



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.20

(21) Номер заявки
201992790

(22) Дата подачи заявки
2018.05.24

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

(54) СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЯ ЗЕРНА

(31) PCT/CN2017/085986

(32) 2017.05.25

(33) CN

(43) 2020.04.03

(86) PCT/GB2018/051414

(87) WO 2018/215779 2018.11.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНСТИТУТ ОФ ДЖИНЕТИКС
ЭНД ДИВЕЛОПМЕНТАЛ
БАЙОЛОДЖИ ЧАЙНИЗ АКАДЕМИ
ОФ САЙЕНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:
**Фу Сяндун, Ван Шуаньсоу, У Кунь,
Лю Цянь, Хуан Кэ, Дуань Пэнгэнь,
Чжан Баолань, Ли Юньхай, Цянь
Цянь (CN)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2004123343
JING WANG ET AL.: "Tissue-Specific Ubiquitination by IPA1 INTERACTING PROTEIN1 Modulates IPA1 Protein Levels to Regulate Plant Architecture in Rice", THE PLANT CELL, vol. 29, no. 4, 8 April 2017 (2017-04-08), pages 697-707, XP055490457, US, ISSN: 1040-4651, DOI: 10.1105/tpc.16.00879, page 703, right-hand column, last paragraph - page 704, right-hand column, paragraph first

NA LI ET AL.: "Ubiquitin-mediated control of seed size in plants", FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, vol. 5, 11 July 2014 (2014-07-11), XP055167715, ISSN: 1664-462X, DOI:

10.3389/fpls.2014.00332, Pages 4-5, "Challenges and future perspectives"

Anonymous: "B9G207", 24 March 2009 (2009-03-24), XP055491423, Retrieved from the Internet: URL:https://www.uniprot.org/uniprot/B9G207.txt [retrieved on 2018-07-10], the whole document

YUEPENG ZANG ET AL.: "Rice, a candidate housekeeping gene, is required for K63-linked polyubiquitination and tolerance to DNA damage", RICE, SPRINGER-VERLAG, NEW YORK, vol. 5, no. 1, 8 September 2012 (2012-09-08), pages 1-11, XP035134918, ISSN: 1939-8433, DOI: 10.1186/1939-8433-5-24, abstract

XU RONGFANG ET AL.: "Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice", JOURNAL OF GENETICS AND GENOMICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 43, no. 8, 29 July 2016 (2016-07-29), pages 529-532, XP029715830, ISSN: 1673-8527, DOI: 10.1016/J.JGG.2016.07.003, page 531, right-hand column, last paragraph

SHUANSUO WANG 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 RESEARCH - XIBAO YANJIU, vol. 27, no. 9, 4 August 2017 (2017-08-04), pages 1142-1156, XP055490394, GB, CN ISSN: 1001-0602, DOI: 10.1038/cr.2017.98, the whole document

KE HUANG ET AL.: "WIDE AND THICK GRAIN 1, which encodes an otubain-like protease with deubiquitination activity, influences grain size and shape in rice", THE PLANT JOURNAL, vol. 91, no. 5, 16 June 2017 (2017-06-16), pages 849-860, XP055490401, GB ISSN: 0960-7412, DOI: 10.1111/tpj.13613, the whole document

CN-A-107164347

(57) Изобретение относится к способам повышения урожайности растений, а в частности урожая зерна, благодаря снижению или отмене экспрессии и/или активности OTUB1 в растениях. Также описаны генетически модифицированные растения, охарактеризованные по вышеуказанному фенотипу, и способы выращивания таких растений.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способам повышения урожайности растений, а в частности, урожая зерна благодаря снижению уровня экспрессии и/или активности OTUB1 и последующей модификации уровней по меньшей мере одного фактора транскрипции, подобного белку, связывающемуся с промотором SQUAMOSA (SBP-домена), у растений. Также описаны генетически модифицированные растения, охарактеризованные по вышеуказанному фенотипу, и способы выращивания таких растений.

Предпосылки создания изобретения

Рис представляет собой важный пищевой продукт, употребляемый людьми во всем мире. Размер и форма зерна риса представляет собой ключевые агрономические признаки, определяющие урожайность и внешний вид зерна. У риса, длина, ширина и толщина зерна ассоциируется с размером и формой зерна. У риса было охарактеризовано несколько важных генов, влияющих на размеры и форму зерна (Fan et al., 2006, Song et al., 2007, Shomura et al., 2008, Weng et al., 2008, Che et al., 2015, Duan et al., 2015, Hu et al., 2015, Wang et al., 2015 and Si et al., 2016), но молекулярные механизмы, определяющие размер и форму зерна, пока еще точно не определены.

Несколько факторов, которые влияют на пролиферацию клеток, определяют размер зерна риса. Так, например, ген GRAIN SIZE 3 (GS3) потери функции дает длинное зерно в результате увеличения числа клеток (Fan et al., 2006, Mao et al., 2010). GS3 кодирует предполагаемую γ -субъединицу G-белка. Аналогичным образом, предполагаемая протеин-фосфатаза (OsPPKL1), кодируемая GL3.1/qGL3, ограничивает пролиферацию клеток, и ее мутант с потерей функции дает длинное зерно (Hu et al., 2012, Qi et al., 2012, Zhang et al., 2012). В противоположность этому, предполагаемая серин-карбоксипептидаза, кодируемая GS5, и фактор транскрипции OsSPL16, стимулируют, главным образом, рост зерна посредством их влияния на число клеток (Li et al., 2011b, Wang et al., 2012). Модуль OsMKK4-OsMPK6 влияет на рост зерна посредством увеличения числа клеток (Duan et al., 2014, Liu et al., 2015). Процесс размножения клеток также играет очень важную роль в определении размера зерна. Высокий уровень экспрессии фактора транскрипции SPL13 дает длинное зерно в результате увеличения длины клеток (Si et al., 2016). Рост-регулирующий фактор 4 (OsGRF4), кодируемый GS2, ассоциируется с коактиваторами транскрипции (OsGIF1/2/3), что приводит к увеличению размера зерна преимущественно посредством воздействия на размер клеток (Che et al., 2015, Duan et al., 2015, Hu et al., 2015, Li et al., 2016, Sun et al., 2016). Эти исследования позволяют предположить, что регуляция транскрипции играет важную роль в росте зерна риса. Высокий уровень экспрессии GW7/GL7/SLG7, который, вероятно, участвует в организации микротрубочек, дает длинное зерно в результате увеличения длины клеток и/или увеличения их количества (Wang et al., 2015a, Wang et al., 2015b, Zhou et al., 2015). Таким образом, процессы пролиферации клеток и размножения клеток координированно влияют на размер зерна риса.

Убиквитин-протеасомный путь играет важную роль в росте семян риса и растений других видов (Li and Li, 2014, Li and Li, 2016). Убиквитин может быть присоединен к белкам-мишеням посредством убиквитинизации. Деубиквитинизирующие ферменты (DUB), такие как отубаин-протеаза, убиквитин-специфическая протеаза, убиквитин-С-концевая гидролаза, Josephins и JAMM могут отщеплять убиквитин от убиквитинизированных белков (Nijman et al., 2005). В рисе белок с неизвестной функцией, кодируемый qSW5/GW5, предположительно участвует в пути убиквитина, а дизрупция qSW5 дает широкое зерно (Shomura et al., 2008, Weng et al., 2008). Следует отметить, что ранее не идентифицированный ген GSE5 в локусе qSW5/GW5 был недавно описан как ген, ограничивающий ширину зерна (Duan et al., 2017). GSE5 кодирует белок, ассоциированный с плазматической мембраной и содержащий домены IQ, а низкий уровень экспрессии GSE5 в некоторых сортах indica и в большинстве сортов japonica дает широкое зерно (Duan et al., 2017). Убиквитин-лигаза E3 типа RING, кодируемая GW2, ограничивает рост зерна, а ее мутант с потерей функции дает широкое зерно (Song et al., 2007). Аналогичным образом, ее гомолог DA2 в Arabidopsis ограничивает рост семян посредством материнской наружной оболочки (Xia et al., 2013). DA2 и другая убиквитин-лигаза E3 BB/EOD1 физически взаимодействуют с рецептором убиквитина DA1, что приводит к подавлению роста семян и органов (Li et al., 2008, Xia et al., 2013). DA1 также обладает пептидазной активностью, которая может расщеплять убиквитин-специфическую протеазу (UBP15/SOD2) (Du et al., 2014, Dong et al., 2017). Таким образом, модификация белков посредством убиквитина играет важную роль в определении размера семян растений.

Рис употребляет в пищу более чем половина населения всего мира. Несмотря на значительный прогресс в сборе урожая, достигнутый благодаря использованию полукарликовых растений и применению гетерозиса^{1,3}, повышение урожая риса, возможно, превышающее урожай существующих элитных сортов, является основной задачей для рисоводов⁴. Для выхода за пределы урожайности существующих сортов риса, был предложен идиотипический метод, и этот метод был применен в программах по рисоводству^{4,7}. С начала 1990-х годов, специалистами Международного Института исследования риса (IRRI) был выведен ряд сортов риса "нового типа" (NPT), где структура этих растений отличается от структуры обычных сортов, т.е. эти растения имеют более крупные метелки, менее стерильные побеги и более прочные стебли. Хотя несколько сортов риса NPT были коммерчески реализованы^{6,7}, однако, генетическая основа их фенотипа была объяснена только на уровне локусов количественного признака (QTL)⁸. Авторами было обнаружено, что NPT1 кодирует ген OTUB1, т.е. отубаин-подобную протеазу, обладающую деубиквити-

низирующей активностью.

Независимо от этого, для дальнейшего выявления механизмов определения размера и формы зерна, авторами было идентифицировано несколько мутантов по размеру зерна риса (Duan et al., 2014, Fang et al., 2016). Авторами был охарактеризован мутант с широким и толстым зерном 1 (wtg1-1), который дает широкое, толстое, короткое и тяжелое зерно. WTG1 кодирует OTUB1, т.е. тот же самый ген, который присутствует в локусе NPT риса. Сверхэкспрессия WTG1 дает узкое, тонкое и длинное зерно. Таким образом, авторы настоящего изобретения определили отубаин-подобную протеазу WTG1 как важный фактор, определяющий размер и форму зерна, а также другие важные агрономические признаки, включая общую урожайность сельскохозяйственных культур.

Следовательно, необходимо повысить урожай зерна коммерчески ценных сельскохозяйственных культур, таких как рис. Эта проблема может быть решена с использованием настоящего изобретения.

Сущность изобретения

Авторами было неожиданно обнаружено, что ген OTUB1 (также известный и обозначаемый как "NPT1", "DEP5" и "WTG1", где указанные термины могут использоваться как синонимы) сохраняет количественный признак урожайности зерна. В частности, авторами было неожиданно обнаружено, что ингибирование или отмена экспрессии или деубиквитиновой активности этого белка приводит к повышению активности меристемы, к увеличению числа зерен на метелку, к увеличению массы и ширины зерна и, что самое важное, к повышению урожая зерна.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу повышения урожая зерна растения, где указанный способ включает снижение уровня экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей отубаин-подобную протеазу (OTUB1), и/или снижение активности отубаин-подобной протеазы. Предпочтительно указанное повышение урожая зерна включает увеличение по меньшей мере числа зерен, числа зерен на метелку, массы зерна, ширины зерна, толщины зерна и/или массы тысячи зерен.

Способ может включать введение посредством одной мутации по меньшей мере в одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид OTUB1 и/или промотор полипептида OTUB1. Мутацией может быть мутация с потерей функции или с частичной потерей функции, и/или инсерция, делеция и/или замена. Предпочтительно мутацией является любая мутация, которая может снижать уровень экспрессии или активности OTUB1.

Если этот способ включает введение мутации, то такая мутация может быть введена посредством нацеленной модификации генома, а предпочтительно ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9. Альтернативно в некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация может быть введена посредством мутагенеза, а предпочтительно TILLING или инсерции Т-ДНК.

В других вариантах осуществления изобретения, способ может включать использование РНК-интерференции для снижения или отмены экспрессии нуклеиновой кислоты OTUB1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанная урожайность была повышена по сравнению с урожайностью растения дикого типа или контрольного растения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация приводит к снижению или отмене деубиквитиновой активности OTUB1.

Настоящее изобретение также относится к генетически модифицированному растению, его части или клетке, где указанное растение содержит по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одной нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид OTUB1 и/или промотор OTUB1.

Растение может быть охарактеризовано по снижению или отсутствию экспрессии полипептида OTUB1. Альтернативно или дополнительно, указанное растение может быть охарактеризовано по снижению или отсутствию деубиквитиновой активности OTUB1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное растение характеризуется повышением урожая зерна, предпочтительно если указанное растение сравнивают с контрольным растением или растением дикого типа. Указанное повышение урожая зерна включает увеличение по меньшей мере числа зерен, числа зерен на метелку, массы зерна, ширины зерна, толщины зерна, массы тысячи зерен и/или уменьшение длины зерна.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанной мутацией является мутация с потерей или с частичной потерей функции. Предпочтительно указанной мутацией является инсерция, делеция и/или замена. Предпочтительно мутацией является любая мутация, которая может снижать уровень экспрессии или активности OTUB1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация может быть введена посредством нацеленной модификации генома, а предпочтительно ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9. Альтернативно мутация может быть введена посредством мутагенеза, а предпочтительно TILLING или инсерции Т-ДНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, растение включает конструкцию для РНК-интерференции, которая снижает уровень экспрессии полипептида OTUB1. В одном из примеров конструкция для РНК-интерференции содержит SEQ ID NO: 210 или состоит из SEQ ID NO: 210 или ее варианта, как было определено в настоящей заявке.

Частью растения предпочтительно является зерно или семяна.

Настоящее изобретение также относится к способу выращивания растения с повышенной урожайностью зерна, где указанный способ включает введение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид OTUB1 и/или промотор полипептида OTUB1. Мутацией может быть мутация с потерей функции или с частичной потерей функции, а предпочтительно инсерция, делеция и/или замена. Предпочтительно мутацией является любая мутация, которая может снижать уровень экспрессии или активности OTUB1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацию вводят посредством нацеленной модификации генома, а предпочтительно ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9. Альтернативно мутацию вводят посредством мутагенеза, а предпочтительно TILLING или инсерции T-ДНК.

Настоящее изобретение также относится к способу выращивания растения с повышенной урожайностью зерна, где указанный способ включает введение в указанное растение и экспрессию в указанном растении конструкции для РНК-интерференции, которая снижает уровень экспрессии или отменяет экспрессию нуклеиновой кислоты OTUB1. В одном из примеров конструкция для РНК-интерференции содержит SEQ ID NO: 210 или состоит из SEQ ID NO: 210 или ее варианта, как было определено в настоящей заявке.

Способы согласно изобретению могут также включать оценку уровня повышения по меньшей мере урожая зерна, где указанная оценка включает определение повышения по меньшей мере числа зерен, числа зерен на метелку, массы зерна, ширины зерна, толщины зерна, массы тысячи зерен и/или уменьшения длины зерна. Предпочтительно указанное увеличение сравнивают с контрольным растением или растением дикого типа.

Способы согласно изобретению могут также включать оценку снижения или отсутствия экспрессии нуклеиновой кислоты OTUB1 и/или оценку снижения или отсутствия активности, а предпочтительно деубиквитиназной активности полипептида OTUB1.

Способы согласно изобретению могут также включать регенерацию растения и скрининг на повышение урожая зерна.

Настоящее изобретение также относится к растению, к части растения или к клетке растения, полученным или получаемым любым одним или более из описанных выше способов.

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации и/или отбора растения, которое будет давать повышенный урожай зерна предпочтительно по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением, где указанный способ включает детектирование в растении или в зародышевой плазме растения по меньшей мере одного полиморфизма в гене OTUB1 и/или в промоторе OTUB1, и отбор указанного растения или его потомства. Полиморфизмом может быть инсерция, делеция и/или замена. Этот способ может также включать интрогрессию хромосомной области, содержащей по меньшей мере один полиморфизм в гене OTUB1 и/или в промоторе OTUB1, во второе растение или в зародышевую плазму этого растения с получением растения или зародышевой плазмы растения с интрогрессией.

В одном варианте любого из вышеописанных аспектов, полипептид OTUB1 может включать, или состоять из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функциональный гомолог или вариант. В другом варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота OTUB1 включает, или состоит из, последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота включает, или состоит из нее, последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 2-5, или ее функциональный вариант или гомолог. В одном из примеров гомолог может иметь последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид OTUB1, определенный в SEQ ID NO: 14-20, или ее функциональный вариант, определенный в настоящей заявке. Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты гомолога OTUB1 выбирают из SEQ ID NO: 7-13 или ее функционального варианта, определенного в настоящей заявке.

В других вариантах любых вышеописанных аспектов, последовательность нуклеиновой кислоты промотора OTUB1 может включать, или состоять из нее, SEQ ID NO: 6 или ее функциональный вариант или гомолог. В одном варианте осуществления изобретения гомолог выбран из SEQ ID NO: 21-27 или их функционального варианта, определенного в настоящей заявке.

Растение предпочтительно выбрано из риса, пшеницы, кукурузы, сои, сорго, капусты и ячменя. В одном примере, растением является рис. В другом примере растением является пшеница. В другом примере растением является кукуруза.

Настоящее изобретение также относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один ДНК-связывающий домен, который может связываться по меньшей мере с одной последовательностью-мишенью в гене и/или в промоторе OTUB1. В одном примере, последовательность ДНК-связывающего домена выбрана из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146 или последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146.

В одном варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один протоспейсерный элемент, где протоспейсерный элемент содержит ДНК-связывающий домен. В одном варианте осуществления изобретения последовательность протоспейсерного элемента выбрана из SEQ ID NO: 29, 35, 39, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143 и 147 или последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 29, 35, 39, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143 и 147.

Конструкция может также включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность РНК CRISPR (сг-РНК), где указанная последовательность сг-РНК содержит последовательность протоспейсерного элемента и дополнительные нуклеотиды. Конструкция может также включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую транскрибируемую РНК (tracr-РНК). В одном варианте осуществления изобретения tracr-РНК включает, или состоит из нее, SEQ ID NO: 30 или ее функциональный вариант.

В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну одноцепочечную руководящую РНК (оцрРНК), где указанная оцрРНК содержит последовательность tracr-РНК и последовательность сг-РНК или протоспейсерную последовательность. В одном варианте осуществления изобретения последовательность оцрРНК содержит, или состоит из нее, последовательность, выбранную из 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148, или последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу оцрРНК, где молекула оцрРНК связывается с последовательностью-мишенью, выбранной из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146 или ее варианта. В предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты оцрРНК выбрана из 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148 или ее варианта.

В одном из примеров последовательность конструкции нуклеиновой кислоты выбрана из SEQ ID NO: 33, 37, 41, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145 и 149 или ее варианта, где указанный вариант имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, а наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 33, 37, 41, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145 и 149.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, конструкция может быть функционально присоединена к промотору, а предпочтительно к конститутивному промотору.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты также содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент CRISPR. В одном примере, ферментом CRISPR может быть белок Cas, а предпочтительно Cas9 или его функциональный вариант.

В альтернативном варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты кодирует эффектор TAL. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один ДНК-связывающий домен, который может связываться по меньшей мере с одной последовательностью-мишенью в гене и/или промоторе OTUB1. В одном примере последовательность ДНК-связывающего домена выбрана из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146 или последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146, а также содержит последовательность, кодирующую эндонуклеазу или ее ДНК-расщепляющий домен. Эндонуклеазой может быть FokI.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к одноцепочечной руководящей молекуле (оцр) РНК, где указанная оцрРНК содержит последовательность сг-РНК и последовательность tracr-РНК, где последовательность оцрРНК может связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146 или последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146.

Настоящее изобретение также относится к выделенной клетке растения, трансфицированной по меньшей мере одной конструкцией нуклеиновой кислоты, определенной в настоящей заявке; или к выделенной клетке растения, трансфицированной по меньшей мере одной конструкцией нуклеиновой кислоты, определенной в настоящей заявке; и второй конструкцией нуклеиновой кислоты, где указанная

вторая конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Cas, а предпочтительно белок Cas9 или его функциональный вариант. Вторая конструкция нуклеиновой кислоты может быть трансфецирована до, во время или после трансфекции определенной здесь конструкции нуклеиновой кислоты. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной клетке растения, трансфецированной молекулой оцРНК, определенной выше.

Настоящее изобретение также относится к генетически модифицированному растению, где указанное растение содержит трансфецированную клетку, определенную в настоящей заявке. Нуклеиновая кислота, кодирующая оцРНК, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая белок Cas, могут быть интегрированы в стабильной форме.

Настоящее изобретение также относится к способу повышения урожая зерна растения, где указанный способ включает введение в растение и экспрессию в растении конструкции нуклеиновой кислоты или молекулы оцРНК, описанных в настоящей заявке, где предпочтительно указанное повышение рассматривается по отношению к контрольному растению или растению дикого типа. Настоящее изобретение также относится к растению, полученному или получаемому этим способом.

Настоящее изобретение также относится к способу получения генетически модифицированного растения, определенного в настоящей заявке, где указанный способ включает:

- a) отбор части растения;
- b) трансфекцию по меньшей мере одной клетки части растения пункта (a) конструкцией нуклеиновой кислоты или оцРНК, определенными в настоящей заявке;
- c) регенерацию по меньшей мере одного растения, происходящего от трансфецированной клетки или трансфецированных клеток;
- d) отбор одного или более растений, полученных в соответствии с пунктом (c) и имеющих пониженный уровень экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты OTUB1 в указанном растении.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу модификации, а предпочтительно повышению уровней фактора транскрипции, подобного белку, связывающемуся с промотором SQUAMOSA (SBP-домена), где указанный способ включает повышение уровня экспрессии или активности UBC13 или снижение, или отмену экспрессии или активности OTUB1, как описано в настоящей заявке.

Описание чертежей

Настоящее изобретение также описано на нижеследующих неограничивающих чертежах.

На фиг. 1 показано позиционное клонирование qNPT1. (a) Внешний вид зрелого растения. RIL52 был выведен в результате скрещивания Chunjiang06 (CJ06) × IR66167-27-5-1-6. Масштаб: 20 см. (b) Морфология метелки. Масштаб: 5 см. (c-e) Сравнение RIL52 с родителями с точки зрения (c) числа зерен, (d) числа побегов и (e) диаметра стебля. Данные представлены как среднее ± ср. кв. ош. (n=30). Наличие тех же самых строчных букв означает незначимое различие средних (P < 0,05). (f) Картирование QTL для определения числа зерен, числа побегов и диаметра стебля, (g) Позиционное клонирование qNPT1. Локус был картирован на геномной области размером ~4,1 т.п.о., фланкированной P139 и P143. Числа между строками означают число рекомбинантов между qNPT1 и указанным смежным маркером. Было предсказано, что ген-кандидат продуцирует два альтернативных транскрипта, (h) Варианты последовательностей в локусе NPT1 в промоторной и кодирующей областях, указанных в g.

На фиг. 2 показан избыток транскрипта OsOTUB1, ассоциированного с ветвлением метелки и урожаем зерна, (a) Уровни транскрипта OsOTUB1, присутствующего в органах растений NIL. R: корень; C: стебель; LB: пластинка листа; LS: влагалище листа; SAM: меристема верхушки побега; YP0.2, YP6, YP12: молодые метелки средней длины, соответственно, 0,2, 6 и 12 см. Относительные уровни экспрессии выражены как относительные копии на 1000 копий риса Actin1. Данные представлены как среднее ± ср. кв. ош. (n=3). (b) Морфология растения. Масштаб: 20 см. (c) Морфология метелки. Масштаб: 5 см. (d) Морфология зерна. Масштаб: 2 мм. (e-j) Количественное сравнение двух NIL. (e) Время образования головных метелок, (f) Высота растения, (g) Число побегов на растение, (h) Число вторичных ветвей на метелку, (i) Число зерен на метелку, (j) Масса 1000 зерен, (k) Фотография меристемы верхушки побега. Масштаб: 50 мкм. (l) Фотография стебля, полученная на сканирующем электронном микроскопе. Масштаб: 25 мкм. (m) Сосудистая система стебля, (n) Общее число крупных и небольших сосудистых пучков, представленных в (m). (o) Общий урожай зерна на растение. Данные представлены как среднее ± ср. кв. ош. (n=288). Все фенотипические данные были получены для растений, выращенных на орошаемых рисовых полях в нормальных условиях культивирования. Для вычисления величин P использовали t-критерий Стьюдента.

На фиг. 3 показано взаимодействие OsOTUB1-OsSPL14, регулирующее архитектуру растения, (a) Анализы BiFC. N-конец YFP-меченного OsSPL14, SBP-домена или делетированного варианта OsSPL14 котрансформировали в протопласты риса вместе с C-концом YFP-меченного OsOTUB1.1. Панели (слева направо): окрашивание DAPI, сигнал YFP, дифференциальный интерферирующий контрастный агент, объединенный канал. Масштаб: 10 мкм. (b) Совместная иммунопреципитация OsOTUB1.1-GFP и

OsSPL14. IB, Иммуноблот; IP, иммунопреципитация. (c) Морфология растения. Масштаб: 20 см. (d) Морфология метелки. Масштаб: 5 см. (e) Избыток транскрипта OsSPL14. Транскрипция по сравнению с уровнем транскрипции у растений ZH11 была принята за 1. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. ($n=3$). (f) Число побегов на растение, (g) Число зерен на метелку, (h) Диаметр стебля. Все фенотипические данные были получены для растений, выращенных в поле в обычных условиях культивирования. Данные в (f-h) представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. ($n=120$). Наличие тех же самых строчных букв означает незначимое различие средних ($P < 0,05$).

На фиг. 4 показано, что OsOTUB1 стимулирует разложение OsSPL14. (a) Аккумуляция OsSPL14 в растениях ZH11 и ZH11-npt1. Избыток белка HSP90 был использован в качестве загрузочного контроля. (b) Обработка ингибитором протеасомы MG132 стабилизирует OsSPL14. Общие белки экстрагировали из молодых метелок (длиной $< 0,2$ см) растений ZH11, обработанных 0 или 50 мкМ MG132. Иммуноблот зондировали антителами против OsSPL14 или против HSP90. (c) OsOTUB1 дестабилизирует OsSPL14. Лизаты молодых метелок растений ZH11 и ZH11-npt1 совместно инкубировали с GST-OsSPL14 в присутствии или в отсутствии His-OsOTUB1. Лизаты собирали в различные периоды времени и подвергали иммуноблоттингу для оценки аккумуляции OsSPL14 и HSP90. (d) Убиквитинизация OsSPL14. Экстракты белка молодых метелок подвергали иммунопреципитации с использованием анти-Мус антитела, а затем анализировали с использованием конъюгатов цепей антител против убиквитина, убиквитина K48 или убиквитина K63. (e) Flag-OsSPL14 может быть модифицирован посредством связывания K48-убиквитина. Протопласты риса котрансфецировали Flag-OsSPL14 и HA-убиквитином (HA-меченным убиквитином дикого типа или убиквитином K48R) и убиквитинизированные формы Flag-OsSPL14 подвергали иммунопреципитации с использованием анти-Flag антитела, а затем анализировали с использованием анти-HA антитела, (f) K63-связанная убиквитинизация OsSPL14 регулировалась OsOTUB1. Протопласты риса котрансфецировали Flag-OsSPL14 и HA-убиквитином (HA-меченным убиквитином дикого типа, убиквитином K48R, K63R, K48O или K63O) в присутствии или в отсутствии Мус-OsOTUB1, после чего лизаты собирали и подвергали иммуноблоттингу для оценки аккумуляции OsSPL14, а проанализированные убиквитинизированные формы Flag-OsSPL14 описаны в (e).

На фиг. 5 проиллюстрирован филогенетический анализ. Человеческая последовательность OTUB1 и ее ортологи мышей (MmOTUB1), *Arabidopsis thaliana* (AtOTUB1), сои (GmOTUB1), кукурузы (ZmOTUB1), сорго (SbOTUB1), ячменя (HvOTUB1), пшеницы полбы дикого типа (TuOTUB1) и риса (OsOTUB1) были взяты из www.ncbi.nlm.nih.gov. Числа справа означают положение остатков в каждом белке.

Идентичные остатки показаны темными штриховыми участками, консервативные остатки показаны светлыми штриховыми участками, а вариабельные остатки не заштрихованы.

На фиг. 6 показано влияние функционального OsOTUB1 на архитектуру растения и урожай зерна. (a) Морфология зрелого растения. Масштаб: 20 см. (b) Мутации потери функции OsOTUB1, полученные посредством CRISPR/Cas9. (c) Время образования головных метелок, (d) Высота растения, (e) Диаметр верхнего междоузлия, (f) Число побегов на растение, (g) Длина метелки, (h) Число первичных ветвей на метелку, (i) Число вторичных ветвей на метелку, (j) Число зерен на метелку, (k) Масса 1000 зерен. (l) Общий урожай зерна на растение. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. ($n=288$). Все фенотипические данные были получены для растений риса-падди, выращенных в нормальных условиях культивирования. Наличие тех же самых строчных букв означает незначимое различие средних ($P < 0,05$).

На фиг. 7 проиллюстрирован анализ на экспрессию rOsOTUB1::GUS. (a) Экспрессия GUS в пятидневных проростках. Масштаб: 1 см. (b) Кончики корней растений показаны в (a). Масштаб: 200 мкм. (c) Поперечный срез GUS-окрашенной зоны удлинения корня, показанной в (a). Масштаб: 200 мкм. (d) Поперечный срез стебля. Масштаб: 100 мкм. (e) Различные стадии образования метелки. Масштаб: 1 см. (f) Кожура колосков до оплодотворения. Масштаб: 1 мм.

На фиг. 8 показана субклеточная локализация OsOTUB1.1-GFP. (a) Экспрессия OsOTUB1.1-GFP в зоне удлинения корня. Масштаб: 20 мкм. (b) Экспрессия GFP в протопластах, выделенных из влагалища листьев растений ZH11, сверхэкспрессирующих OsOTUB1.1-GFP. Масштаб: 10 мкм. Панели (слева направо): сигнал GFP, дифференциальный интерферирующий контрастный агент (DIC), объединенный канал.

На фиг. 9 представлен фенотип растений ZH11, сверхэкспрессирующих OsOTUB1.1. (a) В двух независимых трансгенных линиях наблюдалось пониженное число побегов и карликовость. Масштаб: 10 см. (b) Размер метелки уменьшался. Масштаб: 5 см. (c) Наблюдался некроз листьев. Масштаб: 3 мм. (d) Апоптоз был индуцирован в удлиненных листьях, как было проанализировано путем окрашивания синим Эвансом. Масштаб: 3 мм. (e) Избыток транскрипта OsOTUB1.1 в молодой метелке. Транскрипция по сравнению с уровнем транскрипции у растений ZH11 была принята за 1. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. ($n=3$). (f) высота растения, (g) Число побегов на растение, (h) Число зерен на метелку. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. ($n=60$). Все фенотипические данные были получены для растений риса-падди, выращенных в обычных условиях культивирования. Наличие тех же самых строчных букв означает незначимое различие средних ($P < 0,05$, панели f-h).

На фиг. 10 показано, что OsOTUB1 обладает активностью расщепления тетрамеров K48- и K63-связанного убиквитина. Активность расщепления тетрамеров K48- и K63-связанного убиквитина (Tetra-ub) анализировали с использованием OTUB1, His-OsOTUB1.1 или OTUB1.2. Исходные вещества (Ub₄) и продукты их расщепления [тримеры (Ub₃), димеры (Ub₂) и мономеры (Ub₁)] помечены слева. Продукты визуализировали с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием антитела против убиквитина.

На фиг. 11 показано влияние экспрессии человеческого OTUB1 или его ортологов на архитектуру растения ZH11-npt1. (a) Морфология растения. Масштаб: 20 см. (b) Морфология метелки. Масштаб: 5 см. (c) Избыток транскрипта OTUB1 (или его ортологов) в молодых метелках по сравнению с уровнем OsOTUB1 в растениях ZH11-npt1. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. (n=3). (d) Число побегов на растение, (e) Число зерен на метелку, (f) Диаметр верхнего междоузлия. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. (n=30). Все фенотипические данные были получены для растений риса-падди, выращенных в нормальных условиях культивирования. Наличие тех же самых строчных букв означает незначимое различие средних ($P < 0,05$, панели d-f).

На фиг. 12 показано, что взаимодействие между OsOTUB1 и OsUBC13 регулирует архитектуру растения, (a) Анализы на присутствие двух компонентов в дрожжах. (b) Анализы на ингибирование с использованием рекомбинантных GST-OsOTUB1 и His-OsUBC13. (c) Анализы BiFC в протопластах риса. Масштаб: 10 мкм. (d) Морфология трансгенных растений ZH11. Масштаб: 20 см. (e) Поперечный срез верхних междоузлий. Масштаб: 500 мкм. (f) Влияние OsUBC13 на степень ветвления метелки. Масштаб: 5 см. (g) Размер и форма зерна. Масштаб: 2 мм. (h) Избыток транскрипта OsOTUB1 в молодой метелке по сравнению с уровнем в ZH11. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. (n=3). (i) Число побегов на растение, (j) Число зерен на метелку, (k) Масса 1000 зерен. (l) Диаметр верхнего междоузлия. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. (n=30). Все фенотипические данные были получены для растений риса-падди, выращенных в нормальных условиях культивирования. Наличие тех же самых строчных букв означает незначимое различие средних ($P < 0,05$, панели i-l).

На фиг. 13 показано, что SBP-домен необходим для взаимодействия OsSPL14-OsOTUB1. (a) Анализы на наличие двух компонентов в дрожжах подтвердили взаимодействие между C-концами OsOTUB1 и OsSPL14. (b) Схематическое представление deletированных и не deletированных вариантов белков OsSPL14, используемых в анализах BiFC. (c) Анализы BiFC. Масштаб: 10 мкм.

На фиг. 14 показано, что OsOTUB1 взаимодействует с факторами транскрипции SPL риса. Анализы BiFC были проведены с использованием протопластов риса, где C-конец YFP-меченного OsOTUB1.1 был котрансформирован N-концом YFP-меченных OsSPL. Панели (слева направо): сигнал YFP, дифференциальный интерферирующий контрастный агент (DIC), объединенный канал. Масштаб: 10 мкм.

На фиг. 15 показано, что OsOTUB1 и OsSPL14 антагонистически регулируют общие гены-мишени, (a) Число и перекрытие OsSPL14-активированных и OsOTUB1-ингибированных генов-мишеней. Секвенирование РНК осуществляли с использованием молодых метелок (длиной $< 0,2$ см) растений NIL. (b) Избыток OsSPL14-регулируемого гена, оцениваемого в молодой метелке по сравнению с уровнем в ZH11. Данные представлены как среднее $\pm$ ср. кв. ош. (n=3).

На фиг. 16 показано влияние взаимодействия OsSPL14-OsOTUB1 на аффинность связывания ДНК OsSPL14. Анализ на конкурентное связывание с белком OsSPL14-GST осуществляли с использованием 10 $\times$, 20 $\times$ и 50 $\times$ немеченных зондов, содержащих мотивы GTAC-бокс промотора гена DEP1 или с использованием 1 $\times$, 2 $\times$ и 4 $\times$ немеченных гибридных белков Myc-OsOTUB1.1, соответственно.

На фиг. 17 указаны последовательности праймеров, используемые в анализе на конструкции и транскрипты ДНК.

На фиг. 18 показано, что WTG1 влияет на размер, форму и массу зерна.

(a) зерно риса-падди Zhonghuajing (ZHJ) и wtg1-1.

(b) Зерно коричневого риса ZHJ и wtg1-1.

(c) Поперечный срез зерен коричневого риса ZHJ и wtg1-1. Красными линиями показана толщина зерна.

(d) Длина зерна ZHJ и wtg1-1 (n $\geq$ 50).

(e) Ширина зерна ZHJ и wtg1-1 (n $\geq$ 50).

(f) Ширина зерна ZHJ и wtg1-1 (n $\geq$ 50).

(g) Масса 1000 зерен ZHJ и wtg1-1. Была измерена масса трех партий образцов (n=3). Величины в (d-g) означают среднее $\pm$ ср. кв. ош. ** $P < 0,01$ по сравнению с родительской линией (ZHJ) по t-критерию Стьюдента.

Масштаб: 3 мм (a-c).

На фиг. 19 показано, что WTG1 влияет на размер метелки, форму метелки и число зерен на метелку.

(a,b) Растения ZHJ (a) и wtg1-1 (b). Растения, выращенные на орошаемом рисовом поле, выкапывали и высаживали в горшки для получения фотографии всего растения.

(c, d) Удлиненные листья ZHJ (c) и wtg1-1 (d).

(e) Метелки ZHJ (слева) и wtg1-1 (справа).

(f) Высота растений ZHJ и wtg1-1 (n $\geq$ 10).

(g, h) Длина (g) и ширина (h) листьев ZHJ и wtg1-1 ($n \geq 10$).

(i) Длина метелки ZHJ и wtg1-1 ($n \geq 10$).

(j) Расстояние между каждой первичной ветвью и шейкой метелки ($n \geq 10$).

(k, l) Число первичных ветвей метелки (k) и число вторичных ветвей метелки (l) ($n \geq 10$).

(m) Число зерен на метелку ($n \geq 10$).

Величины в (f-m) означают $\pm$ ср. кв. ош. $**P < 0,01$ по сравнению с ZHJ по t-критерию Стьюдента.

Масштаб: 10 см (a, b); 1 см (c, d); 5 см (e).

На фиг. 20 показано, что WTG1 кодирует отубаин-подобную протеазу с деубиквитинизирующей активностью.

(a) ген WTG1. В незаштрихованных рамках показаны 5'- и 3'-нетранслируемые области. В заштрихованных рамках показаны кодирующие последовательности. Также показаны старт-кодон (ATG) и стоп-кодон (TAG), wtg1-1 содержит т.п.о.-делецию в области стыка "экзон-интрон" четвертого интрона.

(b) Маркер dCAPS1 проявился на основе мутации wtg1-1. Для гидролиза ПЦР-продуктов использовали рестриктирующий фермент Hpy1881.

(c) ОТ-ПЦР-анализ WTG1 в метелках ZHJ и wtg1-1. Мутация wtg1-1 приводила к модификации сплайсинга WTG1.

(d, e) Белок WTG1 (d) и мутированный белок wtg1-1 (e). Белок WTG1 содержит домен отубаина. Мутированный белок wtg1-1 имеет N-концевую область, часть домена отубаина и неродственный пептид (зеленая рамка).

(f) Зерно риса-падди ZHJ, wtg1-1 и gWTG1; wtg1-1. gWTG1; wtg1-1 означает, что геномная последовательность гена WTG1 была превращена в мутант wtg1-1.

(g) Зерно коричневого риса ZHJ, wtg1-1 и gWTG1; wtg1-1.

(h) Поперечный разрез зерен коричневого риса ZHJ, wtg1-1 и gWTG1; wtg1-1. Красными линиями показана толщина зерна.

(i-k) Длина зерна (i), ширина зерна (j) и толщина зерна (k) ZHJ, wtg1-1 и gWTG1; wtg1-1 ($n \geq 50$).

(l) WTG1 обладает деубиквитинизирующей активностью in vitro. MBP-WTG1 расщепляет His-UBQ10 in vitro, а MBP, MBP-WTG1^{wtg1-1} и MBP-WTG1^{D68E; C71S; H267R} не расщепляют His-UBQ10. Анти-His и анти-MBP антитела были использованы для детектирования His-UBQ, и расщепляли His-UBQ10, MBP, MBP-WTG1^{wtg1-1} и MBP-WTG1^{D68E; C71S; H267R}, соответственно.

Величины в (i-k) означают $\pm$ ср. кв. ош. $**P < 0,01$ по сравнению с родительской линией (ZHJ) по t-критерию Стьюдента.

Масштаб: 3 мм (f-h).

На фиг. 21 показана экспрессия и субмолекулярная локализация WTG1.

(a) Экспрессию WTG1 в корнях и листьях молодых проростков и в развивающихся метелках размером от 1 см (P1) до 15 см (P15) анализировали с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Величины даны как среднее $\pm$ ср. кв. ош. для трех дубликатов.

(b-d) Экспрессию WTG1 исследовали с использованием трансгенных растений proWTG1:GUS. Показана активность GUS в 8-дневных проростках (b), в кожуре развивающихся колосков (c) и развивающихся метелках (d).

(e-g) субклеточная локализация GFP-WTG1 в клетках корней pro35S:GFP-WTG1. Показаны флуоресценция GFP GFP-WTG1 (e), окрашивание DAPI (f) и объединенные изображения (g).

(h) Субклеточное фракционирование и иммуноблот-анализы. Листья pro35S:GFP-WTG1 использовали для выделения фракции цитоплазматического белка (C) и фракции ядерного белка (N). Иммуноблот-анализ проводили с использованием антитела против GFP. Birp, белок, связывающийся с люминалом, использовали в качестве цитоплазматического маркера. Гистон H4 использовали в качестве ядерного маркера.

Масштаб: 5 мм (b), 2 мм (c), 10 мм (d) и 10 мкм (e-g).

На фиг. 22 показано, что сверхэкспрессия WTG1 дает узкое, тонкое и длинное зерно.

(a) Зерно риса-падди трансгенных линий Zhonghuajing (ZHJ) и proActin:WTG1.

(b) Зерно коричневого риса трансгенных линий ZHJ и proActin:WTG1.

(c) Поперечный разрез зерна трансгенных растений ZHJ и proActin:WTG1. Красными линиями показана толщина зерна.

(d-f) Длина (d), ширина (e), и толщина (f) зерна ZHJ и proActin:WTG1 ($n \geq 40$).

(g) Уровень экспрессии WTG1 в трансгенных линиях ZHJ и proActin:WTG1. Было оценено три дубликата.

Величины в (d-g) означают среднее $\pm$ ср. кв. ош. $**P < 0,01$ по сравнению с родительской линией (ZHJ) по t-критерию Стьюдента.

Масштаб: 3 мм (a-c).

На фиг. 23 проиллюстрирована идентификация мутации wtg1-1 методом MutMap. Секвенирование всего генома выявило одну делецию в гене LOC-Os08g42540, который имеет индекс SNP/INDEL=1.

На фиг. 24 показано филогенетическое дерево WTG1 и его гомологов. Гомологи WTG1 были полу-

ченны путем поиска в базе данных (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Филогенетическое дерево гомологов WTG1 конструировали методом присоединения соседних концов с помощью программы MEGA7.0. Числа в примечаниях означают процент 1000 бутстреп-дубликатов.

На фиг. 25 показано выравнивание WTG1 и его гомологов.

Белки *Oryza sativa* (MSULocus: LOC_Os08g42540), *Caenorhabditis elegans* (C.elegans, NP_506709), *Homo sapiens* (OTUB1, AK000120; OTUB2, AK025569), *Mus musculus* (Mus musculus, NP_080856), *Drosophila melanogaster*, (D.melanogaster, NP_609375), *Chlamydomonas reinhardtii* (C.reinhardtii, CHLREDRAFT 55169), *Zea mays* (Zea mays, ACG38232), *Hordeum vulgare* (Hordeum vulgare, BAJ96717), *Triticum urartu* (Triticum urartu, EMS61506), *Arabidopsis thaliana* (A. thaliana, At1 g28120) и *Glycine max* (Glycine max, XP_014623731) использовали для выравнивания. Красными треугольниками показаны консервативные аминокислоты в предполагаемой каталитической триаде цистеин-протеазы, а в красных рамках показаны консервативные последовательности в отубаин-подобном домене.

На фиг. 26 показано, что сверхэкспрессия WTG1 влияет на размножение клеток в кожуре колосков.

(a, b) Средняя длина (a) и ширина (b) внешних эпидермальных клеток в нижней цветковой чешуе трансгенных растений ZHJ и proActin:WTG1. Было оценено более чем 100 клеток ($n > 100$).

(c) Число внешних эпидермальных клеток по длине зерна нижней цветковой чешуи. Для подсчета числа клеток использовали двадцать зерен ($n = 20$).

(d) Число внешних эпидермальных клеток по ширине зерна. Для подсчета числа клеток использовали двадцать зерен ($n = 20$).

Величины в (a-d) даны как среднее $\pm$ ср. кв. ош. $**P < 0,01$ по сравнению с родительской линией (ZHJ) по t-критерию Стьюдента.

На фиг. 27 представлены праймеры, используемые в примере 2.

На фиг. 28 показан сайленсинг РНКи OsOTUB1. (a) Сайленсинг РНКи OsOTUB1 имеет ZH11-npt1-подобный фенотип. Масштаб: 20 см. (b) Уровни экспрессии OsOTUB1 трансгенных растений, (c) Толщина стебля трансгенных растений. Масштаб: 5 мм. (d) Архитектура метелок трансгенных растений. Масштаб: 5 см. (e) Форма зерна трансгенных растений. Масштаб: 5 мм. (f) Форма удлинённых листьев трансгенных растений. Масштаб: 5 см.

На фиг. 29 показан фенотип растений со снижением уровней экспрессии OTUB1 посредством РНКи. (a) Число первичных ветвей на метелку. (b) Число вторичных ветвей на метелку, (c) Число зерен на метелку, (d) Длина метелки, (e) Высота растения, (f) Общий урожай зерна на растение.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение более подробно описано ниже. В нижеследующих разделах различные аспекты изобретения определены более подробно. Каждый определенный таким образом аспект может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если это не оговорено особо. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или преимущественный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или преимущественные.

Настоящее изобретение может быть практически осуществлено, если это не оговорено особо, с помощью стандартных методов, применяемых в области ботаники, микробиологии, культивирования тканей, молекулярной биологии, химии, биохимии, технологии рекомбинантных ДНК и биоинформатики, которые известны специалистам в данной области. Такие методы подробно описаны в литературе.

Используемые здесь термины "нуклеиновая кислота", "последовательность нуклеиновой кислоты", "нуклеотид", "молекула нуклеиновой кислоты" или "полинуклеотид" включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), природные, мутированные, синтетические молекулы ДНК или РНК, и аналоги ДНК или РНК, полученные с использованием нуклеотидных аналогов. Эти последовательности могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Такими нуклеиновыми кислотами или полинуклеотидами являются, но не ограничиваются ими, кодирующие последовательности структурных генов, антисмысловые последовательности и некодирующие регуляторные последовательности, которые не кодируют мРНК, или белковые продукты. Эти термины также включают ген. Используемый здесь термин "ген" или "генная последовательность" употребляется в широком смысле и означает нуклеиновую кислоту ДНК, ассоциированную с биологической функцией. Таким образом, гены могут включать интроны и экзоны, как и в геномной последовательности, или могут содержать только кодирующую последовательность, как и в кДНК, и/или могут включать кДНК в комбинации с регуляторными последовательностями.

Используемые здесь термины "полипептид" и "белок" являются синонимами и означают аминокислоты в полимерной форме любой длины, связанные друг с другом пептидными связями.

Аспекты настоящего изобретения включают методы рекомбинантных ДНК и исключают варианты, которые основаны исключительно на культивировании растений традиционными методами селекции.

Способы повышения урожайности

В соответствии с этим, в первом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу повышения урожайности растений, где указанный способ включает снижение или отмену экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей отубаин-подобную протеазу (обозначаемую здесь "OTUB1" (белок, связывающийся с альдегидом убиквитина и содержащий домен опухоли яичника

1)), и/или снижение или отмену активности полипептида OTUB1 в указанном растении. Предпочтительно настоящее изобретение относится к способу повышения урожая зерна. OTUB1 может также обозначаться здесь "NPT1", "DEP5" или "WTG1", и эти термины могут быть использованы как синонимы. В одном варианте осуществления изобретения способ может снижать, но не отменять экспрессию и/или активность OTUB1.

Термин "урожай" в общих чертах означает измеримое достижение экономической ценности, обычно связанное с указанной сельскохозяйственной культурой, в конкретной области и в конкретный период времени. Отдельные части растений непосредственно вносят свой вклад в урожай в зависимости от их количества, размеров и/или массы. Альтернативно фактическим урожаем является урожай сельскохозяйственной культуры на квадратный метр в год, который определяется путем деления общего объема продукта (включая собранный и оцененный продукт) на засеянные квадратные метры.

Термин "повышение урожайности", определяемый в настоящей заявке, может включать любой или по меньшей мере один из нижеследующих признаков и может быть определен путем оценки одного или более параметров: (a) увеличенной биомассы (массы) одной или более частей растения, надземных частей (заготавливаемых частей) или увеличенной биомассы корней, увеличенного объема корней, увеличенной длины корней, увеличенного диаметра корней или увеличенной биомассы любой другой части заготавливаемой части. Увеличенная биомасса может быть выражена как г/растение или кг/гектар; (b) увеличенной урожайности семян на растение, которая может включать одно или несколько признаков: увеличенной биомассы (массы) семян на растение или его отдельной части, (c) увеличенной скорости налива семян, (d) увеличенного числа налитых семян, (e) повышенного показателя урожайности, который может быть выражен как отношение урожайности заготавливаемых частей, таких как семена, к общей биомассе, (f) увеличенной всхожести/эффективности прорастания, (g) увеличенного числа или размера или массы семян или стручков, или бобов, или зерна, (h) увеличенного объема семян (что может быть результатом изменения состава (т.е. общего содержания и состава липидов (также называемых здесь маслом), белков и углеводов), (i) увеличенной (индивидуальной или средней) площади семян, (j) увеличенной (индивидуальной или средней) длины семян, (k) увеличенной (индивидуальной или средней) ширины семян, (l) увеличенного (индивидуального или среднего) периметра семян, (m) повышенного роста или ветвления, например, соцветий с большим числом ветвей, (n) увеличенной свежей массы или наполненности зерна, (o) увеличенной массы колоса, (p) увеличенной массы тысяч зерен (TKW), которая может быть вычислена исходя из числа подсчитанных наполненных семян и их общей массы и может быть результатом увеличения размера семян и/или массы семян, (q) уменьшенного числа бесплодных побегов на растение и (r) более крепких или более сильных соломин или стеблей. Все параметры приводятся по отношению к растению дикого типа или к контрольному растению.

Предпочтительно повышенный урожай включает по меньшей мере одно увеличение по меньшей мере числа зерен, числа зерен на колос или на метелку, массы зерна, ширины зерна и толщины зерна, массы тысячи зерен. Урожайность является повышенной по сравнению с урожайностью контрольного растения или растения дикого типа. Так, например, урожайность была повышена 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, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, или 95% по сравнению с урожайностью контрольного растения или растения дикого типа. В одном из вариантов осуществления изобретения урожайность может быть повышена на 20-50%, а более предпочтительно на 5-15% или более по сравнению с урожайностью контрольного растения. Повышение урожая зерна может быть оценено путем определения одного или более параметров: числа зерен, числа зерен на метелку, массы зерна, ширины зерна и толщины зерна, массы тысячи зерен и/или числа плодоносящих побегов на растение. Специалист в данной области может определить любой из вышеуказанных параметров урожая зерна известными методами.

Используемые здесь термины "семена" и "зерно" могут рассматриваться здесь как синонимы. Термины "повышение", "улучшение" или "усиление" также используются здесь как синонимы.

Термин "снижение" означает снижение уровней экспрессии и/или активности OTUB1 на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% или более по сравнению с уровнем у растения дикого типа или контрольного растения. Термин "снижение" может охватывать, а может и не охватывать, отмену экспрессии, а предпочтительно он не охватывает такую отмену. Термин "отмена" экспрессии означает, что экспрессия OTUB1 не обнаруживается, или функциональный полипептид OTUB1 не продуцируется. Методы определения уровня экспрессии и/или его активности OTUB1 хорошо известны специалистам в данной области. Такое снижение может быть измерено любым стандартным методом, известным специалистам в данной области. Так, например, снижение уровней экспрессии и/или содержания по меньшей мере OTUB1 может быть показателем уровней белка и/или нуклеиновой кислоты и может быть определено любым известным методом, таким как, но не ограничивающимся ими, любая форма гель-электрофореза или хроматографии (например, ВЭЖХ). В одном из вариантов осуществления изобретения мутация снижает или отменяет деубиквитиnazную активность OTUB1. В соответствии с этим, способ может включать оценку деубиквитиnazной активности белка стандартными методами, такими как применение флуоресцентного деубиквитиnazного субстрата.

В предпочтительном варианте любого из описанных здесь аспектов изобретения, экспрессия и/или

активность OTUB1 является пониженной, но не отмененной.

Термин "по меньшей мере одна мутация" означает, что если ген OTUB1 присутствует в виде более чем одной копии или гомолога (с той же самой или немного отличающейся последовательностью), то по меньшей мере в одном гене присутствует по меньшей мере одна мутация. Предпочтительно чтобы все гены были мутированными.

В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает введение по меньшей мере одной мутации, предпочтительно в эндогенный ген, кодирующий OTUB1 и/или в промотор OTUB1. Предпочтительно указанной мутацией является мутация в кодирующей области гена OTUB1. Альтернативно указанной мутацией является мутация в интронной последовательности или в 5'-UTR. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация или структурная модификация может быть введена в промотор OTUB1 так, чтобы ген OTUB1 не экспрессировался (т.е. чтобы экспрессия была отменена) или экспрессировался на пониженном уровне, как определено в настоящей заявке. В альтернативном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация может быть введена в ген OTUB1 так, чтобы модифицированный ген не экспрессировал полноразмерный (т.е. экспрессировал усеченный) белок OTUB1 или не экспрессировал полностью функциональный белок OTUB1. Таким образом, активность полипептида OTUB1 может рассматриваться как пониженная или отмененная, как описано в настоящей заявке. В любом случае, мутация может приводить к экспрессии OTUB1 с отсутствием биологической активности *in vivo*, с ее значительным уменьшением или изменением. Альтернативно OTUB1 может вообще не экспрессироваться.

В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность гена OTUB1 содержит или состоит из нее, последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в любой из SEQ ID NO: 2-5, или ее функциональный вариант или гомолог, и кодирует полипептид, определенный в SEQ ID NO: 1, или его функциональный вариант или гомолог.

Термин "промотор OTUB1" означает область, простирающуюся по меньшей мере на 2,5 т.п.о. выше кодона ATG OPC OTUB1. В одном из вариантов осуществления изобретения, последовательность промотора OTUB1 включает, или состоит из нее, последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в SEQ ID NO: 6 или ее функциональный вариант или гомолог. Примеры гомологов промотора указаны в SEQ ID NO: 21-27.

В вышеуказанных вариантах "эндогенная" нуклеиновая кислота может означать нативную или природную последовательность в геноме растения. В одном из вариантов осуществления изобретения, эндогенная последовательность гена OTUB1 содержит любую из SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5 и кодирует аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 1 или ее гомологи. В объем настоящего изобретения также входят функциональные варианты (определенные в настоящей заявке) и гомологи идентифицированных выше последовательностей. Примеры гомологов представлены в SEQ ID NO: 7-27. В соответствии с этим, в одном из вариантов осуществления изобретения гомолог кодирует полипептид, выбранный из SEQ ID NO: 14-20 или содержит, или состоит из нее, последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 7-13.

Термин "функциональный вариант" (или "вариант"), используемый здесь со ссылкой на любые SEQ ID NO: 2-210, означает последовательность варианта или часть ее последовательности, которые сохраняют биологическую функцию полноразмерной немодифицированной последовательности. Функциональный вариант также включает вариант представляющего интерес гена, который имеет модификации в последовательности, не влияющие на функцию, например, в неконсервативных остатках. В объем настоящего изобретения также входит вариант, который, по существу, идентичен представленным здесь последовательностям дикого типа, т.е. имеет только некоторые модификации последовательности, например, в неконсервативных остатках, и является биологически активным. Модификации в последовательности нуклеиновой кислоты, которые приводят к продуцированию другой аминокислоты в данном положении, не влияющей на функциональные свойства кодируемого полипептида, хорошо известны специалистам в данной области. Так, например, кодон аминокислоты аланина, т.е. гидрофобной аминокислоты, может быть заменен кодоном, кодирующим другой менее гидрофобный остаток, такой как глицин, или более гидрофобный остаток, такой как валин, лейцин или изолейцин. Аналогичным образом, модификации, которые приводят к замене одного отрицательно заряженного остатка на другой, например, аспарагиновой кислоты на глутаминовую кислоту или одного положительно заряженного остатка на другой, например, лизина на аргинин, могут также, как и ожидается, продуцировать функционально эквивалентный продукт. Также не следует ожидать, что нуклеотидные замены, которые приводят к изменению N-концевых и C-концевых частей молекулы полипептида, будут изменять активность полипептида. Каждая из предложенных модификаций входит в компетенцию специалиста обычной квалификации, и было определено, что она не изменяет биологическую активность кодируемых продуктов.

В одном из вариантов осуществления изобретения, функциональный вариант имеет последовательность, общая идентичность которой составляет 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% по сравнению с последовательностью немодифицированной нук-

леиновой кислоты или аминокислотной последовательностью.

Используемый здесь термин "гомолог" также означает промотор OTUB1 или ортолог гена OTUB1, происходящий от растений других видов. Гомолог может иметь, в порядке увеличения предпочтительности, последовательность, общая идентичность которой составляет 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% по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1 или любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленной SEQ ID NO: 2 или 6. В одном из вариантов осуществления изобретения, общая идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 37%. В одном из вариантов осуществления изобретения, 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%, а наиболее предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99%.

В объем настоящего изобретения входят также функциональные варианты гомологов OTUB1, определенных выше.

"OTUB1" (белок, связывающийся с альдегидом убиквитина и содержащий домен опухоли яичника 1) кодирует отубаин-подобную протеазу. Как обсуждалось выше, "OTUB1" может также обозначаться здесь "NPT1", "DEP5" или "WTG1", и эти термины могут быть использованы как синонимы.

OTUB1 характеризуется наличием ряда консервативных доменов, включая, но не ограничиваясь ими, отубаин-подобный домен.

В другом варианте осуществления изобретения последовательность отубаин-подобного домена представлена ниже:

SEQ ID NO: 211

PYVGDKEPLSTLAAEFQSGSPILQEKIKLLGEQYDALRRTRGDGNCFYRSFMFSY

LEH

ILETQDKAEVERILKKIEQCKKTLADLGYIEFTFEDFFSIFIDQLESVLQGHESIGAEELL

ERTRDQMVS DYVVMFFRFVTSGEIQRRAEFFEPFISGLTNSTVVQFCKASVEPMGEE

SDHVHIIALSDALGVPIRVMYLDRSSCDAGNISVNHHDFSPEANSSDGAAAAEKPYITL

LYRPGHYDILYP

Аминокислоты, выделенные жирным в SEQ ID NO: 211, образуют каталитическую триаду, или SEQ ID NO: 212

SPIQEKIKLLGEQYDALRRTRGDGNCFYRSFMFSYLEHILETQDKAEVERILKKI

EQCK

KTLADLGYIEFTFEDFFSIFIDQLESVLQGHESIGAEELLERTRDQMVS DYVVMFFRF

VTSGEIQRRAEFFEPFISGLTNSTVVQFCKASVEPMGEEESDHVHIIALSDALGVPIRVM

YLDRSSCDAGNISVNHHDFSPEANSSDGAAAAEKPYITLLYRPGHYDILYPK

В соответствии с этим, в одном из вариантов осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты OTUB1 (кодирующая) кодирует белок OTUB1, содержащий по меньшей мере один SBP-домен и/или отубаин-подобный домен, определенный ниже или их вариант, где указанный вариант имеет последовательность, общая идентичность которой составляет 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% по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 211 или 212. В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид OTUB1 характеризуется наличием по меньшей мере одного отубаин-подобного домена и имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична SEQ ID NO: 211 или 212. В другом варианте осуществления изобретения белок OTUB1 содержит каталитическую триаду и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 211 или SEQ ID NO: 212 и/или их вариант, определенный выше, где последовательность этого варианта содержит по меньшей мере аспартат и цистеин (предпочтительно в положениях 4 и 7) и/или гистидин в SEQ ID NO: 211 (предпочтительно в первом положении).

Две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов называются "идентичными", если последовательность нуклеотидов или аминокислотных остатков, соответственно, в двух последовательностях являются одинаковыми при их выравнивании на максимальное соответствие, как описано ниже. Термины "идентичный" или процент "идентичности" в отношении двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов при сравнении и выравнивании на максимальное соответствие по всему окну сравнения, как было определено с помощью одного из ледующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального наблюдения. Если процент иден-

тичности последовательностей используется в отношении белков или пептидов, то считается, что положения остатков, которые не являются идентичными, часто отличаются консервативными аминокислотными заменами, где аминокислотные остатки были заменены другими аминокислотными остатками со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью) а, следовательно, не изменяют функциональные свойства молекулы. Если последовательности отличаются консервативными заменами, то процент идентичности последовательностей может быть скорректирован в сторону повышения для коррекции консервативного характера замен. Методы такой коррекции хорошо известны специалистам в данной области. Для сравнения последовательностей, обычно одну последовательность выбирают в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, определяют координаты подпоследовательности, если это необходимо, и вычисляют параметры алгоритма программы последовательности. Могут быть использованы параметры программы по умолчанию, либо могут быть выбраны альтернативные параметры. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательностей вычисляют процент идентичности последовательности для тестируемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основе параметров программы. Неограничивающими примерами алгоритмов, которые являются подходящими для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0.

Подходящие гомологи могут быть идентифицированы путем сравнения последовательностей и идентификаций консервативных доменов. Специалистам в данной области известны программы предсказания, которые могут быть использованы для идентификации таких последовательностей. Функция гомолога может быть идентифицирована, как описано в настоящей заявке, и, таким образом, специалист в данной области сможет подтвердить функцию, например, если она избыточно экспрессируется в растении.

Таким образом, нуклеотидные последовательности согласно изобретению и описанные здесь последовательности могут также быть использованы для выделения соответствующих последовательностей из других организмов, а в частности других растений, например, сельскохозяйственных культур. Таким образом, методы, такие как ПЦР, гибридизация и т.п. могут быть применены для идентификации таких последовательностей исходя из гомологии этих последовательностей с описанными здесь последовательностями. Топология последовательностей и доменов с характерной структурой также может учитываться при идентификации и выделении гомологов. Последовательности могут быть выделены исходя из общей идентичности их последовательностей или их фрагментов. В методах гибридизации, вся известная нуклеотидная последовательность или ее часть используются в качестве зонда, который селективно гибридизуется с другими соответствующими нуклеотидными последовательностями, присутствующими в популяции клонированных фрагментов геномной ДНК или фрагментов кДНК (т.е. библиотек геномных ДНК или кДНК) выбранного растения. Эти зонды для гибридизации могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды, и могут быть помечены детектируемой группой или любым другим детектируемым маркером. Методы получения зондов для гибридизации и конструирования кДНК и геномных библиотек обычно известны специалистам и описаны в руководстве Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Гибридизация таких последовательностей может быть осуществлена в условиях определенной жесткости. Под термином "жесткие условия" или "жесткие условия гибридизации" подразумеваются условия, при которых зонд будет гибридизоваться с последовательностью-мишенью в детектируемо большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза по сравнению с фоном). Условия жесткости зависят от последовательности и будут отличаться в различных случаях. Путем регуляции условий жесткости гибридизации и/или промывки могут быть идентифицированы последовательности-мишени, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование). Альтернативно условия жесткости можно регулировать так, чтобы это допускало некоторое несоответствие в последовательности, но так, чтобы можно было детектировать более низкие степени сходства (гетерологичное зондирование). Как правило, зонд имеет длину менее чем приблизительно 1000 нуклеотидов, а предпочтительно менее чем 500 нуклеотидов.

Как правило, условия жесткости могут представлять собой условия, при которых концентрация соли составляет менее, чем приблизительно 1,5 М ионов Na, а обычно, приблизительно от 0,01 до 1,0 М ионов Na (или других солей) при pH 7,0-8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, более чем 50 нуклеотидов). Продолжительность гибридизации обычно составляет менее чем приблизительно 24 часа, а чаще всего приблизительно от 4 до 12 часов. Условия жесткости могут быть также достигнуты путем добавления дестабилизирующих агентов, таких как формамид.

В другом варианте осуществления изобретения используемый здесь вариант может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид OTUB1, определенный в настоящем

описании, где указанная последовательность способна гибридизоваться в определенных здесь условиях жесткости с последовательностью нуклеиновой кислоты, определенной в SEQ ID NO: 2-5.

В одном из вариантов осуществления изобретения, способ включает снижение или отмену, а предпочтительно снижение экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид OTUB1 или снижение или отмену активности полипептида OTUB1, как описано в настоящей заявке, где указанный способ включает введение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в один ген и/или в промотор OTUB1, где указанный ген OTUB1 содержит или состоит из:

- a. последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, определенный в одной из SEQ ID NO: 1 и 14-20; или
- b. последовательности нуклеиновой кислоты, определенной в одной из SEQ ID NO: 2-13; или
- c. последовательности нуклеиновой кислоты, общая идентичность которой составляет 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% по сравнению с последовательностями (a) или (b); или
- d. последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид OTUB1, как определено в настоящей заявке, и способной гибридизоваться в определенных здесь условиях жесткости с последовательностью нуклеиновой кислоты по любому из (a)-(c), и где промотор OTUB1 содержит или состоит из:
 - e. последовательности нуклеиновой кислоты, определенной в SEQ ID NO: 6 и 21-27;
 - f. последовательности нуклеиновой кислоты, общая идентичность которой составляет 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% по сравнению с последовательностью (e); или
 - g. последовательности нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться в определенных здесь условиях жесткости с последовательностью нуклеиновой кислоты по любому из (e)-(f).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мутация, которую вводят в эндогенный ген или промотор OTUB1 для сайленсинга, снижения или ингибирования биологической активности и/или уровней экспрессии гена или белка OTUB1, может быть выбрана из мутаций следующих типов:

1. "миссенс-мутации", которая представляет собой модификацию последовательности нуклеиновой кислоты, приводящую к замене одной аминокислоты на другую аминокислоту;
2. "нонсенс-мутации" или "мутации стоп-кодона", которые представляют собой модификацию в последовательности нуклеиновой кислоты, которая приводит к введению преждевременного стоп-кодона и, таким образом, к терминации трансляции (с образованием усеченного белка); где в растениях кодоны терминации трансляции могут быть выбраны из "TGA" (UGA в РНК), "TAA" (UAA в РНК) и "TAG" (UAG в РНК); и таким образом, любая нуклеотидная замена, инсерция и делеция приводит к образованию одного из этих кодонов для трансляции зрелой мРНК (в рамке считывания) и прекращает трансляцию.
3. "инсерционной мутации" одного или более нуклеотидов или одной или более аминокислот из-за добавления одного или более кодонов в кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты;
4. "делеционной мутации" одного или более нуклеотидов или одной или более аминокислот из-за делеции одного или более кодонов в кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты;
5. "мутации со сдвигом рамки считывания", которая приводит к трансляции последовательности нуклеиновой кислоты в другой рамке считывания, расположенной ниже этой мутации. Мутация со сдвигом рамки считывания может происходить по различным причинам, таким как инсерция, делеция или дупликация одного или более нуклеотидов.
6. "мутации сайта сплайсинга", которая представляет собой мутацию, приводящую к инсерции, делеции или замене нуклеотидов в сайте сплайсинга.

Используемые здесь термины "инсерция", "делеция" или "замена" могут означать инсерцию, делецию или замену по меньшей мере одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти нуклеотидов. В одном конкретном варианте указанная мутация может включать по меньшей мере одну из следующих замен:

- С на Т в положении 1135 SEQ ID NO: 2 или 5;
- Г на С в положении 1462 SEQ ID NO: 2 или 5; и/или
- Г на С в положении 1798 SEQ ID NO: 2 или 5.

В другом дополнительном или альтернативном варианте осуществления изобретения указанной мутацией является инсерция одной аминокислоты, а предпочтительно Т в положении 2234 SEQ ID NO: 2 или 5.

В другом дополнительном или альтернативном варианте осуществления изобретения указанной мутацией является делеция по меньшей мере четырех нуклеотидов, а предпочтительно четырех нуклеотидов, подчеркнутых в SEQ ID NO: 3. Этой мутацией являются мутация в последовательности сплайсинга экзона-интрона, приводящая к образованию мутированной последовательности CDS, содержащей четвертую интронную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 153 (четвертый интрон подчеркнут). В результате мутация wtg приводит к преждевременной терминации предсказанного белка (как описано в SEQ ID NO: 154).

В другом дополнительном или альтернативном варианте осуществления изобретения указанной му-

тацией может быть замена G на A в положении 1824 SEQ ID NO: 155.

Вообще говоря, специалистам в данной области очевидно, что по меньшей мере одна мутация, определенная выше и приводящая к inserции, делеции или замене по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты или аминокислоты по сравнению с последовательностью промотора OTUB1 или нуклеиновой кислоты или белка OTUB1 дикого типа, может влиять на биологическую активность белка OTUB1. Предпочтительно указанная мутация отменяет или снижает деубиквитиназную активность OTUB1.

В одном из вариантов осуществления изобретения мутацию вводят в SBP-домен и/или отубаин-подобный домен. Предпочтительно указанной мутацией является мутация с потерей или с частичной потерей функции, такая как преждевременный стоп-кодон или аминокислотная замена в высококонсервативной области, которая, как было предсказано, играет важную роль в образовании структуры белка. В другом варианте осуществления изобретения мутацию вводят в промотор OTUB1 и такой мутацией является по меньшей мере делеция и/или inserция по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты. Также включены и другие основные замены, такие как делеции, которые удаляют функциональные области промотора и снижают уровень экспрессии OTUB1. В одном из вариантов осуществления изобретения мутация может быть введена в положение по меньшей мере одной аминокислоты, которая образует каталитическую триаду, определенную выше. Так, например, указанной мутацией может быть по меньшей мере одна, а предпочтительно все нижеследующие замены:

D на E в положении 68 SEQ ID NO: 1

C на S в положении 71 SEQ ID NO: 1 и/или

H на R в положении 267 SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов осуществления изобретения, мутация может быть введена в промотор OTUB1 и по меньшей мере одну мутацию вводят в ген OTUB1.

В одном варианте осуществления изобретения мутацию вводят с помощью мутагенеза или целевого редактирования генома. Т.е. в одном своем варианте настоящее изобретение относится к способу и к растению, которое было получено описанными выше методами генной инженерии и не включает природные сорта.

Нацеленная модификация генома или целевое редактирование генома представляют собой метод геномной инженерии, в котором используются целевые двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) для стимуляции редактирования генома посредством событий рекомбинации, опосредуемых гомологичной рекомбинацией (HR). Для достижения эффективного редактирования генома посредством введения сайт-специфических DSB ДНК могут быть использованы четыре основных класса специально сконструированных ДНК-связывающих белков: мегануклеазы, происходящие от микробных мобильных генетических элементов; нуклеазы ZF на основе эукариотических факторов транскрипции; эффекторы, подобные активатору транскрипции (TALE) от бактерий *Xanthomonas*, и РНК-ДНК-эндонуклеаза cas9, регулируемая РНК и происходящая от бактериальной адаптивной иммунной системы CRISPR типа II (кластеризованных регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов). Мегануклеаза, белки ZF и TALE распознают специфические последовательности ДНК посредством взаимодействий белок-ДНК. Хотя мегануклеазы интегрируют нуклеазы и ДНК-связывающие домены, однако, белки ZF и TALE состоят из отдельных модулей, нацеленных на нуклеотиды 3 или 1 (nt) ДНК, соответственно. ZF и TALE могут быть собраны в нужной комбинации и присоединены к нуклеазному домену FokI для направления нуклеолитической активности на специфические геномные локусы.

После доставки в клетки-хозяева посредством бактериальной системы секреции типа III, эффекторы TAL проникают в ядро, связываются с эффектор-специфическими последовательностями в промоторах гена-хозяина и активируют транскрипцию. Их специфичность нацеленной доставки определяется центральным доменом тандема из 33-35 аминокислотных повторов. За ними следует один усеченный повтор из 20 аминокислот. Большинство оцениваемых природных эффекторов TAL расположены между 12 и 27 полноразмерными повторами.

Эти повторы отличаются друг от друга только двумя смежными аминокислотами, т.е. двумя остатками с переменными повторами (RVD). RVD, который определяет какой именно один нуклеотид будет распознавать эффектор TAL, представляет собой один RVD, соответствующий одному нуклеотиду, и каждый из четырех наиболее распространенных RVD, который преимущественно ассоциируется с одним из четырех оснований. Природные сайты распознавания равномерно расположены после T, который необходим для сообщения эффекторной активности TAL. Эффекторы TAL могут быть присоединены к каталитическому домену нуклеазы FokI с образованием нуклеазы эффектора TAL (TALEN), что позволяет вводить целевые двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) *in vivo* для редактирования генома. Применение этой технологии в редактировании генома хорошо описано в литературе, например, в патентах США 8440431, 8440432 и 8450471. Sermak T. и др. описывают набор специально изготовленных плазмид, которые могут быть использованы в методе клонирования "Golden Gate" для сборки множества фрагментов ДНК. Как описано в настоящей заявке, в методе Golden Gate используют рестриктирующие эндонуклеазы типа IIS, которые расщепляют сайты, находящиеся за пределами сайтов распознавания с образованием уникальных выступающих концов размером 4 п.о. Клонирование осуществляют посредством гидролиза и лигирования в одной и той же реакционной смеси, так как правильная сборка устраняет сайт рас-

познавания фермента. Сборка специально сконструированного TALEN или конструкция эффектора TAL включает две стадии: (i) сборку модулей-повторов с получением промежуточных массивов из 1-10 повторов и (ii) присоединение этих промежуточных массивов к остову с получением конечной конструкции. В соответствии с этим, с применением известных методов можно сконструировать эффектор TAL, который будет нацелен на описанную здесь последовательность гена или промотора OTUB1.

Другим методом редактирования геномов, который может быть применен в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, является CRISPR. Применение этой технологии в редактировании генома хорошо описано в литературе, например, в патенте США 8697359 и в цитируемых там документах. Короче говоря, CRISPR представляет собой микробную нуклеазную систему, участвующую в защите от инвазивных фагов и плазмид. Локусы CRISPR в микробах-хозяевах содержат комбинацию CRISPR-ассоциированных генов (Cas), а также некодирующие элементы РНК, способные программировать специфичность CRISPR-опосредуемого расщепления нуклеиновой кислоты (оцрРНК). Три типа (I-III) систем CRISPR были идентифицированы для бактерий-хозяев широкого ряда. Одним из ключевых признаков каждого локуса CRISPR является присутствие массива повторяющихся последовательностей (прямых повторов), перемежающихся короткими фрагментами неповторяющихся последовательностей (спейсеров). Некодирующий массив CRISPR транскрибируется и расщепляется в прямых повторах с образованием коротких *сг*-РНК, содержащих отдельные последовательности-спейсеры, которые направляют нуклеазы Cas в сайт-мишень (протоспейсер). CRISPR типа II представляет собой одну из наиболее хорошо охарактеризованных систем и осуществляет нужный двухцепочечной разрыв ДНК в четыре последовательных стадии. Во-первых, две некодирующие РНК, массив *pre-сг*-РНК и *tracr*-РНК, транскрибируются из локуса CRISPR. Во-вторых, *tracr*-РНК гибридизуется с областями повторов *pre-сг*-РНК и опосредует процессинг *pre-сг*-РНК в зрелые *сг*-РНК, содержащие отдельные последовательности-спейсеры. В-третьих, зрелый комплекс *сг*-РНК:*tracr*-РНК направляет Cas9 к ДНК-мишени посредством спаривания оснований Уотсона-Крика между спейсером на *сг*-РНК и протоспейсером на ДНК-мишени рядом со смежным мотивом протоспейсера (PAM), что является дополнительным условием распознавания мишени. И наконец, Cas9 опосредует расщепление ДНК-мишени с образованием двухцепочечного разрыва в протоспейсере.

Одним из главных преимуществ системы CRISPR-Cas9, по сравнению с обычным таргетингом генов и другими программируемыми эндонуклеазами, является простота сообщения мультиплексности, где множество генов может быть мутировано одновременно просто с использованием множества оцрРНК, каждая из которых нацелена на другой ген. Кроме того, если две оцрРНК используются для фланкирования геномной области, то промежуточный участок может быть делетирован или инвертирован (Wiles et al., 2015).

Таким образом, Cas9 представляет собой ключевой белок системы CRISPR-Cas типа II и крупную мономерную ДНК-нуклеазу, нацеленную на последовательность-мишень ДНК, смежную с мотивом последовательности PAM (смежным мотивом протоспейсера) посредством комплекса из двух некодирующих РНК: РНК CRISPR (*сг*-РНК) и транс-активирующей *сг*-РНК (*tracr*-РНК). Белок Cas9 содержит два нуклеазных домена, гомологичных нуклеазам RuvC и HNH. Нуклеазный домен HNH расщепляет комплементарную цепь ДНК, тогда как RuvC-подобный домен расщепляет некомплементарную цепь, в результате чего в ДНК-мишень вводится затупленный вырезанный фрагмент. Гетерологичная экспрессия Cas9 вместе с оцрРНК позволяет вводить сайт-специфические двухцепочечные разрывы (DSB) в геномную ДНК живых клеток, происходящих от различных организмов. Для применения в эукариотических организмах были использованы оптимизированные по кодонам варианты Cas9, которые по своей природе происходят от бактерии *Streptococcus pyogenes*.

Одноцепочечная руководящая РНК (оцрРНК) является вторым компонентом системы CRISPR/Cas, который образует комплекс с нуклеазой Cas9. оцрРНК представляет собой синтетическую РНК-химеру, полученную путем присоединения *сг*-РНК к *tracr*-РНК. Последовательность руководящей оцрРНК находится у 5'-конца и сообщает специфичность к ДНК-мишени. Таким образом, посредством модификации руководящей последовательности можно получить оцрРНК с различными специфичностями к мишени. Каноническая длина руководящей последовательности составляет 20 п.о. В растениях, оцрРНК экспрессируются под контролем промоторов РНК-полимеразы III растений, таких как U6 и U3. В соответствии с этим, с применением известных методов можно сконструировать молекулы оцрРНК, нацеленные на описанную здесь последовательность гена или промотора OTUB1. В одном из вариантов осуществления изобретения, способ включает использование любых описанных здесь конструкций нуклеиновой кислоты или молекул оцрРНК.

Плазмиды для экспрессии Cas9, предназначенные для их применения в способах согласно изобретению, могут быть сконструированы как описано в литературе.

Альтернативно для введения по меньшей мере одной мутации в последовательность гена OTUB1 или промотора OTUB1 могут быть применены более традиционные методы мутагенеза. Эти методы включают физический и химический мутагенез. Специалисту в данной области могут быть известны и другие методы, которые могут быть применены для получения таких мутантов, и эти методы мутагенеза и модификации полинуклеотидов хорошо известны специалистам. См., например, Kunkel (1985) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; патент США No. 4873192; Walker and Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York) и цитируемые там документы.

В одном из вариантов осуществления изобретения используется инсерционный мутагенез, осуществляемый, например, посредством мутагенеза Т-ДНК (который позволяет встраивать фрагменты Т-ДНК из Т-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* в ДНК, что будет приводить к мутации, вызывающей потерю функции гена или приобретение функции гена); сайт-направленных нуклеаз (SDN) или транспозонов в качестве мутагена. Инсерционный мутагенез является альтернативным средством нарушения функции гена и основан на введении чужеродной ДНК в представляющий интерес ген (см. Krysan et al, The Plant Cell, Vol. 11, 2283-2290, December 1999). В соответствии с этим, в одном варианте осуществления изобретения Т-ДНК используют в качестве инсерционного мутагена для прекращения экспрессии гена OTUB1 или промотора OTUB1. Т-ДНК не только нарушает экспрессию гена, в которую ее встраивают, но также действует в качестве маркера для последующей идентификации мутации. Поскольку последовательность встроенного элемента является известной, то ген, в который вводят инсерцию, может быть выделен с применением различных стратегий клонирования или стратегий на основе ПЦР. Инсерция фрагмента Т-ДНК порядка 5-25 т.п.о. обычно приводит к нарушению функции гена. При получении достаточно крупных популяций Т-ДНК-трансформированных линий имеются достаточно высокие шансы получить трансгенное растение, несущее Т-ДНК-вставку в любом представляющем интерес гене. Трансформация спор посредством Т-ДНК достигается с применением *Agrobacterium*-опосредуемого метода, который включает обработку клеток и тканей растения суспензией клеток *Agrobacterium*.

Детали этого метода хорошо известны специалистам в данной области. Короче говоря, трансформация растения с использованием *Agrobacterium* приводит к интеграции последовательности, называемой Т-ДНК, в геном ядра, которая осуществляется на бактериальной плазмиде. Применение трансформации Т-ДНК обеспечивает стабильные отдельные вставки. Последующий анализ полученных трансформированных линий на наличие мутанта является простым и каждая отдельная встроенная линия может быть быстро охарактеризована посредством прямого секвенирования и анализа ДНК, фланкирующей вставку. Экспрессию генов в мутанте сравнивают с экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1 в растении дикого типа, а также проводят фенотипический анализ.

В другом варианте осуществления изобретения мутагенез представляет собой физический мутагенез, например, с помощью ультрафиолетового излучения, рентгеновского излучения, гамма-излучения, быстрых или тепловых нейтронов или протонов. Целевая популяция может быть затем скринирована для идентификации мутанта OTUB1 с пониженной экспрессией или активностью.

В другом варианте различных аспектов настоящего изобретения способ включает мутагенез популяции растений мутагеном. Мутагеном может быть облучение быстрыми нейтронами или химический мутаген, например, выбранный из нижеследующего неограничивающего списка: этилметансульфоната (EMS), метилметансульфоната (MMS), N-этил-N-нитрозомочевина (ENU), триэтилмеланина (1'EM), N-метил-N-нитрозомочевина (MNU), прокарбазина, хлорамбуцила, циклофосфамида, диэтилсульфата, акриламидного мономера, мелфалана, азотного аналога горчичного газа, винкристина, диметилнитрозамина, N-метил-N'-нитро-нитрозогуанидина (MNNG), нитрозогуанидина, 2-аминопурина, 7,12- диметилбенз(а)антрацена (DMBA), этиленоксида, гексаметилфосфорамида, бисульфана, диэпоксиалканов (диэпоксиоктана (DEO), диэпоксибутана (BEB) и т.п.), дигидрохлорида 2-метокси-6-хлор-9[3-(этил-2-хлорэтил)аминопропиламино]акридина (ICR-170) или формальдегида. И в этом случае, целевая популяция может быть затем скринирована для идентификации мутанта гена или промотора OTUB1.

В другом варианте осуществления изобретения способом, применяемым для создания и анализа мутаций, является индуцирование локальных поражений в геномах посредством таргетинга (TILLING), описанное Henikoff et al., 2004. В этом способе, семена подвергают мутагенезу химическим мутагеном, например, EMS. Полученные растения M1 являются самоопыляющимися и поколение растений M2 используют в целях получения образцов ДНК для мутационного скрининга. Образцы ДНК объединяют и наносят в виде массивов на микротитрационные планшеты, а затем подвергают геноспецифической ПНР. Продукты ПЦР-амплификации могут быть скринированы на наличие мутаций в гене-мишени OTUB1 с применением любого метода, который позволяет идентифицировать гетеродуплексы между генами дикого типа и мутантными генами. Примерами являются, но не ограничиваются ими, денатурирующая жидкостная хроматография высокого давления (дЖХВД), константный денатурирующий капиллярный электрофорез (КДКЭ), капиллярный электрофорез в градиенте температур (КЭГТ) или фрагментация посредством химического расщепления. Предпочтительно продукты ПЦР-амплификации инкубируют с эндонуклеазой, которая преимущественно расщепляет ошибочные спаривания в гетеродуплексах между последовательностями дикого типа и мутантными последовательностями. Продукты расщепления подвергают электрофорезу на автоматическом устройстве для секвенирования геля и изображения геля анализируют с помощью стандартной коммерчески доступной программы обработки изображений. Для амплификации последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1 в объединенном образце ДНК может быть использован любой праймер, специфичный к последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1. Предпочтительно праймер конструируют для амплификации областей гена OTUB1, где подходящие му-

тации, по всей вероятности, будут возникать, в частности, в областях гена OTUB1, которые являются в высокой степени консервативными и/или сообщают активность, как описано в настоящей заявке. Для облегчения детектирования ПЦР-продуктов на геле, ПЦР-праймер может быть помечен любым стандартным методом мечения. В альтернативном варианте осуществления изобретения способ, применяемый для создания и анализа мутаций, представляет собой EcoTILLING. EcoTILLING является молекулярным методом, аналогичным TILLING, за исключением того, что его целью является обнаружение природной изменчивости данной популяции по сравнению с индуцированными мутациями. Впервые метод EcoTILLING был описан в публикации Comai et al., 2004.

Таким образом, процедуры быстрого высокопроизводительного скрининга позволяют проводить анализ продуктов амплификации для идентификации мутации, сообщающей снижение или инактивацию экспрессии гена OTUB1 по сравнению с соответствующим немутагенным растением дикого типа. После идентификации мутации в представляющем интерес гене, семена растения M2, несущего такую мутацию, культивируют с получением взрослых растений M3 и скринируют на фенотипические признаки, ассоциированные с геном-мишенью OTUB1. Таким образом, может быть идентифицирована потеря и снижение функции в мутантах с увеличенным размером семян по сравнению с контролем.

Растения, полученные или получаемые таким способом и несущие функциональную мутацию в эндогенном локусе гена или промотора OTUB1, также входят в объем настоящего изобретения.

В альтернативном варианте осуществления изобретения экспрессия гена OTUB1 может быть снижена на уровне транскрипции или трансляции. Так, например, экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1 или промотора OTUB1, как определено в настоящей заявке, может быть снижена или "выключена" с применением ряда методов сайленсинга гена, известных специалисту в данной области, таких как, но не ограничиваясь ими, использование коротких интерферирующих нуклеиновых кислот (киНК) против OTUB1. Термин "сайленсинг генов" является общим термином и означает подавление экспрессии гена посредством последовательность-специфических взаимодействий, которые опосредуются молекулами РНК. Степень снижения может быть скорректирована так, чтобы это приводило к полной элиминации продуцирования кодируемого генного продукта, но обычно элиминация экспрессии является частичной, т.е. экспрессия до некоторой степени сохраняется. Следовательно, этот термин не должен быть истолкован как полный "сайленсинг" экспрессии.

В одном варианте осуществления изобретения киНК могут включать короткую интерферирующую РНК (киРНК), двухцепочечную РНК (дцРНК), микро-РНК (миРНК), антагомиры и короткую шпилечную РНК (кшРНК), способные опосредовать РНК-интерференцию.

Ингибирование экспрессии и/или активности может быть измерено путем определения присутствия и/или количества транскрипта OTUB1 с применением методов, хорошо известных специалистам в данной области (например, Нозерн-блоттинга, ОТ-ПЦР и т.п.).

Трансгены могут быть использованы для подавления эндогенных генов растений. Это впервые было обнаружено, когда трансгены халконсинтазы в петунии вызывали подавление эндогенных генов халконсинтазы, и это наблюдалось по легко заметным изменениям в пигментации. Впоследствии было описано множество генов, если не все гены растений, которые могут подвергаться "сайленсингу" под действием трансгенов. Для сайленсинга генов требуется сходство последовательностей между трансгеном и геном, который становится "молчащим". Такая гомология последовательностей может относиться к промоторным областям или к кодирующим областям молчащего гена-мишени. Если присутствуют кодирующие области, то трансген, способный вызывать сайленсинг гена, может быть сконструирован вместе с промотором, который инициировал бы транскрипцию кодирующей последовательности РНК в смысловой или антисмысловой ориентации. Вполне вероятно, что различные типы сайленсинга генов осуществляются по различным механизмам, которые пока еще недостаточно хорошо изучены. В качестве различных примеров могут служить транскрипционный или пост-транскрипционный сайленсинг гена, и оба они могут быть использованы в соответствии со способами согласно изобретению.

Механизмы сайленсинга генов и их применение в генной инженерии, которые впервые были обнаружены в растениях в начале 1990-х годов, а затем продемонстрированы в *Caenorhabditis elegans*, подробно описаны в литературе.

РНК-опосредованная супрессия гена или сайленсинг РНК в соответствии со способами согласно изобретению включают совместную супрессию, где сверхэкспрессия смысловой РНК или мРНК-мишени, т.е. смысловой РНК или мРНК OTUB1, приводит к снижению уровня экспрессии рассматриваемых генов. РНК трансгена и гомологичного эндогенного гена подавляются совместно. Другие методы, применяемые в способах согласно изобретению, включают использование антисмысловой РНК для снижения уровней транскриптов эндогенного гена-мишени в растении. В этом способе, сайленсинг РНК не влияет на транскрипцию локуса гена, а вызывает лишь последовательность-специфическую деградацию мРНК-мишени. "Антисмысловая" последовательность нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную "смысловой" последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или часть белка OTUB1, т.е. комплементарную кодирующей цепи двухцепочечной молекулы кДНК или комплементарную последовательности мРНК транскрипта. Антисмысловая последовательность нуклеиновой кислоты, предпочтительно комплементарна эндогенному гену OTUB1, под-

вергаемому сайленсингу. Комплементарность может присутствовать в "кодирующей области" и/или в "некодирующей области" гена. Термин "кодирующая область" означает область нуклеотидной последовательности, содержащей кодоны, которые транслируются в аминокислотные остатки. Термин "некодирующая область" означает 5'- и 3'-последовательности, которые фланкируют кодирующую область и транскрибируются, но не транслируются в аминокислоты (называемые также 5'- и 3'- нетранслируемыми областями).

Антисмысловые последовательности нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы в соответствии с правилами спаривания оснований Уотсона и Крика. Антисмысловая последовательность нуклеиновой кислоты может быть комплементарна полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1, определенной в настоящем описании, но она также может представлять собой олигонуклеотид, который является антисмысловым только для части последовательности нуклеиновой кислоты (включая 5'- и 3'-UTR мРНК). Так, например, антисмысловая олигонуклеотидная последовательность может быть комплементарна области, окружающей сайт инициации трансляции транскрипта мРНК, кодирующего полипептид. Длина подходящей антисмысловой олигонуклеотидной последовательности известна специалистам и может иметь длину приблизительно, начиная с 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10 нуклеотидов или менее. Антисмысловая последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению может быть сконструирована посредством химического синтеза и реакций ферментативного лигирования с применением известных методов. Так, например, антисмысловая последовательность нуклеиновой кислоты (например, антисмысловая олигонуклеотидная последовательность) может быть химически синтезирована с использованием природных нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, предназначенных для повышения биологической стабильности молекул или повышения физической стабильности дуплекса, образованного между антисмысловыми и смысловыми последовательностями нуклеиновой кислоты, например, могут быть использованы производные фосфоритоата и нуклеотиды, замещенные акридином. Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть использованы для получения антисмысловых последовательностей нуклеиновой кислоты, хорошо известны специалистам в данной области. Антисмысловая последовательность нуклеиновой кислоты может быть продуцирована биологическим методом с использованием экспрессионного вектора, в котором последовательность нуклеиновой кислоты была субклонирована в антисмысловой ориентации (т.е. РНК, транскрибированная из встроенной нуклеиновой кислоты, будет находиться в антисмысловой ориентации по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте-мишени). Предпочтительно получение антисмысловых последовательностей нуклеиновой кислоты в растениях осуществляют с использованием стабильно интегрированной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей промотор, функционально присоединенный антисмысловой олигонуклеотид и терминатор.

Молекулы нуклеиновой кислоты, используемые для сайленсинга в способах согласно изобретению, гибридизуются или связываются с транскриптами мРНК и/или встраиваются в геномную ДНК, кодирующую полипептид, что приводит к ингибированию экспрессии белка, например, посредством ингибирования транскрипции и/или трансляции. Гибридизация может быть осуществлена благодаря стандартной комплементарности нуклеотидов с образованием стабильного дуплекса, или, например, в случае антисмысловой последовательности нуклеиновой кислоты, которая связывается с дуплексами ДНК, посредством специфических взаимодействий в главной бороздке двойной спирали. Антисмысловые последовательности нуклеиновой кислоты могут быть введены в растение путем трансформации или прямого впрыска в определенный участок ткани. Альтернативно антисмысловые последовательности нуклеиновой кислоты могут быть модифицированы для выбранных клеток-мишеней, а затем введены системно. Так, например, для системного введения, антисмысловые последовательности нуклеиновой кислоты могут быть модифицированы так, чтобы они специфически связывались с рецепторами или антигенами, экспрессируемыми на поверхности отобранной клетки, например, посредством связывания антисмысловой последовательности нуклеиновой кислоты с пептидами или антителами, которые связываются с рецепторами или антигенами клеточной поверхности. Антисмысловые последовательности нуклеиновых кислот также могут быть доставлены в клетки с использованием векторов.

РНК-интерференция (РНКи) является еще одним пост-транскрипционным феноменом сайленсинга гена, который может быть применен в соответствии со способами согласно изобретению. Такая интерференция индуцируется двухцепочечной РНК, в которой мРНК, гомологичная диРНК, подвергается специфической деградации. Это относится к процессу последовательность-специфического пост-транскрипционного сайленсинга гена, опосредованного короткими интерферирующими РНК (киРНК). Процесс РНКи начинается в том случае, когда фермент DICER взаимодействует с диРНК и разрезает ее на фрагменты, называемые короткими интерферирующими РНК (киРНК). Этот фермент принадлежит к семейству нуклеаз РНКазы III. Комплекс белков, объединяющий эти РНК, сохраняется и служит в качестве кода, осуществляющего поиск и разрушение любых РНК в клетке с соответствующей последовательностью, такой как мРНК-мишень.

Искусственные и/или природные микроРНК (миРНК) могут быть использованы для нокаута экспрессии гена и/или трансляции мРНК. МикроРНК (миРНК) обычно представляет собой одноцепочечные короткие РНК, длина которых, как правило, составляет 19-24 нуклеотидов. Большинство микроРНК рас-

тений имеет идеальную или почти идеальную комплементарность с их последовательностями-мишенями. Тем не менее, существуют природные мишени, имеющие до пяти ошибочных спариваний. Они процессируются из более длинных некодирующих РНК с характерными структурами обратной укладки посредством двухцепочечных специфических РНКаз семейства Dicer. После процессинга они встраиваются в комплекс РНК-индуцированного сайленсинга (RISC) посредством связывания с его главным компонентом, белком Argonaute. миРНК служат в качестве компонентов специфичности RISC, поскольку они образуют пары оснований с нуклеиновыми кислотами-мишенями, главным образом, мРНК в цитоплазме. Последующие события регуляции включают расщепление и разрушение мРНК-мишени и/или ингибирование трансляции. Таким образом, эффекты сверхэкспрессии миРНК часто наблюдаются при снижении уровней мРНК генов-мишеней. Технология искусственных микроРНК (имиРНК) была применена для растения *Arabidopsis thaliana* и других растений для эффективного сайленсинга представляющих интерес генов-мишеней. Принципы конструирования имиРНК были обобщены и включены в пакет программ, имеющийся на Web-сайте (<http://wmd.weigelworld.org>).

Таким образом, в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, растение может быть трансформировано для введения молекул РНКи, кшРНК, мяРНК, дцРНК, киРНК, миРНК, та-киРНК, имиРНК или молекулы для совместной супрессии, которые были сконструированы для целевой экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1 и селективного снижения или ингибирования экспрессии гена или стабильности его транскрипта. Предпочтительно РНКи, мяРНК, дцРНК, кшРНК, киРНК, миРНК, имиРНК, та-киРНК или молекула для совместной супрессии, используемые в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, включают фрагмент по меньшей мере из 17 нуклеотидов, а предпочтительно 22-26 нуклеотидов и могут быть получены на основе информации, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-12. Методы конструирования эффективных киРНК известны специалистам в данной области. Вкратце, короткий фрагмент последовательности гена-мишени (например, длиной в 19-40 нуклеотидов) был выбран в качестве последовательности-мишени киРНК согласно изобретению. Коротким фрагментом последовательности гена-мишени является фрагмент мРНК гена-мишени. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, критериями отбора фрагмента последовательности из мРНК гена-мишени в качестве кандидата на молекулу киРНК являются: 1) последовательность мРНК гена-мишени, которая имеет по меньшей мере 50-100 нуклеотидов от 5'- или 3'-конца нативной молекулы мРНК, 2) последовательность мРНК гена-мишени, которая имеет содержание G/C в пределах от 30 до 70%, а наиболее предпочтительно приблизительно 50%, 3) последовательность мРНК гена-мишени, которая не содержит повторяющихся последовательностей (например, AAA, CCC, GGG, TTT, AAAA, CCCC, GGGG, TTTT), 4) последовательность мРНК гена-мишени, которая является доступной в мРНК, 5) последовательность мРНК гена-мишени, которая является уникальной для гена-мишени, 6) исключение областей в пределах 75 оснований старт-кодона. Фрагмент последовательности мРНК гена-мишени может удовлетворять одному или более критериям, указанным выше. Отобранный ген вводят как нуклеотидную последовательность в программу предсказания с учетом всех вышеуказанных переменных, используемых для конструирования оптимальных олигонуклеотидов. Эта программа сканирует любую нуклеотидную последовательность мРНК для областей, восприимчивых к таргетингу под действием киРНК. Результатом этого анализа является оценка возможных олигонуклеотидов киРНК. Самые высокие оценки используют для конструирования двухцепочечных РНК-олигонуклеотидов, которые обычно получают путем химического синтеза. Для нацеливания на гомологичные области, помимо киРНК, которая является комплементарной области-мишени мРНК, могут быть использованы вырожденные последовательности киРНК. киРНК согласно изобретению могут быть синтезированы любым известным методом. РНК, предпочтительно химически синтезируют с использованием соответствующим образом защищенных рибонуклеозид-фосфорамидитов и стандартного синтезатора ДНК/РНК. Кроме того, киРНК могут быть получены от коммерческих поставщиков, занимающихся синтезом РНК-олигонуклеотидов.

Молекулы киРНК в соответствии с аспектами настоящего изобретения могут быть двухцепочечными. В одном варианте осуществления изобретения молекулы двухцепочечной киРНК содержат тупые концы. В другом варианте осуществления изобретения молекулы двухцепочечной киРНК содержат выступающие нуклеотиды (например, 1-5 нуклеотидных выступающих концов, а предпочтительно 2 нуклеотидных выступающих конца). В некоторых вариантах осуществления изобретения киРНК представляет собой короткую шпилечную РНК (кшРНК); и две цепи молекулы киРНК могут быть соединены посредством линкерной области (например, нуклеотидного линкера или ненуклеотидного линкера). киРНК согласно изобретению могут содержать один или более модифицированных нуклеотидов и/или нефосфодиэфирных связей. Химические модификации, хорошо известные специалистам, могут повышать стабильность, доступность и/или поглощение киРНК клеткой. Специалисту в данной области могут быть известны и другие типы химической модификации, которая может быть включена в молекулы РНК.

В одном варианте осуществления изобретения могут быть использованы рекомбинантные конструкции ДНК, описанные в патенте США 6635805, который вводится в настоящее изобретение посредством ссылки.

Молекулу РНК для сайленсинга вводят в растение стандартными методами, например, посредством

трансформации, опосредуемой вектором и *Agrobacterium*. Затем получают стабильно трансформированные растения и анализируют экспрессию гена OTUB1 по сравнению с экспрессией в контрольном растении дикого типа.

Сайленсинг последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1 или снижение уровней ее экспрессии могут быть также достигнуты посредством сайленсинга гена, индуцированного вирусом.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения растение экспрессирует конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую молекулы РНКи, кшРНК, мяРНК, дцРНК, киРНК, миРНК, транса-активирующей (ta) киРНК, имиРНК или молекулу косупрессии, которые нацелены на последовательность нуклеиновой кислоты OTUB1, как описано в настоящей заявке, и которые снижают уровень экспрессии эндогенной последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1. Ген является мишенью, если, например, молекулы РНКи, кшРНК, мяРНК, дцРНК, киРНК, миРНК, ta-киРНК, имиРНК или молекула косупрессии селективно снижает или ингибирует экспрессию гена по сравнению с экспрессией у контрольного растения. Альтернативно молекулы РНКи, кшРНК, мяРНК, дцРНК, киРНК, миРНК, ta-киРНК, имиРНК или молекула косупрессии нацелены на последовательность нуклеиновой кислоты OTUB1, если молекулы РНКи, кшРНК, мяРНК, дцРНК, киРНК, миРНК, ta-киРНК, имиРНК или молекула косупрессии гибридизуются в жестких условиях с геномным транскриптом. В одном из примеров растение экспрессирует конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую РНКи, где последовательность РНКи содержит, или состоит из нее, SEQ ID NO: 210 или ее функциональный вариант, определенные в настоящей заявке. Настоящее изобретение также относится к применению этой конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей РНКи, где последовательность РНКи содержит, или состоит из нее, SEQ ID NO: 210 или ее функциональный вариант, для снижения или отмены (а предпочтительно снижения) экспрессии OTUB1 и, следовательно, повышения урожая зерна, как описано выше.

Другим способом осуществления сайленсинга гена является нацеливание на последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарные регуляторной области гена (например, промотору и/или энхансеру) OTUB1 с образованием тройных спиральных структур, которые препятствуют транскрипции гена в клетках-мишенях. Могут быть применены и другие методы, такие как использование антител, направленных против эндогенного полипептида, для ингибирования его функции *in planta* или интерференция пути передачи сигнала, в котором участвует полипептид, и эти методы должны быть хорошо известны специалисту в данной области. В частности, можно предположить, что искусственные молекулы могут быть использованы для ингибирования биологической функции полипептида-мишени или для интерференции пути передачи сигнала, в котором участвует полипептид-мишень.

В одном варианте осуществления изобретения нуклеиновые кислоты-супрессоры могут представлять собой антисмысловые супрессоры экспрессии полипептидов OTUB1. При использовании антисмысловых последовательностей для ингибирования экспрессии генов, нуклеотидную последовательность помещают под контроль промотора в "обратной ориентации" так, чтобы в результате транскрипции образовывалась РНК, комплементарная нормальной мРНК, транскрибируемой из "смысловой" цепи гена-мишени.

Антисмысловая нуклеиновая кислота-супрессор может содержать антисмысловую последовательность по меньшей мере из 10 нуклеотидов, происходящих от нуклеотидной последовательности-мишени. Может оказаться предпочтительным, чтобы наблюдалась полная идентичность последовательности, используемой для ингибирования экспрессии последовательности-мишени, и самой последовательности-мишени, хотя общая комплементарность или сходство последовательностей не являются существенными. Один или более нуклеотидов могут отличаться в используемой последовательности, происходящей от гена-мишени. Таким образом, последовательность, используемая для ингибирования экспрессии гена в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой последовательность дикого типа (например, ген), выбранную из уже имеющихся последовательностей или варианта такой последовательности.

Последовательность необязательно включает открытую рамку считывания или необязательно является специфичной к РНК, которая может быть транслируемой. Может оказаться предпочтительным, чтобы гомология соответствующих антисмысловой и смысловой молекул РНК была достаточной для гибридизации. Ингибирование экспрессии генов может наблюдаться даже при наличии приблизительно 5, 10, 15 или 20% или более несоответствий между используемой последовательностью и геном-мишенью. Для достижения нужного эффекта, гомология должна быть достаточной для ингибирования экспрессии гена.

Нуклеиновые кислоты-супрессоры могут быть функционально присоединены к тканеспецифическим или индуцибельным промоторам. Так, например, промоторы, специфичные к покровному слою и семенам, могут быть использованы для специфического ингибирования нуклеиновой кислоты OTUB1 в развивающихся семяпочках и семенах в целях увеличения конечного размера семян.

Нуклеиновая кислота, которая подавляет экспрессию полипептида OTUB1, как описано в настоящей заявке, может быть функционально присоединена к гетерологичной регуляторной последовательности, такой как промотор, например, конститутивный промотор, индуцибельный промотор, тканеспецифический промотор или промотор, специфичный к стадии развития. Конструкция или вектор могут быть введены в клетки растения и экспрессированы, как описано в настоящей заявке. Клетки растения, содер-

жащие такие векторы, также входят в объем настоящего изобретения.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к конструкции для сайленсинга, получаемой или полученной описанным здесь способом, и к клетке растения, содержащей такую конструкцию.

Таким образом, аспекты настоящего изобретения включают способы нацеленного мутагенеза, а в частности, редактирования генома, а в предпочтительном варианте осуществления изобретения исключены варианты, основанные только на выращивании растений традиционными методами селекции.

В еще одном варианте осуществления изобретения способ может включать снижение и/или отмену активности OTUB1. В одном из примеров этот способ может включать снижение способности OTUB1 взаимодействовать с UBC13 посредством снижения и/или отмены его ингибирования как описано в настоящей заявке и/или снижение способности OTUB1 к деубиквитинизации SPL14, что приводит к аккумуляции SPL14.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к растению, полученному или получаемому описанным здесь способом.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу повышения уровня пролиферации клеток в оболочке колоска растения, предпочтительно по длине зерна и/или снижения числа клеток по ширине зерна, что будет приводить к уменьшению длины клеток и к увеличению ширины клеток, где указанный способ включает снижение или отмену экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид OTUB1 и/или снижение активности полипептида OTUB1 в указанном растении с применением любых описанных здесь способов. Используемые здесь термины "увеличение", "улучшение" или "повышение" являются синонимами. В одном варианте осуществления изобретения пролиферация клеток увеличивается по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 или 50% по сравнению с контрольным растением.

Генетически измененные или модифицированные растения и способы получения таких растений.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к генетически измененному растению, его части или клетке, отличающимся тем, что растение не экспрессирует OTUB1, имеет пониженные уровни экспрессии OTUB1, не экспрессирует функциональный белок OTUB1 или экспрессирует белок OTUB1 с пониженной функцией и/или активностью. Так, например, растением является мутант с пониженной функцией (нокдаун) или потерей функции (нокаут), где функция последовательности нуклеиновой кислоты OTUB1 является пониженной по сравнению с контрольным растением дикого типа или отсутствует. Предпочтительно растение было подвергнуто нокдауну, но не нокауту, и это означает, что растение имеет пониженные уровни экспрессии OTUB1 или экспрессирует белок OTUB1 с пониженной функцией и/или активностью. С этой целью мутацию вводят в последовательность гена OTUB1 или в соответствующую промоторную последовательность, что приводит к нарушению транскрипции гена. Следовательно, предпочтительно чтобы указанное растение содержало по меньшей мере одну мутацию в промоторе и/или в гене OTUB1. В одном варианте осуществления изобретения растение может содержать мутацию в промоторе и в гене OTUB1.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к растению, его части или клетке, характеризующимся повышенным урожаем семян по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением, где предпочтительно растение содержит по меньшей мере одну мутацию в гене и/или в промоторе OTUB1. Предпочтительно указанное повышение урожая семян включает увеличение числа зерен, числа зерен на метелку, массы зерна, ширины зерна, толщины зерна, массы тысячи зерен и/или снижение длины зерна.

Растение может быть получено путем введения мутации, предпочтительно делеции, инсерции или замены в последовательность гена и/или промотора OTUB1 любыми из вышеописанных способов. Предпочтительно указанную мутацию вводят по меньшей мере в одну клетку растения, и растение регенерируют по меньшей мере из одной мутированной клетки растения.

Альтернативно растение или клетка растения могут содержать конструкцию нуклеиновой кислоты, экспрессирующую молекулу РНКи, нацеленную на описанный здесь ген OTUB1. В одном примере, последовательность РНКи содержит, или состоит из нее, SEQ ID NO: 210 или ее вариант, определенные в настоящей заявке. В одном варианте осуществления изобретения указанная конструкция стабильно включена в геном растения. Эти методы также включают таргетинг гена с использованием векторов, нацеленных на представляющий интерес ген и позволяющих интегрировать трансген в специфический сайт. Конструкцию для нацеливания конструируют так, чтобы она осуществляла рекомбинацию с геном-мишенью, что достигается путем включения последовательностей самого гена в конструкцию. Рекомбинация затем происходит в области этой последовательности в гене, что приводит к инсерции чужеродной последовательности и к дизрупции гена. В случае прерывания последовательности, измененный ген будет транслироваться в нефункциональный белок, если он вообще будет транслироваться.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу получения описанного здесь генетически модифицированного растения. В одном варианте осуществления изобретения способ включает введение по меньшей мере одной мутации в ген OTUB1 и/или в промотор OTUB1, предпочтительно по меньшей мере в одну клетку растения с применением любого описанного здесь метода мутагенеза.

Предпочтительно указанный способ дополнительно включает регенерацию растения из мутированной клетки растения.

Способ может дополнительно включать отбор одного или более мутированных растений предпочтительно для дальнейшего размножения. Предпочтительно указанные отобранные растения содержат по меньшей мере одну мутацию в последовательности гена и/или промотора OTUB1. Предпочтительно указанные растения характеризуются отсутствием или пониженным уровнем экспрессии OTUB1 и/или пониженным уровнем активности полипептида OTUB1. Уровни экспрессии и/или активности OTUB1 могут быть определены любым стандартным методом, известным специалистам в данной области. В одном варианте осуществления изобретения может быть определен уровень деубиквитиновой активности OTUB1. Снижение является таким, как оно описано в настоящей заявке.

Выбранные растения могут быть размножены различными способами, например, посредством клонального размножения или классическими методами селекции. Так, например, первое поколение (или T1) трансформированного растения может самоопыляться, а отобранные гомозиготные трансформанты второго поколения (или T2), и растения T2 могут быть затем дополнительно размножены классическими методами селекции. Полученные трансформированные растения могут принимать различные формы. Так, например, они могут представлять собой химеры трансформированных клеток и нетрансформированных клеток; клональные трансформанты (например, все клетки, трансформированные так, чтобы они содержали экспрессионный кластер); трансплантаты трансформированных и нетрансформированных тканей (например, в растениях, трансформированный корневой побег прививают к нетрансформированному черенку).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к растению, полученному или получаемому вышеописанными способами.

В соответствии с настоящим изобретением, "генетически измененное растение" или "мутантное растение" представляет собой растение, которое было генетически модифицировано по сравнению с природным растением дикого типа (WT). В одном варианте осуществления изобретения мутантное растение представляет собой растение, которое было модифицировано по сравнению с природным растением дикого типа (WT) с применением метода мутагенеза, такого как любой из описанных здесь методов мутагенеза. В одном варианте осуществления изобретения методом мутагенеза является нацеленная модификация генома или редактирование генома. В одном варианте осуществления изобретения геном растения был модифицирован по сравнению с последовательностями дикого типа методом мутагенеза. Такие растения имеют описанный выше модифицированный фенотип, такой, как увеличение урожая семян. Таким образом, в этом примере повышенный урожай семян обусловлен наличием модифицированного генома растений, например, мутированной эндогенной последовательности гена OTUB1 или промотора OTUB1. В одном варианте осуществления изобретения осуществляют специфический таргетинг эндогенной последовательности промотора или гена посредством нацеленной модификации генома, и присутствие мутированной последовательности гена или промотора не зависит от присутствия трансгенов, экспрессируемых в растении. Другими словами, генетически модифицированное растение может быть описано как растение, не содержащее трансгена.

Растение согласно различным аспектам согласно изобретению, включая описанные здесь трансгенные растения, способы и применения, может представлять собой однодольное или двудольное растение. Предпочтительным растением является сельскохозяйственная культура. Термин "сельскохозяйственная культура" означает любое растение, которое выращивается в промышленных масштабах для потребления или использования человеком или животными. В предпочтительном варианте осуществления изобретения растением является зерновая культура. В другом варианте осуществления изобретения растением является *Arabidopsis*.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения растение выбрано из риса, пшеницы, кукурузы, ячменя, капусты, такой как капуста китайская, сои и сорго. В одном примере пшеницей является дикая пшеница полба. В другом примере растением является рис, а предпочтительно сорта *jaronica* или *indica*. В другом варианте осуществления изобретения растение содержит мутантный аллель *der-1* или его функциональный вариант или гомолог. Предпочтительно растение содержит или экспрессирует (эндогенно) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую, или состоящую из них, SEQ ID NO: 156 или 158, которые кодируют полипептид, определенный в SEQ ID NO: 157 или 159.

Используемый здесь термин "растение" охватывает целые растения, их предки и потомство и части растений, включая семена, плоды, побеги, стебли, листья, корни (включая клубни), цветки, ткани и органы, где каждая из вышеупомянутых частей включает описанную здесь конструкцию нуклеиновой кислоты. Термин "растение" также охватывает клетки растений, суспензионные культуры, ткань каллуса, эмбрионы, меристемы, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры, и в этом случае каждая из вышеупомянутых частей включает описанную здесь конструкцию нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение также относится к заготавливаемым частям растения согласно изобретению, описанным в настоящей заявке, включая, но не ограничиваясь ими, семена, листья, плоды, цветки, стебли, корни, корневища, клубни и луковичи. Аспекты настоящего изобретения также относятся к продуктам, полученным, а предпочтительно непосредственно полученным, из заготавливаемой части такого

растения, например, таким как сухие гранулы или порошки, масла, жиры и жирные кислоты, крахмал или белки. Другим продуктом, который может быть получен из заготавливаемых частей растения согласно изобретению, является биодизельное топливо. Настоящее изобретение также относится к пищевым продуктам и к пищевым добавкам, содержащим растение согласно изобретению или его части. В одном варианте осуществления изобретения пищевыми продуктами может быть корм для животных. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к продукту, полученному из описанного здесь растения или его части.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения часть растения или заготавливаемый продукт представляет собой семена или зерно. Следовательно, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к семенам, полученным из описанного здесь генетически модифицированного растения. В альтернативном варианте осуществления изобретения частью растения является пыльца, сеянец или потомство описанного здесь генетически модифицированного растения. Соответственно, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к пыльце, сеянцу или потомству описанного здесь генетически модифицированного растения.

Контрольным растением, используемым здесь в соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения, является растение, которое не было модифицировано способами согласно изобретению. В соответствии с этим, в одном варианте осуществления изобретения контрольное растение не имеет пониженную экспрессию нуклеиновой кислоты OTUB1 и/или пониженную активность полипептида OTUB1. В альтернативном варианте осуществления изобретения растение было генетически модифицировано как описано выше. В одном варианте осуществления изобретения контрольным растением является растение дикого типа. Контрольным растением обычно является растение того же вида, а предпочтительно растение, имеющее такой же генетический фон, как и модифицированное растение.

Конструкции для редактирования генома в целях их применения в описанных здесь способах целевой модификации генома.

"сг-РНК" или РНК CRISPR означают последовательность РНК, которая содержит протоспейсерный элемент и дополнительные нуклеотиды, комплементарные tracr-РНК.

"tracr-РНК" (транскрибирующая РНК) означает последовательность РНК, которая гибридизуется с сг-РНК и связывается с ферментом CRISPR, таким как Cas9, и тем самым активирует нуклеазный комплекс для введения двухцепочечных разрывов в специфические сайты в геномной последовательности по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты или промотора OTUB1.

"Протоспейсерный элемент" означает часть сг-РНК (или оцрРНК), комплементарную геномной последовательности ДНК-мишени, длина которой обычно составляет приблизительно 20 нуклеотидов. Этот элемент также может быть известен как спейсер или нацеливающая последовательность.

"оцрРНК" (одноцепочечная руководящая РНК) означает комбинацию tracr-РНК и сг-РНК в одной молекуле РНК, предпочтительно также включающую линкерную петлю (которая связывает tracr-РНК и сг-РНК в одну молекулу). "оцрРНК" также может называться "рРНК", и в данном контексте, эти термины являются синонимами. оцрРНК или рРНК обеспечивают специфичность нацеливания и обладают способностью образовывать каркас с нуклеазой Cas и связываться с ней. рРНК может означать двойную молекулу РНК, содержащую молекулу сг-РНК и молекулу tracr-РНК.

"Эффектор TAL" (эффектор, подобный активатору транскрипции (TAL)) или TALE означают последовательность белка, которая может связываться с геномной последовательностью ДНК-мишени (последовательностью в последовательности гена или промотора OTUB1), и которая может быть присоединена к расщепляющему домену эндонуклеазы, такой как FokI с образованием нуклеаз эффектора TAL или TALEN или мегануклеазы для создания megaTAL. Белок TALE состоит из центрального домена, который ответственен за связывание с ДНК; сигнала локализации в ядре и домена, который активирует транскрипцию гена-мишени. ДНК-связывающий домен состоит из мономеров, и каждый мономер может связываться с одним нуклеотидом в нуклеотидной последовательности-мишени. Мономеры представляют собой тандемные повторы из 33-35 аминокислот, из которых две аминокислоты, присутствующие в положениях 12 и 13, являются в высокой степени вариабельными (два повторяющихся вариабельных остатка, RVD). Именно эти RVD ответственны за распознавание одного специфического нуклеотида. HD нацелен на цитозин; NI нацелен на аденин; NG нацелен на тимин, а NN нацелен на гуанин (хотя NN может также связываться с аденином с более низкой специфичностью).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, где конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере один ДНК-связывающий домен. В одном варианте ДНК-связывающий домен может связываться с последовательностью в гене и/или промоторе OTUB1. Предпочтительно указанная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146. В этом примере, SEQ ID NO: 28 (рис), 34 (рис), 38 (рис), 102 (пшеница), 106 (пшеница), 110 (ячмень), 114 (ячмень), 118 (кукуруза), 122 (кукуруза), 126 (сорго), 130 (сорго), 134 (соя), 138 (соя), 142 (капуста) и 146 (капуста) представляют собой последовательности-мишени в гене OTUB1, а SEQ ID NO: 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96 и 99 представляют собой последовательности-мишени в промоторе OTUB1, а

предпочтительно в промоторе риса. В одном варианте конструкция нуклеиновой кислоты содержит один или более ДНК-связывающих доменов, а поэтому, такая конструкция может связываться с одним или более, а предпочтительно по меньшей мере с двумя или с тремя последовательностями в гене OTUB1, где указанные последовательности выбраны из:

- (i) SEQ ID NO: 28 (рис), 34 (рис) и 38 (рис);
- (ii) SEQ ID NO: 102 (пшеница) и 106 (пшеница);
- (iii) SEQ ID NO: 110 (ячмень) и 114 (ячмень);
- (iv) SEQ ID NO: 118 (кукуруза) и 122 (кукуруза);
- (v) SEQ ID NO: 126 (сорго) и 130 (сорго);
- (vi) SEQ ID NO: 134 (соя) и 138 (соя); или
- (vii) SEQ ID NO: 142 (капуста) и 146 (капуста).

В альтернативном или дополнительном варианте конструкция нуклеиновой кислоты содержит один или более ДНК-связывающих доменов, где один или более ДНК-связывающих доменов могут связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96 и 99.

В другом варианте осуществления изобретения указанная конструкция также содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую SSN, такой как белок FokI или Cas.

В одном варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере один протоспейсерный элемент, где последовательность протоспейсерного элемента выбрана из SEQ ID NO: 29, 35, 39, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143 и 147 или ее варианта. В одном примере конструкция нуклеиновой кислоты может содержать одну, две или три протоспейсерных последовательности, где последовательность протоспейсеров выбрана из:

- (i) SEQ ID NO: 29 (рис), 35 (рис) и 39 (рис);
- (ii) SEQ ID NO: 103 (пшеница) и 107 (пшеница);
- (iii) SEQ ID NO: 111 (ячмень) и 115 (ячмень);
- (iv) SEQ ID NO: 119 (кукуруза) и 123 (кукуруза);
- (v) SEQ ID NO: 125 (сорго) и 131 (сорго);
- (vi) SEQ ID NO: 135 (соя) и 139 (соя); или
- (vii) SEQ ID NO: 143 (капуста) и 147 (капуста).

В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит sg-РНК-кодирующую последовательность. Как определено выше, последовательность sg-РНК может содержать протоспейсерные элементы, определенные выше, а предпочтительно дополнительные нуклеотиды, комплементарные tracr-РНК. Соответствующая последовательность дополнительных нуклеотидов будет известна специалистам, поскольку эти последовательности определяются выбором белка Cas.

В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты также содержит последовательность tracr-РНК. И в этом случае соответствующая последовательность tracr-РНК будет известна специалистам, поскольку эта последовательность определяется выбором белка Cas. Тем не менее, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная последовательность содержит, или состоит из нее, последовательность, определенную в SEQ ID NO: 30, или ее вариант.

В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует оцрРНК (или рРНК). И в этом случае, как уже обсуждалось, оцрРНК обычно содержит последовательность sg-РНК или протоспейсерную последовательность и последовательность tracr-РНК, а предпочтительно последовательность линкерной петли. В предпочтительном варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность оцрРНК, определенную в любой из SEQ ID NO: 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148 или ее варианта.

В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит, или состоит из нее, последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 33, 37, 41, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145 и 149.

В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты может также содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сайт расщепления эндорибонуклеазы. Предпочтительно эндорибонуклеазой является Csy4 (также известный как Cas6f). Если конструкция нуклеиновой кислоты содержит множество последовательностей нуклеиновой кислоты оцрРНК, то конструкция может включать одинаковое число сайтов расщепления эндорибонуклеазы. В другом варианте осуществления изобретения сайт расщепления находится у 5'-конца последовательности нуклеиновой кислоты оцрРНК. Соответственно, каждая последовательность нуклеиновой кислоты оцрРНК фланкирована сайтом расщепления эндорибонуклеазы.

Термин "вариант" означает нуклеотидную последовательность, где нуклеотиды, по существу, идентичны одной из указанных выше последовательностей. Вариант может быть получен путем модифика-

ций, таких как инсерция, замена или делеция одного или более нуклеотидов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вариант по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен любой из вышеуказанных последовательностей. В одном варианте осуществления изобретения идентичность последовательностей составляет по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления изобретения идентичность последовательностей составляет 100%. Идентичность последовательностей может быть определена с помощью любой программы выравнивания последовательностей известной специалистам.

Настоящее изобретение также относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, функционально присоединенную к подходящему промотору растения. Подходящий промотор растения может быть конститутивным или сильным промотором или может быть тканеспецифичным промотором. В одном варианте осуществления изобретения подходящие промоторы растения выбраны, но не ограничиваются ими, из промотора вируса желтой курчавости листьев *Cestrum* (CmYLCV) или промотора убиквитина 1 проса (PvUbbM), РНК-полимеразы III U6 (TaU6) CaMV35S пшеницы, промоторов U6 пшеницы или убиквитина кукурузы (например, Ubi1). Альтернативно экспрессия может быть специфически нацелена на конкретные ткани семян пшеницы посредством последовательностей, регулирующих экспрессию генов. В одном варианте осуществления изобретения промотор выбран из промотора U3 (SEQ ID NO: 163), промотора U6a (SEQ ID NO: 164), промотора U6b (SEQ ID NO: 165), промотора U3b в двудольных растениях (SEQ ID NO: 166) и промотора U6-1 в двудольных растениях (SEQ ID NO: 167).

Конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению может также дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует фермент CRISPR. "Фермент CRISPR" означает ДНК-эндонуклеазу, которая находится под контролем РНК, и которая может ассоциироваться с системой CRISPR. В частности, такой фермент связывается с последовательностью *tracr*-РНК. В одном варианте осуществления изобретения ферментом CRISPR является белок Cas ("CRISPR-ассоциированный белок"), предпочтительно Cas9 или Cpf1, а более предпочтительно Cas9. В конкретном варианте осуществления изобретения Cas9 представляет собой оптимизированный по кодонам Cas9 (оптимизированный для растения, в котором он экспрессируется). В одном примере Cas9 имеет последовательность, описанную в SEQ ID NO: 150, или ее функциональный вариант или гомолог. В другом варианте осуществления изобретения ферментом CRISPR является белок из семейства белков-кандидатов х класса 2, таких как C2c1, C2C2 и/или C2c3. В одном варианте осуществления изобретения белок Cas происходит от *Streptococcus pyogenes*. В альтернативном варианте осуществления изобретения белок Cas может происходить от любого из *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus thermophilus* или *Treponema denticola*.

Используемый здесь термин "функциональный вариант", если он относится к Cas9, означает вариант последовательности гена Cas9 или часть геновой последовательности, которая сохраняет биологическую функцию полноразмерной немодифицированной последовательности, например, действует как ДНК-эндонуклеаза, или распознает ДНК и/или связывается с ДНК. Функциональный вариант также включает вариант представляющего интерес гена, который имеет модификации в последовательности, не влияющие на функцию, например, неконсервативные остатки. Этот термин также охватывает вариант, который, по существу, идентичен последовательностям дикого типа, представленным в настоящей заявке, т.е. он имеет только некоторые модификации в последовательности, например, в неконсервативных остатках, и является биологически активным. В одном варианте осуществления изобретения общая идентичность функционального варианта SEQ ID NO: 150 и аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 150, составляет по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В другом варианте осуществления изобретения белок Cas9 был модифицирован для повышения активности.

Подходящие гомологи или ортологи могут быть идентифицированы путем сравнения последовательностей и идентификации консервативных доменов. Функция гомолога или ортолога может быть идентифицирована как описано в настоящей заявке, и, таким образом, специалист в данной области может подтвердить функцию, если она экспрессируется в растении.

В другом варианте осуществления изобретения белок Cas9 был модифицирован для повышения активности. Так, например, в одном варианте осуществления изобретения белок Cas9 может содержать аминокислотную замену D10A, и эта замена расщепляет только цепь ДНК, которая комплементарна рРНК и распознается ею. В альтернативном варианте осуществления изобретения белок Cas9 может альтернативно или дополнительно содержать аминокислотную замену H840A, и эта замена расщепляет только цепь ДНК, которая не взаимодействует с оцРНК. В этом варианте осуществления изобретения Cas9 может быть использован вместе с парой молекул оцРНК (т.е. с двумя молекулами) (или с конструкцией, экспрессирующей такую пару) и в результате он может расщеплять область-мишень на противоположной стороне ДНК с возможным повышением специфичности в 100-1500 раз. В другом варианте

осуществления изобретения белок Cas9 может содержать замену D1135E. Белок Cas9 может также представлять собой вариант VQR. Альтернативно белок Cas9 может содержать мутацию в обоих нуклеазных доменах, а поэтому, HNH и RuvCOlike являются каталитически неактивными. Вернее, вместо расщепления цепи-мишени, этот каталитически неактивный белок Cas может быть использован для предотвращения процесса элонгации транскрипции, что будет приводить к потере функции не полностью транслируемых белков, если они коэкспрессируются с молекулой оцрПНК. Примером каталитически неактивного белка является инактивированный Cas9 (dCas9), индуцируемый точечной мутацией в нуклеазных доменах RuvC и/или HNH (Komor et al., 2016 and Nishida et al., 2016).

В другом варианте осуществления изобретения белок Cas, такой как Cas9, может быть также присоединен к эффектору репрессии, такому как фермент, модифицирующий гистон/метилирующий ДНК, или цитидин-дезаминаза (Komor et al. 2016), для проведения сайт-направленного мутагенеза. В последнем случае, фермент цитидин-дезаминаза не индуцирует разрывы дцДНК, но опосредует превращение цитидина в уридин, и тем самым, индуцирует замену С на Т (или G на А). Эти методы могут быть особенно подходящими для нацеливания на глутаминовые и пролиновые остатки в глиадинах и для разрушения токсических эпителий с сохранением функциональных свойств глиадина.

В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит эндорибонуклеазу. Предпочтительно эндорибонуклеазой является Csy4 (также известный как Cas6f), а более предпочтительно оптимизированный по кодомам csy4, например, определенный в SEQ ID NO: 168. В одном варианте осуществления изобретения если конструкция нуклеиновой кислоты содержит белок Cas, то конструкция нуклеиновой кислоты может содержать последовательности для экспрессии эндорибонуклеазы, такой как Csy4, экспрессируемая в виде 5'-концевого гибрида Р2А (используемого как саморасщепляющийся пептид) с белком Cas, таким как Cas9, например, как определено в SEQ ID NO: 169.

В одном варианте осуществления изобретения белок Cas, эндорибонуклеаза и/или последовательность гибрида "эндорибонуклеаза-Cas" могут быть функционально присоединены к подходящему промотору растения. Подходящие промоторы растений уже описаны выше, но в одном из вариантов, они могут представлять собой промотор убиквитина 1 кукурузы.

Подходящие методы получения систем нуклеиновых кислот и векторов CRISPR являются известными и, например, описаны в публикации Molecular Plant (Ma et al., 2015, Molecular Plant, DOI:10.1016/j.molp.2015.04.007), которая вводится в настоящее описание посредством 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 гена и/или промотора OTUB1, выбранную из SEQ ID NO: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146. Методы конструирования эффектора TAL хорошо известны специалистам и осуществляются в зависимости от последовательности-мишени. Примеры подходящих методов описаны в публикациях Sanjana et al., and Cermak T et al., которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Предпочтительно указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит две последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие эффектор TAL с образованием пары TALEN. В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты также содержит последовательность-специфическую нуклеазу (SSN). Предпочтительно такая SSN представляет собой эндонуклеазу, такую как FokI. В другом варианте осуществления изобретения TALEN конструируют методом клонирования Golden Gate в одной плазмидной конструкции или в конструкции нуклеиновой кислоты.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к молекуле оцрПНК, где молекула оцрПНК содержит последовательность *sg*-ПНК и последовательность *tracr*-ПНК, и где последовательность *sg*-ПНК может связываться по меньшей мере с одной последовательностью, выбранной из SEQ ID NOs: 28, 34, 38, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 и 146 или ее варианта. В одном варианте последовательность нуклеиновой кислоты молекулы оцрПНК определена в любой из SEQ ID NO: 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148 или ее варианта. Другими словами, последовательность ПНК оцрПНК кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148. Только в одном из примеров последовательность ПНК одной оцрПНК согласно изобретению определена в SEQ ID NO: 32 или в ее варианте. Термин "вариант" определен в настоящей заявке. В одном варианте молекула оцрПНК может содержать по меньшей мере одну химическую модификацию, например, модификацию, которая повышает стабильность и/или аффинность связывания последовательности-мишени или последовательности *sg*-ПНК с последовательностью *tracr*-ПНК. Такие модификации хорошо известны специалистам и включают, например, но не ограничиваются ими, модификации, описанные в публикации Rahdar et al., 2015, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки. В этом примере, *sg*-ПНК может содержать модификацию фосфоритоатного остова, такую как замены 2'-фтора (2'-F), 2'-О-метила (2'-O-Me) и S-стерического этила (сET).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной последовательности нук-

леиновой кислоты, которая кодирует протоспейсерный элемент (определенный в любой из SEQ ID NO: 29, 35, 39, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143 и 147) или оцрРНК (описанную в любой из SEQ ID NO: 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к растению или его части или по меньшей мере к одной выделенной клетке растения, трансфецированной по меньшей мере одной описанной здесь конструкцией нуклеиновой кислоты. Cas9 и оцрРНК могут быть объединены или могут находиться в отдельных экспрессионных векторах (или конструкциях нуклеиновой кислоты, и эти термины являются синонимами). Другими словами, в одном варианте осуществления изобретения выделенную клетку растения трансфицируют одной конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей оцрРНК и Cas9, как подробно описано выше. В альтернативном варианте осуществления изобретения выделенную клетку растения трансфицируют двумя конструкциями нуклеиновой кислоты, т.е. первой конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну оцрРНК, определенную выше, и второй конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей Cas9 или его функциональный вариант или гомолог. Вторая конструкция нуклеиновой кислоты может быть перенесена до, во время или после переноса первой конструкции нуклеиновой кислоты. Преимущество отдельной второй конструкции, содержащей белок cas, заключается в том, что конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая по меньшей мере одну оцрРНК, может спариваться с описанным здесь белком cas любого типа, и, следовательно, этот белок не ограничивается функцией одной Cas (как могло бы быть в случае, когда оба cas и оцрРНК кодируются одной и той же конструкцией нуклеиновой кислоты).

В одном варианте осуществления изобретения конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую белок cas, сначала трансфицируют и стабильно встраивают в геном, а затем осуществляют вторую трансфекцию конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту оцрРНК. В альтернативном варианте осуществления изобретения растение или его часть или по меньшей мере одну выделенную клетку растения трансфицируют мРНК, кодирующей белок cas, и ко-трансфицируют по меньшей мере одной определенной здесь конструкцией нуклеиновой кислоты.

Векторы для экспрессии Cas9, используемые в настоящем изобретении, могут быть сконструированы как описано в литературе. В одном примере экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в SEQ ID NO: 150, или ее функциональный вариант или гомолог, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты функционально присоединена к подходящему промотору. Примерами подходящих промоторов являются промотор актина, CaMV35S, U6 пшеницы или убиквитина кукурузы (например, Ubi1).

В своем альтернативном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной клетке растения, трансфецированной по меньшей мере одной описанной здесь конструкцией нуклеиновой кислоты или молекулой оцрРНК.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированному или отредактированному растению, содержащему описанную здесь трансфецированную клетку. В одном варианте осуществления изобретения конструкция или конструкции нуклеиновой кислоты могут быть интегрированы в стабильной форме. В альтернативном варианте осуществления изобретения конструкция или конструкции нуклеиновой кислоты не являются интегрированными (т.е. они являются транзигентно экспрессированными). В соответствии с этим, в предпочтительном варианте осуществления изобретения генетически модифицированное растение не содержит каких-либо нуклеиновых кислот, кодирующих оцрРНК и/или белок Cas. Другими словами, это растение не содержит трансгена.

Используемые здесь термины "введение", "трансфекция" или "трансформация" охватывают перенос экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяина, независимо от метода такого переноса. Ткань растения, способная к последующему клональному размножению, независимо от того, происходит ли это посредством органогенеза или эмбриогенеза, может быть трансформирована с помощью генетической конструкции согласно изобретению, и из этой ткани регенерируют целое растение. Конкретно выбранная ткань будет варьироваться в зависимости от клональных систем размножения, доступных и наиболее подходящих для трансформации в конкретные виды. Репрезентативными тканями-мишенями являются листовые диски, пыльца, эмбрионы, семядоли, гипокотили, мегагаметофиты, ткань каллуса, присутствующая ткань меристемы (например, апикальная меристема, пазушные почки и корневые меристемы) и индуцированная ткань меристемы (например, меристемы семядолей и гипокотилей). Затем полученная трансформированная клетка растения может быть использована для регенерации трансформированного растения способом, известным специалистам в данной области. Перенос чужеродных генов в геном растения называется трансформацией. Трансформация растений многих видов в настоящее время является рутинной техникой. Любой из нескольких методов трансформации, известных специалистам в данной области, может быть применен для введения конструкции нуклеиновой кислоты или представляющей интерес молекулы оцрРНК в подходящую клетку-предка. Методы, описанные для трансформации и регенерации растений из тканей или клеток растения, могут быть применены для транзигентной или стабильной трансформации.

Методы трансформации включают применение липосом, электропорацию, применение химических веществ, которые повышают поглощение свободной ДНК, инъекцию ДНК непосредственно в растение (микроинъекцию), "выстреливание" генов (или применение биобаллистических систем доставки частиц (биобаллистики)), как описано в примерах, липофекцию, трансформацию с использованием вирусов или пыльцы и микрокультивирование. Способы могут быть выбраны из способов с использованием кальция/полиэтиленгликоля для протопластов; трансфекции генов, опосредуемой ультразвуком; оптической или лазерной трансфекции; трансфекции с использованием волокон карбида кремния; электропорации протопластов; микроинъекции в растительный материал; бомбардировки частицами, покрытыми ДНК или РНК; инфицирования (неинтегрирующего) вирусами и т.п. Трансгенные растения могут быть также получены с помощью трансформации, опосредуемой *Agrobacterium tumefaciens*, включая, но не ограничиваясь ими, метод окунания цветков/метод вакуумной инфльтрации *Agrobacterium*, как описано в публикации Clough & Bent (1998), которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Соответственно, в одном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна конструкция нуклеиновой кислоты или молекула оцРНК, описанная в настоящей заявке, может быть введена по меньшей мере в одну клетку растения любыми вышеописанными методами. В альтернативном варианте осуществления изобретения любая описанная здесь конструкция нуклеиновой кислоты может быть сначала транскрибирована с образованием предварительно собранного рибонуклеопротеина Cas9-оцРНК, а затем доставлена по меньшей мере в одну клетку растения любыми вышеописанными методами, такими как липофекция, электропорация или микроинъекция.

Для отбора трансформированных растений растительный материал, полученный в процессе трансформации, как правило, но необязательно, подвергают отбору в селективных условиях так, чтобы трансформированные растения можно было отличить от нетрансформированных растений. Так, например, семена, полученные вышеописанным способом, могут быть засеяны, и после начального периода роста подвергнуты подходящему отбору путем распыления. Еще одной возможностью является культивирование семян после стерилизации если это необходимо, на агаровых планшетах с использованием подходящего агента для отбора, так, чтобы растения могли вырасти только из трансформированных семян. Как описано в примерах, подходящим маркером может быть ген *bar* резистентности к фосфинотрицину или PPT. Альтернативно трансформированные растения подвергают скринингу на присутствие селективного маркера, такого как, но не ограничивающегося им, GFP, GUS (β -глюкуронидаза). Другие примеры могут быть хорошо известны специалисту в данной области. Альтернативно отбор не проводят, и семена, полученные вышеописанным способом, высевает и культивируют, а затем определяют уровни экспрессии OTUB1 или белка в соответствующий период времени стандартными методами, описанным в литературе. Такой альтернативный способ, позволяющий избежать введения трансгенов, является предпочтительным для получения растений, не содержащих трансгенов.

После переноса ДНК и регенерации предполагаемые трансформированные растения могут быть также оценены, например, с помощью ПЦР для детектирования присутствия представляющего интерес гена, числа копий и/или геномной организации. Альтернативно или дополнительно уровни интеграции и экспрессии вновь введенной ДНК могут быть подвергнуты мониторингу с помощью Саузерн-, Нозерн-и/или Вестерн-блот-анализа, и эти методы хорошо известны специалистам в данной области.

Полученные трансформированные растения могут быть размножены различными способами, например, с помощью клонального размножения или классических методов селекции. Так, например, первое поколение (или T1) трансформированного растения может самоопыляться, а отобранные гомозиготные трансформанты второго поколения (или T2) и растения T2 могут быть затем дополнительно размножены классическими методами селекции.

В другом своем родственном аспекте настоящее изобретение также относится к способу получения генетически модифицированного растения, описанного в настоящей заявке, где указанный способ включает:

- a. отбор части растения;
- b. трансфекцию по меньшей мере одной клетки части растения согласно пункту (a) по меньшей мере одной описанной здесь конструкцией нуклеиновой кислоты, или по меньшей мере одной описанной здесь молекулой оцРНК описанными выше методами трансфекции или трансформации;
- c. регенерацию по меньшей мере одного растения, происходящего от трансфецированной клетки или трансфецированных клеток;
- d. отбор одного или более растений, полученных в соответствии с пунктом (c), в которых наблюдается сайленсинг или пониженный уровень экспрессии OTUB1.

В другом варианте осуществления изобретения способ также включает стадию скрининга генетически модифицированного растения на SSN (предпочтительно CRISPR)-индуцированные мутации в последовательности гена или промотора OTUB1. В одном варианте осуществления изобретения способ включает получение образца ДНК из трансформированного растения и проведение амплификации ДНК для детектирования мутации по меньшей мере в одной последовательности гена или промотора OTUB1.

В другом варианте осуществления изобретения способы включают получение стабильных растений T2, которые являются предпочтительно гомозиготными по мутации (т.е. по мутации по меньшей мере в

одной последовательности гена или промотора OTUB1).

Растения, которые имеют мутацию по меньшей мере в одной последовательности гена или промотора OTUB1, также могут быть скрещены с еще одним растением, также содержащим по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одной последовательности гена и/или промотора OTUB1, с получением растений, имеющих дополнительные мутации в последовательности гена или промотора OTUB1. Комбинации будут очевидны специалистам в данной области. В соответствии с этим, этот способ может быть применен для получения растений T2 с мутациями во всех гомологах или в большинстве гомологов по сравнению с числом мутаций гомологов в одном растении T1, трансформированном как описано выше.

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

Генетически модифицированное растение согласно изобретению может быть также получено путем переноса любых последовательностей согласно изобретению посредством скрещивания, например, с использованием пыльцы описанного здесь генетически модифицированного растения для опыления растения дикого типа или контрольного растения, или для опыления гинцея описанных здесь растений другой пыльцой, которая не содержит мутации по меньшей мере в одной из последовательностей гена или промотора OTUB1. Способы получения растений согласно изобретению не ограничиваются исключительно способами, описанными в этом пункте, так, например, генетическая трансформация зародышевых клеток из колоса пшеницы может быть осуществлена, как уже упоминалось выше, но без последующей регенерации растения.

Способ скрининга растений на природные фенотипы повышенного урожая зерна.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу скрининга популяции растений и идентификации и/или отбора растения, которое будет иметь пониженную экспрессию OTUB1 и/или фенотип повышенного урожая зерна, а предпочтительно увеличения числа зерен, числа зерен на метелку, массы зерна, ширины зерна, толщины зерна, массы тысячи зерен и/или снижения длины зерна (по сравнению с контрольным растением или растением дикого типа), где указанный способ включает детектирование в растении или в зародышевой плазме растения по меньшей мере одного полиморфизма (предпочтительно полиморфизма с низким уровнем экспрессии OTUB1) в промоторе гена OTUB1 или в гене OTUB1. Предпочтительно указанный скрининг включает определение присутствия по меньшей мере одного полиморфизма, где указанным полиморфизмом является по меньшей мере одна инсерция и/или по меньшей мере одна делеция и/или замена.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения указанный полиморфизм может включать по меньшей мере одну из следующих замен:

С на Т в положении 1135 SEQ ID NO: 2 или 5;

Г на С в положении 1462 SEQ ID NO: 2 или 5; и/или

Г на С в положении 1798 SEQ ID NO: 2 или 5.

В другом дополнительном или альтернативном варианте осуществления изобретения указанным полиморфизмом является инсерция одной аминокислоты, а предпочтительно Т в положении 2234 SEQ ID NO: 2 или 5.

В другом дополнительном или альтернативном варианте осуществления изобретения указанным полиморфизмом может быть замена G на A в положении 1824 SEQ ID NO: 155.

В результате, вышеописанные растения будут иметь фенотип повышенного урожая зерна, как описано выше.

Подходящие тесты для оценки наличия полиморфизма хорошо известны специалистам в данной области, и включают, но не ограничиваются ими, изоферментный электрофорез, тест на полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), тест на случайно амплифицированные полиморфные ДНК (RAPD), полимеразная цепная реакция с использованием произвольно выбранных праймеров (AP-ПЦР), амплификация ДНК посредством фингерпринтинга (DAF), тест на амплифицированные области, охарактеризованные с использованием последовательности (SCAR), тест на полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP), тест на простые повторяющиеся последовательности (SSR, которые также называются микросателлитами), и тест на полиморфизм по одному нуклеотиду (SNP). В одном варианте осуществления изобретения используется аллель-специфическое генотипирование с помощью ПЦР на конкурентное связывание (KASP).

В одном варианте осуществления изобретения способ включает:

а) получение образца нуклеиновой кислоты из растения и

б) осуществление амплификации нуклеиновой кислоты одного или более аллелей промотора OTUB1 с использованием одной или более пар праймеров.

В другом варианте осуществления изобретения способ может также включать интрогрессию хромосомной области, содержащей по меньшей мере один из указанных полиморфизмов, экспрессирующих OTUB1 на низком уровне, или хромосомной области, содержащей повторяющуюся последовательность с делецией, как описано выше, во втором растении или в зародышевой плазме растения с получением растения или зародышевой плазмы растения с интрогрессией. Предпочтительно, чтобы экспрессия OTUB1 в

указанном втором растении была снижена или отменена (по сравнению с контрольным растением или растением дикого типа), а более предпочтительно, чтобы указанное второе растение давало больший урожай зерна, а предпочтительно давало увеличение по меньшей мере числа зерен, числа зерен на метелку, массы зерна, ширины зерна, толщины зерна, массы тысячи зерен и/или снижение длины зерна.

В одном варианте осуществления изобретения растение может эндогенно экспрессировать SEQ ID NO: 2 или 4, а уровни нуклеиновой кислоты OTUB1 и/или активности белка OTUB1 были снижены или дополнительно снижены любым описанным здесь способом.

В соответствии с этим, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу повышения урожайности, а предпочтительно урожая семян или зерна у растения, где указанный способ включает:

a. скрининг популяции растений по меньшей мере на одно растение по меньшей мере с одним из вышеописанных полиморфизмов;

b. дальнейшее снижение или отмену экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты OTUB1 и/или снижение активности полипептида OTUB1 в указанном растении путем введения по меньшей мере одной мутации в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую OTUB1, или по меньшей мере одной мутации в описанный здесь промотор OTUB1, как описано в настоящей заявке или с использованием описанной здесь РНК-интерференции.

"Дальнейшее снижение" означает снижение уровня экспрессии OTUB1 до более низкого уровня, чем у растения по меньшей мере с одним из вышеописанных полиморфизмов OTUB1. Термин "снижение" означает снижение уровней экспрессии и/или активности OTUB1 на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с уровнем у контрольного растения.

UBC13.

Авторами настоящего изобретения было также неожиданно обнаружено, что повышение уровня экспрессии белка, связывающегося с убиквитином E2, UBC13, дает фенотип, аналогичный фенотипу, наблюдаемому в растениях, несущих аллель *npt1*, такой как увеличение числа зерен, массы тысячи зерен, диаметра стебля и снижение числа побегов. В соответствии с этим, сверхэкспрессия UBC13 будет также давать повышенный урожай зерна. Следовательно, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу модификации, а предпочтительно повышения уровней по меньшей мере одного фактора транскрипции, подобного белку, связывающемуся с промотором SQUAMOSA (SBP-домена), где указанный способ включает повышение уровня экспрессии или активности описанного здесь UBC13 или снижение или отмену экспрессии или активности описанного здесь OTUB1. В одном варианте осуществления изобретения фактором транскрипции SBP-домена является SPL14.

Термины "увеличение", "улучшение" или "повышение", используются здесь как синонимы. В одном варианте осуществления изобретения длина зерна увеличивается по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 или 50% по сравнению с контрольным растением. Предпочтительно такое увеличение составляет по меньшей мере 5-50%.

Соответственно, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, определенный в SEQ ID NO: 161 или его функциональный вариант или гомолог, где указанная последовательность функционально присоединена к регуляторной последовательности, где предпочтительной указанной регуляторной последовательностью является тканеспецифический или конститутивный промотор. В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в SEQ ID NO: 160 (кДНК) или 162 (геномная) или ее функциональный вариант или гомолог. Функциональный вариант или гомолог являются такими, как они определены выше.

Используемый здесь термин "функционально присоединенный" относится к функциональной связи между последовательностью промотора и представляющим интерес геном, а поэтому, промоторная последовательность способна инициировать транскрипцию представляющего интерес гена.

"Промотор растения" включает регуляторные элементы, которые опосредуют экспрессию кодирующего сегмента последовательности в клетках растений. Соответственно, промотор растения необязательно должен происходить от растения, т.е. он может происходить от вирусов или микроорганизмов, например, от вирусов, которые атакуют клетки растений. "Промотор растения" может также происходить от клетки растения, например, от растения, которое было трансформировано последовательностью нуклеиновой кислоты, экспрессируемой способом согласно изобретению и описанной в настоящей заявке. Это также относится и к другим регуляторным сигналам "растения", таким, как терминаторы "растений". Промоторы, расположенные выше нуклеотидных последовательностей, используемых в способах согласно изобретению, могут быть модифицированы посредством одной или более нуклеотидных замен, инсерций и/или делеций без нарушения функциональности или активности либо промоторов, либо открытой рамки считывания (ОРС), либо 3'-регуляторной области, такой как терминаторы или другие 3'-регуляторные области, расположенные на расстоянии от ОРС. Активность промоторов может быть также повышена посредством модификации их последовательности, либо путем их полной замены на более активные промоторы и даже промоторы, происходящие от гетерологичных организмов. Для экспрессии в

растениях, молекула нуклеиновой кислоты должна быть, как описано выше, функционально присоединена к подходящему промотору или содержать подходящий промотор, который экспрессирует ген в нужный момент времени и с требуемым паттерном пространственной экспрессии. Используемый здесь термин "функционально присоединенный" относится к функциональной связи между последовательностью промотора и представляющим интерес геном, а поэтому промоторная последовательность способна инициировать транскрипцию представляющего интерес гена.

В одном варианте осуществления изобретения промотор представляет собой конститутивный промотор. "Конститутивный промотор" означает промотор, который является транскрипционно активным в большинстве, но не обязательно во всех фазах роста и развития, и в большинстве условий окружающей среды, по меньшей мере в одной клетке, ткани или органе. Примерами конститутивных промоторов являются, но не ограничиваются ими, актин, HMGP, CaMV19S, GOS2, циклофилин риса, гистон H3 кукурузы, гистон H3 люцерны, 34S FMV, малая субъединица Rubisco, OCS, SAD1, SAD2, NOS, V-АТФаза, суперпромотор, белки G-бокса и синтетические промоторы.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему вышеописанную последовательность нуклеиновой кислоты.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты. Клеткой-хозяином может быть бактериальная клетка, такая как *Agrobacterium tumefaciens* или выделенная клетка растения.

Настоящее изобретение также относится к культуральной среде или к набору, содержащему культуральную среду и выделенную клетку-хозяина, описанные ниже.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к трансгенному растению, экспрессирующему описанную выше конструкцию нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления изобретения указанная конструкция нуклеиновой кислоты стабильно включена в геном растения.

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

Полученные трансформированные растения могут быть размножены различными способами, например, посредством клонального размножения или классическими методами селекции. Так, например, первое поколение (или T1) трансформированного растения может самоопыляться, а отобранные гомозиготные трансформанты второго поколения (или T2) и растения T2 могут быть затем дополнительно размножены классическими методами селекции. Полученные трансформированные растения могут принимать различные формы. Так, например, они могут представлять собой химеры трансформированных клеток и нетрансформированных клеток; клональные трансформанты (например, все клетки, трансформированные так, чтобы они содержали экспрессионный кластер); трансплантаты трансформированных и нетрансформированных тканей (например, в растениях, трансформированный корневой побег прививают к нетрансформированному черенку).

Подходящее растение определено выше.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению описанной здесь конструкции нуклеиновой кислоты для повышения урожая зерна, а предпочтительно повышения числа зерен и/или массы тысячи зерен.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу повышения урожая зерна, а предпочтительно повышения числа зерен и/или массы тысячи зерен, где указанный способ включает введение описанной здесь конструкции нуклеиновой кислоты в указанное растение и ее экспрессию в указанном растении.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу получения растения с повышенным урожаем зерна, а предпочтительно повышенным числом зерен и/или повышенной массой тысячи зерен, где указанный способ включает введение описанной здесь конструкции нуклеиновой кислоты в указанное растение и ее экспрессию в указанном растении.

Указанное повышение рассматривается по сравнению с контрольным растением или растением дикого типа.

Хотя представленное выше раскрытие изобретения представляет собой общее описание предмета изобретения, входящее в объем настоящего изобретения, включая методы, а также наилучший способ его осуществления, разработки и применения этого изобретения, однако, нижеследующие примеры приводятся для лучшего понимания способа осуществления изобретения и для более полного его описания. Тем не менее, специалисту в данной области будет очевидно, что конкретные детали, представленные в этих примерах, не должны рассматриваться, как ограничение изобретения, объем которого должен быть сформулирован в формуле изобретения и в эквивалентах, прилагаемых к данному раскрытию изобретения. Различные другие аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области исходя из раскрытия настоящего изобретения.

Используемый здесь составной союз "и/или" следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов, взятых вместе или отдельно друг от друга. Так, например, "А и/или В" должно быть принято как конкретное раскрытие каждого из (i) А; (ii) В и (iii) А и В, так же, как если бы каждый из них был по отдельности определен в данном описании.

Если это не противоречит контексту изобретения, то описание и определение указанных выше признаков не ограничивается каким-либо конкретным аспектом или вариантом осуществления изобретения и в равной степени применимы ко всем описанным здесь аспектам и вариантам осуществления изобретения.

Описанная выше заявка и все регистрационные номера цитируемых в ней документов и последовательностей во время их рассмотрения ("цитируемых в заявке документов"), и все документы, цитированные или упомянутые в цитируемых здесь документах, и все цитируемые или упомянутые здесь документы ("цитируемые здесь документы"), и все документы, цитированные или упомянутые в цитируемых здесь документах вместе с инструкциями любого производителя, описанием, спецификацией продуктов и списком любых упомянутых здесь продуктов или продуктов, упомянутых в любом документе, включенном в настоящее описание посредством ссылки, вводятся в настоящее описание посредством ссылки, и могут быть использованы для практического осуществления изобретения. Более конкретно, все цитируемые документы вводятся посредством ссылки, так, как если бы каждый отдельный документ был конкретно и отдельно включен в настоящее описание посредством ссылки.

Настоящее изобретение описано в нижеследующих неограничивающих примерах.

Пример 1.

Достижение увеличения урожая зерна долгое время было основным направлением программ селекции зерновых культур. Авторами было показано, что локус количественного признака урожая зерна риса qNPT1, который действует посредством определения архитектуры растения нового типа (NPT), характеризующейся меньшим количеством бесплодных побегов, более крепкими стеблями и более крупными метелками, кодирует деубиквитинизирующий фермент, гомологичный человеческому OTUB1. Ингибирование OsOTUB1 усиливает меристемную активность, что приводит к уменьшению числа побегов на растение, увеличению числа зерен на метелку, увеличению массы зерна и, как следствие, увеличению урожая зерна. OsOTUB1 взаимодействует с OsUBC13 и с фактором транскрипции SBP-домена OsSPL14 и ограничивает Lys63-связанный убиквитин в OsSPL14 в отношении регуляции разрушения, зависящего от протеасомы. И наоборот, потеря функции OsOTUB1 приводит к аккумуляции высокого уровня OsSPL14, что, в свою очередь, регулирует архитектуру NPT и повышает урожай зерна. Пирамидная обработка аллелей высокой урожайности npt1 и dep1-1 обеспечивает новую стратегию увеличения потенциальной урожайности риса, которая может превышать достигаемые в настоящее время показатели.

Набор из 670 рекомбинантных инбредных линий (RIL) был выведен в результате скрещивания риса сорта japonica Chunjiang06 и выбранной линии NPT (IR66167-27-5-1-6), и из этого набора был выбран RIL52 исходя из того, что он имел Фенотип NPT, ответственный за увеличение числа зерен, уменьшение числа побегов и утолщение стебля (фиг. 1a-1e). Последующий анализ QTL идентифицировал локус qNPT1 (растения нового типа 1) как плеiotропно ответственный за все три признака (фиг. 1f). Позиционное клонирование qNPT1 осуществляли с использованием потомства BC₂F₂ и BC₂F₃, полученного в результате возвратного скрещивания между RIL52 и сортом indica Zhefu802 (рекуррентного родителя). Область-кандидат была сужена до сегмента ~4,1 т.п.о., фланкированного маркерами P139 и P143, которые содержат промотор и часть кодирующей последовательности гена в LOC_Os08g42540 (фиг. 1g). Было предсказано, что этот ген кодирует деубиквитинизирующий фермент, гомологичный человеческому OTUB1 (белок, связывающийся с альдегидом убиквитина и содержащий домен опухоли яичника 1) (фиг. 5), т.е. белку, ассоциированному с регуляцией стабильности p53 и репарацией повреждения ДНК⁹⁻¹². Исходя из этого, LOC_Os08g42540 далее обозначен как OsOTUB1. Сравнение последовательностей выявило пять нуклеотидных вариантов, в которых аллели, ответственные за NPT, отличались от аллелей стандартного фенотипа (фиг. 1h), причем, три из них имели полиморфизм по одному нуклеотиду (SNP), один имел полиморфизм с инсерцией-делацией (Indel) в интронной последовательности, и один имел SNP в промоторной области.

Затем авторами была получена почти изогенная линия (NIL) ZH11-npt1, которая содержит сегмент ~240 т.п.о., включающий аллель npt1 от IR66167-27-5-1-6 в исходной культуре риса сорта japonica Zhonghua11 (ZH11) (фиг. 6). Количественный ОТ-ПЦР-анализ показал, что пик избытка транскрипта OsOTUB1 был обнаружен в меристеме побега и молодых метелках (фиг. 2a). Гистохимические анализы на GUS, нацеленный на промотор OsOTUB1, показали, что этот ген в высокой степени экспрессируется в сосудистой ткани, а также в клетках корневого чехлика и в покоящихся центральных клетках (QC) (фиг. 7). Избыток транскрипта OsOTUB1 в ZH11-npt1 был ниже, чем в ZH11 (фиг. 2a). Фенотип нокаута OsOTUB1, генерированного с использованием CRISPR/Cas9¹³, был аналогичен фенотипу ZH11-npt1, что приводило к уменьшению числа побегов, увеличению числа зерен, увеличению массы зерна и к последующему увеличению урожая зерна (фиг. 6). В трансгенных растениях, несущих конструкцию pOsOTUB1::OsOTUB1-GFP, сигнал GFP обнаруживался как в ядре, так и в цитоплазме клеток оболочки корня и влагалища листа (фиг. 8). Исходя из проектируемой базы данных, снабженных комментариями к описанию растений риса, было предсказано, что ген OsOTUB1 генерирует два альтернативно сплайсированных транскрипта (фиг. 1g). Фенотип трансгенного ZH11-npt1, экспрессирующего кДНК OsOTUB1.1, индуцируемый его нативным промотором, был аналогичен фенотипу ZH11, тогда как фенотип с избыточной экспрессией OsOTUB1.2 был аналогичен фенотипу ZH11-npt1 (фиг. 6). Кроме того, трансгенные

растения ZH11, сверхэкспрессирующие OsOTUB1.1, были карликового роста, имели меньше зерен и имели некроз листьев (фиг. 9). Эти результаты показывают, что потеря функции OsOTUB1 ассоциируется с идеотипической архитектурой.

Анализ гаплотипов показал, что аллель *npt1* не использовался селекционерами элитных сортов *indica* и сортов *japonica* умеренных широт (фиг. 1h). Поскольку высокоурожайный аллель *dep1-1* интенсивно использовался китайскими селекционерами^{14,15}, то было интересно оценить эффект сочетания *npt1* и *dep1-1*. NIL для аллельных комбинаций локусов *qNPT1* и *qDEP1* были созданы в элитном сорте риса *japonica* Wuyunjing7 (который содержит аллели *NPT1* и *dep1-1*, далее называемые WYJ7-NPT1-*dep1-1*). Растения WYJ7-*npt1-1* и WYJ7-NPT1-*dep1-1* не отличались друг от друга по времени образования головных метелок и высоте растения (фиг. 2b, 2e и 2f), тогда как растения WYJ7-*npt1-1* давали меньше побегов и имели большее число более тяжелых зерен, чем WYJ7-NPT1-*dep1-1* (фиг. 2g-2j). Меристемы верхушки побегов, образованные растениями WYJ7-*npt1-1*, были больше, чем у WYJ7-NPT1-*dep1-1* (фиг. 2k), что указывает на то, что *npt1* и *dep1-1* действуют синергически с повышением меристемной активности⁵. Растения WYJ7-*npt1-1* также характеризовались большим количеством сосудистых пучков, более толстым стеблем и более толстой клеточной стенкой паренхимы и склеренхимы (фиг. 2l-2n). Важно отметить, что в течение трех сезонов подряд, общий урожай зерна растений WYJ7-*npt1-1* был на 10,4% больше, чем у растений WYJ7-NPT1-*dep1-1* (фиг. 2o). Следовательно, пирамидная обработка аллелей *npt1* и *dep1-1* представляет собой эффективное средство повышения урожая зерна риса.

Учитывая предсказанную деубиквитиназную активность OsOTUB1, авторы исследовали его способность расщеплять линейный Lys48- и Lys63-связанный тетра-убиквитин. В соответствии с поведением человеческого гомолога, он проявлял высокую активность расщепления, если в нем присутствовал Lys48-связанный тетраубиквитин^{16,17}, но в отличие от OTUB1, он также проявлял умеренный уровень активности, если он присутствовал в Lys63-связанных формах (фиг. 10). Растения ZH11-*npt1*, экспрессирующие OTUB1 или его ортологи, происходящие от мыши, кукурузы или ячменя и регулируемые промотором OsOTUB1, продемонстрировали фенотип, не отличающийся от фенотипа ZH11 или трансгенных растений ZH11-*npt1*, экспрессирующих OsOTUB1.1 (фиг. 11), что позволяет предположить, что ортологи OTUB1 от всех этих видов являются функционально взаимозаменяемыми. Известно, что OTUB1 взаимодействует с UBC13, что приводит к ингибированию убиквитинизации хроматина, вызванной двухцепочечными разрывами^{9,10}, и те же самые взаимодействия *in vitro* и *in vivo* были установлены между OsOTUB1 и OsUBC13 (фиг. 12). Сверхэкспрессия OsUBC13 давала фенотип, аналогичный фенотипу растений, несущих аллель *npt1*, по меньшей мере в отношении числа зерен, числа побегов и диаметра стебля (фиг. 12). И наоборот, конститутивная экспрессия РНКи, направленная на OsUBC13, давала фенотип, напоминающий фенотип растений, у которых кДНК OsOTUB1.1 была сверхэкспрессирована (фиг. 9 и фиг. 12).

Скрининг дрожжей на присутствие двух нацеливающих белков, взаимодействующих с OsOTUB1, выявил взаимодействия 72 кандидатов, которые включали гомолог риса, состоящий из фактора транскрипции, подобного белку, связывающемуся с промотором SQUAMOSA (SBP-домена) OsSPL14, который, как известно, регулирует архитектуру растений в отношении снижения числа побегов, утолщения стебля и увеличения числа зерен^{18,19}. Анализы на комплементарность по бимолекулярной флуоресценции (BiFC) и анализы методом коиммунопреципитации показали, что взаимодействие OsSPL14-OsOTUB1 явно происходит *in planta* (фиг. 3a, 3b). Анализ делеций показал, что консервативный SBP-домен является необходимым и достаточным для взаимодействий *in vitro* и *in vivo* (фиг. 3a и фиг. 13). Дальнейшие анализы BiFC показали, что OsOTUB1 способен взаимодействовать с полным набором факторов транскрипции SPL риса (фиг. 14), что соответствует данным, указывающим на то, что избыток транскриптов OsSPL7, OsSPL13, OsSPL14 и OsSPL16 коррелирует с одним или более признаками: снижения числа побегов, увеличения числа зерен или увеличения массы зерна^{18,23}. Было показано, что присутствие аллеля *npt1* или OsSPL14^{WFP}, ассоциированного с высоким уровнем транскрипта OsSPL14¹⁹, генерирует архитектуру NPT, а фенотип растений ZH11-*npt1*, в которых OsSPL14 был подвергнут сайленсингу под действием РНКи, был сходен с фенотипом растений ZH11 (фиг. 3c-3h). Сравнительный транскриптомный анализ на основе секвенирования РНК ZH11, ZH11-*npt1* и ZH11-OsSPL14^{WFP} показал, что уровни транскриптов 453 общих генов-мишеней были выше в ZH11-*npt1*, и в ZH11-OsSPL14^{WFP}, чем в ZH11 (фиг. 15), и этот результат был подтвержден с помощью кол. ОТ-ПЦР²²⁻²⁴. И наоборот, количество оцененных генов-мишеней было значительно снижено в случае OsSPL14 с сайленсингом ZH11-*npt1* (фиг. 15). Таким образом, OsOTUB1 и OsSPL14 действуют антагонистически и регулируют архитектуру растения посредством регуляции общих генов-мишеней.

Анализы EMSA показали, что маловероятно, что взаимодействие OsOTUB1-OsSPL14 влияет на аффинность связывания OsSPL14 с его нацеливающими мотивами GTAC (фиг. 16). Различий в количестве транскрипта OsSPL14 между ZH11 и ZH11-*npt1* (фиг. 3e) не наблюдалось, но накопление OsSPL14 было намного выше в последнем генотипе (фиг. 4a). В случае обработки ингибитором протеасомы MG132, накопление OsSPL14 было явно выше в ZH11 (фиг. 4b). Эти результаты позволяют предположить, что OsOTUB1, в отличие от OTUB1, который регулирует стабильность белков p53 и SMAD^{11,12},

способствует разложению OsSPL14. Если лизаты, полученные из молодых метелок ZH11, были подвергнуты воздействию GST-OsSPL14, то титр GST-OsSPL14 со временем снижался, а в случае обработки MG132, наблюдался обратный эффект (фиг. 4с). Стабильное накопление GST-OsSPL14 было больше в случае, если лизаты были получены из метелок ZH11-npt1, но не из ZH11, тогда как разложение GST-OsSPL14 ускорялось в лизатах, образованных из метелок ZH11-npt1 в присутствии His-OsOTUB1 (фиг. 4с). Вестерн-блот-анализ показал, что можно детектировать присутствие полиубиквитинизированных форм иммунопреципитата Мус-OsSPL14, выделенного из молодых метелок с использованием антитела, которое распознает общий убиквитин или конъюгаты Lys48-полиубиквитин или Lys63-полиубиквитин (фиг. 4d). Это свидетельствует о том, что OsSPL14 модулируется посредством Lys48- и Lys63-связанной убиквитинизации²⁵.

Этот анализ был также проведен для исследования убиквитинизации OsSPL14, опосредуемой эндогенной лигазой E3. В присутствии убиквитина дикого типа, MG132-обработка протопластов риса, экспрессирующих Flag-OsSPL14, приводила к усилению аккумуляции полиубиквитинизированного Flag-OsSPL14; однако, в присутствии K48R-убиквитинов, MG132-обработка не приводила к какой-либо значимой аккумуляции полиубиквитинизированного Flag-OsSPL14 (фиг. 4е). Это наблюдение совпадает с мнением о том, что Lys48-связанный убиквитин OsSPL14 необходим для разложения, опосредуемого протеасомой. В присутствии Мус-OsOTUB1.1, титр полиубиквитинизированного Flag-OsSPL14 явно снижался в случае мутаций K48R или K63O, но оставался неизменным в присутствии мутаций K48O или K63R (фиг. 4f). Кроме того, Мус-OsOTUB1 стимулировал разложение Flag-OsSPL14 только в присутствии убиквитина дикого типа, K48O- или K63R-связанного убиквитина (фиг. 4f), что указывает на то, что стабилизация OsSPL14 коррелирует с Lys48-связанной убиквитинизацией. В целом, эти результаты позволяют предположить, что OsOTUB1-опосредованное ингибирование Lys48-связанной убиквитинизации OsSPL14 необходимо для его разложения в зависимости от протеасомы.

Факторы транскрипции SBP-домена, нацеленные на miR156, играют важную роль в регуляции функции стволовых клеток и цветения у растений²⁶⁻²⁸. Неканоническая OsOTUB1-опосредованная регуляция факторов транскрипции SBP-домена создает новую основу для изучения судьбы меристемных клеток, архитектуры соцветия и развития цветков. Полученные авторами результаты проливают свет на молекулярную основу идеотипического подхода в программах селекции риса, а манипуляции с модулем OsOTUB1-OsSPL14 также представляют собой потенциальную стратегию для облегчения селекции новых сортов риса с более высокой урожайностью зерна.

Растительные материалы и условия культивирования. Набор из 670 популяций RIL был выведен в результате скрещивания китайского сорта риса умеренных широт japonica Chunjiang06 и селекции NPT IR66167-27-5-1-6. Образцы риса, использованные для анализа на разнообразие последовательностей, были описаны в других публикациях^{14,21}. Растения NIL, несущие либо npt1, ZH11-OsSPL14^{WFP19,29}, либо аллельные комбинации локусов qNPT1 и qDEP1, были выведены путем семикратного скрещивания RIL52 с Zhonghua11 или Wuyunjing7. Растения, выращенные в орошаемых условиях, были высажены на расстоянии 20 см друг от друга и выращивались в течение стандартного вегетационного периода на трех экспериментальных станциях: одна в Линшуй (провинция Хайнань), одна в Хэфэй (провинция Аньхой) и одна в Пекине.

Трансгенные конструкции. Последовательности, кодирующие OsOTUB1.1 и OsOTUB1.2, их UTR (5': от сайта инициации транскрипции до -2,8 т.п.о.; 3': 1,5 т.п.о. ниже сайта терминации), амплифицировали из геномной ДНК ZH11 (гДНК) и вводили в вектор pCambia2300 (Cambia) с получением pOsOTUB1::OsOTUB1.1 и pOsOTUB1::OsOTUB1.2. кДНК полноразмерного человеческого OTUB1 (и его ортологов мыши, ячменя и кукурузы) амплифицировали из соответствующей матричной кДНК, а затем субклонировали в вектор pActin::nos¹⁴, тогда как кДНК OsOTUB1.1 и ее 5'-UTR вводили в вектор p35S::GFP-nos²¹ с получением конструкции pOsOTUB1::OsOTUB1.1-GFP-nos. Для получения p35S::Мус-OsSPL14, кДНК OsSPL14 амплифицировали из матрицы кДНК ZH11 и клонировали в p35S::Мус-nos. Конструкции рРНК, необходимые для CRISPR/Cas9-нокаута OsOTUB1, получали, как описано в других работах¹³. 300 п.о.-фрагмент кДНК OsSPL14 и 300 п.о.-фрагмент кДНК OsUBC13 амплифицировали из кДНК ZH11 и использовали для конструирования трансгенов pActin::RNAi-OsSPL14 и pActin::RNAi-OsUBC13, как описано в других работах¹⁴. Трансгенные растения риса были получены с помощью Agrobacterium-опосредованной трансформации, как описано ранее⁵. Соответствующие последовательности праймеров приведены на фиг. 17.

Количественный ПЦР-анализ в реальном времени (кол.ОТ-ПЦР). Общую РНК экстрагировали из тканей растения с использованием реагента TRIzol (Invitrogen) и обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКазы (Invitrogen), в соответствии с протоколом производителя. Полученную РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора для синтеза кДНК (TRANSGEN). Последующую кол.ОТ-ПЦР проводили как описано в других работах²¹, включая три независимых препарата РНК в качестве биологических дубликатов. Рис Actin1 был использован в качестве эталона. Соответствующие последовательности праймеров представлены на фиг. 17.

Анализ на дрожжевую двухгибридную систему. Анализ на дрожжевую двухгибридную систему проводили как описано в других работах^{14,21}. Полноразмерную кДНК OsOTUB1.1 и С-концевой фраг-

мент OsOTUB1 амплифицировали из кДНК ZH11 и встраивали в pGBKT7 (Takara Bio Inc.), тогда как полноразмерную кДНК OsUBC13 и С-концевой фрагмент OsSPL14 встраивали в pGADT7 (Takara Bio Inc.). Каждую из этих плазмид подтверждали путем секвенирования с последующей трансформацией в дрожжевой штамм AH109. Необходимые анализы на β -галактозидазу проводили в соответствии с протоколом производителя (Takara Bio Inc.). Клетки, несущие либо пустой pGBKT7, либо пустой pGADT7, использовали в качестве негативного контроля. Всю последовательность OsOTUB1 или С-концевой фрагмент использовали в качестве "приманки" для скрининга библиотеки кДНК приготовленной из poly(A)-содержащей РНК, выделенной из молодых метелок риса (длиной <0,2 см). Экспериментальные процедуры скрининга и выделения плазмид осуществляли в соответствии с протоколом производителя (Takara Bio Inc.). Соответствующие последовательности праймеров приведены на фиг. 17.

BiFC-анализы. Полноразмерные кДНК OsOTUB1.1, OsUBC13, OsSPL1-OsSPL13 и OsSPL15-OsSPL19 вместе с их вариантами OsSPL14 с делециями и без делеций, амплифицировали из кДНК ZH11, и ампликоны встраивали в векторы pSY-735-35S-cYFP-NA или pSY-736-35S-nYFP-EE³⁰ для создания серии гибридных конструкций. Два вектора, используемые для тестирования белок-белковых взаимодействий (например, nYFP-OsSPL14 и cYFP-OsOTUB1), были котрансфицированы в протопласты риса. После инкубирования в темноте в течение 14 часов оценивали сигнал YFP и делали фотографии под конфокальным микроскопом (Zeiss LSM710), как описано в других работах³¹. Каждый BiFC-анализ повторяли по меньшей мере три раза. Соответствующие последовательности праймеров приведены на фигуре 17.

Ингибирование *in vitro*. Рекомбинантный гибридный белок GST-OsOTUB1 иммобилизовали на сферах с глутатион-сефарозой и инкубировали с His-OsUBC13 в течение 30 минут при 4°C. Сферы с глутатион-сефарозой промывали три раза и элюировали буфером для элюирования (50 mM Трис-HCl, 10 mM восстановленный глутатион, pH 8,0). Супернатант подвергали иммуноблот-анализу с использованием антител против His и против GST (Santa Cruz).

Коиммунопреципитация и вестерн-блоттинг. Мус-OsSPL14 экстрагировали из молодых метелок (длиной <0,2 см) трансгенных растений ZH11, несущих pActin::Myc-OsSPL14, с использованием буфера, состоящего из 50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,5% Тритона-X 100, 1 mM DTT и коктейля из ингибиторов протеиназы (Roche LifeScience, Basel, Switzerland). Затем добавляли конъюгированные с агарозой анти-Мус-антитела (Sigma-Aldrich), и реакционную смесь оставляли по меньшей мере на 4 часа при 4°C, а затем ~5-6 раз промывали буфером TBS-T и элюировали 2× буфером для загрузки. Иммунопреципитаты и лизаты подвергали электрофорезу в ДСН-ПААГ, и отделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare). Гибридные белки Мус-OsSPL14 детектировали путем зондирования мембраны анти-Мус-антителом (Santa Cruz), а его полиубиквитинизированные формы детектировали путем зондирования антителами, которые распознают общие конъюгаты убиквитина; антителами, которые специфически распознают конъюгаты Lys48-полиубиквитина; или антителами, которые специфически распознают конъюгаты Lys63-полиубиквитина (Abcam).

Анализ на разложение OsSPL14. Лизаты, полученные из молодых метелок (длиной <0,2 см), собранных с растений ZH11 и ZH11-npt1, инкубировали с соответствующим рекомбинантным гибридным белком GST-OsSPL14 в присутствии или в отсутствие рекомбинантного гибридного белка His-OsOTUB1. Белок экстрагировали из лизатов, которые не обрабатывали или обрабатывали 50 мкМ MG132 в течение предварительно определенных периодов времени и подвергали электрофорезу в ДСН-ПААГ и вестерн-блоттингу на основе антитела против GST (Santa Cruz). В качестве загрузочного контроля, избыток HSP90 определяли путем зондирования антителом против HSP90 (BGI). Буфер для лизиса содержит 25 mM Трис-HCl (pH 7,5), 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 4 mM PMSF, 5 mM DTT и 10 mM АТФ, как описано в других работах³².

Анализ на расщепление линейного K48- и K63-связанного тетра-убиквитина. Аликвоту ~1 мкг рекомбинантного GST-OsOTUB1.1, GST-OsOTUB1.2 или OTUB1 добавляли к 20 мкл 50 mM трис-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,5 mM дитиотреитола, содержащего 2,5 мкг линейного K48- и K63-связанного тетра-убиквитина (Boston Biochem) и оставляли на 1 час при 37°C. Продукты реакции анализировали с помощью вестерн-блот-анализа на основе антитела против убиквитина (Abcam), как описано в других работах¹⁶.

Анализ на убиквитинизацию *in vitro*. Протопласты риса, полученные из молодых метелок ZH11-npt1 (длиной <0,2 см), трансфецировали плазмидами pUC19-35S-Flag-OsSPL14-RBS (33) и pUC19-35S-NA-Ubiq-RBS (NA-меченным убиквитином (дикого типа), K48R (с заменой K48 на аргинин), K63R (с заменой K63 на аргинин), K48O (убиквитином только с K48, с заменой других лизиновых остатков на аргинин) или K63O (убиквитином только с K63 с заменой других лизиновых остатков на аргинин) в присутствии или в отсутствие плазмиды pUC19-35S-Мус-OsOTUB1-RBS. Через 15 часов, протопласты лизировали в буфере для экстракции [50 mM Трис-HCl (pH 7,4), 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,5% Тритона-X 100, 1 mM DTT], содержащем коктейль из ингибиторов протеиназы (Roche Life Science). Полученные лизаты обрабатывали конъюгированными с агарозой анти-Flag антителами (Sigma-Aldrich) в течение по меньшей мере 4 часов при 4°C, а затем 5-6 раз промывали в буфере для экстракции и элюировали пептидом 3×Flag (Sigma-Aldrich). Иммунопреципитаты разделяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и

переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare), которую использовали для вестерн-блот-анализа с использованием антител против HA и против Flag-конъюгатов (Sigma-Aldrich).

Пример 2.

Результаты.

Мутант *wtg1-1* дает широкие, толстые, короткие и тяжелые зерна.

Для определения размера зерна риса, авторами был мутагенизирован сорт *japonica Zhonghuajing* (ZHJ) с помощью γ -излучения, и был выделен мутант с широким и толстым зерном 1 (*wtg1-1*) в популяциях M2. Зерна *wtg1-1* были шире, чем зерна ZHJ (фиг. 18a, b, e). Ширина зерна ZHJ составляла 3,41 мм, тогда как ширина зерна *wtg1-1* составляла 3,84 мм (фиг. 18e). И наоборот, длина зерен *wtg1-1* была меньше, чем у ZHJ (фиг. 18a, b, d). Длина зерен ZHJ составляла 7,47 мм, тогда как длина зерен *wtg1-1* составляла 6,89 мм. Зерна *wtg1-1* были явно толще, чем зерна ZHJ (фиг. 18c). Средняя толщина зерен ZHJ и *wtg1-1* составляла 2,27 мм и 2,66 мм, соответственно (фиг. 18f). Важно отметить, что зерна *wtg1-1* были значительно тяжелее, чем зерна ZHJ (фиг. 18g). Масса 1000 зерен ZHJ и *wtg1-1* составляла 25,56 г и 29,09 г, соответственно. Эти результаты показали, что WTG1 влияет на ширину зерна, толщину и длину зерна, а также на массу зерна.

Мутант *wtg1-1* увеличивает число зерен на метелку.

Зрелые растения *wtg1-1* были немного короче, чем растения дикого типа (фиг. 19a, b, f). Растения *wtg1-1* имели более широкие листья по сравнению с растениями ZHJ, тогда как длина листьев *wtg1-1* была аналогична длине листьев ZHJ (фиг. 19c, d, g, h). Метелки *wtg1-1* были короткими, толстыми и плотными по сравнению с метелками растения дикого типа, что указывает на фенотип выпрямления метелки (фиг. 19e, i). Длина оси метелок *wtg1-1* была меньше по сравнению с осью метелок дикого типа (фиг. 19j), что указывает на то, что WTG1 влияет на размер метелки. Поскольку ветви метелок определяют структуру и форму метелки, то авторами были проведены исследования первичных и вторичных ветвей метелок дикого типа и *wtg1-1*. Метелки *wtg1-1* имели большее число первичных и вторичных ветвей, чем ZHJ (фиг. 19k, l). Авторами было оценено число зерен на метелку в ZHJ и *wtg1-1*. Как показано на фиг. 2M, число зерен на метелку в *wtg1-1* было выше, чем у ZHJ. Таким образом, эти данные показали, что повышенное число первичных и вторичных ветвей метелок в *wtg1-1* приводит к увеличению числа зерен на метелку.

Идентификация гена WTG1.

Авторами была предпринята попытка идентифицировать мутацию *wtg1-1* с применением метода MutMap (Abe et al., 2012), который был использован для клонирования генов риса. Авторы провели скрещивание *wtg1-1* с ZHJ и получили популяцию F₂. В популяции F₂, сегрегация потомства показала, что одна рецессивная мутация определяет фенотипы *wtg1-1*. Авторами была экстрагирована ДНК из пятидесяти растений F₂, которые показали фенотипы широких и толстых зерен, и такое же количество ДНК смешивали для секвенирования всего генома. Авторы также секвенировали ZHJ в качестве контроля. 6,2 Gbp и 5,4 Gbp коротких ридов были получены для ZHJ и объединенных растений F₂, соответственно. Авторами было детектировано 1399 SNP и 157 INDEL между объединенными F₂ и ZHJ. Затем авторы вычисляли отношение SNP/INDEL в объединенных растениях F₂. Принимая во внимание, что все мутантные растения в популяции F₂ должны иметь каузальный SNP/INDEL, отношение SNP/INDEL для этой каузальной мутации в объединенных растениях F₂ должно быть 1. Среди них только INDEL показывают отношение SNP/INDEL=1. Эти INDEL содержат делецию в гене размером 4 п.о. (LOC_Os08g42540) (фиг. 20a, 23). Авторы также подтвердили эту делецию в *wtg1-1* посредством проявления маркера dCAPS1 (фиг. 20b). Таким образом, эти анализы позволяют предположить, что LOC_Os08g42540 может представлять собой ген WTG1.

Для подтверждения того, что WTG1 представляет собой ген LOC_Os08g42540, авторами был проведен тест на генетическую комплементарность. Геномный фрагмент, содержащий 2337 п.о. 5'-фланкирующей последовательности, ген LOC_Os08g42540 и 1706 п.о. 3'-фланкирующей последовательности (gWTG1) были трансформированы в мутант *wtg1-1*. Конструкция gWTG1 дополняла фенотипы мутанта *wtg1-1* (фиг. 20f-k). Ширина зерна, толщина зерна и длина зерна трансгенных растений gWTG1;*wtg1-1* были сравнимыми с такими же параметрами у ZHJ. Следовательно, этот эксперимент по геномной комплементарности подтвердил, что ген WTG1 представляет собой LOC_Os08g42540.

WTG1 кодирует отубаин-подобную протеазу с деубиквитинизирующей активностью.

Ген WTG1 кодирует неизвестный белок с предсказанным доменом отубаина (фиг. 20d). Гомологи WTG1 были обнаружены в *Chlamydomonas reinhardtii*, *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, и у других видов растений и животных (фиг. 24). Гомологи у растений семейства злаков (например, пшеницы, *Brachypodium*, кукурузы и сорго) имеют высокую идентичность аминокислотной последовательности с WTG1 (фиг. 24). WTG1 также имеет сходство с белками человеческого отубаина 1/2 (OTUB1/2) (фиг. 25), которые участвуют во множественных физиологических процессах и процессах развития (Nakada et al., 2010, Herhaus et al., 2013). В *wtg1-1*, делеция в 4 п.о. наблюдается в области стыка экзон-интрон четвертого интрона (фиг. 20a). Мутация *wtg1-1* приводит к изменению сплайсинга WTG1, что, в свою очередь, приводит к преждевременному появлению стоп-кодона (фиг. 20c). Белок, кодируемый аллелем *wtg1-1*, не имеет половины предсказанного домена отубаина, а также содержит полностью не-

родственный пептид (фиг. 20е), что позволяет предположить, что wtgl-1 представляет собой аллель с потерей функции.

Известно, что у животных, белки отубаина обладают деубиквитинизирующей активностью, поскольку они содержат остатки гистидина, цистеина и аспартата в консервативном каталитическом домене цистеиновых протеаз (фиг. 25) (Balakirev et al., 2003). WTG1 имеет сходство с человеческими белками отубаина и имеет домен, подобный отубаину (фиг. 20d, 25), что позволяет предположить, что WTG1 может представлять собой отубаин-подобную протеазу. Поэтому авторы тщательно исследовали аминокислотную последовательность WTG1 и обнаружили, что WTG1 содержит консервативные остатки аспартата (D68), цистеина (C71) и гистидина (H267) в предсказанном домене отубаина, которые определяют каталитическую триаду убиквитин-протеазы у животных (фиг. 20d, 25) (Balakirev et al., 2003). Затем авторы определили, обладает ли WTG1 деубиквитинизирующей активностью. Авторы экспрессировали WTG1, WTG1^{wtgl-1}, кодируемый аллелем wtgl-1 и WTG1^{D68E;C71S;H267R}, с мутациями в консервативных аминокислотах, как белки, меченные MBP (белком, связывающимся с мальтозой) (MBP-WTG1, MBP-WTG1^{wtgl-1} и WTG1^{D68E;C71S;H267R}), и UBQ10 (гексамерный полиубиквитин) в качестве His-меченого белка (His-UBQ10). Анализы на деубиквитинизацию показали, что MBP-WTG1 был способен расщеплять His-UBQ10, а MBP-WTG1^{wtgl-1}, MBP-WTG1^{D68E;C71S;H267R} и MBP не расщепляли His-UBQ10 (фиг. 20l). Эти результаты показали, что WTG1 обладает деубиквитинизирующей активностью, WTG1^{wtgl-1} не обладает деубиквитинизирующей активностью, а консервативные остатки аспартата (D68), цистеина (C71) и гистидина (H267) играют важную роль в сообщении деубиквитинизирующей активности WTG1. Таким образом, WTG1 представляет собой отубаин-оподобную протеазу с деубиквитинизирующей активностью.

Экспрессия и субклеточная локализация WTG1.

Авторами была оценена экспрессия WTG1 с помощью количественного ОТ-ПЦР-анализа в реальном времени. Как показано на фиг. 21a, ген WTG1 экспрессируется в листьях, в развивающихся метелках и в корнях. Авторами были получены трансгенные растения с промотором WTG1:GUS (proWTG1:GUS) и были исследованы паттерны экспрессии WTG1 в различных тканях. Авторы наблюдали окрашивание GUS в листьях и корнях молодых проростков proWTG1:GUS (фиг. 21b). Окрашивание GUS в развивающихся метелках также было детектируемым (фиг. 21d). Активность GUS в более молодых метелках была сильнее, чем у более старых метелок (фиг. 21d), что соответствовало функции WTG1, влияющей на число ветвей метелки. Во время развития кожуры колоска, экспрессия WTG1 начиналась с кончиков, а затем распространялась по всей кожуре колосков и, наконец, исчезала на более поздних стадиях развития. Следовательно, паттерн экспрессии WTG1 поддерживает его функции в развитии метелки и кожуры колосков.

Затем авторами были получены трансгенные растения pro35S:GFP-WTG1 и была исследована субклеточная локализация WTG1. Как показано на фигурах 5e-g, сигнал GFP в корнях pro35S:GFP-WTG1 был преимущественно обнаружен в ядрах. Авторы также пытались выяснить, может ли GFP-WTG1 локализоваться исключительно в ядре. Авторами были получены цитоплазматические и ядерные фракции белков из трансгенных растений pro35S:GFP-WTG1. Неожиданно было обнаружено, что гибридные белки GFP-WTG1 присутствовали как в ядерной фракции, так и в цитоплазматической фракции, хотя сигнал GFP в растениях pro35S:GFP-WTG1 явно не наблюдался в цитоплазме (фиг. 21h). Таким образом, эти данные указывают на то, что WTG1 локализуется как в ядре, так и в цитоплазме риса.

Сверхэкспрессия WTG1 дает узкое, тонкое и длинное зерно благодаря присутствию узких и длинных клеток в кожуре колосков.

Для дальнейшего выявления функций WTG1, регулирующих размер и форму зерна, авторами была получена конструкция proActin:WTG1, которую затем трансформировали в растение дикого типа (ZHJ). Как показано на фиг. 22g, трансгенные линии proActin:WTG1 имели более высокие уровни экспрессии WTG1, чем растения дикого типа (ZHJ). Затем авторы исследовали фенотипы размера и формы зерна в трансгенных линиях proActin:WTG1. Как показано на фиг. 22a-f, трансгенные линии proActin:WTG1 давали узкое, тонкое и длинное зерно по сравнению с ZHJ. Уровни экспрессии WTG1 в трансгенных линиях proActin:WTG1 были ассоциированы с фенотипами размера и формы зерна (фиг. 22d-g). Эти данные также показали, что WTG1 влияет на размер и форму зерна.

Учитывая, что трансгенные линии proActin:WTG1 имели узкое и длинное зерно, авторы попытались выяснить, может ли WTG1 влиять на размножение клеток. Авторы исследовали размер внешних эпидермальных клеток в кожуре колосков ZHJ и proActin:WTG1. Внешний эпидермис кожуры колосков proActin:WTG1 содержал узкие и длинные клетки по сравнению с кожурой колосков ZHJ (фиг. 26a, b). В противоположность этому, внешний эпидермис кожуры колосков proActin:WTG1 имел такое же число эпидермальных клеток по ширине и длине зерен, как и число эпидермальных клеток в кожуре колосков растений дикого типа (фиг. 26c, d). Эти результаты также показали, что WTG1 определяет размер и форму зерна, благодаря влиянию на размер и форму клеток в кожуре колосков.

Обсуждение.

Размер и форма зерна имеют решающее значение для урожая и внешнего вида зерна у сельскохозяйственных культур. Ширина, толщина и длина зерна совместно определяют размер и форму зерна риса. Однако, молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования размера и формы зерна риса,

пока еще точно не известны. В этом исследовании авторами был выделен мутант с широким и толстым зерном (*wtg1-1*), который давал толстое, широкое, короткое и тяжелое зерно по сравнению с растением дикого типа. WTG1 кодирует отубаин-подобную протеазу с деубиквитинизирующей активностью. Сверхэкспрессия WTG1 дает узкое, тонкое и длинное зерно. Таким образом, полученные авторами результаты определяют отубаин-подобную протеазу как важный фактор, влияющий на размер и форму зерна риса, что позволяет предположить, что он может повышать урожай зерна и улучшать размер и форму зерна.

Мутант *wtg1-1* давал толстое, широкое и короткое зерно (фиг. 18a-f), что указывает на то, что WTG1 действует как фактор, влияющий на размер и форму зерна риса. Зерна *wtg1-1* были тяжелее, чем зерна ZHJ (фиг. 18g), что указывает на то, что WTG1 играет ключевую роль в определении массы зерна. Мутант *wtg1-1* показал короткие, толстые и плотные метелки по сравнению с растением дикого типа (фиг. 19e), что позволяет предположить, что функция WTG1 влияет на размер и форму метелки. Мутация *wtg1-1* приводила к увеличению числа зерен на метелку в результате увеличения как первичных, так и вторичных ветвей метелки (фиг. 19k, l, m). Ранее проведенные исследования показали, что увеличение числа зерен на метелку обычно вызывает уменьшение размера и массы зерна (Huang et al., 2009). И наоборот, было описано, что некоторые мутанты риса дают зерно большего размера, а также большее число зерен на метелку (Li et al., 2011a, Hu et al., 2015). Полученные авторами результаты показали, что мутант *wtg1-1* дает тяжелое зерно и большее число зерен на метелку.

Ген WTG1 кодирует отубаин-подобную протеазу. Гомологи WTG1 обнаружены у различных видов растений и животных. Гомологи WTG1 у людей являются членами семейства деубиквитинизирующих ферментов (DUB) класса протеаз, связывающихся с доменом опухоли яичника (OTU). OTUB1 участвует в репарации повреждения ДНК и трансформации путей передачи сигнала фактора роста- β (TGF β) (Nakada et al., 2010, Herhaus et al., 2013). OTUB1 обладает деубиквитинизирующей активностью и выполняет функции по удалению связанных убиквитиновых цепей или молекул из их мишеней. OTU-домен OTUB1 содержит три консервативные аминокислоты (D88/C91/H265) (Balakirev et al., 2003). Аналогичным образом, WTG1 содержит предсказанную каталитическую триаду (D68/C71/H267) в предсказанном домене отубаина, что позволяет предположить, что WTG1 может обладать деубиквитинизирующей активностью. В соответствии с этим, полученные авторами биохимические данные показали, что WTG1 может расщеплять полиубиквитины, а поэтому, WTG1 представляет собой функциональный деубиквитинизирующий фермент. И наоборот, мутации в предсказанной каталитической триаде (WTG1^{D68E;C71S;H267R}) нарушали деубиквитинизирующую активность WTG1 (фиг. 20l), что указывает на то, что эти консервативные аминокислоты имеют решающее значение для деубиквитинизирующей активности. Кроме того, белок, кодируемый аллелем *wtg1-1* (WTG1^{wtg1-1}), не обладал какой-либо деубиквитинизирующей активностью, что указывает на то, что *wtg1-1* является аллелем потери функции. Возможно, что WTG1 может удалять убиквитиновые цепи из своих мишеней и предотвращать разрушение своих мишеней.

Мутант *wtg1-1* давал широкие, толстые и короткие зерна, а сверхэкспрессия WTG1 давала узкие, тонкие и длинные зерна. Кроме того, зерна *wtg1-1* были значительно тяжелее, чем зерна дикого типа, а мутант *wtg1-1* демонстрировал повышенное число зерен на метелку, что позволяет предположить, что он может повышать урожай зерна. Таким образом, следует проверить, могут ли WTG1 и его гомологи в сельскохозяйственных культурах (например, в кукурузе и пшенице) использоваться для повышения урожая зерна и улучшения размера и формы зерна в будущем. Известно, что признаки размера и формы зерна были выбраны рисоводами в процессе одомашнивания риса. Авторами было обнаружено, что эти сорта риса содержали множество SNP в области гена WTG1 (<http://ricevarmap.ncpgr.cn>).

Материалы и методы.

Растительные материалы и условия выращивания.

Зерно сорта japonica Zhonghuaqing (ZHJ) облучали γ -лучами, и мутант с широким и толстым зерном 1 (*wtg1-1*) был идентифицирован из этой популяции M2. Растения риса выращивали на орошаемых полях с плотностью 20 см $\times$ 20 см. Всего 48 саженцев риса переносили из рассадочного питомника на орошаемую делянку для выращивания риса-падди (1,92 м²). Растения риса культивировали на орошаемых полях Линшюя (110°03'E, 18°51'N, высота над уровнем моря 10 м, Хайнань, Китай) с декабря 2015 г. по апрель 2016 г. и в Гуаньчжоу (119°95'E, 30°07'N, высота над уровнем моря 12 м, провинция Чжэцзян, Китай) с июля по ноябрь 2016 года, соответственно. Почва в Линшюе представляет собой песчано-суглинистую почву, а почва в Гуаньчжоу представляет собой глинистую почву. В течение вегетационного сезона, температура колебалась в пределах от 9 до 32°C в Линшюе, и в пределах от 12 до 39°C в Гуаньчжоу (<http://data.cma.cn/site/index.html>). Во время цикла выращивания риса вносились азотные, фосфорные и калийные удобрения (по 120 кг на гектар для каждого).

Морфологический и клеточный анализ.

Растения ZHJ и *wtg1-1*, выращенные на орошаемых рисовых полях, выкапывали и высаживали в горшки для фотографирования. Для сканирования зрелых зерен использовали MICROTEK Scan Marker i560 (MICROTEK, Shanghai, China). Для автоматического измерения ширины и длины зерна использовали систему для тестирования риса WSEEN (WSeen, Zhejiang, China). Толщину зерна измеряли с помо-

щью цифрового штангенциркуля (JIANYE TOOLS, Zhejinag, China). Зерна из 30 главных метелок использовали для измерения массы зерна. Всего 1000 сухих семян взвешивали на электронных аналитических весах. Массу зерна оценивали с тремя повторностями.

Идентификация WTG1.

Для клонирования гена WTG1 авторы скрещивали wtg1-1 с ZHJ и получали популяцию F₂. Из популяции F₂ авторы отбирали 50 растений, которые имели фенотипы wtg1-1, и их ДНК объединили в равном соотношении для повторного секвенирования всего генома на NextSeq 500 (Illumina, America). Mut-Map осуществляли как описано в предыдущем исследовании (Abe et al., 2012), а отношение SNP/INDEL вычисляли в соответствии с предыдущим отчетом (Fang et al., 2016). Из них только одна INDEL давала отношение SNP/INDEL=1. Эта INDEL содержала делецию в гене размером 4 п.о., которая присутствовала в области стыка экзон-интрон четвертого интрона LOC_Os08g42540. Маркер dCAPS1 также проявляла на основе этой делеции в 4 п.о. Таким образом, LOC_Os08g42540 представляет собой ген-кандидат на WTG1.

Конструкции и трансформация растений.

Праймеры C99-WTG1-GF и C99-WTG1-GR были использованы для амплификации геномной последовательности WTG1, содержащей 2337 п.о. 5'-фланкирующей последовательности, ген WTG1 и 1706 п.о. 3'-фланкирующей последовательности. Затем геномную последовательность встраивали в вектор PMDC99 с использованием набора для клонирования GBclonart Seamless Clone Kit (GB2001-48, Genebank Biosciences) с получением конструкции gWTG1. Праймеры 003-CDSWTG1-F и 003-CDSWTG1-R были использованы для амплификации CDS гена WTG1. CDS встраивали в вектор pIPKb003 с помощью промотора ACTIN с использованием набора для клонирования GBclonart Seamless Clone Kit (GB2001-48, Genebank Biosciences), с получением плазмиды proACTIN:WTG1. Праймеры C43-CDSWTG1-F и C43-CDSWTG1-R были использованы для амплификации CDS гена WTG1. CDS встраивали в вектор PMDC43 с использованием набора для клонирования GBclonart Seamless Clone Kit (GB2001-48, Genebank Biosciences) с получением плазмиды pro35S:GFP-WTG1. Праймеры proWTG1-F и proWTG1-R были использованы для амплификации 3798 п.о. 5'-фланкирующей последовательности WTG1. Затем промоторную последовательность встраивали в вектор pMDC164 с использованием набора для клонирования GBclonart Seamless Clone Kit (GB2001-48, Genebank Biosciences) с получением плазмиды proWTG1:GUS. Плазмиды gWTG1, proACTIN:WTG1, pro35S:GFP-WTG1 и proWTG1:GUS были введены в *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 соответственно. GWTG1 переносили в wtg1-1, а proACTIN:WTG1, pro35S:GFP-WTG1 и proWTG1:GUS переносили в ZHJ, как описано ранее (Hiei et al., 1994).

Окрашивание GUS и субклеточная локализация WTG1.

Окрашивание GUS различных тканей (proWTG1:GUS) проводили, как описано ранее (Xia et al., 2013, Fang et al., 2016). Корни трансгенных линий pro35S:GFP-WTG1 были использованы для наблюдения флуоресценции GFP. Для наблюдения флуоресценции GFP была применена конфокальная микроскопия Zeiss LSM 710. Ядра клеток корней были помечены 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (1 мкг/мл).

Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ОТ-ПЦР в реальном времени.

Молодые метелки ZHJ и wtg1-1 и проростки трансгенных линий ZHJ и proACTIN:WTG1 использовали для выделения общей РНК с использованием набора для экстракции РНК (Tiangen, China). РНК (2 мкг) подвергали обратной транскрипции с получением комплементарной ДНК с помощью набора FastQuant RT (Tiangen, China) в соответствии с руководством пользователя. Количественную ОТ-ПЦР в реальном времени проводили как описано ранее (Wang et al., 2016). Было протестировано три копии для каждого образца. Список праймеров приведен в дополнительной табл. 1.

Анализ на деубиквитинизацию.

Кодирующие последовательности WTG1 и wtg1-1 были амплифицированы из комплементарной ДНК, транскрибированной из общей РНК молодой метелки с использованием праймеров MBP-WTG1-F/R и MBP-WTG1-F/MBP-wtg1-R, и клонированы в вектор pMAL-C2 с использованием набора GBclonart Seamless Clone (GB2001-48, Genebank Biosciences) для конструирования плазмид MBP-WTG1 и MBP-WTG1^{wtg1-1}, соответственно. Для конструирования MBP-WTG1^{D68E:C71S;H267R}, праймеры WTG1-WTG1-MutF и MBP-WTG1-MutR1 (с двумя сайтами мутаций) были использованы для амплификации первой части WTG1^{D68E:C71S;H267R}, а праймеры MBP-WTG1-MutF1 (с двумя сайтами мутаций) и MBP-WTG1-MutR (с одним сайтом мутации) использовали для амплификации второй части WTG1^{D68E:C71S;H267R}. Эти два продукта затем смешивали в качестве матриц, и праймеры MBP-WTG1-MutF и MBP-WTG1-MutR использовали для амплификации полной последовательности WTG1^{D68E:C71S;H267R}. И наконец, последовательность WTG1^{D68E:C71S;H267R} была клонирована в вектор pMAL-C2 с использованием набора для клонирования GBclonart Seamless (GB2001-48, Genebank Biosciences) в целях конструирования плазмиды MBP-WTG1^{D68E:C71S;H267R}. Плазмиду His-UBQ10 конструировали как описано в предыдущих исследованиях (Xu et al., 2016). Плазмиды MBP-WTG1, MBP-WTG1^{wtg1-1} и MBP-WTG1^{D68E:C71S;H267R} переносили в *Escherichia coli* BL21. Индуцирование, выделение и очистку белков MBP-WTG1, MBP-WTG1^{wtg1-1} и MBP-WTG1^{D68E:C71S;H267R} проводили в соответствии с предыдущими исследованиями (Xia et al., 2013). 15 мкл His-UBQ10 инкубировали с 2 мкл очищенного MBP, MBP-WTG1, MBP-WTG1^{wtg1-1} и MBP-

WTG1^{D68E;C71S;H267R} в 100 мкл реакционного буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 7,4, 100 мМ NaCl, 1 мМ DTT) при 30°C в течение 20 минут, соответственно. Продукты расщепленного убиквитина, MBP-WTG1, MBP-WTG1^{wtg1-1} и MBP-WTG1^{D68E;C71S;H267R} были проанализированы с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ. Антитела против His и против MBP использовали для детектирования расщепленного убиквитина и МРВ-меченых белков, соответственно.

Экстракция белков и Вестерн-блот анализ.

Листья трансгенных растений pro35S:GFP-WTG1 использовали для приготовления цитоплазматических и ядерных белковых фракций в соответствии с описанным ранее методом (Alvarez-Venegas and Avramova, 2005). Анти-GFP (Beyotime), анти-Bir (Abcam) и анти-H4 (активный мотив) антитела были использованы для обнаружения GFP-WTG1, Bir и гистона H4, соответственно.

Пример 3.

Для получения трансгенных растений с нокдауном OsOTUB1 применяли стратегию РНКи. Авторы встраивали два одинаковых сегмента кодирующей области OsOTUB1 "голова к голове" в промежуточный вектор pUCCRNAi, который содержал интрон оксидазы GA20 картофеля. С помощью pUCCRNAi-OsOTUB1, структуру РНК-интерференции вводили в бинарный вектор растения pCambia-actin-2300 с получением конструкции pActin::OsOTUB1-RNAi. Затем конструкцию OsOTUB1-РНКи переносили в рис с использованием системы трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. Трансгенные растения отбирали в среде Мурашига и Скуга (MS) в половинной концентрации, содержащей 50 мг/л G418, и G418-резистентные растения пересаживали в почву и выращивали в поле. Для идентификации трансгенных растений, гомозиготных по T2 с нокдауном OsOTUB1, проводили кол. ОТ-ПЦР. Как показано на фиг. 28a, сайленсинг РНКи OsOTUB1 показал ZH11-npt1-подобный фенотип. Кроме того, как показано на фиг. 28b, растения, экспрессирующие РНКи, имели повышенное число первичных ветвей на метелку, повышенное число вторичных ветвей на метелку и повышенное число зерен на метелку и, что самое важное, давали увеличение общего урожая зерна на растение.

Список последовательностей

Arabidopsis thaliana (AtOTUB1),

соя (GmOTUB1),

кукуруза (ZmOTUB1),

сорго (SbOTUB1),

ячмень (HvOTUB1),

дикая пшеница полба (TuOTUB1)

рис (OsOTUB1)

SEQ ID NO: 1: полипептид OsOTUB1

```

MGDDYYHSCCGDPDPDLRAPEGPKLPYVGDKPEPLSTLAAEFQSGSPILQEKIKLL
GEQYDALRRTRGDGNCFYRSFMFSYLEHILETQDKAEVERILKKIEQCKKTLADLGYIEF
TFEDFFSIFIDQLESVLQGHESIGAEELLERTRDQMVSDYVVMFFRFVTSGEIQRRAEFF
EPFISGLTNSTVVQFCKASVEPMGEESDHVHIALSDALGVPIRVMYLDRSSCDAGNISVN
HHDFSPEANSSDGAAAAEKPYITLLYRPGHYDILYPK

```

SEQ ID NO: 2: нуклеиновая кислота OsOTUB1 (кДНК от Zhefu802)

```

atggcgccgggactactaccactcgtgctgcggcgaccccgaccccgacctccgcgcggcaggggcccaagctgcggtac
gtcggggacaaggaacctctctccacttttagccgctgagttcagctggcagcccattttacaggagaaaaataagttgcttggaacag
tatgatgctttaagaaggacacgaggagatggaactgctttatcgaagctttatgtttcctacttggaacatatcctagagacacaagacaa
agctgaggttgagcgcattctaaaaaaattgagcagtgcaagaagactcttcagatcttgatacattgagttcacctttgaagatttcttc
tatattcattgatcagctggaaagtgttctgcaggacatgaatccctcatagggccgaagagcttctagaagaaccagggatcagatgg
tttctgattatgttgatcttcttaggtttgtcacctctggtgaaatccaaggagggtgagttcttcgaaccattcatctctggttgacaaatt
cgactgtggttcagttctgaaggcttccgtggagccgatggcgaggaaagtaccatgtccacataattgccctatcagatgcgttggtg
gtgccaatccgtgtgatgtacacagagctcatgtgatgctggaaatataagtgtaaccaccatgatttcagccctgaggccaattcat
cggacgggtgctgctgctgagaaacctacattcttgcctaccgtcctggtcactacgacattctaccggaagtga

```

SEQ ID NO: 3: нуклеиновая кислота OsOTUB1 (геномная от Zhefu802)

atggcgcgggactactaccactctgtctgcggcgaccccgaccccgacctccgcgcgcggaggggcccaagctgcgcgtatg
gtcggggacaagggtgagatgttgacgcctctctctcttctgtctctcgtcgcctttgactcatctgcgctttgactcatctgcgggtcgtatg
atftgttcatgtgtgtagaaatgggtctgaatcgtggtaagacgccagtggttgccatgccagtatccgctagtgtgccagcaggtgaggcga
tagatcagtcctgttagtctagtgttgatgctgattgttggtcatcattactgtttattgggtgtcctatttctatgtgaattgacattttaaggcgtcta
tacaagcagtggggactagaatttggataacaagtaacaatttcccttattgcgtcatcttaaaggataagaggagttatcatagatgctggattt
tctcctttatttttagtctgtggtgccttgaataatggagattggctgaacaagttcatatcagttgtgtccattttcatcctctggatgggtcagtcctt
aagtattgtcaggcgctattgtgtgagttgtaactgtgtactgtatttttagcttcggttggtgaactgattgttggagggtcatgcagaagtcag
aaccatggggaattagaatttggatgaacagacagcaattacctttctgtgttcttctaggaagaagggttattctgttatcatttgcgtggat
gtgctccttacttaatatatttgcagtggaataatagagatggccaacaagttgtccatagcgtattatgattctaggataaaagtgggtgtcatc
ctttaatcgtcacacctaggacaataaatgtgaaggacgaactgttgatgcagaataatagcctatgctagtcgaattcagcacagaaaactgag
gttaaatgtgtccaaaagtgtcagttgaaggttcacacataggtttacacgaacagaaacaaatctgcaaatatagtcctatgagaagggtggag
agctacatacacacaatttcatatgaaatggaaaatgatgttggcactaaacttggatttaggtcaagtagttagatatgttgatccctcaaatcat
ttgttctgttaattgcaagcacctttcacaaatggaggacactaatgcattgctatgattatctctgtgttgtacagttattttagggtcatcgtatga
ctttctctgtcttctcatttgtgttcattatgatacttttgaaaccttgcaggaacctctctccactttagccgctgagttcagcttgcgcagccccattt
tacaggagaaaaataaagggtccatatgggatttggcagttataatatgtaatagacataatttgggtgatctatcgtatcaatggatgggtgttcaattt
gttcttataatttctgttgggtctgcagttgcttgggtgaacagtatgatgctttaagaaggacacgaggagatggaactgctttatcgaaagctt
tatgttttctacttgggtattattttgtgtgttccatacaaaacttgcattttataaagctgatgatcttatcatttgcctttaggaacatatcctaga
gacacaagacaaaagctgaggttgagcgcatttcaaaaaaattgagcagtgcaagaagacttctgcagatcttggatacatttaggttcacctt
tgaagatttcttctctgtaagcttattgttacttgtgtgtgctccttacttatcgttcaattgctgttttgcacttatgccagatgtattccctct
gaatgatgtagaagatctgtccgattatttcatgatgctgttggcatttcccttttagatgttcttggaaataattttgtatgagctagtataatgaga
gctgtgtcatttctgtcatgcaacaaattaaatactagtgtctaactctgtgcattgttaataacttggaaaatgattagccttgaagattgtgtcc
attatataatattgttacttgttcttagttaggatcactcaccagtcaccccttgcgaagttcataatgtatcacttataagtaagctagcaaaacaaaa
ttggactgtttgtagccaccagaacccaaatagatggatttcacattatttctactggcttgggagttatttgatcgtatgctagtacaacgttg
aaatttgggtagttgagatgcgttttccaaaaggactccttattgggtgctgtatcacaactgggtgtttactttttacaaaaaaatgtaatcctt
tgcagtgcactcaaatattgcaacctccttcttattgttccaccctcattatttcagatattcattgatcagctggaaagtgttctgcagggaca
tgaatcctccatagggtaaatatcctagtagttatattgtatccttaatgcatatgaccaataatcatgtattaacaacaagaacattttgtaatgtt
tataaagtagtggcatgtccatcataaatgttttcttctgtagtgaatcattttgttttctgtatccttagggccggaagagctttagaagaacca
gggatcagatggttctgattatgggtttgtacatccagatagtgtgtagtatgccttctctgcttctcattatttaactatgtcttctttagttgtca
tgttctttaggtttgtcacctctgggtgaaatccaaaggagggtgcagttcttgcgaaccattcatcttggcttgacaaattcgaactgtgtgttcaggt
tagctccacttctcattttatgagggtttgtacagtcgttggggagggtattatgaggtacaatacctccagggtaccgggagttaccacacataa
gcataaaatgtgtgggtcccttccaaaggaccacaagaaatcttctcattatatttgaatgcacagagcagagagtacagacaataagacctg
cactctgcattttcattaaagtattttagatgtgagattatctatgtttatctctctgttagtatttttgcctgtgtttataatggaagttcattttctggg
aactgtcattcacaaaacaatgagttatcgtaccttgcatttagtagggaatttgggtgtaaaaaacattaaacttttcttcaattttgtgccttct
gcacaagggtgggtagggcatattgttggaacaaaagagtgcacaatgactaattatttagtatgcatcacactggagtatgatatactagtgtg
gaaagggttatggcaaaataccatgatatgagcttgatagattagcaggtccgtaagttttccaatgataatgtttattcattaaactgtagca
ggataaaatctacttatgcacctttttcatgagtagcaaaacatgcattctctggttggaaaaactgttcaagttgcagtggtgtattccaatccg
tgtttgtgtgacaagcaattgtcggagttactgatcctgagttcaattcaatttgcagttctgcaagggttccgtggagccgatgggcgaggaa
agtgacctgtccacataaattgccctatcagatgcgttgggtgtgccaatccgtgtgatgtacctagacagaagctcatgtgatgtcggaaata
taagtgtgaaccaccatgatttcagccctgaggccaattcatcggaoggtgtgtgtgtgtgtagaagcttaccatttctgtctaccgtcct
gttgcactacgacattcttaccggaagtga

SEO ID NO: 4: нуклеиновая кислота OsOTUB1 (кДНК от IR66167-27-5-1-6)

atggcgccgggactaciacctcgtgctcgccgcaccccgaccccgacctccgcgcgccgaggggcccgaagctgcctgac
gtcggggacaaggaacctctctccactttagccgctgagtttcagctcggcagccccatttcacggagaaaaataaagttgcttggtgaacag
tatgatgctttaagaaggacacgaggagatggaaactgctttatcgaagctttatgtttctactctggaaacatatctagagacacaagacaa
agctgaggttgagcgcattctaaaaaaattgagcagtgcaagaagactcttcagatcttggatacttgagttcaccttgaagattctctc
tatattcattgatcagctggaagtgtctgcaggacatgaatcctcataggggccgaagagcttctagaagaaccagggatcatgatgg
ttctgattatgtgtcatgttctttaggtttgcacctctggtgaaatccaaaggagggccgagttcttcgaaccattcatctcgttgacaatt
cgactgtggttcagttctgcaaggctccgtggagccgatggggcaggaaagtgcacatgtccacataattgccctatcagatgcgttgggg
gtgccaatccgtgtgatgtacctagacagaagctcatgtgatctggaaatataagtgtgaaccaccatgatttcagccctgaggccaattcat
cggacggtgctgctgctgctgagaaaaccttcattactttgctctaccctcctggtcactacgacattctctaccggaagtga

SEQ ID NO: 5: нуклеиновая кислота OsOTUB1 (геномная от IR66167-27-5-1-6)

atgggcggggactactaccactcgtgctgcggcgaccccgaccccgacctccgcgcggcaggggcccaagctgccgtac
gtcggggacaaggtgagatgttgacgcctctctctctctctctctcgtcgtcttgactcatctgcgttgactcatctgcggtcgataga
tttgtcatgtggtagaatgggtctgaatcgtgtaagacgccagtggtgccatgccagtatccgtagttgtccagcaggtgaggcgat
agatcagtcctgttagtctagttggatgctgattgttggtcatcattactgttgattggtgctccatttctatgtgaattgacattttaaggcgtctat
acaagcagtggggactagaatttggataacaagtaacaattcccttattgctgcatcttaaggataaggaggattatcagatgctggattt
ctcctttatttttagtctggtgctggaataatggagattggctgaacaagttcatatcagttgtgtccatttcatcctctggatggtcagtccta
agtattgtcaggcgctattgtgtgagttgtaactgttgactgtatttttagcttcgttggtgaactgatttggagggttcagcagaagtcaga
accatggggaattagaatttggatgaacagacagcaattaccttctggttctcttaggaaaagaagggttattctgtatcatttgcctggatgt
gctccttacttaattattatgcatggaataatagagatggccaaacaagttgtccatagcgtattatgattctaggataaaagtgtgtcatcct
ttaatcgtcacacctaggacaataatgtgaaggacgaactgttgatgcagaataatagcctatgctagtcaattcagcacagaactgagg
ttaatgtgtccaaaagtftcagttaagggtcacactaggatttacacgaacagaacaaatctgcaatatagtcctatgagaaggtggaga
gtacatacacacaatttcatatgaaatggaaaatgatgttgccactaaacttggatttagtcaagtagttagatattttagtgcctcaatttattt
tgttctgtaattgcaagcacctttcacaaatggaggacactaatgcatgtatgattatctctgtgttgtacagttattttaggctatcgtatgact
ttctctgctttcatttgttgcattattgatatctttgaaccttgcaggaaacctctctccacttttagccgctgagtttcagctggcagccccatttta
caggagaaaaataaagggtccataggttggcaggtataatgtaatagacatattttgggtgatctatcgtatcaatggatggtgttcaatttgt
tcttataatttctgttggctccagttgcttgggaacagatgatgctttaaagaaggacagaggagatggaaaactgtttttcgaagctttat
gtttctacttgggtatttttggctgtttccatacaaaacttgaacttttataagctgatgatcttatcatttgcctttaggaacatatcctagaga
cacaagacaaaagctgaggttgagcgcattctaaaaaaattgagcagtgcaagaagactcttgcagatctggatacattgagttcaccttgg
aagatttctctgtgaagcttttattgttacttgtgtggtcctccttacttactctgttcaatttctgttttgaacttatgccagatgattccctctga
atagatgaagatctgccgatttttcatgtatgcttgttgcatttcttttagatgttctcctggaataattttgtatgagctagtataatgagagc
ttgtgcatttctctgcatgcaacaataaataactagtgtctaactctgtgcattgttaataacttgaataatgattagccttgaagattgttcatt
atatatatgttacttctttagtaggacactaccagtcacccttctgaagttcataatgtatcactataagtaagctagcaaaacaaattt
ggactgttttagccaccagaccccaatagatggatttcacattatttctactggcttgggagttatttgcagtgctagtacaacgttgaa
attttgggtagttgagatgcattttcacaaggactccttattgtgtgctgatctacaactgggttttactttttacaaaaaatgtaatctccttg
cagtgacactcaaaattattgcaacctccttcttattgtccaccctcatttttcagatattcattgatcagctggaaaagtgttcgcaggacatg
aatcctccatagggttaataatctagagtataatttgccttaatgcataatgaccaataatcatgtataacaacaagcatttttgaattgttta
taaatgtaggcatgccatcataaatgtttcctctgtagtgaatctatttttctctgtatccttagggccgaagagctttagaagaaccag
ggatcagatgggttctgattatggtgtacatccagatgtgtatgcttctctgcttctcatttttaactatgtcttctttagttgtcat
gttctttaggttgtcacctctggtgaaatccaaaggaggccgaggttcttgaaccattcatctctggttgacaaatcagctgtggttcaggt
tagctccatacttccattgtatgagggtttgtacagttgttggggaggtattatgaggtacaatacctccaggtaccgggaggtaccacacataa
gcataaaatgtgtggtccttccaaggaccacaagaatctcttcatatttgaatgcacagagcagagagtacagacaaatagacctg
cactctgcattttcattaagtatttagatgtgagatttctatgtttatctctctgttagtatttttgcctgttttataatggaagttcattttctggg
aactgtcattcacaacaaatgagttatcgtaccctgccatttagtagggaatttgggtggttaaaaaccatttcttcaattttgtgccttct
gcacaagggtgggtagggcataatttgggaacaaaagagtgcaaatgactaattatttagtatgcacactggagtagtatatactagt
gaaagggtatggcaaaatccatgatagtagcttagatagcagggtcgttaagatttttccaatgataatgttttattcattaaactgtagca
ggataaaatctacttatgcacctttttcatgagtagcaacaatgcattctctggtttgaaaaactgttcaagttgcagtggttattccaatccg
tgtttgtgtgacaagcaattgctggagttactgacctgagttcaattcaatttgcagttctgcaaggcttccgtggagccgatgggcgaggaa
agtaccatgtccacataaattgccctatcagatgcgttgggtgtgccaatccgtgtgtatgtacctagacagaagctcatgtatgctggaata
taagtgtgaaccatgatttcagccctgaggccaattcatcgacgggtgctgctgctgctgagaaaccttacatttcttaccgtcct
ggctactacgacattctaccggaagtga

SEQ ID NO: 6: промоторная последовательность OsOTUB1 от Zhefu802

gagttgaagttgttgcgtgctcataagctactatctgctaataaggccacactcctagcattattagaactgagaatatcccaagcaa
 tgaagcgcaaaaaagtaaccgtttgaagacatgattgacatgggtcacatcaaacaccggacatcaacatctaattgtacataacaaggcc
 aaaaataatttcgatgctggtggtgctaccaagtcacagctatgatacttaagaatcaatcatgaatattacaaaatcaagtcaaaactacgttatgt
 attgaactcttataattactgcaacatatcacactggaatttctatggtaattcctcgccagccttatcctaccatcccttgcagtatattaagag
 catcaacaacaacatgattcaagacaacttttataaactgaacaacataaattgggaacaaaacaaaccacttggaggcatgattaggat
 aatcgggtattaaagaactggacatcacaattcacaactagatgttgaataatacctgtctcttcttggctcatggcaggtgtcagtgaaatata
 ctgatgctccaagagagctggaagcaccgtttccacgtaatacaaatgtccttttctgttgcgaatcaaccttaagggctctttgatgctat
 ctcttcaggcatgtcctttacaacttcacataaccttgggttgcctaatgaagtaatacaatcgaaaacgtctgcaaatccactgacagaga
 ataccaataagtgatgaactaccttttgaacagaaataaactgcataactacaagtagcacagtcgttcattctgtagatgtattctacacatag
 attcattccagtaggcagcaacctcaaaacttgggcagaaacattgttgcgttgagaaggcgcgcaaccgcaattccatcacatagctgaaga
 aacattcggagaataattacaaccaggagtaacataataacatagccagttgaaatcacattcgcttgcgaatgtgaaaatttataataat
 ctgaaaatttgattatgccactatatacatgcaacctgcctccacgacatttaatacatggagtagaagataaaacatatgatccccctcattga
 ccctactacttactacttgcgtgacggaacgatctaacagcgaaatccagaaaaccaactcatttgatcccaataacaacggagaga
 gaaacgctagccgagatcgcttaacgtacatcgctgcagctggttgagcccgcgtagcagtcgactccggatgataccattcctcctcg
 acggagctgcagaagaaggagggttcaaacggcaatcaccaccacagtcctcaagcagagatgtccactacccggatcttaaaccca
 aaccacaatacacggcgaggtctcaccggcattgccgccgccaccaccgcacgacggccactcgccaccggcgctgcgccc
 atgacccgcgaccccgacggcgacggcgactctccctaaagacaaaaggcagtaagcgagatccgtaagcttctggaacaatctcga
 gcatcagctgcaagaggtgaggctgggcccgtacctggaggtgggaagagtgaagaagaaaggcggagaggagggtggagagag
 gaggaagtagagcgcgggggcgaggaagatgacggtagggagatgcggacgctgcgcgcccaccacgcccggcgacgc
 cgacgacgacatcgctcgcggcgagaagcactggatctgacggccgcccctccacgcccggagtgagagcgctatataagctcgtca
 gaatgtgggcccgtgctatgtgggcccaccatgtcatcgacgcttataagatcgagcggtggcgtgaggaacccggtagggggtggg
 gggtaaccaatcgaaacgcgtaataactaccgcggttactttctcttatgacacgtgggcccactcttcttgcgaccacactgtcagt
 tacccttacggcctcactctgaggatctaaccgtaaaaacgaatttatcgagggttatccgcgaggggaaaaaacgcgacttattct
 cgcttcgcccagatctcggaagagaagaacacgcaccgcggggagaggggagagaagcggaagctccaccgaatcgaagcccc
 acacacgcgaagctggcgcgggagggcgccgacgcgacgcccgggaagcgcaaggcgggcgacggcgggggggggcgacgc
 cgcgggcgacggtcccgaggaggcggtgatgggggagggcgcgcgggcgagcccgggccccgagccggtcgtcgaggggggag
 gaggggggggggaggggtgaatcctaaccctagcgcggtgggggaggggtggtgaggggtgctcgactccgtgctggtcagagc
 tctcg

SEQ ID NO: 7: последовательность κДНК TuOTUB1

Atgggcggggactactaccacgcctgctgcggcgacccggaccccgaccacaagcccaggggacccaggtgcccgtacat
 cggtacaaggaacctctctccgcttagcagcagagttccagtcgtgcagccccattttacaggagaaaaataaagttgcttggtaacaata
 tgatgctttaaggcgaacacgaggagatggaactgctttatcgaagctttatgttctctacctggaacatatctagacacagaataga
 gctgaggttgagcgcatcctaaaaacattgaacagtgcaagatgacactttcaggtcttggatacattgaattcattttgaagacttctct
 atgttcattgaggagctgcaaatgttctgcagggacacgaaacttctattggcctgaagaactctagaagaaccaggatcaaacgac
 ttctgattatgttcatgttctttagttgttacctctggtgaaattcaaggagggtgagttcttgaaccattatttctggttgacaaattcg
 accgtggtcagtttcaagctctctgtgagccaatggcgaggaagcgaccatgtgcacattattgctctgtcagatcggttaggggtg
 ccaatccgctgtagtagtagaccgaagctcctgtgacacaggcaatctaagtgtaaccaccatgatttattctgtagccaattcctctg
 aaggtgatgctgcaatgggattaaatccggctgaggagaaccttactactctgctctaccggcctggtcactatgatattcttaccctaa
 g

SEQ ID NO: 8: последовательность κДНК HvOTUB1

Atgggcggggactactaccacgcctgctgcggcgaccccgaccccgaccccaagcccaggggacccaggtgcccgtacat
 cggtacaaggaacctctctccgcttagcagcagagttccagtcgtgcagccccattttacaggagaaaaataaagttgcttggtaacaata
 tgatgctttaagcggacacgaggagatggaactgctttatcgaagctttatgttctctacctggaacatatcttagacacagaagacaga
 gctgaggttgagcgcatcctaaaaacattgaacaatgcaagaagacactttcaggtcttggatacattgagttcattttgaggacttctct
 atgttcattgaggagctgcaaatgttctgcagggacacggaacttctattggcctgaagaactctagaagaaccaggatcagacgac
 ttctgattatgttcatgttctttagttgttacctctggtgaaattcaaggagggtgagttcttgaaccattatttctggttgacaaattcg
 accgtggttcagtttcaagctctctgtggagccaatggcgaggaagcgaccatgtgcacattattgctctgtcagatcggttaggggtg
 caatccgctgtagtagtagaccgaagctcctgtgacacaggcaatctaagtgtaaccaccatgatttattctgtagccaattcctctg
 aaggtgatgctgcaatgggattaaatccggctgaggagaaccttactactctgctctaccggcctggtcactatgatattcttaccctaa
 g

SEQ ID NO: 9: последовательность κДНК ZmOTUB1

atgggcgacgttcacagcgccgcacgctgctgggaggtggagaagagtgggcgggcccggaccctaaccctagcccga
 gcctcgccgctgctcggaccccggtcgtggtgagctctccatgggcgggactactaccgcgctgctgcccagagcccgatcccga
 atccccgagggcccaagctcgcgtgcttgggacaaggaacctctctctttagcagctgagttcagctctggcagcccattttaca
 gagaaaattaagttgcttggcgagcaatatggtgctttaagacgtacacgtggagatggaaactgctttatcgaagctttatgtttctacctg
 gaacacatcctagagacacaagacaagctgaggtgatcgcatcatggtaaaaattgaggaatgcaaaaaacacacctctctcttgata
 tattgagttcacttttaggactcttttcgatattcattgaactgctggaaagtgttctgcaggacatgaaactcctatagggttgtcactctg
 gtgaaattcaagagggtctgactctttgaaccgttatctggcttgacaaattcaaccgtggttcagttctgcaaggcttctgtggaacct
 tgggtgaggaaagtaccatgtgcacataattgccctatcagatgcactaggcgtagcaatccgtgttatgtacctagaccgaagctcgtgtg
 aactgtggaacctgagcgtgaatcaccacgatttcacccgtcgccaatgattcggagggtgatcgccacgacacctgctctgccac
 agagaaacctgacatcactttgctctaccgtcctggccactacgatatctctacccaaagtga

SEQ ID NO: 10: последовательность κДНК SbOTUB1

atgggcgacgtgccccagggcgccgcacgcccgggaaggaggaggaggactggaggagggggcggtgcccgcacct
 aacctagcccagcctgagcctcgccgctgctcggaccccgctgctggagctctccatggcggggactactaccgcgctgctg
 cggcgaccccgaccccgacatccccgaggggcccgaagctcgcgttggggaaggaacctctctctttagcagccgagttca
 gtctggcagccccatttacaagagaaaattaagttgcttggcgaaatattggtgctttaagacggacacgtggagatggaaactgctttat
 cgaagctttatgttctcacttggaaacacatcctagagacacaagacaagctgaggtgatcgcatcatggtaaaaattgaggattgcaag
 aagacgctctgctcttgatattgagttcacttttaggatttttgcgatattcattgatctggaaagtgttctgcaggacatgaaac
 tcctatagggttgtcactctgtgtgaaattcaagagggtctgactcttgaaccattcatatctggcttgacaaattcaactgtgttcagttct
 gcaaggcttctgtggaacctatgggtgaggaaagtaccatgttcacataattgccctatcggtgactaggtgtacctatccgtgttatgta
 cctagaccgaagctcgtgtgatactggcaatctgagtgtaatcaccatgatttcaccccttcctcaatgcttctgagggtgatgctgcgatg
 acatctactctgacgctgagaaacctacatcactttgctctaccgtcctggtcactatgatattctacccaaagtga

SEQ ID NO: 11: последовательность κДНК AtOTUB1

atgcagaatcagattgatattggtgaaggtgaagcggaagtgcctgcatcgatttcagcaattaagggtgaagaatggggaatt
 gttcatcagtggaagatcaacctctttcaagaagaagaagctgctaaagttccttatgttggtgataaggaacctctgtctagttagctgca
 gagtataatcaggagatccattttgctggagaagattaagatactggacagtcataatatacgaatccggcgaacaaggagatggaa
 attgcttctccgaagtttatgttctctaccttgagcatatattggaatcacaagatcgctgctgaagtcgactgatcaaggtcaattgtgagaa
 ttagaaagactctgcaaaacttaggtatagattttacattttaggactcttgcgttctccttgagcaactagatgacatttccaaggaa
 ctgaagagtataagctacgatgagctggttaacagaagtagatcagtcagtcagattacattgtaatttcttaggtttgtactgctg
 gtgatatacgaacgcgtgccgatttttcgagcctttataacaggcttatcaaatgcaacagtggtatgatttgaagctcctcggtcgaacca
 atgggggaagagagtgaccatattacataactgcttgcggacgcacttgggtgtgcaatccgtgtgtgatcttgaccgtagctcatgtga
 tagtggggcgctcactgtgaatcatcatgactttgttctgtgggcattaccaatgagaagatgaagaagcttctgctcatttataaccttgct
 gtatcgtccaggccattacgatatcctctaccccaagccatcttgaagggtatcagacaatgtggggaaa

SEQ ID NO: 12: последовательность κДНК GmOTUB1

Atgcagagtaagaagctgttgggaagatggggaataaagagtgtgactgctgtagggtctgaaattgatgggtggaccaat
 ttggggacgatgacataatgcagcagcagtatacaattcagctgaaggaggtaagaaagtccatctgtggcgacaaggaacctga
 gtacttagctgctgaatataatcaggcagtcctatcttgcgtggagaaaataaaggctgtgatgagcaatacgtgccattcgtctactcg
 aggagatggaaactgcttcttcgaagctttatgtttcatatcttgagcatgttatgaaatgtcaagaccaagcagaagtgtatcgtatccaagc
 caatgttgaaaaaagtagaaaagcactgcagacctgggttatgcagactgactttgaagatttttgcgttattccttgagcagctggaatct
 gttattcaagggaagagacttcataagtcataagagctgttcttagaagccgagatcagtcagtatctgattatgtcgttatgttttcagat
 ttgtacctctgccgaatacaaaagcgacagaattttgaaccattcatactaggcttaactaatacaacggtcgagcagtttgc aaatcat
 ctgttgaaccaatgggtgaagagcgaccatgtgcacattactgcccttcagatgattgggcattccagtcctgtgtgtaccttgaccg
 cagctcaagtatactggtggtgtcagtgtaaatcatcatgatttcagtcagtggtgatctccaaatgctagtgtgcagctctgaaaag
 aacattcttcatcacactatatactgctcgtgactatgacatcctctatccaaaatga

SEQ ID NO: 13: последовательность кДНК капусты китайской

Atgcagaatcagaatgatacgggtgaaggatgatgcggagctcgtcgtccatctcggctgaacaatggggatgctgttcagtg
gaggaaacctatcttcaagatgatgaagctgctaagttccttatgttggtgataaggagcctatgtctagttagctgcagagtaccaagcag
ggagccccatttgccttgagaagataaaggtagtgacagtcataatgttgcaatcaggcgaacaaggagatggaactgcttctccga
agttttatgttctctaccttgagcatatttggaaatcacaaagtggtgctgaagttgaccgtatcaagctaatgttgaaaaatgtagaagaatc
tgcagaacttagctacacagatttcacatttgaggactcttgcgttgctccttgagcaactagatgacatcctccaaggaggcgaagagtct
ataagctatgatgagctggtaacagaagtagagatcagctgtttccgactacattgtgatgttctcaggtttgtactgctggtgaaataaaa
acgcgtgctgagttctcgagcctttataacaggattatctaataccacagtgatcagttttgcaagacatcagttgaaccgatgggggaag
agagtaccattacataacagcttctgcggacgcgcttggtgttgcaatccgggtgtgtatcttgaccgtagctcatgtgatactggaggt
ggtgtcactgtgaaccatcacgacttgttcccggttgccagtgccactaatgagaaagaagaagcttctctgctgctcccttataacattgctc
tategtcaggccattacgatatcctctacccaaggatttgagaatgtgaaaaatga

SEQ ID NO: 14: аминокислотная последовательность TuOTUB1

MGGDYHACCGDPDPDPHKPEGPQVPYIGNKEPLSALAAEFQSGSPILQEKIKLLG
EQYDALRRTRGDGNCFYRSFMFSYLEHILETQDRAEVERILKNIEQCKMTLSGLGYIEFT
FEDFFSMFIEELQNVLQGHETSIGPEELLERTRDQTTSYVVMFFRFVTSGEIQRRAEFFE
PFISGLTNSTVAQFCKSSVEPMGEESDHVHIIALSDALGVPIRVMYLDRSSCDTGNL SVN
HHDFIPAANSSEGDAAMGLNPAEEKPYITLLYRPGHYDIL YPK

SEQ ID NO: 15: аминокислотная последовательность HvOTUB1

MGGDYHACCGDPDPDPKPEGPQVPYIGNKEPLSALAAEFQSGSPILQEKIKLLG
EQYDALRRTRGDGNCFYRSFMFSYLEHILETQDRAEVERILKNIEQCKKTL SGLGYIEFT
FEDFFSMFIEELQNVLQGHGTSIGPEELLERTRDQTTSYVVMFFRFVTSGEIQRRAEFFE
PFISGLTNSTVVQFCKSSVEPMGEESDHVHIIALSDALGVPIRVMYLDRSSCDTGNL SVN
HHDFIPAANSSEGDAAMGLNPADEKPYITLLYRPGHYDIL YPK

SEQ ID NO: 16: аминокислотная последовательность ZmOTUB1

MGDVPQAPHAAGGGGEWAGDPNPNPSLGGCSDPVSVELSMGGDYRACCGEP
DPDIPEGPKLPCVGDKEPLSSLA AEFQSGSPILQEKIKLLGEQY GALRRTRGDGNCFYRSF
MFSYLEHILETQDKAEADRMVKIEECKTLLSLGYIEFTFEDFFSIFIELLESVLQGHETPI
GFVTSGEIQRSSDFEFISGLTNSTVVQFCKASVEPMGEESDHVHIIALSDALGVPIRVM
YLDRSSCDTGNL SVNHHDFIPSANDSEGDAATTPAPATEKPYITLLYRPGHYDIL YPK

SEQ ID NO: 17: аминокислотная последовательность SbOTUB1

MGDVPQAPHA AEGGGGLEEGAVDPNPNPSL SLGGCSDPVSLELSMGGDYR
ACCGDPDPDIPEGPKLPCVGEKEPLSSLA AEFQSGSPILQEKIKLLGEQY GALRRTRGDG
NCFYRSFMFSYLEHILETQDKAEADRMVKIEDCKK TLLSLGYIEFTFEDFFAIFIDMLESV
LQGHETPIGFVTSGEIQRSSDFEFISGLTNSTVVQFCKASVEPMGEESDHVHIIALSDAL
GVPIRVMYLDRSSCDTGNL SVNHHDFIPSSNASEGDAAMTSTPDAEKPYITLLYRPGHY
DIL YPK

SEQ ID NO: 18: аминокислотная последовательность AtOTUB1

MQNQIDMVKDEAEVAASISAIKGEEWGNCSVEDQPSFQEEEA KVPYVGDKEP
LSSLA AEYQSGPILLEKIKILDSQYIGIRTRGDGNCFFRSFMFSYLEHILESQDRAEVDRI
KVNVEKCRKTLQNLGYTDFTFEDFFALFLEQLDDILQGTEESISYDELVNRSRDQSVSDY
IVMFFRFVTAGDIRTRADFFEPFITGLSNATVDQFCKSSVEPMGEESDHIHITALSDALGV
AIRVVYLDRSSCDSGGVTVNHHDFVPVGITNEKDEEASAPFITLLYRPGHYDIL YPKPSC
KVSDNVGK

SEQ ID NO: 19: аминокислотная последовательность GmOTUB1

MQSKEAVVEDGEIKSVTAVGSEIDGWTNFGDDDIMQQYTIQSEEAKKVPVSGD
KEPLSSLA AEYKSGPILLEKIKVLDEQY AAIRTRGDGNCFFRSFMFSYLEHVMKCQDQ
AEVDRIQANVEKSRKALQTLGYADLTFEDFFALFLEQLESVIQKETSISHEELVLRSD
QSVSDYVVMFFRFVTSAAIQKRTEFFEPFILGLTNTTVEQFCKSSVEPMGEESDHVHITAL
SDALGIPVRVVYLDRSSDTGGVSVNHHDFMPVAGDLPNASCSEKNIPFITLLYRPGHY
DIL YPK

SEQ ID NO: 20: аминокислотная последовательность капусты китайской

mqnqndtvkddaelaasisaeqwgccsveepsfqddeakvpvvgdkepmsslaeayqagspillekikvldsqvair
rtrgdgncffrsfmsfylehilesqdgaevdriklnveckrnlqnlgytdftdfdfalfleqlddilgggeesisydelvnrsrdqsvsdy
ivmffrfvtageiktraeffepftglstntvdqfcktsvepvmgeesdhihitalsdalgvairvvyldrsscdtgggvtnhhdvfpvgsg
tnekeassaapfitllyrpgghydilypklenvek

SEQ ID NO: 21: промоторная последовательность TuOTUB1:

[illegible]

SEQ ID NO: 22: промоторная последовательность HvOTUB1:

aatacagaagtagcgaactcaggtacccaggaagtgcatcacgtctcctcagggttaagtcattgactgggagtcctcg
gtgttcacacaaggtcaagatatctactggctttccccccttcagagacagcaagaaagcacgccaccactgtcctttcaacatgtgattta
taggtgttcaatgctgtcaactgcaacaagcgatggcgcgtggtatgtgcagcatgtttgaaatcaaaatgcttgcacagtatatatga
aaatgaacgatgagaagaggtatatactggggagtgatgattgaatgaaggaggttattcttccatccgctgcttgcctgagctgccaa
acggaaggaatgagcagcggaataccaagtgatgtacaccttcttacagttaaagatcgcagctcaacaccaattgtttaagcttgctt
gcttccacgacgtaaaaatataaaaataaccactagtcacatagtcctccattcttaaacattccaacgctccgaaaatactgtcatatgaatt
catatatctagatgaatttagttctagatatatccattttatatattgtgcgataagtaatttcaggcggaggaggatataagtttttaaagattca
ctagggactacatacggatgtatatagacatactttagagtagatagatacatccatttgccttgcagctctgtagtggaatctcaaaaaagac
ttatatttaagaacagaggagtagatttagtcccaaacacggagtgatgaagaacatggcccgtgcaattggaagtgtgtttaatgtatca
accgccagtggtgattgatgcacactccactcgttggcgcagaatgcatcatgcattgcatttgggttctagttaagcataactctcattga
cttgttaacaattgagatggacagttgttggaaatcgattctcctctagaagcaaaattgaccagggaacaagaacaaacaactctcagcc
aaagaatgaataagcagctaaagtatgtaaacattgcgatgcacacaataagaatccggttatggaaccaactctcaacaaactatgtaa
tgtgtgtatttcccagtgatggatcagattaatcacaggccattacaccacctgacagtagatcagtagctagttctgagcaatgcaaaattc
aaaaattatacatatcccccaaaaaatttctgcttgttagttatctaagaacaagtttcaacctatctataccctcaaatgttgagttgg
gcctgggcatatttccagttgcaaaaggaaatgccagaatgattcgttaggtagtaagtgtcgtgtacatgtctgagctactatctgaactca
ccgaaaacagtatccagaagggccatgatgcattgtttagtgatgataattgctctgtaaatcaagaggatgtgcagcttgcgactctgatg
aagaacggttctctgaagggcattacattatgccactgcagtagcaactcagccacaatgcgatctattagtcgctaccgataagaaggt
ggctgtgtgattggtccttgtttatgggtcactgtgcagttgtgctacaactgaactcacagaagcaatgttcaggagagctaatcc
cctccccagaatatactctcgtgatgagcatccacatggccttagctagttggtcctcctgagtcagcagccgtgtagtttgcgaaggc
cctctactcaagaccaatgtcttctgtagcccttgcatgttctcattgacagttaccatcttaccataatttcaagaacgtggcaacataagca
tcgctgttgactgaacatagtagtcgagagcagcttctgttgcctatgcacctctcaaaatcctcatgagtcaggagagacgatttagtata
cataattttagatcgaaagtgaagccctcagttccattagccccatcccagcagctaaataaatgtttgtctctgtaggaatacctagtgcttg
gaggataaatgctgttctcattggtgttagaggcacttccacgggtctccacagatgagcagcatccaatcaatacattcctgtcctccc
cacgtgcagcttcaatcgcatccagtgatttgaagaagggcactgtattcacatcgactgtaggcaaccataatctggttcaaatcaagggtg
aagtataagaaggtttgttattgcttgagaagcttcagatcttggcttctaccttctgttcaactggagtgcatgttagcaaccttggcag
taacaagcttgcagtgatgtgatatctgagaaaatacaggcatatacatcagcatggggaaaaggcagatccaaaggtgaataattacaac
agcgaaaagttaaaattgacaacacaccaagaagtcagcaattaaatcaatgacacgatgaataggaaaatttagcaatttttaggttc
ataagaattgagagcaataaaatcataagacattgttacatcgcaagaactaactacagagtaacattaactaagtttacacaactagttatct
taaaggctttatttccgcaaatccgcatcttgagattatacctgtgaaaagtcttcttgactgatgacaatcattagaacagaaaccggcac
aaatttatcagtaggtcatcgatcgcaaaagcagacaacaatacaagattaggtgaagttgaagtggttgagttagtaagaattcatgtaacc
aacaatttaaggcagtgaaaatcttgcattgtatgaaactatgaattgacatcttagttaacaagaatttatcacgcgtagtatagtgatcag
tgtatttattcaattatgcatagtttttaaggagtcgaggcggtttaaggcggtgagggggggct

SEQ ID NO:: 24: промоторная последовательность ZmOTUB1:

tcaatacatttggaaagtacaatgaacatcacatcaaacatgtacaacattagaacacaactcaaaagatgtagtattaaataaggagaat
gaggtcaagttataaaatgaactaatcctaattaggagttgattactctataagtgttggaaacatatctcaaaaaggtaaagttagtaatttaaac
aagaaagagattaaatcataagatggacttatctcatttaggaatttgattattcttaagtgttatctataattacataacctaattctatttcatt
gagacctaaaagttaaaccaaatgaattcatgtaacacatattatctaactcacaagattaaatatatttaactcctagggtcttctttttattat
ttcattaaatgaataaatcaacatatacattaaactatacttaggtgtaaaattaaagtcacagaccatagatgaacttaatttattggacag
agaataattatgaacattttacaatttgaaccactaaattggagttcatatgaaaaagatatgaaataaacaagtttgaagttgaaatatgaa
attagggtcaatttgtgattaaataaagttacagggggtatccaaaagaaccaggggcctacgcgctaaaacagaggacgtcgggttg

attctctaaagcagagctgtcttaagtaaaacttacagtggaagggtacgggttaacctcgggtcatcagatcagagataaacgacaa
ggattagatcgcgtgggcgcgggcgcggtggacgcgactaacaggcggggacggggcgctcagcgagtcagggcgggctgaccagccg
ggccacggggcagggcgcgaggtgagggggagaaaggagagcgggccggatctagatcggagcgctgcgattagatccgcaataatg
aaacctaaaccgcacgatctcggacgaacgcccagatctatgactggggcgggacacaaacgcgggtggcgccgctcggtcccgcgc
cgacagtgagcgggtggcgaagctctctgttcgcgcgggcagagcgagagagagagggcgaggggggttggctgagggcgcaagtggagc
gagggggaggtggcgagcagggcgcggggctcaaaaggagcagggcgcggggacgtggccggagaacgcgcggacgtggcg
cgtccaccgcgggggatcgtggcgggaggttggggatgaccgacaggtgggctcgtgggacagagagagagagagagcggg
cgcgaggggaaaggacgacgtcgacaactcgggtccacagagcagcgagagagggggagagagggcgcgctggagagacagac
agacagcgcggggtccgctgtcagcgtggcgggcgcgggcgcgcgcaagctgggcccgaacttgggctaactgggccaagtggct
ttttctattccagggaattttctatttctttttatttttctctagggtttcaattcaaattcaaatctagtttcaattcaaaccaaatcaaatgt
gcaacaattcaagaataatttaggctcaatgatgcaacatttcatgactcatatgttttgggcaaaataaaataaatccctcactaattaac
taaccttaatacaaaagaggaagggggagagaaactagagagagaaactagagttagatagagaagagtaaacctgaatttggat
gataatfatgaagaaattttataccccaattcagggtgttacaatcgtgtgacactatttttgcgcgcgctgcacaggcgctggcggtggg
agggtgaagtcgtggtagcatcaggtgccacattagattcttaataagattatttactagttggtgtctcatacttggctacggtattatatact
catccgtccataataaaggcgtaaccatttttggcttgcctccacataataagacatgctctctctatgcatacgtacattaatgcagtgat
agagaaaaataataatttctggtatttgaaccagagggtgtacgccttatatactaggacagaggagtagtatataaataggatttagat
atttattcaaatgtaactattgtttatttctaaacactaaagtgatgtgtggtcgtggtggttagctccaaatttctgaagcagggggcgctgggctcga
gtagtgtccctgcatttttgcgcggtgtgatgggtgggctagagtgtcagaagggtgaagctgtgatatcatcatgtgccacattagattctt
aatagattagtagattataattattactaggtagtgtgtccgctgtgtccacgaggctgagaagcgtggggaggggcgcttaagctacaaa
tataattttgtttattgtaaacactaaagtatgtgtgatctgatggttagccctaatttttagagcacaggatgtgagttgactgctcgtttgt
ctatttttggggctggacgtggggagagtgaaagccgtgtgaacactagggtgccacattaggttcttaatagatagtagatagattgtt
tatttgaacatatatgtgatctgggtggttagtctctaatttctaagcatagtgtgtgggttagtgctcgttctccactatttttgcgctggacg
taaagagagtgaaagtcgtatgacaccagggtacctacattagattcttaataagatagcaggggagtagaataatataatagaacttatatat
atgccgaagcttgtttatacattattctaacggtttattttaaataacatatatttttaatagcacgaataatgatgcaaatattttatggccttaa
caatttaaatagatttttttaatttttaggacttaattatacgcacttttgaacgcgctaagaataaacggttaataaacagggttatcc
SEQ ID NO: 25: промоторная последовательность SbOTUB1:
tattcaacctgagagcactgtagcagccttgacagtagaagcgtttgcatatgagggtttctgaaaacacacaacatatatcaatttggcg
agaatcaacctcaagatgaacaactaacattacataaaaaattatcataccaagagcctaataaggactgtgatagaattgaagaacg
aagggttaataaaaaatttctaggatatacattgtcattgccacaatcgtgaatcatagaatagctaaccacgcaaatctgttaggtacatac
agctgggaaggactaaactactcgttaccttattattcttatttactcaacctacatctttagaagatagtaggaaactaaaagattaggtaattaa
agtgggtgctgggtcgcaaaaagtcatataaccaacaataaaggatacccaattctcataatatatagacaggcatcttcaccatcaaaatt
catagtgtgacgtcctaaccaattaaggctcaggttcgttactgcaaaagggacaaaaagaattgataaatgcagatcactacagctttcaca
gtaagttctaagttgtaataaaaggaaatccagcaaaactaaaattttaaagggttacaaaaatgctacactaatagtttgtagaagtaggaag
gttatatttcaacaatagaataacaaaaaaccttattccatgtaaaagtagcaattaccaactgctgggtcacatcagatgctaactctaaag
cataaatgactaaataaactgatttatacttcatcacggttagttgtagtactttcacatatactagtcacttagtcaggaaacagtaagtataaa
actattatacttcataaactattttccctcggttaggaataggaaatatgaactcttataaactataatatagtacaaccaagatgccaatctgt
gtcgtacaatttttttgaactgatttatttaccccccttcaacatactaataaagtgaatgaatataagaataacatattctattagatgtc
atgcaaaaccactgtaaactgtgaacgaatcactgtgaagcatgagtaagagcattagatatatttggaatggatggaaaatgcaaagga
tctatgagatatacaagcagtagctatctcttcttgattcatggcaggtgtcagtgagatgtattgatgtcctaagagagctggaagtacactt
caacataatacaaatgtcctttccgttactgcagtgcaaccttaaacgcgctcttggatgctatctccacaggcaagctcttataacttccacata

tcctctagtctgctcaatgaagtaataacatcgaaaacatctgcaaagccactgacagaacaatccaataagaactactgtaagcatatttca
aacagaactgaactatagaacttcaatcatatacctgactcattccaataggcggaacactgaagcagaatcatctgttgcgttcag
aagacgtgcaacccaattccgtcacatagctgcagaaacatcacaatagtatcatttagtgccctccagaactcataagcacaagatatg
aagttatgaacaaaagaaagcacaattgctttatggaacatcaagatcttctgactgaaagttcagcactctcagctcaggtcagagagtc
ctactccatgagtgctgctacgatactgacaaccagagcatgtttcggctaaaatcaatcatttgatctctacaggaaggaggaactctaac
cgaggctcttaacgtacatcacgtcgagctgggtgagaccaccgtagcagcttattcggtatgccgttctctctggacggagctgcaca
cacagcgagggcgtcaatcatcagtagctccaagtcagtatccaaattccaccccaaacagcgaggccttacctgactggtgccgtc
cgccaccacccgcacggcgccactccaccaaccgctgccccatagagccgagcccgaaggaggcagctctctgctacaaa
ccgaatgcggggttaaggaattgcgctagaacattctgagagggtctgggagtagcacgagggggcgagcgcgctaccggggggcggg
gagggtgacgaaggggcgccgacggcgccgacagggaggaagaaggagcgggcgcgaggaaggagggacggtagggaggaacc
ggaggcggtgctgcgcgaccacgcccggcggtgacatggcgggcgactcaccgtcgccggagccgcccgggtgaggcgct
ggatctgatcgccggtgctgcgctgtgatgaggaggagaagaatccactagcacactgcccacaccggagccgaccag
ggccttgtagtttcaatttttttcaaaatagaattagtagcacattcggttgatttgacaaatattgttcaatcatgaactaactaggcttaaaa
gattcgctcgttaattccgactaaactgtataattgatttttctgttatattaacttcatgtatgcgtctaaagatttgatgtagcggagaat
ctgaaaaattttcaaattttttaagtaacaaggccggcggttctctcagcagatgaaaaatgggtccagggccacatcggggtccca
cacgtcatccacaacagtgacacgtcgaatgggtggtgctgtggggcgctagagctggtagcctatagccaataggataggaacag
gtgggaccatgcttgagctacccccacatgtcagctcacgggagtgatccagttggagaggggttagacgttagtaaacggtgaacaac
aagggttatccgcaaacgacacggacgtatttccccgcttcccggttccacctgcgcccagatctcggaagagacgacgcaccgcag
gatc

SEQ ID NO: 26: промоторная последовательность GmOTUB1:

tctgttaataatcaataatttgataattataattttttatcatacaagtaataatgactacacatctttatcaaaattgaaagaagattga
aatctccttaatacaacttaactgattgtacaagttaaattaggatgcataaattataattacataattaaaaatttctcaatataattttgtctgaa
tttcttctcatagtatatgttcacttgaataatgataatgaaactaaaaataaaaaatataataataatgtgattagaaagaaagaa
aaagacaaaagaagaagaaaaagtaatatatacatatttaggtcaaatgacttttttaatttgatcttttcttaaaaaattattt
taatctttatgttttaattgattcgaatagtccttctgttaaaagcaatttaacaccattaataataaagataacccgccacaaaacataa
tttctttctgaaataatctccatactataattatacacatcaacaatttttaactctactataattttacaagtttgaaaaaatacacaacacat
gttctaacctccatgaacctagaacatccccacccataacaaaaacaattgcaacaattctaaattgggttagggcttcaattgcatatc
tttacaagcaaaacccaaaaacaatcttgattttgattcaaaaacttgagagaatttacaactctgtattcaaaaccaataaaaaattgcaca
acaatctccctctagtgctccttctctgtgtgctactactgctacaatgattatgagtttgaatgctattatcatcattgttctgctgcattgtt
cacttctgtgtcacaatttttaattgatgtttccaacgacgaatgaatccatcatattagaaaaaagtaacaaacgagcacaaatatacata
gatctaaattaatctacaaattaaaaaccaaacacatatatggtatcagtgagtggttaaaaaaataactataagtaaacaccattgtgactc
tgatggttctgatgatgacaacataaactattcaacgaagtcacaaaataactaatagttagggactaattgaaatcattttaaataaaaaataa
tcaaaataaactttataaaaaataaagattaaattgaaaaataagataaagaatcaaatagataatttaactatgttttattctttcaaggtt
tcattctgttgatatagaacttattatgaatcttttaaaagagtgaactgaagacctgtggttagaattataaaattttcaagggcataatttta
catttacaaggttttaaaactttcaaaatgaacgaatttttattgaaatgaaacattgttcaatctaaatattttatcatcgatttttaaaatgta
gattctattaaaaaatatcatctcaatattatctagggtgtattggattaagatttcaaaaggatttttaaaagactttttatgattaaaaagcttctgt
ggattcaatcaagacttttataaaatataaacaatctgtgtgattcaattagacaataaagatttttttcaggggcaacaaatctgttggtat
tcaattgagattttaccacttttaaaatgtcttttggtattcaaaagtaaatagatttttgaggattcttttggaatggattttgagagacttttag
ttagaaatacacataaaatactctcaacaatctcaccacacccctgagactttcataatcttcaaaagacttttctctcctgccgaacaag
acacaaaccactaccagggtttattctcttacaacttttcaatcaattttacctacttttaattgacaatcgatagtaaatattgttcatactatatgtata
ttacgcaaatcaaaagaaaagggtgctgtatatgcttcaagatttctgattcatattgtttcaacgtccaggcaatgaatgatcatcaaaagaat
gacaattgatatgcatcaagattcatattgcttttttttagtactgtatatgcaaatcaaaataaaaaacttttttttctgtttctcaactgtttttt
tacaacgtccattattattattattttctgtgtattattataaattataattatgattgtattattttttgacagcgtgtattattattattgt
gttaataatttttaattgtattgtgtattattattgtttttgtaaatgatttttttaaatgattttatgatatatgattatttttttgaaatgctaa
catgtgcccttaagacactgtttagtattatgaaccattgttcaacacagaagcaggaacgagaagatgctaataatggaggactaata
taggttcataatgagaagaatgctaataattaggcgcaacatgaagtgaatcactttgtattatttttaggcaataatgactttgtattaaa
agggttaaaattctatcggttttttttcttattcaaacattataatttattatcatcttttcttcttcttgaactccgttattttttgtttaaatgtat
taatctttcaaaatcttaaaatccataaagtactttgaaatcttaaaatctgtgttagaaatccattaaaaatcttgggttaagaatcctgattctaa
aaagcttttaaaaaaatcttttaaaatcccaaaaatcaatacatctcacaatcttttaaaatcttcaagattgtttgtcaaaatattctctca
aaatctcaatccaatacacttcttaaaaaatattattgtacgattaattataaattactataactataaaaaatcttcaattaattaacccgtcagc
gcc

SEQ ID NO: 27: промоторная последовательность BnOTUB1:

tgtttaatacatgtggcacttcactatgtggattgtggaccctcgtttattctaaagatggccttgggaattttatagatacaaa
aagtgggtaacatggaaatgtgcaacatcatattatcatcaccatctaatacatgactgaaagtgaattgagtatatggccttttaggattggcca
aagtaagcatgtaagattatgagccaatctgcaatgagtttttttattcttatttcttatttggcttctctctaatctttcacttttagcatgct
attattttgggaacgtgagattcttatgcctacttatgatcacttgtagttgtagctgtaccatgtttgggtttcaattatgaactttgataaaataac
gtttccgaatcaactttgattatgaactttgattcttgtaaaaaaaatcatattaagaaaaattagctgaaatttggtagcttattcctaaatc
gttatagaaaaattgggtccatcccaataggtttattgttttaataaacgatggcatttgagttctacatggatgtcactgtctaaagacaat
tttcttatcttttttgattaaatagatatccagacctatggaatatcaaaactatctccaaaagaagtatagctcacgagtttagatcatt
tgcgggtatccaaaataagttcactatctatagtagttccatctctcgtgaccacacataatttagtgcgtgggattgctttaaaccgaattgct
taactaacgggaattcgctgatcactcattgtttttctactccctcgttttataattgtaagtagtttagcaaaaaattgttttcacaataaa
gtagttttcatatttcaatgcacattttctttattgaattgtgtaaccaatcaataatgctagctttttataatagggtgaatttataaataaa
tattttttacaaaagcaacaatttcttaattagtggttttaactaaaactattacaatatgaacagagggagtatcatttaggtggtacataaca
cacgtaaaattctatttccataaaactgaattaaaaattgttgacaaaattcattgtcatctatttctcatttacaatttgactctacacctaataatgc
gaactgtcctttcttctttttcacaacgggaaccaatcgtgaactcttttaataacattttattgttttctggcaattgatcagtgcatatga
tcgaggagtttccatgaatatcatatgtgctacttgatcaaatgatgggctaatacatgctttacaatactcatgattgcaagccctgcaat
ctctggatccaaatgatttttcttcttttcatcatgatgatccacatttaattattacatgatgattcacgagaactaaaaagaagaact
tatatcaattcaatattatagaaattgctatagaaaaaccattcgttatcgttttcttaatttttttggccttttcatatggctattccaatgctttt
atgattattagcatgaacttgagcatgttctttatccccaaagaaagtaaaactacagatacatcgtatgataattgtgtatttataattattatga
cgatcgttttacaacatatatagaagagctgatgagtggtactgacgtaaatagtaattaacatatatcacttaactatataatgcataaagtc
aagtttgggtttgggttaaaaacgtacatcaaaccaacataatagttcagtttcttagtttaggtttgattatggccagtagatcgtaatcaa
ggctactattttgtgacaatgggttttttctgggttaattttgattttttttgttttaatttgcaagtcctccgcatactaaaagataaagctcgat
atatttgaattaaacgggaataatagcatagattcaatcatggacgtattatcttctagtacttttccacgctttcattaaaaaagaaca
cttatctacatactgataacaactaacatagataatfaaggtcgtttaagagtttagaaaaaaatgcaaaaagaaagaataatgttgatgttcg
tgtagatttttgggtacttttgaacgagcaaggatcaaaatcatcttcggaagaggagtatcaacctcacaaagtcacaagaataaagctac
tctacgcagaatagcaaacgtcaaaaaaatcaaaatatttatcttttggacaatagttgattgctataaatttctttacagtaaaaagtttaag
caatttctacggacataattatcacacctcatgtttactgtagcagagtcgaatgaattcacgcgcatcagcaataatctttttaacaaaca
gaaatagtgacatccatagatgataaaaccttaattttgtttcaaatccaccgaaacccctacattcgaataaagtataagctatcatatgt
tagttcattaccacagggtccacaacatctgtgcttcatcagctggtatcagaaccatattaagctttaaataatataatgaatcatcatgtgatta
ttgtgtgcgtttatgtgtagtccaattccgatttggctgtttactaacattcgcaaaagaggcccaaatattcgccattctactaacatgat
gtcgttccattattagcgaagccacatgcacgtcgttttaattcccataaacgcttcgttcttttattgtacattggaaaaagccaacgctcg
ttaccttttctgccctccaatcaaatgggtgtaaatcttttgggttctcttttccagaaatttttccctaaagttttgttttcttgaataaacattgca
gagtgcctccaaaccg

Информация о последовательности CRISPR

Рис

Пример I; ген OTUB1

SEQ ID NO: 28: последовательность-мишень OsOTUB1 CRISPR

tcagctggaagtggtctgcagg

SEQ ID NO: 29: протоспейсерная последовательность OsOTUB1 CRISPR

tcagctggaagtggtctgc

SEQ ID NO: 30: нуклеотидная последовательность tracr-PHK

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT

GAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 31: полноразмерная нуклеотидная последовательность ocrPHK Os

tcagctggaagtggtctgcGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC

CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 32: ocrPHK OTUB1 Os

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC

UUGAAAAAGUGGCACCAGUCGGUGC

SEQ ID NO: 33: полноразмерная конструкция нуклеиновой кислоты OTUB1 CRISPR
 TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTCTGTAGTTTTCCACAAACCATTTTTTA
 CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
 CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
 GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
 GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCTCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
 TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
 TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCTGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
 AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
 GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtcagctggaaagtgtctgcGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
 AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT
 TCAAGAGCTT

Пример II; ген OTUB1

SEQ ID NO: 34: последовательность-мишень OsOTUB1 CRISPR
 gactactaccactcgtgctgcgg

SEQ ID NO: 35: протоспейсерная последовательность OsOTUB1
 gactactaccactcgtgctg

SEQ ID NO: 36: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK OsOTUB1
 gactactaccactcgtgctgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
 CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 37: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U3-оцрPHK OsOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGACGCGTTGACATTGTAGGACTATATTGCTCTAAT
 AAAGGAAGGAATCTTTAAACATACGAACAGATCACTTAAAGTTCTTCTGAAGCAAC
 TTAAGTTATCAGGCATGCATGGATCTTGGAGGAATCAGATGTGCAGTCAGGGACC
 ATAGCACAAGACAGGCGTCTTCTACTGGTGCTACCAGCAAATGCTGGAAGCCGGGA
 ACACTGGGTACGTTGGAACACCGTGTGATGTGAAGGAGTAAGATAAACTGTAGGA
 GAAAAGCATTTCTAGTGGGCCATGAAGCCTTTCAGGACATGTATTGCAGTATGGGC
 CGGCCATTACGCAATTGGACGACAACAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGGCTAT
 CCACATAGATCAAAGCTGGTTTAAAAGAGTTGTGCAGATGATCCGTGGCAgactactacca
 ctgctgctgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACT
 TGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Пример III; ген OTUB1

SEQ ID NO: 38: последовательность-мишень OsOTUB1 CRISPR
 ccaccatgatttcagccctgagg

SEQ ID NO: 39: протоспейсерная последовательность OsOTUB1
 ccaccatgatttcagccctg

SEQ ID NO: 40: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK OsOTUB1
 ccaccatgatttcagccctgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
 CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

SEQ ID NO: 41: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U6b-оцрPHK OsOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGATGCAAGAACGAACTAAGCCGGACAAAAA
 AGGAGCACATATACAAACCGGTTTTATTCATGAATGGTCACGATGGATGATGGGGC
 TCAGACTTGAGCTACGAGGCCGACGGCGAGAGAAGCCTAGTGTGCTCTCTGCTTGT
 TGGGCCGTAACGGAGGATACGGCCGACGAGCGTGTACTACCGCGCGGGATGCCGCT
 GGGCGCTGCGGGGGCCGTTGGATGGGGATCGGTGGGTGCGGGAGCGTTGAGGGGA
 GACAGGTTTAGTACCACCTCGCCTACCGAACAATGAAGAACCCACCTTATAACCCCG
 CGCGCTGCCGCTTGTGTTGccaccatgatttcagccctgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
 AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT
 CAAGAGCT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с после-

довательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрПНК).

Пример IV; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 42: последовательность-мишень

agcggcggtgggggaggaggtgg

SEQ ID NO: 43; протоспейсерная последовательность

agcggcggtgggggaggagg

SEQ ID NO: 44: полноразмерная последовательность оцрПНК (протоспейсерная последовательность выделена (такая же, как в нижеследующих последовательностях)

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCTGTAGTTTTCCACAAACCATTTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAAGTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAAGTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCTGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGagcggcggtgggggaggaggGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
TTTCAAGAGCTT

Пример V; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 45: последовательность-мишень

Gggaggaggagggggggggagg

SEQ ID NO: 46 протоспейсерная последовательность

gggaggaggagggggggggagg

SEQ ID NO: 47: полноразмерная последовательность оцрПНК

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCTGTAGTTTTCCACAAACCATTTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAAGTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAAGTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCTGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGgggaggaggagggggggggGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT
TTTTCAAGAGCTT

Пример VI; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 48: последовательность-мишень

Ggggggaggaggagggggggggg

SEQ ID NO: 49 протоспейсерная последовательность

Ggggggaggaggaggagggggg

SEQ ID NO: 50: полноразмерная последовательность оцрПНК

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCTGTAGTTTTCCACAAACCATTTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAAGTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAAGTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCTGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGgggggaggaggagggggggGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT
TTTTCAAGAGCTT

Пример VII; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 51: последовательность-мишень

tcgaggggggaggaggagggggg

SEQ ID NO: 52; протоспейсерная последовательность

tcgaggggggaggaggagg

SEQ ID NO: 53: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTT
 CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
 CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
 GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
 GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
 TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
 TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
 AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
 GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtcgaggggggaggaggaggGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
 TTAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
 TTCAAGAGCTT

Пример VIII; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 54: последовательность-мишень

Gtcgtcaggggggaggaggagg

SEQ ID NO: 55; протоспейсерная последовательность

gtcgtcaggggggaggagg

SEQ ID NO: 56: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTT
 CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
 CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
 GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
 GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
 TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
 TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
 AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
 GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtcgtcaggggggaggaggGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
 TTAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
 TTCAAGAGCTT

Пример IX; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 57: последовательность-мишень

ggcagccgcggcccccgagccgg

SEQ ID NO: 58; протоспейсерная последовательность

ggcagccgcggcccccgagc

SEQ ID NO: 59: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTT
 CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
 CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
 GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
 GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
 TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
 TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
 AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
 GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGgcagccgcggcccccgagcGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
 TTAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
 TTCAAGAGCTT

Пример X; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 60: последовательность-мишень

tcccgaggaggcggtgatgggg

SEQ ID NO: 61; протоспейсерная последовательность

tcccggaggaggcggtgatg

SEQ ID NO: 62: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCCTGTAGTTTTCCACAAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtcccggaggaggcggtgatgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
TTTCAAGAGCTT

Пример XI; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 63: последовательность-мишень

cgccccgaagcgcaaggcgcg

SEQ ID NO: 64; протоспейсерная последовательность

cgccccgaagcgcaaggcg

SEQ ID NO: 65: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCCTGTAGTTTTCCACAAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGcgccccgaagcgcaaggcgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
TTTCAAGAGCTT

Пример XII; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 66: последовательность-мишень

gaagagaagaacacgcaccgcgg

SEQ ID NO: 67; протоспейсерная последовательность

gaagagaagaacacgcaccg

SEQ ID NO: 68: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCCTGTAGTTTTCCACAAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGgaagagaagaacacgcaccgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
TTTCAAGAGCTT

Пример XIII; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 69: последовательность-мишень

cccttacggcctccactctgagg

SEQ ID NO: 70; протоспейсерная последовательность

cccttacggcctccactctg

SEQ ID NO: 71: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCCTGTAGTTTTCCCACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTGTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGccttacggcctccactctgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT
TCAAGAGCTT

Пример XIV; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 72: последовательность-мишень

cactttctccttatgacacgtgg

SEQ ID NO: 73; протоспейсерная последовательность

cactttctccttatgacacg

SEQ ID NO: 74: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCCTGTAGTTTTCCCACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTGTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGcactttctccttatgacacgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT
TCAAGAGCTT

Пример XV; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 75: последовательность-мишень

tatataagctcgtcagaatgtgg

SEQ ID NO: 76; протоспейсерная последовательность

tatataagctcgtcagaatg

SEQ ID NO: 77: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCCTGTAGTTTTCCCACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTGTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtatataagctcgtcagaatgGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT
TCAAGAGCTT

Пример XVI; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 78: последовательность-мишень

cgagaagcactggatctgatcgg

SEQ ID NO: 79; протоспейсерная последовательность

cgagaagcactggatctgat

SEQ ID NO: 80: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGcgagaagcactggatctgatGTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAGT
TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT
TTCAAGAGCTT

Пример XVII; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 81: последовательность-мишень

gagaggaggaagtagagcgcg

SEQ ID NO: 82; протоспейсерная последовательность

gagaggaggaagtagagcg

SEQ ID NO: 83: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGgagaggaggaagtagagcgGTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAG
TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
TTCAAGAGCTT

Пример XVIII; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 84: последовательность-мишень

taaaccsaaccsacaatcacgg

SEQ ID NO: 85; протоспейсерная последовательность

taaaccsaaccsacaatca

SEQ ID NO: 86: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtaaaccsaaccsacaatcaGTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAGT
TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT
TTCAAGAGCTT

Пример XIX; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 87: последовательность-мишень

atgtaccattctctctcgacgg

SEQ ID NO: 88; протоспейсерная последовательность

atgtaccattctctctcga

SEQ ID NO: 89: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTCTGTAGTTTTCCACACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtatgtaccattctctcgaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
AAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT
TCAAGAGCTT

Пример XX; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 90: последовательность-мишень

aacgtacatcgcgctgcagctgg

SEQ ID NO: 91; протоспейсерная последовательность

aacgtacatcgcgctgcagc

SEQ ID NO: 92: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTCTGTAGTTTTCCACACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGaacgtacatcgcgctgcagcGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT
TTCAAGAGCTT

Пример XXI; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 93: последовательность-мишень

actatcttactactgtgcatgg

SEQ ID NO: 94; протоспейсерная последовательность

actatcttactactgtgca

SEQ ID NO: 95: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTCTGTAGTTTTCCACACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGactatcttactactgtgcaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT
TCAAGAGCTT

Пример XXII; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 96 последовательность-мишень

tcggaagaataattacaaccagg

SEQ ID NO: 97; протоспейсерная последовательность

tcggaagaataattacaacc

SEQ ID NO: 98: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAAGTACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCTGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtggagaataattacaaccGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT
TTCAAGAGCTT

Пример XXIII; промотор OTUB1

SEQ ID NO: 99: последовательность-мишень

gtaggcagcaacctcaacttg

SEQ ID NO: 100; протоспейсерная последовательность

gtaggcagcaacctcaact

SEQ ID NO: 101: полноразмерная последовательность оцрPHK

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAAGTACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCTGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGtaggcagcaacctcaactGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT
TTCAAGAGCTT

Дикая пшеница полба

Пример I; ген OTUB1

SEQ ID NO: 102: последовательность-мишень TuOTUB1 CRISPR

ttaaggcgaacacgaggagatgg

SEQ ID NO: 103: протоспейсерная последовательность; TuOTUB1 (двойная мишень)

ttaaggcgaacacgaggaga

SEQ ID NO: 104: нуклеиновая кислота оцрPHK TuOTUB1

ttaaggcgaacacgaggagaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT
CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 105 TuOTUB1; конструкция нуклеиновой кислоты кластера Uба-оцрPHK однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAAGTACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCTGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGttaaggcgaacacgaggagaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT
TTTCAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Пример II; ген OTUB1

SEQ ID NO: 106: последовательность-мишень TuOTUB1 CRISPR

attgctctgtcagatgcgtagg

SEQ ID NO: 107: протоспейсерная последовательность; TuOTUB1 (двойная мишень)

attgctctgtcagatgcggtt

SEQ ID NO: 108: нуклеиновая кислота оцрPHK TuOTUB1

AttgctctgtcagatgcggtGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC

CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 109: TuOTUB1; конструкция нуклеиновой кислоты кластера U3-оцрPHK однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGACGCGTTGACATTGTAGGACTATATTGCTCTAAT
AAAGGAAGGAATCTTTAAACATACGAACAGATCACTTAAAGTTCTTCTGAAGCAAC
TTAAAGTTATCAGGCATGCATGGATCTTGGAGGAATCAGATGTGCAGTCAGGGACC
ATAGCACAAGACAGGCGTCTTCTACTGGTGCTACCAGCAAATGCTGGAAGCCGGGA
ACACTGGGTACGTTGGAAACCACGTGTGATGTGAAGGAGTAAGATAAACTGTAGGA
GAAAAGCATTTTCGTAGTGGGCCATGAAGCCTTTCAGGACATGTATTGCAGTATGGGC
CGGCCCATACGCAATTGGACGACAACAAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGGCTAT
CCACATAGATCAAAGCTGGTTTAAAAGAGTTGTGCAGATGATCCGTGGCAattgctctgtc
gatgcgtGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT
GAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTCAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Ячмень

Пример I; ген OTUB1

SEQ ID NO: 110: последовательность-мишень HvOTUB1 CRISPR

ttaagacggacacgaggagatgg

SEQ ID NO: 111: протоспейсер Hv OTUB1

ttaagacggacacgaggaga

SEQ ID NO: 112: нуклеиновая кислота оцрPHK Hv OTUB1

ttaagacggacacgaggagaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT

CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 113: конструкция нуклеиновой кислоты кластера Uба-оцрPHK однодольного растения Hv OTUB1

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCTGTAGTTTTCCACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAAGTACCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAAGTACGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCTGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGttaagacggacacgaggagaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
TTTCAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Пример II; ген OTUB1

SEQ ID NO: 114: последовательность-мишень HvOTUB1 CRISPR

Attgctctgtcagatgcgtagg

SEQ ID NO: 115: протоспейсер Hv OTUB1

attgctctgtcagatgcggtt

SEQ ID NO: 116: нуклеиновая кислота оцрPHK Hv OTUB1

attgctctgtcagatgcggtGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC

GTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 117: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U3-оцрPHK Hv OTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGACGCGTTGACATTGTAGGACTATATTGCTCTAAT
AAAGGAAGGAATCTTTAAACATACGAACAGATCACTTAAAGTTCTTCTGAAGCAAC
TTAAAGTTATCAGGCATGCATGGATCTTGGAGGAATCAGATGTGCAGTCAGGGACC
ATAGCACAAGACAGGCGTCTTCTACTGGTGCTACCAGCAAATGCTGGAAGCCGGGA
AACTGGGTACGTTGGAAACCACGTGTGATGTGAAGGAGTAAGATAAACTGTAGGA
GAAAAGCATTTTCGTAGTGGGCCATGAAGCCTTTCAGGACATGTATTGCAGTATGGGC
CGGCCATTACGCAATTGGACGACAACAAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGGCTAT
CCACATAGATCAAAGCTGGTTTAAAAGAGTTGTGCAGATGATCCGTGGCAaattgctgtca
gatgcgttGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT
GAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Кукуруза

Пример I; ген OTUB1

SEQ ID NO: 118: последовательность-мишень ZmOTUB1 CRISPR

aagctttatgttttctacctgg

SEQ ID NO: 119: протоспейсерная последовательность ZmOTUB1

aagctttatgttttctacc

SEQ ID NO: 120: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK ZmOTUB1

aagctttatgttttctaccGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC

GTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 121: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U6а-оцрPHK ZmOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCTGTAGTTTTCCCAACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAAGTACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAAGTACTAGGAAGACGATG
GTTGATTTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTATGATACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAAGTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGaagctttatgttttctaccGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT
CAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Пример II; ген OTUB1

SEQ ID NO: 122: последовательность-мишень ZmOTUB1 CRISPR

attgccctatcagatgcactagg

SEQ ID NO: 123: протоспейсерная последовательность ZmOTUB1

attgccctatcagatgcact

SEQ ID NO: 124: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK ZmOTUB1

attgccctatcagatgcactGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC

CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 125: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U3-оцрPHK ZmOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGACGCGTTGACATTGTAGGACTATATTGCTCTAAT
AAAGGAAGGAATCTTTAAACATACGAACAGATCACTTAAAGTTCTTCTGAAGCAAC
TTAAAGTTATCAGGCATGCATGGATCTTGGAGGAATCAGATGTGCAGTCAGGGACC
ATAGCACAAGACAGGCGTCTTCTACTGGTGCTACCAGCAAATGCTGGAAGCCGGGA
ACACTGGGTACGTTGGAACCACGTGTGATGTGAAGGAGTAAGATAAACTGTAGGA
GAAAAGCATTTTCGTAGTGGGCCATGAAGCCTTTCAGGACATGTATTGCAGTATGGGC
CGGCCCATACGCAATTGGACGACAACAAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGGCTAT
CCACATAGATCAAAGCTGGTTTAAAAGAGTTGTGCAGATGATCCGTGGCAattgcctatc
agatgcactGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACT
TGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK). Сорго

Пример I; ген OTUB1 SEQ ID NO: 126: последовательность-мишень SbOTUB1 CRISPR
aagctttatgttctcctactgg

SEQ ID NO: 127: протоспейсерная последовательность SbOTUB1
aagctttatgttctcctact

SEQ ID NO: 128: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK SbOTUB1
aagctttatgttctcctactGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC
GTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 129: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U6a-оцрPHK ZmOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTTTTCTGTAGTTTTCCCAACAACCATTTTTTA
CCATCCGAATGATAGGATAGGAAAAATATCCAAGTGAACAGTATTCTATAAAATT
CCCGTAAAAAGCCTGCAATCCGAATGAGCCCTGAAGTCTGAACTAGCCGGTCACCT
GTACAGGCTATCGAGATGCCATACAAGAGACGGTAGTAGGAACTAGGAAGACGATG
GTTGATTCGTCAGGCGAAATCGTCGTCCTGCAGTCGCATCTATGGGCCTGGACGGAA
TAGGGGAAAAAGTTGGCCGGATAGGAGGGAAAGGCCAGGTGCTTACGTGCGAGG
TAGGCCTGGGCTCTCAGCACTTCGATTCGTTGGCACCGGGGTAGGATGCAATAGAG
AGCAACGTTTTAGTACCACCTCGCTTAGCTAGAGCAAACCTGGACTGCCTTATATGCGC
GGGTGCTGGCTTGGCTGCCGaagctttatgttctcctactGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT
CAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Пример II; ген OTUB1

SEQ ID NO: 130: последовательность-мишень SbOTUB1 CRISPR
tgttcacataattgccctatcgg

SEQ ID NO: 131: протоспейсерная последовательность SbOTUB1
tgttcacataattgccctat

SEQ ID NO: 132: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK SbOTUB1
tgttcacataattgccctatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC
GTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

SEQ ID NO: 133: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U3-оцрPHK SbOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGACGCGTTGACATTGTAGGACTATATTGCTCTAAT
AAAGGAAGGAATCTTTAAACATACGAACAGATCACTTAAAGTTCTTCTGAAGCAAC
TTAAAGTTATCAGGCATGCATGGATCTTGGAGGAATCAGATGTGCAGTCAGGGACC
ATAGCACAAGACAGGCGTCTTCTACTGGTGCTACCAGCAAATGCTGGAAGCCGGGA

ACACTGGGTACGTTGGAAACCACGTGTGATGTGAAGGAGTAAGATAAACTGTAGGA
GAAAAGCATTTTCGTAGTGGGCCATGAAGCCTTTCAGGACATGTATTGCAGTATGGGC
CGGCCCATACGCAATTGGACGACAACAAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGGCTAT
CCACATAGATCAAAGCTGGTTTAAAAGAGTTGTGCAGATGATCCGTGGCA_{tgctacataat}
_{tgccctat}GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT
GAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCTT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Соя

Пример I; ген OTUB1

SEQ ID NO: 134: последовательность-мишень GmOTUB1 CRISPR

_{attcgctgactcgaggagatgg}

SEQ ID NO: 135: протоспейсерная последовательность GmOTUB1

_{attcgctgactcgaggaga}

SEQ ID NO: 136: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK GmOTUB1

_{attcgctgactcgaggaga}GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC

CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

SEQ ID NO: 137: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U3b-оцрPHK GmOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTACTTTAAATTTTTTCTTATGCAGCCTGTGAT
GGATAACTGAATCAAACAAATGGCGTCTGGGTTTAAAGATCTGTTTTGGCTATGT
TGGACGAAACAAGTGAACCTTTAGGATCAACTTCAGTTTATATATGGAGCTTATATC
GAGCAATAAGATAAGTGGGCTTTTTATGTAATTTAATGGGCTATCGTCCATAGATTC
ACTAATACCCATGCCCAGTACCCATGTATGCGTTTCATATAAGCTCCTAATTCTCCC
ACATCGTCAAATCTAAACAAATCTTGTTGTATATATAAACTGAGGGAGCAACATT
GGTCA_{attcgctgactcgaggaga}GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT
CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Пример II; ген OTUB1

SEQ ID NO: 138: последовательность-мишень GmOTUB1 CRISPR

_{tactgcccttcagatgcattgg}

SEQ ID NO: 139: протоспейсерная последовательность GmOTUB1

_{tactgcccttcagatgcat}

SEQ ID NO: 140: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK GmOTUB1

_{tactgcccttcagatgcat}GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC

CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

SEQ ID NO: 141: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U6-1-оцрPHK

GmOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGAAGAAATCTCAAATTCGGCAGAACAAATTTGA
ATCTCGATCCGTAGAAACGAGACGGTCATTGTTTTAGTTCCACCACGATTATATTG
AAATTTACGTGAGTGTGAGTGAGACTTGCATAAGAAAAATAAAATCTTTAGTTGGGA
AAAAATTCAATAATATAAATGGGCTTGAGAAGGAAGCGAGGGATAGGCCTTTTTCT
AAAATAGGCCCATTTAAGCTATTAACAATCTTCAAAGTACCACAGCGCTTAGGTAA
AGAAAGCAGCTGAGTTTATATATGGTTAGAGACGAAGTAGTGATTG_{tactgcccttcagatgc}
_{at}GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
AAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Капуста

Пример I; ген OTUB1

SEQ ID NO: 142: последовательность-мишень BnOTUB1 CRISPR

_{atcaggcgaacaagaggagatgg}

SEQ ID NO: 143: протоспейсерная последовательность BnOTUB1
atcaggcgaacaagaggaga

SEQ ID NO: 144: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK BnOTUB1
atcaggcgaacaagaggagaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT
CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

SEQ ID NO: 145: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U3b-оцрPHK BnOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGATTTACTTTAAATTTTTCTTATGCAGCCTGTGAT
GGATAACTGAATCAAACAAATGGCGTCTGGGTTTAAGAAGATCTGTTTTGGCTATGT
TGGACGAAACAAGTGAACCTTTTAGGATCAACTTCAGTTTATATATGGAGCTTATATC
GAGCAATAAGATAAGTGGGCTTTTTATGTAATTTAATGGGCTATCGTCCATAGATTC
ACTAATACCCATGCCAGTACCCATGTATGCGTTTCATATAAGCTCCTAATTTCTCCC
ACATCGCTCAAATCTAAACAAATCTTGTGTATATATAACACTGAGGGAGCAACATT
GGTCAatcaggcgaacaagaggagaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAG
TCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

Пример II; ген OTUB1

SEQ ID NO: 146: последовательность-мишень BnOTUB1 CRISPR
tattcacataacagctttgtcgg

SEQ ID NO: 147: протоспейсерная последовательность BnOTUB1
tattcacataacagctttgt

SEQ ID NO: 148: последовательность нуклеиновой кислоты оцрPHK BnOTUB1
tattcacataacagctttgtGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC

GTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

SEQ ID NO: 149: конструкция нуклеиновой кислоты кластера U6-1-оцрPHK BnOTUB1 однодольного растения

TGGAATCGGCAGCAAAGGAAGAAATCTCAAAATCCGGCAGAACAAATTTTGA
ATCTCGATCCGTAGAAACGAGACGGTCATTGTTTTAGTTCCACCACGATTATATTTG
AAATTTACGTGAGTGTGAGTGAGACTTGCATAAGAAAATAAAATCTTTAGTTGGGA
AAAAATTCAATAATATAAATGGGCTTGAGAAGGAAGCGAGGGATAGGCCTTTTTCT
AAAAATAGGCCCATTTAAGCTATTAACAATCTTCAAAAGTACCACAGCGCTTAGGTAA
AGAAAGCAGCTGAGTTTATATATGGTTAGAGACGAAGTAGTGATTGtattcacataacagcttt
gtGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
AAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCAAGAGCT

(строчными буквами показана протоспейсерная последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью. Выделенная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую оцрPHK).

SEQ ID NO: 150; Cas9

atggctcctaagaagaagcggaaggttggtattcacggggtgcctgcggctgacaagaagtactccatcgccctcgacatcgg
 caccaacacgctgctggcggtgatccgacgagtagacaagggtccgtccaagaaggtcaaggtcctgggcaacaccgaccgccact
 ccatcaagaagaacctcatcgccgctctcttcgactccggcgagacggcgaggcgaccgctcaagcgacggcccgccg
 ctacaccgcccgaagaaccgcatctgtactccaggagatcttccaacgagatggcggaaggtcgacgactccttctccaccgctc
 gaggagtccttctcgtggaggaggacaagaagcacgagcgccacccatcttcggcaacatcgtcgacgaggtcgctaccacgagaa
 gtacccactatctaccaccttctaagaagcttggactctactgataaggctgatcttcgtctcatctaccttgcctcgtcacatgatcaag
 ttccgtggtcacttcttatcgagggtgaccttaacctgataactccgacgtggacaagctcttcatccagctcgtccagacctacaaccagc
 tcttcgaggagaacctataacgcttcgggtgctgacgctaaggcgatccttccgctaggctctccaagtcaggcgctcgtgagaacctc
 atcgccagctccgtggtgagaagaagaacggtcttttcgtaacctcatcgctctcctcgtgctgaccttaactcaagtcacactcg
 acctcgctgaggacgctaagcttcagcttccaaggatactacgacgatgatctcgacaacctcctcgtcagattggagatcagtagct
 gatcttctccttgcgtctaagaaccttccgatgctatctccttccgataatcctagggttaacactgagatcactaaggctccttcttgcctt
 catgatcaagcgctacgacgagcaccaccagacctcacctcctcaaggctcttgcgtcagcagctccccgagaagtacaaggagat
 cttcttcgaccagtcacaagaacggctacccggttacattgacggtggagctagccaggaggagttctacaagttcatcaagccaatccttg
 agaagatggatggtactgaggagcttctcgttaagcttaaccgtgaggacctccttaggaagcagaggactttcgataacggctctatccctc
 accagatccaccttgggtgagcttcacgccatcctcgttaggcaggaggacttctaccccttctcaaggacaaccgtgagaagatcgagaag
 atccttacttccgtattcctactacgttggctccttgcgtggttaactccggttcgcttgatgactaggaagtcgaggagactatcccc
 cttggaacttcgaggaggttggtaagaagggtcctccgacctcctcatcgagcgcatgaccaacttcgacaagaacctcccccaacgag
 aaggctctcccccaagcactcctcctctacgagtacttcacggtctacaacgagctaccaaggtcaagtcacgcaccgagggatgctgca
 agcctgccttctcctcggcgagcagaagaaggctatcgttgacctccttcaagaccaaccgcaaggctaccgtcaagcagctcaagga
 ggactactcaagaagatcgagtgcttgcactccgtcgagatcagcggttgaggaccgtttcaacgcttctcgtgactaccacgatct
 cctcaagatcatcaaggacaaggacttctcgcacaacgaggagaacgaggacatcctcgaggacatcgtcctcacttacttcttcgagg
 ataggagatgatcgaggagaggctcaagacttacgctcatcttctgatgacaagggtatgaagcagctcaagcgctcgggttacaccggt
 tggggtaggctctcccgcaagctcatcaacgggtatcaggagataagcagagcggaagactatcctcgacttctcaagctgatggttcgc
 taacaggaactcatgcagctcatccacgatgactcttaccttcaaggagatattcagaaggctcaggtgtccggtcagggcgactctct
 ccacgagcacattgctaaccttgcgtgttccctgctatcaagaagggtcactcctcagactgttaaggttgcgatgagcttgcgaaggttatg
 ggtcgtcacaagcctgagaacatcgtatcgagatggctcgtgagaaccagactaccagaagggtcagaagaactcgaggagcgcat
 gaagaggattgaggagggtatcaaggagcttgggtcagatccttaaggagcaccctgtcgagaacaccagctccagaacgagaagct
 ctaccttactacctccagaacggtagggatgtacgttgaccaggagctcgacatcaacaggcttctgactacgacgtcgaccacattgt
 tctcagcttcttcaaggatgactccatcgacaacaaggctcctcaggggtccgacaagaacagggttaagtcggacaacgtcccttccg
 aggaggttgcgaagaagatgaagaactactggaggcagcttctcaacgctaagctcattaccagagggaagttcgacaacctcacgaagg
 ctgagagggtggtcccttccgagcttgacaaggctggttcatcaaggcgagcttgttgagacgagcgagattaccaagcacgttgctca
 gatcctcgatttaggatgaacaccaagtacgacgagaacgacaagctatccgaggtcaagggtatcacctcaagtcgaagctcgtc
 tccgacttccgcaaggacttccagttctacaaggctccgagatcaacaactaccaccacgctcacgatgcttaccttaacgctgtcgttgg
 accgctcttatcaagaagtaccctaagcttgagtcgaggttcgtctacggtgactacaaggctctacgacgttcgtaagatgatcgccaagtcc
 gagcaggagatcggaaggccaccgccaagcttcttactccaacatcatgaacttctcaagaccgagatcacctcgcgaacggcg
 agatccgcaagcgccctctatcgagacgaacgggtgagactggtgagatcgtttgggacaagggtcgcgacttctgacttcttgcgaaggt
 ccttctatgcctcaggttaacatcgtaagaagaccgaggtccagaccggtggttctccaaggagtctatccttccaagagaaactcgga
 caagctcatcgctaggagaagaggtgggacctaagaagtacgggtggttctgactccctactgtcgcctactcctcgtggtcgcca
 aggtggagaagggttaagtcgaagaagctcaagtcgtaaggagctcctcggcatcaccatcatggagcgctcctcctcgagaagaacc
 cgatcgacttctcagggccaagggtcaaggaggtcaagaaggacctcatcaagctcccaagtactcttcttcgagctcgagaa
 cggctgtaaggagatgctggttccgctggtgagctccagaagggttaacgagcttgccttcttccaagctgtaacttctctacctcgc
 ctcccactacgagaagctcaagggttccctgaggataacgacgagaagcagcttctcgtgagcagcacaagcactacctcgacgagat
 catcgagcagatctccgagttctcaagcgctcatcctcgtgacgtaacctcgacaaggtcctcctccgctacaacaagcaccgac
 aagccatcccgagcagggcgagaacatcatcccttctacgctcagaaacctcgcgccctcgtcttcaagcttacttcgacacca
 ccatcgacaggaagcggttacacgtccaccaaggaggttctcgacgctactctcatccaccagtcacatcaccggtcttctacgagactcgtatc
 gaccttccagcttgggtgataagcgctcgtcgtccacaaaaggccggacagggttaagaaaagaagtag

SEQ ID NO: 151: последовательность нуклеиновой кислоты Cys4-P2A-TaCas9

5'ATGGACCACTACCTCGACATCAGGCTCAGGCCAGACCCAGAGTTCCCACCA
GCCCAGCTCATGTCCGTCTCTTCGGCAAGCTCCACCAGGCCCTCGTGGCCCAGGGC
GGCGACAGGATCGGCGTGTCTTCCCAGACCTCGACGAGTCCAGGTCCAGGCTCGG
CGAGAGGCTCCGCATCCACGCCTCCGCCGACGACCTCAGGGCCCTCCTCGCCAGGCC
GTGGCTGGAGGGCCTCAGGGACCACCTCCAGTTCGGCGAGCCAGCCGTGGTGCCAC
ACCCAACCCATACAGGCAAGTGTCCAGGGTGCAAGCCAAGTCCAACCCAGAGAGG
CTCAGGAGGAGGCTCATGAGGAGGCACGACCTCTCCGAGGAAGAGGCCAGGAAGC
GCATCCCAGACACCGTGGCCAGGGCCCTCGACCTCCCATTCTGTGACCTCAGGTCCC
AGTCCACCGGCCAGCACTTCCGCCTCTTCATCAGGCACGGCCCACTCCAGGTGACCG
CCGAGGAGGGCGGCTTTACCTGCTACGGCCTCTCCAAGGGCGGCTTCGTGCCGTGGT
TCGGCTCCGGCGCCACCAACTTCTCCCTCCTCAAGCAAGCCGGCGACGTGGAGG
AGAACCCAGGCCCAATGGACAAGAAGTACTCGATCGGCCTCGACATCGGGACGAATC
AGTTGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCTAAGAAGTTCAAGGTCCT
GGGGAACACCGACCGCCATTCCATCAAGAAGAACCCTCATCGGCGCTCTCTGTTCGACAG
CGGGGAGACCGCTGAGGCTACGAGGCTCAAGAGAACCGCTAGGCGCCGGTACACGAGA
AGGAAGAACAGGATCTGCTACCTCCAAGAGATTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTTGAC
GATTCATTCTCCACCGCCTGGAGGAGTCTTCCTCGTGGAGGAGGATAAGAAGCACGAG

CGGCATCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTTGCCTACCACGAGAAGTACCCTACG
 ATCTACCATCTGCGGAAGAAGCTCGTGGACTCCACCGATAAGGCGGACCTCAGACTGATC
 TACCTCGCTCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGCGGCCATTTCTGATCGAGGGGGATCTC
 AACCCAGACAACAGCGATGTTGACAAGCTGTTTCATCCAATCGTGCAGACCTACAACCAAC
 TCTTCGAGGAGAACCCGATCAACGCCCTCTGGCGTGGACGCGAAGGCTATCCTGTCCGCG
 AGGCTCTCGAAGTCCAGGAGGCTGGAGAACCTGATCGCTCAGCTCCCAGGCGAGAAGAA
 GAACGGCCTGTTTCGGGAACCTCATCGCTCTCAGCCTGGGGCTACCCCCGAACCTCAAGTC
 GAACTTCGATCTCGCTGAGGACGCCAAGCTGCAACTCTCCAAGGACACCTACGACGATGA
 CCTCGATAAACCTCCTGGCCCAGATCGGCGATCAATACGCGGACCTGTTCTCGCTGCCAA
 GAACCTGTCGGACGCCATCCTCCTGTCAGATATCCTCCGCGTGAAACCCGAGATCACGAA
 GGCTCCACTCTCTGCCTCCATGATCAAGCGCTACGACGAGCACCATCAGGATCTGACCCCT
 CCTGAAGGCGCTGGTCCGCCAACAGCTCCCGGAGAAGTACAAGGAGATTTTCTTCGATCA
 GTCGAAGAACGGCTACGCTGGGTACATCGACGGCGGGGCCCTACAAGAGGAGTTCTACA
 AGTTCATCAAGCCAATCCTGGAGAAGATGGACGGCACGGAGGAGCTCCTGGTGAAGCTC
 AACAGGGAGGACCTCCTGCGGAAGCAGAGAACCTTCGATAACGGCAGCATCCCCACCA
 AATCCATCTCGGGGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGGCAAGAGGACTTCTACCCTTTCTCT
 CAAGGATAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCATACTACGTCGG
 CCCTCTCGCGCGGGGGAACCTCAAGATTGCTTGGATGACCCGCAAGTCTGAGGAGACCA
 TCACGCCGTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCTAGCGCTCAGTCGTTTCATC
 GAGAGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTCCCTAAGCACTCG
 CTCTGTACGAGTACTTCACCGTCTACAACGAGCTCACGAAGGTGAAGTACGTCACCGAG
 GGCATGCGCAAGCCAGCGTTCTGTCCGGGGAGCAGAAGAAGGCTATCGTGGACCTCCT
 GTTCAAGACCAACCGGAAGGTCACGGTTAAGCAACTCAAGGAGGACTACTTCAAGAAGAT
 CGAGTGCTTCGATTTCGGTCGAGATCAGCGGCGTTGAGGACCGCTTCAACGCCAGCCTCG
 GGACCTACCACGATCTCCTGAAGATCATCAAGGATAAGGACTTCTGGAACAACGAGGAGA
 ACGAGGATATCCTGGAGGACATCGTGTGACCCCTACGCTGTTTCGAGGACAGGGAGATG
 ATCGAGGAGCGCCTGAAGACGTACGCCATCTCTTCGATGACAAGGTTCATGAAGCAACTC
 AAGCGCCGGAGATACACCGGCTGGGGGAGGCTGTCCCGCAAGCTCATCAACGGCATCCG
 GGACAAGCAGTCCGGGAAGACCATCCTCGACTTCTCAAGAGCGATGGCTTCGCCAACA
 GGAACCTTCATGCAACTGATCCACGATGACAGCCTCACCTTCAAGGAGGATATCCAAAAGG
 CTCAAGTGAGCGGCCAGGGGGACTCGCTGCACGAGCATATCGCGAACCTCGCTGGCTCC
 CCCGCGATCAAGAAGGGCATCCTCCAGACCGTGAAGGTTGTGGACGAGCTCGTGAAGGT
 CATGGGCCCGGCACAAGCCTGAGAACATCGTTCATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAAAACCA
 CGCAGAAGGGGCAAAAGAAGTCTAGGGAGCGCATGAAGCGCATCGAGGAGGGCATCAAG
 GAGCTGGGGTCCCAAATCCTCAAGGAGCACCCAGTGGAGAACACCCAAGTGCAGAACGA
 GAAGCTCTACCTGTACTACCTCCAGAACGGCAGGGATATGTACGTGGACCAAGAGCTGGA
 TATCAACCGCCTCAGCGATTACGACGTCGATCATATCGTTCCCCAGTCTTTCTGAAGGAT
 GACTCCATCGACAACAAGGTCTCACCAGGTCGGACAAGAACCGCGGCAAGTCAGATAAC
 GTTCCATCTGAGGAGGTCGTTAAGAAGATGAAGAACTACTGAGGCGAGCTCCTGAACGCC
 AAGCTGATCACGCAAGGAAGTTCGACAACCTCACCAAGGCTGAGAGAGGCGGGCTCTC

AGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTCGAGACCAGACAAATCACGA
 AGCACGTTGCGCAAATCCTCGACTCTCGGATGAACACGAAGTACGATGAGAACGACAAGC
 TGATCAGGGAGGTTAAGGTGATCACCTGAAGTCTAAGCTCGTCTCCGACTTCAGGAAGG
 ATTTCCAGTTCTACAAGGTTTCGCGAGATCAACAACCTACCACCATGCCCATGACGCTTACCT
 CAACGCTGTGGTCGGCACCGCTCTGATCAAGAAGTACCCAAAGCTGGAGTCCGAGTTTCGT
 GTACGGGGACTACAAGGTTTACGATGTGCGCAAGATGATCGCCAAGTCGGAGCAAGAGAT
 CGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAG
 ATCACGCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGAGACCGCTCATCGAGACCAACGGCGAGAC
 GGGGGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGATTTTCGCGACCGTCCGCAAGGTTCTCTCCA
 TGCCCCAGGTGAACATCGTCAAGAAGACCGAGGTCCAAACGGGCGGGTTCTCAAAGGAG
 TCTATCTTGCCTAAGCGGAACAGCGACAAGCTCATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCA
 AAGAAGTACGGCGGGTTTCGACAGCCCTACCGTGGCCTACTCGGTCTCTGGTTGTGGCGAA
 GGTGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTCAAGAGCGTGAAGGAGCTCCTGGGGATCACCA
 TCATGGAGAGGTCCAGCTTCGAGAAGAACCCAATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACA
 AGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTCCCCAAGTACTCTCTCTTCGAGCTGGAGA
 ACGGCAGGAAGAGAATGCTGGCTTCCGCTGGCGAGCTCCAGAAGGGGAACGAGCTCGC
 GCTGCCAAGCAAGTACGTGAACCTTCTTACCTGGCTTCCACTACGAGAAGCTCAAGGG
 CAGCCCGGAGGACAACGAGCAAAAGCAGCTGTTTCGTCGAGCAGCACAAAGCATTACCTCG
 ACGAGATCATCGAGCAAATCTCCGAGTTCAGCAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCGAACCC
 TGGATAAGGTCTCTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCAGAGAGCAAGCG
 GAGAACATCATCCATCTCTTACCCCTGACGAACCTCGGCGCTCCTGCTGCTTTCAAGTACT
 TCGACACCACGATCGATCGGAAGAGATACACCTCCACGAAGGAGGTCTTGACGCGACC
 CTATCCACCAGTCGATCACCGGCCTGTACGAGACGAGGATCGACCTCTCACAACCTCGGC
 GGGGATAAGAGACCCGAGCAACCAAGAAGGCAGGGCAAGCAAAGAAGAAGAAGTGA 3'

SEQ ID NO: 152; Отубаин-подобный домен

PYVGDKEPLSTLAAEFQSGSPILQEKIKLLGEQYDALRRTRGDGNCFYRSFMFSY
 LEHILETQDKAEVERILKKIEQCKKTLADLGYIEFTFEDFFSIFIDQLESVLQGHESIGAE
 LLERTRDQMVSDYVVMFFRFVTSGEIQRRAEFFEPFISGLTNSTVVQFCKASVEPMGEES
 DHVHIIALSDALGVPIRVMYLDRSSCDAGNISVNHDFSP EANSSDGA AAAEKPYITLLY
 RPHYDILYP

SEQ ID NO: 153; Мутированный OsOTUB1

ATGGGCGGGGACTACTACCACTCGTGCTGCGGCGACCCCGACCCCGACCTCC
 GCGCGCCCGAGGGGCCCAAGCTGCCGTACGTGCGGGACAAGGAACCTCTCTCCACT
 TTAGCCGCCGAGTTTCAGTCTGGCAGCCCCATTTTACAGGAGAAAATAAAGTTGCTT
 GGTGAACAGTATGATGCTTTAAGAAGGACACGAGGAGATGGAAACTGCTTTTATCG
 AAGCTTTATGTTTTCTACTTGGAACATATCCTAGAGACACAAGACAAAAGCTGAGGT
 TGAGCGCATTCTAAAAAAATTGAGCAGTGCAAGAAGACTCTTGCAAGATCTTGAT
 ACATTGAGTTCACCTTTGAAGATTTCTTCTCTGTCTTTATTGTTACTTTGTGTGGCCCT
 CCTTACTTATCCTGTTCAATTGCTGTTTTGCAACTTATGCCAGATGTATTCCTCTGA
 ATAGTATGAAGATCTGTCCGATTATTTTCATGTATGCTTGTTTGCATTTCTTTTAG

ATGTTCTGGAATAATTTTTGTATGAGCTAGTTATAATGAGAGCTTGTGCATTTTCCT
GTCATGCAACAAATTAATACTAGTGTCTAATCCTTGTGCATTGTTAATAACTTTGA
AAATGATTAGCCTTGAAGATTGGTCCATTATATATATGTTCACTTGTTCCTTAGTTAG
GATCACTACCCAGTCACCCCTTCTGAAGTTCATAATGTATCACTTATAAGTAAGCTAG
CAAAACAAAATTTGGACTGTTTGTAGCCACCCAGAACCCAAATAGATGGATTTCAC
ATTATTTTCTACTGGCTTTGGGAGTTATTTGATCGATGCTAGTACAACGTTGAAATTT
GGGTAGTTGAGATGCATTTTTCACAAAGGACTCCTTTATTGGTGCTTGATCTACAAC
TGGTGTTTTACTTTTTTACAAAAAATGTAATCTCCTTGCAGTGCCTCAAATTATTG
CAACCTCCTTCCTTATGTTCCACCCCTCATTATTTTCAGATATTCATTGATCAGCTGG
AAAGTGTCTGCAGGGACATGAATCCTCCATAGGGGCCGAAGAGCTTCTAGAAAGA
ACCAGGGATCAGATGGTTTCTGATTATGTTGTCATGTTCTTTAGGTTTGTACCTCTG
GTGAAATCCAAAGGAGGGCCGAGTTCTTCGAACCATTATCTCTGGCTTGACAAATT
CGACTGTGGTTCAGTTCTGCAAGGCTTCCGTGGAGCCGATGGGCGAGGAAAGTGAC
CATGTCCACATAATTGCCCTATCAGATGCGTTGGGTGTGCCAATCCGTGTGATGTAC
CTAGACAGAAGCTCATGTGATGCTGGAATATAAGTGTGAACCACCATGATTTAG
CCCTGAGGCCAATTCATCGACGGTGCTGCTGCTGCTGCTGAGAAACCTTACATTACTTT
GCTCTACCGTCTGGTCACTACGACATTCTCTACCCGAAGTGA

SEQ ID NO: 154; мутация wtg OsOTUB1

MGGDYYHSCCGDPDPDLRAPEGPKLPYVGDKEPLSTLAAEFQSGSPILQEKIKLL
GEQYDALRRTRGDGNCFYRSFMFSYLEHILETQDKAEVERILKKIEQCKKTLADLGYIEF
TFEDFFSVFIVTLCPPYLSCSIAVLQLMPDVFLNSMKICPIIFMYACLHFLFRCSWNNFC
MS

SEQ ID NO: 155: промоторная последовательность NPT1 2,5 т.п.о. от IR66167-27-5-1-6

gagttgaagttggtgctgtcataagctactatctgctaaatgggcacactcctagcattattagaactgagaatatccaagcaa
tgaaagcgacaaaaaagtaaccggttgaagacatgattgacatggatcacatcaaacacggacatcaacatctaaatgtacataacaaggcc
aaaataattttcgtgctggttggtgctaccaagtcacgctatgatacttaagaatcaatcatgaatattacaatcaagtaaaactacgttatgt
attgaactcttataaattactgcaacatatcacactggaatttcctatggaattcctcgcagccttatcctaccatccctgcatgataaagag
catcaacaacaacatgattcaagaacaattttataacactgaacaacataaattgggaacaaacaaaccactggaggcatgattaggat
aatcggtallaaagaacatggacatcacaallcacaacatagatgllgaalaatccgtgclclclcllggclcalggcagggtgclaglgaaatata
ctgatgctccaagagagctggaagcaccggttccacgtaatacaaatgtcctttctgtgctcaatcaacctaaagggtccttttgatgctat
ctcttcaggcatgtccttcacaactccacataacctctggttgctcaatgaagtaatacaatcgaaacgtctgcaaatccactgacagaga
ataccaataagtgtgaactaccttttgaacagaaataaactgcataactacaagtagcacagtcgttcatctgtagagtattctcatacctag
attcattccagtaggcagcaacctcaacttgggcagaaacattgttgcttgagaaggcgcgcaaccgcaattccatcacatagctgaaga
aacattcggaagaataattacaaccaggagtaacataataacatagccagttgaaatcaattcgcttgcaatgtgaaattttcataaataat
ctgaaaatttgattatgccactatatacatgcaacctgcctccacgacatttatacatggagtagaagataaaacatatgatccccctcattga
ccctactatcttactactgtgcatggccgaacgatctaacagcgaaatccagaaagccaaactcattgatccactaacaacggagaga
gaaacgctagccgagatcgcttaacgtacatcgctgcagctggttgagcccgccgtagcagtcgacccgagtgatccattcctcctcg
acggagctgcagaagaaggagggttcaaacccgaatcaccaccacagtcctcaagcagagatgtccactacccggatccttaaaccca
aaccacaatacagggcgaggtctcaccggcattgcccccaccaccaccgacgacccgactcggccaccgcccgtgcgcccatt
atgaccccgacccccgacgacgagcgcgactcctccctaaagacaaaagcgagtaagcgagatccgtaagcttctggaacaatctcga
gcatcagctgcaagaggtgaggctgggcccgtacctggaggtgggaagagtgaagaagaaggcgagaggagggtggagagag
gaggaaagtagagcgcgggggcgagggaagatgaccgtaggaggtacggacgcggtgctgcgcccaccacgcccggcgacgc
cgacgacgacatcgctcgcgagagaagcactggatctgatcgccgcccgtccacgcccggagtgagagcatatataagctcgtca
gaatgtgggcccgtggtatgtgggcccaccatgtcatcgacgcttatcaagatcgagcgggtggcgtgaggaaaccggtagggggtggg
gggtaaccaatcggaacgctgaataactcaccgcggttacttctccttatgacacgtgggcccattcttcttgagcccactgtcagt
taccttacggtcctcactctgaggaatctaaacgtaaaacgaattatcgagggttaccgaggggaaaaaacgcgcacttattct
cgcttcgcccagatctcggaagagaagaacacgcacccgcggggagaggggagagaagcggaagctccaccgaatcgagcccc
acacacgcgaagctggcgaggagggcgacgcgagcgccggaagcgcaaggcgcgacggcgggggagggcgacgc
cgcgcgacggtcccgaggagggcggtgatggggagggcgcgcgagccgcccggagccggtcgtcaggggggag
gaggggggggggagggtgaatcctaaccctagcgcggtgggggagggaggtgggtggaggggtcgtcgactccgtgctggtcgagc
tctcg

SEQ ID NO: 156: последовательность κДНК DEP1:

atggggaggaggcggtggtgatggagcgccgaggcccaagtcgcccagggtacccggacgtgctgcccggcgggc
ggatgcagctggagggtgcagatcctgagccgcgagatcacgttctcaaggatgagcttacttcctgaaggagctcagccggtttctggt
ctggatgcattaaagataaatgagttgttggtacaaaacatgaccactaataccaacaagagaaggaggcacagatcttgcgctttt
ttcggtgatcggaataaattgtatctgcatcttctgcttctgactgttgcaagtgctcacccaagtgcaaaagaccaaggtgctcaatt
gttctgagctcatgctgagcagccatgctgtaagccaaactgcagtgctgctgctgctgggtcatgctgtagtcagactgctgctcat
gctgtaaacctaactgcagttgctgcaagacccttctgctgcaaacgaactgctgctgctcctgtccaagctgcagctcatgctgcgata
catgctgctgcaaacggagctgcacctgcttcaacatctttcatgcttcaaatccctgtacagctgcttcaagatccctcatgcttcaagtc
agtgaactgctctagcccaattgctgcacttgacccttccaagctgtagctgcaagggtgctgcttccaagctgtggatgcaacggct
gtggctgtccaagctgcggatgcaacgggtgtggctgtccaagctgcgggtgcaacggctgtggcctccaagctgcgggtgcaacggctg
cggctgctgcttctgcccgaatgcaaacggatgtggctgctgcttaccattgctgtagctgcaagccaagctgcaacggctgctgctg
gcgagcagtgctgcccgtgcccggactgcttctgctgctgctgctgctgctcagctgcttcaacatcttcaaatgctcctgctgctgctg
ctgctgagcctgtgcaagtgcccctgcacgacgcagtgcttcaagctgcccagctgctgctgcaagcggcagccttctgctgcaagtg
cagtgcttctgctgaggggcagccttctgctgagggacactgctgcagcctcccgaacgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
gtgctgcttctgcaagaattgtacagaggggtgtgcatgccacgggtgtgtaaccatgctgctcagtggtgcttattgtga

SEQ ID NO: 157: белок DEP1:

mgeeavvmeaprpkspprypdlcgrrmqlevqilsreitflkdelhflegaqpvsrsgcikeinefvgtkhdpkrrrrhr
scrflrwgsklcicisclycckspkckrprelncssscdepckpncsaccagsccspdcscckpncscktpscckpncscsc
pscsscdtsckpsetcfnifscfkslyscfkipscfksqcnsspnctctlpsscckgcacpscngcngcpcscngcngcpcscng
ggclpscngcngcscsaqckpdcgscstncscckpscngcgeqccrcadefscscpresscfnfkscscagccsslkcpcttqfcs
cqsscckrqpsscckqsscceqgpcceghccslpkpscpcscgcvwsknctegercprcrmpccclsgclc

SEQ ID NO: 158: последовательность κДНК dep1:

ATGGGGGAGGAGGCGGTGGTGTATGGAGGCGCCGAGGCCCAAGTCGCCGCCG
AGGTACCCGGACCTGTGCGGCCGGCGCGGATGCAGCTGGAGGTGCAGATCCTGAG
CCGCGAGATCACGTTCTCAAGGATGAGCTTCACTTCCTTGAAGGAGCTCAGCCGT
TTCTCGTTCTGGATGCATTAAGAGATAAATGAGTTTGTGTGTTACAAAACATGACCC
ACTAATACCAACAAAGAGAAGGAGGCACAGATCTTGCCGTCTTTTCGGTGGATCG
GATCAAAATTGTGTATCTGCATTTTCATGTCTTTGCTACTGTTGCAAGTGCTCACCCAA
GTGCAAAAGACCAAGGTGCCTCAATTGTTCTTGCAGCTCATGCTGCGACGAGCCATG
CTGTAAGCCAAACTGCAGTGCGTGCTGCGCTGGGTATGCTGCAGTCCAGACTGCTG
CTCATGCTGTAAACCTAACTGCAGTTGCTGCAAGACCCCTTCTTGTGCAAACCGAA
CTGCTCGTGCTCCTGTCCAAGCTGCAGCTCATGCTGCGATACATCGTGCTGCAAACC
GAGCTGCACCTGCTTCAACATCTAG

SEQ ID NO: 159: белок dep1:

mgeeavvmeaprpkspprypdlcgrrmqlevqilsreitflkdelhflegaqpvsrsgcikeinefvgtkhdpkrrrrhr
scrflrwgsklcicisclycckspkckrprelncssscdepckpncsaccagsccspdcscckpncscktpscckpncscsc
pscsscdtsckpsetcfnif

SEQ ID NO: 160: κДНК OsUBC13

atggccaacagcaacctccccggcgaatcatcaaggagacgcagcgactcctcagcgagccagcgccgggaatcagcgc
gtctcgtcgaggagaacatgcgctacttcaacgtcatgactctggccggcacagctccccctatgaagggtgaggttttaagcttgaact
cttttacctgaggaataatcctatggctgctccaaggttaggttctgacaaaatataccacccaacattgacaagcttgtaggatgac
ttgacattctcaaggacaaatggagcccagccctcagattcgagactcttttgagtatccaggcactcctaagtgaccaaacctgatga
tctctctctgataacattgcaaagcactggaaagccaatgaagcagaagctgtgaaacagcaaaggagtgactgcctgtatgccagc
ggtgcataa

SEQ ID NO: 161: белок OsUBC13:

Manslnpriiketqrllsepapgisaspseenmryfnvmilgpaqspyeggvfklflpeeypmaapkvrltkiypni
dklgricldikdkwspalqirtvllsiqallsapnppdplsdniakhwkaneaeavetakewtrlyasga

SEQ ID NO: 166: U3b в двудольном растении

TTTACTTTAAATTTTTCTTATGCAGCCTGTGATGGATAACTGAATCAAACAA
ATGGCGTCTGGGTTTAAGAAGATCTGTTTTGGCTATGTTGGACGAAACAAGTGAAC
TTTAGGATCAACTTCAGTTTATATATGGAGCTTATATCGAGCAATAAGATAAGTGGG
CTTTTTATGTAATTTAATGGGCTATCGTCCATAGATTCACTAATAACCCATGCCCAGTA
CCCATGTATGCGTTTCATATAAGCTCCTAATTTCTCCACATCGCTCAAATCTAAACA
AATCTTGTGTATATATAACACTGAGGGAGCAACATTGGTCA

SEQ ID NO: 167: U6-1 в двудольном растении

AGAAATCTCAAAATTCGGCAGACAATTTTGAATCTCGATCCGTAGAAACG
AGACGGTCATTGTTTTAGTTCCACCACGATTATTTGAAATTTACGTGAGTGTGAG
TGAGACTTGCATAAGAAAATAAAATCTTTAGTTGGGAAAAAATTCAATAATATAAA
TGGGCTTGAGAAGGAAGCGAGGGATAGGCCTTTTTCTAAAATAGGCCCATTTAAGC
TATTAACAATCTTCAAAAAGTACCACAGCGCTTAGGTAAAGAAAGCAGCTGAGTTTAT
ATATGGTTAGAGACGAAGTAGTGATTG

SEQ ID NO: 168; последовательность нуклеиновой кислоты Cys4-P2A-TaCas9

5' ATGGACCACTACCTCGACATCAGGCTCAGGCCAGACCCAGAGTTCCCACCA
GCCCAGCTCATGTCCGTCTCTTCGGCAAGCTCCACCAGGCCCTCGTGGCCCAGGGC
GGCGACAGGATCGGCGTGTCTTCCAGACCTCGACGAGTCCAGGTCCAGGCTCGG
CGAGAGGCTCCGCATCCACGCCTCCGCCGACGACCTCAGGGCCCTCCTCGCCAGGCC
GTGGCTGGAGGGCCTCAGGGACCACCTCCAGTTTCGGCGAGCCAGCCGTGGTGCCAC
ACCCAACCCCATACAGGCAAGTGTCCAGGGTGCAAGCCAAGTCCAACCCAGAGAGG
CTCAGGAGGAGGCTCATGAGGAGGCACGACCTCTCCGAGGAAGAGGCCAGGAAGC
GCATCCCAGACACCGTGGCCAGGGCCCTCGACCTCCCATTCGTGACCCCTCAGGTCCC
AGTCCACCGGCCAGCACTTCCGCCTCTTCATCAGGCACGGCCCACTCCAGGTGACCG
CCGAGGAGGGCGGCTTTACCTGCTACGGCCTCTCCAAGGGCGGCTTCGTGCCGTGGT
TCGGCTCCGGCGCCACCAACTTCTCCCTCCTCAAGCAAGCCGGCGACGTGGAGG
AGAACCCAGGCCCAATGGACAAGAAGTACTCGATCGGCCCTCGACATCGGGACGAAC
AGTTGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCTAAGAAGTTCAAGGTCT
GGGGAACACCGACCGCCATTCCATCAAGAAGAACCCTCATCGGCGCTCTCTGTTCGACAG
CGGGGAGACCGCTGAGGCTACGAGGCTCAAGAGAACCGCTAGGCGCCGGTACACGAGA
AGGAAGAACAGGATCTGCTACCTCCAAGAGATTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTTGAC
GATTCACTTCCACCGCTGGAGGAGTCTTTCCTCGTGAGGAGGATAAGAAGCACGAG
CGGCATCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTTGCCTACCACGAGAAGTACCCTACG
ATCTACCATCTGCGGAAGAAGCTCGTGGACTCCACCGATAAGGCGGACCTCAGACTGATC
TACCTCGCTCTGGCCACATGATCAAGTTCCGCGGCCATTTCTGATCGAGGGGGATCTC
AACCCAGACAACAGCGATGTTGACAAGCTGTTTCATCCAACCTCGTGCAGACCTACAACCAAC
TCTTCGAGGAGAACCCGATCAACGCCTCTGGCGTGGACGCGAAGGCTATCCTGTCCGCG
AGGCTCTCGAAGTCCAGGAGGCTGGAGAACCTGATCGCTCAGCTCCCAGGCGAGAAGAA
GAACGGCCTGTTCCGGGAACCTCATCGCTCTCAGCCTGGGGCTCACCCCGAACTTCAAGTC
GAACCTCGATCTCGCTGAGGACGCCAAGCTGCAACTCTCCAAGGACACCTACGACGATGA
CCTCGATAACCTCCTGGCCCAGATCGGCATCAATACGCGGACCTGTTCTCGCTGCCAA
GAACCTGTGCGGACGCCATCCTCTGTGATATCCTCCGCGTGAACACCGAGATCACGAA
GGCTCCACTCTCTGCCTCCATGATCAAGCGCTACGACGAGCACCATCAGGATCTGACCCT
CCTGAAGGCGCTGGTCCGCCAACAGCTCCCGGAGAAGTACAAGGAGATTTCTTCGATCA
GTCGAAGAACGGCTACGCTGGGTACATCGACGGCGGGGCCTACAAGAGGAGTTCTACA
AGTTCATCAAGCCAATCCTGGAGAAGATGGACGGCACGGAGGAGCTCCTGGTGAAGCTC
AACAGGGAGGACCTCCTGCGGAAGCAGAGAACCCTTCGATAACGGCAGCATCCCCACCA
AATCCATCTCGGGGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGGCAAGAGGACTTCTACCCCTTCTCT
CAAGGATAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCATACTACGTCGG

CCCTCTCGCGGGGGAACTCAAGATTGCTTGATGACCCGCAAGTCTGAGGAGACCA
 TCACGCCGTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCTAGCGCTCAGTCGTTTCATC
 GAGAGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTCCCTAAGCACTCG
 CTCCTGTACGAGTACTTCACCGTCTACAACGAGCTCACGAAGGTGAAGTACGTCACCGAG
 GGCATGCGCAAGCCAGCGTTCCTGTCCGGGGAGCAGAAGAAGGCTATCGTGACCTCCT
 GTTCAAGACCAACCGGAAGGTACGGTTAAGCAACTCAAGGAGGACTACTTCAAGAAGAT
 CGAGTGCTTCGATTTCGGTCGAGATCAGCGGCGTTGAGGACCGCTTCAACGCCAGCCTCG
 GGACCTACCACGATCTCCTGAAGATCATCAAGGATAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGA
 ACGAGGATATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTCACGCTGTTTCGAGGACAGGGAGATG
 ATCGAGGAGCGCCTGAAGACGTACGCCCATCTCTTCGATGACAAGGTTCATGAAGCAACTC
 AAGCGCCGGAGATACACCGGCTGGGGGAGGCTGTCCCGCAAGCTCATCAACGGCATCCG
 GGACAAGCAGTCCGGGAAGACCATCTCGACTTCTCAAGAGCGATGGCTTCGCCAACA
 GGAACCTTCATGCAACTGATCCACGATGACAGCCTCACCTTCAAGGAGGATATCCAAAAGG
 CTAAGTGAGCGGCCAGGGGGACTCGCTGCACGAGCATATCGCGAACCTCGCTGGCTCC
 CCCGCGATCAAGAAGGGCATCTCCAGACCGTGAAGGTTGTGGACGAGCTCGTGAAGGT
 CATGGGCCCGGCACAAGCCTGAGAACATCGTCATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAAAACCA
 CGCAGAAGGGGCAAAAAGAACTCTAGGGAGCGCATGAAGCGCATCGAGGAGGGCATCAAG
 GAGCTGGGGTCCCAAATCCTCAAGGAGCACCCAGTGGAGAACACCCAACTGCAGAACGA
 GAAGCTCTACCTGTACTACCTCCAGAACGGCAGGGATATGTACGTGGACCAAGAGCTGGA
 TATCAACCGCCTCAGCGATTACGACGTGCATCATATCGTTCCCGAGTCTTCTCTGAAGGAT
 GACTCCATCGACAACAAGGTCTCACCAGGTCCGACAAGAACCGCGCAAGTCAGATAAC
 GTTCCATCTGAGGAGGTCTGTTAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGGCAGCTCCTGAACGCC
 AAGCTGATCACGCAAAGGAAGTTCGACAACCTCACCAAGGCTGAGAGAGGCGGGCTCTC
 AGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTCGAGACCAGACAAATCACGA
 AGCACGTTGCGCAAATCCTCGACTCTCGGATGAACACGAAGTACGATGAGAACGACAAGC
 TGATCAGGGAGGTTAAGGTGATCACCTGAAGTCTAAGCTCGTCTCCGACTTCAGGAAGG
 ATTTCCAGTTCTACAAGGTTTCGCGAGATCAACAACCTACCACCATGCCCATGACGTTACCT
 CAACGCTGTGGTCGGCACCGCTCTGATCAAGAAGTACCCAAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGT
 GTACGGGGACTACAAGGTTTACGATGTGCGCAAGATGATCGCCAAGTCGGAGCAAGAGAT
 CGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAG
 ATCACGCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGAGACCGCTCATCGAGACCAACGGCGAGAC
 GGGGGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGATTTTCGCGACCGTCCGCAAGGTTCTCTCCA
 TGCCCCAGGTGAACATCGTCAAGAAGACCGAGGTCCAAACGGGCGGGTTCTCAAAGGAG
 TCTATCTCGCCTAAGCGGAACAGCGACAAGCTCATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCA
 AAGAAGTACGGCGGGTTTCGACAGCCCTACCGTGGCCTACTCGGTCTGTTGTGGCGAA
 GGTTGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTCAAGAGCGTGAAGGAGCTCCTGGGGATCACCA
 TCATGGAGAGGTCCAGCTTCGAGAAGAACCCAATCGACTTCTTCTTTCGAGCTGGAGA
 ACGGCAGGAAGAGAATGCTGGCTTCCGCTGGCGAGCTCCAGAAGGGGAACGAGCTCGC
 GCTGCCAAGCAAGTACGTGAACCTTCTTACCTGGCTTCCCACTACGAGAAGCTCAAGGG
 CAGCCCCGAGGACAACGAGCAAAAAGCAGCTGTTCTGTCGAGCAGCACAAGCATTACCTCG
 ACGAGATCATCGAGCAAATCTCCGAGTTCAGCAAGCGCGTGATCTCTGCCGACGCGAACC
 TGGATAAGGTCTCTCCGCTTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCAGAGAGCAAGCG
 GAGAACATCATCCATCTCTTACCCTGACGAACCTCGGCGCTCCTGCTGCTTTCAAGTACT
 TCGACACCACGATCGATCGGAAGAGATACCTCCACGAAGGAGGTCTGGACGCGACC
 CTCATCCACCAGTCGATCACCGGCTGTACGAGACGAGGATCGACCTCTCACAACCTCGGC
 GGGGATAAGAGACCCGCAGCAACCAAGAAGGCAGGGCAAGCAAAGAAGAAGAAGTGA 3'

SEQ ID NO: 169: последовательность нуклеиновой кислоты эндорибонуклеазы Cys 4

5' ATGGACCACTACCTCGACATCAGGCTCAGGCCAGACCCAGAGTTCACCA
 GCCCAGCTCATGTCCGTCCTCTTCGGCAAGCTCCACCAGGCCCTCGTGGCCCAGGGC
 GGCGACAGGATCGGCGTGTCTTCCAGACCTCGACGAGTCCAGGTCCAGGCTCGG
 CGAGAGGCTCCGCATCCACGCCTCCGCCGACGACCTCAGGGCCCTCCTCGCCAGGCC
 GTGGCTGGAGGGCCTCAGGGACCACCTCCAGTTCGGCGAGCCAGCCGTGGTGCCAC
 ACCCAACCCCATACAGGCAAGTGTCCAGGGTGCAAGCCAAGTCCAACCCAGAGAGG
 CTCAGGAGGAGGCTCATGAGGAGGCACGACCTCTCCGAGGAAGAGGCCAGGAAGC
 GCATCCAGACACCGTGGCCAGGGCCCTCGACCTCCCATTCGTGACCTCAGGTCCC
 AGTCCACCGGCCAGCACTTCCGCCTCTTCATCAGGCACGGCCCACTCCAGGTGACCG
 CCGAGGAGGGCGGCTTTACCTGCTACGGCCTCTCCAAGGGCGGCTTCGTGCCGTGGT
 TC 3'

Таблица I

Праймеры, используемые для конструирования оцрРНК

Номер	Прямой праймер	Обратный праймер
1	Agcggcggtggggaggagggttttagagct agaaat (SEQ ID NO: 170)	Cctctccccaccgctcggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 171)
2	Gggaggaggaggggggggggttttagagc tagaaat (SEQ ID NO: 172)	Cccccctctctctccccggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 173)
3	Ggggggaggaggaggggggggttttagagc tagaaat (SEQ ID NO: 174)	Cccccctctctctccccggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 175)
4	Tcgagggggaggaggagggttttagagct agaaat (SEQ ID NO: 176)	Cctctctctccccctcgacggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 177)
5	Gtcgtcgagggggaggagggttttagagcta gaaat (SEQ ID NO: 178)	Cctctccccctcgacgacggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 179)
6	Ggcagccgcccggcggcgttttagagcta gaaat (SEQ ID NO: 180)	Gtcggggcgccggcgtcccggcagccaagccag ca (SEQ ID NO: 181)
7	Tccgggaggagcggtgatggttttagagcta gaaat (SEQ ID NO: 182)	Catcaccgcctctccgggacggcagccaagccagc a (SEQ ID NO: 183)
8	Cgcccgaagcgcaaggcgggttttagagct	Cgccttgcgttccggcgcgccagccaagccagc

	agaaat (SEQ ID NO: 184)	a (SEQ ID NO: 185)
9	Gaagagaagaacacgcaccggttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 186)	Cggtgcgtgttcttcttccggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 187)
10	cccttacggcctccactctggttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 188)	Cagagtggaggccgtaaggcgccagccaagccagca (SEQ ID NO: 189)
11	Cactttctcttatgacacggttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 190)	Cgtgtcataaggagaaagtgcggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 191)
12	Tatataagctcgtagaatggttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 192)	Cattctgacgagcttatatacggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 193)
13	Cgagaagcactggatctgatgttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 194)	Atcagatccagtgtctctcggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 195)
14	Gagaggaggaagtagagcggttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 196)	Gcgctctacttctctctcggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 197)
15	Taaacccaaccacaatcagtttagagctagaaat (SEQ ID NO: 198)	Tgatttggtgttggtttacggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 199)
16	Atgtaccattctctctcgagtttagagctagaaat (SEQ ID NO: 200)	Tcgaggaggaatgggtacatcggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 201)
17	Aacgtacatcgctcgacggttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 202)	Gctgcgacgcatgtacgttcggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 203)
18	Actatcttacttctgtgcagtttagagctagaaat (SEQ ID NO: 204)	Tgcacaagtagtaagatagtcggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 205)
19	Tcggagaataattacaaccggttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 206)	Ggttgtaattattctccgacggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 207)
20	Gtaggcagcaacctcaactgttttagagctagaaat (SEQ ID NO: 208)	Agtttgaggtgtgcctaccggcagccaagccagca (SEQ ID NO: 209)

SEQ ID NO: 210: последовательность нуклеиновой кислоты РНК

TCTGGTGAAATCCAAAGGAGGGCCGAGTTCTTCGAACCATTCATCTCTGGCTT
GACAAATTCGACTGTGGTTCAGTTCTGCAAGGCTTCCGTGGAGCCGATGGGCGAGG
AAAGTGACCATGTCCACATAATTGCCCTATCAGATGCGTTGGGTGTGCCAATCCGTG
TGATGTACCTAGACAGAAGCTCATGTGATGCTGGAATATAAGTGTGAACCAT
GATTTACGCCCTGAGGCCAATTCATCGACGGTGCTGCTGCTGCTGAGAAACCTTAC
ATTACTTTGCTCTACCGTCTGGTCACTACG

Библиография

1. Abe, A., Kosugi, S., Yoshida, K., Natsume, S., Takagi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Mitsuoka, C., Tamiru, M., Innan, H., Cano, L., Kamoun, S. and Terauchi, R. (2012) Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol*, 30, 174–178.
2. Alvarez-Venegas, R. and Avramova, Z. (2005) Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive Arabidopsis genes and in atxl mutants. *Nucleic Acids Res*, 33, 5199–5207.
3. Balakirev, M.Y., Tcherniuk, S.O., Jaquinod, M. and Chroboczek, J. (2003) Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep*, 4, 517–522.
4. Che, R., Tong, H., Shi, B., Liu, Y., Fang, S., Liu, D., Xiao, Y., Hu, B., Liu, L., Wang, H., Zhao, M. and Chu, C. (2016) Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nat Plants*, 2
5. Dong, H., Dumenil, J., Lu, F.H., Na, L., Vanhaeren, H., Naumann, C., Klecker, M., Prior, R., Smith, C., McKenzie, N., Saalbach, G., Chen, L., Xia, T., Gonzalez, N., Seguela, M., Inze, D., Dissmeyer, N., Li, Y. and Bevan, M.W. (2017) Ubiquitylation activates a peptidase that promotes cleavage and destabilization of its activating E3 ligases and diverse growth regulatory proteins to limit cell proliferation in Arabidopsis. *Genes Dev*, 31, 197–208.
6. Du, L., Li, N., Chen, L., Xu, Y., Li, Y., Zhang, Y. and Li, C. (2014) The ubiquitin receptor DA1 regulates seed and organ size by modulating the stability of the ubiquitin-specific protease UBP15/SOD2 in Arabidopsis. *Plant Cell*, 26, 665–677.
7. Duan, P., Ni, S., Wang, J., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Chen, H., Zhu, X. and Li, Y. (2016) Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nat Plants*, 2.
8. Duan, P., Rao, Y., Zeng, D., Yang, Y., Xu, R., Zhang, B., Dong, G., Qian, Q. and Li, Y. (2014) SMALL GRAIN 1, which encodes a mitogen-activated protein kinase kinase 4, influences grain size in rice. *Plant J*, 77, 547–557.
9. Duan, P., Xu, J., Zeng, D., Zhang, B., Geng, M., Zhang, G., Huang, K., Huang, L., Xu, R., Ge, S., Qian, Q. and Li, Y. (2017) Natural Variation in the Promoter of GSE5 Contributes to Grain Size Diversity in Rice. *Mol Plant*, 10, 685–694.
10. Fan, C., Xing, Y., Mao, H., Lu, T., Han, B., Xu, C., Li, X. and Zhang, Q. (2006) GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet*, 112, 1164–1171.
11. Fang, N., Xu, R., Huang, L., Zhang, B., Duan, P., Li, N., Luo, Y. and Li, Y. (2016) SMALL GRAIN 11 Controls Grain Size, Grain Number and Grain Yield in Rice. *Rice (N Y)*, 9, 64.
12. Herhaus, L., Al-Salihi, M., Macartney, T., Weidlich, S. and Sapkota, G.P. (2013) OTUB1 enhances TGFbeta signalling by inhibiting the ubiquitylation and degradation of active SMAD2/3. *Nat Commun*, 4, 2519.
13. Hisanaga, T., Kawade, K. and Tsukaya, H. (2015) Compensation: a key to clarifying the organ-level regulation of lateral organ size in plants. *J Exp Bot*, 66, 1055–1063.
14. Hu J., Wang, Y., Fang, Y., Zeng, L., Xu, J., Yu, H., Shi, Z., Pan, J., Zhang, D., Kang, S., Zhu, L., Dong, G., Guo, L., Zeng, D., Zhang, G., Xie, L., Xiong, G., Li, J. and Qian,

- Q.** (2015) A Rare Allele of GS2 Enhances Grain Size and Grain Yield in Rice. *Mol Plant*, 8, 1455–1465.
15. **Hu Z., He, H., Zhang, S., Sun, F., Xin, X., Wang, W., Qian, X., Yang, J. and Luo, X.** (2012) A Kelch Motif–Containing Serine/Threonine Protein Phosphatase Determines the Large Grain QTL Trait in Rice. *J Integr Plant Biol*, 54, 979–990.
 16. **Huang, X., Qian, Q., Liu, Z., Sun, H., He, S., Luo, D., Xia, G., Chu, C, Li, J. and Fu, X.** (2009) Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet*, 41 , 494–497.
 17. **Li M., Tang, D., Wang, K., Wu, X., Lu, L., Yu, H., Gu, M., Yan, C. and Cheng, Z.** (2011a) Mutations in the F-box gene LARGER PANICLE improve the panicle architecture and enhance the grain yield in rice. *Plant Biotechnol J*, 9, 1002– 1013.
 18. **Li N. and Li, Y.** (2014) Ubiquitin–mediated control of seed size in plants. *Front Plant Sci*, 5, 332.
 19. **Li N. and Li, Y.** (2016) Signaling pathways of seed size control in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 33, 23–32.
 20. **Li S., Gao, F., Xie, K., Zeng, X., Cao, Y., Zeng, J., He, Z., Ren, Y., Li, W., Deng, Q., Wang, S., Zheng, A., Zhu, J., Liu, H., Wang, L. and Li, P.** (2016) The OsmiR396c–OsGRF4–OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in Rice. *Plant Biotechnol J*, 14, 2134–2146.
 21. **Li, Y. Fan, C, Xing, Y., Jiang, Y., Luo, L., Sun, L, Shao, D., Xu, C, Li, X., Xiao, J., He, Y. and Zhang, Q.** (2011b) Natural variation in GS5 plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nat Genet*, 43, 1266–1269.
 22. **Li Y., Zheng, L., Corke, F., Smith, C. and Bevan, M.W.** (2008) Control of final seed and organ size by the DA1 gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 22, 1331 –1336.
 23. **Liu, S., Hua, L., Dong, S., Chen, H., Zhu, X., Jiang, J., Zhang, F., Li, Y., Fang, X. and Chen, F.** (2015) OsMAPK6, a mitogen–activated protein kinase, influences rice grain size and biomass production. *Plant J*, 84, 672–681 .
 24. **Mao, H., Sun, S., Yao, J., Wang, C, Yu, S., Xu, C, Li, X. and Zhang, Q.** (2010) Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 107, 19579–19584.
 25. **Nakada, S., Tai, I., Panier, S., Al–Hakim, A., Iemura, S., Juang, Y.C., O'Donnell, L., Kumakubo, A., Munro, M., Sicheri, F., Gingras, A.C., Natsume, T., Suda, T. and Durocher, D.** (2010) Non–canonical inhibition of DNA damage– dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature*, 466, 941–946.
 26. **Nijman, S.M., Luna–Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K. and Bernards, R.** (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 123, 773–786.
 27. **Qi, P., Lin, Y.S., Song, X.J., Shen, J.B., Huang, W., Shan, J.X., Zhu, M.Z., Jiang, L., Gao, J. P. and Lin, H.X.** (2012) The novel quantitative trait locus GL3.1 controls rice grain size and yield by regulating Cyclin–T1 ;3. *Cell Res*, 22, 1666–1680.

28. **Shomura, A., Izawa, T., Ebana, K., Ebitani, T., Kanegae, H., Konishi, S. and Yano, M.** (2008) Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat Genet*, 40, 1023–1028.
29. **Si L., Chen, J., Huang, X., Gong, H., Luo, J., Hou, Q., Zhou, T., Lu, T., Zhu, J., Shangguan, Y., Chen, E., Gong, C, Zhao, Q., Jing, Y., Zhao, Y., Li, Y., Cui, L., Fan, D., Lu, Y., Weng, Q., Wang, Y., Zhan, Q., Liu, K., Wei, X., An, K., An, G. and Han, B.** (2016) OsSPL13 controls grain size in cultivated rice. *Nat Genet*, 48, 447–456.
30. **Song, X.J., Huang, W., Shi, M., Zhu, M.Z. and Lin, H.X.** (2007) A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet*, 39, 623–630.
31. **Sun, P., Zhang, W., Wang, Y., He, Q., Shu, F., Liu, H., Wang, J., Yuan, L. and Deng, H.** (2016) OsGRF4 controls grain shape, panicle length and seed shattering in rice. *J Integr Plant Biol*, 58, 836–847.
32. **Wang, S., Li, S., Liu, Q., Wu, K., Zhang, J., Wang, Y., Chen, X., Zhang, Y., Gao, C, Wang, F., Huang, H. and Fu, X.** (2015a) The OsSPL16–GW7 regulatory module determines grain shape and simultaneously improves rice yield and grain quality. *Nat Genet*, 47, 949–954.
33. **Wang, S., Wu, K., Yuan, Q., Liu, X., Liu, Z., Lin, X., Zeng, R., Zhu, H., Dong, G., Qian, Q., Zhang, G. and Fu, X.** (2012) Control of grain size, shape and quality by OsSPU 6 in rice. *Nat Genet*, 44, 950–954.
34. **Wang, Y., Xiong, G., Hu, J., Jiang, L., Yu, H., Xu, J., Fang, Y., Zeng, L., Xu, E., Ye, W., Meng, X., Liu, R., Chen, H., Jing, Y., Zhu, X., Li, J. and Qian, Q.** (2015b) Copy number variation at the GL7 locus contributes to grain size diversity in rice. *Nat Genet*, 47, 944–948.
35. **Wang, Z., Li, N., Jiang, S., Gonzalez, N., Huang, X., Wang, Y., Inze, D. and Li, Y.** (2016) SCF(SAP) controls organ size by targeting PPD proteins for degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 7, 1 1 192.
36. **Weng, J., Gu, S., Wan, X., Gao, H., Guo, T., Su, N., Lei, C, Zhang, X., Cheng, Z., Guo, X., Wang, J., Jiang, L., Zhai, H. and Wan, J.** (2008) Isolation and initial characterization of GW5, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell Res*, 18, 1 199–1209.
37. **Wu, Y., Fu, Y., Zhao, S., Gu, P., Zhu, Z., Sun, C. and Tan, L.** (2016) CLUSTERED PRIMARY BRANCH 1, a new allele of DWARF1 1 , controls panicle architecture and seed size in rice. *Plant Biotechnol J*, 14, 377–386.
38. **Xia, T., Li, N., Dumenil, J., Li, J., Kamenski, A., Bevan, M.W., Gao, F. and Li, Y.** (2013) The Ubiquitin Receptor DA1 Interacts with the E3 Ubiquitin Ligase DA2 to Regulate Seed and Organ Size in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25, 3347–3359.
39. **Xu, Y., Jin, W., Li, N., Zhang, W., Liu, C, Li, C. and Li, Y.** (2016) UBIQUITIN–SPECIFIC PROTEASE14 Interacts with ULTRAVIOLET–B INSENSITIVE4 to Regulate Endoreduplication and Cell and Organ Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28, 1200–1214.
40. **Yamamuro, C, Ihara, Y., Wu, X., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ashikari, M., Kitano, H. and Matsuoka, M.** (2000) Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive

homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell*, 12, 1591 – 1606.

41. **Zhang, X., Wang, J., Huang, J., Lan, H., Wang, C., Yin, C., Wu, Y., Tang, H., Qian, Q., Li, J. and Zhang, H.** (2012) Rare allele of OsPPKU associated with grain length causes extra-large grain and a significant yield increase in rice. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 109, 21534–21539.

42. **Zhou, Y., Miao, J., Gu, H., Peng, X., Leburu, M., Yuan, F., Gao, Y., Tao, Y., Zhu, J., Gong, Z., Yi, C., Gu, M., Yang, Z. and Liang, G.** (2015) Natural Variations in SLG7 Regulate Grain Shape in Rice. *Genetics*, 201, 1591–1599.

43. **Zhao, M. et al.** Regulation of OsmiR156h through alternative polyadenylation improves grain yield in rice. *PLOS One* 10, e0126154 (2015).

Bracha-Drori, K. et al. Detection of protein–protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40, 419–427 (2004).

Wang, F. et al. Biochemical insights on degradation of Arabidopsis DELLA proteins gained from a cell-free assay system. *Plant Cell* 21, 2378–2390 (2009).

Liu, Z. et al. BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 110, 6205–6210 (2013).

Cermak, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector–based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 39 (2011).

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

Wiles, M.V., Qin, W., Cheng, A.W., Wang, H. CRISPR–Cas9–mediated genome editing and guide RNA design. *Mamm Genome* 26(9–10), 501–510 (2015).

Henikoff, S., Jill, B.J., Comai, L. TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Perspectives on Translational Biology.* 135(2), 630–636 (2004).

Comai, L., Young, K., Reynolds, S.H., Greene, E.A., Codomo, C.A., Enns, L.C., Johnson, J.E., Burtner, C., Odden A.R., Henikoff, S. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J* 37(5), 778–786 (2004).

Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., Liu, D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double–stranded DNA cleavage. *Nature* 533(7603), 420–424 (2016).

Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K.Y., Shimatani, Z., Kondo, A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 353(6305), aaf8729 (2016).

Clough, S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*–mediate transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16(6), 735–743 (1998).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения урожая зерна растения, включающий снижение уровня экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей отубаин-подобную протеазу (OTUB1), и/или снижение активности OTUB1, где нуклеиновая кислота кодирует OTUB1, определенный в SEQ ID NO: 1, или его функциональный вариант или гомолог, причем функциональный вариант имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3.

2. Способ по п.1, где способ включает введение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид OTUB1 и/или промотор полипептида OTUB1.

3. Способ по п.1 или 2, где нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид OTUB1, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5, или ее функциональный гомолог или вариант, и где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая промотор OTUB1, содержит SEQ ID NO: 6 или ее функциональный вариант или гомолог, где функциональный вариант имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 6.

4. Способ по любому из пп.1–3, где способ включает использование РНК-интерференции для снижения экспрессии по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты OTUB1.

5. Способ по пп.1–4, где растение выбрано из риса, пшеницы, кукурузы, сорго, ячменя, сои и капусты.

ты.

6. Генетически модифицированное растение или его часть, где указанное растение содержит по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид OTUB1 и/или промотор OTUB1 или где растение содержит конструкцию для РНК-интерференции, которая снижает экспрессию полипептида OTUB1, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид OTUB1, содержит SEQ ID NO: 1 или ее функциональный вариант или гомолог, и где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая промотор OTUB1, содержит SEQ ID NO: 6 или ее функциональный вариант или гомолог; где функциональный вариант имеет по меньшей мере 60% идентичность с SEQ ID NO: 1 или 6.

7. Генетически модифицированная клетка растения, где указанное растение содержит по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид OTUB1 и/или промотор OTUB1 или где растение содержит конструкцию для РНК-интерференции, которая снижает экспрессию полипептида OTUB1, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид OTUB1, содержит SEQ ID NO: 1 или ее функциональный вариант или гомолог, и где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая промотор OTUB1, содержит SEQ ID NO: 6 или ее функциональный вариант или гомолог; где функциональный вариант имеет по меньшей мере 60% идентичность с SEQ ID NO: 1 или 6.

8. Генетически модифицированное растение по п.6 или клетка растения по п.7, где растение выбрано из риса, пшеницы, кукурузы, сорго, ячменя, сои и капусты.

9. Часть растения по любому из пп.6-8, где указанной частью растения является зерно или семя.

10. Способ получения растения с повышенным урожаем зерна, включающий введение по меньшей мере одной мутации по меньшей мере в одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид OTUB1 и/или промотор полипептида OTUB1, где мутация снижает экспрессию или активность OTUB1, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид OTUB1, содержит SEQ ID NO: 1 или его функциональный гомолог или вариант, и где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая промотор OTUB1, содержит SEQ ID NO: 6 или его функциональный вариант или гомолог; где функциональный вариант имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 6.

11. Способ по п.10, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид OTUB1, содержит SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5 или ее функциональный гомолог или вариант, причем функциональный гомолог или вариант имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5.

12. Способ получения растения с повышенным урожаем зерна, включающий введение в указанное растение и экспрессию в указанном растении конструкции для РНК-интерференции, которая снижает экспрессию нуклеиновой кислоты OTUB1, где нуклеиновая кислота кодирует OTUB1, определенный в SEQ ID NO: 1, или его функциональный вариант или гомолог, где функциональный вариант имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

13. Способ по п.12, где способ также включает оценку снижения уровня экспрессии нуклеиновой кислоты OTUB1 и/или оценку снижения активности, а предпочтительно деубиквитиназной активности полипептида OTUB1.

14. Способ по п.13, где способ также включает регенерацию растения и скрининг на повышение урожая зерна.

15. Способ по п.13 или 14, где растение выбрано из риса, пшеницы, кукурузы, сорго, ячменя, сои и капусты.

16. Растение или часть растения, полученные или которые могут быть получены способом по любому из пп.12-15.

17. Клетка растения, полученная или которая может быть получена способом по любому из пп.12-15.

18. Способ идентификации и/или отбора растения, которое будет давать повышенный урожай зерна по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением, включающий детектирование в растении или в зародышевой плазме растения по меньшей мере одного полиморфизма в гене OTUB1 и/или в промоторе OTUB1, и отбор указанного растения или его потомства, где полиморфизм приводит к пониженной экспрессии OTUB1, где ген OTUB1 включает последовательность нуклеиновой кислоты, определенной в SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5, или ее функциональный гомолог или вариант, и где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая промотор OTUB1, включает SEQ ID NO: 6 или его функциональный вариант или гомолог; где функциональный вариант имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 6.

19. Способ по п.18, где способ также включает интрогрессию хромосомной области, содержащей по меньшей мере один полиморфизм в гене OTUB1 и/или в промоторе OTUB1, во второе растение или в зародышевую плазму растения с получением растения или зародышевой плазмы растения с интрогрессией.

20. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, ко-

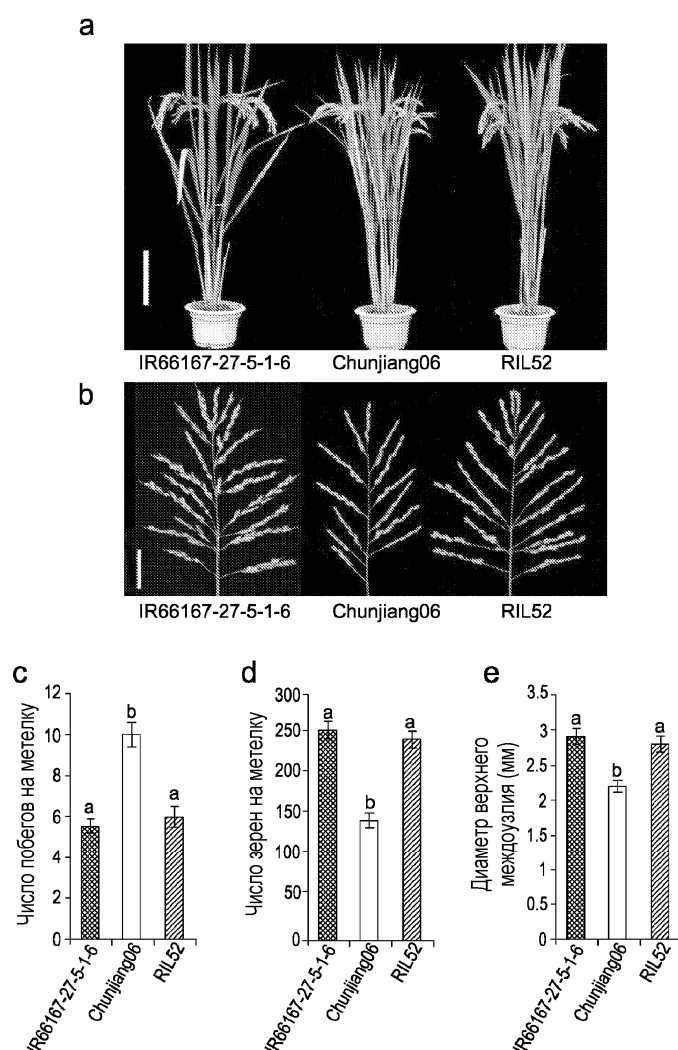
дирующую по меньшей мере одну одноцепочечную направляющую РНК (оцрРНК), где оцрРНК содержит, или состоит из нее, последовательность, выбранную из 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148, или ее вариант, причем вариант имеет по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 31, 36, 40, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148.

21. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.20, где конструкция нуклеиновой кислоты также включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент CRISPR.

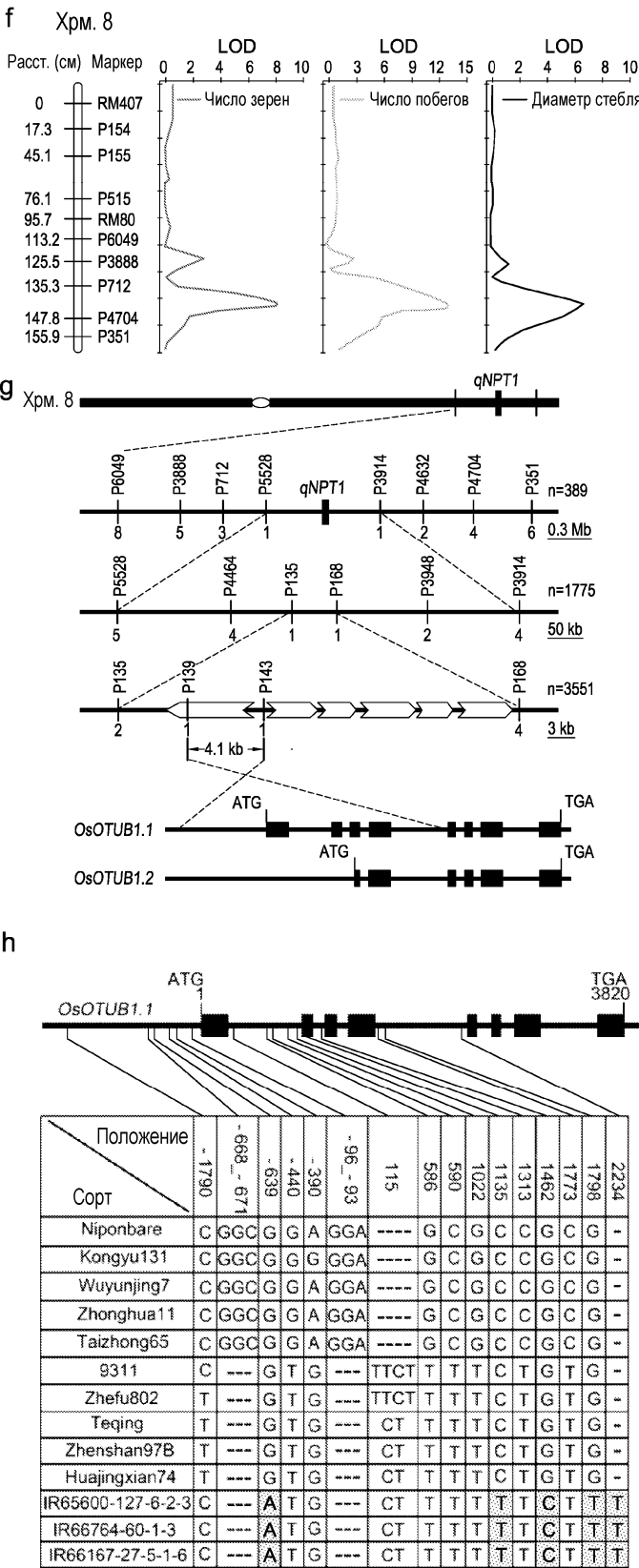
22. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.20, где конструкция нуклеиновой кислоты кодирует эффектор TAL, и где конструкция нуклеиновой кислоты также содержит последовательность, кодирующую эндонуклеазу или ее ДНК-расщепляющий домен, где эндонуклеазой является FokI.

23. Молекула одноцепочечной направляющей (оцр) РНК, где указанная оцрРНК содержит или состоит из SEQ ID NO: 32.

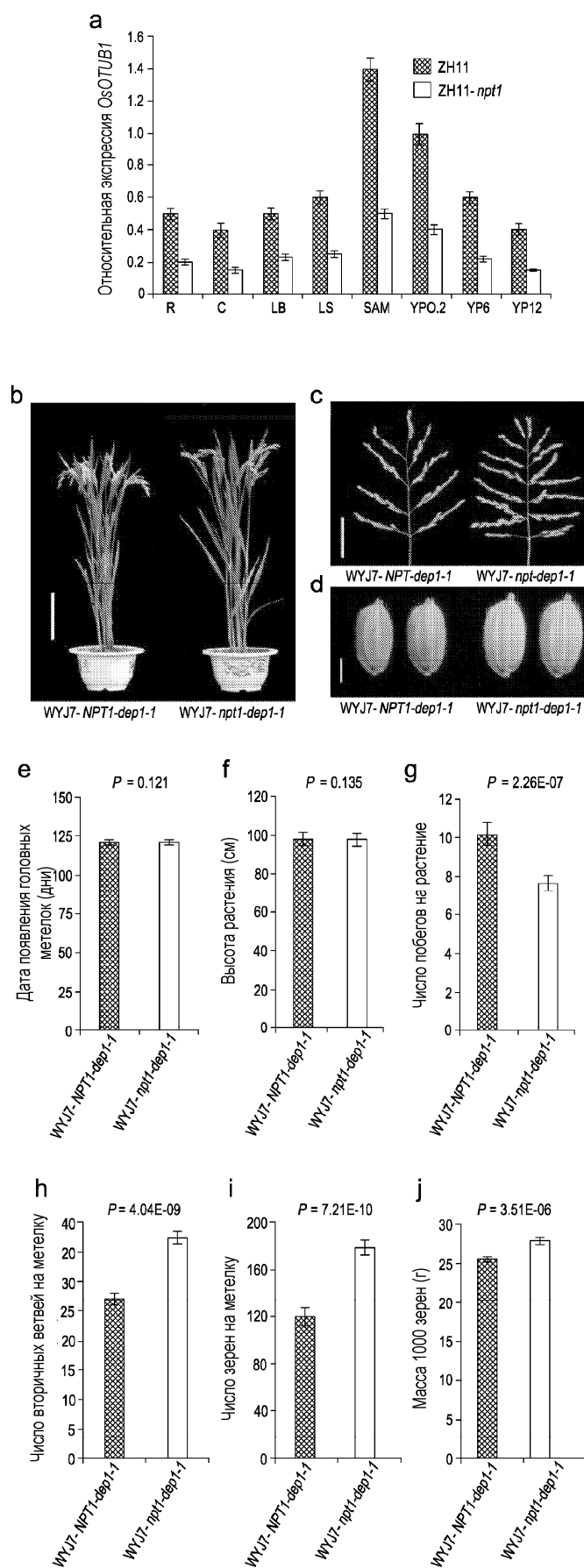
24. Генетически модифицированное растение, где нуклеиновая кислота по любому из пп.20-22 интегрирована в стабильной форме.



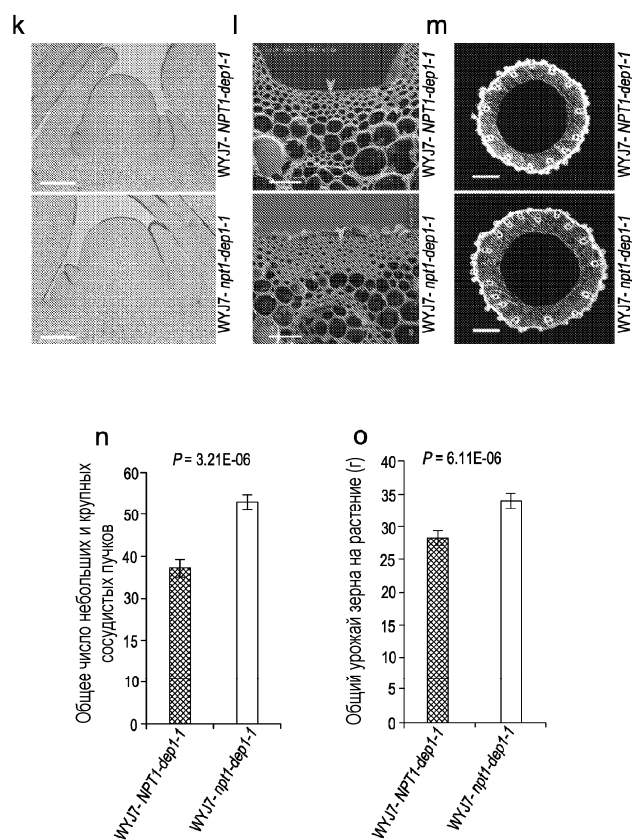
Фиг. 1



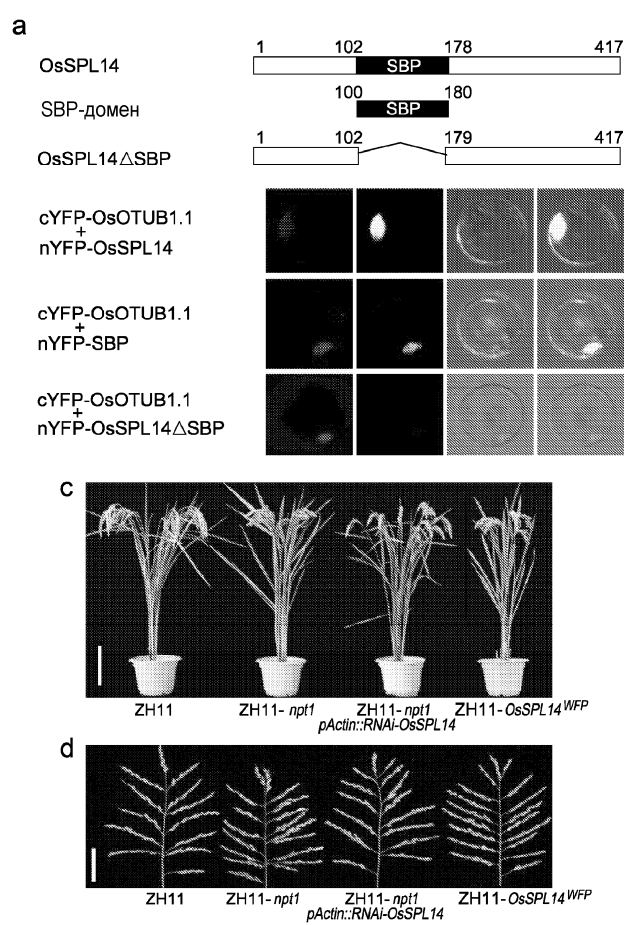
Фиг. 1 продолжение



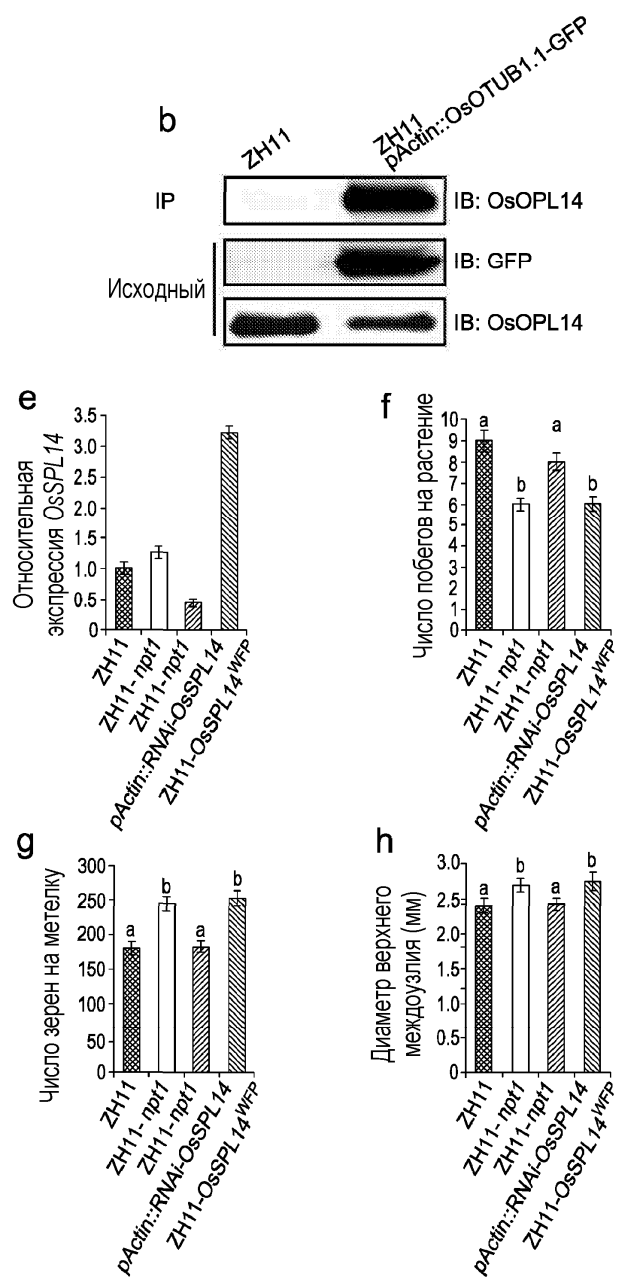
Фиг. 2



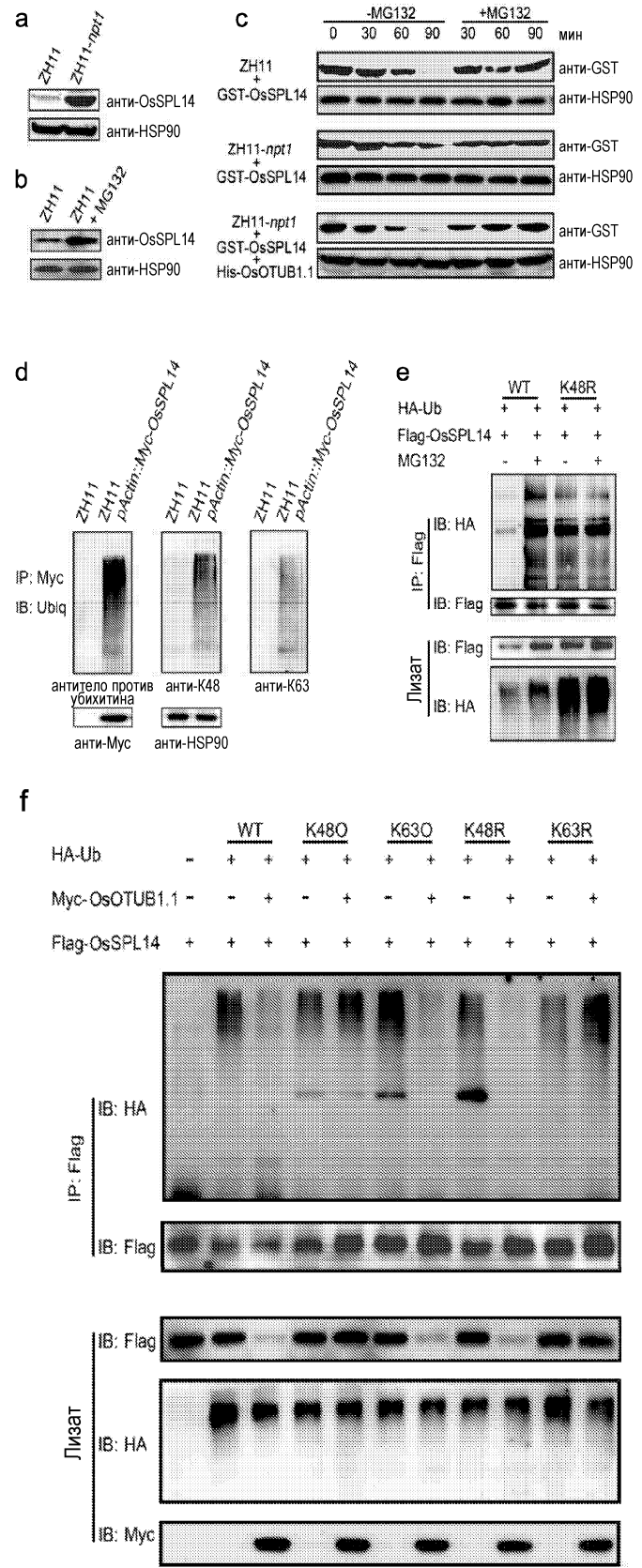
Фиг. 2 продолжение



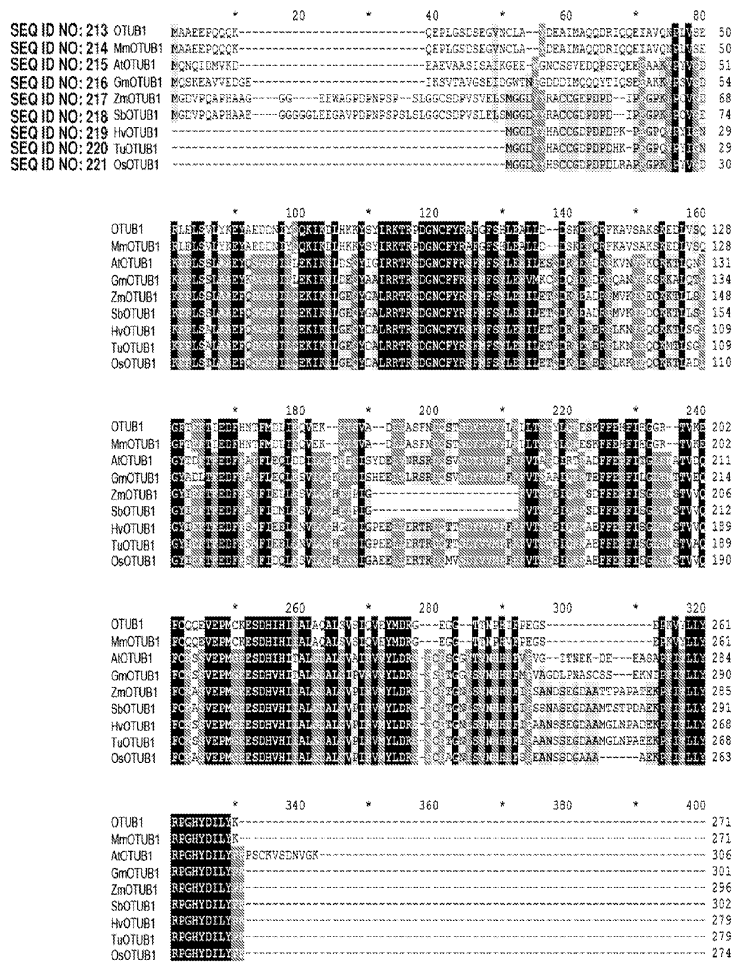
Фиг. 3



Фиг. 3 продолжение

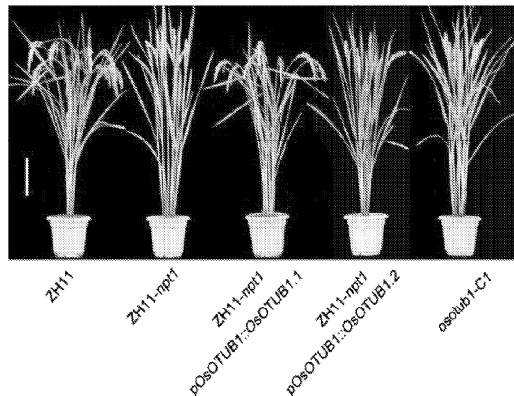


Фиг. 4

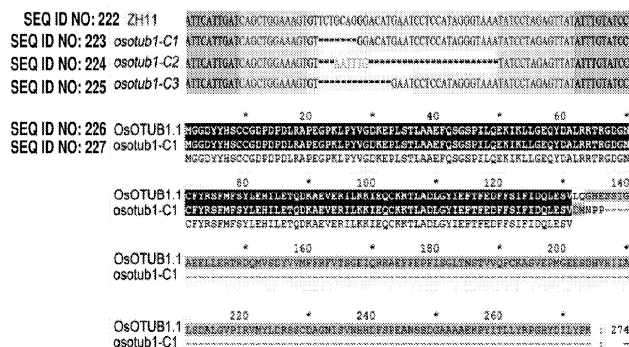


Фиг. 5

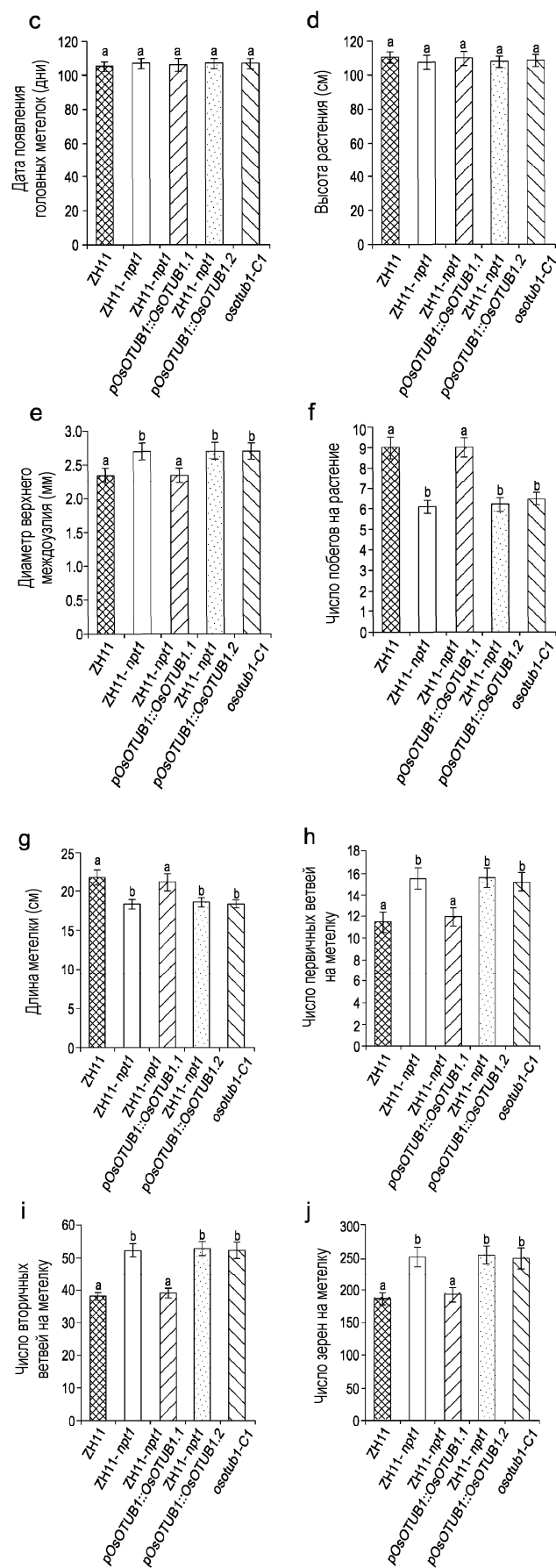
a



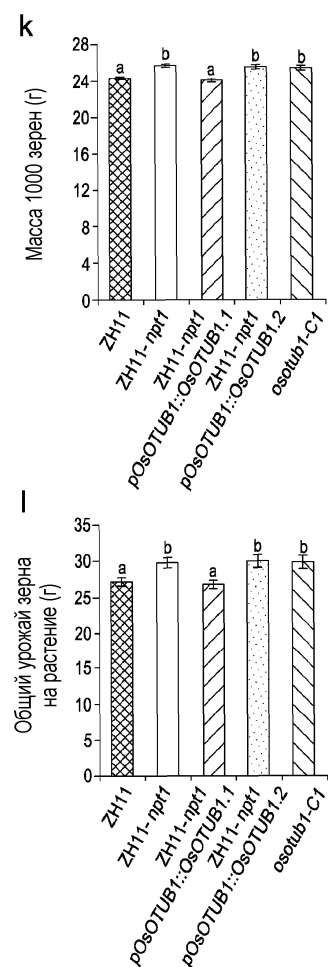
b



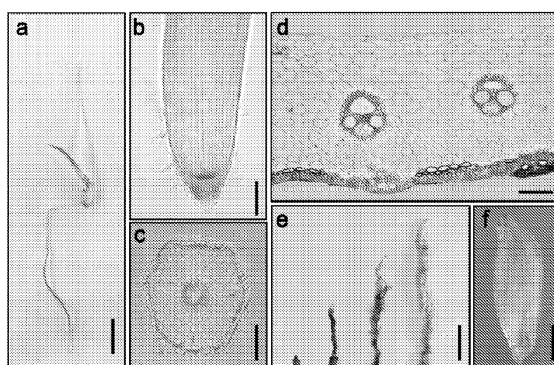
Фиг. 6



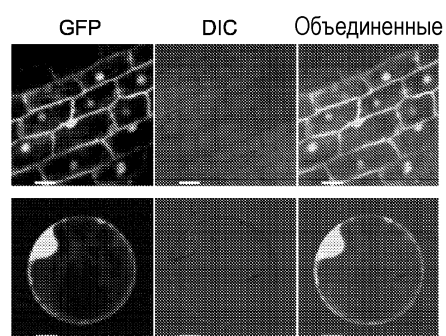
Фиг. 6 продолжение



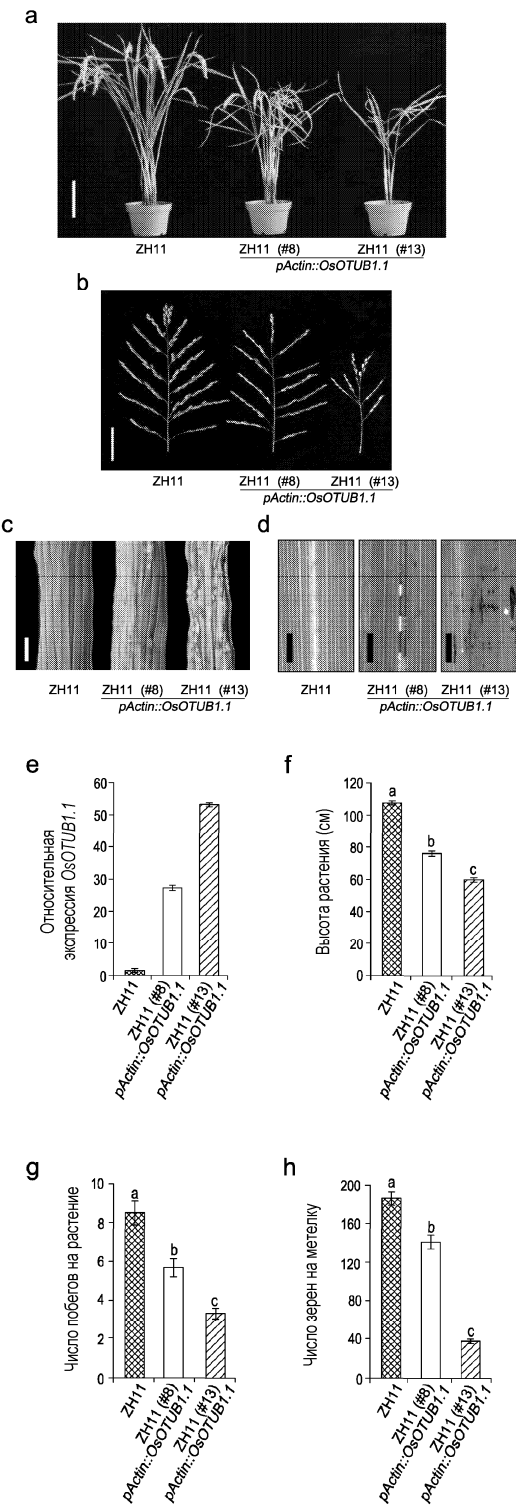
Фиг. 6 продолжение



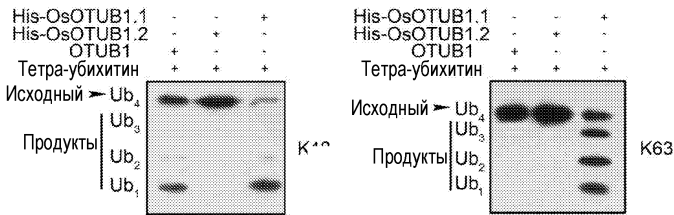
Фиг. 7



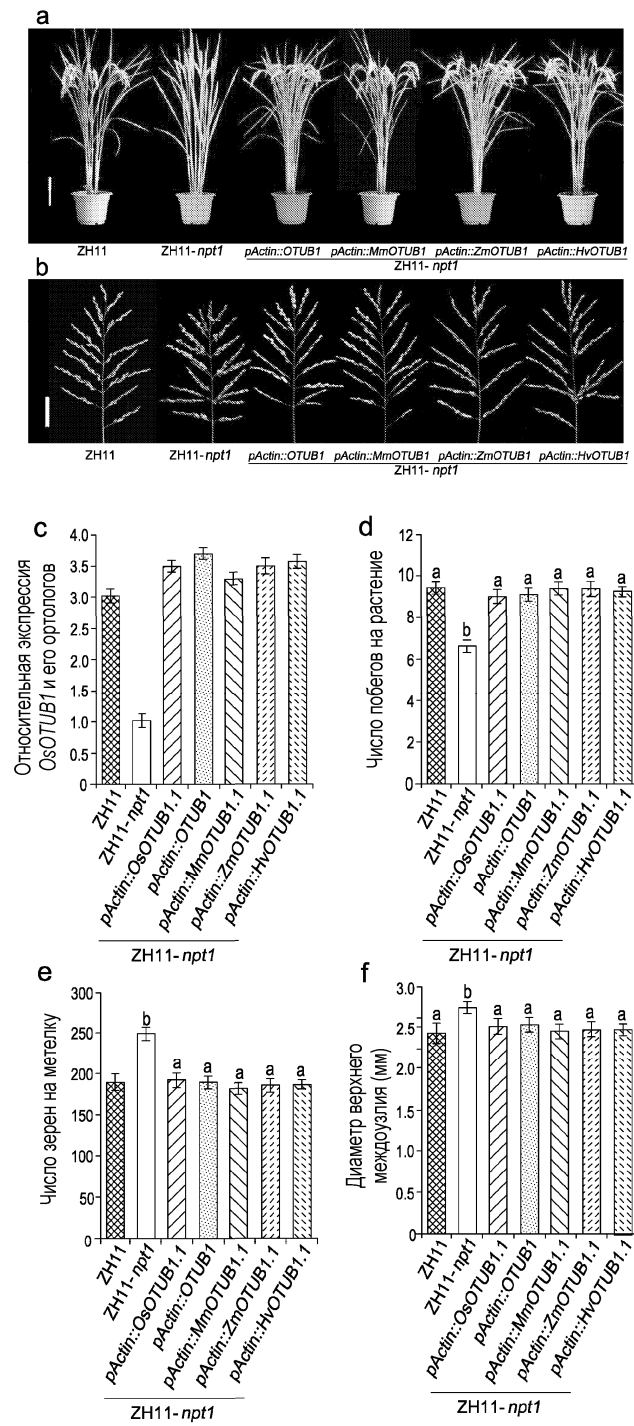
Фиг. 8



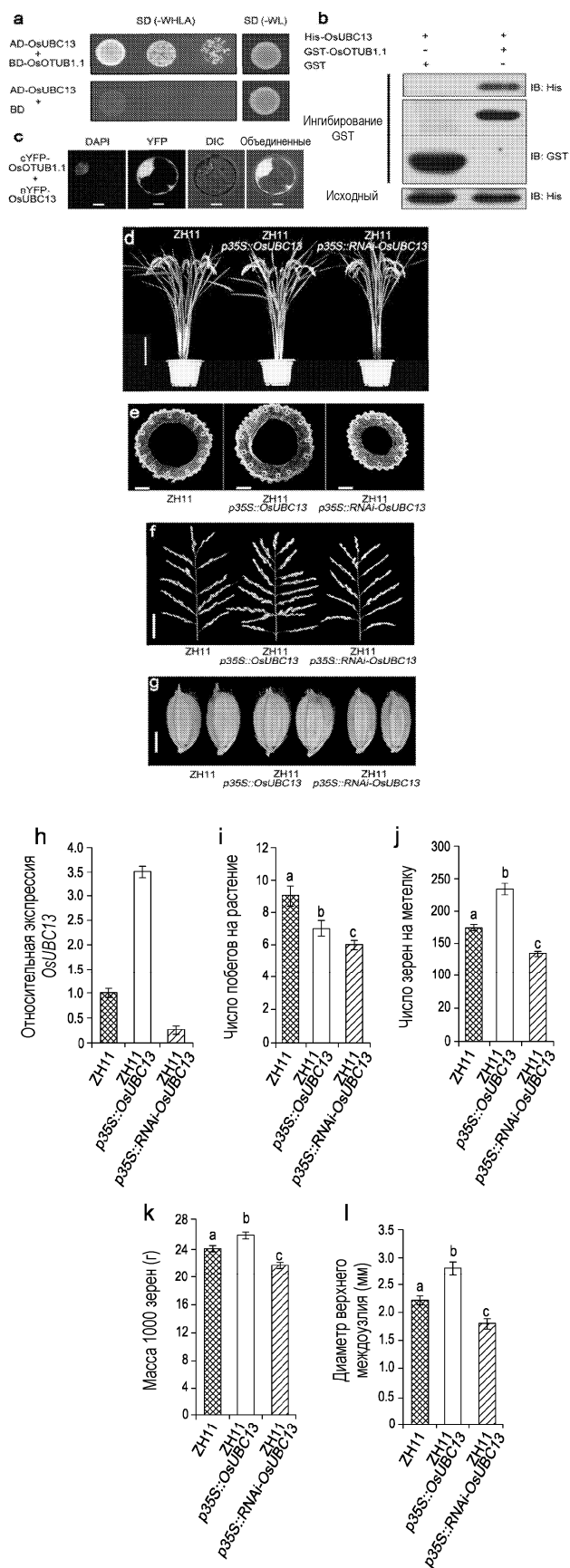
Фиг. 9



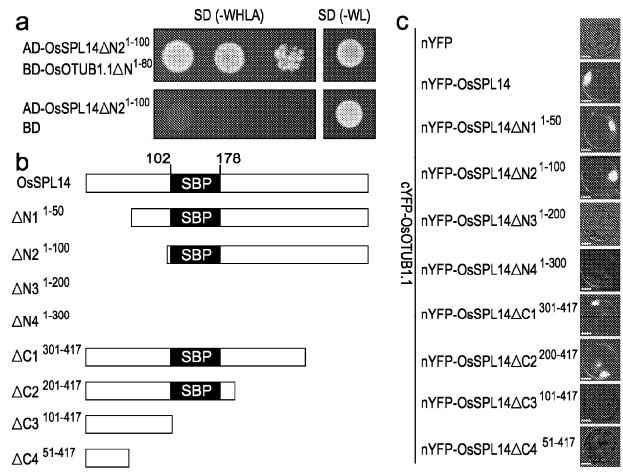
Фиг. 10



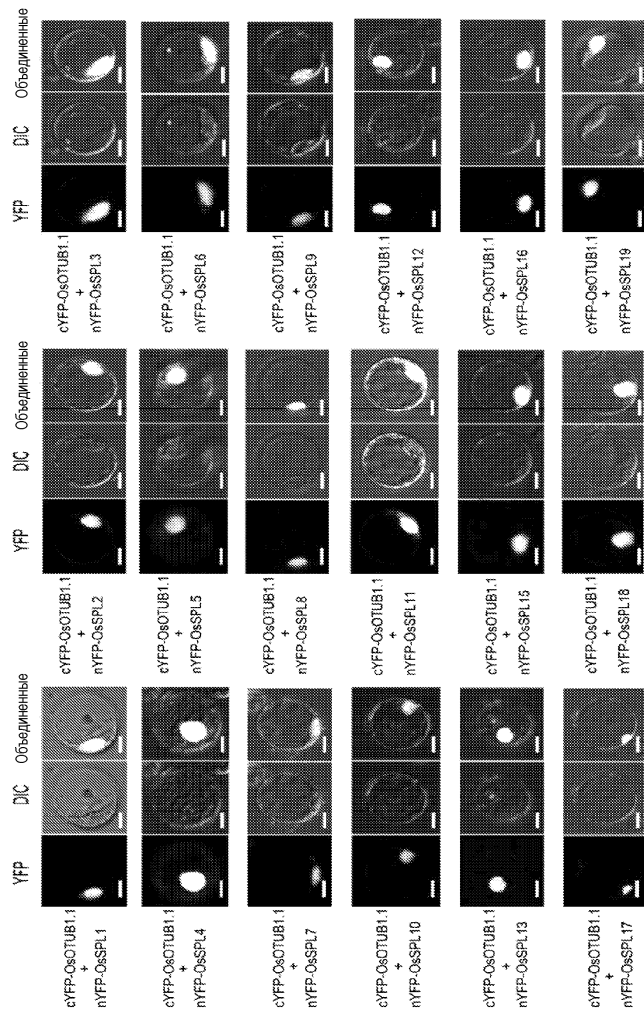
Фиг. 11



Фиг. 12

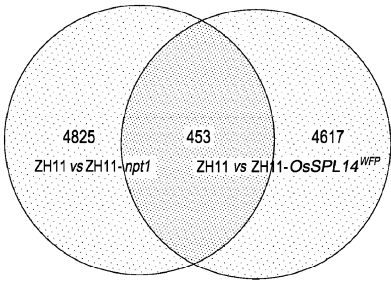


Фиг. 13

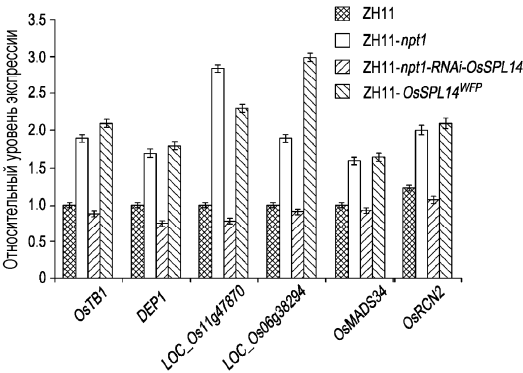


Фиг. 14

A

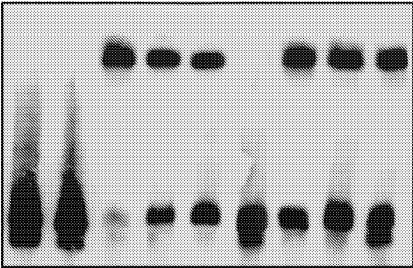


B



Фиг. 15

GST	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GST-OsSPL14	-	-	+	+	+	+	+	+	+
His-OsOTUB1.1	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
Биотиновый зонд	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Конкурент	-	-	-	+	++	+++	-	-	-



Фиг. 16

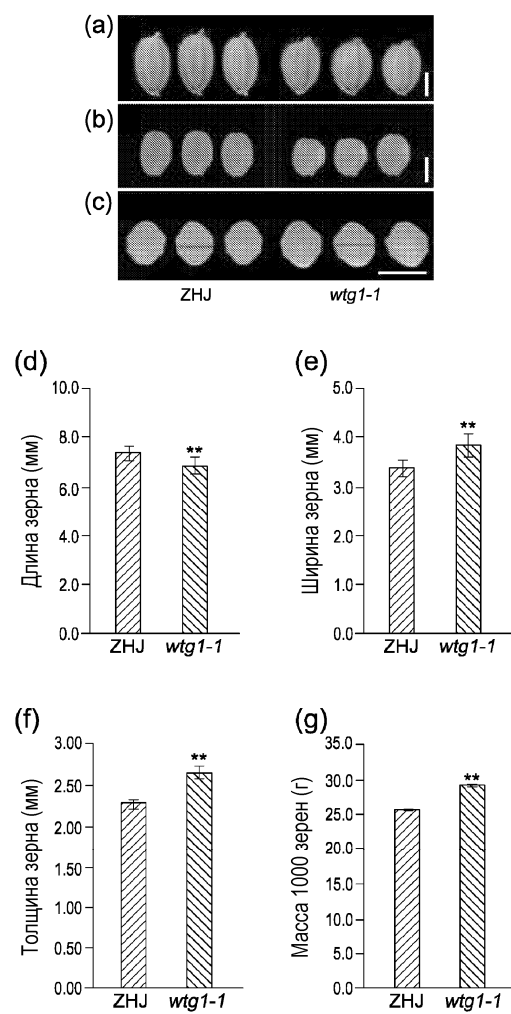
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
OsSPL1	Cgagctcatgctgagtggtctcaagaa SEQ ID NO: 228	Cgggacccctacttggggcctgaacgca SEQ ID NO: 229
OsSPL2	Ggctcgacaatggattgggacccaagat SEQ ID NO: 230	Cgggatccctaccacgatgagaaggaa SEQ ID NO: 231
OsSPL3	Ggctcgacaatgggtcttttgggatgga SEQ ID NO: 232	Cgggatccctataatgcaatagatct SEQ ID NO: 233
OsSPL4	Ggctcgacaatggattggatgctctcc SEQ ID NO: 234	Cgggatccctaatgaaatgacatgcage SEQ ID NO: 235
OsSPL5	Cgagctcatggcgggtccagcggcgcc SEQ ID NO: 236	Cgggatccctagatgaaatccacctcga SEQ ID NO: 237
OsSPL6	Ggctcgacaatggaggtgcccgggtcgg SEQ ID NO: 238	Cgggatccctacatgggtccacgttcta SEQ ID NO: 239
OsSPL7	Ggctcgacaatggaggaacgctgcggc SEQ ID NO: 240	Cgggatccctagacacgcccggcgcct SEQ ID NO: 241
OsSPL8	gcgtcgacaatgatgaacgttccatccg SEQ ID NO: 242	Cgggatccctagtgcagatgcgat SEQ ID NO: 243
OsSPL9	Ggctcgacaatggacgccccggcggcgcg SEQ ID NO: 244	Cgggatccctatgatgagtgttccatg SEQ ID NO: 245
OsSPL10	Ggactagtatgatgagcggtagatgaa SEQ ID NO: 246	Cgggatccctacatgaatgcaccicga SEQ ID NO: 247
OsSPL11	Ggctcgacaatggagtgcaccccgctc SEQ ID NO: 248	Cgggatccctaatgtatctggttcagac SEQ ID NO: 249
OsSPL12	Ggctcgacaatggctcttttgggatgaa SEQ ID NO: 250	Ggactagtctagtcagatggccatagc SEQ ID NO: 251
OsSPL13	Cgagctcatggaccgcaaggacaaggc SEQ ID NO: 252	Cgggatccctatctgactggaacggcg SEQ ID NO: 253
OsSPL15	Ggctcgacaatgcagagggagtgggcc SEQ ID NO: 254	Cgggatccctatctgacaaaatcca SEQ ID NO: 255
OsSPL16	Gtcgacaatggagtggtatcgaat SEQ ID NO: 256	Ggatccctactgcatgagaacggca SEQ ID NO: 257
OsSPL17	Ggctcgacaatggcagccggcgagcagg SEQ ID NO: 258	Cgggatccctacagagaccgttcagg SEQ ID NO: 259
OsSPL18	Cgagctcatggattggatcgaat SEQ ID NO: 260	Cgggatccctactgacagagaatggga SEQ ID NO: 261
OsSPL19	Cgagctcatggagtgccggcgccgccc SEQ ID NO: 262	Cgggatccctacacctgccaagagaat SEQ ID NO: 263
OsOTUB1	Gattgaggagacgagccatc SEQ ID NO: 264	Cttttcagatctgcctec SEQ ID NO: 265
OsSPL14	Cattgggtttgtgcatcag SEQ ID NO: 266	Caacgacccatattccaacc SEQ ID NO: 267
OsUBC13	Gggatgacttgaggtatgg SEQ ID NO: 268	Gcgactcagttctccact SEQ ID NO: 269
OsTB1	Gaaccatcatcgiccacca SEQ ID NO: 270	Ctgatcctgctgactgct SEQ ID NO: 271
DEP1	Gcgagatcacgttctcaag SEQ ID NO: 272	Tgcagtttggcttacagcat SEQ ID NO: 273
OsRCN2	Caacccacggfgaagatga SEQ ID NO: 274	Acctgtggatgccgatgtt SEQ ID NO: 275
OsMADS3 4	Gagatcgacgtagaggcagc SEQ ID NO: 276	Taggcatccactcaggagg SEQ ID NO: 277
Os11g478 70	Agctgcacatcgtggaclac SEQ ID NO: 278	Ttcagacaatggcttgaac SEQ ID NO: 279
Os06g382 94	Tcgtttgtggtggagtg SEQ ID NO: 280	Aggtagatggcgtaggtgtt SEQ ID NO: 281
Actin1	Ccactatgtccctggcatt SEQ ID NO: 282	Gtactcagcctggcaatcc SEQ ID NO: 283

Фиг. 17

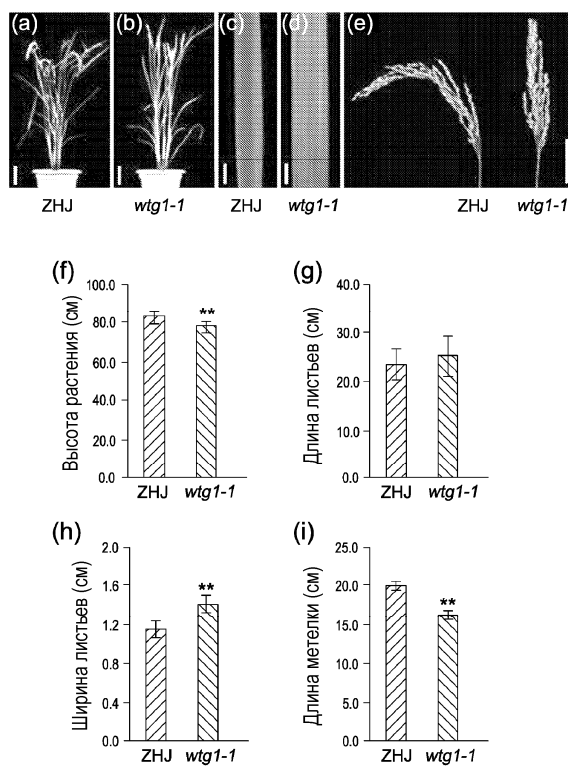
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
DEP1-GTAC-motif	Aatttattccctgtctgtttcattctgaactacccgcgcgcggatgc ggccatagc SEQ ID NO: 284	Gctatggccgcattcccgagcgcggagtagctacgaaatg aaacagcaagggaataaatt SEQ ID NO: 285
pOsOTUB1.1	Gaattcgagttgaattgtgtctgtctga SEQ ID NO: 286	Ggtaccgagagctcgaccgacacg SEQ ID NO: 287
gOsOTUB1.1	Cccggatggcgccgggactactaccact SEQ ID NO: 288	Gtcgactacttcgggtagagaatctcg SEQ ID NO: 289
gOsOTUB1.2	Cccggatgttttctacttggattattt SEQ ID NO: 290	Gtcgactacttcgggtagagaatctcg SEQ ID NO: 291
OsOTUB1.1-OE	Cccggatggcgccgggactactaccact SEQ ID NO: 292	Gtcgactacttcgggtagagaatctcg SEQ ID NO: 293
OsOTUB1.2-OE	Cccggatgttttctacttggacatatac SEQ ID NO: 294	Gtcgactacttcgggtagagaatctcg SEQ ID NO: 295
OsOTUB1.1-GFP	Cccggatggcgccgggactactaccact SEQ ID NO: 296	Gtcgacttcgggtagagaatctcgtag SEQ ID NO: 297
OsOTUB1.2-GFP	Cccggatgttttctacttggacatatac SEQ ID NO: 298	Gtcgacttcgggtagagaatctcgtag SEQ ID NO: 299
CRISPR-OsOTUB1	Cagctggaaagtgttctcggttttagagctagaaa SEQ ID NO: 300	Gcagaacaatttcagctcgccgacccaagccagca SEQ ID NO: 301
OsUBC13-OE	Gtcgacatggccaacagcaactcccccg SEQ ID NO: 302	Ctcagttatgcaccgctggcatacagcg SEQ ID NO: 303
RNAi-OsUBC13-L	Actagtcccgccgaatcatcaaggagac SEQ ID NO: 304	Agatctgaactgtccgaatctgaaggcg SEQ ID NO: 305
RNAi-OsUBC13-R	Tctagaccgcccgaatcatcaaggagac SEQ ID NO: 306	Ggaccggaactgtccgaatctgaaggcg SEQ ID NO: 307
OsSPL14-OE	Gaattctatggagatggccagtgaggag SEQ ID NO: 308	Ggatccctacagagaccaatccatcgtgtt SEQ ID NO: 309
RNAi-OsSPL14-L	Actagtaagaacaagggaaggcgctg SEQ ID NO: 310	Agatctaaagggtttgcggcctct SEQ ID NO: 311
RNAi-OsSPL14-R	Tctagaaagaacaagggaaggcgctg SEQ ID NO: 312	Ggatccaaagggtttgcggcctct SEQ ID NO: 313
BD-OsOTUB1.1	Ggatccatggcgccgggactactaccact SEQ ID NO: 314	Gaattctacttcgggtagagaatctcg SEQ ID NO: 315
BD-OsOTUB1.2	Ggatccatgttggaacatactactagagac SEQ ID NO: 316	Gaattctacttcgggtagagaatctcg SEQ ID NO: 317
AD-OsUBC13	Ggatccatggccaacagcaactcccccg SEQ ID NO: 318	Gtcgactgcaccgctggcatacagcg SEQ ID NO: 319
BD-OsSPL14ΔN2	Gaattcatgcccgcgggtgccagtgga SEQ ID NO: 320	Ggatccctacagagaccaatccatcgtgtt SEQ ID NO: 321
cYFP-OsOTUB1.1	Gtcgacaatggcgccgggactactaccact SEQ ID NO: 322	Ggatccctacttcgggtagagaatctcg SEQ ID NO: 323
nYFP-OsUBC13	Gtcgacaatggccaacagcaactcccccg SEQ ID NO: 324	Ggatccctatgcaccgctggcatacagcg SEQ ID NO: 325
nYFP-OsSPL14	Gagctcatggagatggccagtgaggag SEQ ID NO: 326	Ggatccctacagagaccaatccatcgtgtt SEQ ID NO: 327

	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
nYFP-OsSPL14ΔN1	Gagctcatggcagcgccggcgccactgg SEQ ID NO: 328	Ggatccctacagagaccaatccatcgtgtt SEQ ID NO: 329
nYFP-OsSPL14ΔN2	Gagctcatggcagcgccggcgccactgg SEQ ID NO: 330	Ggatccctacagagaccaatccatcgtgtt SEQ ID NO: 331
nYFP-OsSPL14ΔN3	Gagctcatgagctttatgttgattctc SEQ ID NO: 332	Ggatccctacagagaccaatccatcgtgtt SEQ ID NO: 333
nYFP-OsSPL14ΔN4	Gagctcatgtgggatactactaccacagt SEQ ID NO: 334	Ggatccctacagagaccaatccatcgtgtt SEQ ID NO: 335
nYFP-OsSPL14ΔC1	Gagctcatggagatggccagtggaggag SEQ ID NO: 336	Ggatccctaccatggtgggttgacagaa SEQ ID NO: 337
nYFP-OsSPL14ΔC2	Gagctcatggagatggccagtggaggag SEQ ID NO: 338	Ggatccctatctgaacttgcgactcaac SEQ ID NO: 339
nYFP-OsSPL14ΔC3	Gagctcatggagatggccagtggaggag SEQ ID NO: 340	Ggatccctacggcgccggcgccggcgccg SEQ ID NO: 341
nYFP-OsSPL14ΔC4	Gagctcatggagatggccagtggaggag SEQ ID NO: 342	Ggatccctatgcgcggcgccgctcctga SEQ ID NO: 343
nYFP-SBP	Gagctcatgcccgcgggtgccagtgga SEQ ID NO: 344	Ggatccctaggtttgcggcctcctccgc SEQ ID NO: 345
YFP-SPL14ΔSBP-1	Gagctcatggagatggccagtggaggag SEQ ID NO: 346	Gcgtagtgcgaagggtttgcacgccttccctgtt SEQ ID NO: 347
YFP-SPL14ΔSBP-2	Caacccttttgcatcacgc SEQ ID NO: 348	Ggatccctacagagaccaatccatcgtgtt SEQ ID NO: 349

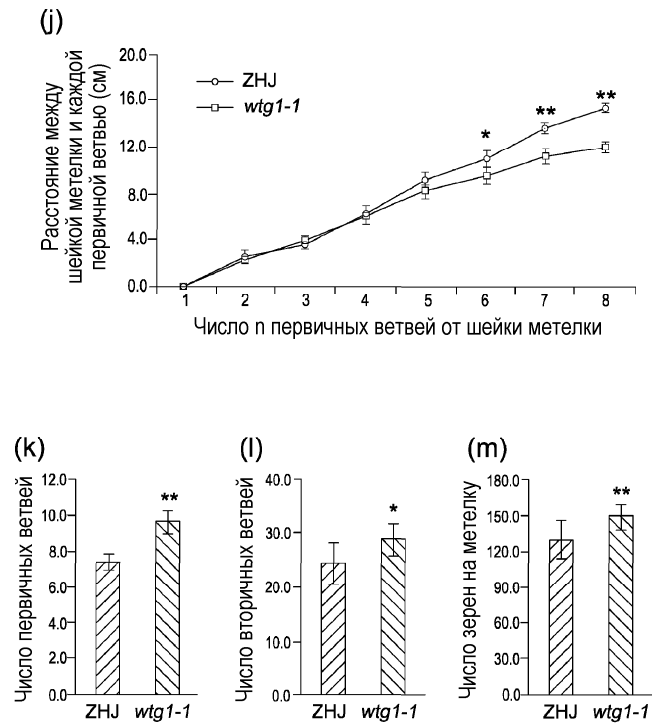
Фиг. 17 продолжение



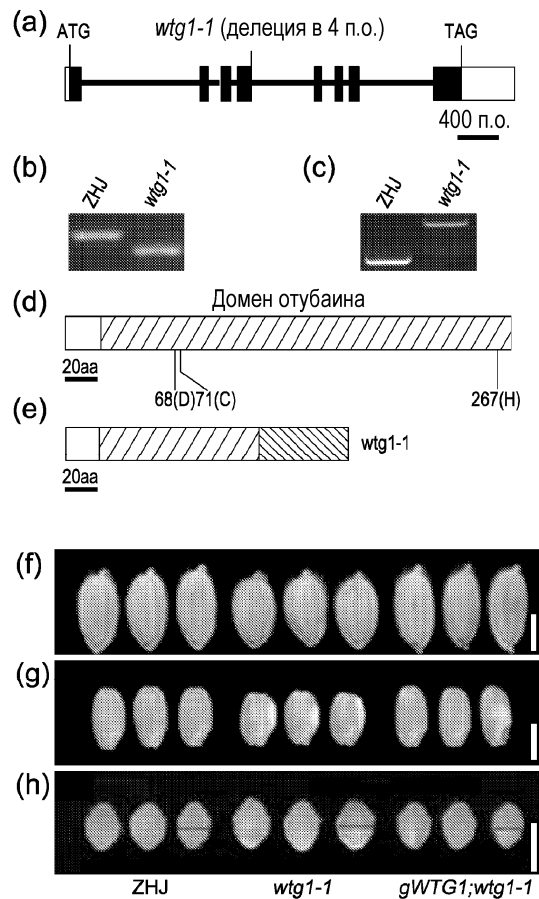
Фиг. 18



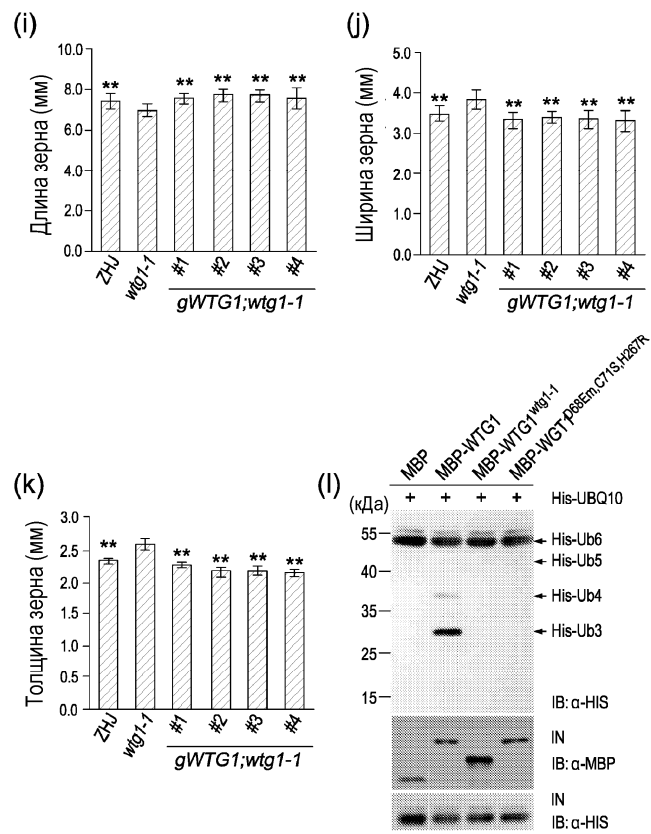
Фиг. 19



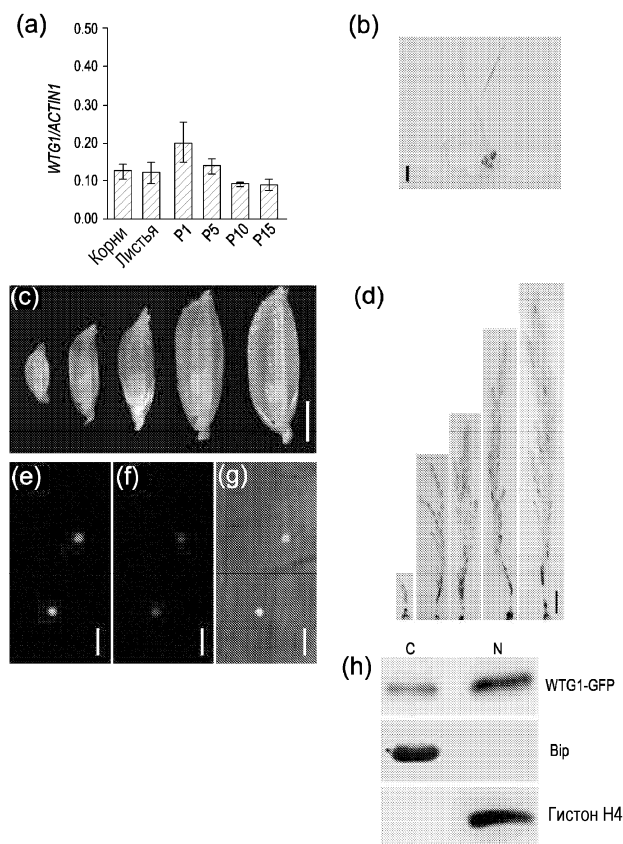
Фиг. 19 продолжение



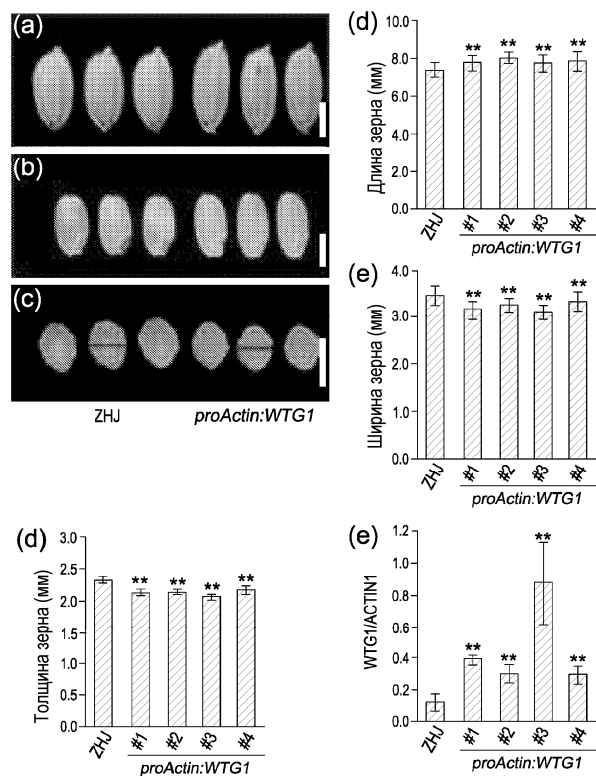
Фиг. 20



Фиг. 20 продолжение



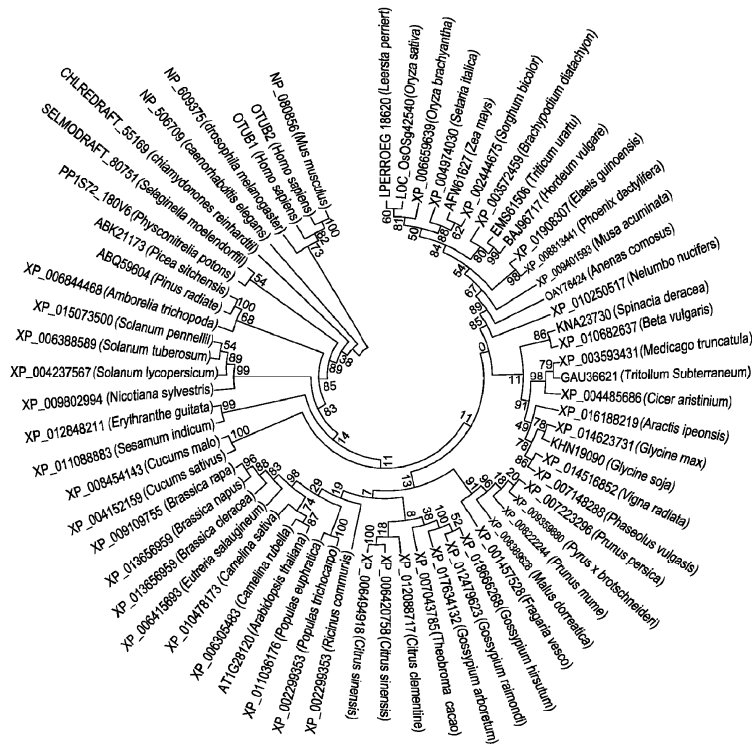
Фиг. 21



Фиг. 22

No.	Хромосома	Положение	ZHJ	wtg-1-1	Ген	Примечание	Индекс SNP/INDEL
Делеция 1	Хрм. 8	26885556 - 26885559	TTAC	-	LOC_Os08g42540	Делеция	1

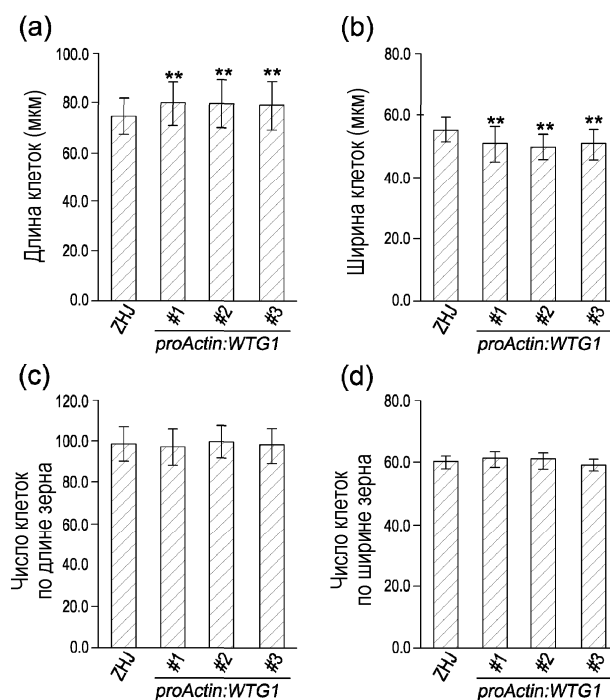
Фиг. 23



Фиг. 24

[illegible]

ФИГ. 25



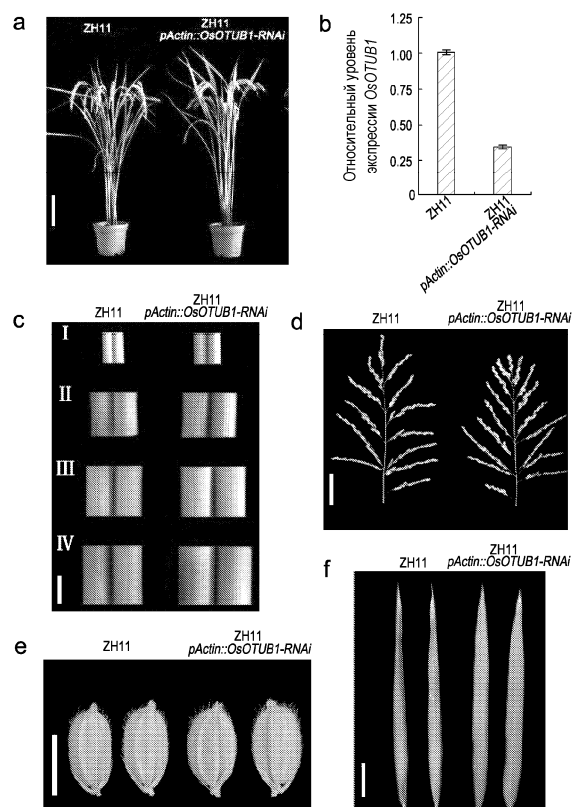
Фиг. 26

	Праймеры	Последовательность праймера
Маркер dCAPS1 для идентификации мутации wtg1-1		
SEQ ID NO: 362	WTG1-dF	CACAAAGTAACAATAAAGTC (Hpy188I)
SEQ ID NO: 363	WTG1-dR	GCTGATGATCTTATCATTTGCTTC
Праймеры для идентификации модифицированного сплайсинга		
SEQ ID NO: 364	WTG1-F1	ATGGGCGGGGACTACTAC
SEQ ID NO: 365	WTG1-R1	TCACTTCGGGTAGAGAATGT
Праймеры для плазмидных конструкций		
SEQ ID NO: 366	C99-WTG1-GF	AGCGCAACGAATTCGAGCTCGGTACATCAAAACACCGGAC
SEQ ID NO: 367	C99-WTG1-GR	GGCCAGTGCCAAGCTTAGCAGCAACATCAACTAGGGGCCT
SEQ ID NO: 368	003-CDSWTG1-F	GCAGGAATTCAAGCTTATGGGCGGGGACTACTAC
SEQ ID NO: 369	003-CDSWTG1-R	AGTCACTATGGTCGACTCACTTCGGGTAGAGAATGT
SEQ ID NO: 370	C43-CDSWTG1-F	TGAACTATACAAAGGCGGCCAATGGGCGGGGACTACTAC
SEQ ID NO: 371	C43-CDSWTG1-R	CGCTCTAGAACTAGTAAATTAATCACTTCGGGTAGAGAATGT
SEQ ID NO: 372	proWTG1-F	CGGGGCGTAATCTAGATGCTACCAAGTCCACGTAT
SEQ ID NO: 373	proWTG1-R	GGATCGATCCTCTAGAAAAGCTTCGATAAAAGCAGT
SEQ ID NO: 374	MBP-WTG1-F	TCGGATCCTCTAGAGTCGACATGGGCGGGGACTACTAC
SEQ ID NO: 375	MBP-WTG1-R	GGCCAGTGCCAAGCTTGCTCACTTCGGGTAGAGAATGT
SEQ ID NO: 376	MBP-wtg1-F	TCGGATCCTCTAGAGTCGACATGGGCGGGGACTACTACCA
SEQ ID NO: 377	MBP-wtg1-R	GGCCAGTGCCAAGCTTGCTCACTCATACAAAATTTATTC
SEQ ID NO: 378	MBP-WTG1-MutF	TCGGATCCTCTAGAGTCGACATGGGCGGGGACTACTACCA
SEQ ID NO: 379	MBP-WTG1-MutR	GGCCAGTGCCAAGCTTGCTCACTTCGGGTAGAGAATGTCGTAGCGAC
SEQ ID NO: 380	MBP-WTG1-MutF1	GAGGAGAAGGAAACAGCTTTTATCG
SEQ ID NO: 381	MBP-WTG1-MutR1	CGATAAAAGCTGTTTCTCTCCTC

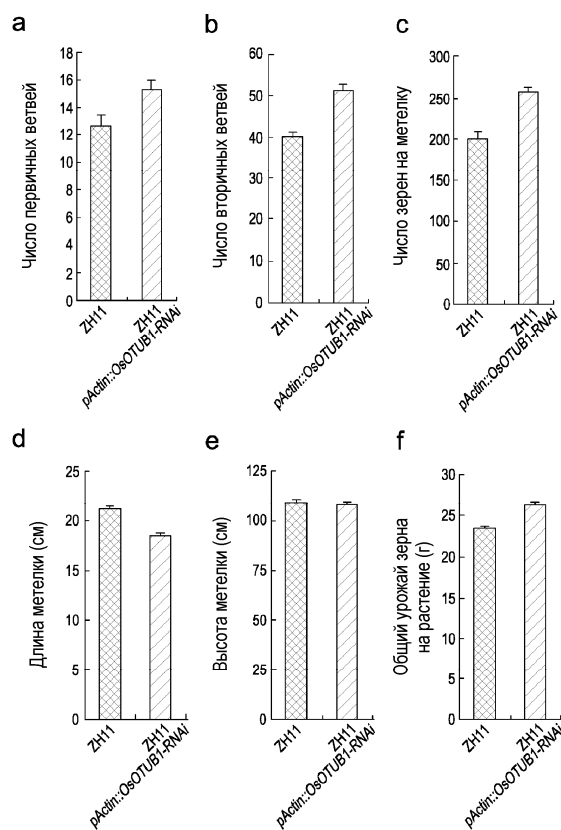
Фиг. 27

	<u>Праймеры</u>	<u>Последовательность праймера</u>
	Праймеры для количественной ОТ–ПЦР в реальном времени	
SEQ ID NO: 382	ACTIN1-F	ACATCGCCCTGGACTATGACCA
SEQ ID NO: 383	ACTIN1-R	GTCGTACTCAGCCTTGGCAAT
SEQ ID NO: 384	WTG1-QF	TGGTTCAGTTCGTGCAAGGCT
SEQ ID NO: 385	WTG1-QR	CCAGGACGGTAGAGCAAAGT
SEQ ID NO: 386	LIC-QF	GGAGTTTCGAGCGTATCTGGAA
SEQ ID NO: 387	LIC-QR	TGGACAGAGGAAGCAGGAGACT
SEQ ID NO: 388	BRD1-QF	TCAACCTTCCTGGAACCAAC
SEQ ID NO: 389	BRD1-QR	TCTGTGAGCTTCTCCCTGGT
SEQ ID NO: 390	BZR1-QF	GACAACAACGAGGTGCTCAA
SEQ ID NO: 391	BZR1-QR	GCTTACATCCCTTGCGGTAG
SEQ ID NO: 392	D1-QF	CGGCCCTAGACCAGAACTTG
SEQ ID NO: 393	D1-QR	CTTCCCTGGAGCGTCTCATGC
SEQ ID NO: 394	D2-QF	AGCTGCCTGGCACTAGGCTCTACAGATCAC
SEQ ID NO: 395	D2-QR	ATGTTGTCTGGAGATGAGCTCGTCCGTGAGC
SEQ ID NO: 396	D11-QF	TGGCGATGACATTCCGATG
SEQ ID NO: 397	D11-QR	GCAACTGCAAACCTGTCAGGA
SEQ ID NO: 398	D61-QF	GTTGGACGGCCTTACGTTTATC
SEQ ID NO: 399	D61-QR	GCTGGTAAACTCCAGCAAGC
SEQ ID NO: 400	GS2-QF	GCCATTCCCCTTTCAAGCTAT
SEQ ID NO: 401	GS2-QR	GACCATGAATCCCTTCCCTTTG
SEQ ID NO: 402	GL7-QF	CACAGGGAAGATGCAAGGTG
SEQ ID NO: 403	GL7-QR	GGCCCCGTGTTGAGGAATAT
SEQ ID NO: 404	SPL13-QF	CCGCCGTTCCAGATCAGATA
SEQ ID NO: 405	SPL13-QR	AAGAAGGGACGTAGGTGGTG
SEQ ID NO: 406	SRS5-QF	GAGTTCGACGATGGTGACG
SEQ ID NO: 23	SRS5-QR	TCAAAACCAGACACACAAACTG

Фиг. 27 продолжение



Фиг. 28



Фиг. 29

