.

**Анализ с использованием количественной ПЦР в реальном времени (кОТ-ПЦР).** Тотальные РНК экстрагировали из различных органов растения риса с использованием реагента TRIzol (Invitrogen), а затем обрабатывали свободной от РНКаз ДНКазой I (Invitrogen) в соответствии с протоколом изготовителя. Затем полноразмерную кДНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора для синтеза кДНК (TRANSGEN, AE311). Последующую кОТ-ПЦР проводили в соответствии с инструкциями изготовителя (TRANSGEN, AQ101), с использованием трех независимых препаратов РНК в качестве биологических реплик. Транскрипты гена *Actin2* риса использовали в качестве эталона.

**Анализ с использованием бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC).** Полноразмерные кДНК, соответствующие генам *SLR1*, *OsGIF1*, *OsGIF2*, *OsGIF3*, *OsGRF1*, *OsGRF2*, *OsGRF3*, *OsGRF4*, *OsGRF5*, *OsGRF6*, *OsGRF7*, *OsGRF8*, *OsGRF9*, *OsGRF10*, *OsGRF11* и *OsGRF12*, вместе как с делетированными, так и с недеLETEDрованными версиями кДНК *OsGRF4*, амплифицировали с NJ6. Полученные ампликоны встраивали в векторы pSY-735-35S-cYFP-НА или pSY-736-35S-nYFP-EE<sup>34</sup> с получением слитых конструкций. Котрансфекция конструкций (например, конструкций, кодирующих nYFP-*OsGRF4* и cYFP-*SLR1*) в эпидермальные клетки листьев табака посредством *Agrobacterium*-опосредуемой инфильтрации позволила тестирование белок-белковых взаимодействий. После инкубации в течение 48 ч в темноте исследовали сигнал YFP и фотографировали с использованием конфокального микроскопа (Zeiss LSM710). Каждый анализ BiFC повторяли по меньшей мере три раза.

**Анализ коиммунопреципитации (Co-IP).** Полноразмерную кДНК *OsGRF4*, *OsGIF1* и *SLR1* амплифицировали, а затем встраивали либо в вектор pUC-35S-НА-RBS, либо в вектор pUC-35S-flag-RBS, как описано ранее<sup>35</sup>. Протопласты *A. thaliana* трансфицировали 100 мкг плазмиды, а затем инкубировали в течение ночи в условиях низкой интенсивности. Затем из собранных протопластов экстрагировали тотальный белок путем обработки посредством 50 mM HEPES (pH7,5), 150 mM KCl, 1 mM EDTA (pH8), 0,3% Triton-X 100, 1 mM DTT с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche LifeScience). Лизаты инкубировали с магнитными гранулами, конъюгированными с антителом против метки DDDDK (MBL, M185-11) при 4°C в течение по меньшей мере 4 часов. Затем магнитные гранулы ополаскивали 6 раз буфером для экстракции и элюировали с использованием 3×Flag-пептида (Sigma-Aldrich, F4709). Иммунопреципитаты подвергали электрофоретическому разделению посредством SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare). Детекцию белков проводили с использованием иммуоблоттинга с антителами против Flag (Sigma, F1804) и против НА (Santa Cruz Biotechnology, sc-7392).

**Анализ EMSA.** Полноразмерную кДНК *OsGRF4*, *OsGIF1* и *SLR1* амплифицировали и клонировали в вектор pCold-TF (Takara). His, слитые белки *OsGRF4*-



His и SLR1-His очищали с использованием агарозы Ni-NTA (QIAGEN, 30210), в соответствии с инструкциями изготовителя. Зонды ДНК размером 47 п.н. искусственно амплифицировали и метили с использованием набора с биотиновой меткой (Biosune). Анализ задержки электрофоретического сдвига в геле для ДНК проводили с использованием набора LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Thermo Fisher Scientific, 20148).

**Анализ ChIP-кПЦР.** ~2 г двухнедельных проростков трансгенных растений риса p35S::flag-OsGRF4<sup>ngr2</sup> фиксировали с использованием 1% формальдегида в вакууме в течение 15 мин при 20-25°C, а затем гомогенизировали в жидком азоте. После выделения и лизиса ядер хроматин выделяли и подвергали ультразвуковой фрагментации на фрагменты среднего размера ~500 п.н. Иммунопреципитацию проводили с использованием антител против Flag (Sigma, F1804) в течение ночи при 4°C. Затем подвергнутая обратному сшиванию и преципитированная ДНК служила в качестве матрицы для количественной ОТ-ПЦР.

**Анализ FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции).** Контролируемые промотором 35S вируса мозаики цветной капусты слитые конструкции с С-концевыми метками CFP или YFP создавали для получения донорного вектора p35S::OsGIF1-CFP и акцепторного вектора p35S::OsGRF4-YFP. Донорные и акцепторные векторы, с вектором p35S::SLR1 или без него, котрансформировали в клетки эпидермиса листьев табака посредством опосредуемой *Agrobacterium* инфильтрации для получения канала FRET. Трансформация вектором p35S::OsGIF1-CFP обеспечивала только донорный канал, а трансформация только вектором p35S::OsGRF4-YFP обеспечивала только акцепторный канал. Детекцию и фотографирование сигнала FRET проводили с использованием конфокального микроскопа (Zeiss LSM710).

**Анализ временной трансактивации in vitro.** Промоторные фрагменты ДНК размером ~3 т.п.н. из каждого из OsAMT1.1, OsAMT1.2, OsGS1.2, OsGS2, OsNADH-GOGAT2, OsFd-GOGAT, OsCAB1, OsTPS1, OsSWEET11, *OscycA1;1* или *Oscdc2Os-3* амплифицировали из NJ6, а затем субклонировали в вектор pUC19, содержащий репортерный ген LUC светлячка, контролируемый минимальным ТАТА-боксом 35S и 5×связывающими элементами GAL4, таким образом, получая репортерные плазмиды, содержащие определенные промоторы, слитые с LUC. Полноразмерную кДНК OsGRF4 амплифицировали и подвергали слиянию с последовательностью, кодирующей GAL4BD, таким образом, получая эффекторную плазмиду pRTBD-OsGRF4. Анализ временной трансактивации проводили с использованием протопластов риса, как описано в литературе<sup>36</sup>. Систему двойного люциферазного репортерного анализа (Promega, E1960) использовали для проведения анализа активности люциферазы с геном LUC Renilla в качестве внутреннего контроля.

**Определение концентрации минеральных питательных веществ в растениях.** Образцы из различных органов растений сушили в печи при 80°C в течение 72 часов. После гомогенизации тканей концентрации С и N определяли с использованием

элементного анализатора (IsoPrime100; Elementar), концентрации P и S определяли с использованием ICP-OES (Optima5300DV; Perkin Elmer), и концентрации K, Ca и Mg определяли с использованием атомного абсорбционного спектрофотометра (AA-6800GF; Shimadzu). Все эксперименты проводили по меньшей мере с тремя репликами.

**Анализ поглощения  $^{15}\text{N}$ .** После выращивания в гидропонной культуре в течение 4 недель проводили измерение притока  $^{15}\text{NO}_3^-$  и  $^{15}\text{NH}_4^+$  в корнях риса, как описано в литературе<sup>37,38</sup>. Корни и побеги отделяли и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  перед лиофилизацией. Корни и побеги сушили в течение ночи при  $80^\circ\text{C}$ , и содержание  $^{15}\text{N}$  определяли с использованием IsoPrime 100 (Elementar, Германия).

**Определение активности глутаминсинтазы и нитратредуктазы.** Активность глутаминсинтазы и нитратредуктазы соответственно определяли с использованием набора Glutamine Synthetase Kit (Solarbio LIFE SCIENCES, BC0910) и набора Nitrate Reductase Kit (Solarbio LIFE SCIENCES, BC0080) в соответствии с инструкциями изготовителя.

### **Способ конструирования донорных последовательностей ДНК для CRISPR**

1. Выбор двух последовательностей-мишеней по обоим концам матричной последовательности.
2. Отбор двух последовательностей размером приблизительно 100 п.н с обоих концов двух последовательностей-мишеней с получением левого плеча и правого плеча.
3. Внесение мутантного локуса/локусов в матричную последовательность приводит к репарации матричной последовательности для внесения правильных SNP.
4. Замена NGG на NXX (убедившись, что аминокислотная последовательность не изменяется) в последовательностях-мишенях обеспечивает мутантную мишень 1 и мутантную мишень 2.
5. Добавление к последовательностям-мишеням NGG по обоим концам плеч.
6. Использование KpnI для связывания донорного фрагмента с конструкцией pCXUN-cas9-U3-gDNA.
7. Использование AarI для соединения последовательности-мишени 1 (без NGG) с пространством между промотором U3 и гДНК.
8. Амплификация U3, последовательности-мишени 2 (без NGG) и гДНК, а затем использование AarI для соединения их с конструкцией pCXUN-cas9-U3-gDNA.

### **ССЫЛКИ:**

1. Pingali, P.L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. Proc. Natl Acad. Sci. USA **109**, 12302-12308 (2012).
2. Evenson, R.E. and Gollin, D. Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. Science **300**, 758-762 (2003).
3. Hedden, P. The genes of the Green Revolution. Trends Genet **19**, 5-9 (2003).
4. Peng, J. et al. Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature **400**, 256-261 (1999).
5. Zhang, C., Gao, L., Sun, J., Jia, J and Ren, Z. Haplotype variation of Green Revolution gene Rht-D1 during wheat domestication and improvement. J Integr Plant Biol. **56**, 774-780

(2014).

6. Sasaki, A. et al. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice - new insight into the rice variant that helped avert famine over thirty years ago. *Nature* **416**, 701-702 (2002).

7. Speilmeyer, W. et al. Semidwarf (sd-1), green revolution rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 9043-9048 (2002).

8. Harberd, N.P., Belfield, E. and Yasumura, Y. The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* **21**, 1328-1339 (2009).

9. Xu, H., Liu, Q., Yao, T., Fu, X. Shedding light on integrative GA signaling. *Curr Opin Plant Biol.* **21**, 89-95 (2014).

10. Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., Matsuoka, M. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* **14**, 57-70 (2002).

11. Asano, K. et al. Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**, 11034-11039 (2011).

12. Gooding, M.J., Addisu, M., Uppal, R.K., Snape, J.W. and Jones, H.E. Effect of wheat dwarfing genes on nitrogen-use efficiency. *J Agric Sci* **150**, 3-22 (2012).

13. Li, B.-Z. et al. Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice. *Rice Science* **16**, 314-322 (2009).

14. Hawkesford, M.J. Reducing the reliance on nitrogen fertilizer for wheat production. *J Cereal Sci* **59**, 276-283 (2014).

15. Zhao, X. et al. Nitrogen runoff dominates water nitrogen pollution from rice-wheat rotation in the Taihu Lake region of China. *Agric Ecosyst Environ* **156**, 1-11 (2012).

16. Conway, G. *One Billion Hungry. Can We Feed the World?* Cornell Univ. Press. USA (2012).

17. Che, R. et al. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nature Plants* **2**, 15195 (2015).

18. Duan, P. et al. Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nature Plants* **2**, 15203 (2015).

19. Hu, J. et al. A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice. *Mol Plant* **8**, 1455-1465 (2015).

20. Ma, X. et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant* **8**, 1274-1284 (2015).

21. Sun, H. et al. Heterotrimeric G proteins regulate nitrogen-use efficiency in rice. *Nat Genet.* **46**, 652-656 (2014).

22. Somers, D.A., Kuo, T., Kleinhofs, A., Warner, R.L., Oaks, A. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiol.* **72**, 949-952 (1983).

23. Tabuchi, M., Abiko, T., Yamaya, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot.* **58**, 2319-2327 (2007).

24. Peng, J. et al. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**, 3194-3205 (1997).
25. Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Stitt, M. Metabolic signalling aspects underpinning plant carbon nitrogen interactions. *Mol. Plant* **3**, 973-996 (2010).
26. Fabian, T., Lorbiecke, R., Umeda, M., Sauter, M. The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta* **211**, 376-383 (2000).
27. Sauter, M. Differential expression of a CAK (*cdc2*-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and *cdc2* genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant J.* **11**, 181-190 (1997).
28. Yu, J. et al. OsLG3 contributing to rice grain length and yield was mined by Ho-LAMap. *BMC Biol.* **15**, 28 (2017).
29. Huang, X. et al. Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet.* **41**, 494-497 (2009).
30. Serrano-Mislata, A., Bencivenga, S., Bush, M., Schiessl, K., Boden, S., Sablowski, R. DELLA genes restrict inflorescence meristem function independently of plant height. *Nat. Plants* **3**, 749-754 (2017).
31. Wang, S. et al. Non-canonical regulation of SPL transcription factors by a human OTUB1-like deubiquitinase defines a new plant type rice associated with higher grain yield. *Cell Res.* **27**, 1142-1156 (2017).
32. Liu, W.J., Zhu, Y.G., Smith, F.A., Smith, S.E. Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture? *New Phytol.* **162**, 481-488 (2004).
33. Wang, S. et al. Control of grain size, shape and quality by OsSPL16 in rice. *Nat Genet* **44**, 950-954 (2012).
34. Bracha-Drori, K. et al. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**, 419-427 (2004).
35. Chen, H. et al. Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants. *Plant Physiol.* **146**, 368-376 (2008).
36. Wang, S. et al. The OsSPL16-GW7 regulatory module determines grain shape and simultaneously improves rice yield and grain quality. *Nat. Genet.* **47**, 949-954 (2015).
37. Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., Tsay, Y.F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184-1194 (2009).
38. Loqué, D. et al. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *Plant J* **48**, 522-534 (2006).
39. Sun, Y. et al. Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. *Mol. Plant.* 628-630 (2016).
40. Nicole M. Gaudelli et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage; *Nature* volume 551, pages 464-471 (23 November 2017).
41. Kim et al. Highly efficient RNA-guided Base Editing in Mouse Embryos; *Nat*

Biotechnol. 2017 May;35(5):435-437.

42. Tomas Cermak, Erin L. Doyle, Michelle Christian, Li Wang, Yong Zhang, Clarice Schmidt, Joshua A. Baller, Nikunj V. Somia, Adam J. Bogdanove & Daniel F. Voytas. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL-effector-based constructs for DNA targeting, *Nucleic Acids Research* 2011, 39(12).

43. Neville E Sanjana., Le Cong, Yang Zhou, Margaret M Cunniff, Guoping Feng & Feng Zhang A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering, *Nature Protocols* 7, 171-192 (2012)

44. Meghdad Rahdar, Moira A. McMahon, Thazha P. Prakash, Eric E. Swayze, C. Frank Bennett and Don W. Cleveland, Synthetic CRISPR RNA-Cas9-guided genome editing in human cells *PNAS* 2015 112 (51) E7110-E7117; published ahead of print November 16, 2015, doi:10.1073/pnas.1520883112

### **СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ:**

#### **Рис**

SEQ ID NO: 1 OsGRF<sup>NGR2</sup> (геномная последовательность дикого типа)

ATGACGATGCCGTATGCCTCCCTGTCTCCGGCGGTGGCCGACCACCGCTCGTC  
 CCCGGCAGCCGCGACCGCCTCCCTCCTCCCCTTCTGCCGCTCCACCCCGCTCTCCGCG  
 TAAGCAACGCGAACCCGCGGCTACAACCCATTTTCTTGGCTCCAGTGGTGCATGTGA  
 CAACACGGTGAGACGTTGTGTGTGGGTGGGTGGGTGCAGGGGCGGTGGTGTGTGTCG  
 CGATGGGGGAGGACGCGCCGATGACCGCGAGGTGGCCGCCGGCGGCGGCGGCGAG  
 GCTGCCGCCGTTACCGCGGCGCAGTACGAGGAGCTGGAGCAGCAGGCGCTCATAT  
 ACAAGTACCTGGTGGCAGGCGTGCCCGTCCCGCCGGATCTCGTGCTCCCCATCCGCC  
 GCGGACTCGACTCCCTCGCCGCCCGCTTCTACAACCATCCCGCCCGTACGTGCTGTT  
 CCTATTTCTTGCCTCTCCTCTACCATCGCTGCATTGCTTTTGGATGCTTGTTTAGTGTC  
 GGCCTCTTTGTTTATTCCGATCAGGCGTACTTTGCTTCCATTTGTTAATTGGCTCCGG  
 GTCATTTGTTAATCCGGGTTACGCGATTCAAGAAACATGCGTGTGGTTTTTATGCTAT  
 CCTCCGGATTTGGTTATAAAAAGGCTTGTTTTTTAAATCCAAAACCTCGTGCTCGTTCA  
 CGATTAGCGCATCATTTTTTTTTTATGGGGGGGGGGGGGAGAGTTTGCCCATCAT  
 TCTGTCTCTGTTTGATCTGATAGAGGACGTGCACACGCTCTTGTCTGAAATAAAATC  
 TTTTGTATCAGTATGCCCATGGGATAAGCCATTTTCTCTGTGAACCAACACCCTGG  
 CAAACTGTTTTTTTGCTCGCCATTTTTGAGCGATTGCTAAGAACAGATAACTATGCC  
 TGCATATGGATCGGATATGGACTTCTCAAATATTCAAATGCCATTCTATTAGGAACT  
 CAAAATGCATTACCAACAATGCATTCTTGTGTGTAACACGGTTGCTACGATGTGCC  
 TGTTTTTGTACAGTTGGATATGGTCCGTA CTTCGGCAAGAAGCTGGACCCAGAGCCA  
 GGGCGGTGCCGGCGTACGGACGGCAAGAAATGGCGGTGCTCGAAGGAGGCCGCGC  
 CGGATTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTTCAAGAAAG  
 CCTGTGGAACGCAGCTGGTCGCCCAGTCCCAACCGCCCTCATCTGTTGTGCGTTCT  
 GCGGCGGCGCCCCTTGCTGCTGCCTCCAATGGCAGCAGCTTCCAAAACCACTCTCTT  
 TACCCTGCTATTGCCGGCAGCAATGGCGGGGGCGGGGGGAGGAACATGCCAGCTC  
 ATTTGGCTCGGCGTTGGGTCTCAGCTGCACATGGATAATGCTGCCCTTATGCAGC

TGTTGGTGGTGGAAACAGGCAAAGATCTCAGGTGATTGTTTCATTTCTTTTTTTTAATC  
 AAACGCCATATTTACTTGTTTAGCACTGTCTTGAATCATGATATGTATCCTTCCGTTG  
 TCTAAAAAAAAGGTGTCATGCTCTAACTGATTGGTGTGAGGTGGATGCAGTTATGAA  
 TCTGTATTTTTCTTTGTGATCGGTTAATAACTGTGTCCCATTTGTTTGCATTGGTGGC  
 AATCGAACCAGCTGTCCATGCTCAGTAGTACTACTTCGATTTGGTGTGCAATCACT  
 GAAAGTCTGAAACTTTACTCTCTGCACTGCAAAAATTTGTGTTATGTTTAGGTTTCCA  
 GAGTGTGCCTCTTTGCCCTTCCCATACTTTCTGGTATCAGTTTTTCAGCCCCAGAAGC  
 CGGGGACAGTCTCCATAAGAGATTTCTGCTCAGGTGAAACTGGGGTGCAGGGTCTT  
 AACATGGCTTTGGCCAGTAGTTTGAAACATGTACTGTCCATAAAGATGATACTACT  
 ACATATTTGTGTCTGCCCTCGCAGTGCTTGTGCCTGCTGGTAGCTGATCATGGCTTCC  
 CTTGGCATTACTCCACTTCTTTATTCCTCCACAGAATCCAGTTGTTTCTGTCTCTGCT  
 CTTCAGGGGCAGTCAATTATTTGGCCCTTGCAAAATACTATCTCTGAAGATGTCTCA  
 CCGATCACCCTATACCTGAAACATTTTCCAGTGGCCAGCGTGAGCTGCATGATGCT  
 CCAAGTCAACTCTATACTCATCCAATGTTGATGATTAGATTTTAACAATGCAACTCTT  
 TGATTTATCTTCCCTACAAAAAAAAGGAACTCTTTGATTTATCTTCGGTGAATCTCA  
 GTCTGACCTTAGTACCTAGCCTCATTATTTACTTCACCAAATGTATAACTCTACAGTG  
 CTTGTTTCGTGTTGATTTGGTTTAGTTAGTTATTGAATTATTCGGTACCTTAGTCTTT  
 GATTGTTTTTTTTCTTTCTGCTCTTGTCACTGTTTAGGGTTCAGCTGACTTGCTGC  
 TGCAACTAACTGTCTTCTGGTTTTACTGCAAAATAGAATGTTTCTTGGGCCATGATC  
 TGCTGCTATATATGATTAGTTAAACCATGGTTCTATGTTTTCTTATATGAATTCATGA  
 CAAGAATACTAACTTTTGAAAAGGTAATTTTATTTTTTTGTATGATAATAATGCTT  
 TGGATTCTTTCTAGTTTATCTGTGCGACTTAGGTTAACTACATTTCCCTCCGGTACATG  
 GATTTATTTCACTTACAATTGAGCCCTTATGAATATTTTCTTCCCTAATTTCTGTTCTA  
 AAAAGTTAGAATTGACATATTTTCGATAGGTACATGCCTAGCACTTGCATTCGTGTT  
 TCCTACTAATTCCCAATCACTGTATCTTCTCAAATTCAGGTATACTGCTTATGGCACA  
 AGATCTTTGGCGGATGAGCAGAGTCAACTCATTACTGAAGCTATCAACACATCTATT  
 GAAAATCCATGGCGGCTGCTGCCATCTCAGAACTCGCCATTTCCCTTTCAAGCTAT  
 TCTCAGCTTGGGGCACTAAGTGACCTTGGTCAGAACACCCCCAGCTCACTTTCAAAG  
 GTTCAGAGGCAGCCACTTTCGTTCTTTGGGAACGACTATGCGGCTGTCGATTCTGTG  
 AAGCAAGAGAACCAGACGCTGCGTCCCTTCTTTGATGAGTGGCCAAAGGGAAGGGA  
 TTCATGGTCAGACCTCGCTGATGAGAATGCTAATCTTTCGTCATTCTCAGGCACCCA  
 ACTGTCGATCTCCATAACCAATGGCATCCTCTGACTTCTCGGCGGCCAGTTCTCGATC  
 AACTAATGGTACGACTACTTGATCTCCCCCAATTAATTCGTGCGTGTATTATGTCTGT  
 ATCCTGCAATGTCTGAAGATTTCTTACTGAAAACGTCATCTGGTCTGTGTGCAGGTG  
 ACTGA

SEQ ID NO: 2 OsGRF<sup>NGR2</sup> (последовательность CDS дикого типа)

ATGACGATGCCGTATGCCCTCCCTGTCTCCGGCGGTGGCCGACCACCGCTCGTC  
 CCCGGCAGCCGCGACCGCCTCCCTCCTCCCCTTCTGCCGCTCCACCCCGCTCTCCGCG  
 GGCGGTGGTGTGTCGCGATGGGGGAGGACGCGCCGATGACCGCGAGGTGGCCGCC  
 GGCGGCGGCGGCGAGGCTGCCGCCGTTACCGCGGCGCAGTACGAGGAGCTGGAGC

AGCAGGCGCTCATATACAAGTACCTGGTGGCAGGCGTGCCCGTCCCGCCGGATCTC  
 GTGCTCCCCATCCGCCGCGGACTCGACTCCCTCGCCGCCCGCTTCTACAACCATCCC  
 GCCCTTGATATGGTCCGTA CTTCGGCAAGAAGCTGGACCCAGAGCCAGGGCGGTG  
 CCGGCGTACGGACGGCAAGAAATGGCGGTGCTCGAAGGAGGCCGCGCCGGATTCCA  
 AGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAA  
 ACGCAGCTGGTCGCCCAGTCCCAACCGCCCTCATCTGTTGTCGGTTCTGCGGCGGGC  
 CCCCTTGCTGCTGCCTCCAATGGCAGCAGCTTCCAAAACCACTCTCTTTACCCTGCTA  
 TTGCCGGCAGCAATGGCGGGGGCGGGGGGAGGAACATGCCCAGCTCATTTGGCTCG  
 GCGTTGGGTTCTCAGCTGCACATGGATAATGCTGCCCTTATGCAGCTGTTGGTGGT  
 GGAACAGGCAAAGATCTCAGGTATACTGCTTATGGCACAAGATCTTTGGCGGATGA  
 GCAGAGTCAACTCATTACTGAAGCTATCAACACATCTATTGAAAATCCATGGCGGCT  
 GCTGCCATCTCAGA ACTCGCCATTTCCCCTTTCAAGCTATTCTCAGCTGTGGGCACTA  
 AGTGACCTTGGTCAGAACACCCCCAGCTCACTTTCAAAGGTTTCAGAGGCAGCCACTT  
 TCGTTCTTTGGGAACGACTATGCGGCTGTCGATTCTGTGAAGCAAGAGAACCAGACG  
 CTGCGTCCCTTCTTTGATGAGTGGCCAAAGGGAAGGGATTTCATGGTCAGACCTCGCT  
 GATGAGAATGCTAATCTTTCGTCATTCTCAGGCACCCAACTGTCGATCTCCATACCA  
 ATGGCATCCTCTGACTTCTCGGCGGCCAGTTCTCGATCAACTAATGGTGACTGA

SEQ ID NO: 3 OsGRF<sup>NGR2</sup> (аминокислотная последовательность)

MTMPYASLSPAVADHRSSPAAATASLLPFCRSTPLSAGGGVVAMGEDAPMTAR  
 WPPAAAARLPPFTA AQYEELEQQALIKYL VAGVPVPPDLVLPIRRGLDSLAA RFYNHP  
 ALGYGPYFGK KLDPEPGRCRRTDGKKWRCSKEAAPDSKYCERHMRGRNRSRKP VET  
 QLVAQSQPPSSVVGSAAPLAAASNGSSFQNHSLYPAIAGSNGGGGGRNMPSSFGSALG  
 SQLHMDNAAPYAAVGGGTGKDLRYTAYGTRSLADEQSQLITEAINTSIENPWRL LPSQN  
 SPFPLSSYSQLWALS DLGQNT PSSL SKVQRQPLSFFGNDYAAVDSVKQENQTLRPF FDE  
 WPKGRDSWSDLADENANLSSFSGTQLSISIPMASSDFSAASSRSTNGD\*

SEQ ID NO: 4 OsGRF<sup>ngr2</sup> (геномная последовательность)

ATGACGATGCCGTATGCCCTCCCTGTCTCCGGCGGTGGCCGACCACCGCTCGTC  
 CCCGGCAGCCGCGACCGCCTCCCTCCTCCCCTTCTGCCGCTCCACCCCGCTCTCCGCG  
 TAAGCAACGCGAACCCGCGGCTACAACCCATTTTCTTGCTCCAGTGGTGCATGTGA  
 CAACACGGTGAGACGTTGTGTGTGGGTGGGTGGGTGCAGGGGCGGTGGTGTGTGCG  
 CGATGGGGGAGGACGCGCCGATGACCGCGAGGTGGCCGCCGGCGGCGGCGGCGAG  
 GCTGCCGCCGTTACCGCGGCGCAGTACGAGGAGCTGGAGCAGCAGGCGCTCATAT  
 ACAAGTACCTGGTGGCAGGCGTGCCCGTCCCGCCGGATCTCGTGCTCCCCATCCGCC  
 GCGGACTCGACTCCCTCGCCGCCCGCTTCTACAACCATCCCGCCCGTACGTCGTGTT  
 CCTATTTCTTGCTCTCCTCTACCATCGCTGCATTGCTTTTGGATGCTTGTTTAGTGTC  
 GGCCTCTTTGTTTATTCCGATCAGGCGTACTTTGCTTCCATTTGTTAATTGGCTCCGG  
 GTCATTTGTTAATCCGGGTACGCGATTCAAGAAACATGCGTGTGTGTTTTTATGCTA  
 TCCTCCGGATTTGGTTATAAAAAGGCTTGTTTTTAAATCCAAAACCTCGTGCTCGCTTC  
 ACGATTAGCGCATCATTTTTTTTTTTGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGTTTGCCCATCA  
 TTCTGTCTCTGTTTGATCTGATAGAGGACGTGCACACGCTCTTGTCTGAAATAAAAT

CTTTTGTTTATCAGTATGCCCATGGGATAAGCCATTTTCTCTGTGAACCAACACCCTG  
GCAAACGTTTTTTTTGGCTCGCCATTTTGGAGCGATTGCTAAGAACAGATAACTATGC  
CCTGCATATGGATCGGATATGGACTTCTCAAATATTCAAATGCCATTCTATTAGGAA  
CTCAAATGCATTACCAACAAATGCATTCTTGTGTGTAACACGGTTGCTACGATGTG  
CCTGTTTTTGTACAGTTGGATATGGTCCGTACTTCGGCAAGAAGCTGGACCCAGAGC  
CAGGGCGGTGCCGGCGTACGGACGGCAAGAAATGGCGGTGCTCGAAGGAGGCCGC  
GCCGGATTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTAAAAGAA  
AGCCTGTGGAACGCAGCTGGTCGCCCAGTCCCAACCGCCCTCATCTGTTGTGCGTT  
CTGCGGCGGCGCCCCTTGCTGCTGCCTCCAATGGCAGCAGCTTCCAAAACCACTCTC  
TTTACCCTGCTATTGCCGGCAGCAATGGCGGGGGCGGGGGGAGGAACATGCCCAGC  
TCATTTGGCTCGGCGTTGGGTTCTCAGCTGCACATGGATAATGCTGCCCCCTTATGCA  
GCTGTTGGTGGTGGAACAGGCAAAGATCTCAGGTGATTGTTCAATTTCTTTTTTTTAA  
TCAAACGCCATATTTACTTGTAGCACTGTCTTGAATCATGATATGTATCCTTCCGT  
TGTCTAAAAAAAAGGTGTCATGCTCTAACTGATTGGTGTGAGGTGGATGCAGTTATG  
AATCTGTATTTTTCTTTGTGATCGGTTAATAACTGTGTCCCATTTGTTTGCATTGGTG  
GCAATCGAACCAGCTGTCCACGCTCAGTAGTACTACTTCGATTTGGTGCTGCAATCA  
CTGAAAGTCTGAAACTTTACTCTCTGCACTGCAAAAATTTGTGTTATGTTTAGGTTTC  
CAGAGTGCTGCCTCTTTGCCCTTCCCATACTTTCTGGTATCAGTTTTCAGCCCCAGAA  
GCCGGGGACAGTCTCATAAGAGATTTCTGCTCAGGTGAAACTGGGGTGCAGGGTC  
TTAACATGGCTTTGGCCCAGTAGTTTGAACATGTACTGTCCATAAAGATGATACTA  
CTACATATTTGTGTCTGCCCTCGCAGTGCTTGTGCCTGCTGGTAGCTGATCATGGCTT  
CCCTTGGCATTACTCCACTTCTTTATTCCTCCACAGAATCCAGTTGTTTCTGTCTCTG  
CTCTTCAGGGGCAGTCAATTATTTGGCCCTTGCAAAAATACTATCTCTGAAGATGTCT  
CACCGATCACCACTATACCTGAAACATTTTCCAGTGGCCAGCGTGAGCTGCATGATG  
CTCCAAGTCAACTCTATACTCATCCAATGTTGATGATTAGATTTTAAACAATGCAACT  
CTTTGATTTATCTTCCCTACAAAAAAAAGGAACTCTTTGATTTATCTTCGGTGAATC  
TCAGTCTGACCTTAGTACCTAGCCTCATTATTTACTTCACCAAATGTATAACTCTACA  
GTGCTTGTTCGTGTTGATTTGGTTTAGTTTAGTTATTGAATTATTCGGTCACCTTAGT  
CTTTGATTGTTTTTTTCTTTCTGCTCTTGTCACTGTTTAGGGTTCAGCTGACTTG  
CTGCTGCAACTAACTGTCTTCTGGTTTTACTGCAAAAATAGAATGTTTCTTGGGCCAT  
GATCTGCTGCTATATATGATTAGTTAAACCATGGTTCTATGTTTTCTTATATGAATTC  
ATGACAAGAATACTAACTTTTGGAAAAGGTAATTTTATTTTTTTTGTATGATAATAAT  
GCTTTGGATTCTTTCTAGTTTATCTGTCCGACTTAGGTTAACTACATTTCCCTCCGGTA  
CATGGATTTATTTCACTTACAATTGAGCCCTTATGAATATTTTCTTCTAATTCTGT  
TCTAAAAAGTTAGAATTGACATATTTTCGATAGGTACATGCCTAGCACTTGCATTG  
TGTTTCCCTACTAATCCCAATCACTGTATCTTCTCAAATTCAGGTATACTGCTTATGG  
CACAAGATCTTTGGCGGATGAGCAGAGTCAACTCATTACTGAAGCTATCAACACATC  
TATTGAAAATCCATGGCGGCTGCTGCCATCTCAGAACTCGCCATTTCCCCTTTCAAG  
CTATTCTCAGCTTGGGGCACTAAGTGACCTTGGTCAGAACACCCCCAGCTCACTTTC  
AAAGGTTTCAAGGCAGCCACTTTCGTTCTTTGGGAACGACTATGCGGCTGTCGATTC



TGTGAAGCAAGAGAACCAGACGCTGCGTCCCTTCTTTGATGAGTGGCCAAAGGGAA  
 GGGATTCATGGTCAGACCTCGCTGATGAGAATGCTAATCTTTCGTCATTCTCAGGCA  
 CCCAACTGTCGATCTCCATAACCAATGGCATCCTCTGACTTCTCGGCGGCCAGTTCTC  
 GATCAACTAATGGTACGACTACTTGATCTCCCCCAATTAATTCTCGTGCCTGTTTATGT  
 CTGTATCCTGCAATGTCTGAAGATTTCTTACTGAAAACGTCATCTGGTCTGTGTGCA  
 GGTGACTGA

SEQ ID NO: 5 OsGRF<sup>ngr2</sup> (последовательность CDS)

ATGACGATGCCGTATGCCTCCCTGTCTCCGGCGGTGGCCGACCACCGCTCGTC  
 CCCGGCAGCCGCGACCGCCTCCCTCCCTTCTGCCGCTCCACCCCGCTCTCCGCG  
 GGCGGTGGTGTGTCGCGATGGGGGAGGACGCGCCGATGACCGCGAGGTGGCCGCC  
 GGCGGCGGCGGCGAGGCTGCCGCGGTTACCCGCGGCGCAGTACGAGGAGCTGGAGC  
 AGCAGGCGCTCATATAACAAGTACCTGGTGGCAGGCGTGCCCGTCCCGCCGGATCTC  
 GTGCTCCCATCCGCGCGGACTCGACTCCCTCGCCGCCCGCTTCTACAACCATCCC  
 GCCCTTGGATATGGTCCGTAATTCGGCAAGAAGCTGGACCCAGAGCCAGGGCGGTG  
 CCGGCGTACGGACGGCAAGAAATGGCGGTGCTCGAAGGAGGCCGCGCCGGATTCCA  
 AGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAA  
 ACGCAGCTGGTGCAGTCCCAACCGCCCTCATCTGTTGTCGGTTCTGCGGCGGCG  
 CCCCTTGCTGCTGCCTCCAATGGCAGCAGCTTCCAAAACCACTCTCTTTACCCTGCTA  
 TTGCCGGCAGCAATGGCGGGGGCGGGGGGAGGAACATGCCAGCTCATTTGGCTCG  
 GCGTTGGGTTCTCAGCTGCACATGGATAATGCTGCCCCTTATGCAGCTGTTGGTGGT  
 GGAACAGGCAAAGATCTCAGGTATACTGCTTATGGCACAAGATCTTTGGCGGATGA  
 GCAGAGTCAACTCATTACTGAAGCTATCAACACATCTATTGAAAATCCATGGCGGCT  
 GCTGCCATCTCAGAACTCGCCATTTCCCCTTCAAGCTATTCTCAGCTGTGGGCACTA  
 AGTGACCTTGGTCAGAACACCCCCAGCTCACTTTCAAAGGTTTCAGAGGCAGCCACTT  
 TCGTTCTTTGGGAACGACTATGCGGCTGTGCGATTCTGTGAAGCAAGAGAACCAGACG  
 CTGCGTCCCTTCTTTGATGAGTGGCCAAAGGGAAGGGATTTCATGGTCAGACCTCGCT  
 GATGAGAATGCTAATCTTTCGTCATTCTCAGGCACCCAACTGTCGATCTCCATAACCA  
 ATGGCATCCTCTGACTTCTCGGCGGCCAGTTCTCGATCAACTAATGGTACTGA

SEQ ID NO: 6 OsGRF<sup>ngr2</sup> (аминокислотная последовательность)

MTMPYASLSPAVADHRSSPAAATASLLPFCRSTPLSAGGGVVAMGEDAPMTAR  
 WPPAAAARLPPFTAAQYEELEQQALIKYKLVAGVPPDLVLPIRRGLDSLAAARFYNHP  
 ALGYGPYFGKKLDPEPGRCRRTDGKKWRCSKEAAPDSKYCERHMRGRNRKRKPVET  
 QLVAQSQPPSSVVGSAAPLAAASNGSSFQNHSLYPAIAGSNGGGGGRNMPSSFGSALG  
 SQLHMDNAAPYAAVGGGTGKDLRYTAYGTRSLADEQSQLITEAINTSIENPWRLPSQN  
 SPFPLSSYSQLWALS DLGQNT PSSL SKVQRQPLSFFGNDYAAVDSVKQENQTLRPFDE  
 WPKGRDSWSDLADENANLSSFSGTQLSISIPMASSDFSAASSRSTNGD\*

SEQ ID NO: 7: промотор OsGRF гаплотипа А

TATCGATGGCAACAGTGCATGAGCATATATTTATTTTCATTGACCTACGGTTGC  
 ATGTCTTCGATCTCTATGGAGTAGTACCGAGGCTAAGTTTAGTTTCAAACCTTTTCCTT  
 CAAACTTACAGCTTTTTTATCACATTAACCTTTCTACATACAACTTTCAAACCTTT



CCATCACATCTTTCAATTTCAACCAAACCTTTTAATTTTAACGTGAACTAAACACACC  
 CTGAATTCAAAACCTCTTTTTATTTTCCTTCAAGATGTCCGATGCACACGCTCTATGTA  
 GACGCAAGAAGATGTTGGAGCAGCAGACTAACAGTAGCAAAAAAATGGCAGGTTCG  
 AAAAGCAACTGCGACGGTTGCTCCGTCATCCTCTCATCGCCTTTTTATTGCTCCGGCG  
 TTGGGAACCGCAACAATGGAACAGCCCAAATCGACAGTCCCCTCC-  
 CCCCCCTCCCCATCCTCTCTCTCCCCACGCAATACTTGTCACTACTCGCGCTGCTCA  
 CTACAGCGTCTCTGCATGTATATCCATCTATCCATCCATTCCCCCATTTTCCAAATAA  
 AAATACAGCAAACCAAACACAAACGCAGCCTCGCACTGTAICTCGAAGAAAAATCGG  
 TGCTGTACGTACTACGCCACGAGATAACGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
 AGAGGAGAAAATGGAAATGCTACTGCTCGTACCACGCCGCTACGTCCGCTAGGTTCG  
 ACAGGCCCGGGGGGAGGCAGGTGTTTGTCTAGCTCGGGTCGGAGCGCGCCTTC  
 TCGTGTCGGGCTCGACGTCCGCGACTCCTCGCCCCTGGTCGAGAGCTCGCAGGCGCA  
 GCGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAAGCCGCGCAATAAAGGCG  
 CGCGCGCGAGCGAGCGAAGCAAAGCACCATTACTAAAGACCGCGGCGTGTGCTTGC  
 GTTGCAGCGAGCGAGAGCGAGAGAGAGATTGAGAGAGAGAGAGAGGGAAGGG

(SNP -941, -884, -855, -847, -801, -522 и -157 выделены полужирным шрифтом)

Ортологичные последовательности

**Zea Mays**

SEQ ID NO: 10: RMZM2G034876 (фактор транскрипции 6 GRF); промотор  
 размером 2 т.п.н.

TTCTAGTGTTTCAACGGAAGCCTAAGTTTCGATGGGAAGAAAGGACATGTAC  
 TAGCAAGGAACCAAACCTCCACGCATCATTCTTGCCTAGCCTTGCTTTATCGTGGCTA  
 CCTTGGACCAACAAAAGAACCAAGCAGCCCAATGTATCTGATATGGAGCTAAAAA  
 TACAACCAACTCATATTATACGTTGGATGTTTTGACTGCACTTGAGATGTTGTAAGA  
 CTTTCGGTACGCTATACATATAGAGTTGAATATACAGTTGAAGACTGCTGCAGCGGT  
 CAACTGTCTGATCTACTGTAAACTCTATGAGGAAATCGGAAACGCTACTTCCAGAGT  
 AGTGTAACCTCCGACTGGAAAACCTGTTGCAGAATACGGATAGCCTGATCAGTTAGAC  
 TGTCGGCTGCGGAGTTCAACTGTTGCAGAGTTAGAAAGAAATGATAAAATATATAG  
 TAGTTAGTATAGAGTTGATATATAGAGTAAACATGACTGTAGAGGATTGTAGTATAG  
 GGTAGATAGTTTTGCTGACCAGGACAAGATATTCCTTTTAGAGTATGAATTTAGAGT  
 AGTATGAGTGCGGATAGCCTAACTTTGTAAGTATTTTTAAAGCTTACTTTGCATACG  
 GTCTTTGTGATCTACATCTTTACTATGGCTATTTTCATGATAATAACTAGATGAGATAT  
 ATGACCAATCGAGTTGTACATATATGTTTGGGTTTTAATTAAGGGCATAAGTTAAAAG  
 CACTGAGCTTTTAAGAAAACGATGTGGTTCTAAATATGGCAGTTTATGCTTTGGTTT  
 CTAGAAACTGAATTTCTAGCATATTTCCGTAATACTTCTTAGTTGGTTTGGATAGAAAC  
 TACGACGATTATCACCGCTCTGAGGCCTAATGGCCTATGCACTTGATTCTCTCCATG  
 CCCACTCTGCCCTGTTCAAATGTTTAATTAATTTAATTTAATAATTTTGAATTCAA  
 GAATACGAGTTCAAGGTATATTTAAAATTGACATCAAAGAGAAATGAAATTAAGC  
 AATGATAGACTTGTCTTTGGGTGTGAAAAAAGCTAGAACTTATTTATAAAAACCC  
 AATTCTAAACATGTATACCTAATTTTTATTATAAATCGGTTTTTAGATAGAATCGTAA

AGCCCTTGATCAGAGCATCCAACGAGCCATGAGGCCATGACGGAAGAGCGGAAGTG  
 CAGACGGCAACGGCGTTCCGCTTCATGCCGCACCCTCCAGTGTCTGTGGCCTTTAA  
 GTGCCGGCCTTGGGAACCGCGACGCAGACACAGCCCAAATCCGCAGTCACTCCTCC  
 AACACGATGCTTGTCAACCACCCTTGCTACAGTGCCTGCATCCATATCCACTCCGCTC  
 GCGCAAAAATATCCGAGTCGGAACAAACAAAGCAGCATAGGAAACAGAAGAAA  
 GCTGTACTAGTACGTGAGGACGAGGAGGGAGAGAGAGCAATACACAGAAGCCTGC  
 TACCGTGCTACGGACTACCACAACGCCAGAGGGACAACCGGACAGAGGGGGAGGC  
 AGGCCTCGCTTGTTCATCTAGCTAGGTCAGCCGGGGACGGGGTCGGAGCAGTAGAGC  
 TAAAGCCAGAGGCCAGGCTCGTAGTAGTACGTAGTAGTAGTGCCCTCCTCGTGTCAT  
 TTGGCCAGCCTTGTCCAGACGACCACACACACCAGATTACGCTTAACATTCTGTTTG  
 ACATCTAAAACCAGCCGGCTTGATCCAAATGCCTCCCTAGGTAGTAGCTTAGTCTTG  
 CTCGCCGCCTCTCCGGGAGACGACGACACGCCTGATGAGTGCCTGACGTTCCAGCGC  
 GAGGCAGACAGCGACGCAGAGAGAGACAAAGCGGGCAATAAAGGCAGCCGCGCGC  
 GAGCGAGGGAAGGGAGCGAAGCAAAGCACATCACGAGCCCAGCCTGCGCCTGCGG  
 AGGGAGGGGGCTCATTAAGAGGGGGCGCGAGCGCGACCGGCCGCGGGGAGCAAG  
 CAGCGCGCGAGAGAGACAGGTTGAG

SEQ ID NO: 11: CDS

ATGGCGATGCCGTATGCCTCTCTTTCCCCGGCAGGCGCCGCCGACCACCGCTC  
 CTCCACAGCCACGGCGTCCCTCGTCCCCTTCTGCCGCTCCACTCCGCTCTCCGCGGGC  
 GGCGGGCTGGGCGAGGAGGACGCCAGGCGAGCGCGAGGTGGCCGGCCGCGAGGC  
 CGGTGGTGCCGTTACGCCGGCGCAGTACCAGGAGCTGGAGCAGCAGGCGCTCATA  
 TACAAGTACCTGGTGGCGGGCGTGCCCGTTCCGCCGGATCTCGTGGTTCCAATCCGC  
 CGCGGCCTCGACTCCCTCGCAACCCGCTTCTACGGCCAACCCACACTCGGGTACGGA  
 CCGTACCTGGGGAGGAACTGGATCCGGAGCCCAGCCGGTGGCCGGCAACGGACGG  
 CAAGAAGTGGCGGTGCTCCAAGGAGGCCGCCCGGACTCCAAGTACTGCGAGCGCC  
 ACATGCACCGCGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGCGCC  
 CCAGTCCCAACCGCCCAGCCGCGCAGCCGTCTCCGCCGCTCCGCCCTGGCAGCCGC  
 CGCCGCCGCCACCACCAACGGCAGCGGCTTCCAGAACCACTCTCTTACCCGGCCAT  
 CGCCGGCAGCACTGGTGGTGGAGGAGGAGTTGGCGGGTCCGGCAATATCTCCTCCC  
 CGTTCTCCTCGTCGATGGGGGGATCGTCTCAGCTGCACATGGACAGTGCTGCCAGCT  
 ACTCCTACGCAGCTCTTGGTGGTGGAACTGCAAAGGATCTCAGGTACAACGCTTACG  
 GAATAAGATCTCTGGCGGACGAGCACAACCAGCTGATCGCAGAAGCCATCGACTCG  
 TCGATAGAGAGCCAGTGGCGCCTCCCCAGCTCGTTCGTTCCCGCTCTCGAGCTACCCA  
 CATCTCGGGGCGCTGGGCGACCTGGGCGGCCAGAACAGCACGGTGAGCTCGCTGCC  
 GAAGATGGAGAAGCAGCAGCCGCCCTCGTCCTTCTAGGGAACGACACCGGGGCCG  
 GCATGGCCATGGGCTCCGCCTCCGCGAAGCAGGAGGGCCAGACGCTGCGGCACTTC  
 TTCGACGAGTGGCCCAAGGCGCGGGACTCCTGGCCGGGCTCTCCGACGAGACCGC  
 CAGCCTCGCCTCGTTCCCCCGGCGACCCAGCTGTCGATGTCCATACCCATGGCGTC  
 CTCCGACTTCTCCGTGGCCAGCTCCCAGTCGCCAACGATGACTAA

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 12: аминокислотная последовательность

MAMPYASLSPAGAADHRSSTATASLVPCRSTPLSAGGGLGEEDAQASARWPA  
 ARPVVFPPTPAQYQELEQQALIYKYL VAGVPVPPDLVPIRRGLDSLATRFYQPTLGYG  
 PYLGRKLDPEPGRCRRTDGKKWRCSKEAAPDSKYCERHMHRGRNRSRKPVETQLAPQS  
 QPPAAAAVSAAPPLAAAAAATTNGSGFQNHSLYPAIAGSTGGGGGVGGSGNISSPFSS  
 MGGSSQLHMDSAASYSYAALGGGTAKDLRYNAYGIRSLADEHNQLIAE AIDSSIESQWR  
 LPSSSFPLSSYPH LGALGDLGGQNSTVSSLPKMEKQPPSSFLGNDTGAGMAMGSASAK  
 QEGQTLRHHFDEWPKARDSWPGLSDETASLASFP PATQLSMSIPMASSDFSVASSQSPND  
 D\*

SEQ ID NO: 13 GRMZM2G041223 (фактор транскрипции 8 GRF); промотор  
 размером 2 т.п.н.

AAACAATACTTATCGTTAATAAACATGACATATGATCTGATGCATAAATTT  
 GTATTTTTATTTTTAACATTGATTTTTTAAAGATTCCCAAAAGATAAACATCAAATTT  
 ATCATATAATTCCTCAAATGATACATATAAAATTTGAATACGAATATATTTTTACTTT  
 GTTTATTACTGGGAGTAAATATTGTATAAAAAATATGCAAATTTATTCTTATTTATA  
 GTAATATGCAAATAATGTATAAATAGTCCATGCTCATAAATTTTTTAGTAGCCCGCA  
 ACCCAAGGCGACCGCGAACAGTGCCAAGCCGAGCGGGGGTGTGCATGTTGGAGATG  
 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGCCCGAAAAATATCGCTGATGACTCGACGAGATAGAGGA  
 GGGAGGGAGGGAGGGAGGGCGCAGTAGGACAGGGCTGCAGGCAGGTGCTTGTCTT  
 AGCTGGAACCCTCCCGTGTGCGCCTCATCCACCGCCCCGCCCTGCCGTCCTGCCCT  
 GCGCGGCTGCGGTGCGCTATAAGGCTAGCCCAGGCCATTTGCCCTTTGCCCCCGTCC  
 GTCCGTCCCTCACCTCACCTCACCTCACCTCGGCCCGCCTCCCTCATCAGGTAGCCGT  
 AGCGAGCAGTATAGCACGCACAGCCGCCGCGCTGCCCTGCCCTGCCCTGCTCGGCGT  
 AGGCACAGGCACAGCCAGAGCGAGCGAGACAGAGGGAAAGAGACAGAGCCAGCC  
 AGGTA AAAAGGCAA AAGCACAGCACATTA AAAAGAGAGGGCCGGAAGCAGCGGCAGAG  
 CGGAGAGAGAGAGAGAACTAGAAAGCATATATGGCGATGCCCTTTGCCTCCCTGTCT  
 CCGGCAGCCGACCACCGCCCCTCCTCCCTCCTCCCCTACTGCCGCGCCGCCCTCTCT  
 CCGCGTAAGCCACCTCCCTTTGCCCCGTCCGGGAAAAAACCTCTTCTTCGCTCGGT  
 TTATGCCACCCGGAGCCGTGCTGCAGCCTGCAGGTATCTGATGCCGCGAGCTTTGCC  
 TTGCAGGGTGGGAGAGGACGCCGCCGCGCAGGCGCAACAGCAGCAGCAGCACGCT  
 ATGAGCGGCAGGTGGGCAGCGAGGCCGCCGGCGCTCTTACCGCGGCGCAGTACGA  
 GGAGCTGGAGCACCAGGCGCTTATATACAAGTACCTCGTCGCCGGCGTGCCCGTCCC  
 GCCGGACCTCCTCCTCCCCCTACGCCGAGGCTTCGTCTACCACCAACCCGCCCGTAA  
 GCAAGCACGGCCCCCGCGCCGCCTCCGCACCCCTTCACACTCACACGCACGTTAAC  
 CGCTTTTGC ACTGCACAACCCCGGCCCGGCCGGCGGGCGGTCCGTGCCTTGATCTGG  
 TTGTTTACTCGGATCGAGGGATT CAGATGTCCTCTCCGTCCGTTTGTTAATCGGCTCC  
 GGTCATTTCTTAATCTCGTCCTGGATTCGGTCCACGAAAAGCTAGAGGTCAAGATTTT  
 GCTCTCGATTACTATATCCTTGCCCTCATGTTCTAATGGAGTTTATTTTATTGGTCTGA  
 TGTGATTAGATAGGATGCTAGCCAGGCTTGTCTCCGGCCAAAAGCGGCGGTTTGTAGTT  
 TATTGATGATTGCTTCTTTCCCTTGGGGGATTTATTCCTGTCTGGTTGTTGGGAGCCTA

ACCACGCTCCTATTGCTGCTGCGGTTTACTAACCATCTGCGCCAGTACACCTACTCC  
 ATGGACCCCAAAAATACAGTTCTTCCAACCATCCCCCCTCCATCTGCTTTCTCGCGG  
 GCAAATAAAAACGTGTAGAACGACGGTGTAGTAGGCAGATCTACTCCTTGTGCCGC  
 TACGCTAGCCCGCTACCGAAGATCGGGCCCGTTTCAACCGGTTTCGTTGGTCTGAGCG  
 GAGCTAAGATGGGGCGCATTTTCATTTTTTGGTCCTTTCGTCTGATTGGAGAAGTGCC  
 CATTCCGGTATCGCTCCCCGGCCTCCAAATACGCACCGACACAGAACGTGTTTCGTAC  
 GCACGTACACATGGT

SEQ ID NO: 14: CDS

ATGCGCACCGTGCTGCTGGCCATAGCCGTTGACTCACCGGGATTCACTCCTCT  
 CTCGCGTGTGTGTGTGTGGCTTCCTTGCAGTTGGGTACGGGCCCTACTTCGGCAAGA  
 AGGTGGACCCGGAGCCCGGGCGGTGCCGGCGTACGGACGGCAAGAAGTGGCGGTG  
 CTCCAAGGAGGCCGCCCGGACTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCC  
 GCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAAGCGCAGCTCGTGCCCCCGCCGCACGCCCA  
 GCAGCAGCAGCAGCAGCAGGCCCGCGCCACCGCTGGCTTCCAGAGCCACCCCA  
 TGTACCCATCCATCCTCGCCGGCAACGGCGGGCGGCGGGGGTAGGTGGTGGT  
 GCTGGTGGCGGTGGCACGTTTCGGCCTGGGGCCACCTCTCAGCTGCACATGGACAGT  
 GCCGCTGCTTACGCGACTGCTGCTGGTGGAGGGAGCAAAGATCTCAGGTACTCTGCC  
 TACGGGGTGAAGTCTCTGTCTGGACGAGCACAGCCAGCTCTTGTCCGGCGGGCGGG  
 CATGGACGCGTCAATGGACAACCTCGTGGCGCCTGTTGCCGTCCCAAACCGCCGCCAC  
 GTTCCAGGCCACAAGCTACCCTCTGTTCGGCGCGCTGAGCGGTCTGGACGAGAGCA  
 CCATCGCCTCGCTGCCAAGACGCAGAGGGAGCCCCTCTCCTTCTTCGGGAGCGACT  
 TCGTGACCCCGAAGCAGGAGAACCAGACGCTGCGCCCCTTCTTCGACGAGTGGCCC  
 AAGTCGAGGGACTCGTGGCCGGAGCTGAACGAGGACAACAGCCTCGGCTCCTCGGC  
 CACCCAGCTCTCCATCTCCATCCCCATGGCGCCCTCCGACTTCAACACCAGCTCCAG  
 ATCGCCGAATGGAATACCGTCAAGATGAACCTGAGTAACCATGCGGACCCCAACAT  
 CTCAGAGCTGACGACTCTTTGCTGCTGGCCTGGCCTCATCGTACCTTGA

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 15: аминокислотная последовательность

MAMPFASLSPAADHRPSSLLPYCRAAPLSAVGEDAAAQAQQQQQHAMSGRWA  
 ARPPALFTAAQYEELEHQALIYKYL VAGVPVPPDLLPLRRGFVYHQPALGYGPYFGKK  
 VDPEPGRCRRTDGKKWRCSKEAAPDSKYCERHMRGRNRSRKPVEAQLVPPPHAQQQ  
 QQQQAPAPTAGFQSHPMYPSILAGNNGGGGGVGGGAGGGGTFLGPTSQLHMDSAAA  
 YATAAGGGSKDLRYSAYGVKSLSDHSQLLSGGGMDASMDNSWRLPSQTAATFQA  
 TSYPLFGALSGLDESTIASLPKTQREPLSFFGSDFVTPKQENQTLRPFDEWPKSRDSWPE  
 LINEDNSLGSSATQLSISIPMAPSDFNTSSRSPNGIPSR\*

**Triticum aestivum**

SEQ ID NO: 16: Traes\_6AL\_06A78C520, промотор размером 2 т.п.н.

GATAGTGTGGGAAGGGAGTGGAGTGGAGTGGAAATGCGGCTAGGGTTTTAGC  
 CGGAGTGCGGCCTATTTAGGTGGGGTCCGGTGGAGCCAGATCCAACATGGCAGGTAG  
 GTTCGGGCATCCCCGTA CTCCCTAAATTTGGGCTGGACTGGGGAGTGACCGGAA

GTCCGAACGTTTGC GCGTCAAAAATGCGGCGCTCGGTTGGGCATTGACCATGCAACT  
 TGCTCGGACATTTGGGGCAAGTATAGGGACTCCGATTGTAGATGCTCCTACGTCTAA  
 TTTGATACTTCATTGAGATGTGGTGTCCGATGCGTGAAAATGCTTCGAGAAGTGAGA  
 GCATCTACAGCCGACTTAGCAAATCTGGCATCTATAAGTCAGCGGGCGCCTCCGCG  
 GACGGCCCCCTCACTTGAGTTGCCGCACATTGACACACCGCAAATACGGATTCTTGAA  
 TTCATGCAATCCATTGACGTCCATCAAACGATACAAATCATCCCAATTCAACAGTTC  
 GAAACAAAATAAGACAAAAGCAAACAAATCATAATTCAACAATCCGGACATGCTAA  
 AATAAAATCAATGTCCGAGCGTGATGGTTCCTTGACCGGCTGGATCACTCGCC  
 CGACGCCATCCATATCCGCTTGCTCCGTGGCCATCCTTATGGGCAGCGAGGATGAG  
 GAGCAAGGATGGCGGACGACAAGGGCTTGAACACGGGAATAGGTGGAGGGAGTCG  
 GGAGGGGGAAGGGTTTAGGGCCTCTTTGATTACAGGATTGTCAAATAAAGGAAT  
 AGAAAAAATGCAGGAATAGGGTGACATGTCCCATAGTATCCTACAGGATTTGAAAG  
 AATGTTTGATAGCATAGGAAAAACAAGGAATTCTACAAAGAGGTTTGAGTGGATG  
 GAAATTTTTTTTCAAATGTAGTACAAATGGATCATATGGAAAAATTCCTAAGGATG  
 CCAATCCTACGAATCAAACGAGCATCACATGAAAAATTTCTAAGGATTTAAATCCTC  
 CAAAAATCCTATATAATTCCTTTAAATCAAAGGAGCGCTAGTGAATTGATGCAATTT  
 GTGCTGAAGTAAGCCTGTCCGGTTCGACGTGACGGGCGCGCCGAGACATCGCTTTC  
 ATATTTGGACTGGGTATATGGAGTGCTAGTCAGCTCAAGTGTTTGAGACGCTCGTCT  
 CGGTTTTTTTCATTTGACCTGTAATCGGGCCGTTTCGTCCGGACGTTTCGATAGAGGTTTG  
 TGGTGCAGGGATGTAGATGCACACTGCTTCCGTTATCAGTTATCACCACGACACAAG  
 AAGCAAGCACATAGTACTGTAGTAAAAAATTGACGAGGGAAAAGTGGCGCAAAC  
 GGTTGCCCCGCACCCTCTCACGGACGGACTTTAAAAGTCGGCATTGGTAACCGCAAC  
 ACAGCACAGAGAGACTACCCCCAAATCTCTCTCTCTCTCTCTATTCTATGCAATG  
 CAATAGTTGTCACCACTCGCTACAGTGCCGGCAGCATTGCATCGCATCGCATCCATA  
 TCCATTCCTCCTCACGAGAAAAAGAGAGAGAGACGAGCAATACTAGTCGTCGTCGT  
 CGTCGTAGCCTGGTACGTCTACGCTAGAGCGACAGGGAAAGAGGAGGGAGGGGGC  
 GCTTGTCATCTACTCCTCCTCGCTACTACCCTAGCTGGGATCCACAGCCTCCTCCTC  
 CTCCTCGTGTCCGCTCGTCCACATCCACCGTCTCCTCCGAGCGAGGCGGACAGCGA  
 CGCGGCCACGGAGCGAGGGAGGGAGAGAGACAAAGCCGGTAATAAAGGCGGGCGG  
 GCGCGCGCGCGCACAAAGCCAAGCAAAGCACATTAACGACGCCAGCCAGCCAGCCA  
 GCCAGCCAGCCC GCGGGGAACCCCATTAAGACGCTTCCGGGGGAGCGCCGTGGGC  
 AAGCAAGCACAGGGGCTTAGCTTAGCTTGGCTTGTGCATCGCGTGTTGTGTGCGGA  
 GAGGGAGACAGCGGCCGAGAGAGAAAG

SEQ ID NO: 17: CDS

atggcgatgccgatgectctcttccccggcaggcgaccgcccctccccggccaccgccaccgctcctctcccc  
 ttctgccgctcctccccctctccgcccggcgcaatggcggcatgggggaggaggcgccgatggacgggaggtggatggcgaggccg  
 gtgccctcacggcggcgagtaggagctggagcaccaggcctcatatacaagtacctggcggcgctgcccgtcccggcg  
 atctgtgctccccatccgccggcagtcagtcctcgcgcccgttctaccacaacccccctgccatcgggtacggatcgtacctggg  
 caagaaggtggatccggagccgggcccgtgccggcgcacggacggaagaagtggcggtgcgccaaggagggcgcctccgactcca  
 agtactgcgagcgcacatgcaccgcccggcaaccgtcaagaaagcctgtggaaacgcagctcgtccccactcccagcccgg

ccgcctccgcccgtgccgccccctgccaccggcttccacggccactcctctaccccgccgctggcgccggcaccacacgggtggggagg  
 cggggggaacaacggcatgtccatgcccggcacgttctcctccgctggggccgctcagcagcacatgggcaacaatgccgcctctc  
 cctacgggctctcggcgccgcccgaacatgcaaagattcaggtataccgcatatggaataagatctttggcagatgagcagagtcagct  
 catgacagaagccatgaacacctccgtggagaacctatggcgctgccgccatcttctcaaacgactacattcccgtctcaagctactctc  
 ctacgcttgagcaacgagtgacctgggtcagaacaacagcagcaacaacaacagcgccgtcaaggccgagcgacagcagcagcagc  
 agccgctctcctcccgggggtggcgacttcggcgccgactcccggaagcaggagaaccagacgctggggcgttcttcgacga  
 gtggccgaagacgagggactcgtgggtcgacctgaccgacgacaactcgaacgtcgctcctctcggccaccagctgtcgatctcgat  
 acctatgacgtccccgacttctccgcccagctcccagtcgcccacggcatgctgttcggcgagatgtactag

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 18: аминокислотная последовательность

MAMPYASLSPAGDRRSSPAATATASLLPFCRSSPFSAGGNGGMGEEAPMDGRW  
 MARVPFTAQAQYEELEHQALIYKYLAVGVPVPPDLVLPPIRRGIESLAARFYHNPLAIGYG  
 SYLGKKVDPEPGRCRRTDGKKWRAKEAASDSKYCERHMRGRNRSRKPVETQLVPH  
 SQPPAASAVPPLATGFHGHSLYPVGGGTNGGGGGGNGMSMPGTFSSALGPPQQHM  
 GNNAASPYAALGGAGTCKDFRYTAYGIRSLADEQSQLMTEAMNTSVENPWRLPPSSQT  
 TTFPLSSYSPQLGATSDLGQNNSSNNNSGVKAERQQQQPLSFPGCGDFGGGDSAKQEN  
 QTLRPFDEWPKTRDSWSDLTDDNSNVAFSATQLSISIPMTSPDFSAASSQSPNGMLFA  
 GEMY\*

SEQ ID NO: 19: TRIAE\_CS42\_6BL\_TGACv1\_500422\_AA1604330: промотор  
 размером 2 т.п.н.

TTTTGCACGCAACGCCCACTTGAGTTCCTCCTCTCTCAAGAGAGCATGTTGG  
 CCTTGCTCAGCCTCAGACTTGGTTCGATGCTCATTAACAGAAAGAAGTGTGGTTTCA  
 GCCTTTACATCTAGTGTCTCAATGAGTTGAGTTAGACGTTCTTTTTTCTGCTTATAAA  
 TCCCAGTCTCATTCCCTGGCCATCCTCTCAGAAATTGTCGGAGGTTTCTAATCTTATT  
 CTGCCATCTCTCGACATGTGTCCCTCCTGTAATTGGCTTAGCCCATTCGCATGCAATC  
 ATCTCCATAAATCCTTCTCGCTCAAACCAGCTTTACTCGAAAGAGAAGATGTTTTTG  
 TTTGCAACATGGGTAGCCTCACCCGAATCTAAAAAGAGTGGTGTATGATCTGAGATC  
 CCTCTATGCATTGCATGGACCGACACCAACGGATATTTTTGTTCCCACTCCACACTA  
 GCAAGTACCCTATCCAGCTTTTCATAAGTCAGAACAGGTAACGAGTTGGCCCATGTA  
 AACTGTCTACCGGTGAGCTCAATTTCTCTCAAATTGAGGCTCTCGATAATCATGTTA  
 AACATCATAGACCAACGTCCATCGAAATTGTCATTATTCTTTTCTTCTTCTCCGAA  
 TGATATTAATAACACCCCGACTAGCAGTGGCAGATTTTCATCTCCACAAATCCGCA  
 CTAGATGGGCAAGAAAATCGGGTTTAAATTGCTTGGAGGAGTGAGAGCATCTACAA  
 CCGGACTTAGCGAATCTGGGCTCTATAAGCCCGCGGGTGCCTCCGCGGACGGCCCTC  
 CCTTGAGTTGCCGCACATTCACACATCTCAAATACGGATTCTTGAATCCATGTATCC  
 ATGCACGTCCATCATAACGATATAAATCATCCCAATTCAAATGTTTGAACAAAATA  
 CGACAATGCAAAGCAAATCATAGTTCAATAATTCAGACATGCCAAATTAATAATCAA  
 TATCCGAGCATGATAGATCACTCGTTGGACGCCATCCATGCCCGCTTGCTCCGCGGC  
 CATCCTTGCGGGCGGCGAGGATGGGGAGCAAGGGTGGCGGACGGCAAGGGCTTGG  
 ACACGAAAATAGGTGGATGAAGGCGGGAGAGAGGAGGGTTTAGTGAATTTTATGCA



ATTTATGTGGGGGGTTGGCCTGTCTGGGTTCTACGTAATGGACGCGCCGAGGCATGAG  
 GGATGCCGGTCAGCTTGGGTGTTTTAGATGCCCCGTCCGGTCTTTTATTTTAAAGTCCG  
 TAATTGGGGCCGTTTCGCCGGACGTTCCATAGAGGTTTGGGGTGCCGGGAAGTAGATG  
 CACAGTACTTCCGTTATCACCACGACACAAGAAGCAAGCACATAGTACTGTTGTAA  
 AAAAATGACGAGGGAAAAGTGGCGCAAACGGTTGCCCCGCACCCTCTCACGGACGG  
 ACTTTAAAAGTCGGCATTGGTAACCGCAACACAACACAGACAGACGCACCCCAAAT  
 CTCTCTCTCTCTCTTCCCATGCAATAGTTGTCGCCACTCGCTCGCTACAGTGACCG  
 CATCGCATCGCATCCATGTCCATTCTCCCCACGAGAAAAAGAGAGAGACAGCAGA  
 AATACCAGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTAGCCTGGTACGTCTACGCTAGAGCGACAGG  
 GAAAGAGGAGGGCGCTTGTTCATCTACTCCTCCTCCTCGCCCGCTACTAGCTGGGATC  
 CACAGCCTCCTCCTCCTCCTCGTGTCTGGCCTCGTCCACATCCACCATCTCCTCCGAGC  
 GAGGTGGACAGCGACGCGGCCACGGAGCGAGTGAGAGAGACAAAGCCGGTAATAA  
 AGGCGGGCGCGCGCGCGCACAAAGCCAAGCAAAGCACATTAACGAGGCCAGCCA  
 GCCCGCAGGGAACCCCATTAAGACGCTTCCGTGGGAGCGCCGTGGGGAAGCAAGC  
 GAGCGAGCACAGGGGCTTGGCTTGC GCGTCGTGTGCTGTGTGCGCGAGAGGGAGAC  
 AGCGGCCGAGAGAGAAAAG

SEQ ID NO: 20: CDS

ATGGCGATGCCGTATGCCTCTCTTTCCCCGGCAGGGCACC GCCGCTCCTCCCC  
 GGCCGCCACC GCCTCCCTCCTCCCCTTCTGCCGCTCCTCCCCGTTCTCCGCCGGCAAT  
 GGCGGCATGGGGGAGGAGGGCGCGGATGGCCGGTAGGTGGATGGCGAGGCCGGCGC  
 CCTTACGGCGGGCGCAGTACGAGGAGCTGGAGCACCAGGCGCTGATATAACAAGTAC  
 CTGGTGGCCGGCGTGCCCGTCCCGCCGGATCTCGTGCTCCCCATCCGCCGCGGCATC  
 GAGACCCTCGCCGCCCGCTTCTACCACAACCCCTCGCCATCGGGTATGGATCGTAC  
 CTGGGCAAGAAGGTGGATCCGGAGCCCGGCCGGTGCCGGCGCACGGACGGCAAGA  
 AGTGGCGGTGCGCCAAGGAGGCCGCTCCGACTCCAAGTATTGCGAGCGCCACATG  
 CACCGCGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGTCTCGCACT  
 CCCAGCCGCCGGCCGCTCCGTCGTGCCGCCCTCGCCACC GGCTTCCACAACCACT  
 CCCTCTACCCCGCCATCGGCGGCACCAACGGTGGTGGAGGCGGGGGGAACAACGGC  
 ATGCCCAACACGTTCTCCTCCGCGCTGGGGCCTCCTCAGCAGCACATGGGCAACAAT  
 GCCTCCTCACCCTACGCGGCTCTCGGTGGCGCCGGAACATGCAAAGATTT CAGGTAT  
 ACCGCATATGGAATAAGATCTTTGGCAGACGAGCACAGTCAGCTCATGACAGAAGC  
 CATGAATACTCCGTGGAGAACCCATGGCGCCTGCCGCCATCGTCTCAAACGACCAC  
 ATTCCCCTCTCAAGCTACGCTCCTCAGCTTGGAGCAACTAGTGACCTGGGT CAGAA  
 CAACAACAGCAGCAGCAGCAACAGTGCCGTCAAGTCCGAACGGCAGCAGCAGCAG  
 CAGCCCCTCTCCTTCCCGGGGTGCGGCGACTTCGGCGGGCGGGCGCCATGGACTCC  
 GCGAAGCAGGAGAACCAGACGCTGCGGCCGTTCTTCGACGAGTGGCCCAAGACGAG  
 GGACTCGTGGTTCGGACCTGACCGACGACAACTCCAGCCTCGCCTCCTTCTCGGCCAC  
 CCAGCTGTGCATCTCGATAACCATGACGTCCTCCGACTTCTCGGCCGCCAGCTCCCA  
 GTCGCCCAACGGTATGCTGTTCCGCCGGCGAAATGTA CTAG

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 21: аминокислотная последовательность

MAMPYASLSPAGDRRSSPAATASLLPFCRSPFSAGNGGMGEEARMAGRWMAR  
 PAPFTAAQYEELEHQALIYKYL VAGVPVPPDLVLPPIRRGIETLAARFYHNPLAIGYGSYL  
 GKKVDPEPGRCRRTDGKKWRCAKEAASDSKYCERHMHRGRNRSRKPVETQLVSHSQP  
 PAASVVPLATGFHNHSLYPAIGGTNGGGGGGNGMPNTFSSALGPPQQHMGNNASSPY  
 AALGGAGTCKDFRYTAYGIRSLADEHSQLMTEAMNTSVENPWRLPPSSQTTTFPLSSYA  
 PQLGATSDLGQNNNSSSSNSAVKSERQQQQPLSFPGCGDFGGGGAMDSAKQENQTLR  
 PFFDEWPKTRDSWSDLTDDNSSLASFSAATQLSISIPMTSSDFSAASSQSPNGMLFAGEMY  
 \*

SEQ ID NO: 22: TRIAE\_CS42\_6DL\_TGACv1\_527461\_AA1704370, промотор  
 размером 2 т.п.н.

GTATGCGTTACCTTGATTTGCCACATTAGCTAGCTGAAGTTGGTTGCCCGTAC  
 ATTTGTCAGCGTTAGCGCCCTGTGACGAACTTGCCATGCTGCCCCCTGATTGTGG  
 TTTGGTCATAAGAACCTNN  
 NNN  
 NNGCAGCAA  
 TGGCCCTGAAGAAATGAGTTGATTGTA CTCTGCTGCATCCCAAGGTGGCGTTTCCGG  
 CCTTTGAGAAAGCCAAGGATCAGTGCCATCTTCGTGATTCATTCTTCTGCTTTTTCTT  
 TTCTGCTACTATGCTTTTAGTCACTGCATGAACAAGAACGCATCAACAATCCACAAA  
 AAGCGTTCTTGCTGTTTGCACGTAGAAGATAACACGGCAATCTCATAATATTTTTTG  
 CGTAGGCAACCAACACCTCATGGCAAGTAGGACATGCACATCCATTTTTCTTTCTG  
 AATTCTGGATGCCATCTATCATTTTGAAGCGATGGCAACAGAAAATAAAATAGGAT  
 GGCAAGCAATAATACATGGTGGCAACTATGGACAACGATAGATGGCAACTGACGTT  
 AGATAAAGTGGCAATTATTTTTCTCCCTCCCATGCCAAATTCCTCCTTTCTCTCC  
 CTATTTTATAGTGATTACTACGCTACCAACTACTCGCATCAAAGCCAACCCAGAAGC  
 TTGGCACAAGTCTAGCATAGTATATGGCAGATCTGGCGTATGTTGGTGGGAAAATGC  
 AAAGACACACAAATTCGTGGGGTGTTTGCCCTGATAGCGTGGATCCAGTCGCCATCT  
 TCGTGGGCAAATTTTGCAAATTCAGATTTCTGGACAAAAGAAGATCGGGGATCCAC  
 CTGTTTTAGCTCGTCGTCTTGGGAGTGC GGGGAGGGGGGTAGGGTGGGGGTGGGGT  
 GGGTGGTTAGCTGTGGGAAAGGCGCTAGGGATTTGCTCTGGTTGCCATGGCAACCA  
 GAGAAGGAAGGCGACGGAGGTAGGGGATCGGGAGATGCGAGACAATGGCGGCAGG  
 GCGGACCGGGGATCGGAAGGAGCCCGGGACAGCTGGCGTGCTGAGTCGTGCGGGC  
 AGCGCGGTCTGTTGGCCCGGACGTGTGGGCGGTTTTGCCACACACCGGACGTGCGG  
 GTTGTGGCTGCGCGCGCCCGGATGCGGTTTTGCGGGCGAGTTCTTCTCCATGCCACA  
 CGAGGCGTGCGGCACAACCACCCGATACACCACACGTGTGGCAGTTATCGGTGTTA  
 AAAAAATGACGAGAGAAAAGTGGCGCAAACGGTTGCCCCGCACCCTCTCACGGACG  
 GACTTTAAAAGTCGGCATTGGTAACCGCAACACAACACAGACAGACGCACCCCAAG  
 CCTCTCTCTATCTCTCTTCCCATGCAATAGTTGTCACCACTCGCTCGCTACAGTGC  
 CCGCATTGCATCGCATCCACATCCATATGACCATATCCATTCCCTCCACAGAAAA  
 GGAGAGAGAGGGGAGAAATACTAGTCGTCTGTCGTAGTAGCTGGTACGTCTACG

CTAGAGCGACAGGGAAAGAGGAGGGAGGGGGCGCTTGTTCATCTACTCCTCCTCCTC  
 GCCCCTAGCTGGGATCCACAGCCTCCTCCTCCTCCTCGTGTTCGGCCTCGTCCACATCC  
 ACCGTCTCCTCCGAGCGAGGTGGACAGCGACCGGCCACGGAGCGAGGGAGGGAG  
 AGAGACAAAGCCGGTAATAAAGGCGGGGGCGCGCGCGCACAAGCCAAGCAAAG  
 CACATTAACGACGCCAGCCAGCCCGCGGGGAACCCCATTAAGACGCTTCCGGGGG  
 AGCGCCGTGGGCAAGCACAGGGGCTTAGCTTAGCTTGGCTTGTGTGTTGTGTGCGCG  
 AGAGGGAGACAGCGGCCGAGAGAGAAAGATGGCG

SEQ ID NO: 23: CDS

ATGGCGATGCCGTATGCCTCTCTTTCCCCGGCAGGCGACCGCCGCTCCTCCCC  
 GGCCGCCACCGCCTCCCTCCTCCCCCTTCTGCCGCTCCTCCCCCTTCTCCGCCGGCGGC  
 GGCAATGGCGGCATGGGGGAGGAGGCGCGGATGGACGGGAGGTGGATGGCGAGGC  
 CGGTGCCCTTACGGCGGCGCAGTACGAGGAGCTGGAGCACAGGCGCTGATATAC  
 AAGTACCTGGTGGCCGGCGTGCCCGTCCCGCCGGATCTCGTGTCTCCCATCCGCCCG  
 GGCATCGAATCCCTCGCCGCCCGCTTCTACCACAACCCCTCGCCATCGGGTACGGA  
 TCGTACCTAGGCAAGAAGGTGGATCCGGAGCCGGGCCGGTGCCGGCGCACGGACGG  
 CAAGAAGTGGCGGTGCGCCAAGGAGGCGCCTCCGATTCCAAGTATTGCGAGCGCC  
 ACATGCACCGCGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGTCCC  
 GCACACCCAGCCGCCGGCCGCTCCGCCGTGCCGCCCTCGCCACCGGCTTCCACAG  
 CCACTCCCTTACCCCGCCATCGGCGGCAGCACCAACGGTGGTGGAGGCGGGGGGA  
 ACAACGGCATGTCCATGCCAGCACGTTCTCCTCCGCGCTGGGGCCGCCTCAGCAGC  
 ACATGGGCAGCAATGCCGCCTCTCCCTACGCGGCTCTCGGTGGCGCCGGTTCAGGTA  
 TACCGCATATGGAATAAGATCTTTGGCAGACGAGCACAGTCAGCTCATGACAGAAG  
 CCATGAATACCTCCGTGGAGAACCATGGCGCCTGCCGCCGTCTGTCTCAAACGACCT  
 CATTCCCGCTTTCAAGCTACGCTCCTCAGCTTGGAGCAACGAGTGACCTGGGTCAGA  
 ACAACAACCACAACAACAGCAGCAGCAACAGTGCCGTCAAGTCCGAGCGGCAGCA  
 GCCGCTCTCCTTCCCGGGGTGCGGCGACTTTGGCGGCGGCGGCATGGACTCCGCGAA  
 GCAGGAGAACCAGACGCTGCGGCCGTTCTTCGACGAGTGGCCGAAGACGAGGGACT  
 CGTGGTCGGACCTGACGGACGACAACCTCCAGCCTCGCCTCCTTCTCGGCCACCCAGC  
 TGTCGATCTCGATAACCATGACGTCCTCCGACTTCTCCGCCGCCAGCTCCCAGTCGC  
 CCAACGGTATGCTGTTCCGCCGGCGAGATGTACTAG

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 24: аминокислотная последовательность

MAMPYASLSPAGDRRSPAATASLLPFCRSPFSAGGGNNGMGEEARMDGRWM  
 ARPVPFTAQYEELEHQALIYKYL VAGVPVPPDLVLPPIRRGIESLAARFYHNPLAIGYGS  
 YLGKKVDPEPGRCRRTDGKKWRCAKEAASDSKYCERHMHRGRNRSRKPVETQLVPH  
 QPPAASAVPPLATGFHSHSLYPAIGGSTNNGGGGGNNGMSMPSTFSSALGPPQQHMGSN  
 AASPYAALGGAGTCKDFRYTAYGIRSLADEHSQMLTEAMNTSVENPWRLPPSSQTTSFP  
 LSSYAPQLGATSDLGQNNNHNNSSNSAVKSERQQPLSFPGCGDFGGGGMDSAKQENQ  
 TLRPFDEWPKTRDSWSDLTDDNSSLASFATQLSISIPMTSSDFSASSQSPNGMLFAGE  
 MY\*

**Hordeum vulgare L.**

SEQ ID NO: 25: HORVU2Hr1G101770, промотор размером 2 т.п.н.

AAAGTTCAAATAAGTTTTTCAGACCCTACCGTCATACACCTTGACGGTAGAAT  
GTGAAACCCTACCATTATATAAACGAATCCCCTTACAACAACCTTACACACGAGGT  
CAGACTCCTACCGCCATAGTTCCTAATGGTAAGGTCTTGCATCCTATCGTCTTATACT  
TGGCGGTACGGCCGTTACGCCACGTGAGCCCTTCGGCTGGCAGTTGACGGCCGCTGT  
TGTTACTCGACTGTCAGATACCTATAAACCTATCGCCAACCTGTGTAACAATGAAAA  
ACGGTCAAATCCCGAAAAAATTTTGAAGCAGGATCGCATCCTGCTAAACTTTTGACA  
AATGGTCAAACACGAAATTTTTGCCGCTCGTTGTGCCTCTGTAAGCTGGAAGCCTA  
CGGTGTCGGCCTCACCCCCACACGGTGCTGCCGCTGCTGCGCCCATCGCCAGCGCT  
TCACGCTATATATCCACCCCGTCGTCGTGTGAGTCTCACCAGGCAGATCGAGCCCTG  
CGCAGCGAGGGGAAAGAGACACACACAGCGCCACCAGGCAAGTAGTAGTAAAAGG  
CAAAAGCACGGCACATTAAGAGAGAGGCCAGCCAGCCCGGACCGGACCGGAGC  
CAAGCAGCAGCCGCAGCCGCAGCCGCAGCAGAGGAGAGAGAGAGGGAGGGAGAA  
GCATATATGGCGATGCCCTTTGCCTCCCTGTCGCCGGCAGCCGACCACCACCGCTCC  
TCCCCATCTTCCCCTTCTGCCGCTCCTCCCCTCTCTACTCGTAAGCCGGCCGGCCGG  
CCGGCCAACCGCCTCACTTCTTTCTTCGTATCTGCTTCCATCTTAGCTCGAGGGGTTC  
GCTAATGCGGTGACCGTCTCCGGCGCCTGTGTTGTGTTCCGTGTGTGCAGGGTAGGG  
GAGGAGGCGGCGCATCAGCATCCTCATCCTCAGCAGCAGCAGCACGCGATGAGCGG  
CGCGCGGTGGGCGGCGAGGCCGGCGCCCTTACGGCGGCGCAGTACGAGGAGCTGG  
AGCAGCAGGCGCTCATCTACAAGTACCTCGTCGCCGGCGTCCCCGTCCCGCAGGACC  
TCCTCCTCCCCATCCGCCGCGGCTTCGAGACCCTCGCCTCGCGCTTCTACCACCACCA  
CGCCCGTACGTACCCCATCCCTTCCCTCCTCCTACCCCGGCCAGGAGTAGTACTTGCTT  
TTTTGCATTCGCCATGCGATTTGCCCGGTTGTTTATTCGGATCGAGCACTTGCTTTTG  
CATTCGCCATGCGATTTGCCCGGCTTGTTTATTGGGATCGAGAGATTCAGGTGTGCT  
CGACCCCATCCCATGATTCCCATCTCTTTGTTAATTGCTCCGGTCATTTGTTAATCC  
CTCCCCGATTTGGCCGAGCAAAAGTCTCATTATTCTAATCCGAGCAAGCCTCGTGC  
CCCTGTTCAAAGATTTGCTCCTACCATCACACCTACCACCATCCAGCAAGCATCCC  
CTGCCTCGCCGGGTCTTTAATTTACTTGGGATTTCACTTCTCATGTCATGTCATGTGC  
TATGATTTGATTAGATGGCGCTAGTCGAGTCTTGGGTTAGTTTCCATTGGTCCTTCCG  
TGGCAAGGGGGTTATTCCTGTCTGGTTGTTGGGAGCCTCACCCACGCATTCCTCGC  
TCGCTCGCTGGTCATGTCCTGCCACGGCCGATCTCACCGATCCATCCTGCATCGCAT  
CACATGGACCCCGACGAAAAAGATCGGCAATCAACCACGCACAGCTCCTCCTTTC  
CCCGGAAATTATTTGCATACGTCTTCCCTCCTTCGTTCCCTTCTTGCGGGGTA  
AATGATTGGTTTGGTGGGGTGGGCACACAGATAGATCCAGGACGAGGACGACCGCC  
TTCGTCCGTCCCTCCGGCCGGCCGGCGTCATGATTGATTGCTACCTGCTACGGCCTTG  
GACTGGACGCGTCTCCGTTCTTCCGATCTCGCGTCTCCTCCTGAGTTGATTTCTTGGT  
CCCTCCGG

SEQ ID NO: 26: CDS

ATGAGCACCGACACATTCCAAGTGCGTACAGATGTATGGGGTATTTATCATG

AAAAAGCATTCTTGACGTGGGTGTTTTTCGTTGTTTGCAGTTGGGTACGGGTCCTACT  
 TCGGGAAGAAGCTGGATCCGGAGCCGGGGCGGTGCCGGCGGACGGACGGCAAGAA  
 GTGGCGGTGCTCCAAGGAGGCCGCTCAGGACTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGC  
 ACCGCGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGTCGCCAGCTC  
 CCACTCCCAGTCCCAGCAGCACGCCACCGCCGCCTTCCACAACCACTCGCCGTATCC  
 GGCGATCGCCACTGGCGGTGGCTCCTTCGCCCTGGGGTCTGCTCAGCTGCACATGGA  
 CACTGCTGCGCCTTACGCGACGACCGCCGGTGTGCCGGAACAAGATTTTCAGGT  
 GACCTCTTCTCTGCATATACTCTGCTGCCGTCGTGTTGATTAG

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 27: аминокислотная последовательность

MSTDTFQVRTDVWGIYHEKAFLTWVFFVVCVSWVRVLLREEAGSGAGAVPADG  
 RQEVAVLQGGRSGLQVLRAPHAPRPQPFKKACGNAARRQLPLPVPAARHRRLPQPLAV  
 SGDRHWRWLLRPGVCSAAHGHCCALRDDRRCRKRQRFQVTSSLHILCCRVD\*

**Sorghum bicolor (L.)**

SEQ ID NO: 28: SORBI\_004G269900, промотор размером 2 т.п.н.

TAAATATTGTTTATTATAGACTAAGCTTAAAAAATTCGTCTCACAAATT  
 ACAATTGAACTGTCTAATTAGTTTATATTTTTGTCTATATTTAATGCTTCATGCATAA  
 GTATAAAGATTTGACGTGACAGAGAATCTAAAAAATTTTACAAAATTGTTTGGAAC  
 AAACAAGGCCCTAGAATACAAGGCTAAGGCCTTGTTTAGATGCACCCAAAAATCCA  
 AACTTTTACAAGATTCTCCGTCACATCGAATCTTACAGCACATGCATGAAGTATTA  
 ATATAGATAAAAAATAAAAACTAATTACACAGTTTATCTGTAAATCGCGAGACAAAT  
 CTTTTAAGCCTAGTTACTCCATGATTGGACAATGTTTGTCAAATAAAAAACGAAAGTG  
 CTACAGTGTCAAATCCAAAAAGTTTTTGCATCTAAACAAGCCCTAAATATAAGGCC  
 TCGTTTAGTTCACCCCAAAAATCAAAAACTTTTCAAGATTCTCCGTCACATCGAATC  
 TTGCGGCACATGCATAAAGCACTAAATAAAGATGAAAATAAAAACTAATTGTACAG  
 TTTACGTGTAAATGAATCTTTTTAAGCCTAATTACTCCATGATTAGATAATATTTATCA  
 AATAAAAACGAAAGTTTTACGGTTTTGAAAACCAAAAAGTTTTTCGGAACCTAGCCCT  
 GTTTAAATTGAAGTTAAAATTTTTTTAGATGTCACGTTGTATGTGTCGGAAGGATAT  
 CGGGAGGGGTTTTAAGAACTAATAAAGAACAATTACATAGCTCGTCTAGAAAC  
 TGCAAGACAAATCTATTAATCATAATTAATATATCATTAGCACATATGAGTTATTAT  
 AGAACTTAAGGCTAATCATAGACTAAGCTTAAAAGATTCATCTCGCAATTCTA  
 AACCAAACTGTGTAATTAGTTTATTTTTTATTTACATTTAGTGATCAATGTATGTGTC  
 CAAAGATTTGATATGATGAATCTAAACACAAATCTAGGCCTTGTTTAGTTTCAAAT  
 ATTTTGCAAATGGACACGGTAGCTCTTTCGTTTGTATTTGACAAATATTGTCCAATC  
 ATGGACTAAATAGGCTCAAAAGATTTATCTCGTCAATTCGACCAAACTGTGCAATT  
 AGTTTTTATTTTTGTCTATATTTAGTAATTCATGCATGTGTCTAAAGATTCGATATGA  
 CGTGGAATCTGAAAATTTTTGTAAAATTTTTTGGGAACTAAACAAGACCCTAACCAT  
 CAACAATGACCGGATGTACAGTACTAGTTTCCAGTCGGCTGTCCAAACGCCCCCGC  
 TGCTCGCTCGCCGCCTCGCCGGGAGTCTCGACACGCCTGACGCTCCAGCGCGAGGCA  
 GACAGCGACGCAGAGAGAGACAAAGGGGGCAATAAAGGCAGCGCGCGGAGCACC

AGCGAGGGAGCGAAGCAAAGCACATCACGAGCCCGGAAGCTCATTAAAGAGCAACT  
 CCAGCATTAGACCCTAAAACCTAAACCCCTACTTTTAATTTGGGTGCTCTTCTACTTC  
 GTGGGGCTCAATTTTTTTTGTCTCAACTCCAACAGTAGCACCCAAATTTAGGCCCCCA  
 AACTTATTCCAGAGAGAATGACACAAGGGACCCACTCGTCAGTGTCTTTTCTTCTT  
 CCTCTTTCTTCTTCTTTGGACATGGACACAATTAGAGCATCGAGCCGGTTACCGTA  
 GGGTGTGCATGCACATAACAAGGGTAGAGAGAGAAGGAGCATGAGCTGAGGCTAGGA  
 CACGCGATGGAGGATGGGGGCTGCCCTGTTGGGCCAACAGGAATGGGGTCTAGGAG  
 AGAAATATGGGTGCCCAGCCAAATATGGGGTCTGGAGTAGGGACCGTGCTGGAGTA  
 ATGTTTTTAGTCTGAGCACCCATATTTAGCTATTGGGGCTTGAGTAGAAGCTCTGCT  
 GGAGTTGCTCTAAAGAGGGGTGCCGTCCGGCCGGCCGCGGGGAGCAAGCAGCGCGC  
 GCGAGAGACAGGTTGAG

SEQ ID NO: 29: CDS

ATGGCGATGCCGTATGCCTCTCTTTCCCCGGCAGGCGCCGACCACCGCTCCTC  
 CACGGCCACGGCGGCGTCGCTCCTCCCCTTCTGCCGCTCCACCCCGCTCTCCGCGGG  
 CGGCGGCGGCGGCCTGGGGGAGGACGCCAGTTGAGCTCGCGGTGGCCGGCCGCGA  
 GGCCGGTGGTGCCGTTACGCCGGCGCAGTACGAGGAGCTGGAGCAGCAGGCGCTC  
 ATATAAAGTACCTGGTGGCCGGCGTGCCCGTCCCGCCGGATCTCGTGTTCCAATC  
 CGCCGCGGTCTCGACTCCCTCGCAACCCGCTTCTACGGCCATCCCACACTTGGTGGG  
 TACGGGACGTACTACTTAGGCAAGAACTGGATCCGGAGCCGGGGCGGTGCCGGCG  
 TACGGACGGCAAGAAGTGGCGGTGCTCCAAGGAGGCCGCCCCAGACTCCAAGTACT  
 GCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAAACGCA  
 GCTCGTGCCCCAGTCCCAACCGCCCGCCACCGCCGCTGCCGTCTCCGCCGCTCCGCC  
 CTTGGCCTTGGCCGCGCCACCACCACCAACGGCAGCTGCTTCCAGAATCACTC  
 TCTTTACCCGGCCATTGCAGGCAGCACCGGTGGAGGTGGCGGGGCCAGCAATATCT  
 CTACCCCGTTCTCCTCGTCGATGGGGTCTGCTCAGCTGCACATGGACAATGCTGCCA  
 GCTACGCAGCTCTTGGTGGTGGAACTGCAAAGGATCTCAGGTACAACGCCTACGGA  
 ATAAGATCTTTGGCGGAGGAGCACAACCAGCTGATTGCAGAAGCCATTGACTCATC  
 AATGGAGAACCAGTGGCGCCTCCCGCCATCCCAAACCTCTTCGTTTCCGCTCTCGAG  
 CTACCCCCAGCTTGGGGCGCTGAGCAACCTGGGTGAGAGCACAGTCACCTCGCTGTC  
 GAAGATGGAGCGGCAGCAGCCACTCTCCTTCTAGGGAACTCCGAGTTCGGGGCCA  
 TGGAATCCGCCGCCAAGCAGCAGGAGAACCAGACGCTGCGGCCCTTCTTCGACGAG  
 TGGCCCAAGGCGAGGGACTCCTGGCCGGGCCTCTCCGACGACAACGCCGCAAGCCT  
 CGCTCCGTGCTTCCCGGCGACCCAGCTGTGATGCCATACCGATGGCGTCTCTCGGA  
 CTTCTCCGTGGCCAGCTCCCAGTCGCCCAACGATGACTAA

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 30: аминокислотная последовательность

MAMPYASLSPAGADHRSSATAASLLPFCRSTPLSAGGGGGLGEDAQLSSRWPA  
 ARPVVFPPTPAQYEELEQQALIKYLVAGVPVPPDLVVPIRRGLDSLATRFYGHPTLGGY  
 GTYYLGGKLDPEPGRCRRTDGKKWRCSKEAAPDSKYCERHMRGRNRSRKPVETQLV  
 PQSQPPATAAAVSAAPPLALAAATTTNGSCFQNHSLYPAIAGSTGGGGGASNISTPFSSS

MGSSQLHMDNAASYAALGGGTAKDLRYNAYGIRSLAEEHNQLIAEAIDSSMENQWRLP  
 PSQTSSFPLSSYPQLGALSNLGQSTVTSLSKMERQQPLSFLGNSEFGAMESAAKQQENQT  
 LRPFDEWPKARDSWPGLSDDNAASLAPSFATQLSMSIPMASSDFSVASSQSPNDD\*

**Glycine max (L.)**

SEQ ID NO: 31: GLYMA11G11826; промотор размером 2 т.п.н.

ACATACACTCTTTCTCTCCAAAAATAAATAAATTAATATACTAGTTTGGCT  
 TTTAATTCCCAAATTACACCATTTTTTTGTGACATTGAGATGTAGGGATTTGACAACC  
 CGACTTCTCAGTGATTTTTATTTTTTTTTAATTTAAATTTTATTTTTATTCTAAATTTAT  
 GTTTTAGTTTTAAATTATTATACACAAAAGTTAAGAAGTTAAAAAGTTGGGATTCATC  
 CCTATTTTTTATCTATGGTTTTACTCCAATTTACTCTAATCAAGAATTAAGAGAATCT  
 AACTTACTTGAATGTTATAAATCCTTCATACCTTATTTAATTCTTACCTATAAAAAAT  
 CCCAATCAAGAAAAAATCCCAATTAAGAGAATCTAACTTACTTTAATTATAACCGA  
 AACAAAGCTACGTAACCTTGATTACAAAATGTACGAGAAACCAAAATTAGTGATGGT  
 GAAAAAATCACCGACAAAAGTAAGAATCTACACGTGATCTGAGATCAGAGACATA  
 CTTAAGAAGCAACAATCAACAGCCGAAAACCAAAATTAAGGTATATATTCCTTA  
 AATTGCTTTGTCCCTTTGACTTTTGCCATCGTGATGATTAATTAAGGTTTAGCAAAC  
 CCCTTCGAACCTCATACAATTGACTGAATTGAGAATTTTATTTTCACATTTCGAGGAA  
 GCGATGCTACAACATCACTTTTTTTGTTCTGTATTGTGCTTTTTAACTGCCTTTTTTCT  
 TCTTCTTTTTTTGCCTCCCTAACAAAGACATGTAAAAGTAATTGTAATAATATTCGTT  
 TCTTATGGAATGCAATCAGTTGATTGATGTAACTATAAACTATTATCTCCTTAATATC  
 GAAAGACAAGTGAAGCCAAACACAAACAAGATAGGGCCTAGGGAGAGGTGTGGTC  
 CATGAATGATGAGGTATGGGTGACCAACAATGAATGAATAATTGAAGCATCCTTG  
 ACCGTTGCTTGAGTTTGTGTCATCCTCAATAATATACTAGTCCCTTGGCTACAGAAA  
 CCGATAAGCCTAAAACCTGGAATTGCACACATTTACGTTTTTGATTTTGATTTTGTTTT  
 TGGCAATCTCGCCCCACATCAAATGTCACCCGCATTCCGGCAAGTAGTGGATGGTTT  
 CCTCTAGCGGTGCTTTGCCTTTGGGCCACTGGGCCCGCAATTACTCCAGCCCATCAT  
 GCCTTGTTGCTGTCCGTTAAAGGGTAGCATAATAAAAATAAAAAGTAGATCAACAAAA  
 TGAGAGCAAGTATTTCAAAAAAAAAAAAAACATAGTAAAAAACACTTCCTCTATTT  
 ATATTATCAAGATTTATTTATCTTAAAACATTCATTATCTCAAAAATACCTATATTAC  
 TTAATAGTATTTTCATGAATTTAAATCTAAGTTTACTATCAAACCTCACCTTTTAAACA  
 ATTATTACACAACAAGTTATAATTGAATGTCATAAAAAAATTGATTATTGTGCTAA  
 CACGTGAAAAAATTTATATTTAATTTTTTTATGTATAATTTGTTTGGACCAATGATA  
 GAGATTAATTGTGATCTAATGAGTTATAAGAAATACGTGGCACATGATCCTAGACA  
 AAAATAAATAAGAATTGTAAAATAATGTATTTTATAGCTTTTCTGAAAGATTTTTTTT  
 TTTAATTTCTTCTCATGCCATACATGAATACATGAATGAGAATTTTTATTTTTATTTT  
 TTTGTCTGAAATAAAGTTAAAAATTGGGAGCAGTGAATGTTAAGGATGACTTTTGAC  
 TTGAATGCAACAAGAAGTAAAGTTCACTTTAAGTTGGAGGCTTGGAGCATCGCCATC  
 CATAACACAACACAATCGACAATCCTAATGGTTCCGACAAAGCTCGACCTGAGTGT  
 GATCTCATGATGTTTCTGCTCTAACTATGTTTGGATACCCAACAACAAAAAG  
 AGTGTTGTCGTGTTGTTGTAGTTAATAGTAATAGGACTAAGTAAGAGTAGTGAAAA

C

SEQ ID NO: 32: CDS

ATGAACAACAGCAGTGGCGGAGGAGGACGAGGAACTTTGATGGGTTTGAGT  
AATGGGTATTGTGGGAGGTCGCCATTCACAGTGTCTCAGTGGCAGGAACTGGAGCA  
CCAAGCTTTGATCTTCAAGTACATGCTTGCGGGTCTTCCTGTTCTCCTCTCGATCTCGTG  
TTCCCCATTCAGAACAGCTTCCACTCTACTATCTCGCTCTCGCACGCTTTCTTTCACC  
ATCCACGTTGAGTTACTGTTCCCTTCTATGGGAAGAAGGTGGACCCTGAGCCAGGAC  
GATGCAGGAGGACTGATGGAAAAAAGTGGAGGTGCTCCAAGGAAGCATAACCCAGA  
CTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGTGGCCGCAAC**CCGTTCAAGAAAGCCT**  
**GTGGAATCACA**AACTATGACTCACTCATCTTCAAAGTGTACATCACTCACTGTCACT  
GGGGGTAGTGGTGGCAGCAAAGGAACTGTAAATTTCCAAAACCTTTCTACAAATAC  
CTTTGGTAATCTCCAGGGTACCGATTCTGGAAGTACCACACCAATTATCATCTAGA  
TTCCATTCCCTATGCGATTCCAAGTAAAGAATACAGGTATGTTCAAGGACTTAAATC  
TGAGGGTGGTGAGCACTGCTTTTTTTCTGAAGCTTCTGGAAGCAACAAGGTTCTCCA  
AATGGAGTCACAGCTGGAAAACACATGGCCTTTGATGTCAACCAGAGTTGCCTCTTT  
TTCTACGTCAAATCAAGTAATGATTCCCTGTTGCATAGTGATTATCCCCGGCATT  
GTTTTTATCTGGTGAATATGTGTCGGGAGAACACGTAAAGGAGGAGGGCCAGCCTC  
TTCGACCTTTTTTAAATGAATGGCCTAAAAGCAGGGAGTCATGGTCTGGTCTAGAAG  
ATGAGAGATCCAACCAAACAGCCTTCTCCACAACCTCAACTCTCAATATCCATTCCTA  
TGTCTTCCAATTTCTCTGCAACGAGCTCTCAGTCCCCACATGGTGAAGATGAGATTC  
AATTTAGGTAA

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 33: аминокислотная последовательность

MNNSSGGGGRGTLMGLSNGYCGRSPFTVSQWQELEHQALIFKYMLAGLPVPLD  
LVFPIQNSFHSTISLSHAFFHHPTLSYCSFYGKKVDPEPGRCRRTDGKKWRCSKEAYPDS  
KYCERHMRGRNRSRKPVESQTMTHSSSTVSLTVTGGSGASKGTVNMQNLSTNTFGN  
LQGTDSGTDHTNYHLDSIPYAIPKEYRYVQGLKSEGGEHCFSEASGSNKVLQMESQL  
ENTWPLMSTRVASFSTSKSSNDSLHSDYPRHSFLSGEYVSGEHVKEEGQPLRPFNEWP  
KSRESWSGLEDRSNQTAFTSTQLSISIPMSSNFSATSSQSPHGEDEIQFR\*

**Brassica napus**

SEQ ID NO: 34: BnaA03g16700D: промотор размером 2 т.п.н.

CATACCTTCAGGATGTGTGAAGCATTCCCTATTGAATTTTGTCGATAAAATAGA  
AATTGCAAGTTGAACAAATTGCAATATATATGGAAAGATGCTAGCTAGTGCCAATA  
ATATATTAACGGAACAATTCATATTTTATATTATATAATGATTATTTTAGTTT  
TTAGTTAATACTAATAATAATAAGAAATATAACTACATAGTTTAAAATGATAGTGT  
GTTCTAAATTTGTAAATGGATATCTAAATCAGTTTAGGTGGCTTTTAAATGTTATTT  
TATGTTTATGTAAATTAATTATTGTTTTACATTTAACATTGTACTTTTTATCATAT  
TAGTTAATTAATGACACTCGTTTTTATTCTAAAATCAAATATCAGACATATTCATCT  
TTATAACAATATGAAAATTAATTTTCAGTATTAATCTAAAAAATCTATTTAAATTTTG  
ATGCGTCTGACTTATAAAAACACACACACATATATATATATATATATATATATATAT



ATTAATTAGTAAAATTTATTTTAAGAAAAATTGAAACTAATTAATTTTGGGAAAGT  
 AGTGATTATATAATAGTTTTGTTATTTTATATGCTAAAATTTATTAAGTACTTTTTTTT  
 TTAATTTGAGACTTACCAAATTACGGATCCTAAATATATTGATCTTGAATTATGATAT  
 ATTAATTAATTTTAAAGTTATCATAAATTTGTTGTGAATTCAGTTTAGGTAATTGTC  
 TATTAATTAGAAAAAAGATAAATAATGATAAAGTTATGTTAGTTATTAGTTTAATA  
 GTATTGAGGTGTAAATAAATTAAGTTGTAATGGTTAATTTATAAGTGTATTTGTGT  
 TTTAATTATATTAGATTTCAATTGATTCCACAGATAATTCAACATGTTCCATGTAATT  
 AATGTTACAGCAGAAATCTAGATAAATTTTTTTTTTAACTGGATAATGCGATTAT  
 AAACGATAAGACGATTCTATATGCGACATGTCTTATAATGATTCATGTCTGAATACA  
 TCATTTGAACCGTTTTATAAGATCTACGTTTGGTGGTATTTTTTTGTGCTATGCTGCAG  
 ATTTTTTATAAGTATTTATTTCAATTCGCATAATTTTATTTTTTTTCTAAAGATCG  
 AAACCTCCGATTTTATGGTGTGTAACATCTAGATAGAGATCTATGGATAAAACAAATA  
 TAGAGGAAGCTACACAATTTAAAGGGTCAAATAGAAACACAGAACTGAAAAGTAT  
 ACTCAGTGCCATATGATTTAATAGTATGAATTTAACTTGAACCTAATGTCGTTTGGTT  
 TGTCATCAAATGCAACTGCAAATCATATCGAAGTAACGCCCGTGTCCATAATATATCT  
 GATTAAGGACTATTATTTTCTGTTTGACAAAAAAAAGGACTATTATTTTCTCACT  
 AATCAGGCTATTGTTTTTTTCTCAATAAACTAATTTAAAGAAATACAGATTATTCAA  
 GTGCTATTTCCAAGGCAGATGCAGGTTACTATCTCTCGATCTTCATCTCGGAGTGTG  
 GTTCTTTATGTGTTTTCTGACTTGCTTTATTATACTAATATTATTAATAGATTAATGA  
 AGATTAATAGTTTAATAGATTAATGAAGACATAAACTATAATTTAATAATCATAGAT  
 TAATGAAGATTTGTGAACCCCATTAATAAAGTTTAATAGTTGTTGTTCTTATAGTCTT  
 TTACCGTATAGTTTTCTCCCCCATCTGTCTCGTCTCACTGTCTTTTCTCTCAAGTTT  
 CAAGTGCCCTAAATAAAAACCTCTTTCCCTTCTCTCTCTGTCAGAAGAAGGTCAG  
 ATACAGAACTGACTGCAAAGAACAAGCTGCAAGGTGCAGCTATTCCTTAGTAAA  
 AAGCTTTGTTCTCTTTCTTTGCTCTTCACATCCCCCAACAGAGACTTTTCTGC  
 TATTTAAAACCAGACCCTGGAAAAAGTAGCCAACACTCTCTCTTTCCC

SEQ ID NO: 35: CDS

ATGGATTTGCAACTGAAACAATGGAGGAGCAAGCAGGTGCAGACAGAGTCA  
 GAACCACAACCTTCTGCAGCTAAGATACCAAGACATGCCTTTGATCCGATTCAGTCC  
 CAACTGCAACTTCTACTGTTCTTCCACTCTTTGCCCTGAACCTGCGTCTTCTAAAC  
 TCTCCTCCTTATGTCCTGATTCTTCTTCCAGGTTCTCCAAGATGGGGAGTTTCTTTAG  
 CTCGGCACAGTGGCAAGAGCTTGAACCTACAGGCACTGATCTACAGGTACATGCTGG  
 CTGGAGCTGCTGTTCCACAAGAGCTCCTTCTACCAATCAAGAAAAGTCTTCTCCATC  
 TATCTCCTTCTACTTTCTTACCACCTACCTCATTACCAGCCTGCTTGGTATTTGGG  
 GAGGGGGGCGATGGATCCTGAGCCAGGGAGATGCAGGAGAACGGATGGTAAGAAG  
 TGGAGATGTTCAAGGGACGTCTTCGCTGGCCACAAGTACTGCGAGCGCCACATGCA  
 CCGAGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAACTCCCATAGTCAATGCTACC  
 ACCACCACTTCCATGGCTTCCCCAGCCACAGCGGCACCGTCATCAACACCATCCTCC  
 TTTGCTTTTGGCGGTGGTGAGAAAGTGGGTCAAGGTGGATCATCTAGCTTCTTCTTCT  
 CAAGTCAAAGTTGTTTCAGAGATGAAACAAGAAAGCAACAACAACAAGAGGCCATA

CGAGTCCCATAATGGATTTGGGAGCAATGGATCAGACGGAGGCCACATCTTGAGGC  
 ACTTCTTTGATGATTGGCCTCGTTCTGAAGCCGACAATAGTTCAAGCCCCATGAGCT  
 CAGCCACTTGTCTCTCCATCTCTATGCCTGGAAACTCTTCCTCAGACGTCTCTCTGAA  
 GCTGTCCACTGGTAATGAAGAGGAAGCTAGGAGCAACAACATTGGGAGGGACCAGC  
 AAAACATGAGCTGGTGGAGCGGTGGAGGTACCAACCACAACCACCATCACATGGGA  
 GGACCATTGGCTGAAGCCCTGAGATCTTCCTCATCATCTTCCCCGACCAGTGTTCTCC  
 ATCAGCTCGGTGTTTCAACGCAAGCCTTTCATTGA

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 36: аминокислотная последовательность

MDLQLKQWRSKQVQTESEPQPSAAKIPRHAFFDPIQSQTATSTVLPLFAPEPASSKL  
 SSLCPDSSSRFSKMGSSFFSSAQWQELELQALIYRYMLAGAAVPQELLPLIKSLLHLSPSY  
 FLHHLPHYQPAWYLGRGAMDPEPGRCRRTDGKKWRCSRDFVAGHKYCERHMHRGRN  
 RSRKPVETPIVNATTTTSMASPATAAPSSPSSFAFGGGEKVGQGGSSSFFFSSQSCSEMK  
 QESNNNKRPHYESHNGFGSNGSDGGHILRHFFDDWPRSEADNSSSPMSSATCLSISMPGNS  
 SSDVSLKLSTGNEEEARSNNIGRDQQNMSWWSGGGTNHNHHHMGGPLAEALRSSSSSS  
 PTSVLHQLGVSTQAFH\*

***Solanum lycopersicum***

SEQ ID NO: 37: Solyc08g075950; промотор размером 2 т.п.н.

CATTTAATTAGTTAAATCAAATACATACATATATAATTGTTATTAATTTTTAG  
 GTATGATGTACCATTAAGACTAAGAAGATCAGTGATGACGCAACGTATTTCAATTTT  
 TTTGTGGGTTAAGTATATGTCTTAAACTTAACATAGATTTAAAATTATTTAAATTGTT  
 AATACCTAAAGTTTATTTTTATTTTCATTTTTGAAAGAACAATAATTCAAGTGGGTAA  
 TTGACAAATTATTTGAATATAAAAAAATGAAAAACAGAGAAAAAAAACATTAGT  
 AAAATCATTAATTACACCAAACAATTTGGAGAATTGAAAAAGAACATTTATAAC  
 AACTCTAATATAAATAAAAAGAAAATTAATTACAAAAGTTTTTTTTTAAAAAAT  
 AAAGGGTTAGTTTAGTCATTTAGGAATCTTATCCGAGGTTTAAACAAATTTTGAATTA  
 GTTATCCCTCCATTTCTGAAGGGATAAGATAATACTAGATATGATGGATAAGCAATCC  
 ATGAGTTAAATTAAATGAAGTAACCAAAACAATGTATTAGTTGAATTAATTTTAAT  
 CCATAAATTATTCTACCTAATATTGTCTATCAAACGGGTCCTTAGTATTAGTTAACTG  
 GTGACGAGGATCATATAATTTAAAGAGTTGGGTCCAGTTTTAAAGCGTGATTATAGC  
 GAAATGAAATGTTTCTTATCCCAACAAAATTTGATTATAAAAACGAAAATGACTCTC  
 GTTGAGAAAAGAAAATTTACAAATGATATTCATCCTCCCGTAATTCTCATATAATTT  
 GTTTTTGATGTACATGAATATTTTTTAAAATAGTTTTTTTAGTTTTTACAAAATATA  
 TAATCTCACTCAACACAAACTCGTTAGGAATTAATTAAACTTTTGTGTTGATCAAC  
 ATAAGTCGCATAACTTATGAGTTTTGATATCGAACTTTGTCTGGACTGGATATAAATT  
 AGAAAACAGAGTCATGAAATACTTAATATAAGTCACATAATTTATGAATTTTGATAT  
 TAGACTTTGTCTTGCTCGAAACAAGTTTTGAATAAAAAAATTTATGCAATACGACAT  
 AACTAATGAGATTAATCACATTTGCATTATTCAAGACTCATAAATACAAAATTTCTA  
 AATTGAGTAATCTCATCTATGTCATCTGTTACATACAAAACATAAACTATCTATG  
 CCACCACACTTCTTGATGATGTGTTGGAGCTTATTTCTCAAGATATTTACATTCTTG

CTCAAACAAAAAGCACAAAGTTTCAAAAAGTAAAAAAAAAAAAAGAGAGAAAAACAA  
 TCATATATATATATATATATCAAACTAGAATAAGATCTTTTGTAGGTCATCTTAATTA  
 TTGTTGAACCTTAAAGGACAAAGTTTACATCTTTAGGGTCATGATACATTCACATGA  
 CTAATTTTGAAGATATAAAAAGAGGTGTTACATCATTTGGACCACAATAAGACA  
 TTATCCATTCTACCCCACTCCATAAGGTCCCCCTTCTTTCAATCCCCTTTTCTCCCCC  
 CATGCCCAATGCTTCCTTAAACCCTTCATTATCTTTCACAAAACCTATACTATAATG  
 TCATCATTCATATTGTTATTGTCATTTATTCTTCTCACCATAAAGTTCAATGTAAGTTT  
 GTTAATTTTGTCTTGTACATTAATAAGTACTAGTGTTATGAATGTTTCTTGATTTAC  
 TCTAATTAATCTCACTCTCTTTCTTCAGCTTTTATCTCTCTGCTCTTTCTTCCATGCT  
 TGTCCAAACCCTAGATCTGTCCCCCTCTTAGGTAACCTCAACAACTTTGCTCTCTAT  
 AACTCACACACAACACACAAAAACACATTCTTTTTCTCTTTCTCTGTGTATATGTTTG  
 TATATTAAGTATATTGTGTTGATTTCTAGGTGCAGCTTTTGTAGTGAAGTGAAAA  
 GGGGAAAGGGGGGTGGGTAATAATTTGGAAAGATTAGTTTTTTAGTGAAGGGAGAAG

SEQ ID NO: 38: CDS

ATGAGTGGCACCTCTACATCAGTAGTGGGGGGTGGGGGTGGAGGGGAGGGG  
 GGAATGGGGTATGGGTATGGTTACCGGCCGCCATTTACGGCGGTGCAATGGCAGGA  
 GCTGGAGCATCAAGCAATGATATAACAAGTACTTGGTGGCAGGTCTTCTGTGCCACC  
 TGATCTTGTTGTCCCTATTCGTCGTAGCTTTGAAGCCATCTCAGCTAGGTTCTTTCAT  
 CATCCAAGCTTGGGCTATTGTTCCCTATTATGGGAAGAAGTTTGATCCTGAGCCAGGA  
 AGGTGTAGAAGGACTGACGGAAAAAGTGGAGATGCTCAAAAGATGCATATCCTGA  
 CTCCAAATATTGCGAGCGGCACATGCATCGAGGCCGCAAC**CCGTTCAAGAAAGCCT**  
**GTGGAAT**CTCAATCTACTCCCCAGTCCTTGTGACTAGTATGTCACAAATTACAGCT  
 GGGAGCAGCAATAACAAGAGGAAGTTTCCAAAATAGCAGCAGCGGAAGCTTCCAAA  
 ACATGCCATTGTATTCTGTTGCTAATTCGGGAACGCTGAATTATGGAAGCACTGGAA  
 CAAAGCTGCAGATGGAGCCTGTCTCCTATGGAATAGATAACAAGGACTATAGGTAT  
 CTCCATGGAATTACTCCTGATGCTGATGAGCACAAATTTATCTTCAGAGGCTTCTGCT  
 ACTGTCAGAAGTTTAGGGATGAGGACCAACACAGACAGTACCTGGGTATTGCCTTCT  
 CAAATTTCTTCAAGCCCCATGGCAAGATCAAAAATGATTCTCAGCTGCTAGGTAGC  
 TCAACAGAGATGCATCTACCTAATCTACTTGAGCCTATGATTGATGCAACAATTTCA  
 AAACGACGACACCAGCATTGCTTCTTTGGCAGTGACATCGATTACCTGGAACAGTA  
 AAGGAGGAGCAGCATTCAATGCGCCCTTCTTTAACGAATGGCCCACTGCTAAAGA  
 ATCGTGGTCCAACCTCGACGATGAGGGATCCAACAAAAACAATTTCTCCACAACAC  
 AGCTCTCCATGTCCATTCCAATCGCTCCTTCCAACCTTCTCTTCAAGGAGTGCTTGCTC  
 TCCAAATGATACTTGA

(участок распознавания miR396 выделен полужирным шрифтом)

SEQ ID NO: 39: аминокислотная последовательность

MSGTSTSVVGGGGGGEGGMGYGYGYRPPFTAVQWQELEHQAMIYKYLVA  
 GLPVPPDLVVPPIRRSFEAISARFFHHPSLGYCSYYGKKFDPEPGRCRRTDGKKWRCSKDAYP  
 DSKYCERHMHRRNRNRKPVESQSTPQSLSTSMSQITAGSSNTRGSFQNSSSGSFQNMPL  
 YSVANSGLNYGSTGTKLQMEPVSYGIDNKDYRYLHGITPDADEHNLSSEASATVRSLG

MRTNTDSTWVLP SQISSSPMARSKNDSQLLGSSTEMHLPNLLPEMIDATISKRRHQHCF  
 GSDIDSPGTVKEEQHSMRPFNEWPTAKESWSNLDDDEGSNKNNFSTTQLSMSIPIAPSNF  
 SRSACSPNDT\*

SEQ ID NO: 40: промотор p35S

aattcccatggagtc aaagattcaaatagaggacctaacagaactcgccgtaaagactggcgaacagttcatacagagtctctta  
 cgactcaatgacaagaagaaaatctctcgtcaacatggaggagcacgacacgctgtctactc caaaaatatacaagatacagttcagaaga  
 ccaaagggaactgagacttttcaacaaaggtaatatccggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcactttattgtgaagatag  
 tggaaaaggaaggtggctcctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggccatcgttgaagatgccctctgccgacagtggtcccaaga  
 tggacccccaccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgcttcaaaagcaagtggtgatgtgatctccactgac  
 gtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagaccttctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacagggtac

SEQ ID NO: 41: промотор pUbi

CTGCAGTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTG  
 CATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTTGTCCACTTGTGTTGAAGTGC  
 AGTTTATCTATCTTTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATA  
 GTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGT  
 CTAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGT  
 GCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTT  
 ATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTAGT  
 ACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAATAAACTCTATTTTAGT  
 TTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATAGAATAAAATAAAGTGAATAAAATTA  
 ACAAATACCCTTTAAGAAATTAATAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTA  
 GATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAA  
 CCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGC  
 CTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATC  
 CAGAAATGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCT  
 CCTCTCACGGCACGGCAGCTACGGGGGATTCCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCT  
 TCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCTCTTTCCCAACCTCGT  
 GTTGTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCAC  
 CTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCGTCTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGA  
 TCGGCGTTCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTT  
 AGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGT  
 ACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTCTCTTTGGGGAATCCTGGG  
 ATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTGCA  
 TAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTGTTGTCGG  
 GTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTC  
 GTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGAA  
 TCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAA  
 TATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAG  
 ATGCTTTTTGTTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTTCATTCGT  
 TCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAA

CTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGATGGAAATATC  
GATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGC  
ATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAACA  
AGTATGTTTTATAATTATTTTGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGC  
TATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTC  
TTTTGTGCGATGCTCACCCCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCAG

SEQ ID NO: 42: нуклеиновая кислота Cas 9

GTCACCCCCAAGCTGTGACAAATCTATCCGAGTTTCATATAATCCCGTGATGG  
ATTGGTGAATCAGTGTGCGCTCTAGCACCTCCTTGGTAGAAGTGTATCGTTTTCGAT  
CTATCGTTGTGTCAAATACTTGAATGCGGCTGGAGCGCCGAGGTTGGTAAGAGTA  
AACAAATGGATAATATTTCCGCCTGCTCACGTATGGGTTTATCCCTGTGCTTGTGT  
ATGCGCTTAATACTTTGTCCAGATTGGCATCAGCTAGGATGACTCTCTTACTGAATTC  
CGAAATTTGCTCTATGATTTTCGTCGAGATAATGTTTGTGCTGCTCAACAAAAGTTG  
CTTCTGTTTCGTTATCTTCAGGTGAACCTTTCAACTTCTCGTAATGGGACGCTAAATAC  
AGGAAATTCACGTATTTAGACGGTAGTGCGAGTTCGTTCCCCTTTTGAAGCTCTCCG  
GCGCTAGCCAACATCCGTTTTTCGGCCATTTTCTAACTCAAACAGACTATACTTTGGT  
AGTTTAATTATGAGATCCTTTTTTACTTCTTGTAACTTTCGCCTCAAGGAAGTCGA  
TGGGGTTCTTTTCAAAGACGAGCGCTCCATAATCGTTATCCCAATAAATTCTTTGA  
CTGACTTCAGTTTCTTGGATTTTCCCTTCTCAACTTTTGCCACTACTAGGACAGAATA  
GGCAACTGTAGGGCTATCGAAGCCACCGTACTTTTTTCGGGTCCCAGTCCTTTTTACG  
AGCGATGAGCTTATCACTATTCCTTTTTTGAAGAATCGATTCCCTTGAAGAACCTCC  
GGTCTGCACCTCAGTTTTCTTACTATGTTGACTTGGGGCATGGACAAAACCTTTTCTC  
ACCGTCGCGAAGTCCCAGCCCTTATCCCATACGATTTACCTGTCTCCCCATTGGTTT  
CAATTAAGGTCGTTTTCGATCTCTCCGTTTGCCAGAGTGATTTCCGTCTTAAAGA  
AATTCATAATGTTAGAATAAAAGAAGTATTTGGCTGTAGCCTTGCCTATCTCCTGTT  
CGTTTTTCGCGATCATCTTACGGACGTCATAAACTTTGTAATCACCATAACAAACT  
CACTTTCTAGCTTCGGGTATTTCTTAATGAGTGCGGTCCCTACGACGGCATTAAAGAT  
AAGCGTCGTGCGCATGGTGGTAGTTATTTATCTCCCTAACTTTATAGAATTGAAAAT  
CCTTTCTGAAGTCCGACACCAATTTTGACTTTAAAGTGATTACTTTGACTTCCCGAAT  
CAGCTTATCGTTCTCGTCGTATTTTCGTATTCATTCGGGAATCTAGTATCTGTGCAACA  
TGCTTTGTGATTTGGCGGGTTTCCACGAGCTGACGTTTAATAAATCCGGCCTTGTCA  
AGTTCAGACAAGCCACCCCTCTCAGCTTTAGTTAAGTTATCGAACTTTCTTTGCGTTA  
TCAGTTTTCGCATTTAGGAGCTGCCGCCAATAGTTCTTCATTTTCTTTACGACTTCCTC  
GCTTGGAACATTGTCACTTTTCCCTCGGTTCTTATCCGAGCGTGTAAGCACTTTATTG  
TCGATTGAATCGTCCTTCAAAAAGGATTGGGGTACAATGTGATCGACGTCGTAATCA  
GATAAACGGTTTATGTCCAGTTCCTGATCAACATACATGTCCCTTCCATTTTGTAGGT  
AATAGAGGTAAGTTTCTCGTTCTGCAATTGGGTATTTTCCACAGGATGCTCCTTTA  
AGATCTGGCTGCCAGTTCTTTAATAACCCTCTTCTATTCTCTTCATCCGCTCTCGACT  
GTTTTTTTGGCCCTTCTGAGTCGTTTGAATTTTCGCGTGCCATCTCGATTACAATGTTTT  
CCGGTTTGTGACGTCCCATGACCTTAACTAGCTCATCCACTACTTTGACTGTCTGGAG

TATGCCCTTTTTGATGGCTGGCGAACCAGCAAGATTCGCAATATGTTTCGTGCAATGA  
GTCCCCTTGTCCGAAACCTGTGCCTTTTGTATATCCTCTTTGAAGGTTAAAGAGTCA  
TCATGGATCAGCTGCATAAAGTTTCTATTGGCGAAGCCGTCGCTCTTTAGAAAATCG  
AGAATAGTTTTACCACTTTGCTTGTCTCTTATCCCGTTGATAAGTTTCCGCGACAATC  
GTCCCAGCCCGTATAGCGACGCCTCTTTAACTGTTTCATAACCTTATCGTCGAACA  
GGTGAGCGTATGTTTTTAGTCTTTCCTCAATCATTTCGATCTTCAAAGAGGGTAAG  
AGTCAACACTATATCTTCTAAGATATCTTCATTCTCTTCGTTATCCAGGAAGTCCTTA  
TCTTTAATTATCTTTAGGAGGTCATGATACGTACCAAGTGACGCATTAATCGATCT  
TCTACCCCGGAGATCTCGACAGAATCGAAGCATTCAATTTTCTTAAAGTAGTCCTCT  
TTCAATTGCTTAACTGTCACTTTGCGGTTGGTCTTGAATAACAGATCTACTATTGCTT  
TCTTCTGTTCTCCGCTTAGAAAGGCGGGTTTACGCATGCCCTCAGTGACATACTTAA  
CTTTCGTGAGTTCATTGTACACTGTGAAATACTCGTAAAGTAAACTGTGCTTAGGCA  
ATACTTTTTTCGTTCCGTAATTTCTTGTCAAAGTTGGTCATCCTCTCGATGAACGATTG  
AGCTGACGCACCTTTATCGACAACCTCCTCAAATTCATGGAGTAATCGTTTCTTC  
GGACTTTCTTGTCAATCCATGCGAACCAGAGGTTCCCTCGGGCCAGGGGTCCCACATA  
GTAAGGTATGCGAAAGGTTAGGATTTTCTCAATCTTTTCACGATTGTCTTTGAGGAA  
CGGATAAAAATCCTCCTGCCTTCTAAGTATAGCATGCAATTCGCCTAAGTGGATTTG  
ATGTGGAATGCTACCGTTGTGCGAAAGTCCGCTGCTTTCGCAGTAGATCTTCGCGATT  
GAGTTTTACAAGCAACTCTTCCGTCCCATCCATCTTCTCTAATATGGGTTTGATAAAC  
TTGTAGAATTCCTCTTGACTCGCTCCGCCGTCAATATAACCTGCGTACCCGTTTTTCG  
ACTGATCAAAGAATATTTCTTATATTTCTCAGGCAGTTGCTGACGGACTAGGGCCT  
TGAGAAGTGTCAAGTCTTGGTGATGTTTCATCGTACCTTTTGATCATTGAAGCGGATA  
ACGGCGCCTTGGTAATCTCAGTATTAACCTCTCAGTATGTCAGATAGGAGGATTGCAT  
CGCTAAGGTTTTTGGCAGCCAAAATAAGTCCGCATACTGATCTCCAATTTGTGCCA  
GTAGATTGTCGAGATCGTCATCGTACGTGTCCTTACTAAGCTGCAATTTGGCATCTTC  
AGCTAAGTCGAAGTTCGACTTAAAATTTGGTGTGAGGCCTAGTGAGAGCGCTATAA  
GGTTACCGAACAACCCATTTTTCTTCTCTCCGGGTAATTGTGCGATCAGGTTTTCTAG  
CCGTCGGGATTTAGAGAGGCGGGCGCTAAGAATAGCCTTCGCATCCACGCCACTTG  
CATTTATAGGGTTCTCTTCAAACAACCTGATTATAGGTTTGTACTAACTGGATGAACA  
GTTTGTGACATCCGAGTTGTCCGGATTTAGATCACCTCAATGAGAAAGTGCCAC  
GGAACCTTATCATATGGGCAAGAGCCAAGTAGATTAACCTCAGGTCCGCTTTATCAG  
TTGAGTCAACTAGCTTTTTTCTGAGGTGATAAATCGTTGGGTACTTTTCATGATATGC  
CACCTCATCTACTATGTTTCAAAGATGGGGTGCCGTTTCATGTTTCTTGTCTCTTCG  
ACAAGGAAGGACTCTTCAAACGGTGAAAGAAAGAATCGTCAACTTTGGCCATCTC  
ATTGCTAAAAATTTCTTGTAAAGTAACATATTCGGTTCTTGCAGCGTGTATACCTTCTC  
CGAGCGGTTTCGTTTCAGGCGAGTCGCCTCTGCCGTTTCGCCACTATCGAATAGGAGG  
GCACCGATAAGATTCTTTTTAATCGAATGACGGTCTGTGTTCCCAACACCTTAAAT  
TTCTTTGAAGGTACTTTGTATTCATCGGTTATGACAGCCCATCCAACGGAATTAGTG  
CCGATGGCTAAACCAATAGAATACTTTTTATC

5' ATGGACCACTACCTCGACATCAGGCTCAGGCCAGACCCAGAGTTCACCA  
 GCCCAGCTCATGTCCGTCTCTTCGGCAAGCTCCACCAGGCCCTCGTGGCCCAGGGC  
 GGCGACAGGATCGGCGTGTCTTCCAGACCTCGACGAGTCCAGGTCCAGGCTCGG  
 CGAGAGGCTCCGCATCCACGCCTCCGCCGACGACCTCAGGGCCCTCCTCGCCAGGCC  
 GTGGCTGGAGGGCCTCAGGGACCACCTCCAGTTCGGCGAGCCAGCCGTGGTGCCAC  
 ACCCAACCCATACAGGCAAGTGTCCAGGGTGCAAGCCAAGTCCAACCCAGAGAGG  
 CTCAGGAGGAGGCTCATGAGGAGGCACGACCTCTCCGAGGAAGAGGCCAGGAAGC  
 GCATCCCAGACACCGTGGCCAGGGCCCTCGACCTCCCATTCGTGACCCTCAGGTCCC  
 AGTCCACCGGCCAGCACTTCCGCCTCTTCATCAGGCACGGCCCACTCCAGGTGACCG  
 CCGAGGAGGGCGGCTTTACCTGCTACGGCCTCTCCAAGGGCGGCTTCGTGCCGTGGT  
 TC

Конструкции CRISPR

SEQ ID NO: 46; последовательность нуклеиновой кислоты tracr-ПНК

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT  
 GAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

**Рис**

**Информация для мутанта с приобретением функции g.1187-1188 TC>AA  
 (мутация в участке связывания мкРНК396)**

SEQ ID NO: 47: последовательность матрицы репарации для внесения правильного  
 SNP

CCGCGCCGGATTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCG  
 TAAAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTGGTCGCCCAGTCCCAACCGCCCTC

SEQ ID NO: 48: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

GAAATGGCGGTGCTCGAAGGAGGACGGTTGCTACGATGTGCCTGTTTTTGTA  
 CAGTTGGATATGGTCCGTACTTCGGCAAGAAGCTGGACCCAGAGCCAGGGCGGTGC  
 CGGCGTACGGACGGCAAGAAATGGCGGTGCTCGAAGGAAGCCGCGCCGGATTCCAA  
 GTAAGTGCAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAAA  
 CGCAGCTGGTCGCCCAGTCCCAACCGCCCTCATCTGTTGTCGGTCTGCGGCAGCGC  
 CCCTTGCTGCTGCCTCCAATGGCAGCAGCTTCCAAAACCACTCTCTTTACCCTGCTAT  
 TGCCGGCAGCAATGGCGGGGGCGGGGGGAGGAACATGCCATCTGTTGTCGGTTCTG  
 CGGCGG

SEQ ID NO: 49: последовательность-мишень, мишень 1:

GAAATGGCGGTGCTCGAAGGAGG

SEQ ID NO: 50: последовательность протоспейсера для мишени 1:

GAAATGGCGGTGCTCGAAGG

SEQ ID NO: 51: полная последовательность нуклеиновой кислоты оРНК для  
 мишени 1:

GAAATGGCGGTGCTCGAAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
 GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

SEQ ID NO: 52: последовательность-мишень, мишень 2:

ATCTGTTGTCGGTTCTGCGGCGG

SEQ ID NO: 53: последовательность протоспейсера для мишени 2:

ATCTGTTGTCGGTTCTGCGG

SEQ ID NO: 54: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

ATCTGTTGTCGGTTCTGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

**Информации для репарации промотора в Нар.А/С -884 Т>А**

SEQ ID NO: 55: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

СТАAGTTTAGTTTCAAACSTTTTCCTTCAAACATACAGCTTTTTTATCACATTA  
AACTTTCCTACATACAAACTTTCAAACSTTTCCATCACATCTTTTAATTTCAACCAAAC  
TTCTAATTTTAACGTGAACTAAAAACACCCTGAATTCAAAACTCTTTTTATTTTCSTT  
CAAGATGTCCGATGCACACGCTCT

SEQ ID NO: 56: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGGCCATGGATAAAATGTAATTTCTATGCATA  
CAAATAAATTATCGATGGCAACAGTGCATGAGCATATATTTATTTTCATTGACCTACG  
GTTGCATGTCTTCGATCTCTATGGAGTAGTACCGATTCTAAGTTTAGTTTCAAACSTTT  
TCCTTCAAACATACAGCTTTTTTATCACATTAAAACTTTCCTACATACAAACTTTCAA  
CTTTTCCATCACATCTTTTAATTTCAACCAAACSTTCTAATTTTAACGTGAACTAAAA  
CACCCCTGAATTCAAAACTCTTTTTATTTTCSTTCAAGATGTCCGATGCACACGCTCTA  
TGTAGACGCAAGAAGATGTTAAAGCAGCAGACTAACAGTAGCAAAAAAATGGCAG  
GTCGAAAAGCAACTGCGACGGTTGCTCCGTCATCCTCTCATCGCCTTTTTATTGCTCC  
GGCGTTGGGATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 57: последовательность-мишень, мишень 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGG

SEQ ID NO: 58: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCG

SEQ ID NO: 59: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 60: последовательность-мишень, мишень 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 61: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGT

SEQ ID NO: 62: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT



**Информация для репарации промотора в Нар.А/С -847 С>Т**

SEQ ID NO: 63: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

СТААГТТТАГТТТCAAАСТТТТCCTTCAAАСТTACAGCTTTTTTATCACAТTAA  
 ААСТТТCCTACATATAAACTTТTCAAСТTТТCCATCACAТCTTTТААТТТCAAССAAAC  
 TTCTAATTTТАACGTGAACTAAAAACACCCTGAATTCAAAАСТCTTTTTATTTTCSTT  
 CAAGATGTCCGATGCACACGCTCT

SEQ ID NO: 64: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGGCCATGGATAAAATGTAATTTCTATGCATA  
 CAACTAAATTATCGATGGCAACAGTGCATGAGCATATATTTATTTCAТTGACCTACG  
 GTTGCATGTCTTCGATCTCTATGGAGTAGTACCGATTCTAAGTTTAGTТTCAAАСТTТ  
 TCCTTCAAАСТTACAGCTTTTTTATCACAТTAAAACTTТCCTACATATAAACTTТCAA  
 CTTTTCCATCACAТCTTTТААТТТCAAССAAАСТTCTAATTTТАACGTGAACTAAAA  
 CACCCTGAATTCAAAАСТCTTTTTATTTTCSTTCAAGATGTCCGATGCACACGCTCTA  
 TGTAGACGCAAGAAGATGTTAAAGCAGCAGACTAACAGTAGCAAAAAAATGGCAG  
 GTCGAAAAGCAAСТGCGACGGTTGCTCCGTCATCCTCTCATCGCCTTTTTATTGCTCC  
 GCGTТGGGATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 65: последовательность-мишень, мишень 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGG

SEQ ID NO: 66: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCG

SEQ ID NO: 67: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGTТTТTAGAGCTAGAAATAGCAAGTТAAAATAA  
 GGCTAGTCCGTTATCAAСТTGAАААAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

SEQ ID NO: 68: последовательность-мишень, мишень 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 69: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGT

SEQ ID NO: 70: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTGTTTТTAGAGCTAGAAATAGCAAGTТAAAATAA  
 GGCTAGTCCGTTATCAAСТTGAАААAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

**Информация для репарации промотора в Нар.А/С -801 С>Т**

SEQ ID NO: 71: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

СТААГТТТТАГТТТCAAАСТТТТCCTTCAAАСТTACAGCTTTTTTATCACAТTAA  
 ААСТТТCCTACATACAААСТTТTCAAСТTТТCCATCACAТCTTTТААТТТCAAССAAAC  
 TTTТААТТТТАACGTGAACTAAAAACACCCTGAATTCAAAАСТCTTTTTATTTTCSTT  
 CAAGATGTCCGATGCACACGCTCT

SEQ ID NO: 72: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP  
 ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGGCCATGGATAAAATGTAATTTCTATGCATA  
 СААСТАААТТАТСГАТГГСААСАГТГСАТГАГСАТАТАТТТАТТТКАТТГАССТАСГ  
 ГТТГСАТГТСТТСГАТСТСТАТГГАГТАГТАССГАТТСТААГТТТАГТТТСАААСТТТ  
 ТССТТСАААСТТАСАГСТТТТТТАТСАСАТТААААСТТТССТАСАТАСАААСТТТСАА  
 СТТТТССАТСАСАТСТТТТААТТТСААССААСТТТТААТТТТААСГТГААСТААААА  
 САСССТГААТТСААААСТСТТТТТАТТТТССТТСААГАТГТССГАТГСАСАСГСТСТА  
 ТГАТАСГСААГААГАТГТТАААГСАГСАГАСТААСАГАТГСААААААТГГСАГ  
 ГТГСААААГСААСТГСАГСАГГТТГСТССГТАТСТСТСАТГССТТТТТАТТГСТСС  
 ГГСАГТТГГГАТГТАГАСГСААГААГАТГТТГГ

SEQ ID NO: 73: последовательность-мишень, мишень 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGG

SEQ ID NO: 74: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCG

SEQ ID NO: 75: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGTТТТАГАГСТАГАААТАГСААГТТААААТАА  
 ГГСТАГТССГТТАТСААСТТГАААААГТГГСАССГАТССГТГСТТТТТТ

SEQ ID NO: 76: последовательность-мишень для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 77: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGT

SEQ ID NO: 78: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGТГТТТТАГАГСТАГАААТАГСААГТТААААТАА  
 ГГСТАГТССГТТАТСААСТТГАААААГТГГСАССГАТССГТГСТТТТТТ

**Информация для репарации промотора в Нар.А/С -884 Т>А, -847 С>Т**

SEQ ID NO: 79: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

СТААГТТТАГТТТСАААСТТТТССТТСАААСАТАСАГСТТТТТТАТСАСАТТАА  
 ААСТТТССТАСАТААААСТТТТСААСТТТТССАТСАСАТСТТТТААТТТСААССААА  
 ТТСТААТТТТААСГТГААСТАААААСАСССТГААТТСААААСТСТТТТТАТТТТССТ  
 СААГАТГТССГАТГСАСАСГСТСТ

SEQ ID NO: 80: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGGCCATGGATAAAATGTAATTTCTATGCATA  
 СААСТАААТТАТСГАТГГСААСАГТГСАТГАГСАТАТАТТТАТТТКАТТГАССТАСГ  
 ГТТГСАТГТСТТСГАТСТСТАТГГАГТАГТАССГАТТСТААГТТТАГТТТСАААСТТТ  
 ТССТТСАААСАТАСАГСТТТТТТАТСАСАТТААААСТТТССТАСАТААААСТТТСАА  
 СТТТТССАТСАСАТСТТТТААТТТСААССААСТТСТААТТТТААСГТГААСТААААА  
 САСССТГААТТСААААСТСТТТТТАТТТТССТТСААГАТГТССГАТГСАСАСГСТСТА

TGTAGACGCAAGAAGATGTTAAAGCAGCAGACTAACAGTAGCAAAAAAATGGCAG  
 GTCGAAAAGCAACTGCGACGGTTGCTCCGTCATCCTCTCATCGCCTTTTTATTGCTCC  
 GGCGTTGGGATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 81: последовательность-мишень, мишень 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGG

SEQ ID NO: 82: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCG

SEQ ID NO: 83: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
 GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 85: последовательность-мишень, мишень 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 86: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGT

SEQ ID NO: 87: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
 GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

**Информация для репарации промотора в Нар.А/С -884 Т>А, -801 С>Т**

SEQ ID NO: 88: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

СТАAGTTTAGTTTCAAACSTTTTCCTTCAAACATACAGCTTTTTTATCACAТТАА  
 ААСТТТССТАСАТАСАААСТТТCAAСТТТТССАТСАСАТСТТТТААТТТCAAССАААС  
 ТТТТААТТТТАААСГТГААСТАААААСАСССТГААТТCAAААСТСТТТТТАТТТТССТТ  
 СААГАТГТССГАТГСАСАСГСТСТ

SEQ ID NO: 89: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGGCCATGGATAAAATGTAATTTCTATGCATA  
 СААСТАААТТАТСГАТGGCAACAGTGCATGAGCATATATTTATTTCAТТGACСТАСГ  
 GTTGCATGTCTTCGATCTCTATGGAGTAGTACCGATTCTAAGTTTAGTTTCAAACSTTT  
 ТССТТCAAACATACAGCTTTTTTATCACAТТААААСТТТССТАСАТАСАААСТТТCAA  
 СТТТТССАТСАСАТСТТТТААТТТCAAССАААСТТТТААТТТТАААСГТГААСТААААА  
 САСССТГААТТCAAААСТСТТТТТАТТТТССТТCAAГАТГТССГАТГСАСАСГСТСТА  
 TGTAGACGCAAGAAGATGTTAAAGCAGCAGACTAACAGTAGCAAAAAAATGGCAG  
 GTCGAAAAGCAACTGCGACGGTTGCTCCGTCATCCTCTCATCGCCTTTTTATTGCTCC  
 GGCGTTGGGATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 90: последовательность-мишень, мишень 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGG

SEQ ID NO: 91: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCG

SEQ ID NO: 92: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 93: последовательность-мишень, мишень 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 94: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGT

SEQ ID NO: 95: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

**Информация для репарации промотора в Нар.А/С -884 Т>А, -847 С>Т, -801 С>Т**

SEQ ID NO: 96: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

СТААГТТТАГТТТCAAАСТТТТCCTTCAAACATACAGCTTTTTTATCACAТTAA  
AACTTTCCTACATATAAACTTTCAACTTTCCTATCACATCTTTTAATTTCAACCAAAC  
TTTTAATTTTAAACGTGAACТАAAАACACCCTGAATTCAAААСТCTTTTTATTTTCCTT  
CAAGATGTCCGATGCACACGCTCT

SEQ ID NO: 97: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGGCCATGGATAAAATGTAATTTCTATGCATA  
CAAATAAATTATCGATGGCAACAGTGCATGAGCATATATTTATTTCAATTGACCTACG  
GTTGCATGTCTTCGATCTCTATGGAGTAGTACCGATTCTAAGTTTAGTTTCAAАСТТТ  
TCCTTCAAACATACAGCTTTTTTATCACAТTAAAАСТTTCCTACATATAAACTTTCAA  
CTTTTCCATCACATCTTTTAATTTCAACCAAАСТTТTAAТTТTAAACGTGAACТАAAАА  
CACCTGAATTCAAААСТCTTTTTATTTTCCTTCAAGATGTCCGATGCACACGCTCTA  
TGTAGACGCAAGAAGATGTTAAAGCAGCAGACTAACAGTAGCAAAAAАATGGCAG  
GTCGAAAAGCAACTGCGACGGTTGCTCCGTCATCCTCTCATCGCCTTTTTATTGCTCC  
GGCGTTGGGATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 98: последовательность-мишень, мишень 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGG

SEQ ID NO: 99: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCG

SEQ ID NO: 100: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 101: последовательность-мишень, мишень 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 102: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGT

SEQ ID NO: 103: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

**Информация для репарации промотора в Нар.А/С -847 С>Т, -801 С>Т**

SEQ ID NO: 104: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

СТАAGTTTAGTTTTCAAACSTTTTCSTTCAAACSTTACAGCTTTTTTATCACAТТАА  
AACTTTCCSTACATATAAACTTTCAAACSTTTCCATCACATCTTTTAATTTCAACCAAAC  
TTTTAATTTTAACGTGAACTAAAAACACCCTGAATTCAAACSTTTTTATTTTCSTT  
CAAGATGTCCGATGCACACGCTCT

SEQ ID NO: 105: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGGCCATGGATAAAATGTAATTTCTATGCATA  
CAAATAAATTATCGATGGCAACAGTGCATGAGCATATATTTATTTCAATTGACCTACG  
GTTGCATGTCTTCGATCTCTATGGAGTAGTACCGATTCTAAGTTTAGTTTTCAAACSTTT  
TCSTTCAAACSTTACAGCTTTTTTATCACAТТАAAACSTTTCCSTACATATAAACTTTCAA  
CTTTTCCATCACATCTTTTAATTTCAACCAAACSTTTTAATTTTAACGTGAACTAAAAA  
CACCCCTGAATTCAAACSTTTTTATTTTCSTTCAAGATGTCCGATGCACACGCTCTA  
TGTAGACGCAAGAAGATGTTAAAGCAGCAGACTAACAGTAGCAAAAAAATGGCAG  
GTCGAAAAGCAACTGCGACGGTTGCTCCGTCATCCTCTCATCGCCTTTTTATTGCTCC  
GGCGTTGGGATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 106: последовательность-мишень, мишень 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGAGG

SEQ ID NO: 107: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCG

SEQ ID NO: 108: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

ATCTCTATGGAGTAGTACCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 109: последовательность-мишень, мишень 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTTGG

SEQ ID NO: 110: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGT

SEQ ID NO: 111: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

ATGTAGACGCAAGAAGATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

CRISPR конструкции для введения SNP в сайт распознавания мкРНК396(т.е. CCGTTCAAAGAAAGCCTGTGGAA>CCGTAAAAAGAAAGCCTGTGGAA)**Zea mays**

GRMZM2G034876 (GRF-transcription factor 6)

SEQ ID NO: 112: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

CGGTGCTCCAAGGAGGCCGCCCGGACTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGC  
ACCGCGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGCGCCCCAGTCC  
CAACCGCCCCGCCGCCGAGC

SEQ ID NO: 113: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

GGCGAACGGACGGCAAGAAGTGGCGCGGCCTCGACTCCCTCGCAACCCGCTT  
CTACGGCCAACCCACACTCGGGTACGGACCGTACCTGGGGAGGAACTGGATCCGG  
AGCCCGGCCGGTGCCGGCGAACGGACGGCAAGAAGTGCCGGTGCTCCAAGGAGGC  
CGCCCCGACTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTAAAA  
GAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGCGCCCCAGTCCCAACCGCCCGCCGCGCAGCC  
GTCTCCGCCGCTCCGCCCTAGCAGCCGCCGCCGCCACCACCAACGGCAGCGG  
CTTCCAGAACCACTCTCTTACCCGGCCATCGCCGGCAGCACTGGTGGTGGAGGAGG  
AGTTGGCGGCGTCTCCGCCGCTCCGCCCTGG

SEQ ID NO: 114: последовательность-мишень, мишень 1:

GGCGAACGGACGGCAAGAAGTGG

SEQ ID NO: 115: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

GGCGAACGGACGGCAAGAAG

SEQ ID NO: 116: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

GGCGAACGGACGGCAAGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATA  
AGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 117: последовательность-мишень, мишень 2:

CGTCTCCGCCGCTCCGCCCTGG

SEQ ID NO: 118: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

CGTCTCCGCCGCTCCGCC

SEQ ID NO: 119: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

CGTCTCCGCCGCTCCGCCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT

GRMZM2G041223

SEQ ID NO: 120: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

CCGCCCCGACTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCG  
TAAAAGAAAGCCTGTGGAAGCGCAGCTCGTGCCCCCGCCGCACGCCAGCAGCAGC

AGCAGCAG

SEQ ID NO: 121: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

AAGTGGCGGTGCTCCAAGGGAGGTCCTCTCTCGCGTGTGTGTGTGTGGCTTCC  
TTGCAGTTGGGTACGGGCCCTACTTCGGCAAGAAGGTGGACCCGGAGCCCGGGCGG  
TGCCGGCGTACGGACGGCAAGAAGTGGCGGTGCTCCAAGGAAGCCGCCCGGACTC  
CAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGG  
AAGCGCAGCTCGTGCCCCCGCCGCACGCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGCCCCC  
GCGCCACCGTAGCTTCCAGAGCCACCCCATGTACCCATCCATCCTCGCCGGCAAC  
GGCGGCGGCGGCGGCGGGGTAGGTGGTGGTGTGCTGGTGGCGGTGGCACGTTCGGCCT  
GGGGCCCCAGGCCCCCGCGCCACCGCTGG

SEQ ID NO: 122: последовательность-мишень, мишень 1:

AAGTGGCGGTGCTCCAAGGGAGG

SEQ ID NO: 123: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

AAGTGGCGGTGCTCCAAGGG

SEQ ID NO: 124: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 1:

AAGTGGCGGTGCTCCAAGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGTCTTTTTT

SEQ ID NO: 125: последовательность-мишень, мишень 2:

CAGGCCCCCGCGCCCACCGCTGG

SEQ ID NO: 126: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

CAGGCCCCCGCGCCCACCGC

SEQ ID NO: 127: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для мишени 2:

CAGGCCCCCGCGCCCACCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGTCTTTTTT

### **Triticum aestivum**

Traes\_6AL\_06A78C520

SEQ ID NO: 128: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

ccgctccgactccaagtactcgagcgccacatgcaccgcgccgcaaccgtAAaagaagcctgtggaacgcagctc  
gtgccccactcccagccgcccggcctccgctgcccctcgccaccggctccacggccactccctctaccccgccgctggcg  
cg

SEQ ID NO: 129: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

GAAGTGGCGGTGCGCCAAGGAGGCCCTCGCCGCCCGCTTCTACCACAACCC  
CTCGCCATCGGGTACGGATCGTACCTGGGCAAGAAGGTGGATCCGGAGCCGGGCCG  
GTGCCGGCGCACGGACGGCAAGAAGTGGCGGTGCGCCAAGGAAGccgctccgactccaagta  
ctcgagcgccacatgcaccgcgccgcaaccgtAAaagaagcctgtggaacgcagctcgtgccccactcccagccgcccg

cctccgccgtgccgcccctgccaccggcttccacggccactccctctaccccgccgtcggcggcgccaccaacgggtggtggagggcgg  
 Agggaacaacggcatgtccatgcccggcacgttctctccgcgctggggccgcctcagcagcacatgggcaacaatgccgcctctccct  
 acgcggctctcggcggcgccaccaacgggtggtggagggcggg

SEQ ID NO: 130: последовательность-мишень, мишень 1:

GAAGTGGCGGTGCGCCAAGGAGG

SEQ ID NO: 131: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

GAAGTGGCGGTGCGCCAAGG

SEQ ID NO: 132: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

GAAGTGGCGGTGCGCCAAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATA  
 AGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

SEQ ID NO: 133: последовательность-мишень, мишень 2:

gcaccaacgggtggtggagggcggg

SEQ ID NO: 134: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

gcaccaacgggtggtggaggc

SEQ ID NO: 135: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

gcaccaacgggtggtggaggcGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT  
 CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

TRIAE\_CS42\_6BL\_TGACv1\_500422\_AA1604330

SEQ ID NO: 136: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

AGGAGGCCGCCTCCGACTCCAAGTATTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCG  
 CAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGTCTCGCACTCCCAGCCGCCGG  
 CCGCCTCCGTCGTGCCGCCCTCGCCACCGGCTTCCACAACCACTCCCTCTACCCCG  
 CCATCGGCG

SEQ ID NO: 137: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

CAAGAAGTGGCGGTGCGCCAAGGGCCCGCTTCTACCACAACCCCTCGC  
 CATCGGGTATGGATCGTACCTGGGCAAGAAGGTGGATCCGGAGCCCGCGGTGCC  
 GGCGCACGGACGGCAAGAAGTGGCGGTGCGCCAAGAGGCCGCCTCCGACTCCAA  
 GTATTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAAA  
 CGCAGCTCGTCTCGCACTCCCAGCCGCCGGCCGCCTCCGTCGTGCCGCCCTCGCCA  
 CCGGCTTCCACAACCACTCCCTCTACCCCGCCATCGGCGGCACCAACGGTGGTGGAG  
 GCGGAGGGAACAACGGCATGCCCAACACGTTCTCCTCCGCGCTGGGGCCTCCTCAG  
 CAGCACATGGGCAACAATGCCTCCTCACCTACGCGGCTCTCGGTGGCGCCGGAGC  
 ACCAACGGTGGTGGAGGCGGG

SEQ ID NO: 138: последовательность-мишень, мишень 1:

CAAGAAGTGGCGGTGCGCCAAGG

SEQ ID NO: 139: протоспейсерная последовательность для мишени 1:



CAAGAAGTGGCGGTGCGCCA

SEQ ID NO: 140: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

CAAGAAGTGGCGGTGCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 141: последовательность-мишень, мишень 2:

GCACCAACGGTGGTGGAGGCGGG

SEQ ID NO: 142: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

GCACCAACGGTGGTGGAGGC

SEQ ID NO: 143: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

GCACCAACGGTGGTGGAGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

TRIAE\_CS42\_6DL\_TGACv1\_527461\_AA1704370

SEQ ID NO: 144: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

AGGCCGCCTCCGATTCCAAGTATTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAA  
CCGTAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGTCCCGCACACCCAGCCGCCGGCCG  
CCTCCGCCGTGCCGCCCTCGCCACCGGCTTCCACAGCCACTCCCTCTACCCCGCCA  
TCGGCGGCA

SEQ ID NO: 145: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

CAAGAAGTGGCGGTGCGCCAAGGTCGCCGCCCCTTCTACCACAACCCCTC  
GCCATCGGGTACGGATCGTACCTAGGCAAGAAGGTGGATCCGGAGCCGGGCCGGTG  
CCGGCGCACGGACGGCAAGAAGTGGCGGTGCGCCAAAGAGGCCGCCTCCGATTCCA  
AGTATTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCGTAAAGAAAGCCTGTGGAA  
ACGCAGCTCGTCCCGCACACCCAGCCGCCGGCCGCTCCGCCGTGCCGCCCTCGCC  
ACCGGCTTCCACAGCCACTCCCTCTACCCCGCCATCGGCGGCAGCACCAACGGTGGT  
GGAGGCGGAGGGAACAACGGCATGTCCATGCCAGCACGTTCTCCTCCGCGCTGGG  
GCCGCCTCAGCAGCACATGGGCAGCAATGCCGCCTCTCCCTACGCGGCTCTCGGTGC  
ACCAACGGTGGTGGAGGCGGG

SEQ ID NO: 146: последовательность-мишень, мишень 1:

CAAGAAGTGGCGGTGCGCCAAGG

SEQ ID NO: 147: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

CAAGAAGTGGCGGTGCGCCA

SEQ ID NO: 148: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

CAAGAAGTGGCGGTGCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 149: последовательность-мишень, мишень 2:

GCACCAACGGTGGTGGAGGCGGG

SEQ ID NO: 150: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

GCACCAACGGTGGTGGAGGC

SEQ ID NO: 151: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

GCACCAACGGTGGTGGAGGCGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

**Hordeum vulgare L.**

HORVU2Hr1G101770

SEQ ID NO: 152: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

CAAGAAGTGGCGGTGCTCCAAGGAGGCCGCTCAGGACTCCAAGTACTGCGA  
GCGCCACATGCACGCGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGT  
CGCCAGCTCCCACTCCCAGTCCCAGCAGCACGCCACCGCCGCCTTCCACAACCACTC  
GCCG

SEQ ID NO: 153: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

GGGCGGTGCCGGCGGACGGACGGACAGATGTATGGGGTATTTATCATGAAA  
AAGCATTCTTGACGTGGGTGTTTTTCGTTGTTTGCAGTTGGGTACGGGTCTACTTTCG  
GGAAGAAGCTGGATCCGGAGCCGGGGCGGTGCCGGCGGACGGACGACAAGAAGTG  
GCGGTGCTCCAAGGAGGCCGCTCAGGACTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACG  
CGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGTCGCCAGCTCCCACT  
CCCAGTCCCAGCAGCACGCCACCGCCGCCTTCCACAACCACTCGCCGTATCCGGCGA  
TCGCCACTGGCGATGGCTCCTTCGCCCTGGGGTCTGCTCAGCTGCACATGGACACTG  
CTGCGCCTTACGCGACGACCGCCGGTGCTGCCGGAACAAAGATTTTCAGGTGACCT  
CTTCTTATCCGGCGATCGCCACTGGCGG

SEQ ID NO: 154: последовательность-мишень, мишень 1:

GGGCGGTGCCGGCGGACGGACGG

SEQ ID NO: 155: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

GGGCGGTGCCGGCGGACGGA

SEQ ID NO: 156: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

GGGCGGTGCCGGCGGACGGAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTAAAATA  
AGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

SEQ ID NO: 157: последовательность-мишень, мишень 2:

TATCCGGCGATCGCCACTGGCGG

SEQ ID NO: 158: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

TATCCGGCGATCGCCACTGG

SEQ ID NO: 159: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

TATCCGGCGATCGCCACTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

**Sorghum bicolor (L.)**

SORBI\_004G269900

SEQ ID NO: 160: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

TGCCGGCGTACGGACGGCAAGAAGTGGCGGTGCTCCAAGGAGGCCGCCCA  
GACTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCCGCGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCC  
TGTGGAAACGCAGCTCGTGCCCCAGTCCAACCGCCCGCCACCGCCGCTGC

SEQ ID NO: 161: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

AACTGGATCCGGAGCCGGGGCGGGATCTCGTGGTTCCAATCCGCCGCGGTCT  
CGACTCCCTCGCAACCCGCTTCTACGGCCATCCCACACTTGGTGGGTACGGGACGTA  
CTACTTAGGCAAGAACTGGATCCGGAGCCGGGGCGATGCCGGCGTACGGACGGCA  
AGAAGTGGCGGTGCTCCAAGGAGGCCGCCAGACTCCAAGTACTGCGAGCGCCAC  
ATGCACCCGCGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAAACGCAGCTCGTGCCCCA  
GTCCAACCGCCCGCCACCGCCGCTGCCGTCTCCGCCGCTCCGCCCTTAGCCTTGGC  
CGCCGCCACCACCACCAACGGCAGCTGCTTCCAGAATCACTCTCTTTACCCGGC  
CATTGCAGGCAGCACCGGTGGAGGTGGCGGGGCCAGCAATCGTCTCCGCCGCTCCG  
CCCTTGG

SEQ ID NO: 162: последовательность-мишень, мишень 1:

AACTGGATCCGGAGCCGGGGCGG

SEQ ID NO: 163: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

AACTGGATCCGGAGCCGGGG

SEQ ID NO: 164: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

AACTGGATCCGGAGCCGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 165: последовательность-мишень, мишень 2:

CGTCTCCGCCGCTCCGCCCTTGG

SEQ ID NO: 166: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

CGTCTCCGCCGCTCCGCCCT

SEQ ID NO: 167: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

CGTCTCCGCCGCTCCGCCCTTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

**Glycine max (L.)**

GLYMA11G11826

SEQ ID NO: 168: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

AAGCATACCCAGACTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGTGGCCGCAA  
CCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAATCACAACTATGACTCACTCATCTTCAACTGTC

SEQ ID NO: 169: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

AAAAAAGTGGAGGTGCTCCAAGGTCTCGCACGCTTTCTTTACCCATCCCACGT  
TGAGTTACTGTTCCCTTCTATGGGAAGAAGGTGGACCCTGAGCCAGGACGATGCAGG  
AGGACTGATGGAAAAAAGTGGAGGTGCTCCAAGAAGCATAACCCAGACTCCAAGTA  
CTGCGAGCGCCACATGCACCGTGGCCGCAACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAATCAC  
AACTATGACTCACTCATCTTCAACTGTCACATCACTCACTGTCACCTGGGAGTAGTG  
GTGCCAGCAAAGGAACTGTAATTTCCAAAACCTTTCTACAAATACCTTTGGTAATC  
TCCAGGGTACCGATTCTGGAAGTACCACACCAATTATCATCTAGACATCACTCACT  
GTCACCTGGGG

SEQ ID NO: 170: последовательность-мишень, мишень 1:

AAAAAAGTGGAGGTGCTCCAAGG

SEQ ID NO: 171: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

AAAAAAGTGGAGGTGCTCCA

SEQ ID NO: 172: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

AAAAAAGTGGAGGTGCTCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 173: последовательность-мишень, мишень 2:

GACATCACTCACTGTCACCTGGGG

SEQ ID NO: 174: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

GACATCACTCACTGTCACCTG

SEQ ID NO: 175: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

GACATCACTCACTGTCACCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

### **Brassica napus**

BnaA03g16700D

SEQ ID NO: 176: последовательность матрицы репарации для внесения правильного SNP

GACGTCTTCGCTGGCCACAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGAGGCCGCA  
ACCGTAAAAGAAAGCCTGTGGAACTCCCATAGTCAATGCTACCACCACCACTTC

SEQ ID NO: 177: последовательность донорной ДНК для внесения правильного SNP

GTAAGAAGTAAAGATGTTCAAGGCTTCTCCATCTATCTCCTTCCTACTTTCTT  
CACCACCTACCTCATTACCAGCCTGCTTGGTATTTGGGGAGGGGGGCGATGGATCCT  
GAGCCAGGGAGATGCAGGAGAACGGATGGTAAGAAGTAAAGATGTTCAAGAGACG  
TCTTCGCTGGCCACAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGAGGCCGCAACCGTAAA

AGAAAGCCTGTGGAAACTCCCATAGTCAATGCTACCACCACCACTTCCATGGCTTCC  
 CCAGCCACAGCAGCACCGTCATCAACACCATCCTCCTTTGCTTTTGGCGGTGGTGAG  
 AAAGTGGGTCAAGGTGGATCATCTAGCTTCTTCTTCTCAAGTCAAAGTTGTTTCAGAG  
 ATGCATGGCTTCCCCAGCCACAGCGG

SEQ ID NO: 178: последовательность-мишень, мишень 1:

GTAAGAAGTAAAGATGTTCAAGG

SEQ ID NO: 179: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

GTAAGAAGTAAAGATGTTCA

SEQ ID NO: 180: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для  
 мишени 1:

GTAAGAAGTAAAGATGTTTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
 GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 181: последовательность-мишень, мишень 2:

CATGGCTTCCCCAGCCACAGCGG

SEQ ID NO: 182: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

CATGGCTTCCCCAGCCACAG

SEQ ID NO: 183: последовательность нуклеиновой кислоты полной оГРНК для  
 мишени 2:

CATGGCTTCCCCAGCCACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
 GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

### ***Solanum lycopersicum***

Solyc08g075950

SEQ ID NO: 184: последовательность матрицы репарации для внесения  
 правильного SNP

ACTGACGGAAAAAAGTGGAGATGCTCAAAAGATGCATATCCTGACTCCAAAT  
 ATTGCGAGCGGCACATGCATCGAGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAATCT  
 CAATCTACTCCCCAGTCCTTGTCGACTA

SEQ ID NO: 185: последовательность донорной ДНК для внесения правильного  
 SNP

CTGAGCCAGGAAGGTGTAGAAGGTGGTGGTTTTAGCTATATGCATTAGCTCA  
 TGATGGAGCTTAATGATTTGTTTCTTCTTTGTACAGTGGGCTATTGTTCCCTATTATGG  
 GAAGAAGTTTGATCCTGAGCCAGGAAGGTGTAGAAGAACTGACGGAAAAAAGTGG  
 AGATGCTCAAAAGATGCATATCCTGACTCCAAATATTGCGAGCGGCACATGCATCG  
 AGGCCGCAACCGTTCAAGAAAGCCTGTGGAATCTCAATCTACTCCCCAGTCCTTGTC  
 GACTAGTATGTCACAAATTACAGCTGGAAGCAGCAATACAAGAGGAAGTTTCCAAA  
 ATAGCAGCAGCGGAAGCTTCCAAAACATGCCATTGTATTCTGTTGCTAATTCGGGAA  
 CGCTGAATTATGGAAGTATGTCACAAATTACAGCTGGG

SEQ ID NO: 186: последовательность-мишень, мишень 1:

CTGAGCCAGGAAGGTGTAGAAGG

SEQ ID NO: 187: протоспейсерная последовательность для мишени 1:

CTGAGCCAGGAAGGTGTAGA

SEQ ID NO: 188: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 1:

CTGAGCCAGGAAGGTGTAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

SEQ ID NO: 189: последовательность-мишень, мишень 2:

GATGTCACAAATTACAGCTGGG

SEQ ID NO: 190: протоспейсерная последовательность для мишени 2:

GATGTCACAAATTACAGCT

SEQ ID NO: 191: последовательность нуклеиновой кислоты полной оРНК для мишени 2:

GATGTCACAAATTACAGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTT

**Ортологичные промоторные последовательности**

OsGRF4 -884 TTTTCCTTCAAACTTACAGCTTTTT

OsGRF4 -847 TTTTCCTACATACCAAACTTCAACTT

OsGRF4 -801 TTTCAACCAAACTCTAATTTTA

SEQ ID NO: 192: Z.mays; GRMZM2G034876 (фактор транскрипции 6 GRF); промотор размером 2 т.п.н.

TTCTAGTGTTTCAACGGAAGCCTAAGTTTCGATGGGAAGAAAGGACATGTAC  
TAGCAAGGAACCAAACCTCCACGCATCATTCTTGCCTAGCCTTGCTTTATCGTGGCTA  
CCTTGGACCAACAAAAGAACCAAGCAGCCCCAATGTATCTGATATGGAGCTAAAAA  
TACAACCAACTCATATTATACGTTGGATGTTTTGACTGCACTTGAGATGTTGTAAGA  
CTTTCGGTACGCTATACATATAGAGTTGAATATACAGTTGAAGACTGCTGCAGCGGT  
CAACTGTCTGATCTACTGTAACCTCTATGAGGAAATCGGAAACGCTACTTCCAGAGT  
AGTGTAACCTCCGACTGGAAAACCTGTTGCAGAATACGGATAGCCTGATCAGTTAGAC  
TGTCGGCTGCGGAGTTCAACTGTTGCAGAGTTAGAAAGAAATGATAAAATATATAG  
TAGTTAGTATAGAGTTGATATATAGAGTAAACATGACTGTAGAGGATTGTAGTATAG  
GGTAGATAGTTTTGCTGACCAGGACAAGATATTCCTTTTAGAGTATGAATTTAGAGT  
AGTATGAGTGCGGATAGCCTAACTTTGTAAGTATTTTTAAAGCTTACTTTGCATACG  
GTCTTTGTGATCTACATCTTTACTATGGCTATTTTCATGATAATAACTAGATGAGATAT  
ATGACCAATCGAGTTGTACATATATGTTTGGGTTTTAATTAAGGGCATAGTTAAAAG  
CACTGAGCTTTTAAGAAAACGATGTGGTTCTAAATATGGCAGTTTATGCTTTGGTTT  
CTAGAAACTGAATTTCTAGCATATTTCCGTA CTATTCTTAGTTGGTTTGGATAGAAAC  
TACGACGATTATCACCGCTCTGAGGCCAATGGCCTATGCACTTGATTCTCTCCATG  
CCCACTCTGCCCTGTTCAAATGTTTAATTAATATTTAATTTAATAATTTTGAATTCAA  
GAATACGAGTTCAAGGTATATTTAAAATTGACATCAAAGAGAAATGAAATTAAGC  
AATGATAGACTTGTCTTTGGGTGTGAAAAAAGCTAGAACTTATTTATAAAAACCC  
AATTCTAAACATGTATACCTAATTTTTATTATAAATCGGTTTTTAGATAGAATCGTA  
AAGCCCTTGATCAGAGCATCCAACGAGCCATGAGGCCATGACGGAAGAGCGGAAGT

GCAGACGGCAACGGCGTTCCGCTTCATGCCGCACCCTCCAGTGTCTGTGGCCTTTA  
 AGTGCCGGCCTTGGGAACCGCGACGCAGACACAGCCCAAATCCGCAGTCACTCCTC  
 CAACACGATGCTTGTACCACCCTTGCTACAGTGCCTGCATCCATATCCACTCCGCT  
 CGCGCAAAAAATATCCGAGTCGGAAACAAACAAAGCAGCATAGGAAACAGAAGAA  
 AGCTGTACTAGTACGTGAGGACGAGGAGGGAGAGAGAGCAATACACAGAAGCCTG  
 CTACCGTGCTACGGACTACCACAACGCCAGAGGGACAACCGGACAGAGGGGGAGG  
 CAGGCCTCGCTTGTTCATCTAGCTAGGTCAGCCGGGGACGGGGTTCGGAGCAGTAGAG  
 CTAAGCCAGAGGCCAGGCTCGTAGTAGTACGTAGTAGTAGTGCCCTCCTCGTGTCA  
 TTTGGCCAGCCTTGTCCAGACGACCACACACCAGATTACGCTTAACATTCTGTTT  
 GACATCTAAAACCAGCCGGCTTGATCCAAATGCCTCCCTAGGTAGTAGCTTAGTCTT  
 GCTCGCCGCTCTCCGGGAGACGACGACACGCCTGATGAGTGCCTGACGTTCCAGC  
 GCGAGGCAGACAGCGACGCAGAGAGAGACAAAGCGGGCAATAAAGGCAGCCGCGC  
 GCGAGCGAGGGAAGGGAGCGAAGCAAAGCACATCACGAGCCAGCCTGCGCCTGC  
 GGAGGGAGGGGGCTCATTAAGAGGGGGCGCGAGCGCGACCGGCCGCGGGGAGCA  
 AGCAGCGCGCGAGAGAGACAGGTTGAG

SEQ ID NO: 193: Z.mays; GRMZM2G041223 (фактор транскрипции 8 GRF);  
 промотор размером 2 т.п.н.

AAACAATACTTATCGTTAATAAACATGACATATGATCTGATGCATAAATTT  
 GTATTTTTATTTTTAACATTGATTTTTTAAAGATTCCCAAAGATAAACATCAAATTT  
 ATCATATAATTCCTCAAATGATACATATAAAATTTGAATACGAATATATTTTTACTTT  
 GTTTATTACTGGGAGTAAATATTGTATAAAAAATATGCAAATTTATTCTTATTTATA  
 GTAATATGCAAATAATGTATAAATAGTCCATGCTCATAAATTTTTTAGTAGCCCGCA  
 ACCCAAGGCGACCGCGAACAGTGCCAAGCCGAGCGGGGGTGTGCATGTTGGAGATG  
 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGCCCGAAAAATATCGCTGATGACTCGACGAGATAGAGGA  
 GGGAGGGAGGGAGGGAGGCGCAGTAGGACAGGGCTGCAGGCAGGTGCTTGTCTT  
 AGCTGGAACCCTCCCGTGTCCGCCTCATCCCACCGCCCCGCCCTGCCGTCTGCCCT  
 GCGCGGCTGCGGTGCTATAAGGCTAGCCAGGCCATTTGCCCTTTGCCCCCGTCC  
 GTCCGTCCCTCACCTCACCTCACCTCGGCCCGCCTCCCTCATCAGGTAGCCGT  
 AGCGAGCAGTATAGCACGCACAGCCGCCGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCTCGGCGT  
 AGGCACAGGCACAGCCAGAGCGAGCGAGACAGAGGGAAAGAGACAGAGCCAGCC  
 AGGTAAGGCAAAGCACAGCACATTAAGAGAGGGCCGGAAGCAGCGGCAGAG  
 CGGAGAGAGAGAGAGAACTAGAAGCATATATGGCGATGCCCTTTGCCTCCCTGTCT  
 CCGGCAGCCGACCACCGCCCCTCCTCCCTCCTCCCTACTGCCGCGCCGCCCTCTCT  
 CCGCGTAAGCCACCTCCCTTTGCCCCGTCCGGGAAAAAACCTCTTCTTCGCTCGGT  
 TTATGCCACCCGGAGCCGTGCTGCAGCCTGCAGGTATCTGATGCCGCGAGCTTTGCC  
 TTGCAGGGTGGGAGAGGACGCCGCCGCGCAGGCGCAACAGCAGCAGCAGCACGCT  
 ATGAGCGGCAGGTGGGCAGCGAGGCCGCCGGCGCTCTTACCGCGGCGCAGTACGA  
 GGAGCTGGAGCACCAGGCGCTTATATAAAGTACCTCGTCGCCGGCGTGCCCGTCCC  
 GCCGACCTCCTCCTCCCCCTACGCCGAGGCTTCGTCTACCACCAACCCGCCCGTAA  
 GCAAGCACGGCCCCCGCGCCGCCTCCGCACCCCTTCACTCACACGCACGTTTAAAC

CGCTTTTGCCTGCACAACCCCGGCCGCCC GGCGGGCGGGCGTCCGTGCCTTGATCTGG  
 TTGTTTACTCGGATCGAGGGATT CAGATGTCCTCTCCGTCCGTTTGTTAATCGGCTCC  
 GGTCATTTCTTAATCTCGTCCTGGATT CCGGTCACGAAAAGCTAGAGGTCAAGATTTT  
 GCTCTCGATTACTATATCCTTGCCTCATGTTCTAATGGAGTTTATTTTATTGGTCTGA  
 TGTGATTAGATAGGATGCTAGCCAGGCTTGTCTCCGGCCAAAAGCGGCGGTTTAGTT  
 TATTGATGATTGCTTCTTTCTTGGGGGATTTATTCCTGTCTGGTTGTTGGGAGCCTA  
 ACCACGCTCCTATTGCTGCTGCGGTTTACTAACCATTCCCCCTCCATCTGCTTTCTCGCGG  
 ATGGACCCCAAATAACAGTTCTTCCAACCATTCCCCCTCCATCTGCTTTCTCGCGG  
 GCAAATAAAAACGTGTAGAACGACGGTGTAGTAGGCAGATCTACTCCTTGTGCCGC  
 TACGCTAGCCCGCTACCGAAGATCGGGCCCGTTTCAACCGGTTTCGTTGGTCTGAGCG  
 GAGCTAAGATGGGGCGCATTTCATTTTTTGGTCCTTTCGTCTGATTGGAGAAGTGCC  
 CATTCCGGTATCGCTCCCCGGCCTCCAAATACGCACCGACACAGAACGTGTTTCGTAC  
 GCACGTACACATGGT

SEQ ID NO: 194: *Triticum aestivum*; Traes\_6AL\_06A78C520; промотор размером 2  
 Т.П.Н.

GATAGTGTGGGAAGGGAGTGGAGTGGAGTGGAAATGCGGCTAGGGTTTTAGC  
 CGGAGTGCGGCCTATTTAGGTGGGGTCCGGTGGAGCCAGATCCAACATGGCAGGTAG  
 GTTCGGGCATCCCCGTACTCGCCCTAAATTTGGGCTGGACTGGGGAGTGACCGGAA  
 GTCCGAACGTTTGC GCGTCAAAAATGCGGGCGCTCGGTTGGGCATTGACCATGCAACT  
 TGCTCGGACATTTGGGGCAAGTATAGGGACTCCGATTGTAGATGCTCCTACGTCTAA  
 TTTGATACTTCATTGAGATGTGGTGTCCGATGCGTGAAAATGCTTCGAGAAGTGAGA  
 GCATCTACAGCCGACTTAGCAAATCTGGCATCTATAAGTCAGCGGGCGCCTCCGCG  
 GACGGCCCCTCACTTGAGTTGCCGCACATTGACACACCGCAAATACGGATTCTTGAA  
 TTCATGCAATCCATTGACGTCCATCAAACGATACAAATCATCCCAATTCAACAGTTC  
 GAAACAAAATAAGACAAAAGCAAACAATCATAATTCAACAATCCGGACATGCTAA  
 AATAAAATCAATGTCCGAGCGTGATGGTTCCTTACTCCTTGACCGGCTGGATCACTCGCC  
 CGACGCCATCCATATTCGCTTGTCCGTGGCCATCCTTATGGGCAGCGAGGATGAG  
 GAGCAAGGATGGCGGACGACAAGGGCTTGAACACGGGAATAGGTGGAGGGAGTCG  
 GGAGGGGGGAAGGGTTTAGGGCCTCTTTGATTACAGGATTGTCAAATAAAGGAAT  
 AGAAAAAATGCAGGAATAGGGTGACATGTCCCATAGTATCCTACAGGATTTGAAAG  
 AATGTTTGATAGCATAGGAAAAACAAGGAATTCTACAAAGAGGTTTGAGTGGATG  
 GAAATTTTTTTTCAAATGTAGTACAAATGGATCATATGGAAAAATTCCTAAGGATG  
 CCAATCCTACGAATCAAACGAGCATCACATGAAAAATTTCTAAGGATTTAAATCCTC  
 CAAAAATCCTATATAATTCCTTTAAATCAAAGGAGCGCTAGTGAATTGATGCAATTT  
 GTGCTGAAGTAAGCCTGTCCGGTTCGACGTGACGGGCGCGCCGAGACATCGCTTTC  
 ATATTTGGACTGGGTATATGGAGTGCTAGTCAGCTCAAGTGTTCGAGACGCTCGTCT  
 CGGTTTTTTTCATTTGACCTGTAATCGGGCCGTTTCGTCCGGACGTTTCGATAGAGGTTTG  
 TGGTGCAGGGATGTAGATGCACACTGCTTCCGTTATCAGTTATCACCACGACACAAG  
 AAGCAAGCACATAGTACTGTAGTAAAAAATTGACGAGGGAAAAGTGGCGCAAAC  
 GGTTGCCCCGCACCCTCTCACGGACGGACTTTAAAAGTCGGCATTGGTAACCGCAAC



ACAGCACAGAGAGACTCACCCCCAAATCTCTCTCTTCTCTCTCTATTCCCTATGCAATG  
 CAATAGTTGTCACCACTCGCTACAGTGCCGGCAGCATTGCATCGCATCGCATCCATA  
 TCCATTCTCCTCACGAGAAAAAGAGAGAGAGACGAGCAATACTAGTCGTCGTCGT  
 CGTCGTAGCCTGGTACGTCTACGCTAGAGCGACAGGGAAAGAGGAGGGAGGGGGC  
 GCTTGTCATCTACTCCTCCTCGCTACTACCCCTAGCTGGGATCCACAGCCTCCTCCTC  
 CTCCTCGTGTTCGGCCTCGTCCACATCCACCGTCTCCTCCGAGCGAGGCGGACAGCGA  
 CGCGGCCACGGAGCGAGGGAGGGAGAGAGACAAAGCCGGTAATAAAGGCGGGCGG  
 GCGCGCGCGCGCACAAAGCCAAGCAAAGCACATTAACGACGCCAGCCAGCCAGCCA  
 GCCAGCCAGCCC GCGGGGAACCCCATTAAGACGCTTCCGGGGGAGCGCCGTGGGC  
 AAGCAAGCACAGGGGCTTAGCTTAGCTTGGCTTGTGCATCGCGTGTGTGTGCGCGA  
 GAGGGAGACAGCGGCCGAGAGAGAAAAG

SEQ ID NO: 195: Triticum aestivum;  
 TRIAE\_CS42\_6BL\_TGACv1\_500422\_AA1604330; промотор размером 2 т.п.н.

TTTTCGCACGCAACGCCCACTTGAGTTCCTCCTCTCTCAAGAGAGCATGTTGG  
 CCTTGCTCAGCCTCAGACTTGGTTCGATGCTCATTAACAGAAAGAAGTGTGGTTTCA  
 GCCTTTACATCTAGTGTCTCAATGAGTTGAGTTAGACGTTCTTTTTTCTGCTTATAAA  
 TCCAGTCTCATTCTGGCCATCCTCTCAGAAATTGTCGGAGGTTTCTAATCTTATT  
 CTGCCATCTCTCGACATGTGTCCTTCTGTAATTGGCTTAGCCCATTCGCATGCAATC  
 ATCTCCATAAATCCTTCTCGCTCAAACCAGCTTTACTCGAAAGAGAAGATGTTTTTG  
 TTTGCAACATGGGTAGCCTCACCCGAATCTAAAAAGAGTGGTGTATGATCTGAGATC  
 CCTCTATGCATTGCATGGACCGACACCAACGGATATTTTTGTTCCCACTCCACACTA  
 GCAAGTACCCTATCCAGCTTTTCATAAGTCAGAACAGGTAACGAGTTGGCCCATGTA  
 AACTGTCTACCGGTGAGCTCAATTTCTCTCAAATTGAGGCTCTCGATAATCATGTTA  
 AACATCATAGACCAACGTCCATCGAAATTGTCATTATTCTTTTCTTCTCTTCTCCGAA  
 TGATATTAATAACCCCCGACTAGCAGTGGCAGATTTTCATCTCCACAAATCCGCA  
 CTAGATGGGCAAGAAAATCGGGTTTAAATTGCTTGGAGGAGTGAGAGCATCTACAA  
 CCGGACTTAGCGAATCTGGGCTCTATAAGCCC GCGGGTGCCTCCGCGGACGGCCCTC  
 CCTTGAGTTGCCGCACATTCACACATCTCAAATACGGATTCTTGAATCCATGTATCC  
 ATGCACGTCCATCATAACGATATAAATCATCCAATTCAAATGTTTGAAAACAAAATA  
 CGACAATGCAAAGCAAATCATAGTTCAATAATTCAGACATGCCAAATTAATAATCAA  
 TATCCGAGCATGATAGATCACTCGTTGGACGCCATCCATGCCCGCTTGCTCCGCGGC  
 CATCCTTGCGGGCGGCGAGGATGGGGAGCAAGGGTGGCGGACGGCAAGGGCTTGG  
 ACACGAAAATAGGTGGATGAAGGCGGGAGAGAGGAGGGTTTAGTGAATTTTATGCA  
 ATTTATGTGGGGGGTTGGCCTGTCGGGTTCTACGTAATGGACGCGCCGAGGCATGAG  
 GGATGCCGGTCAGCTTGGGTGTTTTAGATGCCCGTCCGGTCTTTTTATTTTAAGTCCG  
 TAATTGGGCCGTTCCGCCGACGTTCCATAGAGGTTTGGGGTGCCGGGAAGTAGATG  
 CACAGTACTTCCGTTATCACCACGACACAAGAAGCAAGCACATAGTACTGTTGTAA  
 AAAAATGACGAGGGAAAAGTGGCGCAAACGGTTGCCCGCACCCCTCTCACGGACGG  
 ACTTTAAAAGTCGGCATTGGTAACCGCAACACAACACAGACAGACGCACCCCAAAT  
 CTCTCTCTCTCTCTTCCCATGCAATAGTTGTCGCCACTCGCTCGCTACAGTGACCG



AGCGCGGTTCGTTTTGGCCCCGGACGTGTGGGCGGTTTTGCCACACACCCGGACGTGCGG  
 GTTGTGGCTGCGCGCGCCCGGATGCGGTTTTGCGGGCGAGTTCTTCTCCATGCCACA  
 CGAGGCGTGCGGCACAACCACCCGATACACCACACGTGTGGCAGTTATCGGTGTTA  
 AAAAAATGACGAGAGAAAAGTGGCGCAAACGGTTGCCCCGCACCCTCTCACGGACG  
 GACTTTAAAAGTCGGCATTGGTAACCGCAACACAACACAGACAGACGCACCCCAAG  
 CCTCTCTCTATCTCTCTCTTCCCATGCAATAGTTGTCACCACTCGCTCGCTACAGTGC  
 CCGCATTGCATCGCATCCACATCCATATGACCATATCCATTCCCTCCCCACGAGAAAA  
 GGAGAGAGAGGGGAGAAATACTAGTCGTCGTCGTCGTCGTAGTAGCTGGTACGTCTACG  
 CTAGAGCGACAGGGAAAGAGGAGGGAGGGGGCGCTTGTCATCTACTCCTCCTCCTC  
 GCCCTAGCTGGGATCCACAGCCTCCTCCTCCTCCTCGTGTGCGCCTCGTCCACATCC  
 ACCGTCTCCTCCGAGCGAGGTGGACAGCGACGCGGCCACGGAGCGAGGGAGGGAG  
 AGAGACAAAGCCGGTAATAAAGGCGGGGGCGCGCGCGCACAAGCCAAGCAAAG  
 CACATTAACGACGCCAGCCAGCCCGCGGGGAACCCCATTAAGACGCTTCCGGGGG  
 AGCGCCGTGGGCAAGCACAGGGGCTTAGCTTAGCTTGGCTTGTGTGTTGTGTGCGCG  
 AGAGGGAGACAGCGGCCGAGAGAGAAAGATGGCG

SEQ ID NO: 197: *Hordeum vulgare* L; HORVU2Hr1G101770; промотор размером 2  
 Т.П.Н.

AAAGTTCAAATAAGTTTTTCAGACCCTACCGTCATACACCTTGACGGTAGAAT  
 GTGAAACCCTACCATTATATAAACGAATTCCTGTTACAACAACCTTACACACGAGGT  
 CAGACTCCTACCGCCATAGTTCCTAATGGTAAGGTCTTGCATCCTATCGTCTTATACT  
 TGGCGGTACGGCCGTTACGCCACGTGAGCCCTTCGGCTGGCAGTTGACGGCCGCTGT  
 TGTTACTCGACTGTCAGATACCTATAAACCTATCGCCAACCTGTGTAACAATGAAAA  
 ACGGTCAAATCCCGAAAAAATTTTGAAGCAGGATCGCATCCTGCTAAACTTTTGACA  
 AATGGTCAAACACGAAATTTTTGCCGCTCGTTGTGCCTCTGTAAGCTGGAAGCCTA  
 CGGTGTCGGCCTACCCCCACACGGTGCTGCCGCTGCTGCGCCCATCGCCAGCGCT  
 TCACGCTATATATCCACCCCGTCGTCGTCGTGAGTCTCACCAGGCAGATCGAGCCCTG  
 CGCAGCGAGGGGAAAGAGACACACACAGCGCCACCAGGCAAGTAGTAGTAAAAGG  
 CAAAAGCACGGCACATTAAGAGAGAGGCCAGCCAGCCCGGACCGGACCGGAGC  
 CAAGCAGCAGCCGCAGCCGCAGCCGCAGCAGAGGAGAGAGAGAGGGAGGGAGAA  
 GCATATATGGCGATGCCCTTTGCCTCCCTGTCGCCGGCAGCCGACCACCACCGCTCC  
 TCCCCATCTTCCCCTTCTGCCGCTCCTCCCCTCTCTACTCGTAAGCCGGCCGGCCGG  
 CCGGCCAACCGCCTCACTTCTTTCTTCGTATCTGCTTCCATCTTAGCTCGAGGGGTTC  
 GCTAATGCGGTGACCGTCTCCGGCGCCTGTGTTGTGTTCCGTGTGTGCAGGGTAGGG  
 GAGGAGGCGGCGCATCAGCATCCTCATCCTCAGCAGCAGCAGCACGCGATGAGCGG  
 CGCGCGGTGGGCGGCGAGGCCGGCGCCCTTACGGCGGCGCAGTACGAGGAGCTGG  
 AGCAGCAGGCGCTCATCTACAAGTACCTCGTCGCCGGCGTCCCCGTCCCGCAGGACC  
 TCCTCCTCCCCATCCGCCGCGGCTTCGAGACCCTCGCCTCGCGCTTCTACCACCACCA  
 CGCCCGTACGTACCCCATCCCTTCCCTCCTCCTACCCCGGCCAGGAGTAGTACTTGCTT  
 TTTTGCATTCGCCATGCGATTTGCCCGGTTGTTTATTTCGGATCGAGCACTTGCTTTTG  
 CATTGCCATGCGATTTGCCCGGCTTGTTTATTGGGATCGAGAGATTCAGGTGTGCT

CGACCCCATCCCATGATTCCCATCTCTTTGTTAATTGCTCCGGTCATTTGTTAATCC  
 CTCCCCGGATTTGGCCGAGCAAAAGTCTCATTATTCTAATCCGAGCAAGCCTCGTGC  
 CCCTGTTCAAAGATTTGCTCCTACCATCACACCTACCACCATCCAGCAAGCATCCC  
 CTGCCTCGCCGGGTCTTTTAATTTACTTGGGATTTCAATTCTCATGTCATGTCATGTGC  
 TATGATTTGATTAGATGGCGCTAGTCGAGTCTTGGGTTAGTTTCCATTGGTCCTTCCG  
 TGGCAAGGGGGTTATTCCTGTCTGGTTGTTGGGAGCCTCACCCACGCATTCACTCGC  
 TCGCTCGCTGGTCATGTCCTGCCACGGCCGATCTCACCGATCCATCCTGCATCGCAT  
 CACATGGACCCCGACGAAAAAGATCGGCAATCAACCACGCACAGCTCCTCCTTTC  
 CCCGAAATTATTTGTCATACGTCCTTCCTTCCTTCGTTCCCTTCCTTCTTGCGGGGTA  
 AATGATTGGTTTGGTGGGGTGGGCACACAGATAGATCCAGGACGAGGACGACCGCC  
 TTCGTCCGTCCCTCCGGCCGGCCGGCGTCATGATTGATTGCTACCTGCTACGGCCTTG  
 GACTGGACGCGTCTCCGTTCTTCCGATCTCGCGTCTCCTCCTGAGTTGATTTCTTGGT  
 CCCTCCGG

SEQ ID NO: 198; Sorghum bicolor (L.); SORBI\_004G269900; промотор размером 2  
 Т.П.Н.

TAAATATTGTTTATTATAGACTAACTAGGCTTAAAAAATTCGTCTCACAAATT  
 ACAATTGAACTGTCTAATTAGTTTATATTTTTGTCTATATTTAATGCTTCATGCATAA  
 GTATAAAGATTTGACGTGACAGAGAATCTAAAAAATTTTACAAAATTGTTTGGAACT  
 AAACAAGGCCCTAGAATACAAGGCTAAGGCCTTGTTTAGATGCACCCAAAAATCCA  
 AACTTTACAAGATTCTCCGTCACATCGAATCTTACAGCACATGCATGAAGTATTAA  
 ATATAGATAAAAAATAAAAACTAATTACACAGTTTATCTGTAAATCGCGAGACAAAT  
 CTTTTAAGCCTAGTTACTCCATGATTGGACAATGTTTGTCAAATAAAAAACGAAAGTG  
 CTACAGTGTCAAATCCAAAAAGTTTTTGCATCTAAACAAGCCCTAAATATAAGGCC  
 TCGTTTAGTTCACCCCAAAAATCAAAAACTTTTCAAGATTCTCCGTCACATCGAATC  
 TTGCGGCACATGCATAAAGCACTAAATAAAGATGAAAATAAAAACTAATTGTACAG  
 TTTACGTGTAAATGAATCTTTTTAAGCCTAATTACTCCATGATTAGATAATATTTATC  
 AAATAAAAAACGAAAGTTTTACGGTTTGGAAAACCAAAAAGTTTTTCGGAAGTAGCCC  
 TGTTTAAATTGAAGTTAAAATTTTTTTAGATGTCACGTTGTATGTGTGCGGAAGGATAT  
 CGGGAGGGGTTTTAAGAACTAATAAAAAGAACAAATTACATAGCTCGTCTAGAAAC  
 TGCAAGACAAATCTATTAATCATAATTAATATATCATTAGCACATATGAGTTATTAT  
 AGAACTTAAGGCTAATCATAGACTAACTAGGCTTAAAAGATTCATCTCGCAATTCTA  
 AACCAAACTGTGTAATTAGTTTATTTTTTATTTACATTTAGTGATCAATGTATGTGTC  
 CAAAGATTTGATATGATGAATCTAAACACAAATCTAGGCCTTGTTTAGTTTCAAAT  
 ATTTTGCAAATGGACACGGTAGCTCTTTCGTTTGTATTTGACAAATATTGTCCAATC  
 ATGGACTAAATAGGCTCAAAAGATTTATCTCGTCAATCCGACCAAACTGTGCAATT  
 AGTTTTTATTTTTGTCTATATTTAGTAATTCATGCATGTGTCTAAAGATTCGATATGA  
 CGTGGAATCTGAAAAATTTTGTAAAATTTTTTGGGAACTAAACAAGACCCTAACCAT  
 CAACAAATGACCGGATGTACAGTACTAGTTTCCAGTCGGCTGTCCAAACGCCCCCGC  
 TGCTCGCTCGCCGCTCGCCGGGAGTCTCGACACGCCTGACGCTCCAGCGCGAGGCA  
 GACAGCGACGCAGAGAGAGACAAAGGGGGCAATAAAGGCAGCGCGCGGAGCACC

AGCGAGGGAGCGAAGCAAAGCACATCACGAGCCCGGAAGCTCATTAAAGAGCAACT  
 CCAGCATTAGACCCTAAAACCTAAACCCCTACTTTTAATTTGGGTGCTCTTCCTACTTC  
 GTGGGGCTCAATTTTTTTGCTTCAACTCCAACAGTAGCACCCAAATTTAGGCCCCCA  
 AACTTATTCCAGAGAGAATGACACAAGGGACCCACTCGTCAGTGTCTTTTCTTCTT  
 CCTCTTTCTTCTTCCTTTGGACATGGACACAATTAGAGCATCGAGCCGGTTACCGTA  
 GGGTGTGATGCACATACAAGGGTAGAGAGAGAAGGAGCATGAGCTGAGGCTAGGA  
 CACGCGATGGAGGATGGGGGCTGCCCTGTTGGGCCAACAGGAATGGGGTCTAGGAG  
 AGAAATATGGGTGCCAGCCAAATATGGGGTCTGGAGTAGGGACCGTGCTGGAGTA  
 ATGTTTTTAGTCTGAGCACCCATATTTAGCTATTGGGGCTTGAGTAGAAGCTCTGCT  
 GGAGTTGCTCTAAAGAGGGGTGCCGTCCGGCCGGCCGCGGGGAGCAAGCAGCGCGC  
 GCGAGAGACAGGTTGAG

SEQ ID NO: 199: Glycine max (L.); GLYMA11G11826; промотор размером 2 т.п.н.

ACATACACTCTTTCTCTCCAAAAATAAATAAATTAATATACACTAGTTTGGCT  
 TTTAATTCCCAAATTACACCATTTTTTTGTGACATTGAGATGTAGGGATTTGACAACC  
 CGACTTCTCAGTGATTTTTTATTTTTTTTTAATTTAAATTTTATTTTTATTCTAAATTTAT  
 GTTTTAGTTTAAATTATTATACACAAAAGTTAAGAAGTTAAAAAGTTGGGATTCATC  
 CCTATTTTTTATCTATGGTTTTACTCCAATTTACTCTAATCAAGAATTAAGAGAATCT  
 AACTTACTTGAATGTTATAAATCCTTCATACCTTATTTAATTCTTACCTATAAAAAAT  
 CCCAATCAAGAAAAAATCCCAATTAAGAGAATCTAACTTACTTTAATTATAACCGA  
 AACAAAGCTACGTAAGTTGATTACAAAATGTACGAGAAACCAAATTAGTGATGGT  
 GAAAAAATCACCGACAAAAGTAAGAATCTACACGTGATCTGAGATCAGAGACATA  
 CTTAAGAAGCAACAATCAACAGCCGAAAACCAAATTAAGGTATATATTCCTTA  
 AATTGCTTTGTCCCTTTGACTTTTGCCATCGTGATGATTAATTAAGGTTTAGCAAAC  
 CCCTTCGAACTTCATACAATTGACTGAATTGAGAATTTTTATTTTCACATTCGAGGAA  
 GCGATGCTACAACATCACTTTTTTTGTTCTGTATTGTGCTTTTTAACTGCCTTTTTTCT  
 TCTTCTTTTTTTGCCTCCCTAACAAAGACATGTAAAAGTAATTGTAATAATATTCGTT  
 TCTTATGGAATGCAATCAGTTGATTGATGTAACCTATAAACTATTATCTCCTTAATATC  
 GAAAGACAAGTGAAGCCAAACACAAACAAGATAGGGCCTAGGGAGAGGTGTGGTC  
 CATGAATGATGAGGTATGGGTGACCAAACAATGAATGAATAATTGAAGCATCCTTG  
 ACCGTTGCTTGAGTTTGTGTCATCCTCAATAATATACTAGTCCCTTGGCTACAGAAA  
 CCGATAAGCCTAAAACCTGGAATTGCACACATTTACGTTTTTGATTTTGATTTTGTTTT  
 TGGCAATCTCGCCCCACATCAAATGTCACCCGCATTCCGGCAAGTAGTGGATGGTTT  
 CCTCTAGCGGTGCTTTGCCTTTGGGCCACTGGGCCCGCAATTACTCCAGCCCATCAT  
 GCCTTGTTGCTGTCCGTTAAAGGGTAGCATAATAAAAATAAAAAGTAGATCAACAAAA  
 TGAGAGCAAGTATTTCAAAAAAATAAACAATAGTAAAAAACAACCTTCTCTATTT  
 ATATTATCAAGATTTATTTATCTTAAAACATTCATTATCTCAAAAATACCTATATTAC  
 TTAATAGTATTTTCATGAATTTAAATCTAAGTTTACTATCAAACCTTTTAAAACA  
 ATTATTACACAACAAGTTATAATTGAATGTCATAAAAAAATTGATTATTGTGCTAA  
 CACGTGAAAAAATTTATATTTAATTTTTTTATGTATAATTTGTTTGGACCAATGATA  
 GAGATTAATTGTGATCTAATGAGTTATAAGAAATACGTGGCACATGATCCTAGACA

AAAATAAATAAGAATTGTAAAATAATGTATTTTATAGCTTTTCTGAAAGATTTTTTTT  
 TTTAATTTCTTCTCATGCCCATACATGAATACATGAATGAGAATTTTTATTTTTATTTT  
 TTTGTCTGAAATAAAGTTAAAAATTGGGAGCAGTGAATGTTAAGGATGACTTTTGAC  
 TTGAATGCAACAAGAAGTAAAGTTCACTTTAAGTTGGAGGCTTGGAGCATCGCCATC  
 CATAACACAACAATCGACAATCCTAATGGTTCCGACAAAGCTCGACCTGAGTGT  
 GATCTCATGATGTTTCTGCTCTAACTATGTTTGATTTGGATACCCAACAACAAAAAG  
 AGTGTGTCGTGTTGTTGTAGTTAATAGTAATAGGACTAAGTAAGAGTAGTGAAAA  
 C

SEQ ID NO: 200: Brassica napus; BnaA03g16700D; промотор размером 2 т.п.н.

CATACCTTCAGGATGTGTGAAGCATTTCCTATTGAATTTTGTGCGATAAAAATAGA  
 AATTGCAAGTTGAACAAATTGCAATATATATGGAAAGATGCTAGCTAGTGCCAATA  
 ATATATTAACGGAACAATTCATATTTTATATTATATAATGATTATTTTAGTTT  
 TTAGTTAATACTAATAAATAAAGAAATATAACTACATAGTTTAAAATGATAGTGT  
 GTTCTAAATTTGTTAAATGGATATCTAAATCAGTTTAGGTGGCTTTTAAATGTTATTT  
 TATGTTTCATGTAAATTAATTATTGTTTTACATTTAACATTGTATTACTTTTTATCATAT  
 TAGTTAATTAATGACACTCGTTTTTCAATCTAAAATCAAAATATCAGACATATTCATCT  
 TTATAACAATATGAAAATTAATTTTCAGTATTAATCTAAAAAATCTATTTAAATTTTG  
 ATGCGTCTGACTTATAAAAACACACACACATATATATATATATATATATGTATATATTT  
 ATTAATTAGTAAAATTTATTTTAAGAAAAATTGAAACTAATTAATTTTGGGAAAGT  
 AGTGATTATATAATAGTTTTGTTATTTTATATGCTAAAATTTATTAAGTACTTTTTTTT  
 TTAATTTGAGACTTACCAAATTACGGATCCTAAATATATTGATCTTGAATTATGATAT  
 ATTAATTAATTTTAAAGTTATCATAAATTTGTTGTGAATTCAGTTTAGGTAATTGTC  
 TATTAATTAGAAAAAAGATAAATAATGATAAAGTTATGTTAGTTATTAGTTTAATA  
 GTATTGAGGTGTAAATAAATTAAGTTGTAATGGTTAATTTATAAGTGTATTTGTGT  
 TTTAATTATATTAGATTTCAATTGATTCACAGATAATTCAACATGTTCCATGTAATT  
 AATGTTACAGCAGAAATCTAGATAAATTTTTTTTTTAACTGGATAATGCGATTAT  
 AAACGATAAGACGATTCTATATGCGACATGTCTTATAATGATTCATGTCTGAATACA  
 TCATTTGAACCGTTTTATAAGATCTACGTTTGGTGGTATTTTTTTGTGCTATGCTGCAG  
 ATTTTTTATAAGTATTTATTTTCAATTCGCATAATTTTATTTTTTTTCTAAAGATCG  
 AAACCTCCGATTTTATGGTGTGGAACATCTAGATAGAGATCTATGGATAAAACAAATA  
 TAGAGGAAGCTACACAATTTAAAGGGTCAAAATAGAAACACAGAACTGAAAAGTAT  
 ACTCAGTGCCATATGATTTAATAGTATGAATTTAACTTGAACCTAATGTCGTTTGGTT  
 TGTCATCAAATGCAACTGCAAATCATATCGAAGTAACGCCCGTGTCATAATATATCT  
 GATTAAGGACTATTATTTTCTGTTTGACAAAAAAAAGGACTATTATTTTCTCACT  
 AATCAGGCTATTGTTTTTTTCTCAATAAACTAATTTAAAGAAATACAGATTATTCAA  
 GTGCTATTTCCAAGGCAGATGCAGGTTACTATCTCTCGATCTTCATCTCGGAGTGTG  
 GTTCTTTATGTGTTTTCTGACTTGCTTTATTATACTAATATTATTAATAGATTAATGA  
 AGATTAATAGTTTAATAGATTAATGAAGACATAAACTATAATTTAATAATCATAGAT  
 TAATGAAGATTTGTGAACCCCATTAATAAAGTTTAATAGTTGTTGTTCTTATAGTCTT  
 TTACCGTATAGTTTTCTCCCCCATCTGTCTCGTCTCACTGTCTTTTCTCTCAAGTTT

CAAGTGCCCTAAATAAAAACCTCTTTCCCCTTCTCTCTCTCTGCAGAAGAAGGTCAG  
 ATACAGAAACTGACTGCAAAGAACAAAGCTGCAAGGTGCAGCTATTCCTTAGTAAA  
 AAGCTTTGTTCTCTTTCTTCTTTTGCTCTTCACATCCCCCAACAGAGACTTTTCTGC  
 TATTTAAAACCAGACCCTGGAAAAAGTAGCCAACACTCTCTCTTTCCC

SEQ ID NO: 201; Solanum lycopersicum; Solyc08g075950; промотор размером 2  
 Т.П.Н.

CATTTAATTAGTTAAATCAAATACATACATATATAATTGTTATTAATTTTTAG  
 GTATGATGTACCATTAAGACTAAGAAGATCAGTGATGACGCAACGTATTTCAATTTT  
 TTTGTGGGTTAAGTATATGTCTTAAACTTAACATAGATTTAAAATTATTTAAATTGTT  
 AATACCTAAAGTTTATTTTTATTTTCATTTTTGAAAGAACAATAATTCAAGTGGGTAA  
 TTGACAAATTATTTGAATATAAAAAAATGAAAAACAGAGAAAAAAAACATTAGT  
 AAAATCATTAAATTACACCAAACAAATTTGGAGAATTGAAAAAGAACATTTATAAC  
 AACTCTAATATAAATAAAAAGAAAATTAATTACAAAAGTTTTTTTTAAAAAAAAT  
 AAAGGGTTAGTTTAGTCATTTAGGAATCTTATCCGAGGTTTAAACAAATTTTGAATTA  
 GTTATCCCTCCATTTTCGAAGGGATAAGATAATACTAGATATGATGGATAAGCAATCC  
 ATGAGTTAAATTAAATGAAGTAACCAAACAATGTATTAGTTGAATTAATTTTAAT  
 CCATAAATTATTCTACCTAATATTGTCTATCAAACGGGTCCTTAGTATTAGTTAACTG  
 GTGACGAGGATCATATAATTTAAAGAGTTGGGTCCAGTTTTAAAGCGTGATTATAGC  
 GAAATGAAATGTTTCTTATCCACCAAAAATTTGATTATAAAACGAAAATGACTCTC  
 GTTGAGAAAAGAAAATTTACAAATGATATTCATCCTCCCGTAATTCTCATATAATTT  
 GTTTTTGATGTACATGAATATTTTTTAAAATAGTTTTTTTAGTTTTTACAAAATATA  
 TAATCTCACTCAACACAAACTCGTTAGGAATTAATTAAACTTTTGTGTTGATCAAC  
 ATAAGTCGCATAACTTATGAGTTTTGATATCGAACTTTGTCTGGACTGGATATAAATT  
 AGAAAACAGAGTCATGAAATACTTAATATAAGTCACATAATTTATGAATTTTGATAT  
 TAGACTTTGTCTTGCTCGAAACAAGTTTTGAATAAAAAAATTATGCAATACGACAT  
 AACTAATGAGATTAATCACATTTGCATTATCAAGACTCATAAATACAAAATTTCTA  
 AATTGAGTAATCTCATCTATGTCATCTGTTACATACAAAACATAAAAACCTATCTATG  
 CCACCACACTTCTTGATGATGTGTTGGAGCTTATTTCTCAAGATATTTACATTCTTG  
 CTCAAACAAAAGCACAAAGTTTCAAAAAGTAAAAAAGAGAGAAAAACAA  
 TCATATATATATATATATATCAAACCTAGAATAAGATCTTTTGTAGGTCATCTTAATTA  
 TTGTTGAACCTTAAAGGACAAAGTTTACATCTTTAGGGTCATGATACATTCACATGA  
 CTAAATTTTGAAGATATAAAAAGAGGTGTTACATCATTTGGACCACAATAAGACA  
 TTATCCATTCTACCCCACTCCATAAGGTCCCCCTTCTTTCAATCCCCTTTTCTCCCCC  
 CATGCCCAATGCTTCCTTAAACCCTTCATTATCTTTCACAAAACCTATACTATAATG  
 TCATCATTCATATTGTTATTGTCATTTATTCTTCTCACCATAAAGTTCAATGTAAGTTT  
 GTTAATTTTGTCTTGACATTAATAAGTACTAGTGTTATGAATGTTTCTTGATTTTAC  
 TCTAATTAATCTCACTCTCTTTCTTTCAGCTTTTATCTCTCTGCTCTTTCTTCCATGCT  
 TGTCCAAACCCTAGATCTGTCCCCCTCTTAGGTAACCTCAACAAAACCTTTGCTCTCTAT  
 AACTCACACACAACACAAAAACACATTCTTTTTCTCTTTCTCTGTGTATATGTTTG  
 TATATTAACCTGATATTGTGTTGATTTCTAGGTGCAGCTTTTTGAGTGAAGTGAAAAA

GGGGAAAGGGGGGTGGGTAAAATTTGGAAAGATTAGTTTTTTAGTGAAGGGAGAAG



**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении, причем способ включает повышение экспрессии или уровней регулирующего рост фактора (GRF) или повышение активности регулирующего рост фактора.
2. Способ по п.1, где GRF представляет собой GRF4, или его гомолог или ортолог.
3. Способ по п.1 или 2, где способ дополнительно включает увеличение урожая зерна и/или ассимиляции С в растении.
4. Способ по п.3, где увеличение урожая зерна выбрано из увеличения количества зерен на колос или на растение и/или увеличения массы 1000 зерен.
5. Способ по любому из предшествующих пп., где способ включает внесение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в одну нуклеиновую кислоту, кодирующую GRF и/или промотор GRF.
6. Способ по п.5, где мутация представляет собой замену.
7. Способ по п.5 или 6, где мутация находится в участке связывания микро-РНК (мкРНК), предпочтительно в участке связывания мкРНК396.
8. Способ по любому из предшествующих пп., где нуклеиновая кислота кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или его функционального варианта или гомолога.
9. Способ по п.8, где нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1 или 2 или ее функционального варианта или гомолога.
10. Способ по любому из предшествующих пп., где нуклеиновая кислота, кодирующая промотор GRF, содержит или состоит из SEQ ID NO: 7 или 8 или их функционального варианта или гомолога.
11. Способ по любому из предшествующих пп., где мутацию вносят с использованием направленной модификации генома, предпочтительно ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9.
12. Способ по любому из пп.1-4, включающий введение и экспрессию в растении конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеиновую кислоту GRF.
13. Способ по п.12, где GRF представляет собой GRF4 или его функциональный вариант или гомолог.
14. Способ по п.12 или 13, где конструкция нуклеиновой кислоты содержит регуляторную последовательность.
15. Способ по п.14, где регуляторная последовательность представляет собой конститутивный промотор.
16. Способ по п.14, где регуляторная последовательность представляет собой промотор GRF, как определено в SEQ ID NO: 9, или его функциональный вариант или гомолог.
17. Способ по любому из пп.12-16, где нуклеиновая кислота GRF кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или 6 или

их функционального варианта или гомолога.

18. Способ по п.17, где нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5.

19. Способ по любому из предшествующих пп., где указанное увеличение поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и/или урожая, и/или ассимиляции С происходит относительно растения дикого типа или контрольного растения.

20. Способ по любому из предшествующих пп., где азот представляет собой азот нитрата или аммония.

21. Способ по любому из предшествующих пп., где поглощение азота, и/или ассимиляция азота, и/или эффективность использования азота увеличиваются в побегах и/или корнях растения.

22. Способ по любому из предшествующих пп., где высота растения не изменяется.

23. Способ по любому из предшествующих пп., где поглощение азота, и/или ассимиляция азота, и/или эффективность использования азота возрастают в условиях низкого или высокого поступления азота, предпочтительно в условиях низкого поступления азота.

24. Способ по любому из предшествующих пп., где растение является однодольным или двудольным.

25. Способ по п.24, где растение выбрано из риса, кукурузы, пшеницы, ячменя, сорго, картофеля, томата, сои и *V.napus*.

26. Способ по п.25, где растением является рис.

27. Способ по п.26, где рис представляет собой рис сорта *indica* или *japonica*.

28. Растение, полученное или получаемое по любому из пп.1-27.

29. Генетически измененное растение, его часть или клетка растения, где экспрессия или уровень регулирующего рост фактора (GRF) или активность GRF увеличены по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением, и где растение характеризуется увеличением по меньшей мере одного из поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением.

30. Генетически измененное растение по п.29, где GRF представляет собой GRF4 или его гомолог или ортолог.

31. Генетически измененное растение по п.29 или 30, где растение экспрессирует конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту GRF.

32. Генетически измененное растение по п.31, где конструкция нуклеиновой кислоты содержит регуляторную последовательность.

33. Генетически измененное растение по п.32, где регуляторная последовательность представляет собой конститутивный промотор.

34. Генетически измененное растение по п.33, где регуляторная последовательность представляет собой промотор GRF, как определено в SEQ ID NO: 9,

или его функциональный вариант или гомолог.

35. Генетически измененное растение по пп.31-34, где нуклеиновая кислота GRF кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или 6 или их функционального варианта или гомолога.

36. Генетически измененное растение по п.35, где нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5.

37. Генетически измененное растение по п.29, где растение содержит по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одной нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид GRF и/или промотор GRF.

38. Генетически измененное растение по п.37, где указанная мутация представляет собой замену.

39. Генетически измененное растение по п.37 или 38, где мутация внесена с использованием направленной модификации генома, предпочтительно посредством ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9.

40. Генетически измененное растение по любому из пп.37-39, где мутация находится в участке связывания микроРНК (мкРНК), предпочтительно в участке связывания мкРНК396.

41. Генетически измененное растение по любому из пп.37-39, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или ее функционального варианта или гомолога.

42. Генетически измененное растение по п.41, где нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1 или 2 или их функционального варианта или гомолога.

43. Генетически измененное растение по любому из пп.37-42, где нуклеиновая кислота, кодирующая промотор GRF, содержит или состоит из SEQ ID NO: 7 или 8, или их функционального варианта или гомолога.

44. Генетически измененное растение по любому из пп.29-43, где растение является однодольным или двудольным.

45. Генетически измененное растение по п.44, где растение выбрано из риса, кукурузы, пшеницы, ячменя, сорго, картофеля, томата, сои и *V.napus*.

46. Генетически измененное растение по п.45, где растение представляет собой рис.

47. Генетически измененное растение по п.46, где рис представляет собой рис сорта *indica* или *japonica*.

48. Часть растения по любому из пп.29-47, где указанная часть растения представляет собой зерно или семя.

49. Способ получения растения с увеличенным поглощением азота, и/или ассимиляцией азота, и/или эффективностью использования азота, причем способ включает повышение экспрессии или уровней регулирующего рост фактора (GRF) или повышение активности регулирующего рост фактора.

50. Способ по п.49, где растение также имеет увеличенный урожай и/или ассимиляцию С.

51. Способ по п.49 или 50, где GRF представляет собой GRF4 или его гомолог или

ортолог.

52. Способ по любому из пп.49-51, где способ включает внесение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в одну нуклеиновую кислоту, кодирующую GRF и/или промотор GRF.

53. Способ по п.52, где мутация представляет собой замену.

54. Способ по п.52 или 53, где мутация представляет собой участок связывания микроРНК (мкРНК), предпочтительно участок связывания мкРНК396.

55. Способ по любому из пп.52-54, где нуклеиновая кислота кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или ее функционального варианта или гомолога.

56. Способ по п.55, где нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1 или 2 или их функционального варианта или гомолога.

57. Способ по любому из пп.52-56, где нуклеиновая кислота, кодирующая промотор GRF, содержит или состоит из SEQ ID NO: 7 или 8 или их функционального варианта или гомолога.

58. Способ по любому из пп.52-57, где мутацию вносят с использованием направленной модификации генома, предпочтительно посредством ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9.

59. Способ по любому из пп.49-51, где способ включает введение и экспрессию конструкции нуклеиновой кислоты GRF.

60. Способ по п.59, где конструкция нуклеиновой кислоты содержит регуляторную последовательность.

61. Способ по п.60, где регуляторная последовательность представляет собой конститутивный промотор.

62. Способ по п.60, где регуляторная последовательность представляет собой промотор GRF, как определено в SEQ ID NO: 9, или его функциональный вариант или гомолог.

63. Способ по любому из пп.59-62, где нуклеиновая кислота GRF кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или 6 или их функционального варианта или гомолога.

64. Способ по п.63, где нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5.

65. Способ по любому из пп.49-64, где указанное повышение поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота, и/или урожая, и/или ассимиляции С происходит относительно растения дикого типа или контрольного растения.

66. Способ по любому из пп.49-65, где азот представляет собой азот нитрата или аммония.

67. Способ по любому из предшествующих пп., где поглощение азота, и/или ассимиляция азота, и/или эффективность использования азота повышены в побегах и/или

корнях растения.

68. Способ по любому из пп.49-67, где высота растения не изменяется.

69. Способ по любому из пп.49-68, причем способ дополнительно включает определение повышения по меньшей мере одного из поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота и урожая зерна.

70. Способ по п.69, где способ дополнительно включает регенерацию растения и скрининг в отношении повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота и урожая зерна, и/или ассимиляции С.

71. Способ по любому из пп.49-70, где растение является однодольным или двудольным.

72. Способ по п.71, где растение выбрано из риса, кукурузы, пшеницы, ячменя, сорго, картофеля, томата, сои и *V.napus*.

73. Способ по п.72, где растение представляет собой рис.

74. Способ по п.73, где рис представляет собой рис сорта *indica* или *japonica*.

75. Растение, часть растения или клетка растения, полученные или получаемые способом по любому из пп.49-74.

76. Способ идентификации и/или селекции растения, которое будет иметь увеличенное поглощение азота, и/или ассимиляцию азота, и/или эффективность использования азота, предпочтительно по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением, причем способ включает детекцию в растении или зародышевой плазме растения по меньшей мере одного полиморфизма по меньшей мере в одном гене GRF или промоторе GRF и селекцию указанного растения или его потомка.

77. Способ по п.76, где полиморфизм представляет собой замену.

78. Способ по п.76 или 77, где способ дополнительно включает интрогрессирование хромосомной области, содержащей по меньшей мере один полиморфизм в гене или промоторе GRF, во второе растение или зародышевую плазму растения, с получением подвергнутого интрогрессированию растения или зародышевой плазмы растения.

79. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеиновую кислоту GRF, где нуклеиновая кислота GRF кодирует полипептид GRF, где полипептид GRF содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или 6 или их функционального варианта или гомолога, и предпочтительно регуляторной последовательности.

80. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.79, где регуляторная последовательность представляет собой конститутивный промотор.

81. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.80, где регуляторная последовательность представляет собой промотор GRF, как определено в SEQ ID NO: 9, или его функциональный вариант или гомолог.

82. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.80, где нуклеиновая кислота содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5.

83. Вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп.79-

82.

84. Клетка-хозяин, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по п.83.

85. Клетка-хозяин по п.84, где клетка представляет собой бактериальную клетку или растительную клетку.

86. Трансгенное растение, экспрессирующее конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп.79-82.

87. Трансгенное растение по п.86, где растение является однодольным или двудольным, предпочтительно выбранным из риса, кукурузы, пшеницы, ячменя, сорго, картофеля, томата, сои и *V.parus*.

88. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп.79-82 для повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении.

89. Способ повышения урожая в растении, причем способ включает модулирование экспрессии промотора GRF, где способ включает внесение по меньшей мере одной мутации в промотор GRF, где промотор GRF содержит или состоит из

а. последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в SEQ ID NO: 7, 8, 9 или 192-201; или

б. последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% общей идентичностью последовательности с (а); или

с. последовательности нуклеиновой кислоты, которая способна гибридизоваться в жестких условиях, как определено в настоящем описании, с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно любому из (а)-(б).

90. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один ДНК-связывающий домен, который может связываться по меньшей мере с одним геном GRF.

91. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.90, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере один протоспейсерный элемент, и где последовательность протоспейсерного элемента выбрана из SEQ ID NO: 50, 53, 58, 61, 66, 69, 74, 77, 82, 86, 91, 94, 99, 102, 107, 110, 115, 118, 123, 126, 131, 134, 139, 142, 147, 150, 155, 158, 163, 166, 171, 174, 179, 182, 187 и 190 или последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 50, 53, 58, 61, 66, 69, 74, 77, 82, 86, 91, 94, 99, 102, 107, 110, 115, 118, 123, 126, 131, 134, 139, 142, 147, 150, 155, 158, 163, 166, 171, 174, 179, 182, 187 и 190.

92. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.90 или 91, где указанная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность РНК CRISPR (cr-РНК), где указанная последовательность cr-РНК содержит последовательность протоспейсерного элемента и дополнительные нуклеотиды.

93. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-92, где указанная

конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансактивирующую РНК (tracr-РНК), где предпочтительно tracr-РНК имеет последовательность SEQ ID NO: 46 или ее функционального варианта.

94. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-93, где указанная конструкция кодирует по меньшей мере одну одиночную гидовую РНК (огРНК), где указанная огРНК содержит последовательность tracr-РНК и последовательность cr-РНК, где огРНК содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 51, 54, 59, 62, 67, 70, 75, 78, 83, 87, 92, 95, 100, 103, 108, 111, 116, 119, 124, 127, 132, 135, 140, 143, 148, 151, 156, 159, 164, 167, 172, 175, 180, 183, 188 и 191 или их варианта.

95. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-93, где указанная конструкция функционально связана с промотором.

96. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.95, где промотор представляет собой конститутивный промотор.

97. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-96, где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент CRISPR.

98. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.97, где фермент CRISPR представляет собой белок Cas.

99. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.98, где белок Cas представляет собой Cas9 или его функциональный вариант.

100. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.90, где конструкция нуклеиновой кислоты кодирует эффектор TAL.

101. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.90 или 100, где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую эндонуклеазу или ее домен расщепления ДНК.

102. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.101, где эндонуклеаза представляет собой FokI.

103. Молекула одиночной гидовой (ог)РНК, где указанная огРНК содержит последовательность cr-РНК и последовательность tracr-РНК, где последовательность cr-РНК может связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 49, 52, 57, 60, 65, 68, 73, 76, 81, 85, 90, 93, 98, 101, 106, 109, 114, 117, 122, 125, 130, 133, 138, 141, 146, 149, 154, 157, 162, 165, 170, 173, 178, 181, 186 и 189 или ее варианта.

104. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая донорную нуклеиновую кислоту ДНК, выбранную из 48, 56, 64, 72, 80, 84, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 145, 153, 161, 169, 177 и 185 или из варианта.

105. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.104, где конструкция дополнительно содержит по меньшей мере одну огРНК, выбранную из 51, 54, 59, 62, 67, 70, 75, 78, 83, 87, 92, 95, 100, 103, 108, 111, 116, 119, 124, 127, 132, 135, 140, 143, 148, 151, 156, 159, 164, 167, 172, 175, 180, 183, 188 и 191, предпочтительно функционально связанную с регуляторной

последовательностью.

106. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.104 или 105, где конструкция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую фермент CRISPR, предпочтительно функционально связанную с регуляторной последовательностью.

107. Выделенная клетка растения, трансфицированная по меньшей мере одной конструкцией нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-106 или по меньшей мере одной оГРНК по п.103.

108. Выделенная клетка растения, трансфицированная по меньшей мере одной конструкцией нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-96 и второй конструкцией нуклеиновой кислоты, где указанная вторая конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Cas, предпочтительно белок Cas9 или его функциональный вариант.

109. Выделенная клетка растения по п.108, где вторая конструкция нуклеиновой кислоты вводится посредством трансфекции до, после или одновременно с конструкцией нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-96.

110. Генетически модифицированное растение, где указанное растение содержит трансфицированную клетку по любому из пп.107-109.

111. Генетически модифицированное растение по п.110, где нуклеиновая кислота, кодирующая оГРНК, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая белок Cas, встраивается в стабильной форме.

112. Способ повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении, причем способ включает введение и экспрессию в растении конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-106, или оГРНК по п.103, где предпочтительно указанное повышение происходит относительно контрольного растения или растения дикого типа.

113. Растение, полученное или получаемое способом по п.112.

114. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-106 или оГРНК по п.103 для повышения поглощения азота, и/или ассимиляции азота, и/или эффективности использования азота в растении.

115. Применение по п.114, где конструкция нуклеиновой кислоты или оГРНК увеличивает экспрессию и/или активность GRF в растении.

116. Способ получения генетически модифицированного растения по любому из пп.37-48, причем способ включает:

d. выбор части растения;

e. трансфекцию по меньшей мере одной клетки части растения согласно (a) конструкцией нуклеиновой кислоты по любому из пп.90-106 или оГРНК по п.103;

f. регенерацию по меньшей мере одного растения, происходящего из трансфицированной клетки или клеток;

отбор одного или нескольких растений, полученных согласно (c), которые демонстрируют увеличенную экспрессию по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты



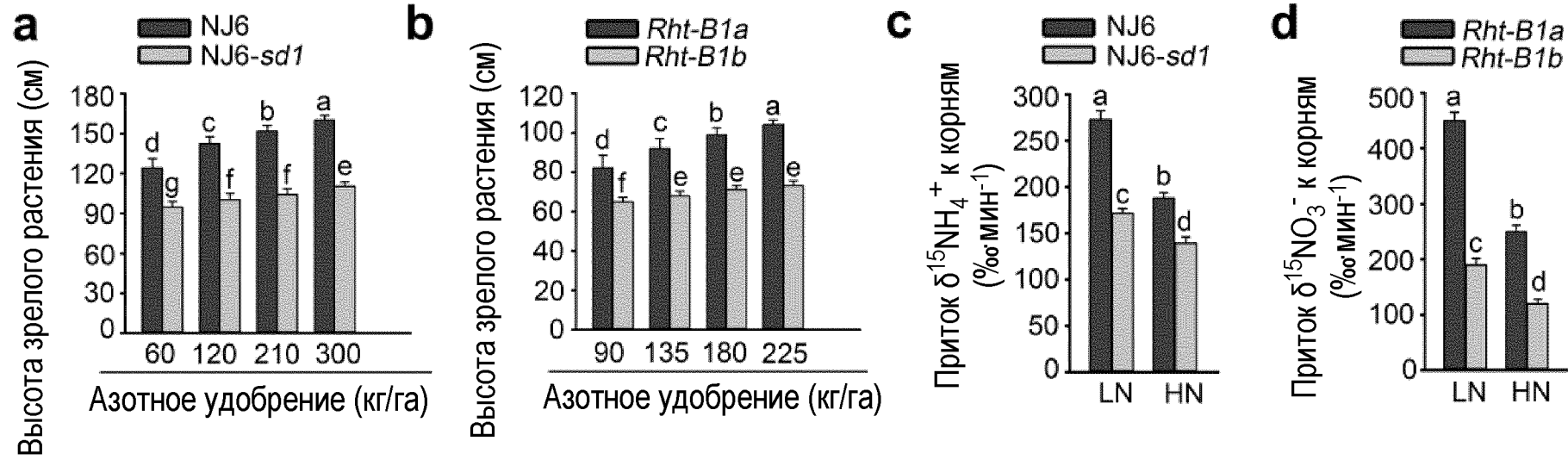
GRF в указанном растении.

117. Способ повышения метаболизма углерода и/или пролиферации клеток в растениях, причем способ включает повышение экспрессии или увеличение уровней GRF4.

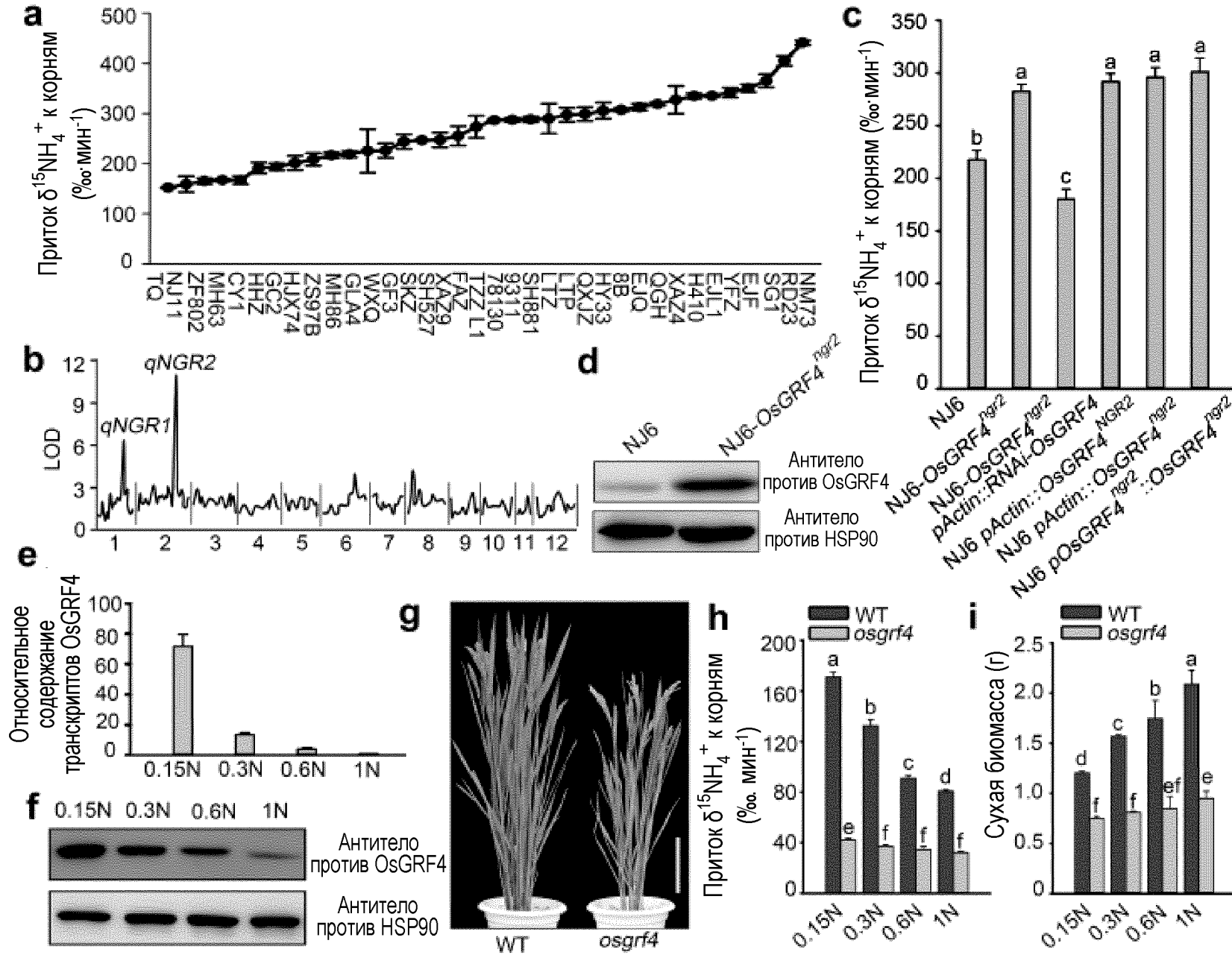
118. Способ по п.117, где метаболизм углерода выбран из по меньшей мере одного из фотосинтеза, передачи сигнала углерода и сахарозы, или нагрузки флоэмы.

По доверенности

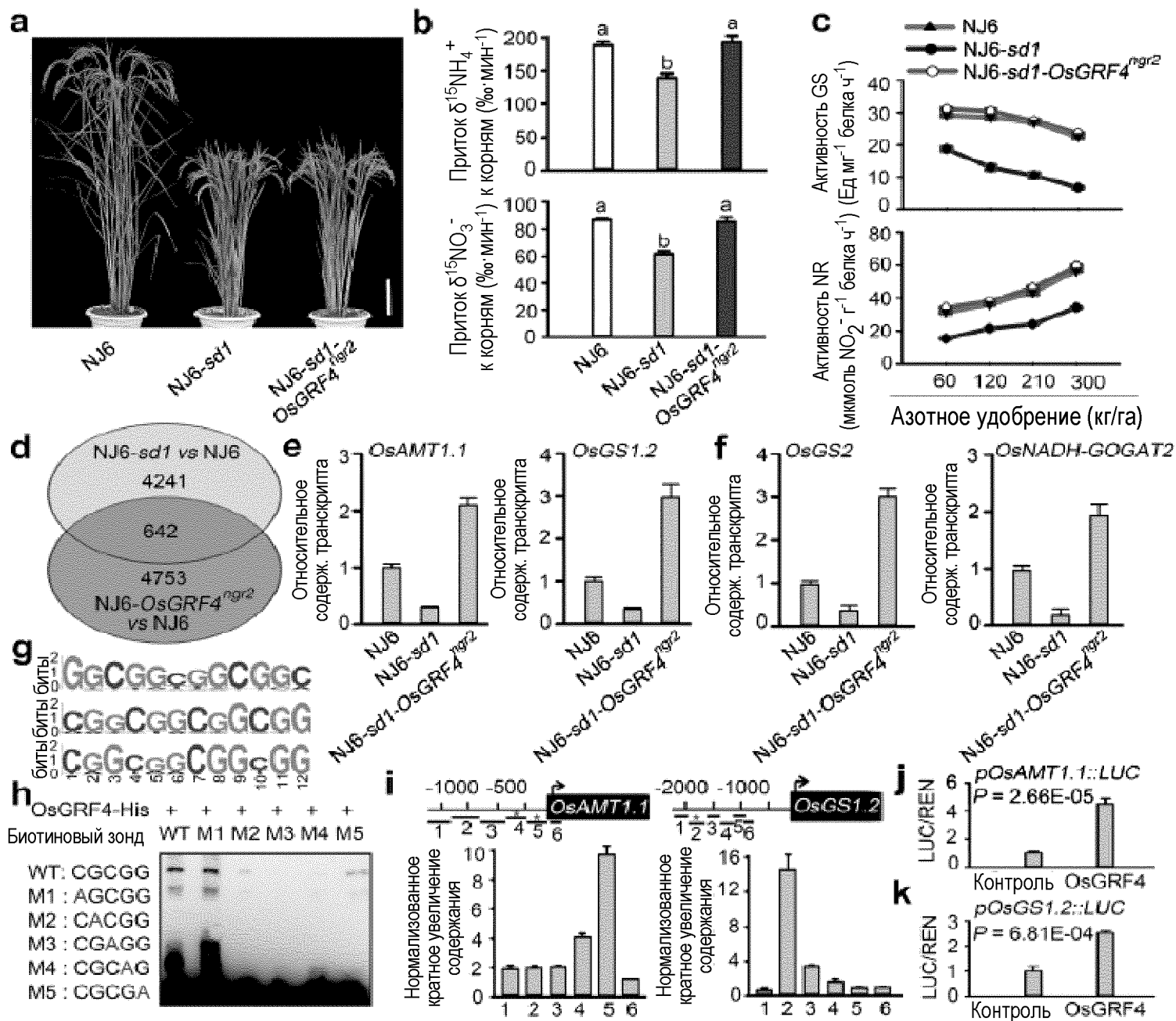
ФИГ.1



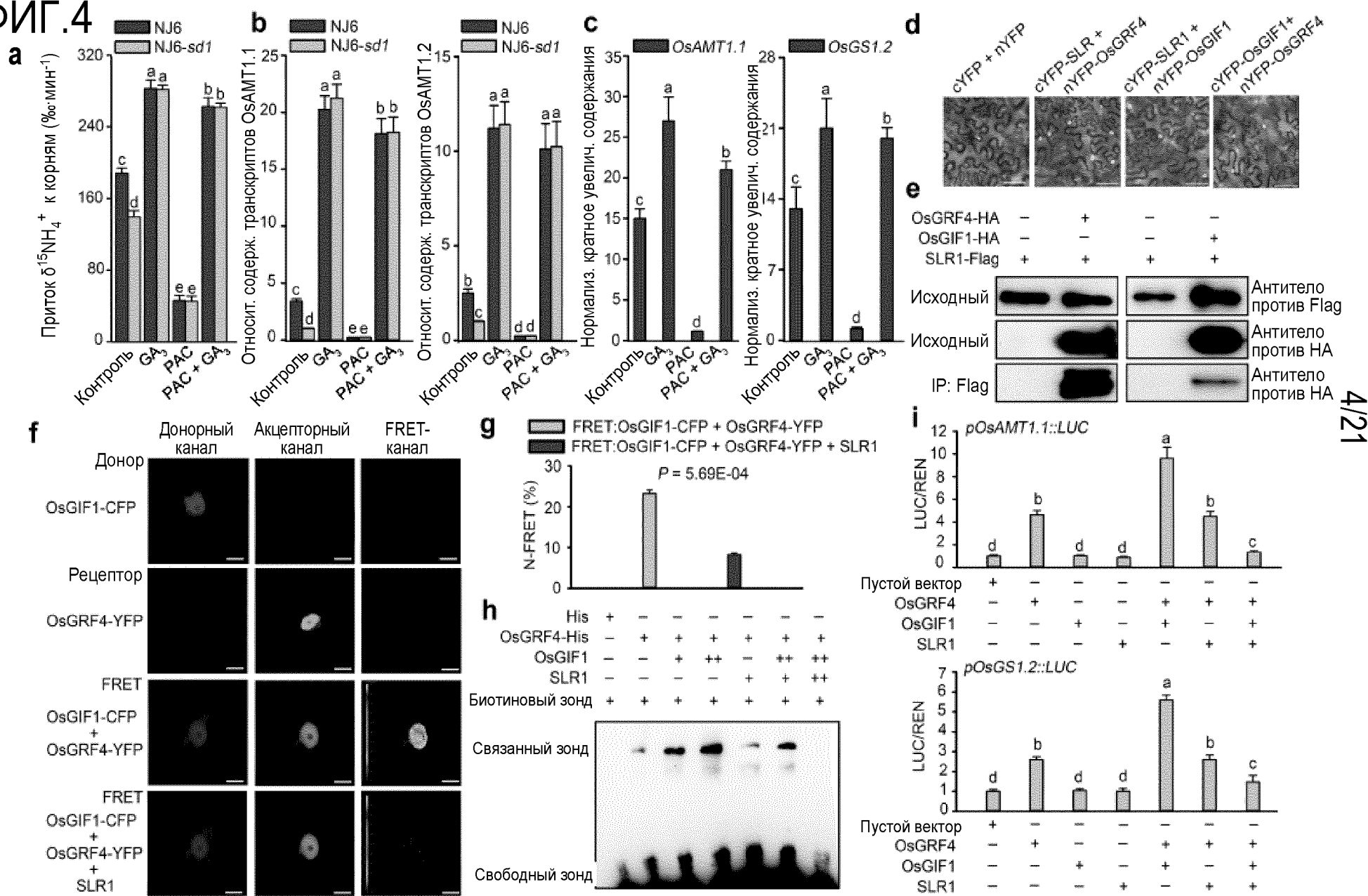
ФИГ.2



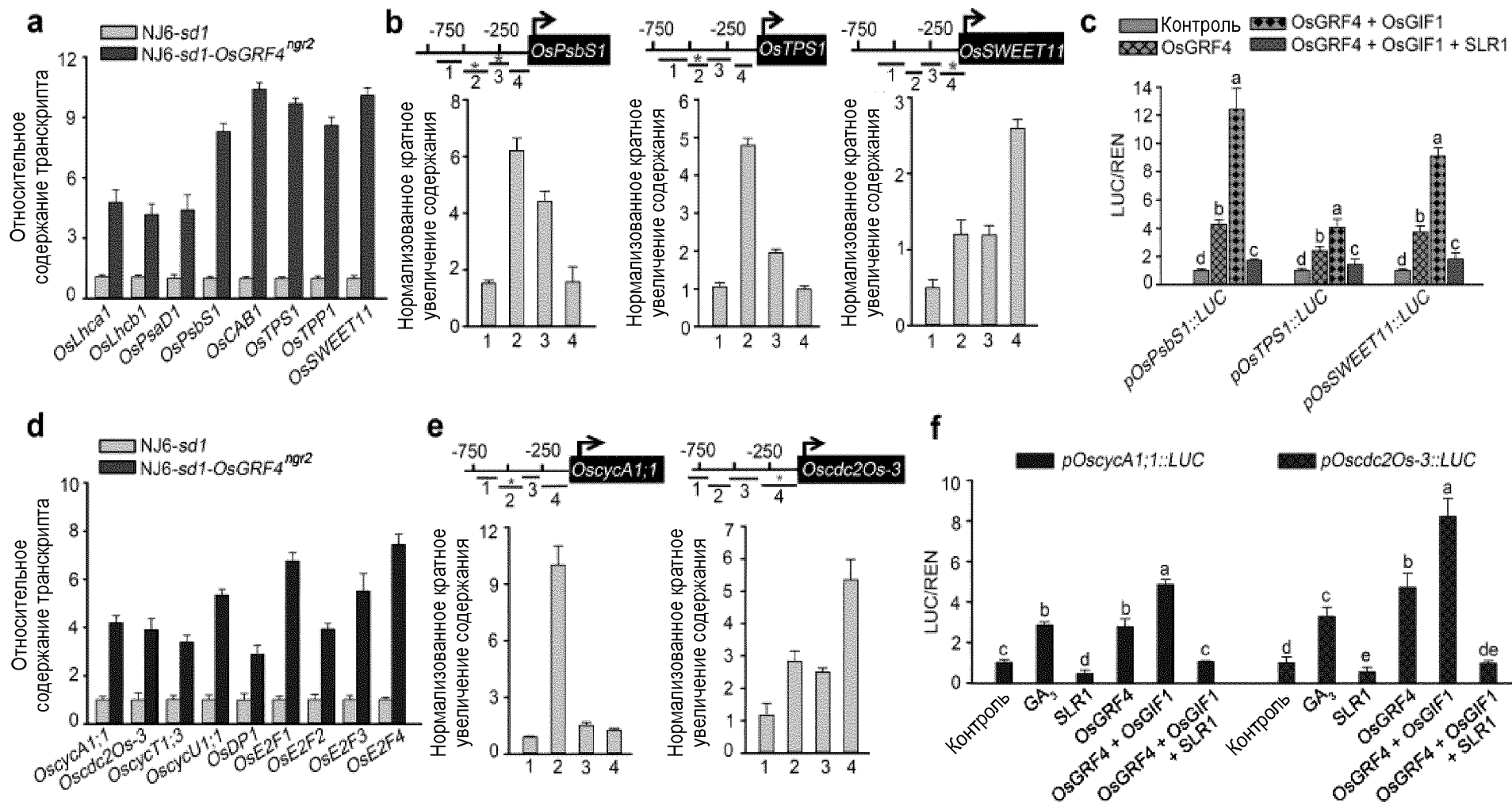
ФИГ.3



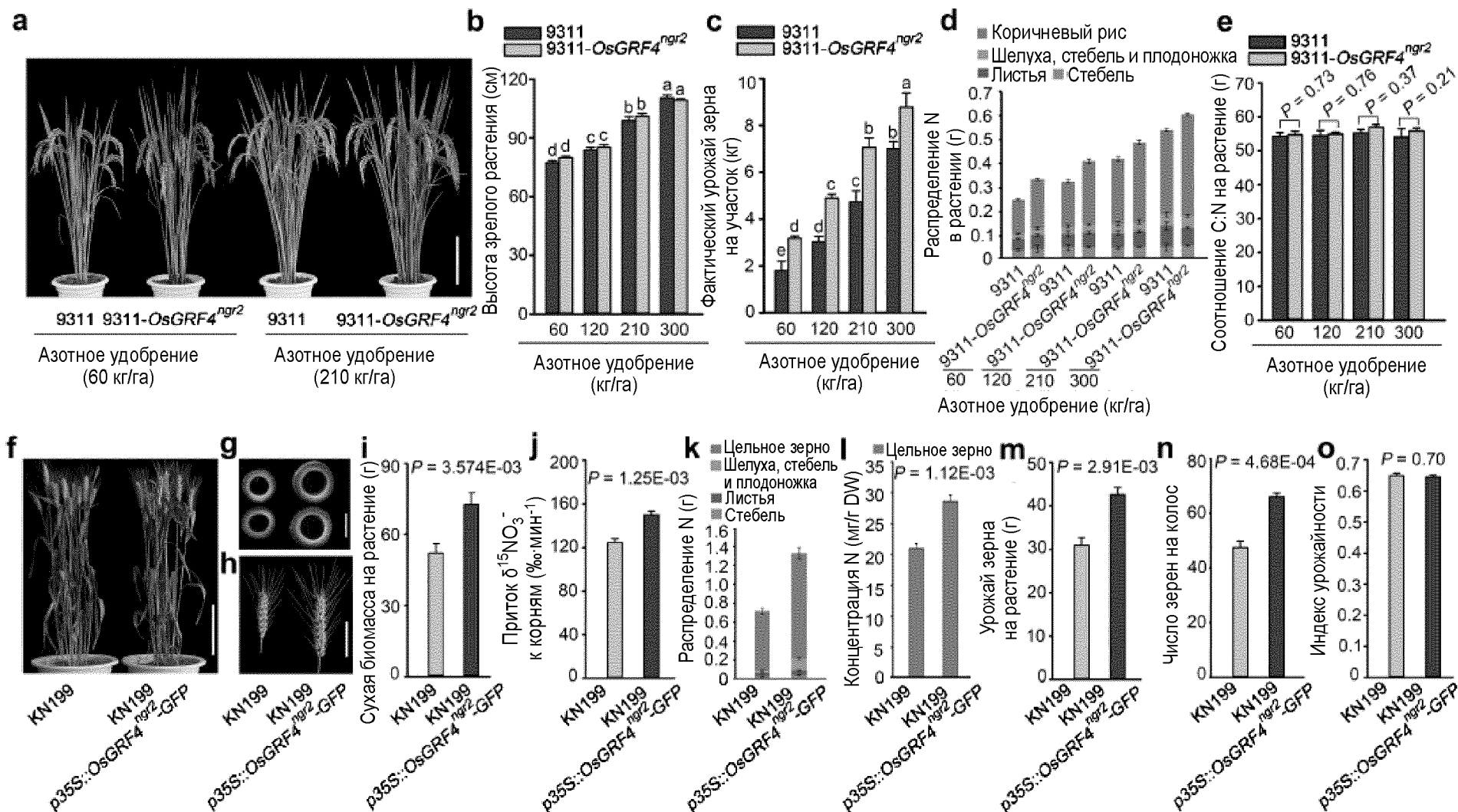
# ФИГ.4



# ФИГ.5



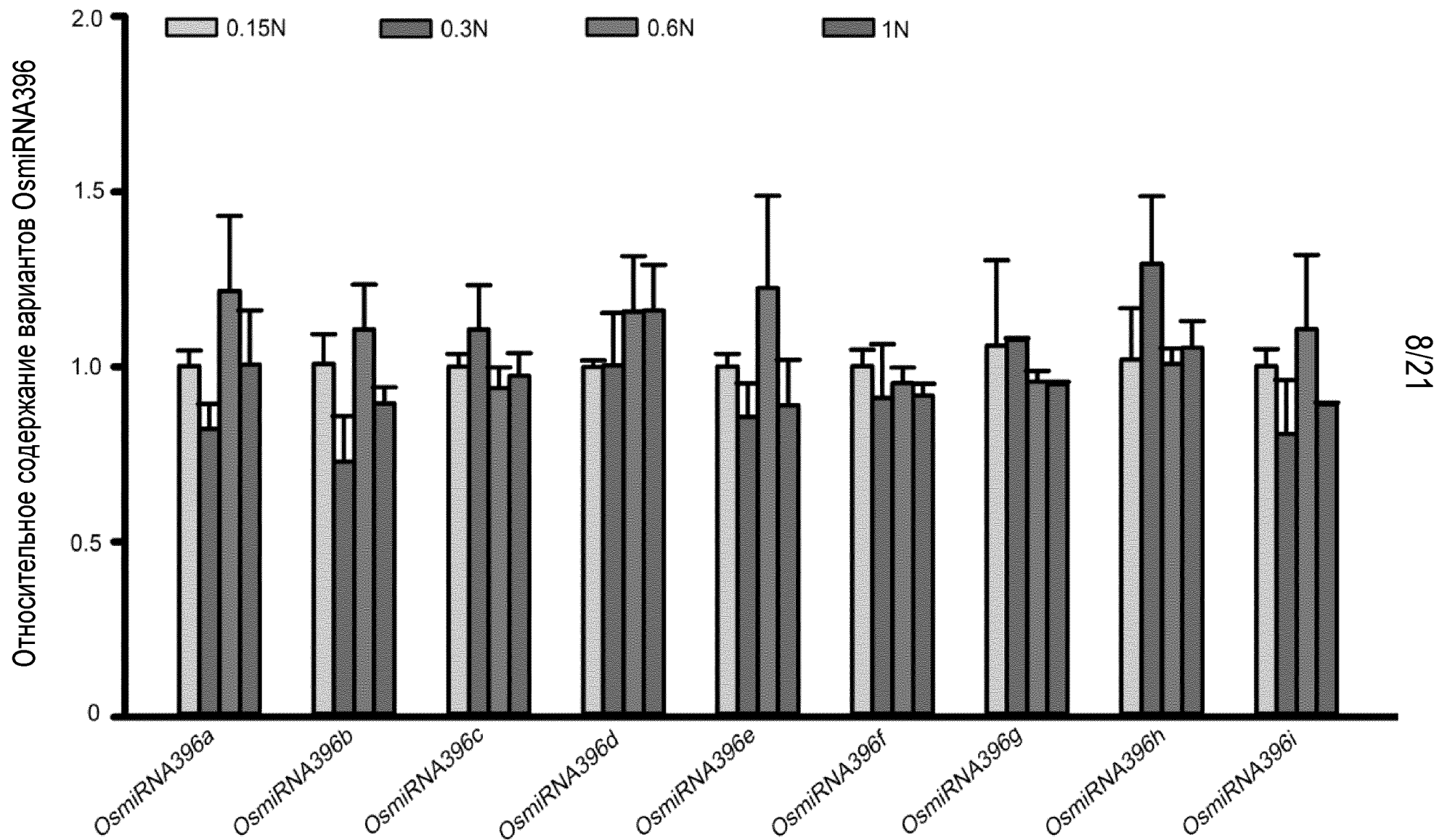
# ФИГ.6







ФИГ.8

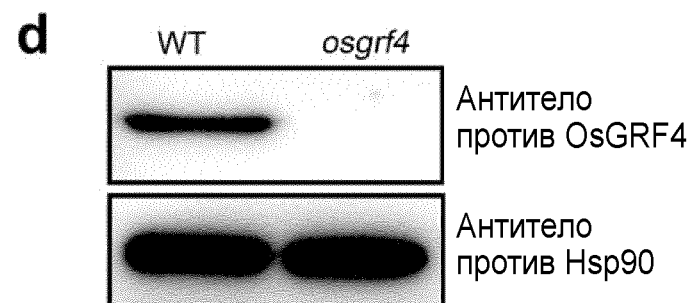
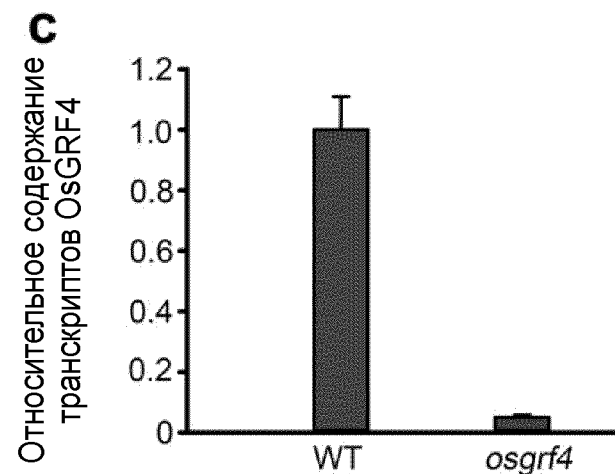


# ФИГ.9

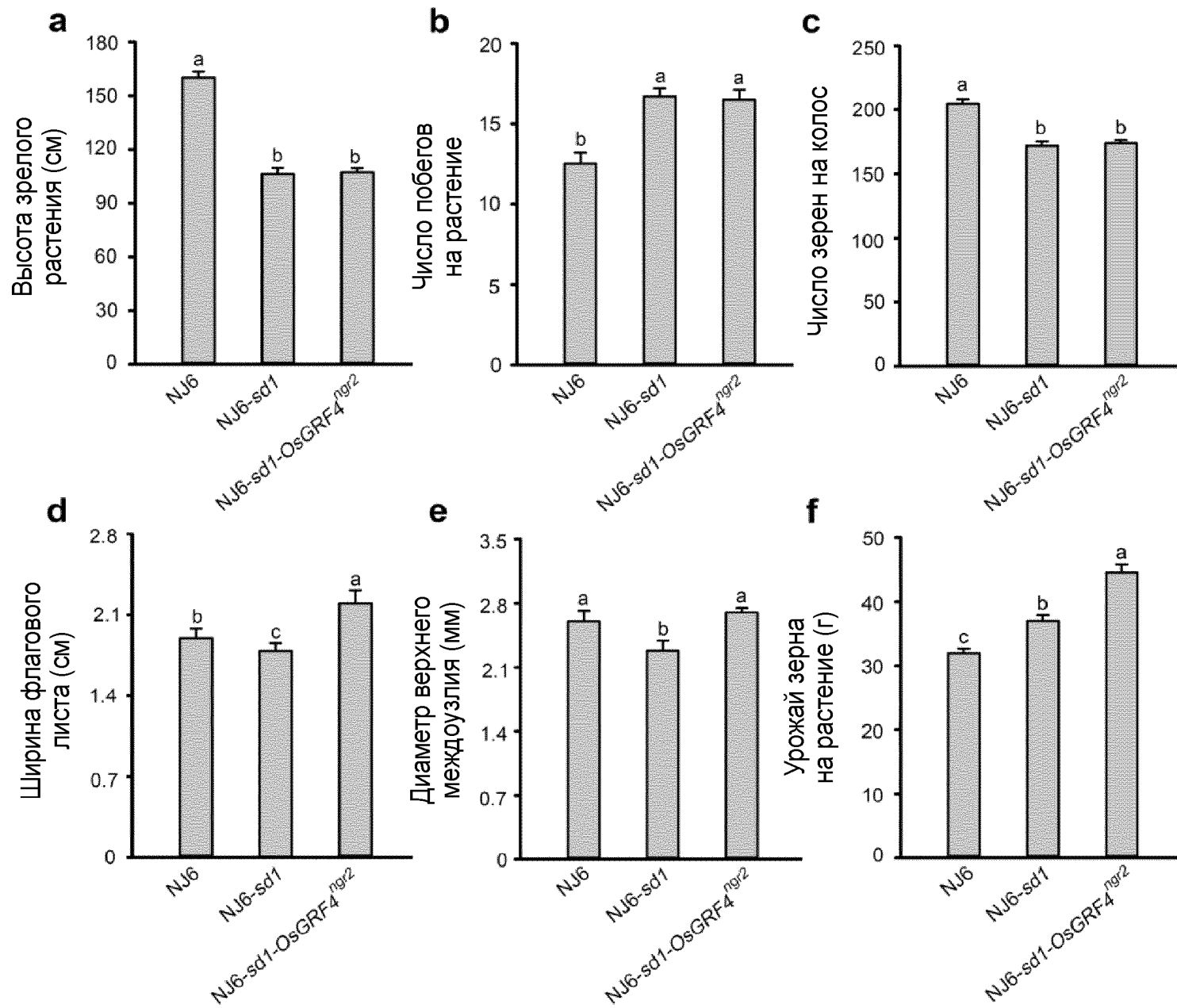


**b**

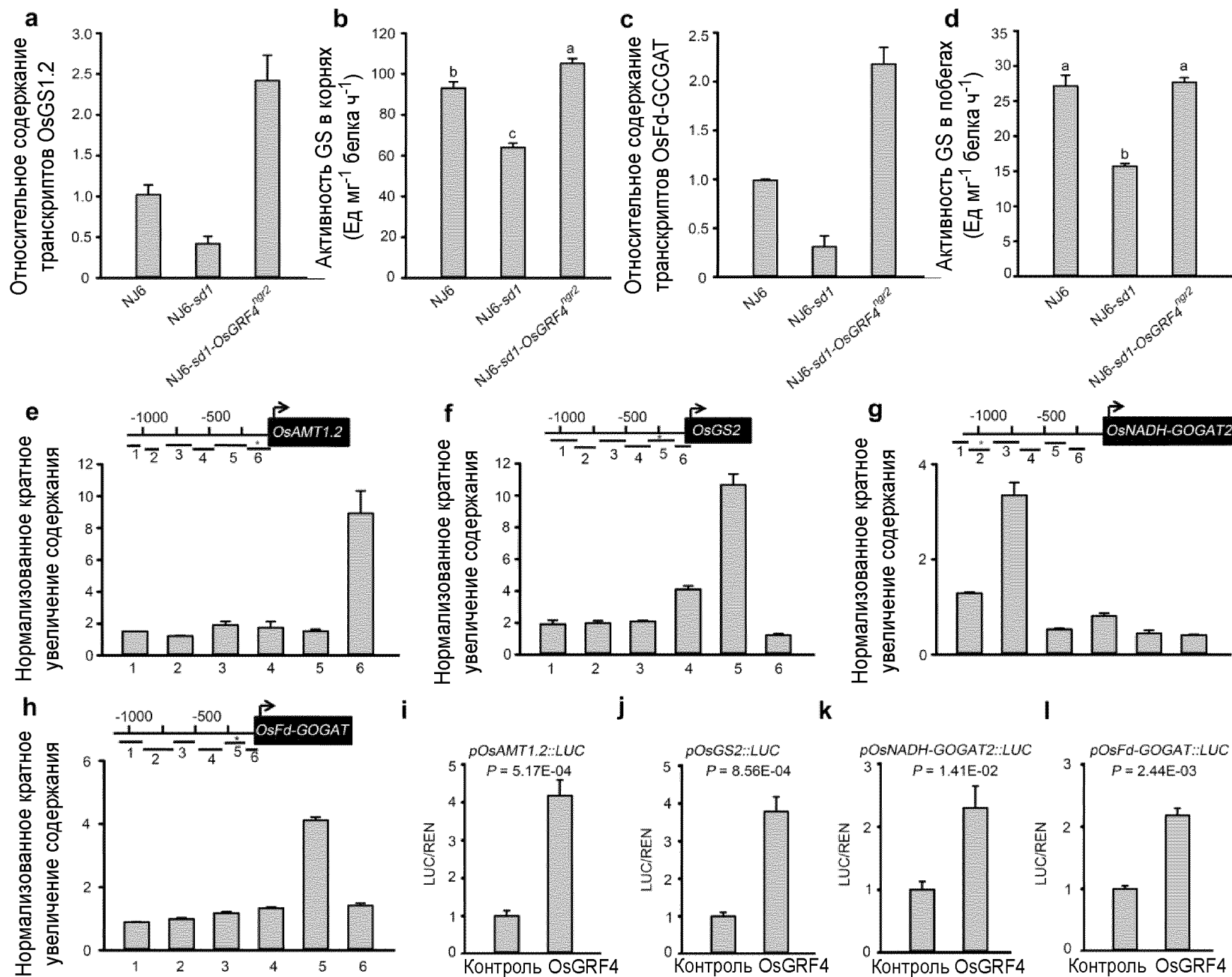
OsGRF4	1	MAMPYASLSPAVADHSSSPAATAASLLPFCRSTPLSAGGGGVEMGEDAPM
osgrf4	1	MAMPYASLSPAGRWRDRDGGGRAD.....DREVAAGGGGEAAVHR.G
OsGRF4	51	TARWPPAPARLPPFTAAQYEELEQQALIKYLVAGVFPFDLVLEIRRG
osgrf4	51	AVRGAGAPGPHIQVPGRRRARPAG.....SRAEPPRTLRERFL
OsGRF4	101	IDS LAARFYNH PALGYGHYFGK KLDPEPGR CRTDCKKWRCSKEA AEDSK
osgrf4	101	LQPSRPWIWSVLRQEA GFRARAVPAYGRQEMAVLEGGRAGFQVLR A E HAP
OsGRF4	151	YCERHMHRRGRNRSRKPVEIQIVAQSQPPSSVVGSA AAPLAAASNGSSFQN
osgrf4	151	RPQPFKKACGNAAGRPVPIALICCR.....FCGGAPCCCLQWQQLPK
OsGRF4	201	HSLYFAIAGSNGGGGRNMPSSFGSALGSQLHMDNAAPYAVVGGGTGKDL
osgrf4	201	PLSLECYCRQQRGEGEEHAQLIWLGVG.....FSPAHG.....
OsGRF4	251	RYTAYGTRSLADEQSQLITEAINTSIENPWRLLP SQNSPFPLSSYSQLGA
osgrf4	251	.....
OsGRF4	301	LSDLGQNTFSSLSKVQRQPLSFFGNDYAAVDSVKQENQTLRPFDEWPKG
osgrf4	301	.....
OsGRF4	351	RDSWSDLADENANLSSFSGTQLSISIPMASSDFSAASSRSTNGD
osgrf4	351	.....



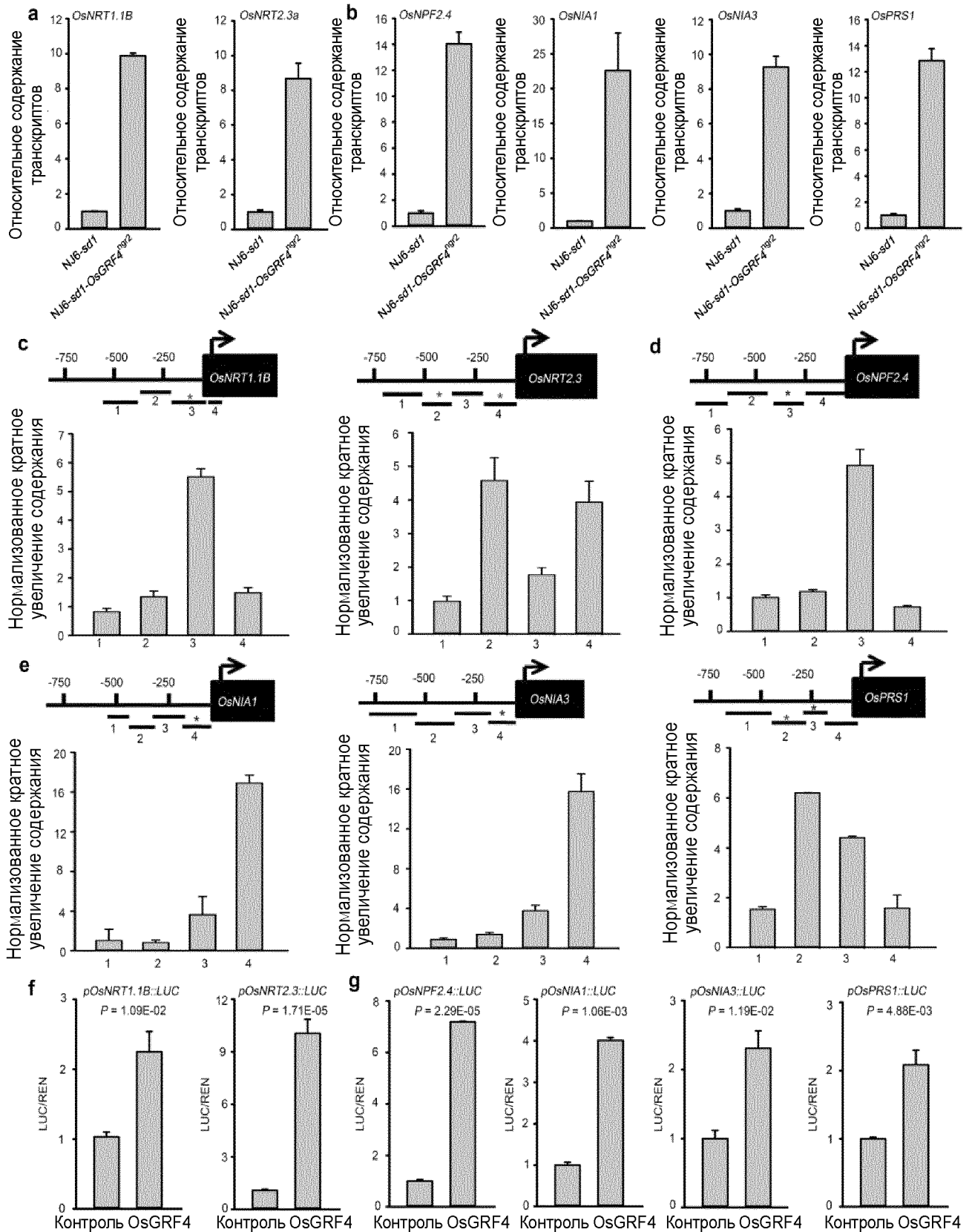
ФИГ.10



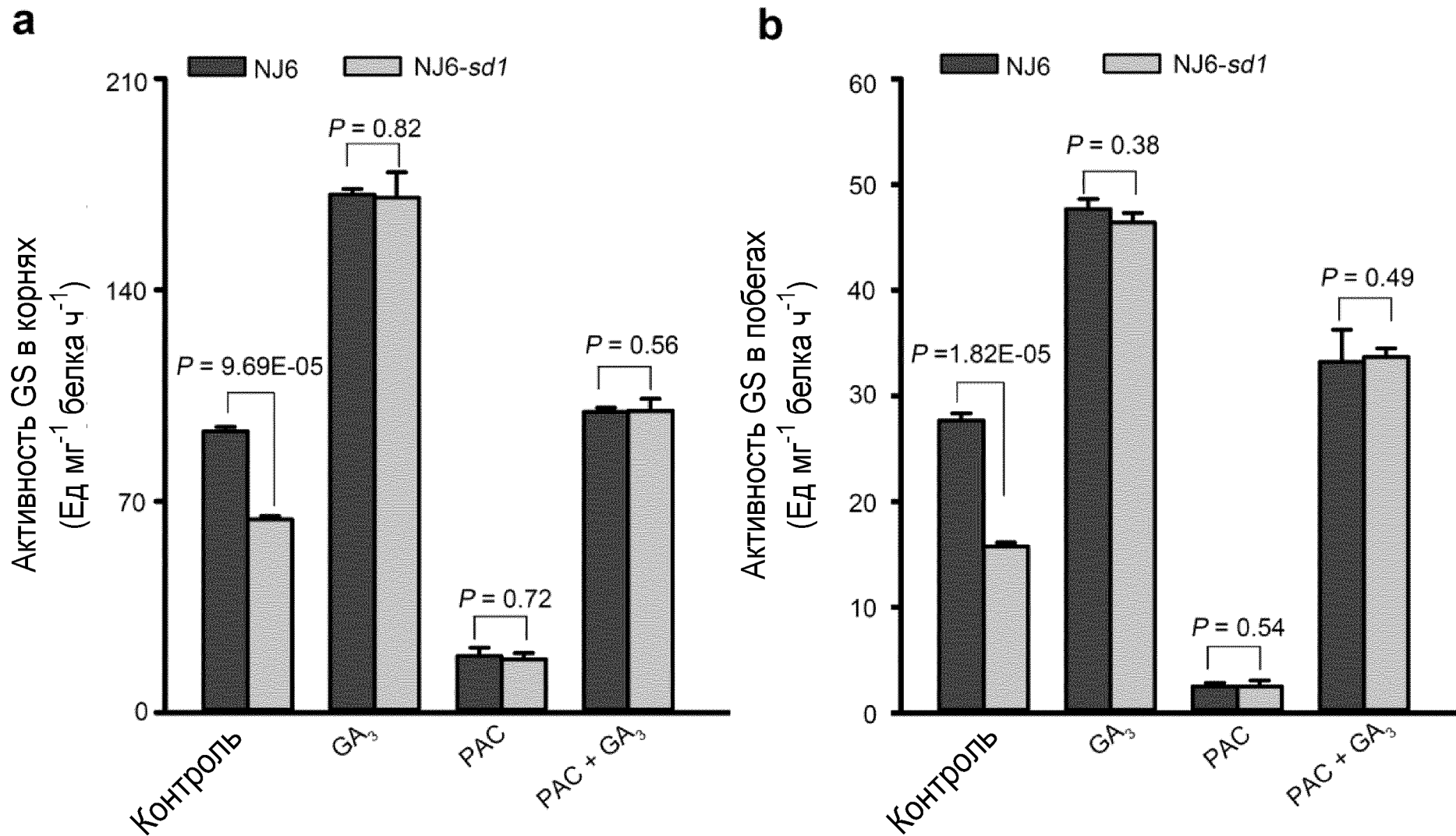
ФИГ.11



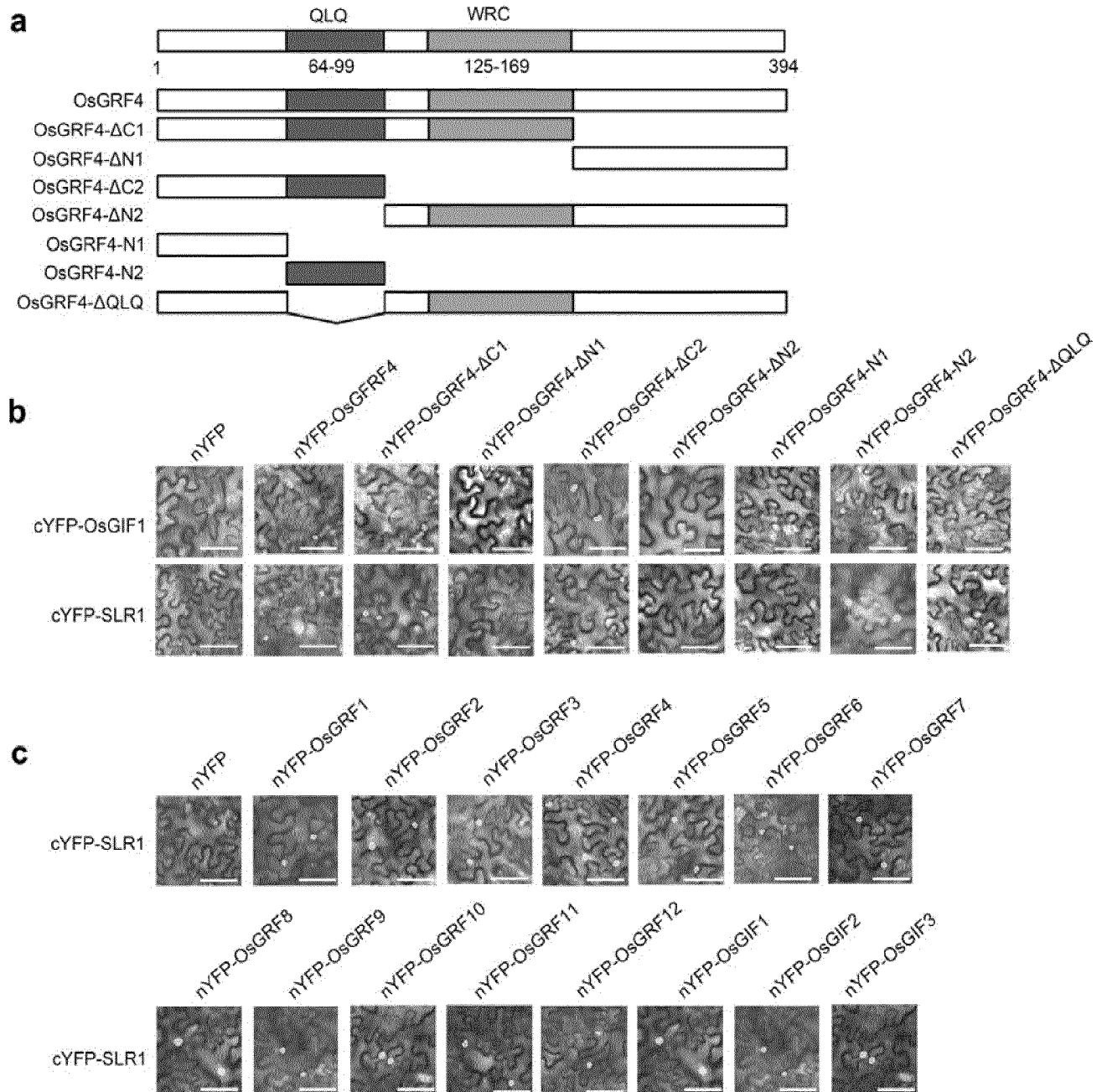
## ФИГ.12



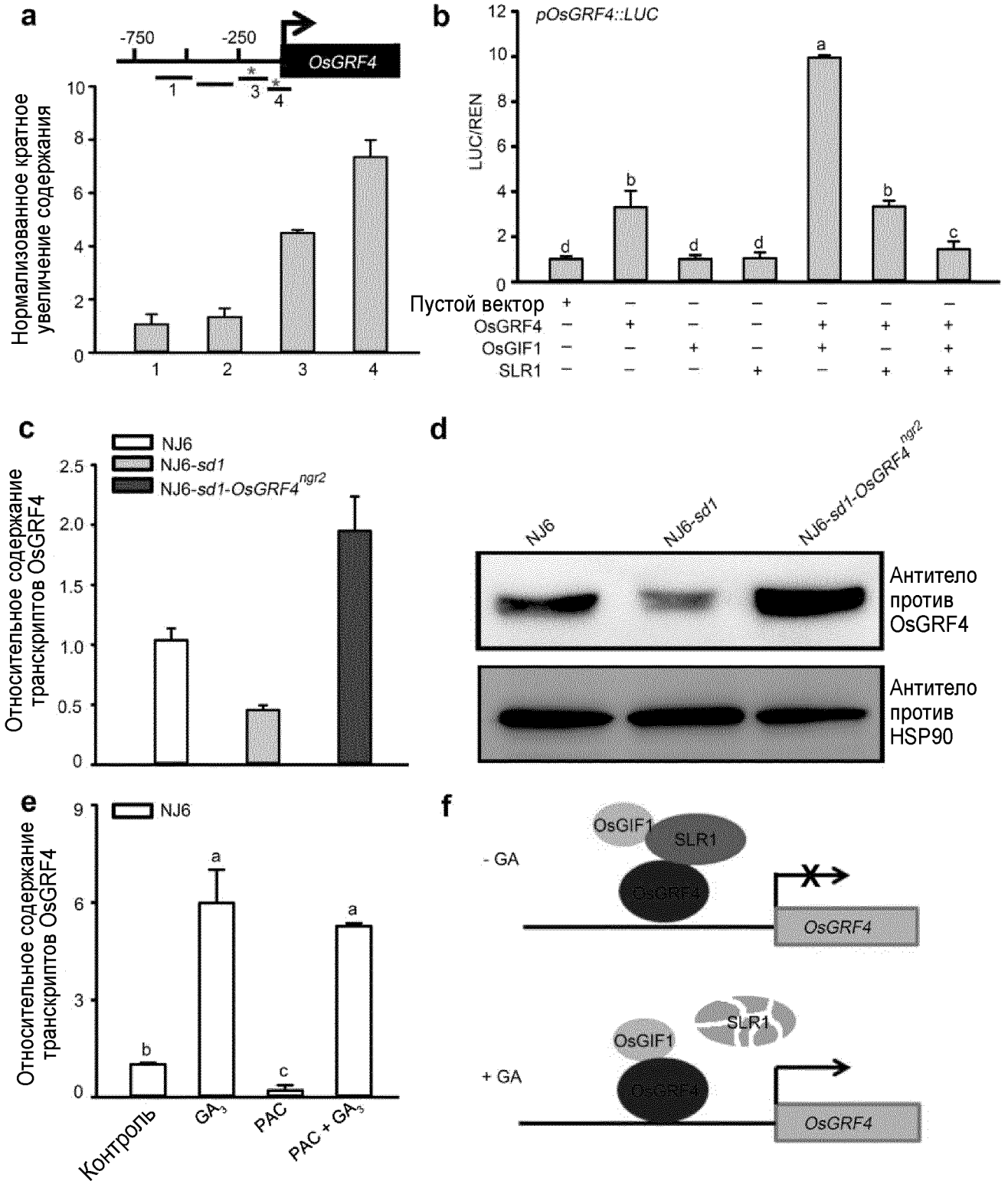
ФИГ.13



## ФИГ.14

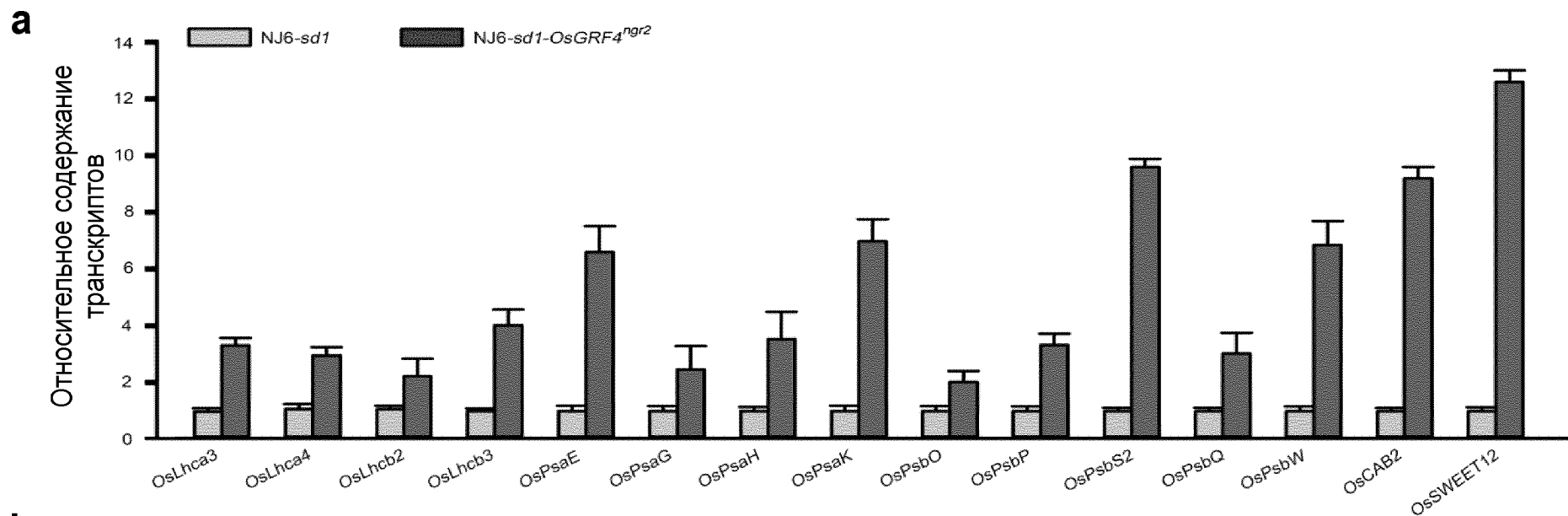


## ФИГ.15

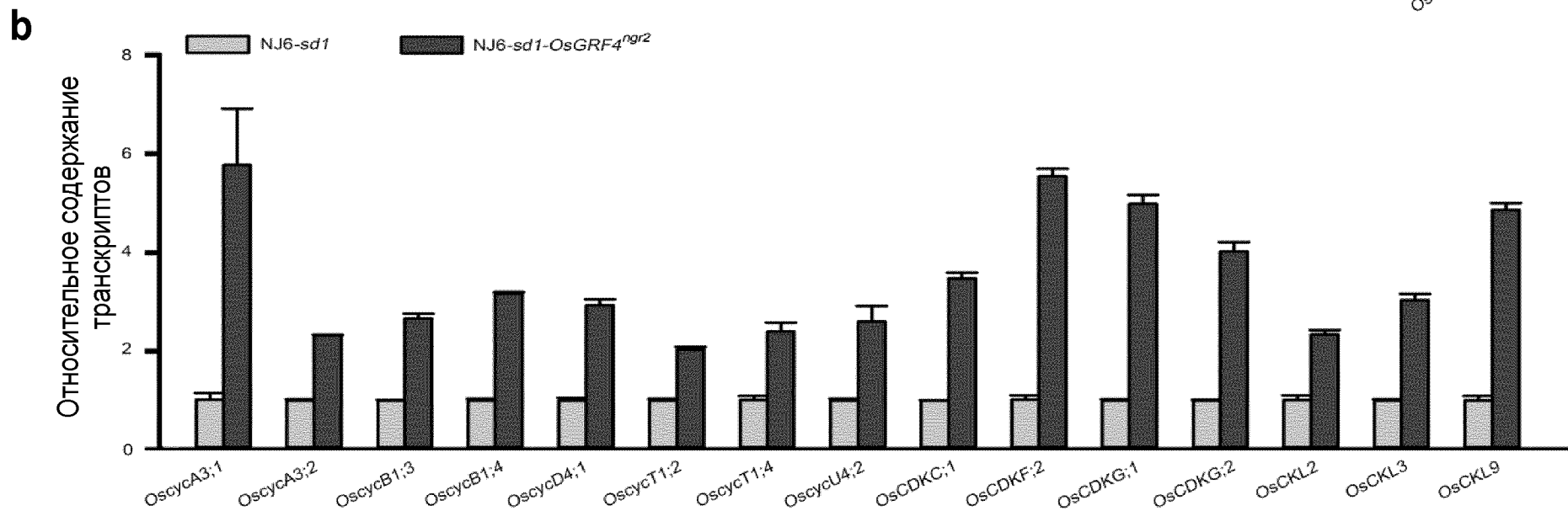




ФИГ.16



16/21



# ФИГ.17

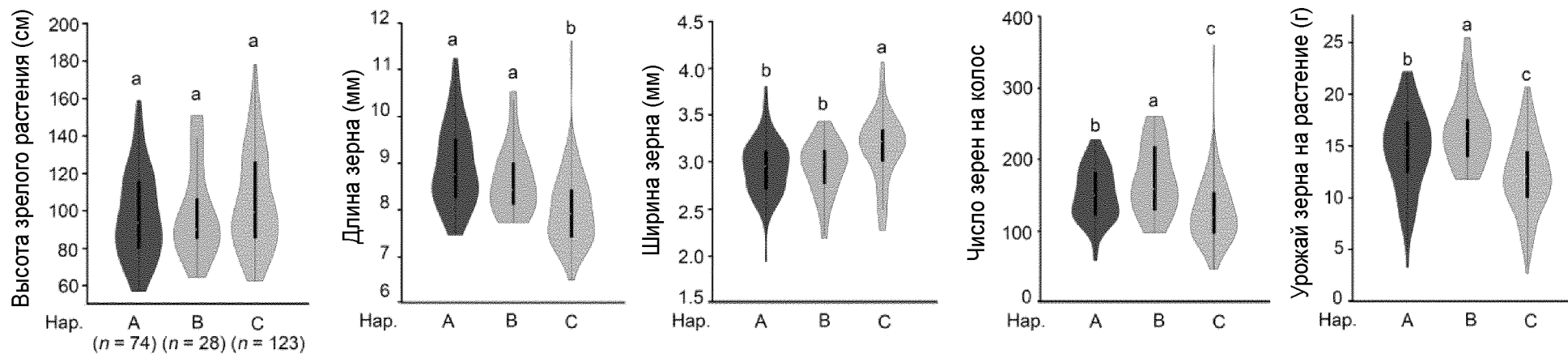
**a** LOC\_Os02g47280



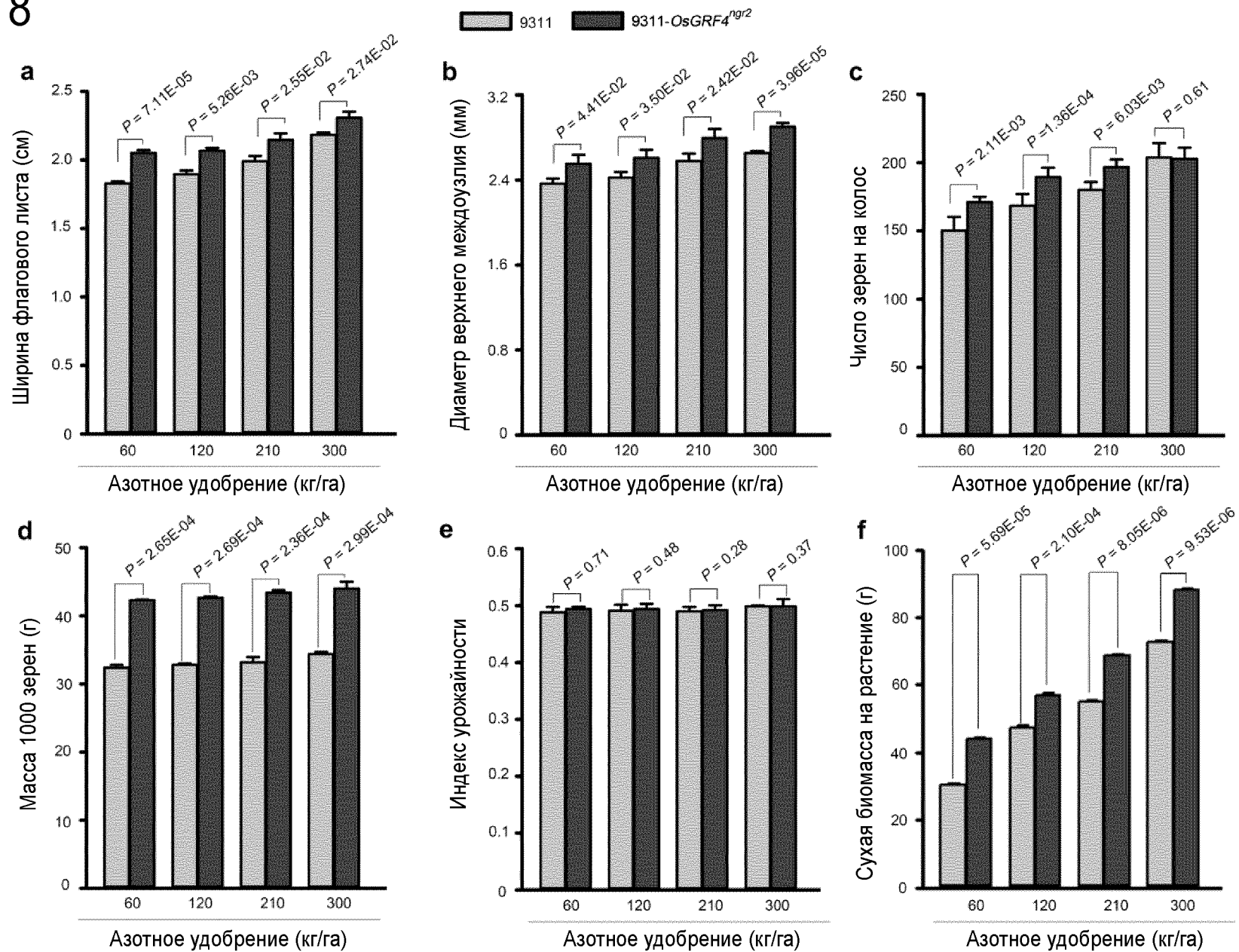
	-941	-884	-847	-839	-818	-801	-792	-780	-558	-535	-502	-357	-356	-355	-354	-353	-352	-324	-314	-309	-308	-188
Нар.А	T	T	C	C	T	C	A	A	C	T	T/C	G	A	G	A	G	A	G/A	G/A	T/A	G/C	C
Нар.В	C	A	T	T	C	T	A	C	-	T	T	G	A	G	A	G	A	G	A	A	C	C
Нар.С	T	T	C	T	C	C	G	C	A	C	C	-	-	-	-	-	-	G	A	A	C	G

17/21

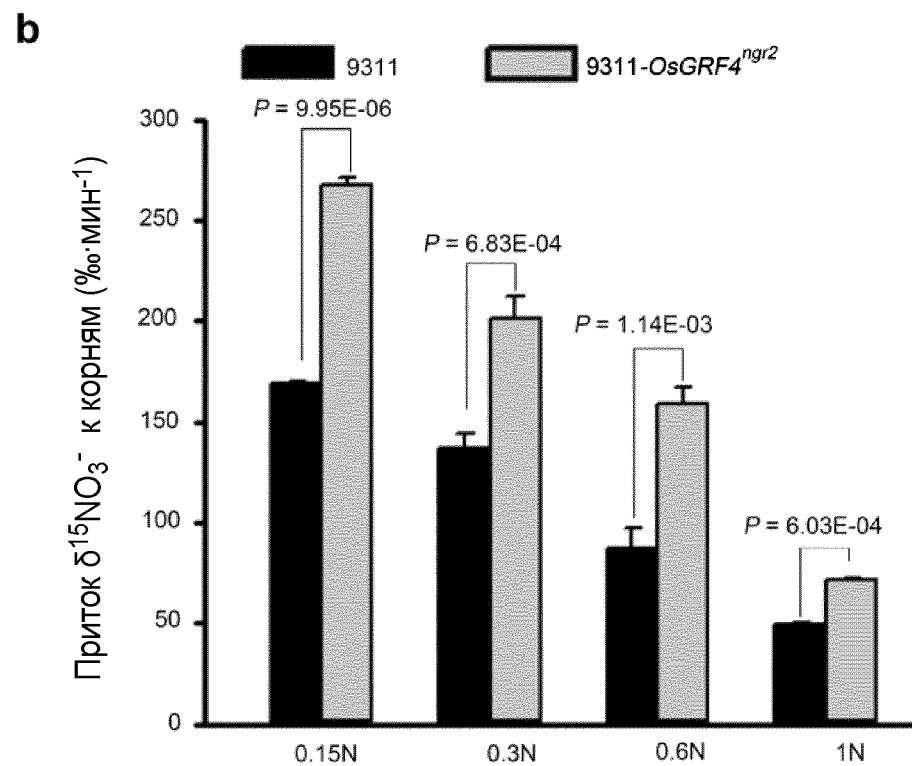
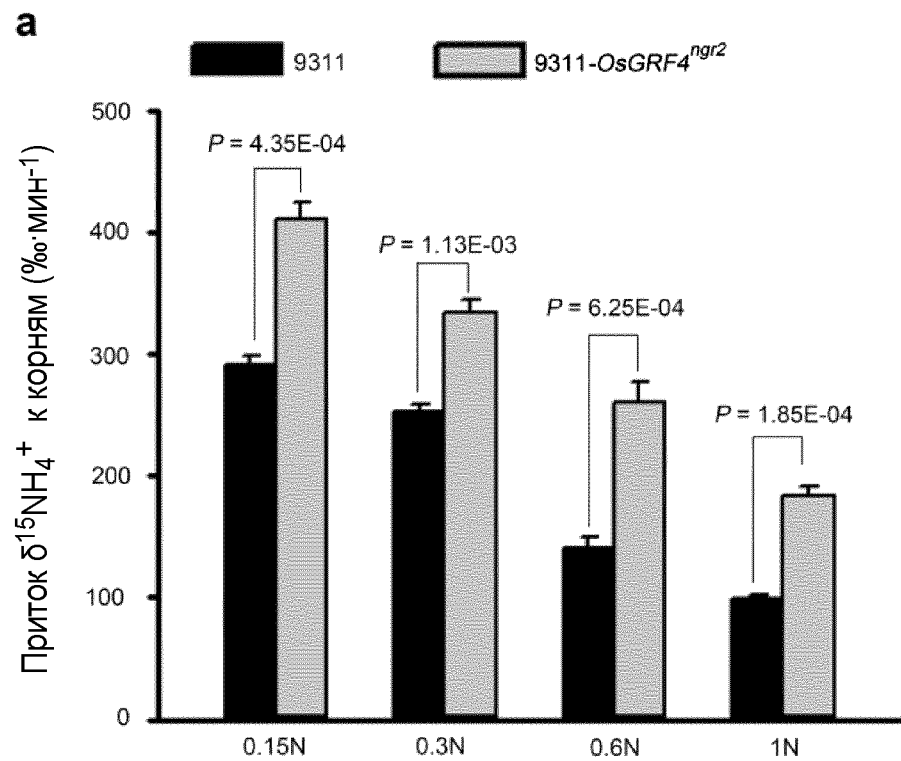
**b**



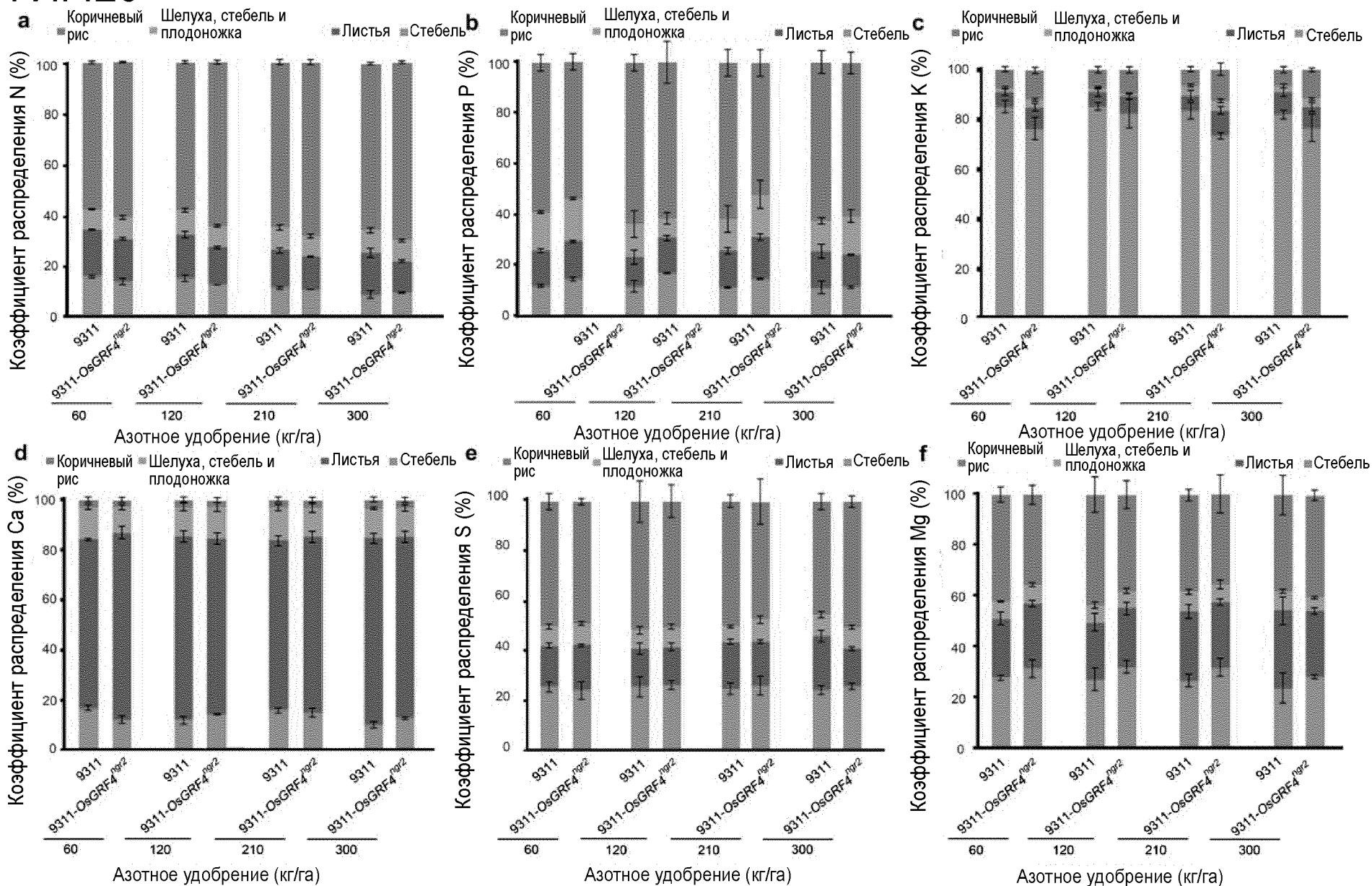
ФИГ.18



ФИГ.19



# ФИГ.20



20/21

# ФИГ.21

