

OZET**BİTKİLERDE TOHUM VE ORGAN BÜYÜKLÜĞÜNÜ**
MODULE ETME YÖNTEMLERİ

5

Bu buluş, tohum ve organ büyüklüğünü kontrol etmek için DA1 ile sinerjik olarak hareket eden bir bitki E3 ubikuitin ligazıyla (burada DA2 olarak bahsedilmektedir) ilgilidir. DA1 ekspresyonu veya aktivitesi eksik bir bitkide DA2 ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılmasını içeren ve bitki verimini artırmayı amaçlayan yöntemler sunulmaktadır. Verimi artmış bitkiler ve bu bitkileri üretme yöntemleri de sunulmaktadır.

10

İSTEMLER

1. Bir bitkinin birim alan başına tohum kütlesini, büyümesini ve/veya biyokütlesini artırmaya yönelik olan bir yöntem olup, söz konusu bitkinin hücrelerindeki bir DA2 polipeptidinin ekspresyonunu veya aktivitesini azaltmayı içerir; burada, DA2 polipeptid, SEKANS KOD NO.: 2 ile temsil edilen bir RING domaini içerir ve ayrıca, bu bitki azaltılmış DA1 ya da azaltılmış DA1 ve EOD1 ekspresyonuna veya aktivitesine sahiptir; burada, DA2 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesi:

(a) bitki hücresinin DA2 polipeptidini kodlayan veya onun ekspresyonunu regüle eden nükleotid sekansına bir mutasyon eklemek ve mutasyona uğratılmış hücreden bitki rejenere etmek ya da

(b) DA2 polipeptidi ekspresyonunu azaltan bir supresör nükleik asit eksprese eden bir heterolog nükleik asidi söz konusu bitki hücresinin bünyesine dâhil etmek suretiyle azaltılır.

2. İstem 1'e uygun yöntem olup, söz konusu bitkinin hücrelerinde bir DA1 polipeptidi ve/veya bir EOD polipeptidi ekspresyonunun veya aktivitesinin azaltılmasını içerir; burada, DA1 polipeptidi ve/veya EOD polipeptidi ekspresyonu veya aktivitesi:

(a) bitki hücresinin DA1 polipeptidini ve/veya EOD polipeptidini kodlayan veya onun ekspresyonunu regüle eden nükleotid sekansına bir mutasyon eklemek ve mutasyona uğratılmış hücreden bitki rejenere etmek;

(b) DA1 polipeptidi ve/veya EOD polipeptidi ekspresyonunu azaltan bir supresör nükleik asit eksprese eden bir heterolog nükleik asidi, söz konusu bitki hücrelerinin bünyesine dâhil etmek ya da

5 (c) söz konusu bitkinin hücrelerinde bir dominant negatif DA1 polipeptidi eksprese etmek suretiyle azaltılır.

3. İstem 1 veya 2'den herhangi birine uygun bir yöntem olup; burada, bitki hücrelerinde gerçekleşen DA2 polipeptidi ekspresyonu veya
10 aktivitesi ortadan kaldırılır.

4. Birim alan başına tohum kütlesi, büyümesi ve/veya biyokütlesi artmış bir bitki üretmeye yönelik olan bir yöntem olup,

15 DA1 ya da hem DA1 hem de EOD1 ekspresyonunda veya aktivitesinde eksik olan bir bitki hücresi sağlamayı,
bitki hücrelerinin bünyesine SEKANS KOD NO.: 2 ile temsil edilen bir RING domaini içeren bir DA2 polipeptidi ekspresyonu veya aktivitesini azaltan bir heterolog nükleik asit
20 dâhil etmeyi ya da SEKANS KOD NO.: 2 ile temsil edilen bir RING domaini içeren bir DA2 polipeptidi ekspresyonu veya aktivitesini azaltan bir mutasyon eklemeyi ve
bir veya daha fazla transfore edilmiş hücreden bitki rejenerasyonu
etmeyi içerir.

25

5. İstem 4'e uygun bir yöntem olup; burada, heterolog nükleik asit, söz konusu bitki hücrelerine DA2 polipeptid ekspresyonunu azaltan bir supresör nükleik asit eksprese eder ve/veya burada, heterolog nükleik

asit, bitkinin hücrelerinde bir DA2 polipeptidi ekspresyonunu veya aktivitesini ortadan kaldırır.

6. Önceki istemlerden herhangi birine uygun bir yöntem olup; burada, bu bitkinin kendi büyüklüğü, tohum büyüklüğü ve/veya organ büyüklüğü, vahşi tip bitkilere kıyasla artmıştır.

7. İstem 1 ilâ 6'dan herhangi birine uygun olan bir yöntem olup, azaltılmış DA2 ekspresyonuna veya aktivitesine sahip bitkinin ürün veya soydaş bitkilerini eşeysiz çoğaltmayı veya büyütmeyi içerir.

8. Önceki istemlerden herhangi birine uygun bir yöntem olup; burada, DA2 polipeptidi SEKANS KOD NO.: 36 ile temsil edilen bir birinci konsensus domaini içerir ve/veya burada, DA2 polipeptidi SEKANS KOD NO.: 37 ile temsil edilen bir ikinci konsensus domaini içerir.

9. Önceki istemlerden herhangi birine uygun bir yöntem olup; burada, DA2 polipeptidi SEKANS KOD NO.: 20 ilâ 35 ile temsil edilenlerden herhangi biriyle en az %20 oranında sekans özdeşliğine sahip bir amino asit sekansı içerir.

10. Önceki istemlerden herhangi birine uygun bir yöntem olup; burada, DA1 proteini SEKANS KOD NO.: 41 ilâ 64 ile temsil edilenlerden herhangi biriyle en az %20 oranında sekans özdeşliğine sahip bir sekans içerir.

11. Önceki istemlerden herhangi birine uygun bir yöntem olup; burada, EOD1 polipeptidi SEKANS KOD NO.: 74 ilâ 90 ile temsil

edilenlerden herhangi biriyle en az %20 oranında sekans özdeşliğine sahip bir sekans içerir.

12. İstem 1 ilâ 11'den herhangi birine uygun bir yöntem olup; burada, 5 bitki isteğe bağlı olarak damarlı bir bitkidir; burada bu bitki Lithospermum erythrorhizon, Taxus spp, tütün, kabakgiller, havuç, lahana, kavun, kırmızı biber, üzüm asmaları, marul, çilek, kolza tohumu lahana, şeker pancarı, buğday, arpa, mısır, pirinç, soya fasulyesi, bezelye, sorgum, ayçiçeği, domates, patates, biber, kasımpatı, karanfil, 10 keten, kenevir ve çavdardan oluşan bir gruptan seçilmiş zirai bir bitkidir.

13. Hem SEKANS KOD NO.: 2 ile temsil edilen bir RING domaini içeren bir DA2 polipeptidi ekspresyonu veya aktivitesi azaltılmış, hem 15 de bir DA1 polipeptidi ya da bir DA1 ve bir EOD1 polipeptidi ekspresyonu veya aktivitesi azaltılmış bir bitki olup; burada, bahsi geçen bir veya daha fazla DA2, DA1 ve EOD1 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesi, o bitkinin bir veya daha fazla hücrelerinin bünyesine bir heterolog nükleik asit dâhil etmek 20 suretiyle azaltılır;

burada, heterolog nükleik asit, bir veya daha fazla polipeptidin ekspresyonunu azaltan bir supresör nükleik asit eksprese eder ve burada, bu bitkinin birim alan başına tohum kütlesi, büyümesi ve/veya biyokütlesi, vahşi tipe kıyasla artmıştır.

TARİFNAME**BİTKİLERDE TOHUM VE ORGAN BÜYÜKLÜĞÜNÜ**

5

MODULE ETME YONTEMLERİ**Buluşun alanı**

Bu buluş, bitkilerin tohum ve organlarının büyüklüğünü değiştirmeye
10 yönelik yöntemlerle, örneğin bitki veriminin iyileştirilmesiyle ilgilidir.

Buluşun Arkaplanı

Tohumların ve organların büyüklüğü, agronomik ve ekolojik açıdan
15 önemli olan ve genetik kontrol altında bulunan bir özelliktir (Alonso-
Blanco, C. PNAS USA 96, 4710-7 (1999); Song, X.J. Nat Genet 39,
623-30 (2007); Weiss, J. Int J Dev Biol 49, 513-25 (2005); Dimmeny,
J.R. Development 131, 1101-10 (2004); Disch, S. Curr Biol 16, 272-9
(2006); Science 289, 85-8 (2000); Horiguchi, G. Plant J 43, 68-78
20 (2005); Hu, Y Plant J 47, 1-9 (2006); Hu, Y. Plant cell 15, 1951-61
(2003); Krizek, B.A. Dev Genet 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y.
PNAS USA 97, 942-7 (2000); Nath, U. Science 299, 1404-7 (2003);
Ohno, C.K. Development 131, 1111-22 (2004); Szecsi, J. Embo J 25,
3912-20 (2006); White, D.W. PNAS USA 103, 13238-43
25 (2006); Horvath, B.M. Embo J 25, 4909-20 (2006); Garcia, D. Plant
cell 17, 52-60 (2005). Belirli bir türde tohum ve organların nihai
büyüklüğü sabittir; ara türlerde tohum ve organ büyüklüğündeki

varyasyon ise önemli ölçüde büyüktür ve bu da bitkilerin, tohum ve organ büyümesini koordineli ve zamanlı bir şekilde kontrol eden regülasyon mekanizmalarına sahip olduğunu gösterir. Bununla birlikte, tohum ve organ büyüklüğü önemli olmasına rağmen, bitkilerde nihai tohum ve organ büyüklüğünü kontrol eden moleküler ve genetik mekanizmalar hakkında az şey bilinmektedir.

Tohum büyüklüğünün genetik regülasyonu, kantitatif özellik yeri (QTL) haritalaması kullanılarak domates, soya fasulyesi, mısır ve pirinç de dahil olmak üzere, bitkilerde araştırılmıştır. Bugüne kadar, yayınlanmış literatürde, pirinç danesi büyüklüğü için başlıca iki QTL'nin temelinde yer alan iki gen (Song, X.J. Nat Genet 39, 623-30 (2007); Fan, C. Theor. Appl. Genet. 112, 1164-1171 (2006)) tanımlanmış olup bu genlerin mekanizmaları açıklığa kavuşturulmuş durumdadır. Arabidopsis'te, Ler ve Cvi katılımları arasındaki çaprazlamalarda tohum ağırlığını ve/veya uzunluğunu etkileyen on bir yer haritalandırılmıştır {Alonso-Blanco, 1999 yukarıda}, fakat karşılık gelen genler tanımlanmamıştır. Son yıllarda yürütülen çalışmalar, tohum büyüklüğünün kontrolünde AP2 ve ARF2'nin yer aldığı ortaya koymuştur. Maalesef, bununla birlikte, ap2 ve arf2 mutantları vahşi tipten daha düşük fertiliteye sahiptir (Schruff, M.C. Development 137, 251-261 (2006); Ohto, M.A. PNAS USA 102, 3123-3128 (2005); Jofuku, K.D. PNAS USA 102, 3117-3122 (2005)). Ek olarak, mutant bitkiler kullanılarak yapılan çalışmalar, hücre çoğalması veya genişmesi üzerinde etkili olarak organ büyüklüğünü etkileyen çeşitli pozitif ve negatif regülatörler tanımlamıştır {Krizek, B.A. Dev Genet 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 942-7 (2000); Nath, U. Science 299, 1404-7 (2003); Ohno,

C.K. Development 131, 1111-22 (2004); Szecsi, J. Embo J 25, 3912-20 (2006); White, D.W. PNAS USA 103, 13238-43 (2006); Horvath, B.M. Embo J 25, 4909-20 (2006); Garcia, D. Plant cell 17, 52-60 (2005). Horiguchi, G. Plant J 43, 68-78 (2005); Hu, Y Plant J 47, 1-9 (2006) Dinneny, J.R. Development 131, 1101-10 (2004)).

Ubikuitinle ilişkili faaliyetlere katılan birkaç faktörün tohum büyüklüğünü etkilediği bilinmektedir. Büyümeyi kısıtlayan bir faktör olan DA1, bir ubikuitin reseptörüdür ve ubikuitini in vitro bağlayan iki ubikuitin etkileşim motifi (UIM) içermektedir ve ayrıca, da1-1 mutanı ovüllerin maternal integumentlerini etkilemek suretiyle büyük tohumlar oluşturmaktadır (Li ve ark., 2008). BIG BROTHER (BB) E3 ubikuitin ligazını kodlayan bir da1-1 (EOD1) artıracısındaki mutasyonlar (Disch ve ark., 2006; Li ve ark., 2008), da1-1 tohum büyüklüğü fenotipini sinerjik olarak artırmaktadır ve bu da, DA1'in tohum büyüklüğünü kontrol etmek için EOD1/BB ile birlikte sinerjik olarak faaliyet gösterdiğine işaret etmektedir. Pirinçte, bir E3 ubikuitin ligazını kodlayan GRAIN WIDTH AND WEIGHT2 (GW2) için bir kantitatif özellik yeri (QTL), hücre bölünmesini sınırlamak suretiyle dane büyüklüğünü kontrol etmektedir (Song ve ark., 2007). Buğdayda bir GW2 homologu tanımlanmıştır (Ta-GW2; Bednarek ve ark. 2012). Pirinçte dane büyüklüğünü sınırlamak için pirinç qSW5/GW5 tarafından kodlanan bir bilinmeyen protein gereklidir (Shomura ve ark., 2008; Weng ve ark., 2008). GW5, bir maya iki hibrid eseyinde poliubikuitinle fiziksel olarak etkileşime girmektedir ve bu da, GW5'in ubikuitin-proteazom yolağına katılabileceğini ortaya koymaktadır (Weng ve ark., 2008). Bununla birlikte, bu iki faktörün pirinçteki maternal ve/veya zigotik dokularda faaliyet

gösterip göstermediği kesin değildir.

Hem tohumların, hem de organların nihai büyüklüğünü kontrol eden ilave faktörlerin tanımlanması sadece bitkilerde büyüklük kontrol mekanizmalarının anlaşılmasını sağlamaz, aynı zamanda örneğin 5 biyoyakıt üretmek için mahsul verimini ve bitki biyokütlesini artırmada önemli pratik uygulamalara sahiptir.

Buluşun Özeti

10

Mevcut buluşun sahipleri, gelişmekte olan tohumların integumentlerinde gerçekleşen hücre çoğalmasını sınırlayarak tohum ve organların nihai büyüklüklerini regüle eden bir bitki E3 ubikuitin ligazı (DA2 olarak ifade edilmektedir) tanımlamışlardır. DA2'nin 15 DA1'le birlikte ve EOD1'den bağımsız şekilde tohum ve organ büyüklüğünü kontrol etmek için sinerjik olarak faaliyet gösterdiği beklenmedik şekilde görülmüştür. Bundan dolayı, DA2 ve DA1'in ya da DA1 ve EOD1'in hedeflenmesi bitki veriminin iyileştirilmesinde faydalı olabilir.

20

Bu patent başvurusuyla ele alınan buluş, istemlerde açıklandığı gibidir.

Bu patent başvurusunda, bir bitkinin beher birim alan için tohum 25 kütlesini, büyümesini ve/veya biyokütlesini artırmaya yönelik olan ve söz konusu bitkinin hücrelerinde bulunan bir DA2 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılmasını içeren bir yöntem açıklanmaktadır;

burada, bu bitkide DA1 ekspresyonu veya aktivitesi eksiktir.

5 Bu patent başvurusunda, ayrıca, bir bitkinin beher birim alan için tohum kütlesini, büyümesini ve/veya biyokütlesini artırmaya yönelik olan ve

söz konusu bitkinin hücrelerinde bulunan bir DA2 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılmasını içeren bir yöntem açıklanmaktadır;

burada, bu bitkide EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi eksiktir.

10

Bu patent başvurusunda, ayrıca, bir bitkinin beher birim alan için tohum kütlesini, büyümesini ve/veya biyokütlesini artırmaya yönelik olan ve

15 söz konusu bitkinin hücrelerinde bulunan bir DA2 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılmasını içeren bir yöntem açıklanmaktadır;

burada, bu bitkide DA1 veya EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi eksiktir.

20 Bu patent başvurusunda, ayrıca, bir bitkinin beher birim alanı için tohum kütlesini, büyümesini ve/veya biyokütlesini artırmaya yönelik olan ve

25 söz konusu bitkinin hücrelerinde bulunan bir DA2 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılmasını veya ortadan kaldırılmasını ve ayrıca, aşağıda sayılanları içeren bir yöntem de açıklanmaktadır:

i) söz konusu hücrelerde bulunan bir DA1 polipeptidinin

ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılması veya ortadan kaldırılması,

ii) söz konusu hücrelerde bulunan EOD1'in ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılması veya ortadan kaldırılması ve/veya

iii) söz konusu hücrelerde bir dominant-negatif DA polipeptidi eksprese edilmesi.

Bu patent başvurusunda, ayrıca, beher birim alan için tohum kütlesi, büyümesi ve/veya biyokütlesi artmış bir bitki üretmeye yönelik olan ve aşağıdakilerden oluşan bir yöntem de açıklanmaktadır:

DA1 ya da hem DA1 hem de EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi eksikliği bulunan bir bitki hücresi temin edilmesi,

bir DA2 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesini ortadan kaldıran veya baskılayan bir heterolog nükleik asidin transformasyon yoluyla bitki hücresi bünyesine dâhil edilmesi ve

bir veya daha fazla transforme edilmiş hücreden bitki rejenerasyonu edilmesi.

Şekillerin Kısa Tanımı

Şekil 1, da2-1 mutantındaki tohum ve organ büyüklüğünü göstermektedir. 1A, Col-0, da2-1 ve 35S::DA2#1 tohumlarının projektif alanını göstermektedir. Bu tohumlar üç gruba (>0,13,

- 0,12-0,13 ve $<0,12 \text{ mm}^2$) ayrılmıştır. Her grup için belirlenen değerler, analiz edilen toplam tohum sayısının bir yüzdesi olarak ifade edilmektedir. 1B; Col-0, da2-1 ve 35S::DA2#1 için meyve başına tohum sayısını göstermektedir. Ana saptaki meyveler (dördüncü meyveden onuncu meyveye kadar), meyve başına tohum sayısını ölçmek için kullanılmışlardır. 1C; Col-0, da2-1 ve 35S::DA2#1 için bitki başına tohum ağırlığını göstermektedir. 1D; Col-0, da2-1 ve 35S::DA2#1 için bitki başına tohum sayısını göstermektedir. 1E; Col-0, da2-1 ve 35S::DA2#1 bitkilerinin boylarını göstermektedir. Değerler (B-E), %100'e ayarlanmış vahşi tip değerine göre ortalama \pm SE cinsinden verilmektedir. Vahşi tipe kıyasla, **, $P<0,01$ ve *, $P<0,05$ (Student t-testi). Ölçek çubukları: F, 1cm; G, 1mm
- 15 Şekil 2; 4 günlük Col-0 (sol), da2-1 (orta) ve 35S::DA2#1 (sağ) bitkilerini ve Col-0 (üst), da2-1 (orta) ve 35S::DA2#1 (alt) çiçeklerini göstermektedir.
- 20 Şekil 3, DA1 ve DA2'nin tohum büyüklüğünü kontrol etmek için sinerjik olarak faaliyet gösterdiklerini göstermektedir. 3A; Col-0, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1'in kuru tohumlarını göstermektedir. 3B; Col-0, da2-1, da1-1 ve da1-1 da2-1'in (soldan sağa) 10 günlük fidelerini göstermektedir. 3C; Col-0, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1'in tohum ağırlıklarını göstermektedir. 3D; Col-0, da1-ko1, da2-1 ve da1-ko1 da2-1'in tohum ağırlıklarını göstermektedir. Değerler, %100'e ayarlanmış ilgili vahşi tip değerlerine göre ortalama \pm SE cinsinden verilmektedir. Vahşi tipe kıyasla **, $P<0,01$ ve
- 25

*, $P < 0,05$ (Student t-testi). Ölçek çubukları: A, 0,1mm; B, 1m

Şekil 4, DA1 ve DA2'nin tohum büyüklüğünü kontrol etmek için sinerjik olarak faaliyet gösterdiklerini göstermektedir. Sol üst panel, 10 günlük Col-0, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1 fidelerinin kotiledon alanlarını göstermektedir. Sağ üst panel, 10 günlük Col-0, da1-ko1, da2-1 ve da1-ko1 da2-1 fidelerinin kotiledon alanlarını göstermektedir. Sol alt panel; Col-0, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1 embriyolarının kotiledonlarında bulunan palisat hücrelerinin ortalama alanlarını göstermektedir. Sağ alt panel Col-0, da1-1, da1-1 da2-1, da1-ko1 da2-1, da1-ko1 da1-1 ve da1-ko1 da1-1 da2-1 tohumlarının projektif alanını göstermektedir. Değerler, %100'e ayarlanmış ilgili vahşi tip değerlere göre ortalama \pm SE cinsinden verilmektedir. Vahşi tipe kıyasla **, $P < 0,01$ ve *, $P < 0,05$ (Student t-test,). Ölçek çubukları: A, 0,1mm; B, 1m

Şekil 5, DA1 ve DA2'nin gelişmekte olan tohumların maternal integumentlerinde gerçekleşen hücre çoğalmasını kontrol etmek için sinerjik faaliyet gösterdiklerini göstermektedir. (5A-5D), sırasıyla, Col-0, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1'in olgun Ovüllerini göstermektedir. da2-1 mutasyonu, da1-1'in ovül büyüklüğünü sinerjik olarak artırmaktadır.

Şekil 6; Col-0 \times Col-0 (c/c) F1, da2-1 \times da2-1 (d2/d2) F1, Col-0 \times da2-1 (c/d2) F1 ve da2-1 \times Col-0 (d2/c) F1 tohumlarının projektif alanını (sol panelde) ve ayrıca, Col-0 \times Col-0 (c/c) F1, da1-ko1 da2-1 \times da1-ko1 da2-1 (dd/dd) F1, Col-0 \times da1-ko1

da2-1 (c/dd) F1, da1-ko1 da2-1 \times Col-0 (dd/c) F1 tohumlarının projektif alanlarını (orta panelde) göstermektedir. Sağ panel, da1-ko1/+ da2-1/+ tohum zarfları içinde da1-ko1/+ da2-1/+ (a), da1-ko1/+ da2-1da2-1 (b), da1-ko1/da1-ko1 da2-1/+ (c) ve da1-ko1 da2-1 (d) embriyolarının gelişmesine yol açan da1-ko1 da2-1 çift mutant polenine sahip da1-ko1/+ da2-1/+ bitkilerinin tozlaşmadan sonraki projektif tohum alanlarını göstermektedir. da1-ko1 da2-1 çift mutant poleniyle fertilize edilmiş da1-ko1/+da2-1/+ bitkilerinden alınan münferit tohumların projektif alanları ölçülmüştür. Bu tohumların da1-ko1 ve da2-1 mutasyonları için genotipi de belirlenmiştir. Bu veriler, da2-ko1 ve da2-1 mutasyonlarının bu tohumların büyüklüklerinde görülen varyasyonla ilişkilendirilmediğini göstermektedirler ($P > 0.05$, Student t-test). Değerler, %100'e ayarlanmış ilgili vahşi tip değerlere göre ortalama \pm SE cinsinden verilmektedir. Vahşi tipe kıyasla, **, $P < 0,01$ (Student t-testi). Ölçek çubukları: A-D, 0,5 mm.

Şekil 7; Col-0, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1 olgun ovüllerinin projektif alanlarını (sol panelde); 6 DAP ve 8 DAP'daki Col-0, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1 tohumlarının dış integumentlerinde bulunan hücre sayısını (orta panelde) ve ayrıca, münferit tohumlar için dış integument boyundan ve hücre sayısından yola çıkılarak hesaplanan, 6 DAP ve 8 DAP'daki Col-0, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1 tohumlarının dış integumentlerindeki ortalama hücre boyunu (sağ panelde) göstermektedir.

Şekil 8A, DA2 gen yapısını göstermektedir. Başlangıç kodonu (ATG) ve sonlanma kodonu (TAA) gösterilmektedir. Kapalı kutular kodlama sekansını; açık kutular 5' ve 3' transle edilmemiş bölgelerini ve kutular arasındaki çizgiler intronları göstermektedir. DA2 geninde bulunan T-DNA insersiyon yeri (da2-1) gösterilmektedir. Şekil 8B, DA2 proteininin tahmin edilen bir RING domaini içerdiğini göstermektedir.

Şekil 9, DA2'nin E3 ubikuitin ligazı aktivitesini göstermektedir. MBP-DA2 ve mutasyona uğratılmış DA2 (MBP-DA2C59S ve MBP-DA2N91L) füzyon proteinleri, E1, E2 ve His-ubikuitin (His-Ub) varlığında E3 ubikuitin ligazı aktivitesi açısından eseye tâbi tutulmuştur. Ubikuitinlenmiş proteinler, sırasıyla, anti-His antikoruyla (Anti-His) ve anti-MBP antikoruyla (Anti-MBP) immünoblotlama (IB) yoluyla tespit edilmişlerdir. Aşağıdaki ok MBP-DA2 proteinlerini ve yukarıdaki ok ubikuitinlenmiş MBP-DA2 proteinlerini göstermektedir.

Şekil 10; COM'un kendi promotoruyla yönlendirilen DA2 kodlama sekansı ile transforme edilmiş da2-1 olduğu Col-0, da2-1, COM#6, COM#8, ve COM#10 tohumlarının projektif alanlarını (üst panelde); Col-0, da2-1, COM#6, COM#8 ve COM#10 bitkilerinin petal alanlarını (orta panelde) ve ayrıca, Col-0, da2-1, COM#6, COM#8 ve COM#10 fidelerinde bulunan DA2 geni ekspresyonunun kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR analizini (alt panelde) göstermektedir. Değerler (D ve E), %100'e ayarlanmış da2-1 değerlerine göre ortalama \pm SE cinsinden verilmektedir. da2-1 mutantına kıyasla, **, P<0,01

(Student t-testi).

Şekil 11, DA2'nin ekspresyon paternlerini göstermektedir. 11A, DA2 geni ekspresyonunun kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR analizini göstermektedir. Köklerden (R), saplardan (S), yapraklardan (L), fidelerden (Se) ve çiçek kümelerinden (In) toplam RNA izole edilmiştir. 11B-11N, pDA2:GUS transgen ekspresyonuyla izlenene DA2 ekspresyon aktivitesini göstermektedir. Dört GUS eksprese eden hat gözlemlenmiştir ve boyama yoğunluğu açısından hafif şekilde farklılık gösterebilirler de, hepsi benzer bir patern göstermişlerdir. Bir 4 günlük fidede (11B), bir 10 günlük fidede (11C), bir floral çiçek kümesinde (11D), gelişmekte olan petallerde (11E-11G), gelişmekte olan stamenlerde (11H ve 11I), gelişmekte olan karpellerde (11J-11L) ve gelişmekte olan ovüllerde (11M ve 11N) GUS aktivitesinin histokimyasal analizi. Ölçek çubukları: B-D, 1mm; E-N, 0,1mm.

Şekil 12, DA1'in DA2 ile in vitro ortamda doğrudan doğruya etkileşime geçtiğini göstermektedir. GST-DA1, GST-DA1R358K, GST-DA1-UIM, GST-DA1-LIM, GST-DA1-LIM+C ve GST-DA1-C, amiloz reçinesi üzerinde immobilize edilmiş MBP-DA2 kullanılarak düşürüldüler (PD) ve bir anti-GST antikoru kullanılarak immünoblotlama (IB) yoluyla analiz edildiler.

Şekil 13, DA1'in ve onun spesifik protein domainlerini içeren türevlerinin şematik bir diyagramını göstermektedir. Tahmin

edilen DA1 proteini iki UIM motifi, tek bir LIM domaini ve C-terminal bölgesi içermektedir.

5 Şekil 14, DA1'in DA2 ile in vivo ortamda etkileşime girdiğini göstermektedir. *Nicotiana benthamiana* yaprakları, 35S:Myc-DA1 and 35S:GFP-DA2 plazmidlerini barındıran *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 hücrelerinin enjekte edilmesiyle transforme edilirler. Toplam proteinler GFP-Trap-A ile immüno-çökeltilmiş ve immüno-blot, sırasıyla, anti-GFP ve anti-Myc antikolarıyla problanmışır. İmmüno-çökeltilmiş GFP-DA2 kompleksinde Myc-DA1 tespit edilmiştir ve bu da, bitkide DA1 ve DA2 arasında fiziksel bir ilişki olduğuna işaret etmektedir.

15 Şekil 15, da2-1 mutantlarının organ büyüklüklerinde artışı açığa çıkardığını göstermektedir. 15A; Col-0, da2-1 ve 35S:DA2#1 bitkilerinin petal boyunu (PL), petal genişliğini (PW), petal alanını (PA), sepal alanını (SA), karpel boyunu (CL), uzun stamen boyunu (LSL) ve kısa stamen boyunu (SSL) göstermektedir. 15B; Col-0, da2-1 ve 35S:DA2#1 bitkilerinin beşinci yaprak alanını göstermektedir. 15C; Col-0, da2-1 ve 35S:DA2#1 çiçeklerinin ağırlıklarını göstermektedir. 15D, Col-0 ve da2-1 petallerinin maksimal genişlik bölgesinde yer alan adaksiyal epidermal hücrelerinin büyüklüklerini göstermektedir. 20 15E, Col-0 ve da2-1'in beşinci yapraklarında yer alan palisat hücrelerinin büyüklüklerini göstermektedir. Açmış çiçekler (aşama 14) petallerin büyüklüklerini (15A), çiçek ağırlığını (C) ve epidermal hücrelerin büyüklüklerini (15D) ölçmek için

kullanılmışlardır. Değerler (A-E), %100'e ayarlanmış ilgili vahşi tip değerlere göre ortalama \pm SE cinsinden verilmektedir. Vahşi tipe kıyasla **, $P < 0,01$ (Student t-testi).

5 Şekil 16, DA1 ve DA2'nin tohum büyüklüğünü kontrol etmek için sinerjik faaliyet gösterdiklerini göstermektedir. 16D; Col-0, da1-kol, da2-1 ve da1-kol da2-1 çiçeklerinin petal alanlarını göstermektedir. 16E; Col-0, da1-kol, da2-1 ve da1-kol da2-1 petallerinin maksimal genişlik bölgelerinde bulunan adaksiyal epidermal hücrelerin büyüklüklerini göstermektedir. 16F; Col-0, eod1-2, da2-1 ve eod1-2 da2-1'in tohum ağırlıklarını göstermektedir. 16G; Col-0, eod1-2, da2-1 ve eod1-2 da2-1'in petal alanlarını göstermektedir. Açılmış çiçekler (aşama 14) hem petallerin büyüklüklerini (16D ve 16G), hem de epidermal hücrelerin büyüklüklerini (16E) ölçmek için kullanılmışlardır. Değerler (16D-G), %100'e ayarlanmış ilgili vahşi tip değerlere göre ortama \pm SE cinsinden verilmektedir. Vahşi tipe kıyasla, **, $P < 0,01$ ve *, $P < 0,05$ (Student t-testi). Ölçek çubukları: 0,1mm.

20 Şekil 17, DA2'nin gereğinden fazla eksprese edilmesinin organ büyümesini sınırladığını göstermektedir. 17A; Col-0, 35S:DA2#2 ve 35S:DA2#4'ün petal alanlarını göstermektedir. 17B; Col-0, 35S:DA2#2 ve 25 35S:DA2#4 fidelerinde DA2 ekspresyon seviyelerini göstermektedir. Değerler (A ve B), %100'e ayarlanmış Col-0 değerlerine göre ortalama \pm SE cinsinden gösterilmektedir. Vahşi tipe kıyasla, **, $P < 0,01$ (Student t testi).

Şekil 18, DA2L'nin gereğinden fazla eksprese edilmesinin organ büyümesini sınırladığını göstermektedir. 18A, 20 günlük Col-0, 35S:DA2L#1, 35S:DA2L#3, 35S:DA2L#4, 35S:DA2L#5 ve 35S:DA2L#6 bitkilerini göstermektedir. 18B, 30 günlük Col-0, 35S:DA2L#1, 35S:DA2L#3, 35S:DA2L#4, 35S:DA2L#5 ve 35S:DA2L#6 bitkilerini göstermektedir. 18C; Col-0, 35S:DA2L#1, 35S:DA2L#3, 35S:DA2L#4, 35S:DA2L#5 ve 35S:DA2L#6 fidelerinde DA2L ekspresyonuna ilişkin RT-PCR analizini göstermektedir. RT-PCR analizi, 2 haftalık fidelerden hazırlanan ilk iplikçikli cDNA üzerinde yapılmıştır. cDNA, bir ACTIN2 standardına atıf yapılarak standartlaştırılmıştır. Ölçek çubukları: A, 1cm, B, 1cm

Şekil 19, GW2'nin gereğinden fazla eksprese edilmesinin tohum ve organ büyümesini sınırladığını göstermektedir. 19A; 30 günlük Col-0, 35S:GW2#1, 35S:GW2#2, 35S:GW2#3, 35S:GW2#6 ve 35S:GW2L#7 bitkilerini göstermektedir. 19B; Col-0, 35S:GW2#1, 35S:GW2#2, 35S:GW2#3, 35S:GW2#6 ve 35S:GW2L#7 tohumlarının projektif alanlarını göstermektedir. 19C; Col-0, 35S:GW2#1, 35S:GW2#2, 35S:GW2#3, 35S:GW2#6 ve 35S:GW2L#7 fidelerinde GW2 geni ekspresyonuna yönelik kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR analizini göstermektedir. Değerler (B), %100'e ayarlanmış Col-0 değerlerine göre ortalama \pm SE cinsinden verilmektedir. Vahşi tipe kıyasla **, P<0,01 (Student t-testi). Ölçek çubukları: A, 1cm

Buluşu Konu Olan Yapılara İlişkin Detaylı Tarifname

Bu buluş, örneğin tohum ve organ büyüklüğü gibi verimi etkileyen bitki özelliklerinin, DA1 veya DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya 5 aktivitesindeki değişikliklerle birlikte bitki E3 ubiquitin ligazı DA2 ekspresyonu veya aktivitesini değiştirmek suretiyle değiştirilmesine yönelik yöntemlerle ilgilidir. Tercihen, bitkilerde DA2 ve DA1 ekspresyonu veya aktivitesi değiştirilmektedir.

10 DA2 ekspresyonu veya aktivitesi; DA1 veya DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi alterasyonundan önce, onunla aynı zamanda ya da ondan sonra değiştirilebilir. Örneğin, bu buluşun bazı yapılarında, bir DA2 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesi, değiştirilmiş DA1 ekspresyonu veya aktivitesinden, değiştirilmiş 15 EOD1 ekspresyonu veya aktivitesinden ya da değiştirilmiş DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesinden birine zaten sahip olan bir veya daha fazla bitki hücresinde değiştirilebilir.

Bu patent başvurusunda, örneğin organ veya tohum büyüklüğünü 20 artırmak suretiyle bitki verimini artırmaya yönelik olan ve DA1 ya da DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi eksik olan bir bitki sağlanmasından ve ayrıca, o bitkinin bir veya daha fazla hücresinde DA2 ekspresyonunun azaltılmasından oluşan yöntemler sunulmaktadır. Bu buluşun diğer yapılarında, DA1 ya da DA1 ve 25 EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi, bir DA2 polipeptidi ekspresyonu veya aktivitesi azalmış bulunan bir veya daha fazla bitki hücresinde azalabilir.

Diğer yöntemler, söz konusu bitkinin bir veya daha fazla hücrelerinde DA2 ekspresyonunun azaltılmasını ve ayrıca, bir veya daha fazla hücrede DA1 ya da hem DA1 hem de EOD1 ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılmasını içerebilirler.

5

Bu patent başvurusunda, ayrıca, vahşi tip bitkiye kıyasla, beher birim alanda tohum kütlesi, büyümesi ve/veya biyokütlesi artmış olan bir bitki üretmeye yönelik olan ve aşağıdakileri kapsayan yöntemler de sunulmaktadır:

10

(a) aşağıda sayılanların transformasyon yoluyla bir bitki hücrelerine dâhil edilmesi:

15

(i) bir DA2 polipeptidi ekspresyonunu azaltan bir birinci heterolog nükleik asit,

(ii) bir DA1 polipeptidinden ve bir EOD1 polipeptidinden birinin ekspresyonunu azaltan ikinci bir heterolog nükleik asit ve isteğe bağlı olarak

20

(iii) bir DA1 polipeptidinin veya bir EOD1 polipeptidinin ekspresyonunu azaltan bir üçüncü heterolog nükleik asit ve

(b) bitkinin bir veya daha fazla transforme edilmiş hücreden rejenere edilmesi.

25

Beher birim alan için tohum kütlesi, büyümesi ve/veya biyokütlesi artmış bir bitki üretmeye yönelik diğer yöntemler aşağıdakileri içerebilirler:

DA1 ya da DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi, tercihen DA1 aktivitesi eksik bir bitki hücresi temin edilmesi,

5 bir DA2 polipeptidinin aktivitesini veya ekspresyonunu düşüren bir heterolog nükleik asidin transformasyon yoluyla bu bitki hücresinin bünyesine dâhil edilmesi ve transforme edilmiş hücreden bitki rejenere edilmesi.

10 Rejenerasyonun ardından, vahşi tip bitkiye kıyasla, hem bir DA2 polipeptid aktivitesi veya ekspresyonu, hem de DA1 ya da DA1 ve EOD1 aktivitesi veya ekspresyonu düşük bir bitki seçilebilir.

15 Azalmış DA2 ekspresyonu ve azalmış DA1 ya da DA1 ve EOD1 ekspresyonu kombinasyonu, bitkinin tohum ve/veya organ büyüklüklerini sinerjik olarak artırmaktadır ve bu yolla, beher birim alan için tohum kütlelerini, büyümeyi ve/veya biyokütleyi de artırmaktadır.

20 Bitkinin verimle ilişkili bir veya daha fazla özellik, azalmış DA2 ekspresyonu veya aktivitesinden ve azalmış DA1 ya da DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesinden oluşan bir kombinasyonla iyileştirilebilir. Örneğin, DA2 polipeptidi ekspresyonunun azaltılmadığı kontrol bitkilerine veya vahşi tip bitkilere kıyasla, bu bitkilerde yaşam süresi, organ büyüklüğü ve tohum büyüklüğü 25 özelliklerinden biri veya birden fazlası artırılabilir.

Bu patent başvurusunda açıklanan yöntemlerde, DA2, DA1 veya EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi, vahşi tip bitkiye kıyasla, en az

%50, en az %60, en az %70, en az %80, en az %90, en az %95 ya da en az %98 oranında azaltılabilir. Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, ekspresyon veya aktivite sifira kadar ya da hemen hemen sifira kadar azaltılır (yani ekspresyon veya aktivite ortadan kaldırılır).

5

Bu buluşa konu olan yöntemler, bir bitkinin bir veya daha fazla hücrelerinde bulunan bir DA2 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesinin değiştirilmesini içermektedirler. DA2 polipeptidleri, bitkilerde bulunan E3 ubikuitin ligazlarıdır. Ekspresyonu veya aktivitesi bu patent başvurusunda açıklandığı gibi azaltılan DA2 polipeptidleri bir RING domaini (Stone, S.L. ve ark. (2005)), tercihen bir C5HC2, C5NC2 veya C5TC2 RING domaini içerebilirler. Uygun bir RING domaini, SEKANS KOD NO.: 1; C(X)₂C(X)₁₁CC(X)₄CX₂CX₇(H/N/T)X₆CX₂C içerebilirler. (SEKANS KOD NO.: 1)

15

Bu buluşa konu olan DA2 polipeptidleri, SEKANS KOD NO.: 2 amino asit sekansını içeren bir RING domaininden oluşurlar:

CPTQFL(Y/F)YPSLNRS(K/R)CC(S/M/T/A)K(G/S)IQTEQFL(Q/R)MK(P/N/S/V/T/N)(C/P)(H/N/T)(T/S)(A/C/C)(R/Q/K)PTQCP(E/Y)C
(SEKANS KOD NO.: 2)

20

Bu buluşun bazı yapılarında, SEKANS KOD NO.: 2'yle temsil edilen RING domaininde 33. pozisyondaki H/N/T artığı T veya N olabilir.

25

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir DA2 polipeptidi, Tablo 1'de (SEKANS KOD NO.: 3-19) gösterilen bir amino asit sekansına sahip bir RING domaini içerebilir, örneğin Arabidopsis DA2 (SEKANS KOD NO.: 11), Arabidopsis DAL2 (SEKANS KOD NO.:

13) veya Pirinç GW2 (SEKANS KOD NO.: 7) ya da onların bir varyantı. Örneğin, bir RING domaini, SEKANS KOD NO.: 20 (Pt_GI-224061326.pro) ile temsil edilen 59 ilâ 101 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 21 (Rc_GI-255578534.pro) ile temsil edilen 59
5 ilâ 101 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 22 (Vv_GI-147817790.pro) ile temsil edilen 59 ilâ 101 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 23 (Gm GI-356549538.pro) ile temsil edilen 59 ilâ 101 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 24 (At_GI-18411948.pro) ile temsil edilen 59 ilâ 101 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 25 (Ta_GI 408743661.pro) ile
10 temsil edilen 61 ilâ 103 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 26(Hv GI-164371454.pro) ile temsil edilen 61 ilâ 103 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 27 (Bd_GI-357140854.pro) ile temsil edilen 61 ilâ 103 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 28 (Os_GI-115445269.pro) ile temsil edilen 62 ilâ 104 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 29 (Sb_GI-242064618.pro) ile temsil edilen 63 ilâ 105 artıklarının, SEKANS
15 KOD NO.: 30 (Zm_GI-220961719.pro) ile temsil edilen 65 ilâ 107 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 31 (Ta_GI-408743658.pro) ile temsil edilen 61 ilâ 103 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 32 (Bd_GI-357125256.pro) ile temsil edilen 43 ilâ 85 artıklarının, SEKANS KOD
20 NO.: 33 (Os_GI-218197613.pro) ile temsil edilen 62 ilâ 104 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 34 (Zm_GI-260935347.pro) ile temsil edilen 62 ilâ 104 artıklarının ya da SEKANS KOD NO.: 35 (Sb_GI-242092026.pro) ile temsil edilen 62 ilâ 104 artıklarının amino asit sekansına sahip olabilir.

25

Ayrıca, uygun RING domain sekansları, bu patent başvurusunda tarif edilen standart sekans analizi teknikleri (örneğin Basit Modüler Mimari Araştırma Aracı (SMART); EMBL Heidelberg, Almanya)

kullanılarak tanımlanabilirler.

- DA2 polipeptidleri, bir birinci konsensus domainini de içerebilir. Birinci konsensus domaini, RING domaininin upstream yönünde (yani N terminal tarafında) bulunabilir. Bir uygun birinci konsensus domaini, SEKANS KOD NO.: 36 ile ifade edilen amino asit sekansından oluşabilir.

`Q/Q/Absent/ GLY (P/M/N/V/Q/L/V/E) (H/S/K) (P/K/R) D (I/V) D (L/I/H/V/Q) (K/R) K (R/K) (R/K) LI (V/I) (F/D) (A/S/T) KLAPC`
(SEKANS KOD NO: 36)

- 10 Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir DA2 polipeptidi, Tablo 2’de gösterilen bir DA2 amino asit sekansının bir birinci konsensus domainini, örneğin SEKANS KOD NO.: 20 ile ifade edilen 20 ilâ 45 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 21 ile ifade edilen 20 ilâ 45 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 22 ile ifade edilen 20 ilâ 45 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 23 ile ifade edilen 20 ilâ 45 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 24 ile ifade edilen 20 ilâ 45 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 25 ile ifade edilen 21 ilâ 46 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 26 ile ifade edilen 21 ilâ 46 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 27 ile ifade edilen 21 ilâ 46 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 28 ile ifade edilen 21 ilâ 46 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 29 ile ifade edilen 21 ilâ 46 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 30 ile ifade edilen 21 ilâ 46 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 31 ile ifade edilen 21 ilâ 46 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 32 ile ifade edilen 4 ilâ 29 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 33 ile ifade edilen 23 ilâ 48 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 34 ile ifade edilen 23 ilâ 48 artıklarını ya da SEKANS KOD NO.: 35 ile ifade edilen 23 ilâ 48 artıklarını içerebilir.

Bir DA2 polipeptidi, bir ikinci konsensus domaini de içerebilir. İkinci konsensus domaini, RING domaininin downstream yönünde (yani C terminal tarafında) bulunabilir. İkinci konsensus domaini, SEKANS KOD NO.: 37 ile ifade edilen amino asit sekansından oluşabilir.

{N/S}YAVEYRG{V/G}K{I/S}KEE{K/R}{G/S}{V/T/I/F/L/M}EQ{L/I/V
/F}EEQ{R/L/K}VIEA{Q/K}{I/M}RMR{H/Q}{K/Q}{E/A}

5 (SEKANS KOD NO: 37).

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir DA2 polipeptidi, Tablo 2’de gösterilen bir DA2 amino asit sekansının bir ikinci konsensus domainini, örneğin SEKANS KOD NO.: 20 ile ifade edilen 106 ilâ 141 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 21 ile ifade edilen 106 ilâ 141 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 22 ile ifade edilen 106 ilâ 141 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 23 ile ifade edilen 106 ilâ 141 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 24 ile ifade edilen 106 ilâ 141 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 25 ile ifade edilen 107 ilâ 143 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 26 ile ifade edilen 107 ilâ 143 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 27 ile ifade edilen 107 ilâ 143 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 28 ile ifade edilen 108 ilâ 144 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 29 ile ifade edilen 109 ilâ 145 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 30 ile ifade edilen 111 ilâ 147 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 31 ile ifade edilen 107 ilâ 143 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 32 ile ifade edilen 90 ilâ 125 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 33 ile ifade edilen 108 ilâ 143 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 34 ile ifade edilen 108 ilâ 143 artıklarını ya da SEKANS KOD NO.: 35 ile ifade edilen 108 ilâ 143 artıklarını içerebilir.

Uygun birinci ve ikinci domain sekanslarının ilave örnekleri, bu patent başvurusunda tarif edilen standart sekans analizi teknikleri (örneğin Basit Modüler Mimari Araştırma Aracı (SMART); EMBL Heidelberg, Almanya) kullanılarak tanımlanabilir.

5

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, ekspresyonu veya aktivitesi bu patent başvurusunda tarif edildiği gibi azaltılan bir DA2 polipeptidi, SEKANS KOD NO.: 2 ile temsil edilen bir RING Domaini, SEKANS KOD NO.: 36 ile temsil edilen birinci konsensus domaini ve SEKANS KOD NO.: 37 ile temsil edilen bir ikinci konsensus domaini içerebilir.

Örneğin, bir DA2 polipeptidi, yukarıda gösterilen RING domain sekansından, birinci konsensus domaini sekansından ve ikinci konsensus domaini sekansından oluşan herhangi bir kombinasyonu içerebilir.

Bir uygun DA2 polipeptidi, Tablo 2’de gösterilen SEKANS KOD NO. 20 ilâ 35’ten herhangi biriyle temsil edilen bir amino asit sekansını içerebilir ya da bu sekanslardan birinin varyantı olabilir. Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir DA2 polipeptidi; SEKANS KOD NO.: 28 veya 33 (OsGW2), SEKANS KOD NO.: 24 (AtDA2), SEKANS KOD NO.: 25 veya SEKANS KOD NO.: 31 (TaGW2) ile temsil edilen amino asit sekansını içerebilir ya da bu sekanslardan herhangi birinin E3 ubiquitin ligazı aktivitesi bulunan bir varyantı olabilir.

SEKANS KOD NO.: 20 ilâ 35'ten herhangi birinin ya da başka referans DA2 sekanslarının bir varyantı olan bir DA2 polipeptidi, referans DA2 sekansına en az %20, en az %30, en az %40, en az %50, en az %60, en az %70, en az %80, en az %90, en az %95 veya en az
5 %98 oranında sekans özdeşliğine sahip bir amino asit sekansı içerebilir.

SEKANS KOD NO.: 20 ilâ 35'ten herhangi birinin bir varyantı olan bir DA2 polipeptidi SEKANS KOD NO.: 2 ile temsil edilen sekansa
10 sahip bir RING domaini, SEKANS KOD NO.: 36 ile temsil edilen sekansa sahip bir a birinci konsensus domaini ve ayrıca, SEKANS KOD NO.: 37 ile temsil edilen sekansa sahip bir ikinci konsensus domaini de içerebilir. Uygun sekanslara verilebilecek örnekler yukarıda gösterilmiştir. Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir
15 DA2 polipeptidi, SEKANS KOD NO.: 20 ilâ 35'ten herhangi biriyle temsil edilen RING domainini, birinci konsensus domainini ve ikinci konsensus domainini içerebilir.

Bir DA2 polipeptidini kodlayan bir nükleik asit, JN896622.1
20 GI:408743658 (TaGW2-A) ve JN896623.1 GI:408743660'dan (TaGW2-B) oluşan gruptan seçilmiş bir veritabanı girişinde belirtilen bir nükleotid sekansını içerebilir ya da bu sekanslardan birinin varyantı olabilir.

25 Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir DA2 polipeptidini kodlayan bir nükleik asit, AtDA2, AtDAL2, OsGW2, TaGW2-A veya TaGW2-B kodlayan nükleotid sekansını içerebilir ya da DA2 aktivitesine sahip bir polipeptidi kodlayan bu DA2 sekanslarından

herhangi birinin bir varyantı olabilir.

DA2 polipeptidleri ve kodlayan nükleik asitler, ilgili herhangi bir bitki türünde, özellikle de buğday, arpa, mısır, pirinç, soya fasulyesi ve
5 başka zırai bitkiler gibi bir tahıl bitkisinde rutin sekans analizi teknikleri kullanılarak tanımlanabilirler.

Bu patent başvurusunda, bir bitkinin DA2 ekspresyonu veya aktivitesinde gerçekleşen azalmanın, DA1 aktivitesi veya
10 ekspresyonunu azaltan mutasyonların bitkilerin verimle ilişkili özellikleri üzerindeki etkisini sinerjik olarak artırdığı gösterilmektedir. Bu buluşun tercih edilen yapılarında, bu patent başvurusunda tarif edilen yöntemler, DA1 ekspresyonu veya aktivitesi eksik olan bir bitkide DA2 ekspresyonunun azaltılmasını ya da bir bitkide hem DA1
15 hem de DA2 ekspresyonunun azaltılmasını içerebilirler.

DA1 polipeptidleri, bitkilerde bulunan ubikuitin reseptörleridir ve hem Li ve ark. (2008) ve Wang ve ark. (2012) referanslarında, hem de WO2009/047525 sayılı patent başvurusunda detaylı tarif
20 edilmektedirler. Ekspresyon veya aktivitesi bu patent başvurusunda tarif edildiği şekilde azaltılan DA1 polipeptidleri, bir LIM domaini, bir korunmuş C terminal domaini ve bir veya daha fazla UIM domaini içerebilirler.

25 Bir LIM domaini iki Zn parmak motifi içerebilir ve ayrıca, (SEKANS KOD NO.:38);

$\underline{C(X)}_2 \underline{C(X)}_{16-23} (\underline{H/C}) (X)_{2/4} (\underline{C/H/E}) (X)_2 \underline{C(X)}_2 \underline{C(X)}_{14-}$

$21 (\underline{C/H}) (X)_{2/1/3} (\underline{C/H/D/E}) X$ amino asit sekansına sahip olabilir;

burada, X simgesi, herhangi bir amino asittir ve Zn koordine edici artıkların altı çizilmiştir.

LIM domainindeki Zn koordine edici artıklar C, H, D veya E, tercihen
5 C olabilir.

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir LIM domaini CXXC, HXXCXXCXXC ve HxxC motiflerini içerebilir; burada, X simgesi herhangi bir amino asittir. Örneğin, bir LIM domaini (SEKANS KOD
10 NO.:39);

C(X)₂C(X)₁₆₋₂₃(H)(X)₂(C)(X)₂C(X)₂C(X)₁₄₋₂₁H(X)₂CX amino asit
sekansını içerebilir;

burada, X simgesi herhangi bir amino asittir ve Zn koordine edici artıkların altı çizilmiştir.

15

Bu buluşun bazı yapılarında, bir LIM domaini AtDA1 LIM domaininin amino asit sekansını içerebilir:

CAGCNMEIGHGRFLNCLNSLWHPECFRCYGCSQPISEYEFSTS
GNYPFHKACY

20 (SEKANS KOD NO.: 40; Zn koordine edici artıkların altı çizilmiştir).

Diğer LIM domainleri Tablo 3'te gösterilen bir DA1 amino asit sekansının LIM domainini, örneğin SEKANS KOD NO.: 41 (Si_GI-514815267.pro) ile temsil edilen 141 ilâ 193 artıklarını, SEKANS
25 KOD NO.: 42 (Bd_GI-357157184.pro) ile temsil edilen 123 ilâ 175 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 43(Br_DA1b.pro) ile temsil edilen 155 ilâ 207 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 44 (Br_DA1a.pro) ile temsil edilen 172 ilâ 224 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 45 (At_GI-

15221983.pro) ile temsil edilen 172 ilâ 224 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 46 (Tc_GI-508722773.pro) ile temsil edilen 117 ilâ 169 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 47 (Gm_GI-356564241.pro) ile temsil edilen 117 ilâ 169 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 48 (Gm_GI-356552145.pro) ile temsil edilen 121 ilâ 173 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 49 (Vv_GI-302142429.pro) ile temsil edilen 119 ilâ 171 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 50 (Vv_GI-359492104.pro) ile temsil edilen 122 ilâ 174 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 51 (Sl_GI-460385048.pro) ile temsil edilen 125 ilâ 177 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 52 (Os_GI-218197709.pro) ile temsil edilen 516 ilâ 568 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 53 (Os_GI-115466772.pro) ile temsil edilen 124 ilâ 176 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 54 (Bd_GI-357160893.pro) ile temsil edilen 150 ilâ 202 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 55 (Bd_GI-357164660.pro) ile temsil edilen 132 ilâ 184 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 56 (Sb_GI-242092232.pro) ile temsil edilen 124 ilâ 176 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 57 (Zm_GI-212275448.pro) ile temsil edilen 147 ilâ 199 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 58 (At_GI-240256211.pro) ile temsil edilen 190 ilâ 242 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 59 (At_GI-145360806.pro) ile temsil edilen 162 ilâ 214 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 60 (At_GI-22326876.pro) ile temsil edilen 1240 ilâ 1291 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 61 (At_GI-30698242.pro) ile temsil edilen 80 ilâ 122 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 62 (At_GI-30698240.pro) ile temsil eden 347 ilâ 402 artıklarını, SEKANS KOD NO.: 63 (At_GI-15240018.pro) ile temsil edilen 286 ilâ 341 artıklarını ya da SEKANS KOD NO.: 64 (At_GI-334188680.pro) ile temsil edilen 202 ilâ 252 artıklarını içerir.

LIM domain sekansları, standart sekans analizi teknikleri (örneğin Basit Modüler Mimari Araştırma Aracı (SMART); EMBL Heidelberg, Almanya) kullanılarak tanımlanabilirler.

- 5 Bir LIM domainine ek olarak, bir DA1 proteini; SEKANS KOD NO.: 41 ile temsil edilen 198 ilâ 504 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 42 ile temsil edilen 180 ilâ 487 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 43 ile temsil edilen 212 ilâ 514 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 44 ile temsil edilen 229 ilâ 532 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 45 ile
- 10 temsil edilen 229 ilâ 532 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 46 ile temsil edilen 174 ilâ 478 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 47 ile temsil edilen 174 ilâ 474 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 48 ile temsil edilen 178 ilâ 478 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 49 ile temsil edilen 176 ilâ 462 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 50 ile
- 15 temsil edilen 179 ilâ 482 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 51 ile temsil edilen 182 ilâ 486 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 52 ile temsil edilen 573 ilâ 878 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 53 ile temsil edilen 181 ilâ 486 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 54 ile temsil edilen 207 ilâ 512 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 55 ile
- 20 temsil edilen 189 ilâ 491 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 56 ile temsil edilen 181 ilâ 486 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 57 ile temsil edilen 204 ilâ 508 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 58 ile temsil edilen 247 ilâ 553 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 59 ile temsil edilen 219 ilâ 528 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 60 ile
- 25 temsil edilen 1296 ilâ 1613 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 61 ile temsil edilen 128 ilâ 450 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 62 ile temsil edilen 404 ilâ 702 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 63 ile temsil edilen 343 ilâ 644 artıklarının ya da SEKANS KOD NO.: 64 ile

temsil edilen 256 ilâ 587 artıklarının sekansına en az %20, en az %30, en az %40, en az %50, en az %60, en az %70, en az %80, en az %90, en az %95 veya en az %98 oranında amino asit özdeşliği bulunan bir amino asit sekansına sahip bir karboksil terminal bölgesi de içerebilir.

5

DA1 proteininin karboksil terminal bölgesi, metallopeptidaz motifi HEMMH (SEKANS KOD NO.: 65) içerebilir.

The karboksil terminal bölgesi, LIM domaini ve HEMMH motifi arasında konumlandırılmış bir EK(X)₈R(X)₄SEEQ (SEKANS KOD NO.: 66) veya EK(X)₈R(X)₄SEQ (SEKANS KOD NO.: 67) motifi de içerebilir.

Bir DA1 proteini, bir LIM domainine ve korunmuş bir karboksil terminal bölgesine ek olarak, bir UIM1 domaini ve bir UIM2 domaini de içerebilir. UIM1 ve UIM2 domainleri, DA1 proteininin N terminal ve LIM domaini arasında yer alabilir.

Bir UIM1 domaini, SEKANS KOD NO.: 68 ile temsil edilen sekansı içerebilir ve bir UIM2 domaini, SEKANS KOD NO.: 69 ile ifade edilen sekansı içerebilir.

p---pLpbA1 pb.Sbp-.pp p (SEKANS KOD NO.: 68)

25

p---pLpbA1 pb.Sbp-spp p (SEKANS KOD NO.: 69)

burada:

p simgesi, bir polar amino asit artığıdır, örneğin C, D, E, H, K, N, Q, R, S veya T;

b simgesi, bir büyük amino asit artığıdır, örneğin E, F, H, I, K, L, M, Q, R, W veya Y;

5 s simgesi, bir küçük amino asit artığıdır, örneğin A, C, D, G, N, P, S, T veya V;

l simgesi, bir alifatik amino asit artığıdır, örneğin I, L veya V;

10 . simgesi, amino asidin mevcut olmadığını ya da herhangi bir amino asit olduğunu ifade eder ve
- simgesi, herhangi bir amino asittir.

15 UIM1 ve UIM2 domain sekanslarının ilave örnekleri, bu patent başvurusunda tarif edilen standart sekans analizi teknikleri (e.g. Basit Modüler Mimari Araştırma Aracı (SMART); EMBL Heidelberg, Almanya) kullanılarak tanımlanabilir.

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir DA1 polipeptidi aşağıdakileri içerebilir:

20 SEKANS KOD NO.: 39 ile temsil edilen bir LIM domaini, yukarıda açıklandığı üzere, bir $EK(X)_8R(X)_4SEEQ$ veya $EK(X)_8R(X)_4SEQ$ motifini ve bir HEMMH motifini içeren ve SEKANS KOD NO.: 45 ile temsil edilen 229 ilâ 532 artıklarına en az %20 oranında sekans özdeşliğine sahip bir C terminal bölgesi ya da
25 SEKANS KOD NO.: 41 ilâ 44 veya 46 ilâ 64'ten herhangi biriyle temsil edilen eşdeğer bir bölge, SEKANS KOD NO.: 66 ile temsil edilen bir UIM domaini ve SEKANS KOD NO.: 67 ile temsil edilen bir UIM domaini.

Bir DA1 proteini, Tablo 3'te gösterilen bir bitki DA1 proteininin bir amino asit sekansını (SEKANS KOD NO.: 41 ilâ 64) içerebilir ya da bu sekanslardan herhangi birinin DA1 aktivitesine sahip bir homologu veya varyantı olabilir. Örneğin, bir DA1 polipeptidi, Tablo 3'te
 5 gösterilen bir amino asit sekansını (SEKANS KOD NO.: 41 ilâ 64) içerebilir ya da bu sekanslardan birinin DA1 aktivitesine sahip varyantı olabilir.

Örneğin, bir DA1 polipeptidi; bir AtDA1, AtDAR1, AtDAR2,
 10 AtDAR3, AtDAR4, AtDAR5, AtDAR6, AtDAR7, BrDA1a, BrDA1b, BrDAR1, BrDAR2, BrDAR3-7, BrDAL1, BrDAL2, BrDAL3, OsDA1, OsDAR2, OsDAL3, OsDAL5, PpDAL1, PpDAL2, PpDAL3, PpDAL4, PpDAL5, PpDAL6, PpDAL7, PpDAL8, SmDAL1, SmDAL2 veya ZmDA1, tercihen AtDA1, AtDAR1 BrDA1a,
 15 BrDA1b, OsDA1 veya ZmDA1 amino asit sekansını ya da bu sekanslardan birinin bir homologu veya varyantını içerebilir.

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir DA1 polipeptidi, AtDA1 (AT1G19270; NP_173361.1 GI: 15221983) amino asit sekansını
 20 içerebilir ya da bu sekansın DA1 aktivitesine sahip varyantı olabilir.

Yukarıda belirtilen karakteristik özellikleri içeren diğer DA1 protein sekansları standart sekans analiz araçları kullanılarak tanımlanabilir. Sektörde bilgi ve beceri sahip bir kişi, ilgili herhangi bir bitki türünde
 25 DA1 proteinlerini kodlayan nükleik asit sekanslarını kolayca belirleyebilecektir.

İlgili bir bitki türünde bulunan bir DA1 proteini, bu patent başvurusunda belirtilen bir DA1 proteini referans amino asit sekansının bir varyantı olan bir amino asit sekansına sahip olabilir.

- 5 Örneğin SEKANS KOD NO.: 41 ilâ 64'ten herhangi biri gibi bir referans DA1 sekansının bir varyantı olan bir DA1 polipeptidi, referans sekansa en az %20, en az %30, en az %40, en az %50, en az %60, en az %70, en az %80, en az %90, en az %95 veya en az %98 oranında sekans özdeşliğine sahip bir amino asit sekansını içerebilir.

10

Bir bitki türünde gerçekleşen belirli amino asit sekansı varyantları, 1 amino asit, 2, 3, 4, 5-10, 10-20 20-30, 30-50 veya 50'den fazla amino asit insersiyonu, adisyonu, süstitüsüyonu veya delesyonuyla bu patent başvurusunda belirtilen bir referans sekanstan farklı olabilirler.

15

Bu buluşun bazı yapılarında, SEKANS KOD NO.: 45 ile temsil edilen AtDA1 sekansının bir varyantı olan bir DA1 polipeptidi, QENEDIDRAIALSLLEENQE (SEKANS KOD NO.: 70) sekansına sahip bir UIM1 domainini ve ayrıca, DEDEQIARALQESMVVGNSP
20 (SEKANS KOD NO.: 71) sekansına sahip bir UIM2 domainini içerebilir.

25

SEKANS KOD NO.: 45 ile temsil edilen AtDA1 sekansının bir varyantı olan bir DA1 polipeptidi, aşağıdaki sekansa sahip bir LIM domaini içerebilir:
ICAGCNMEIGHGRFLNCLNSLWHPECFR CYGCSQP ISEYEFSTS
GNYPFHKAC (SEKANS KOD NO.: 72)

Bir DA1 polipeptidini kodlayan bir nükleik asit, NM_101785.3 GI:42562170 (AtDA1); NM_001057237.1 GI:115454202 (OsDA1); BT085014.1 GI: 238008663'ten (ZmDA1) oluşan gruptan seçilmiş bir veritabanı girişinde belirtilen bir nükleotid sekansını içerebileceği gibi, bu sekanslardan birinin bir aktif DA1 polipeptidini kodlayan varyantı da olabilir.

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir DA1 polipeptidini kodlayan bir nükleik asit; AtDA1 (NM_101785.3 GI: 42562170), ZmDA1 (BT085014.1 GI: 238008663), OsDA1 (NM_001057237.1 GI:115454202) ile temsil edilen nükleotid sekansını içerebileceği gibi, bu sekanslardan herhangi birinin DA1 aktivitesini durduran bir polipeptidi kodlayan bir varyantı da olabilir.

DA1 polipeptidleri ve kodlayan nükleik asitler, bitki türlerinde, özellikle de buğday, arpa, mısır, pirinç ve başka zırai bitkiler gibi tahıl bitkilerinde rutin sekans analizi teknikleri kullanılarak tanımlanabilirler.

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir bitkinin bir veya daha fazla hücresinde gerçekleşen DA1 aktivitesi, o bir veya daha fazla hücrede bir dominant-negatif DA1 polipeptidi ekspresyonuyla azaltılabilir (örneğin, bakınız: Li ve ark. (2008); WO2009/047525; Wang ve ark. 2012). Bir dominant negatif DA1 polipeptidi eksprese eden bir bitki, bir da 1-1 fenotipine sahip olabilir.

Bir DA1 polipeptidinin bir dominant negatif alleli; A. thaliana DA1 amino asit sekansının 358. pozisyonunda, Z. mays DA1 amino asit

sekansının 333. pozisyonunda ya da başka bir DA1 amino asit sekansının eşdeğer pozisyonunda bulunan bir korunmuş R artığına, örneğin bir süstitüsyon veya delesyon gibi bir mutasyona sahip bir DA1 polipeptidi içerebilir. Örneğin, bir DA1 polipeptidinin bir dominant negatif alleli, *A. thaliana* DA1 amino asit sekansının 358. pozisyonuna ya da *Z. mays* DA1 amino asit sekansının 333. pozisyonuna eşdeğer bir pozisyonda bir korunmuş R artığı mutasyonu içerebilir. Bu buluşun tercih edilen yapılarında, korunmuş R artığı, K'yi süstitüe edebilir.

10

A. thaliana DA1'in SEKANS KOD NO.: 45 ile temsil edilen 358. pozisyonuna ya da *Z. mays* DA1'in SEKANS KOD NO.: 57 ile temsil edilen 333. pozisyonuna eşdeğer bir DA1 amino asit sekansında yer alan korunmuş R artığı, DA1 amino asit sekansı bünyesinde SEKANS KOD NO.:57 ile temsil eden R333'e ve SEKANS KOD NO.:45 ile temsil edilen R358'e tekabül eden pozisyonda bulunmaktadır, yani DA1 proteininin diğer motifleri ve domainlerine göre aynı pozisyondadır. Korunmuş R artığı, C terminal bölgesinin LIM domaini ve HEMMH peptidaz motifi arasında yer alır ve DA1 proteinlerinde yer alan aynı sekans bağlamında tamamen korunur. Korunmuş R artığı, C terminal bölgesindeki bir EK(X)₈R(X)₄SEEQ (SEKANS KOD NO.: 66) veya EK(X)₈R(X)₄SEQ (SEKANS KOD NO.: 67) motifinde bulunabilir.

20

Korunmuş R artığı, bu korunmuş C terminal bölgelerini standard sekans analizini ve hizalama araçlarını kullanarak hizalamak suretiyle belirlenebilir ve ayrıca, Tablo 3'e konu olan sekanslardaki bir okla tanımlanır.

25

Bir DA proteininin bir dominant negatif allelini kodlayan nükleik asit, geleneksel herhangi bir teknik kullanılarak üretilebilir. Örneğin, *A. thaliana* DA1'in R358'ine veya *Zea mays* DA1'in R333'üne, örneğin K'ye eşdeğer pozisyondaki korunmuş R artığını değiştirmek için, bir DA1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit üzerinde yer hedefli mutagenез kullanılabilir. *In vitro* mutagenез için kullanılan reaktifler ve kitler ticari piyasada mevcuttur. Bu buluşun bazı yapılarında, bu patent başvurusunda tarif edilen bir dominant negatif DA1 polipeptidini kodlayan bir nükleik asit, örneğin bir konstitütif, indüklenebilir, doku spesifik veya gelişimsel spesifik promotor gibi bir promotorün örnek teşkil ettiği bir heterolog regüle edici sekansa operabl bağlı olabilir. Dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan nükleik asit, bir veya daha fazla vektörde bulunabilir. Örneğin, bitki fenotipini değiştirmek için, bir DA1 proteininin dominant negatif allelini kodlayan mutasyona uğratılmış nükleik asit, aşağıda tarif edildiği üzere bir ekspresyon vektörüne kodlanabilir ve bitki hücrelerinde de eksprese edilebilir. Bu buluşun diğer yapılarında, bir bitkideki bir endojen DA1 nükleik asidine bir mutasyon eklenebilir ve böylece, mutant DA1 nükleik asidinin kodladığı DA1 polipeptidi dominant negatif aktiviteye sahip olabilir.

Bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan nükleik asit, aynı bitki türünde veya orijinal olarak izole edildiği varyetede ya da farklı bir bitki türünde veya varyetesinde (yani bir heterolog bitki) eksprese edilebilir.

Bu patent başvurusunda, ayrıca, bir bitkide DA2 ekspresyonunun azaltılması veya ortadan kaldırılmasının, EOD1 ekspresyon veya aktivitesini azaltan mutasyonların bitkilerin verimle ilişkili özellikleri

üzerindeki etkisini artırdığı da gösterilmektedir. Bu patent başvurusunda tarif edilen yöntemler, EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi eksik olan bir bitkide DA2 ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılmasını ya da bir bitkide hem DA2 hem de EOD1

5 ekspresyonu veya aktivitesinin azaltılmasını içerebilir. Bu buluşun tercih edilen yapılarında, bu bitkide DA1 aktivitesi de eksiktir ya da bu yöntem, ilave olarak bitkide DA1 ekspresyonunun azaltılmasını veya ortadan kaldırılmasını da içerebilir.

10 EOD1 polipeptidleri, bitkilerde bulunan E3 ubikuitin ligazlarıdır ve Disch ve ark. (2006) ve Li ve ark. (2008) referansları ve ayrıca, WO2009/047525 sayılı patent başvurusunda detaylı tarif edilmektedirler.

15 Ekspresyonu veya aktivitesi bu patent başvurusunda tarif edildiği gibi azaltılan bir EOD1 polipeptidi, bir EOD domaini içerebilir. Uygun bir EOD domaini, SEKANS KOD NO.: 73 ile temsil edilen amino asit sekansından oluşabilir;

20 (E/K)RCVICQ(L/M) (K/R/G/T/E)Y(K/R) (R/I) (G/E) (D/N/E) (R/Q/K/L)Q(I /M/V) (K/N/T/A) L(L/P)C(K/S)H(V/A)YH(S/T/G/A) (E/Q/D/S/G)C(I/G/T/V) (S/D) (K/R)WL(G/T/S)INK(V/I/A/K)CP(V/L)C (SEKANS KOD NO: 73)

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, Tablo 4'te de gösterildiği üzere, bir EOD1 polipeptidi; SEKANS KOD NO.: 74 (Zm_GI-223973923.pro) ile temsil edilen 195 ilâ 237 artıklarının, SEKANS

25 KOD NO.: 75 (Sb_GI-242042045.pro) ile temin edilen 195 ilâ 237 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 76 (Zm_GI-226496789.pro) ile temsil edilen 195 ilâ 237 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 77

(Os_GI-222624282.pro) ile temsil edilen 218 ilâ 260 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 78 (Os_GI-115451045.pro) ile temsil edilen 196 ilâ 238 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 79(Bd_GI-357113826.pro) ile temsil edilen 197 ilâ 239 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 80
5 (SI_GI-460410949.pro) ile temsil edilen 193 ilâ 235 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 81 (Rc_GI-255582236.pro) ile temsil edilen 187 ilâ 229 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 82 (Pt_GI-224059640.pro) ile temsil edilen 150 ilâ 192 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 83 (Gm_GI-356548935.pro) ile temsil edilen 194 ilâ 236 artıklarının,
10 SEKANS KOD NO.: 84 (Gm_GI-356544176.pro) ile temsil edilen 194 ilâ 236 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 85 (Vv_GI-359487286.pro) ile temsil edilen 194 ilâ 236 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 86 (Tc_GI-508704801.pro) ile temsil edilen 189 ilâ 231 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 87 (Pp_GI-462414664.pro) ile
15 temsil edilen 192 ilâ 234 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 88 (Cr_GI-482561003.pro) ile temsil edilen 190 ilâ 232 artıklarının, SEKANS KOD NO.: 89 (At_GI-22331928.pro) ile temsil edilen 195 ilâ 237 artıklarının ya da SEKANS KOD NO.: 90 ile temsil edilen 195 ilâ 237 (SI_GI-460370551.pro) artıklarının bir amino asit sekansına sahip bir
20 EOD domainini içerebilir.

İlave uygun EOD domain sekansları, bu patent başvurusunda tarif edilen standart sekans analizi teknikleri (örneğin Basit Modüler Mimari Araştırma Aracı (SMART); EMBL Heidelberg, Almanya)
25 kullanılarak tanımlanabilir.

Ekspresyonu veya aktivitesi bu patent başvurusunda tarif edildiği gibi azaltılan bir EOD1 polipeptidi, Tablo 4'te belirtilen SEKANS KOD

NO. 74 ilâ 90'dan herhangi biriyle temsil edilen bir amino asit sekansını içerebilir. Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir EOD1 polipeptidi, SEKANS KOD NO.: 89 (AtEOD1) veya SEKANS KOD NO.: 77 veya 78 (OsEOD1) ile temsil edilen amino asit sekansını içerebilir ya da E3 ubikuitin ligazı aktivitesini durduran bu sekansın bir varyantı olabilir.

SEKANS KOD NO.: 74 ilâ 90 ile temsil edilen sekanslardan herhangi birinin bir varyantı olan bir EOD1 polipeptidi veya başka bir referans EOD1 sekansı, referans EOD1 sekansına en az %20, en az %30, en az %40, en az %50, en az %60, en az %70, en az %80, en az %90, en az %95 veya en az %98 oranında sekans özdeşliğine sahip bir amino asit sekansı içerebilir.

SEKANS KOD NO.: 74 ilâ 90 ile temsil edilen sekanslardan herhangi birinin bir varyantı olan bir EOD polipeptidi, SEKANS KOD NO.: 73 ile temsil edilen sekansa sahip bir EOD domaini de içerebilir. Uygun sekanslara verilebilecek örnekler yukarıda belirtilmektedir.

Bir EOD1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit XM_002299911.1 GI:224059639 (PtEOD1); XM_002531864.1 GI:255582235 (RcEOD1); XM_002279758.2 GI:359487285 (VvEOD1); XM_003542806.1 GI:356548934 (GmEOD1a); XM_003540482.1 GI:356544175 (GmEOD1b); XM_002468372.1 GI:242042044 (SbEOD1); NM_001147247.1 GI:226496788 (ZmEOD1) veya NP_001030922.1 GI: 79316205'ten (AtEOD1; At3g63530) oluşan gruptan seçilmiş bir veritabanı girişinde belirtilen bir nükleotid sekansını içerebilir ya da bu sekanslardan birinin varyantı olabilir.

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir EOD1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit, AtEOD1 veya OsEOD1 kodlayan nükleotid sekansını içerebilir ya da bu sekansların EOD1 aktivitesine sahip bir polipeptidi kodlayan herhangi birinin bir varyantı olabilir.

5

Ekspresyonu veya aktivitesi bu patent başvurusunda tarif edildiği gibi azaltılan EOD1 polipeptidleri ve kodlayan nükleik asitler ilgili herhangi bir bitki türünde, özellikle de buğday, arpa, mısır, pirinç ve diğer zırai bitkiler gibi bir tahıl bitkisinde rutin sekans analizi teknikleri kullanılarak kolayca tanımlanabilir.

10

Bu patent başvurusunda, ayrıca, bitkilerdeki DA2 mutasyonunun, DA1 ve EOD1 mutasyonlarından oluşan kombinasyonların bitkilerin verimle ilişkili özellikleri üzerindeki etkisini sinerjik olarak artırdığı da gösterilmektedir.

15

Bu patent başvurusunda tarif edilen yöntemler belirli bitki türleriyle sınırlı değildir ve ayrıca, DA2, DA1 veya DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi herhangi bir ilgili bitki türünde, bu patent başvurusunda tarif edildiği şekilde azaltılabilir.

20

İlgili bir bitki türünde bulunan bir DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidi bu patent başvurusunda belirtilen bir ilgili DA1, DA2 veya EOD1 referans amino asit sekansının bir varyantı olan bir amino asit sekansına sahip olabilir. Bu patent başvurusunda belirtilen bir referans sekansın bir varyantı olan bir DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidi, referans sekansa en az %20, en az %30, en az %40, en az %50, en az %60, en az %70, en az %80, en az %90, en az %95 veya en az %98

25

sekans özdeşliğine sahip bir amino asit sekansı içerebilir.

Bir bitki türünde bulunan belirli amino asit sekansı varyantları, 1 amino asit, 2, 3, 4, 5-10, 10-20 20-30, 30-50 veya 50'den fazla amino
5 asit insersiyonu, adisyonu, süstitüsüyonu veya delesyonuyla bu patent başvurusunda belirtilen bir referans sekanstan farklı olabilirler.

İlgili bir bitki türünde bulunan bir DA1, DA2 veya EOD1 nükleik asidi, bu patent başvurusunda belirtilen bir ilgili DA1, DA2 veya
10 EOD1 referans nükleotid sekansının bir varyantı olan bir nükleotid sekansına sahip olabilir. Örneğin, varyant nükleotid sekansı, bu patent başvurusunda belirtilen bir referans DA1, DA2 veya EOD1 sekansının bir homologu veya alleli olabilir ve ayrıca, nükleik asitte bulunan bir veya daha fazla nükleotidin, örneğin 2, 3, 4, 5-10, 10-20 20-30, 30-50
15 veya 50'den fazla gibi bir veya daha fazla adisyonu, insersiyonu, delesyonu veya süstitüsüyonu referans DA1, DA2 veya EOD1 nükleotid sekansından farklı olabilir ve bu da, kodlanan polipeptidde bir veya daha fazla amino asit adisyonuna, insersiyonuna, delesyonuna veya süstitüsüyonuna yol açabilir. Elbette, nükleik asitte gerçekleşen
20 ve kodlanan amino asit sekansında hiçbir farklılığa sebep olmayan değişiklikler de bu patent başvurusunun kapsamına dâhildir. Bir DA1, DA2 veya EOD1 kodlayan nükleik asit, referans nükleik asit sekansına en az %20 veya en az %30 oranında sekans özdeşliğine, tercihen en az %40, en az %50, en az %60, en az 65%, en az %70, en
25 az %80, en az %90, en az %95 veya en az %98 oranında sekans özdeşliğine sahip bir sekans içerebilir. Sekans özdeşliği yukarıda açıklanmaktadır.

Sekans benzerliği ve özdeşliği, yaygın olarak, GAP algoritmasına (Wisconsin Package, Accelrys, San Diego ABD) referans yapılarak açıklanmaktadır. GAP, eşleşme sayısını maksimuma çıkaran ve boşluk sayısını minimuma indiren iki tam sekansı hizalayan Needleman and Wunsch algoritmasını kullanmaktadır. Genelde, bir boşluk oldurma cezasının = 12 ve boşluk genişletme cezasının = 4 olduğu varsayılan parametreler kullanılmaktadır. GAP'in kullanılması tercih edilebilir, ancak örneğin genelde varsayılan parametreleri kullanan BLAST ("Altschul ve ark. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410" referansındaki yöntemi kullanmaktadır), FASTA ("Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448" referansındaki yöntemi kullanmaktadır) veya Smith-Waterman algoritması (Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197) veya yukarıdaki "Altschul ve ark. (1990)" referansının TBLASTN programı gibi diğer algoritmalar da kullanılabilir. Özellikle de, psi-Blast algoritması (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402) kullanılabilir.

Sekans karşılaştırması, bu patent başvurusunda tarif edilen ilgili sekansın tam uzunluğu üzerinden yapılabilir.

20

Uygun varyant amino asit ve nükleotid sekansları, ilgili herhangi bir bitki türünde standart sekans analizi teknikleri kullanılarak tanımlanabilirler.

25 Bu patent başvurusunda belirtilen bir referans DA1, DA2 veya EOD1 nükleik asit sekansının bir varyantı olan bir DA1, DA2 veya EOD1 nükleotid sekansı, bu nükleik asit sekansı veya onun komplemanı ile birlikte katı koşullar altında selektif olarak hibridize edilebilirler.

Katı koşullar, örneğin yaklaşık %80-%90 oranında özdeş sekansların hibridizasyonu için 42°C sıcaklıkta ve 0,25M Na₂HPO₄, pH 7,2, %6,5 SDS, %10 dekstran sülfat içinde gece boyunca hibridizasyonu ve
5 55°C sıcaklıkta 0,1X SSC, %0,1 SDS içinde bir nihai yıkamayı içermektedir. Yaklaşık %90'dan daha fazla oranda özdeş sekansları tespit etmek için, uygun koşullar 65°C sıcaklıkta ve 0,25M Na₂HPO₄, pH 7,2, %6,5 SDS, %10 dekstran sülfat içinde gece boyunca hibridizasyonu ve 60°C sıcaklıkta ve 0,1X SSC, %0,1 SDS içinde bir
10 nihai yıkamayı içermektedir.

Bir 5x SSPE (nihai 0,9 M NaCl, 0,05M sodyum fosfat, 0,005M EDTA pH 7,7) çözeltisi, 5X Denhardt çözeltisi, %0,5 SDS, 50°C veya 65°C sıcaklıkta gece boyunca koşulu, özellikle de bitki nükleik asit
15 preparatlarıyla uygun olabilecek bir alternatiftir. Gerektiği takdirde, yıkama işlemleri 65°C sıcaklıkta 0,2x SSC/%0,1 SDS içinde ya da 50-60°C sıcaklıkta 1x SSC/%0,1 SDS içinde yapılabilir.

Bu patent başvurusunda tarif edilen nükleik asitler, kısmen veya
20 tamamen sentetik olabilirler. Özellikle de, doğada kendiliğinden birlikte bulunmayan (bitişik olmayan), ligate edilmiş veya başka şekilde yapay olarak birleştirilmiş bu nükleik asitler, söz konusu nükleik asit sekanslarında rekombinant olabilirler. Alternatif olarak, örneğin bir otomatik sentezleyici kullanılarak doğrudan doğruya
25 sentezlenmiş olabilirler.

Bir DA2 nükleik asit ve bir DA1 ve/veya EOD1 nükleik asit ekspresyonu, herhangi bir uygun teknik kullanılarak bir bitkinin bir

veya daha fazla hücrede azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir.

Bir bitkide bir DA2 polipeptidinin ve bir DA1 ve/veya EOD1 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesini azaltmaya yönelik yöntemler, sektörde iyi bilinmektedirler ve aşağıda daha detaylı tarif edilmektedirler. Bu buluşun bazı yapılarında, aktif DA2, DA1 ve/veya EOD1 polipeptidinin ekspresyonu, polipeptidi kodlayan veya bu tür bir nükleik asit sekansının ekspresyonunu regüle eden bir bitki hücreindeki nükleik asit sekansına bir mutasyon eklemek suretiyle azaltılabilir, tercihen ortadan kaldırılabilir. Bu mutasyon, DA2, DA1 ve/veya EOD1 polipeptidinin ekspresyonu veya fonksiyonunu sekteye uğratabilir. Uygun mutasyonlar, knock-out ve knock-down mutasyonlarını içerir. Bu buluşun bazı yapılarında, bir mutasyon, DA1'in bir dominant negatif allelini üretebilir. Ardından, bir bitki mutasyona uğratılmış hücrelerden rejenere edilebilirler. Nükleik asitler, bir veya daha fazla nükleotid insersiyonu veya delesyonu yoluyla mutasyona uğratabilirler. Hedef genlerin mutagenezi, inaktivasyonu veya knockout'ı için kullanılan teknikler sektörde (örneğin, bakınız: *In Vitro Mutagenesis Protocols; Methods in Molecular Biology* (2nd edition) Ed Jeff Braman; Sambrook J ve ark. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th Edition) CSH Press; *Current Protocols in Molecular Biology*; Ed Ausubel ve ark. (2013) Wiley) iyi bilinmektedir. Bu buluşun bazı yapılarında, genom editleme teknikleri, örneğin RNA kılavuzlu nükleaz teknikleri, örneğin CRISPR, Çinko-parmak nükleazları (ZFN'ler) ve transaktivatör benzeri efektör nükleazları (TALEN'ler) kullanılarak bir hedef EOD1, DA2 veya DA1 genine mutasyonlar eklenebilir (Urnov, F.D. ve ark. *Nature reviews. Genetics* 11, 636-646

(2010); Joung, J.K. ve ark. Nature reviews. Molecular cell biology 14, 49-55 (2013); Gasiunas, G. ve ark. PNAS USA 109, E2579-2586 (2012); Cong, L. ve ark. Science 339, 819-823 (2013)).

- 5 Ekspresyonu veya aktiviteyi düşüren sekans mutasyonları, vahşi tip nükleotid sekansına kıyasla bir veya daha fazla nükleotidin bir delesyonunu, insersiyonunu veya süstitüsyonunu; bir gen amplifikasyonunu ya da metilasyonun artması veya azalmasını, örneğin hipermetilasyonu içerebilir. Bir veya daha fazla mutasyon, 10 nükleik asit sekansının kodlama yapan veya yapmayan bir bölgesinde olabilir. Komponenti kodlayan genin kodlama bölgesindeki mutasyonlar, tam boy aktif proteinin translasyonunu, yani trunkatlayıcı proteinleri önleyebilirler ya da tam boy, ancak inaktif veya bozulmuş fonksiyonlu proteinlerin translasyonuna, yani mis-sens 15 mutasyonlarına izin verebilirler. Örneğin bir regüle edici elemenda bulunan komponenti kodlayan genin kodlama yapmayan bölgelerinde yer alan, örneğin metilasyon gibi mutasyonlar veya epigenetik değişiklikler, gen transkripsiyonunu önleyebilirler. Bir veya daha fazla sekans mutasyonu içeren bir nükleik asit, aktiviteyi azaltan veya 20 ortadan kaldıran bir varyant polipeptidi kodlayabileceği gibi, örneğin bir regüle edici elemanın değiştirilmiş aktivitesi yoluyla hücre bünyesinde az miktarda ekspresyon olan veya hiç ekspresyon olmayan bir vahşi tip polipeptid kodlayabilir. Bir veya daha fazla sekans mutasyonu içeren bir nükleik asit, mutasyona uğratılmamış sekanstan 25 bir, iki, üç, dört veya daha fazla mutasyona sahip olabilir.

Örneğin, SEKANS KOD NO.: 89 ile temsil edilen 44. pozisyona tekabül eden bir pozisyonda, örneğin bir delesyon, insersiyon veya

sübstitüsyon gibi bir mutasyon, örneğin bir A ilâ T sübstitüsyonu eklemek suretiyle EOD1 aktivitesi azaltılabilir, tercihen ortadan kaldırılabilir. Bir EOD1 polipeptid sekansında bulunan ve SEKANS KOD NO.: 89 ile temsil edilen 44. pozisyona eşdeğer olan bir pozisyon, Tablo 4'te gösterilen standart sekans analizi ve hizalama araçları kullanılarak tanımlanabilir.

DA2, DA1 ve EOD1 kodlama sekansları, ilgili herhangi bir bitki türünde standart sekans analizi teknikleri kullanılarak, örneğin bu patent başvurusunda belirtilen referans sekanslarla karşılaştırma yapılarak tanımlanabilirler.

Sektörde bilgi ve beceri sahibi kişiler bir aktif DA2, DA1 ve/veya EOD1 polipeptidi ekspresyonunu ortadan kaldırmak için uygun mutasyonları kolayca anlayacaklardır.

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir dominant negatif DA1 polipeptidi eksprese eden ve isteğe bağlı olarak i) bir EOD1 supresör nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asidi ya da ii) EOD1 ekspresyonu veya aktivitesini azaltan bir mutasyonu içeren bir bitki hücresine DA2 ekspresyonu veya aktivitesini azaltan veya ortadan kaldıran bir mutasyon eklenebilir.

Bu buluşun bazı yapılarında, söz konusu bitkinin hücreleri içerisinde bir supresör nükleik asit, örneğin bir supresör RNA veya RNAi molekülü kodlayan veya transkribe eden bir heterolog nükleik asit eksprese etmek suretiyle bir bitki hücresinde gerçekleşen bir DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi ekspresyonu azaltılabilir. Supresör

RNA, bitki hücrelerinde kendi hedef polipeptidinin (yani DA1, DA2 veya EOD1) ekspresyonunu baskılamaktadır.

Bu patent başvurusunda tarif edilen nükleik asitler, kısmen veya tamamen sentetik olabilirler. Özellikle de, doğada kendiliğinden birlikte bulunmayan (bitişik olmayan), ligate edilmiş veya başka şekilde yapay olarak birleştirilmiş bu nükleik asitler, söz konusu nükleik asit sekanslarında rekombinant olabilirler. Alternatif olarak, örneğin bir otomatik sentezleyici kullanılarak doğrudan doğruya sentezlenmiş olabilirler.

Elbette nükleik asit çift veya tek iplikçikli, cDNA veya genomik DNA ya da RNA olabilir. Nükleik asit, tasarımına bağlı olarak kısmen veya tamamen sentetik olabilir. Doğal olarak, sektörde bilgi ve beceri sahibi kişi, nükleik asit RNA içerdiğinde, gösterilen sekansa yapılan referansın, U ile ikame edilen T ile birlikte RNA eşdeğerine referans olarak yorumlanması gerektiğini anlayacaktır.

"Heterolog" terimi, söz konusu nükleotidlerin genlerinin/sekanslarının veya söz konusu geni/sekansı regüle eden bir sekansın, bitkinin bahsi geçen hücrelerine veya onların bir öncülüne genetik mühendislik araçları veya rekombinant araçlar kullanılarak, yani insan müdahalesiyle eklendiğini göstermektedir. Bir bitki hücresine heterolog olan nükleotid sekansları o tip, varyete veya türde doğada kendiliğinden oluşmayabilirler (yani eksojen veya yabancı olabilirler) ya da hücrelerin alt-selüler veya genomik ortamında kendiliğinden oluşmayan sekanslar olabilirler ya da hücrelerde kendiliğinden oluşmayan, yani doğal olmayan bir regüle edici unsura operabl bağlı

sekanslar olabilirler.

Bitki hücrelerinde bulunan bir hedef polipeptidin ekspresyonunun baskılanması sektörde iyi bilinmektedir. Uygun bir supresör nükleik asit, hedef genin ekspresyonunu azaltmak amacıyla, DA1, DA2 ve/veya EOD1 genine kıyasla, antisens veya sens yönünde veya her iki yönde sokulan hedef DA1, DA2 ve/veya EOD1 geninin hepsi veya bir kısmının bir kopyası olabilir. Örneğin, “van der Krol ve ark., (1990) *The Plant Cell* 2, 291-299; Napoli ve ark., (1990) *The Plant Cell* 2, 279-289; Zhang ve ark., (1992) *The Plant Cell* 4, 1575-1588 ve US-A-5,231,020” referanslarına bakınız. Bu yaklaşıma ilişkin ilave geliştirmeler WO95/34668 (Biosource) sayılı patent başvurusunda ve “Angell & Baulcombe (1997) *The EMBO Journal* 16, 12:3675-3684 ve Voinnet & Baulcombe (1997) *Nature* 389: pg 553” referanslarına bulunabilir.

Bu buluşun bazı yapılarında, supresör nükleik asit, DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi ekspresyonunun bir sens supresörü olabilir.

Uygun bir sens supresör nükleik asit, bir çift iplikçikli RNA olabilir (Fire A. ve ark. *Nature*, Vol 391, (1998)). dsRNA aracılı susturma, gene özgüdür ve genelde RNA interferansı olarak adlandırılır (RNAi). RNAi, iki basamaklı bir prosestir. İlk olarak, 5' terminal fosfat ve 3' kısa çıkıntılarla (~2nt) yaklaşık 21-23nt uzunlukta kısa müdahaleci RNA'lar (siRNA'lar) elde etmek amacıyla, dsRNA hücre içerisinde klevajlanır. siRNA'lar ilgili mRNA sekansını spesifik olarak tahrip etmek için hedef alırlar (Zamore P.D. *Nature Structural Biology*, 8, 9, 746-750, (2001)).

siRNA'lar (bazen mikroRNA'lar olarak da adlandırılırlar), komplementer RNA'lara bağlanmak ve proteinin içine mRNA eliminasyonu (RNAi) tetiklemek ya da mRNA translasyonu areste etmek suretiyle gen ekspresyonunu aşağı regüle ederler. siRNA, uzun
 5 çift iplikçikli RNA'lardan proseslenerek türetilebilirler ve doğada bulduklarında, tipik olarak eksojen kaynaklıdır. Kısa firketelerin proseslenmesiyle türetilen mikro-müdahaleci RNA'lar (miRNA), protein kodlaması yapmayan küçük RNA'lar tarafından endojen olarak kodlanırlar. Hem siRNA hem de miRNA, kısmen
 10 komplementer hedef sekanslarını barındıran mRNA'ların translasyonunu RNA klevajı olmadan inhibe edebilir ve tam komplementer sekansları barındıran mRNA'ları degrade edebilirler.

Dolayısıyla, mevcut buluş, RNAi sekanslarının, DA1, DA2 ve/veya
 15 EOD1 polipeptidinin ekspresyonunu baskılamak amacıyla DA1, DA2 ve/veya EOD1 nükleik asit sekansına dayanan bir kullanımını sunmaktadır. Örneğin, bir RNAi sekansı, bu patent başvurusunda belirtilen bir referans DA2, DA1 veya EOD1 nükleotid sekansının bir fragmanına tekabül edebilir ya da onların bir varyantı olabilir.

20 siRNA moleküller, tipik olara çift iplikçiklidirler ve bir hedef gen fonksiyonunun RNA aracılı aşağı regülasyonunun etkinliğini optimize etmek amacıyla, siRNA molekülünün boy ve sekansının, mRNA hedefinin siRNA ile tanınmasına aracılık eden RISC kompleksiyle
 25 doğru siRNA tanınmasını ve böylece siRNA'nın bir konakçı cevabını azaltacak kadar kısa olmasını sağlayacak şekilde seçilmesi tercih edilmektedir.

miRNA ligandları, tipik olarak tek iplikçiklidirler ve ligandların bir firkete oluşturmalarına olanak tanıyan, kısmen komplementer bölgelere sahiptirler. miRNA'lar, DNA'dan transkribe edilen, ancak proteine transle edilmeyen RNA sekanslarıdır. Bir miRNA kodlayan bir DNA sekansı, miRNA'dan daha uzundur. Bu DNA sekansı, miRNA sekansını ve bir yaklaşık ters komplemanı içermektedir. Bu DNA sekansı bir tek iplikçikli RNA molekülüne içine transkribe edildiğinde, miRNA sekansı ve onun ters-komplemanı kısmen çift iplikçikli bir RNA segmenti için çift oluştururlar. microRNA sekanslarının tasarımları, "John ve ark., PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004" referansında tartışılmaktadır.

Tipik olarak, siRNA veya miRNA'nın etkilerini taklit etmesi hedeflenen RNA molekülleri, 10 ve 40 arasında ribonükleotide (veya onların sentetik analoglarına), daha tercihen 17 ve 30 arasında ribonükleotide, daha tercihen 19 ve 25 arasında ribonükleotide ve en çok tercihen 21 ve 23 arasında ribonükleotide sahiptirler. Bu buluşun çift iplikçikli siRNA kullanılan bazı yapılarında, bu molekül, örneğin bir veya iki (ribo)nükleotidin simetrik 3' çıkıntılarına, tipik olarak dTdT 3' çıkıntısının bir UU'suna sahip olabilir. Bu patent başvurusunda sunulan açıklama esasında, sektörde bilgi ve beceri sahibi bir kişi, örneğin siRNA bulucu (Ambion) gibi kaynakları kullanarak uygun siRNA ve miRNA sekanslarını kolayca tasarlayabilir. siRNA ve miRNA sekansları, gen aşağı regülasyonuna sebep olmak için sentetik olarak üretilip eksojen olarak eklenebilecekleri gibi, ekspresyon sistemleri (örneğin vektörler) kullanılarak da üretilirler. Bu buluşun tercih edilen bir yapısında, siRNA, sentetik olarak sentezlenmektedir.

Daha uzun çift iplikçikli RNA'lar, siRNA'lar üretmek için hücre içerisinde proseslenebilirler (örneğin, bakınız: Myers (2003) Nature Biotechnology 21:324-328). Daha uzun dsRNA molekülü, örneğin bir veya iki (ribo) nükleotidin simetrik 3' veya 5' çıkıntılılarına ya da küt uçlara sahip olabilirler. Daha uzun dsRNA molekülleri, 25 nükleotid veya daha uzun olabilirler. Tercihen, daha uzun dsRNA molekülleri 25 ve 30 arası nükleotid uzunluğundadırlar. Daha tercihen, daha uzun dsRNA molekülleri 25 ve 27 arasında nükleotid uzunluğundadırlar. En çok tercihen, daha uzun dsRNA molekülleri 27 nükleotid uzunluğundadırlar. 30 veya daha fazla nükleotid uzunluğunda olan dsRNA'lar, vektör pDECAP kullanılarak eksprese edilebilirler (Shinagawa ve ark., Genes and Dev., 17, 1340-5, 2003).

Hücredeki bir kısa firkete RNA molekülünün (shRNA) ekspresyonu başka bir alternatiftir. shRNA'lar, sentetik siRNA'lardan daha uygundur. Bir shRNA, küçük bir ilmi sekansıyla bölünen kısa ters çevrilmiş tekrarlardan oluşur. Bir ters çevrilmiş tekrar, gen hedefine komplementerdir. Hücre içerisinde, shRNA, DICER tarafından hedef genin mRNA'sını degrade eden ve ekspresyonu baskılayan bir siRNA içerisine proseslenir. Bu buluşun tercih edilen bir yapısında, shRNA, bir vektörden transkripsiyon yoluyla (bir hücre içerisinde) endojen olarak üretilmektedir. shRNA'lar, örneğin insan H1 veya 7SK promotörü veya bir RNA polimeraz II promotörü gibi bir RNA polimeraz III promotörünün kontrolü altında bir hücrenin shRNA sekansını kodlayan bir vektörle transfekte edilmesi suretiyle o hücre içerisinde üretilebilirler. Alternatif olarak, shRNA, bir vektörden transkripsiyon yoluyla eksojen olarak sentezlenebilir (in vitro). Ardından, shRNA, hücrenin içerisine doğrudan doğruya eklenebilir.

Tercihen, shRNA molekülü, DA1, DA2 ve/veya EOD1'in bir kısmı sekansını içerir. Örneğin, shRNA sekansı 40 ve 100 arası baz uzunluğundadır, daha tercihen 40 ve 70 arası baz uzunluğundadır. Firketenin gövdesi, tercihen 19 ve 30 arası baz çifti uzunluğundadır.

5 Bu gövde, firkete yapısını stabilize etmek için G-U eşlemeleri içerebilir.

siRNA molekülleri, daha uzun dsRNA molekülleri veya miRNA molekülleri, bir nükleik asit sekansı transkripsiyonuyla rekombinant olarak yapılabilir, tercihen bir vektör bünyesinde bulunabilir.

10 Tercihen, siRNA molekülü, daha uzun dsRNA molekülü veya miRNA molekülü, bu patent başvurusunda belirtilen bir referans DA2, DA1 veya EOD1 nükleotid sekansının bir kısmı sekansını ya da onların bir varyantını içermektedir.

15

Bu buluşun diğer yapılarında, supresör nükleik asit, DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptid ekspresyonunun birbir anti-sens supresörü olabilir. Anti-sens sekansları gen ekspresyonunu aşağı regüle etmek için kullanıldıklarında, bir nükleotid sekansı bir “ters yönde” bir

20 promotorun kontrolü altına alınır ve böylece, transkripsiyon, hedef genin “sens” iplikçikliğinden transkribe edilmiş normal mRNA'ya komplementer RNA verir. Örneğin, “Rothstein ve ark., 1987; Smith ve ark., (1988) Nature 334, 724-726; Zhang ve ark., (1992) The Plant Cell 4, 1575-1588, English ve ark., (1996) The Plant Cell hücresi 8,

25 179-188” referanslarına bakınız. Antisens teknolojisi “Bourque, (1995), Plant Science 105, 125-149 ve Flavell (1994) PNAS USA 91, 3490-3496” referanslarında da gözden geçirilmektedir.

Bir anti-sens supresör nükleik asit, bu patent başvurusunda belirtilen bir referans DA2, DA1 veya EOD1 nükleotid sekansın bir fragmanı olan bir nükleotid sekansının en az 10 nükleotidinden oluşan bir anti-sens sekansından oluşabilir ya da onların bir varyantı olabilir.

5

Bir hedef sekans ekspresyonunun aşağı regülasyonu için kullanılan sekansta ve hedef sekansta tam sekans özdeşliği olması tercih edilebilir; bununla birlikte, toplam sekans tamamlayıcılığı veya benzerliği şart değildir. Bir veya daha fazla nükleotid, hedef genden kullanılan sekansta farklılık gösterebilir. Dolayısıyla, mevcut buluşa uygun olarak bir gen ekspresyonu aşağı regülasyonunda kullanılan bir sekans, kullanılabilir olanlar arasından seçilmiş bir vahşi tip sekans (örneğin gen) ya da bu tür bir sekansın varyantı olabilir.

15 Sekansın bir açık okuma çerçevesi içermesi ya da transle edilebilir bir RNA'yı açıkça belirtmesi gerekmez. İlgili anti-sens ve sens RNA molekülleri için hibridize etmeye yeterli miktarda homoloji olması tercih edilebilir. Kullanılan sekans ve hedef gen arasında yaklaşık %5, %10, %15 veya %20 oranında veya daha fazla uyumsuzluk olduğunda 20 bile gen ekspresyonu aşağı regülasyonu olabilir. Homolojinin gerçekleşecek gen ekspresyonu aşağı regülasyonu için yeterli olması etkili olacaktır.

Bir supresör RNA molekülü; DA2, DA1 ve/veya EOD1 polipeptidini 25 kodlayan bir nükleik asit sekansının sens veya anti-sens iplikçığının 10-40 nükleotidini içerebilir.

Supresör nükleik asitler, heterolog promotorlara, örneğin dokuya özgü

veya indüklenabilir promotorlara operabl bağı olabilirler. Orneğin, nihai tohum büyüklüğünü artırmak amacıyla, gelişmekte olan ovül ve tohumlarda bulunan iki veya daha fazla DA1, DA2 ve/veya EOD1 nükleik asidi spesifik olarak aşağı regüle etmek için integument ve
5 tohum spesifik promotorlar kullanılabilirler.

Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan bir nükleik aside ve isteğe bağı olarak, bir EOD1 supresör nükleik aside sahip olan bir bitki hücresinde DA2
10 supresör nükleik asit eksprese edilebilir.

Supresör nükleik asit ve/veya bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan nükleik asit, bir veya daha fazla vektörde bulunabilir.

15 Bu patent başvurusunda tarif edilen supresör nükleik asit(ler)i ve/veya dominant negatif DA1 polipeptidini kodlayan nükleik asit, yukarıda tarif edildiği üzere, bir heterolog regüle edici sekansa, örneğin bir konstitütif, indüklenabilir, doku spesifik veya gelişimsel spesifik promotor gibi bir promotora operabl bağı olabilir.

20

Bu patent başvurusunda tarif edilen supresör nükleik asit(lar)ı ve/veya dominant negatif DA1 polipeptidlerini kodlayan nükleik asit, bir nükleik asit yapısı veya vektörü üzerinde bulunabilir. Bu yapı veya vektör, tercihen bir bitki hücresine transformasyon ve/veya o hücre
25 içerisinde ekspresyon için uygundur. Bir vektör, diğerlerinin yanı sıra, kendi kendine aktarılabilir veya mobilize edilebilir olabilen veya olmayabilen ve ayrıca, selüler genoma entegrasyon yoluyla ya da ekstrakromazomal olarak (örneğin bir replikasyon orijinine sahip,

otonom replike olan plazmid) mevcut olmak suretiyle prokaryotik veya ökaryotik konakçıyı, özellikle de bir bitki konakçıyı transforme edebilen çift veya tek iplikçikli doğrusal veya dairesel formda herhangi bir plazmid, kozmid, faj veya *Agrobacterium* ikili vektörü
5 olabilir.

Spesifik olarak, *Actinomyces* ve ilgili türlerden, bakterilerden ve ökaryotik (örneğin damarlı bitki, memeli, maya veya mantar) hücrelerinden seçilebilen iki farklı organizmada doğal veya kasıtlı
10 olarak replike olabilen bir DNA vehikülünü ifade eden mekik vektörler de dâhildir.

Yukarıda tarif edilen nükleik asidi içeren bir yapı veya vektörün, özellikle de bu vektör genoma rekombinasyon için bu nükleik asidi
15 hücrelere eklemek kullanılacaksa, bir promotor veya başka bir regüle edici sekans içermesi gerekmez.

Yapılar ve vektörler; kanamisin, higromisin, fosfinotrisin, klorsülfüron, metotreksat, gentamisin, spektinomisin, imidazolinonlar,
20 glifosat ve d-amino asitleri gibi antibiyotiklere karşı direnç gibi seçilebilir fenotipler sunan genlerden oluşan seçilebilir genetik markerler de içerebilirler.

Sektörde bilgi ve beceri sahibi kişiler, örneğin bir mikrobiyal hücrede veya bitki hücresinde vektörler inşa edebilir ve rekombinant gen ekspresyonu için protokoller tasarlayabilirler. Promotor sekansları, terminatör fragmanlar, poliadenilasyon sekansları, artırıcı sekanslar, marker genleri ve uygun diğer sekanslar da dâhil olmak üzere, uygun

regüle edici sekansları içeren uygun vektörler seçilebilir veya inşa edilebilir. Daha detaylı bilgiler için, örneğin “Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, Sambrook ve ark., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press and Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel ve ark. eds. John Wiley & Sons, 1992” referanslarına bakınız. Bitkiler üzerinde daha önce büyük başarıyla kullanılan spesifik prosedür ve vektörler “by Bevan, Nucl. Acids Res. (1984) 12, 8711-8721), and Guerineau and Mullineaux, (1993) Plant transformation and expression vektörs. In: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148” referanslarında tarif edilmektedir.

Bir hücreye seçilmiş bir gen yapısı eklerken sektörde bilgi ve beceri sahibi kişilerin iyi bildikleri belirli bazı mülahazalar göz önünde bulundurulmak zorundadır. Sokulacak nükleik asit, transkripsiyonu yönlendirecek etkili regüle edici elemanlar içeren bir yapı içerisinde birleştirilmelidir. Yapıyı hücre içine taşıyacak bir yöntem olmalıdır. Bu yapı hücre membranı içerisine taşındıktan sonra, endojen kromozomal malzemeye entegrasyon gerçekleşecek veya gerçekleşmeyecektir. Son olarak, hedef hücre tipi, tercihen bitkilerin tamamına rejenere edilen hücrelerdir.

Supresör nükleik asidi veya dominant negatif DA1 polipeptidini kodlayan nükleik asit ekspresyonunu artıran bir yapı ve transformasyon kullanılması tercih edilmektedir. Genin tek bir kopyasının bitki hücrelerinin genomuna entegre edilmesi fen susturma etkilerini en aza indirmek için faydalı olabilir. Benzer şekilde, entegrasyon karmaşıklığının kontrol edilmesi bu açıdan faydalı

olabilir. Örneğin EP1407000B1 sayılı EP Patentine göre bir minimal gen ekspresyon yapısı kullanan bitki hücrelerinin transformasyonu bu açıdan özellikle önemlidir.

- 5 Bu patent başvurusunda tarif edilen özelliklere sahip transgenik bitkiler üretmek amacıyla bitki hücrelerine nükleik asit yapıları ve vektörler eklemek için sektörde bilgi ve beceri sahibi kişilerin iyi bildikleri teknikler kullanılabilir.
- 10 Agrobakteri transformasyonu, sektörde bilgi ve beceri sahibi kişilerin bitki türlerini transforme etmek için yaygın kullandıkları yöntemlerden biridir. Uygun, verimli transgenik bitkilerin üretimi, şu an sektörde gerçekleştirilen rutin bir işlemdir (örneğin “Toriyama, ve ark. (1988) *Bio/Technology* 6, 1072-1074; Zhang, ve ark. (1988) *Plant Cell Rep.* 7, 379-384; Zhang, ve ark. (1988) *Theor Appl Genet* 76, 835-840; Shimamoto, ve ark. (1989) *Nature* 338, 274-276; Datta, ve ark. (1990) *Bio/Technology* 8, 736-740; Christou, ve ark. (1991) *Bio/Technology* 9, 957-962; Peng, ve ark. (1991) *International Rice Research Institute, Manila, Philippines* 563-574; Cao, ve ark. (1992) *Plant Cell Rep.* 11, 585-591; Li, ve ark. (1993) *Plant Cell Rep.* 12, 250-255; Rathore, ve ark. (1993) *Plant Molecular Biology* 21, 871-884; Fromm, ve ark. (1990) *Bio/Technology* 8, 833-839; Gordon-Kamm, ve ark. (1990) *Plant Cell* 2, 603-618; D'Halluin, ve ark. (1992) *Plant Cell* 4, 1495-1505; Walters, ve ark. (1992) *Plant Molecular Biology* 18, 189-200; Koziel, ve ark. (1993) *Biotechnology* 11, 194-200; Vasil, I. K. (1994) *Plant Molecular Biology* 25, 925-937; Weeks, ve ark. (1993) *Plant Physiology* 102, 1077-1084; Somers, ve ark. (1992) *Bio/Technology* 10, 1589-1594; WO92/14828; Nilsson, O. ve

ark. (1992) Transgenic Research 1, 209-220” referanslarına bakınız).

Agrobakteri transformasyonunun verimsiz veya etkisiz olduğu durumlarda, örneğin bazı gimnosperm türlerinde, mikroprojektil veya partikül bombardımanı (US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), 5 elektroporasyon (EP 290395, WO 8706614), mikroenjeksiyon (WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green ve ark. (1987) Plant Tissue and Cell Culture, Academic Press), doğrudan doğruya DNA alımı (DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), 10 lipozom aracılı DNA alımı (örneğin Freeman ve ark. Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)) veya vorteksleme yöntemi (örneğin Kindle, PNAS ABD 87: 1228 (1990d)) gibi diğer yöntemler tercih edilebilir. Bitki hücrelerinin transformasyonu için kullanılan fiziksel yöntemler “Oard, 1991, Biotech. Adv. 9: 1-11” referansında gözden 15 geçirilmektedir.

Alternatif olarak, transformasyon prosesinin etkinliğini artırmak için, örneğin Agrobakteri kaplı mikropartiküllerle bombardıman (EP-A-486234) gibi ya da Agrobakteriyle eş-kültivasyonu takiben yaralanma 20 indüklemek için mikroprojektil bombardımanı (EP-A-486233) gibi farklı tekniklerden oluşan bir kombinasyon kullanılabilir.

Transformasyonu takiben, sektörde de standart olduğu üzere, örneğin tek hücrelerden, kallus dokusundan veya yaprak disklerinden bir bitki 25 rejenere edilebilir. Bitkilerin hücrelerinden, dokularından ve organlarından hemen hemen her türlü bitki tamamen rejenere edilebilir. Kullanıma hazır teknikler “Vasil ve ark., Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II and III, Laboratory

Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984 ve Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989” referanslarında gözden geçirilmektedir.

- 5 Hem belirli bitki türlerini transforme etme etkinliğine, hem de bu buluşu seçtiği belirli bir metodolojiyle uygulayan kişinin deneyimi ve tercihinine göre belirli bir transformasyon teknolojisi seçeneği belirlenecektir. Sektörde bilgi ve beceri sahibi kişiler, nükleik asidi bitki hücrelerine eklemek için seçilen belirli bir transformasyon
- 10 sisteminin, ne buluş açısından, ne de bitki rejenerasyonu için seçilen teknik açısından bir gereklilik veya bir sınırlama olduğunu anlayacaklardır.

Transformasyonu takiben, DA2 ekspresyonu azaltılmış ve ayrıca,

15 DA1 veya DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi azaltılmış bir bitki hücresi tanımlanabilir ve/veya seçilebilir. Bitki hücresinden bir bitki rejenere edilebilir.

Yukarıda tarif edildiği gibi, DA2 aktivitesi veya ekspresyonu

20 azaltılmış ve ayrıca, DA1 ya da hem DA1 hem de EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi eksik bir bitki, ürün veya onun soyundan gelen bitkiler üretmek için eşeyli çoğaltılabilir veya büyütülebilir. Bir veya daha fazla hücreden rejenere edilmiş bitkinin ürünü veya onun soyundan gelenler, eşeyli çoğaltılmış veya büyütülmüş olabilirler.

25

DA1, DA2 ve/veya EOD1 amino asit ya da nükleik asit sekansı, bir bitkide bir veya daha fazla DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesini, o bitki yukarıda belirtildiği gibi

büyütülmeden veya eşeyli çoğaltılmadan önce, bu işlemler sırasında veya sonrasında tespit etmek için bir moleküler marker olarak kullanılabilir. Bir yöntem aşağıdakileri içerebilir:

- 5 bitkilerden oluşan bir popülasyon sağlanması,
- bu popülasyonda yer alan bir veya daha fazla bitkide bir DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidinin ekspresyon miktarının belirlenmesi ve
- 10 bu popülasyonda, DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi ekspresyonu söz konusu popülasyonun diğer üyelerine göre azaltılmış bir veya daha fazla bitki belirlenmesi.

Bitkilerden oluşan popülasyon, yukarıda tarif edildiği gibi üretilebilir.

15

Bu buluşun bazı yapılarında, bir yöntem aşağıdakileri içerebilir:

- progeni bitkilerden oluşan bir popülasyon üretmek için bir birinci ve bir ikinci bitkinin melezlenmesi;
- 20 popülasyonda yer alan progeni bitkilerde bir veya daha fazla DA1, DA2 ve EOD1 polipeptidinin ekspresyonunun tespit edilmesi ve
- bu popülasyonda, DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi ekspresyonu kontrollere kıyasla azaltılmış bir progeni bitkinin
- 25 tespit edilmesi.

Birinci ve ikinci bitkilerin biri veya ikisi, yukarıda tarif edildiği gibi üretilebilir.

DA2 ve DA1 ve/veya EOD1 polipeptidi ekspresyonu kontrollere (örneğin popülasyonun diğer üyeleri) kıyasla azaltılmış bir progeni bitkide, kontrollere nazaran tohum ve/veya organ büyüklüğünün arttığı görülebilir ve bu bitki daha yüksek bitki verimine sahip olabilir.

5

Bu buluşun bazı yapılarında, bir DA2 polipeptidi ekspresyonu veya aktivitesi yukarıda tarif edildiği gibi azaltılabilen ve DA1 ve/veya EOD1 eksikliği olan bir bitki veya bitki hücrelerini tanımlamak amacıyla, bir bitkide bulunan bir veya daha fazla DA1 ve/veya EOD1 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesini tespit etmek için DA1 ve EOD1 amino asit veya nükleik asit sekansları bir moleküler marker olarak kullanılabilirler. Bir yöntem aşağıdakileri içerebilir:

- 15 bitkilerden oluşan bir popülasyon sağlanması,
 bu popülasyonda yer alan bir veya daha fazla bitkide bir DA1 ve/veya EOD1 polipeptidinin ekspresyon miktarının belirlenmesi ve
 bu popülasyonda, DA1 ve/veya EOD1 polipeptidi ekspresyonu söz konusu popülasyonun diğer üyelerine göre azaltılmış bir veya daha fazla bitki belirlenmesi.

20

Belirlenen bitkilerde, DA2 ekspresyonu veya aktivitesi yukarıda tarif edilen yöntemlere göre azaltılabilir.

- 25 Bir bitki veya progeni bitki, i) o bitkinin bir veya daha fazla hücresinde bulunan DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi miktarını ölçmek; ii) o bitkinin bir veya daha fazla hücresinde bulunan DA1, DA2 ve/veya EOD1 mRNA miktarını ölçmek ya da iii) o bitkinin bir

veya daha fazla hücrede DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi kodlayan nükleik asidi sekanslamak ve bir veya daha fazla mutasyon mevcudiyetinde tanımlamak suretiyle belirlenebilir.

- 5 Bu buluşun bazı yapılarında, DA1, DA2 ve/veya EOD1 ekspresyonu miktarı protein seviyesinde tespit edilebilir. Bir yöntem aşağıdakileri içerebilir:

- 10 bitkilerden oluşan bir popülasyon sağlanması,
 bu popülasyonda yer alan bir veya daha fazla bitkide DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi miktarının belirlenmesi ve
 bu popülasyonda, bir DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi miktarı söz konusu popülasyonun diğer üyelerine göre azaltılmış bir veya daha fazla bitki belirlenmesi.

15

- Bitkide DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidine bağlanan ve diğer antijenlere az miktarda bağlanan veya hiç bağlanmayan antikolar kullanılarak, örneğin Western blotlama gibi immünolojik teknikler kullanılabilir. Örneğin, bir bitki hücrede bulunan bir
 20 DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidinin miktarı, bitki hücrelerini içeren bir numuneyi DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidine karşı yönlendirilmiş bir antikorla veya başka bir spesifik bağlanma üyesiyle temas ettirmek ve ayrıca, DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidinin numuneye bağlanıp bağlanmadığını belirlemek suretiyle tespit
 25 edilebilir. Spesifik bağlanma üyesine bağlanma miktarı, hücrede eksprese edilen DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidi miktarının göstergesidir.

DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi miktarı, bitkinin bir veya daha fazla hücresinde, tercihen bitkinin toprağın üzerinde kalan bir kısmı veya dokusundan alınan hücrelerinde, örneğin filizlerdeki vaskülatür ve primer ve sekonder meristemlerde tespit edilebilir.

5

Bu buluşun diğer yapılarında, DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidi ekspresyonu nükleik asit seviyesinde tespit edilebilir. Örneğin, bir DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidi kodlayan nükleik asit miktarı tespit edilebilir. Verimle ilişkili özellikleri artırılmış bir bitki üretme yöntemi aşağıdakileri içerebilir:

10

bitkilerden oluşan bir popülasyon sağlanması,

söz konusu popülasyonda yer alan bir veya daha fazla bitkinin bir hücresinde DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidi kodlayan nükleik asidin, örneğin mRNA'nın seviyesinin veya miktarının belirlenmesi ve

15

bu popülasyonda, nükleik asit kodlayan bir DA1, DA2 veya EOD1 miktarının söz konusu popülasyonun diğer üyelerine kıyasla azaltıldığı bir veya daha fazla bitkinin tespit edilmesi.

20

Bir bitki hücresinde nükleik asit kodlama seviyesi veya miktarı, örneğin o hücrede transkribe edilmiş kodlama nükleik asit miktarını belirleyerek tespit edilebilir. Bu, Northern blotlama veya RT-PCR gibi standart teknikler kullanılarak yapılabilir.

25

Alternatif olarak, bir DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidinin ekspresyon veya aktivitesini etkileyen sekans varyasyonlarının mevcudiyeti tespit edilebilir. Büyüme ve/veya biyokütle özellikleri

artmış bir bitki üretmek için kullanılan başka bir yöntem aşağıdakileri içerebilir:

- bitkilerden oluşan bir popülasyon sağlanması,
- 5 söz konusu popülasyonda yer alan bir veya daha fazla bitkinin bir hücresinde bir DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit içerisinde bir veya daha fazla sekans varyasyonu, örneğin polimorfizmler, mutasyonlar veya hipermetilasyon bölgeleri bulunup bulunmadığının belirlenmesi,
- 10 burada, kodlanan DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidinin ekspresyonu veya aktivitesini azaltan bir veya daha fazla sekans varyasyonundan bahsedilmektedir ve
- bu popülasyonda, DA1, DA2 ve/veya EOD1 ekspresyonu veya aktivitesini söz konusu popülasyonun diğer üyelerine kıyasla
- 15 azaltan bir veya daha fazla sekans varyasyonuna sahip bir veya daha fazla bitki tespit edilmesi.

DA1, DA2 ve/veya EOD1 polipeptidler ve kodlayan nükleik asit, yukarıda daha detaylı tarif edilmektedir.

20

- Bir nükleik asit içerisinde bir veya daha fazla sekans varyasyonu bulunup bulunmadığı, bir veya daha fazla bitki hücresinde varyant nükleik asit sekansı olup olmadığını tespit etmek ya da nükleik asit sekansı tarafından kodlanan varyant polipeptid olup olmadığını tespit
- 25 etmek suretiyle belirlenebilir. Tercih edilen nükleik asit sekansı varyasyonu tespit teknikleri; ARMS™-allel spesifik amplifikasyon, OLA, ALEX™, COPS, Taqman, Molecular Beacons, RFLP ve restriksiyon yeri temelli PCR ve FRET tekniklerini içermektedir.

Sektörde, bir bitki hücresinde bir DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidini kodlayan bir nükleik asidin miktarını ya da bir DA1, DA2 veya EOD1 polipeptidini kodlayan bir nükleik asitte sekans varyasyonu bulunup bulunmadığını tespit etmeye yönelik birçok uygun yöntem vardır (örneğin, bakınız: (örneğin bakınız: Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, Sambrook & Russell (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press NY; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel ve ark. eds. John Wiley & Sons (1992); DNA Cloning, The Practical Approach Series (1995), series eds. D. Rickwood and B.D. Hames, IRL Press, Oxford, UK and PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, ve ark. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.)). Sekans varyasyonu tespitine yönelik birçok güncel yöntem “Nollau ve ark., Clin. Chem. 43, 1114-1120, 1997” referansında ve ayrıca, örneğin “Laboratory Protocols for Mutasyon Detection”, Ed. by U. Landegren, Oxford University Press, 1996 and “PCR”, 2nd Edition by Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997’ gibi standart ders kitaplarında gözden geçirilmektedir.

Tercih edilen polipeptid sekansı varyasyon teknikleri, örneğin ABD ve Kanada’da Stockton Press tarafından ve Birleşik Krallık’ta Macmillan Reference tarafından basılan “A Practical Guide to ELISA by D M Kemeny, Pergamon Press 1991”; “Principles and Practice of Immunoassay, 2nd edition, C P Price & D J Newman, 1997” gibi referanslarla sektörde iyi bilinen immünoeseyleri içermektedir.

25

Bu buluşun bazı yapılarında, nükleik asit veya onun amplifiye edilmiş bir bölgesi, orada polimorfizm veya mutasyon olup olmadığını tanımlamak veya tespit etmek için sekanslanabilir. Bir polimorfizm

veya mutasyon, örneğin sekans veri tabanlarında belirtildiği gibi, elde edilen sekansı DA1, DA2 veya EOD1'in bilinen sekansıyla karşılaştırmak suretiyle tanımlanabilir.

Alternatif olarak, kontrol hücrelerinden alınan ilgili nükleik asidin sekansı da karşılaştırılabilir. Özellikle de, fonksiyonu azaltan, ancak tamamen ortadan kaldırmayan bir veya daha fazla polimorfizm veya mutasyon olup olmadığı tespit edilebilir. Bir dizi standart teknikten herhangi biri kullanılarak sekanslama yapılabilir. Amplifiye edilmiş bir ürünün sekanslanması, örneğin izopropanolle çökeltmeyi, tekrar süspansiyon etmeyi ve bir TaqFS+ Dye terminatör sekanslama kiti (örneğin GE Healthcare UK Ltd ABD firmasından) kullanarak sekanslamayı içerebilir. Uzatma ürünleri, bir ABI 377 DNA sekanslayıcı üzerinde elektroforeze tâbi tutulabilir ve Sequence Navigator yazılımı kullanılarak veri analizi yapılabilir.

15

Azaltılmış bir DA1, DA2 ve/veya EOD1 ekspresyonuna sahip olduğu tespit edilen bir projeni bitki, kontrollere kıyasla artmış veya iyileştirilmiş verimle ilişkili özellikler, örneğin artmış tohum veya organ büyüklüğü açısından test edilebilir.

20

Tanımlanan projeni bitki, tohum büyüklüğü, organ büyüklüğü ve/veya bitki verimi açısından kontrollerle kıyaslanarak test edilebilir.

Bu patent başvurusunda tarif edildiği gibi üretilen bir bitkide DA2 ekspresyonu veya aktivitesi eksik olabilir ve ayrıca, DA1 ekspresyonu veya aktivitesi, EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi ya da hem DA1 hem de EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi de eksik olabilir.

Bitkilerde DA2, DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi,

mutasyonla ya da bitkide sekans kodlayan bir veya daha fazla nükleotidle ve/veya bir supresör nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit ekspresyonuyla azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Bu buluşun tercih edilen bazı yapılarında, bitkide DA1 aktivitesi, bir
5 dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan bir heterolog nükleik asit ekspresyonuyla azaltılır veya ortadan kaldırılır.

Dolayısıyla, bir bitki, örneğin bir siRNA veya shRNA gibi bir supresör nükleik asit kodlayan ya da bir veya daha fazla DA1, DA2 ve
10 EOD1'in ekspresyonunu azaltan ya da bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan heterolog nükleik asit içerebilir.

Bir bitkide, mutasyonlardan, supresör nükleik asitlerden oluşan herhangi bir kombinasyon bu patent başvurusunda tarif edildiği gibi
15 kullanılabilir. Örneğin, bir bitki i) DA2 aktivitesi veya ekspresyonunu azaltan bir mutasyon, EOD1 ekspresyonunu azaltan bir supresör nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit ve ayrıca, bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit; ii) DA2 ekspresyonu veya aktivitesini
20 azaltan bir supresör nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit, EOD1 ekspresyonunu azaltan bir mutasyon ve ayrıca, bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit; iii) EOD1 ve DA2 ekspresyonunu azaltan supresör nükleik asitleri kodlayan heterolog nükleik asitler ve ayrıca,
25 bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit ya da iv) EOD1 ve DA2 aktivitesi veya ekspresyonunu azaltan mutasyon ve ayrıca, bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit kodlayan bir heterolog

nükleik asit içerebilir.

Bu buluşun diğer yapılarında, bir bitki i) DA2 aktivitesi veya ekspresyonunu azaltan bir mutasyon ve ayrıca, DA1 ekspresyonunu azaltan bir supresör nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit; ii) DA2 ekspresyonu veya aktivitesini azaltan bir supresör nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit ve ayrıca, DA1 ekspresyonunu azaltan bir mutasyon; iii) DA1 ve DA2 ekspresyonunu azaltan supresör nükleik asitleri kodlayan heterolog nükleik asitler; iv) DA1 ve DA2 aktivitesi veya ekspresyonunu azaltan mutasyonlar ya da v) DA2 aktivitesi veya ekspresyonunu azaltan bir mutasyon veya DA2 ekspresyonunu azaltan bir supresör nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit ve ayrıca, bir dominant negatif DA1 polipeptidi kodlayan bir nükleik asit kodlayan bir heterolog nükleik asit içerebilir.

15

Dominant negatif DA1 polipeptidi ve/veya supresör nükleik asitleri kodlayan heterolog nükleik asitler, aynı veya farklı ekspresyon vektörleri üzerinde olabilecekleri gibi, geleneksel teknikler kullanılarak bitki hücrelerinin bünyesine dâhil edilebilirler.

20

Bu patent başvurusunda tarif edilen kullanım için uygun bitkilere verilebilecek örnekler; tek çenekli ve çift çenekli damarlı bitkileri, örneğin bir zırai bitkiyi veya tahıl bitkisini, örneğin *Lithospermum erythrorhizon*, *Taxus spp*, tütün, kabakgiller, havuç, lahana, karpuz, kırmızı biber, üzüm asmaı, marul, çilek, kolza tohumu lahana, şeker pancarı, buğday, arpa, mısır, pirinç, soya fasulyesi, bezelye, sorgum, ayçiçeği, domates, patates, biber, kasımpatı, karanfil, keten, kenevir ve çavdardan oluşan bir gruptan seçilmiş bitkiyi içermektedir.

Yukarıda tarif edildiği gibi üretilen bir bitki, ürün veya o bitkinin soyundan gelen başka bir bitki üretmek için eşeyli çoğaltılmış veya büyütülmüş olabilir. Bir veya daha fazla hücreden rejenere edilmiş bitkinin ürünü veya onun soyundan gelen başka bitkiler, eşeysiz 5 çoğaltılmış veya büyütülmüş olabilirler.

Bu patent başvurusunda, ayrıca, bir veya daha fazla hücrede DA2 polipeptidi ekspresyonu veya aktivitesi azaltılmış veya ortadan kaldırılmış olan bir transgenik bitki de açıklanmaktadır; burada, bu 10 bitkide, DA1 veya hem DA1 hem de EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi eksiktir.

Bu bitki, bir veya daha fazla DA2, DA1 ve EOD1'in ekspresyonu veya aktivitesini azaltan veya ortadan kaldıran bir eksojen nükleik asit 15 içerebilir. Bu buluşun bazı yapılarında, transgenik bitki, DA1 aktivitesini azaltan bir dominant negatif DA1 polipeptidi eksprese edebilir.

Bu buluşun bazı yapılarında, bu bitkinin DA1, DA2 ve EOD1 20 ekspresyonu azaltılmış veya ortadan kaldırılmış olabilir ya da DA2 ve EOD1 ekspresyonu azaltılmış veya ortadan kaldırılmış olabilir ve bu bitki, bir dominant negatif DA1 eksprese edebilir.

Bu buluş, bu patent başvurusunda tarif edilen bir yöntemle üretilmiş 25 bir bitkiye ek olarak, bu tür bir bitkinin, tohumun, kendilenmiş veya hibrid progeninin ve soyundan gelenlerin herhangi bir klonunu ve ayrıca, bunlardan herhangi birinin herhangi bir parçası veya üreme yapılarını, örneğin ister eşeyli ister eşeysiz üreme veya çoğaltmada

kullanılabilecek budanmış parçaları ve tohumu içermektedir. Bu buluş, ayrıca, bu tür bir bitkinin eşeyli çoğaltılmış bir ürünü veya klonu olan veya soyundan gelen bir bitkiyi ya da bu tür bitkinin, ürünün, klonun veya soyundan gelenin herhangi bir parçasını veya üreme yapısını içermektedir.

Yukarıda tarif edilen bir yöntem kullanılarak uygun bir bitki üretilebilir.

10 Bu bitkinin verimi kontrol vahşi tip bitkilere (yani DA2 ve DA1 ya da DA2, DA1 ve EOD1 ekspresyonu veya aktivitesi azaltılmamış özdeş bitkiler) kıyasla artmış olabilir. Örneğin, beher birim alan için tohum (örneğin dane) kütlesi veya diğer bitki ürünleri, kontrol bitkilerine kıyasla artmış olabilir.

15

Örneğin, bir bitkide verimle ilişkili bir veya daha fazla özellik iyileştirilebilir. Verimle ilişkili özellikler yaşam süresini, organ büyüklüğünü ve tohum büyüklüğünü içerebilir.

20 DA2 polipeptidini kodlayan nükleik asit ekspresyonunun ortadan kaldırılmadığı veya azaltılmadığı kontrol bitkileriyle (yani DA2 ve isteğe bağlı olarak DA1 ve/veya EOD1 ekspresyonunun azaltılmadığı veya ortadan kaldırılmadığı özdeş bitkiler) kıyaslandığında, Bitkide verimle ilişkili bir özellik iyileştirilebilir, artırılabilir veya geliştirilebilir.

25

Bu patent başvurusunda, DA1'in in vivo ortamda DA2 ile fiziksel olarak etkileşime girdiği gösterilmektedir. Etkileşimi sekteye uğratan

veya ona müdahale eden bileşenler, tohum veya organ büyüklüğünü artırma ve bitki verimini iyileştirme konusunda faydalı olabilirler.

5 Bitki verimini artıran bir bileşiği belirlemek için kullanılan bir yöntem;

bir test bileşiğinin bir DA2 polipeptidinin bir DA1 polipeptidine bağlanması üzerindeki etkisini tespit etmeyi içerebilir ve bağlanmanın azalması veya ortadan kalkması, o bileşiğin bitki verimini artırmak için faydalı olabileceğinin göstergesidir.

10

DA1 ve DA2 polipeptidleri, yukarıda daha detaylı tarif edilmektedirler.

15 DA1 ve DA2 polipeptidleri, izole edilmiş olabilirler ya da bir bitki hücrelerinde rekombinant veya endojen olarak eksprese edilebilirler.

DA1/DA2 bağlanmasını azaltan veya ortadan kaldıran bir bileşik, bitkilerin verimi artıracak şekilde işleme tâbi tutulmalarında faydalı olabilir.

20 Bu patent başvurusunda kullanıldığında, "ve/veya" ifadesi, belirtilen iki özellik veya bileşenden her birine ilişkin, diğerini kapsayan veya kapsamayan spesifik bir açıklama olarak kabul edilmelidir. Örneğin "A ve/veya B" ifadesi, bu patent başvurusunda sanki her biri ayrı ayrı ele alınmış gibi (i) A, (ii) B ve (iii) A ve B'den her birine ilişkin
25 spesifik bir açıklama olarak alınmalıdır.

Bağlam aksini ifade etmedikçe, yukarıda belirtilen özelliklere ilişkin tarifnameler ve tanımlar, bu buluşun herhangi belirli bir özelliği veya

yapısıyla sınırlı değildirler ve tarif edilen tüm özellik ve yapılara eşit şekilde uygulanırlar.

Bu buluşun diğer özellik ve yapıları, yukarıda “oluşan” terimiyle ikame edilen “içeren” terimiyle ifade edilmiş özellik ve yapıları ve ayrıca, yukarıda “özünde oluşan” terimiyle ikame edilen “içeren” terimiyle ifade edilmiş özellik ve yapıları sunmaktadır.

Deneyler

10

1. Yöntemler

1.1 Bitki malzemeleri ve büyütme koşulları

15 Kullanılan vahşi tip hattı Arabidopsis ekotip Columbia (Col-0) idi. Tüm mutantların arkaplanı Col-0'dı. da2-1 (SALK_150003) Arabidopsis Stok Merkezi NASC ve ABRC koleksiyonlarından elde edildi. T-DNA insersiyonu PCR ve sekanslama yoluyla teyit edildi. Tohumların yüzeyi %100 izopropanolle 1 dakika ve %10 (h/h) 20 çamaşır suyuyla 10 dakika süreyle sterilize edildi; steril suyla en az üç kez yıkandı; 4°C sıcaklıkta ve karanlıkta 3 gün boyunca tabakalandı; %0,9 agar ve %1 glukozla GM vasatı üzerine disperse edildi ve ardından, 22°C sıcaklıkta büyütüldü. Bitkiler, 22°C sıcaklıkta uzun gün koşulu (16 saat gündüz / 8 saat gece) altında büyütüldüler.

25

1.2 Yapılar ve transformasyon

pDA2:DA2 yapısı, bir PCR-temelli Geçit sistemi kullanılarak yapıldı.

DA2'nin 1960bp promotör sekansı, DA2proGW-F ve DA2proGW-R primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Ardından, PCR ürünleri pCR8/GW/TOPO TA klonlama vektörüne (Invitrogen) klonlandılar. DA2CDS-pMDC110 plazmidini elde etmek için, DA2 CDS amplifiye edildi ve sonrasında, PCR ürünleri Geçit vektörü pMDC110'un AscI ve KpnI yerlerine klonlandılar. Bunun ardından, pDA2:DA2 yapısını oluşturmak için, DA2 promotörü LR reaksiyonuyla DA2CDS-pMDC110'a alt-klonlandı. Plazmid pDA2:DA2, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 kullanılarak da2-1 mutant bitkilere eklendi ve transformantlar, vasat içeren higromisin (30µg/ml) üzerinde seçildiler.

35S:DA2 yapısı, bir PCR-temelli Geçit sistemi kullanılarak yapıldı. PCR ürünleri, TOPO enzimi kullanılarak pCR8/GW/TOPO TA klonlama vektörüne (invitrogen) alt-klonlandılar. Ardından, DA2 geni, 35S promotörünü (Curtis and Grossniklaus, 2003) içeren Geçit İkili Vektörü pMDC32 içine alt-klonlanır. Plazmid 35S:DA2, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 kullanılarak Col-0 bitkilerine eklendi ve transformantlar, higromisin (30µg/ml) içeren vasat üzerinden seçildiler.

DA2'nin 1960 bp promotör sekansı amplifiye edildi ve PCR ürünleri, T4 DNA ligazı kullanılarak pGEM-T vektörüne (Promaga) klonlandı ve sekanslandı. Ardından, transformasyon plazmidini pDA2:GUS elde etmek amacıyla, DA2 promotörü, pGreen-GUS ikili vektörünün (Curtis and Grossniklaus, 2003) SacI ve NcoI yerlerine sokuldu. Plazmid pDA2:GUS, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 kullanılarak Col-0 bitkilerine eklendi ve transformantlar, kanamisin (50µg/ml) içeren vasat üzerinde seçildiler. 35S:GW2 yapısı, bir PCR-

temelli Geçit sistemi kullanılarak yapıldı. PCR ürünleri, TOPO enzimi kullanılarak pCR8/GW/TOPO TA klonlama vektörüne (invitrogen) alt-klonlandılar. Ardından, GW2 geni, 35S promotorunu (Curtis and Grossniklaus, 2003) içeren pMDC32 Geçit İkili Vektörüne alt-klonlandı. Plazmid 35S:GW2, Agrobacterium tumefaciens GV3101 kullanılarak Col-0 bitkilerine eklendi ve transformantlar, higromisin (30µg/ml) içeren vasat üzerinde seçildiler.

1.3 Morfolojik ve selüler analiz

10

Ortalama tohum ağırlığı, 500'lük seriler halindeki olgun kuru tohumları bir elektronik analiz terazisi (METTLER MOLEDO AL104 ÇİN) kullanılarak ölçmek suretiyle tespit edildi. Her tohum lotu için, beş numune serisinin ağırlıkları ölçüldü. Tohumların fotoğrafı bir Leica CCD (DFC420) kullanılarak bir Leica mikroskopu (LEICA S8APO) altında çekildi ve tohum büyüklüğü, Image J yazılımı kullanılarak ölçüldü. Petallerin (aşama 14), yaprakların ve kotiledonların alan ölçümleri, Image J yazılımı kullanılarak, dijital bir görüntü elde etmek için organları taramak ve ardından, alanı, uzunluğu ve genişliği hesaplamak suretiyle yapıldı. Yaprak, petal ve embriyo hücre büyüklükleri DIC görüntülerinden yola çıkılarak ölçüldü. Çiçeklerde (aşama 14) biyokütle akümüasyonu organların tartılmasıyla ölçüldü.

25

1.4 GUS boyama

Numuneler (pDA2:GUS); 1 mM X-gluk, 100 mM Na₃PO₄ tamponu, her biri 3mM K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆, 10mM EDTA ve %0,1

Nodidet-P40'tan oluşan bir çözelti içerisinde boyandılar ve oda sıcaklığında 6 saat süreyle inkübe edildiler. GUS boyamasından sonra, %70 etanol kullanılarak klorofil çıkartıldı.

5 **1.5 RNA izolasyonu, RT-PCR ve Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR analizi**

Toplam RNA, bir RNeasy Bitki Mini kiti (TIANGEN, Çin) kullanılarak Arabidopsis köklerinden, saplarından, yapraklarından, 10 fidelerinden ve çiçek kümelerinden ekstrakte edildi. Ters transkripsiyon (RT)-PCR, tarif edildiği gibi (Li ve ark., 2006) gerçekleştirildi. cDNA numuneleri, ACTIN2-F ve ACTIN2-R primerleri kullanılarak aktin transkript miktarı üzerinden standartlaştırıldı. Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR analizi, 15 Lightcycler 480 SYBR Green Master (Roche) kullanılarak bir Lightcycler 480 cihazıyla (Roche) yapıldı. ACTIN7mRNA dâhili kontrol olarak kullanıldı ve nispi mRNA miktarları karşılaştırma eşik döngüsü yöntemi kullanılarak hesaplandı.

20 **1.6 E3 ubikuitin ligazı aktivitesi eseyi**

MBP-DA2 yapısı oluşturmak için, DA2 kodlama sekansı, pMAL-C2 vektörünün BamHI ve PstI yerlerine klonlandı. Çoklu-yer yönlendirmeli mutagenез kitinin (Stratagene) kullanım talimatı takip 25 edilerek mutasyona uğratılmış DA2 (DA2C59S ve DA2N91L) oluşturuldu.

MBP-DA2 ve mutasyona uğratılmış MBP-DA2 eksprese eden bakteriyel lizatlar, 0,4 mM IPTG ile 2 saat süreyle indüklenmiş E. coli BL21'den hazırlandılar. Bakteriler, TGH lizis tamponu (50 mM HEPES [pH 7,5], 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, %1 Triton X-100, %10 gliserol ve proteaz inhibitörü kokteyli [Roche]) içerisinde lize edildiler ve ultrasona tâbi tutuldular. Lizatlar santrifüjlenerek temizlendiler ve 4°C sıcaklıkta 30 dakika süreyle amiloz resini (New England Biolabs) kullanılarak inkübe edildiler. Boncuklar, kolon tamponuyla (20 mM Tris pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) yıkandılar ve reaksiyon tamponuyla (50 mM Tris pH 7,4, 20 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP) dengelendiler. 110 ng E1 (Boston Biochem), 170 ng E2 (Boston Biochem), 1 µg His-ubikuitin (Sigma-Aldrich) ve 2 µg DA2-MBP veya mutasyona uğratılmış DA2-MBP füzyon proteini, bir 20µl reaksiyon tamponu içerisinde 30°C sıcaklıkta 2 saat süreyle inkübe edildi.

Poliubikuitinlenmiş proteinler, His'e karşı bir antikorla (Abmart) ve MBP'ye karşı bir antikorla (New England Biolabs) immünoiblota yoluyla tespit edildiler.

20

1.7 İn vitro protein-protein etkileşimi

Spesifik protein domainleri içeren DA1, da1-1 ve DA1 türevlerinin kodlama sekansları, GST-DA1, GST-DA1R358K, GST-DA1-UIM ve GST-DA1-LIM+C yapıları oluşturmak için pGEX-4T-1 vektörünün BamH I ve Not I yerlerine ve ayrıca, GST-DA1-LIM ve GST-DA1-C yapıları elde etmek için pGEX-4T-1 vektörünün EcoRI ve XhoI yerlerine klonlandılar.

Protein-protein etkileşimini test etmek amacıyla, yaklaşık 15 µg of MBP-DA2 füzyon proteini içeren bakteriyel lizatlar, yaklaşık 30 µg GST-DA1, GST-DA1R358K, GST-DA1-UIM, GST-DA1-LIM, GST-DA1-LIM+C veya GST-DA1-C füzyon proteini içeren lizatlarla
 5 birleştirildiler. Birleştirilen her bir çözeltiye, 4°C sıcaklıkta 1 saat süreyle sürekli sallanarak 20 µl amiloz reçinesi (New England Biolabs) ilave edildi. Boncuklar TGH tamponuyla birçok kez yıkandılar ve izole edilmiş proteinler, bir %10 SDS-poliakriamid jel üzerinde ayrıldılar ve sırasıyla anti-GST (Abmart) ve anti-MBP
 10 antikoları (Abmart) kullanılarak Western blot analiziyle tespit edildiler.

1.8 Eş-immüno-çökeltme

15 DA1 ve DA1-C'nin kodlama sekansı, transformasyon plazmidini 35S::Myc-DA1 ve 35S::Myc-DA1-C elde etmek için pCAMBIA1300-221-Myc vektörünün KpnI ve BamHI yerlerine klonlandı. PCR ürünleri, TOPO enzimi kullanılarak pCR8/GW/TOPO TA klonlama vektörüne (invitrogen) alt-klonlandılar. Ardından,
 20 DA2 geni, 35S promotorunu ve GFP genini (Curtis and Grossniklaus, 2003) içeren pMDC43 Geçit İkili Vektörüne alt-klonlandı. PCR ürünleri, TOPO enzimi kullanılarak pCR8/GW/TOPO TA klonlama vektörüne (invitrogen) alt-klonlandılar. Ardından, PEX10 geni, 35S promotorunu ve GFP genini içeren pH7FWG2 Geçit İkili Vektörüne
 25 alt-klonlandılar.

Nicotiana benthamiana yaprakları, 35S:Myc-DA1 ve 35S:GFP-DA2 plazmidlerini barındıran Agrobacterium tumefaciens GV3101

hücreleri enjekte edilerek daha önce tarif edildiği gibi (Voinnet ve ark., 2003) tranforme edildiler. Toplam protein, ekstraksiyon tamponuyla (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, %20 gliserol, %2 Triton X-100, 1mM EDTA, 1 x tam proteaz inhibitörü kokteyli (Roche) ve MG132 20ug/ml) ekstrakte edildi ve GFP-Trap-A (Chromotek) kullanılarak 4°C sıcaklıkta 1 saat süreyle inkübe edildi. Boncuklar, yıkama tamponuyla (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, %0,1 Triton X-100 ve 1 x tam proteaz inhibitörü kokteyli (Roche)) 3 kez yıkandılar. İmmünopresipitatlar, %10 SDS-poliakriamid jelinde ayrıldılar ve sırasıyla anti-GFP (Beyotime) ve anti-Myc (Abmart) antikoları kullanılarak Western blot analiziyle tespit edildiler.

1.9 Erişim numaraları

15

Bu patent başvurusunda bahsedilen Arabidopsis genleri için Arabidopsis Genome Initiative lokusu belirleyicileri aşağıdaki gibidir: At1g19270 (NP_173361.1 GI: 15221983) (DA1), At4g36860 (NP_195404.6 GI:240256211) (DAR1), Atlg78420 (NP_001185425.1 GI:334183988) (DA2), At1g17145 (NP_564016.1 GI:18394446) (DA2L) ve At3g63530 (NP_001030922.1 GI: 79316205) (EOD1/BB).

20

2. Sonuçlar

25

2.1 da2-1 mutanı büyük tohumlar vermektedir

Tohum büyüklüğünün ubikuitin aracılı kontrol mekanizmalarını daha

iyi anlayabilmek için, birden fazla mikrodizi çalışmasında Arabidopsis ovülleri ve/veya tohumlarında eksprese edilmiş bazı tahmini ubikuitin ligazı genlerinin genel kullanıma açık T-DNA insersiyon hatlarını topladık ve onların tohum büyüme fenotiplerini araştırdık. Buradan yola çıkarak değiştirilmiş tohum büyüklüğüne sahip birden fazla T-DNA insersiyon mutanını tanımladık. Bu mutantlardan birini, iri tohum büyüklüğü mutantlarının keşif sırasına atıf yaparak da2-1 olarak isimlendirdik (DA, Çince "büyük" anlamına gelmektedir). Vahşi tip tohumlarla kıyaslandığında, da2-1'le üretilen tohumlar daha büyük ve daha ağırdılar (Şekil 1A, 3C ve 3D). Vahşi tiptekilerle kıyaslandığında, da2-1'de meyve başına tohum sayısı ve bitki başına tohum verimi nispeten daha yüksekti (Şekil 1B ve 1C). Bunun aksine, vahşi tiptekilerle karşılaştırıldığında, da2-1'de beher bitki için toplam tohum sayısı anlamlı düzeyde artmış değildi (Şekil 1D). da2-1 bitkileri, olgun aşamadaki vahşi tip bitkilerden daha uzunlardı (Şekil 1E). Buna ek olarak, vahşi tip bitkilere kıyasla, da2-1 mutant bitkilerinde hem daha büyük çiçek ve yapraklar oluştuğu, hem de biyokütlenin arttığı görüldü (Şekil 2; Şekil 15). da2-1 mutant petal ve yaprak büyüklüklerinin artma sebebi hücrelerin daha büyük olması değildi (Şekil 15) ve bu da, sebebin daha yüksek petal ve yaprak hücresi sayısı olduğuna işaret etti.

2.2 DA2, tohum büyüklüğünü kontrol etmek için DA1 ile sinerjik olarak faaliyet gösterir, ancak bunu EOD1'den bağımsız yapar

25

da2-1 mutanını zayıf, ancak da1-1'e benzer bir tohum büyüklüğü fenotipi gösterdi (Li ve ark., 2008) ve bu da, DA1 ve DA2'nin ortak bir yolda işlev gördüklerine ilişkin bir gösterge sağladı. DA1 ve DA2

arasında genetik bir etkileşim olup olmadığını test etmek amacıyla, bir da1-1 da2-1 çift mutanını oluşturduk ve onun tohum büyüklüğünü tespit ettik. Her ne kadar da2-1 mutanını vahşi tipten nispeten daha büyük ve ağır tohumlara sahip olsa da (Şekil 1A, 3C ve 3D), da2-1 mutasyonu, da1-1'in tohum büyüklüğü ve ağırlık fenotiplerini sinerjik olarak artırdı (Şekil 3A ve 3C) ve bu da, DA1 ve DA2 arasında tohum büyüklüğü açısından sinerjik bir genetik etkileşim olduğunu ortaya koydu. Tohum büyüklüğünde gerçekleşen değişiklikler, embriyoların ve elde edilen fidelerin büyüklüklerine yansdı (Şekil 3B). Ayrıca, 10 günlük fidelerin kotiledon alanını da ölçtük. da1-1'in kotiledon büyüklüğünde da2-1 mutasyonu ile gerçekleşen sinerjik bir artış da gözlemlendi (Şekil 3B ve 4). da1-1 alleli tarafından kodlanan mutant protein, en yakın ilişkili aile üyesi olan DA1 ve bir DA1-ilişkili proteine (DAR1) karşı negatif bir aktiviteye sahipti (Li ve ark., 2008).

da1-ko1 ve dar1-1 tek mutantları belirgin bir tohum büyüklüğü fenotipi göstermezken, çift da1-ko1 dar1-1 T-DNA insersiyon mutantları da1-1 fenotipleri gösterdi (Li ve ark., 2008). da1-1 ve da2-1 tohum büyüklüğünü artırmak için sinerjik olarak faaliyet gösterdiği için, da1-ko1'in da2-1 fenotiplerini sinerjik olarak artırabileceği beklenebilir. Bunu test etmek amacıyla, da1-ko1 da2-1 çift mutanını oluşturduk. Şekil 3D'de de gösterildiği üzere, da1-ko1 mutasyonu, da2-1'in tohum büyüklüğü ve ağırlık fenotiplerini de sinerjik olarak artırdı. 10 günlük fidelerin kotiledon alanlarını da ölçtük. da1-ko1 mutasyonu, da2-1'in kotiledon büyüklüğü fenotipini sinerjik olarak artırdı (Şekil 4, sağ üst). Benzer şekilde, da1-ko1 mutasyonunun da2-1 petal büyüklüğünde sinerjik bir artışa sebep

olduğu da gözlemlendi (Şekil 16D). Bu sonuçlar, hem DA1 hem de DA2'nin eşzamanlı kesilmesinin sinerjik etkilerini de göstermektedir.

Embriyo hücrelerinin ve petal epidermal hücrelerin büyüklüklerini de ölçtük. Parental hatlarında yapılan ölçümlerle kıyaslandığında, da1-1 da2-1 ve da1-kol da2-1 çift mutantlarında hücre büyüklüğü artmadı (Şekil 4 sol alt; Şekil 16E) ve bu da, DA1 ve DA2'nin hücre proliferasyonu proseslerini sınırlamak için sinerjik olarak faaliyet gösterdiklerine ilişkin bir gösterge sundu.

10

da1-1 da2-1 çift mutanti, da1-kol da2-1 çift mutantlarından daha büyük tohumlara sahipti (Şekil 3C, 3D ve 4) ve bu da, da1-1 allelinin da1-kol'den daha kuvvetli fenotiplere sahip olduğunu belirten önceki raporumuzla tutarlıdır (Li ve ark.,2008). da1-1 tohumlarının büyüklükleri, da1-kol dar1-1 çift mutant tohumlarınıninkine benzerdi, çünkü da1-1 alleli, DA1 ve DAR1'e karşı negatif bir aktiviteye sahiptir (Şekil 4 sağ alt) (Li ve ark., 2008). Bundan dolayı, da1-1 da2-1 çift mutant tohumlarının büyüklüklerinin da1-kol dar1-1 da2-1 üçlü mutant tohumlarının büyüklüklerine benzer olabilecekleri beklenebilir. Bundan dolayı, bir da1-kol dar1-1 da2-1 üçlü mutanti oluşturduk ve tohum büyüklüğünü inceledik. Şekil 4'te de gösterildiği üzere, da1-kol dar1-1 da2-1 üçlü mutant tohumlarının büyüklükleri, da1-1 da2-1 çift mutant tohumlarınıninkiyile karşılaştırılabilir ve denk düzeydeydi, ancak da1-kol da2-1 çift mutant tohumlarınıninkinden büyüktü. Dolayısıyla, bu genetik analizler, da1-1 allelinin hem DA1 hem de DAR1 üzerinde negatif bir etkisi olduğunu daha da desteklemektedir (Li ve ark., 2008).

25

BIG BROTHER'a (BB) karşı allelik olan bir da1-1 artırıcıyı (EOD1) daha önce tanımlamıştık (Disch ve ark., 2006; Li ve ark., 2008). eod1 mutasyonları, da1-1'in tohum büyüklüğü fenotipini sinerjik olarak artırdı (Li ve ark., 2008). Benzer şekilde, da1-1 ve da1ko1, da2-1'in tohum büyüklüğü ve ağırlık fenotiplerini de sinerjik olarak artırdı (Şekil 3A, 3C ve 3D). Bundan dolayı, DA2 ve EOD1'in ortak bir yolda işlev görüp görmeyeceğini sorguladık. DA2 ve EOD1 arasında genetik ilişkiler olup olmadığını tespit etmek için, bir eod1-2 da2-1 çift mutantını analiz ettik. Parenteral hatlarıyla kıyaslandığında, eod1-2 ve da2-1 arasındaki genetik etkileşim, aslında, hem tohum ağırlığına, hem de petal büyüklüğüne katkıda bulundu (Şekil 16) ve bu da, DA2'nin tohum ve organ büyümesini EOD1'den bağımsız olarak etkileyecek şekilde işlev gördüğüne ilişkin bir gösterge sundu.

2.3 DA2, tohum büyüklüğünü etkilemek için maternal olarak faaliyet gösterir

Maternal ve/veya zigotik dokuların rohumların büyüklüklerini etkilediğini göz önünde bulundurarak DA2'nin maternal veya zigotik olarak işlev görüp görmediğini sorguladık. Bunu test etmek için, vahşi tip ve da2-1 arasında karşılıklı çapraz deneyler yaptık. Şekil 6'da da gösterildiği üzere, da2-1'in tohum büyüklüğü üzerindeki etkisi, ancak ve sadece maternal bitkiler da2-1 mutasyonu için homozigot olduklarında gözlemlendi. Polen donörünün genotipine bakılmaksızın, maternal da2-1 bitkilerinin ürettikleri tohumlar, maternal vahşi tip bitkilerin ürettiklerinden tutarlı şekilde daha büyüklerdi. Bu sonuç, da2-1'in tohum büyüklüğünü etkilemek için maternal olarak faaliyet gösterebildiğini göstermektedir. DA1'in de tohum büyüklüğünü

kontrol etmek için maternal olarak işlev gördüğünü daha önce göstermiştik (Li ve ark. 2008). da1-ko1 mutasyonu da2-1'in tohum büyüklüğü fenotipini sinerjik olarak artırdığı için (Şekil 3D), vahşi tip ve da1-ko1 da2-1 çift mutanti arasında da karşılıklı çapraz deneyler yaptık. Benzer şekilde, da1-ko1 da2-1'in tohum büyüklüğü üzerindeki etkisi, ancak ve sadece da1-ko1 da2-1 maternal bitki olarak hareket ettiğinde gözlemlendi (Şekil 6).

da1-ko1/+ da2-1/+ bitkilerinin, da1-ko1 da2-1 çift mutant poleniyle çiftleştirilmesi, da1-ko1/+ da2-1/+ tohum zarfları içerisinde da1-ko1 da2-1, da1ko1/da1-ko1 da2-1/+, da1-ko1/+ da2-1da2-1 ve da1-ko1/+ da2-1/+ embriyolarının oluşmasına yol açmaktadır. da1-ko1 da2-1 çift mutant poleniyle fertilize edilen ve da1-ko1 ve da2-1 mutasyonlarıyla genotiplenen da1-ko1/+ da2-1/+ bitkilerinden alınmış münferit tohumların büyüklüklerini de ölçtük. Elde ettiğimiz sonuçlar, da1-ko1 ve da2-1 mutasyonlarının bu tohumların büyüklüklerindeki varyasyonla ilişkilendirilmediğini göstermektedir (Şekil 6). Bu analizler birlikte DA1 ve DA2 için embriyo ve endosperm genotiplerinin tohum büyüklüğünü etkilemediklerini ve ayrıca, tohum büyümesini kontrol etmek için ana bitkinin sporofitik dokusunda DA1 ve DA2 olması gerektiğini göstermektedirler.

2.4 DA2, maternal integumentlerde hücre proliferasyonunu etkilemek için DA1 ile sinerjik olarak faaliyet gösterir

25

Karşılıklı çapraz deneyler, DA1 ve DA2'nin tohum büyüklüğünü tespit etmek için maternal olarak işlev gördüklerini gösterdi (Şekil 6) (Li ve ark., 2008). Ovülü saran integumentler maternal dokulardır ve

fertilizasyondan sonra tohumun büyümesini fiziksel olarak kısıtlayabilen tohum zarfını oluştururlar. Birtakım çalışmalar, ovüllerin integument büyüklüğünün tohum büyüklüğünü belirlediğini göstermiştir (Schruff ve ark., 2006; Adamski ve ark., 2009). Bundan dolayı, DA1 ve DA2'nin tohum büyüklüğünü kontrol etmek için maternal integumentler aracılığıyla faaliyet gösterip göstermediklerini sorguladık. Bunu test etmek için, emaskülasyondan sonra 2. günde vahşi tip, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1'den alınan olgun ovülleri inceledik. da1-1 ovüllerinin büyüklükleri, vahşi tip ovüllerinkinden dramatik olarak daha fazlaydı (Şekil 5 ve 7) ve bu da, önceki bulgularımızla tutarlıydı (Li ve ark., 2008).

da2-1 ovülleri de vahşi tip ovüllerden daha büyüktü (Şekil 5 ve 7). da2-1 mutasyonu, da1-1'in ovül büyüklüğü fenotipini sinerjik olarak artırdı ve bu da, tohum büyüklüğündeki sinerjik etkileşimleriyle tutarlıydı.

6 DAP ve 8 DAP'de, vahşi tip, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1'de gelişmekte olan tohumların dış integument hücre sayısını araştırdık. Vahşi tip tohumlarda, 6 DAP'de dış integument hücrelerinin sayısı, 8 DAP'deki sayıya benzerdi (Şekil 7 orta panel) ve bu da, 6 DAP'de vahşi tip tohumların dış integumentlerindeki hücrelerin bölünmeye tamamen son verdiklerini gösterdi. Benzer şekilde, 6 DAP'de, da11, da2-1 ve da1-1 da2-1 tohumlarının dış integumentlerindeki hücreler, hücre proliferasyonunu tamamen durdurdular. da1-1 ve da2-1 tohumlarındaki dış integument hücrelerinin sayısı, vahşi tip tohumlarinkine kıyasla anlamlı düzeyde arttı (Şekil 7). da2-1 mutasyonu, da1-1'in dış integument hücre sayısını sinerjik olarak

artırdı. Vahşi tip, da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1 tohumların tozlaşmadan sonra 6. ve 8. günlerde dış integument hücre boyunu da araştırdık. da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1 dış integumentlerinde yer alan hücreler, vahşi tip dış integumentlerinkinden anlamlı düzeyde daha 5 kısıydılar (Şekil 7 sağ panel) ve bu da, integumentlerde hücre proliferasyonu ve hücre genişlemesi arasında bir dengeleme mekanizması olduğuna ilişkin gösterge sundu. Dolayısıyla, bu sonuçlar, DA2'nin maternal integumentlerde hücre proliferasyonunu kısıtlamak için DA1 ile sinerjik olarak sinerjik olarak hareket ettiğini 10 göstermektedirler.

2.5 DA2 bir fonksiyonel E3 ubikuitin ligazı kodlar

At1g78420 geninin yedinci eksonunda, T-DNA insersiyonuyla da2-1 15 mutasyonu tanımlandı (Şekil 8A). T-DNA insersiyon yeri, T-DNA spesifik ve komşu primerleri kullanılarak ve PCR ürünleri sekanslanarak PCR ile bir kez daha teyit edildi. At1g78420'nin tam boy mRNA'sı, da2-1 mutantında yarı kantitatif RT-PCR kullanılarak tespit edilemedi. da2-1 bitkilerinde, kendi promotorunun kontrolü 20 altında At1g78420 CDS eksprese ettik ve 62 transgenik bitki izole ettik. Hemen hemen tüm transgenik hatlar, da2-1 fenotiplerinin tamamlandığını gösterdi (Şekil 10) ve bu da, At1g78420'nin DA2 geni olduğuna işaret etti.

25 DA2 fonksiyonunu, özellikle de fonksiyon fenotiplerinin kazanımını da karakterize etmek amacıyla, vahşi tip bitkilerde CaMV 35S promotorunun kontrolü altında DA2'nin kodlama bölgesini eksprese ettik ve 77 transgenik bitki izole ettik. DA2'nin gereğinden fazla

eksprese edilmesi tohum büyüklüğünde, beher bitki için tohum veriminde ve beher bitki için tohum sayısında azalmaya sebep oldu (Şekil 1A, 1C ve 1D). Buna ek olarak, vahşi tiple kıyaslandığında, DA2'yi gereğinden fazla eksprese eden çoğu transgenik bitkinin çiçek ve yaprakları küçüktü, meyve ve bitki boyları kısaydı ve ayrıca, biyokütleleri de düşmüştü (Şekil IE, 2 ve 15). Bu sonuçlar, DA2'nin tohum ve organ büyümesini sınırlamadaki rolünü de desteklemektedir.

10 DA2 geninin, bir tahmini RING domaini içeren bir 402 amino asitli protein (59-101) kodladığı tahmin edilmektedir (Şekil 8B; Tablo 1). DA2'nin E3 ubiquitin ligazı aktivitesine sahip olup olmadığını araştırmak amacıyla, maltoz bağlama proteini (MBP) kullanarak bir füzyon proteini olarak *Escherichia coli* içerisinde DA2 eksprese ettik ve MBP-DA2 proteinini çözünebilir fraksiyonlardan saflaştırdık. Bir E1 ubiquitin aktive edici enzim, bir E2 konjüge edici enzim, His-ubiquitin ve MBP-DA2 mevcudiyetinde, bir anti-His antikoru kullanılarak yapılan Western blotlamayla bir poliubikuitinasyon sinyali gözlemlendi (Şekil 9, soldan beşinci şerit). Anti-MBP blot analizi de, MBP-DA2'nin ubiquitinlendiğini gösterdi (Şekil 9, soldan beşinci şerit). Bununla birlikte, E1, E2, His-ubiquitin veya MBP-DA2'den herhangi birinin yokluğunda, hiçbir poliubikuitinasyon tespit edilmedi (Şekil 9, soldan birinci ilâ dördüncü şeritler) ve bu da, DA2'nin fonksiyonel bir E3 ubiquitin ligazı olduğunu gösterdi. RING motifi, RING parmak proteinlerinin E3 ubiquitin ligazı aktivitesi için gereklidir (Xie ve ark., 2002). Bundan dolayı, DA2 E3 ligazı aktivitesi için bir intakt RING parmak domaini gerekip gerekmediğini test ettik. Sistein-59'u Serine (C59S) mutajenize etmek suretiyle tek bir amino

asit sübstitüsyon alleli üretildi, çünkü bu mutasyonun RING domainini sekteye uğrattığı tahmin edilmekteydi (Tablo 1 ve 2). Bir in vitro ubikuitinasyon eseyi, DA2'nin C59S mutantında E3 ligazı aktivitesinin ortadan kaldırıldığını gösterdi (Şekil 9, soldan altıncı

 5 şerit) ve bu da, DA2 E3 ubikuitin ligazı aktivitesi için bir intakt RING domaini gerektiğine işaret etti. Ayrıca, vahşi tip Col-0 bitkilerinde DA2 C59S(35S:DA2C59S)'yi gereğinden fazla eksprese ettik ve 69 transgenik bitki izole ettik. Transgenik bitkilerde DA2 C59S ekspresyon seviyeleri yüksek olmasına rağmen, transgenik bitkilerin

 10 tohum büyüklükleri, vahşi tip bitkilerin büyüklükleriyle karşılaştırılabilir ve denk düzeydeydi ve bu da, DA2 C59S mutasyonunun tohum büyümesinde DA2 fonksiyonunu etkilediğine işaret etti.

15 Arabidopsis'te, üç adet RING tipi, yani RING-H2, RING-HCa ve RING-HCb ve ayrıca, beş adet modifiye edilmiş RING tipi, yani RING-C2, RING-v, RING-D, RING-S/T ve RING-G tanımlanmıştır (Stone ve ark., 2005). Pirinç GW2'de bulunan yeni bir RING domaini tipi (C5HC2) teklif edilmiştir (Song ve ark., 2007). DA2'nin tahmin

 20 edilen RING domaininde yer alan sisteinlerin aralayıcısı pirinç GW2'nin RING domainine (C5HC2) benzer olsa da, DA2'nin RING domaininde bir asparajin artığıyla (Asn-91) ikame edilen bir korunmuş histidin artığı yoktu (Tablo 1 ve 2). Bu amino asit sübstitüsyonu, örneğin soya fasulyesi ve kolza tohumu gibi çift

 25 çenekli bitkilerde DA2 homologlarının tahmini RING domaininde de gözlemlendi (Tablo 1). Bundan dolayı, bu asparajin artığının (Asn-91) kendi E3 ubikuitin ligazı aktivitesi için çok önemli olup olmadığını sorguladık. Asn-91'i Lösine (N91L) mutajenize etmek suretiyle bir

tek amino asit sübstütüsyonu alleli üretildi. Bir in vitro ubikuitinasyon
 eseyi, DA2'nin N91L mutantının E3 ligazı aktivitesine sahip
 olduğunu gösterdi (Şekil 9, soldan yedinci şerit) ve bu da, DA2 E3
 ligazı aktivitesi için Asn-91'in gerekli olmayabileceğine işaret etti. Bu
 5 sonuçlar, DA2'nin RING domaininin GW2'de bulunan bir varyantı
 olabileceğini iddia etmektedir. Ayrıca, vahşi tip bitkilerde DA2
 N91L(35S:DA2N91L)'yi gereğinden fazla eksprese ettik ve 26
 transgenik bitki izole ettik. Transgenik bitkilerin tohumları, vahşi tip
 tohumlardan daha küçüktü ve bu da, DA2 N91L'nin tohumun
 10 büyümesini kısıtlayabileceğini akla getirdi.

2.6 Arabidopsis DA2 Homologları

Kolza tohumu, soya fasulyesi, pirinç, mısır ve arpa da dâhil olmak
 15 üzere, Arabidopsis ve tahıl bitkilerinde, DA2 ile RING domaini
 dışında anlamlı düzeyde homoloji paylaşan proteinler bulunmaktadır
 (Tablo 2). Arabidopsis'te bulunan bir tahmini protein ve DA2 arasında
 kapsamlı bir amino asit benzerliği vardır ve bu protein DA2 benzeri
 protein (DA2L; At1g17145) olarak adlandırılmaktadır. Tıpkı
 20 35S:DA2 bitkileri gibi, DA2L'yi gereğinden fazla eksprese eden
 hatlarda küçük bitki ve organlar görüldü (Şekil 18) ve bu da, DA2 ve
 DA2L'nin benzer fonksiyonlara sahip olduğuna ilişkin bir gösterge
 sundu. Diğer bitki türlerindeki benzer proteinler ve DA2 arasında
 %39,2-%84,5 oranında amino asit sekansı özdeşliği vardı (Tablo 2).
 25 Brassica napus'ta bulunan homolog, DA2 ile en yüksek oranda amino
 asit sekansı özdeşliğine (%84,5) sahipti (Tablo 2). Pirinç GW2 ve
 Arabidopsis DA2 arasındaki amino asit sekansı özdeşlikleri %43,1
 oranındaydı (Tablo 2). GW2'nin gereğinden fazla eksprese edilmesi

pirinçte dane genişliğini düşürdüğü için (Song ve ark., 2007), DA2 ve GW2'nin tohum büyüklüğü kontrolü konusunda benzer fonksiyon gösterip göstermediğini sorduk. Bundan dolayı, vahşi tip bitkilerde GW2'yi gereğinden fazla eksprese ettik. Tıpkı 35S:DA2 ve 35S:DA2L transgenik hatlarında olduğu gibi, GW2'yi gereğinden fazla eksprese eden Arabidopsis transgenik bitkilerinin tohum ve organları vahşi tip bitkilerden daha küçüktü ve bu da, tohum ve organ büyümesi kontrolünde Arabidopsis DA2 ve pirinç GW2 için korunmuş fonksiyona işaret etti.

10

2.7 DA2 ve DA1 benzer ekspresyon paternleri gösterir

DA2'nin ekspresyon paternini tespit etmek amacıyla, köklerden, saplardan, yapraklardan, fidelerden ve çiçek kümelerinden alınan RNA'lar kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR analiziyle analiz edildiler. Test edilen tüm bitki organlarında DA2 mRNA tespit edildi (Şekil 11A). DA2'nin doku spesifik ekspresyon paternleri, bir DA2 promotor:GUS füzyonu (pDA2:GUS) içeren transgenik bitkilerin GUS aktivitesi için histokimyasal esey kullanılarak incelendiler. Köklerde, kotiledonlarda, yapraklarda ve çiçek kümelerinde GUS aktivitesi tespit edildi (Şekil 11B ve 11C). Yaprak primordiumlarında ve köklerde nispeten yüksek GUS aktivitesi tespit edildi (Şekil 11B ve 11C). Çiçeklerde, yaşlı floral organlara kıyasla genç floral organlarda nispeten daha kuvvetli DA2 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 11D-11L). Benzer şekilde, yaşlı ovüllere kıyasla, genç ovüllerde daha yüksek GUS aktivitesi tespit edildi (Şekil 11M ve 11N). Bu da, DA2 ekspresyonunun geçici ve mekansal olarak regüle edildiğini göstermektedir.

25

2.8 DA1 DA2 ile in vitro ve in vivo ortamda etkileşime girer

Yaptığımız genetik analizler, DA1'in tohum ve organ büyümesini kısıtlamak için DA2 ile birlikte sinerjik olarak hareket ettiğini göstermektedirler. Bundan dolayı, bir in vitro etkileşim/pull-down deneyi kullanarak DA1'in E3 ubiquitin ligazı DA2 ile etkileşime geçip geçmediğini değerlendirdik. DA1 bir GST füzyon proteini olarak eksprese edilirken, DA2 bir MBP füzyon proteini olarak eksprese edilmektedir. Şekil 12'de de gösterildiği üzere (soldan birinci ve ikinci şeritler), GST-DA1, MBP-DA2'ye bağlıyken, GST-DA1, bir negatif kontrole (MBP) bağlı değildir. Bu sonuç, DA1'in in vitro ortamda DA2 ile fiziksel olarak etkileşime geçtiğine işaret etmektedir.

DA1; iki ubiquitin etkileşim motifi (UIM), bir tek LIM domaini ve son derece korunmuş C-terminal bölgesi içermektedir (Şekil 13) (Li ve ark., 2008). Ayrıca, DA1 ve DA2 arasındaki etkileşim için hangi DA1 domaininin gerekli olduğunu da sorguladık. Escherichia coli içerisinde, spesifik protein domainlerini içeren bir dizi DA1 türevi eksprese edildi: yalnızca iki UIM domaini içeren DA1-UIM, yalnızca LIM domaini içeren DA1-LIM, yalnızca LIM domaini ve C-terminal bölgesini içeren DA1-LIM+C ve ayrıca, yalnızca C-terminal bölgesini içeren DA1-C, GST füzyon proteinleri olarak eksprese edildiler (Şekil 13).

DA2, bir MBP füzyon proteini olarak eksprese edildi ve pull-down deneylerde kullanıldı. Şekil 12'de de gösterildiği üzere, GST-DA1-LIM+C ve GST-DA1-C, MBP-DA2 ile etkileşime girdi, ancak GST-DA1-UIM ve GST-DA1-LIM, MBP-DA2'ye bağlanmadı. Bu sonuç,

DA1'in korunmuş C-terminal bölgesinin DA2 ile etkileşime geçtiğine işaret etmektedir.

da1-1 allelinin kodladığı mutant proteinin (DA1R358K) C-terminal
 5 bölgesinde bir mutasyona sahip olduğunu göz önünde bulundurarak
 (Şekil 13) (Li ve ark., 2008), DA1R358K mutasyonunun DA2 ile
 etkileşimleri etkileyip etkilemediğini sorguladık. MBP-DA2 ile pull-
 down deneylerde bir GST-DA1R358K füzyon proteini kullanarak,
 DA1R358K'de bulunan mutasyonun DA1 ve DA2 arasındaki
 10 etkileşimi etkilemediğini gösterdik (Şekil 12, soldan üçüncü şerit).

Bitkilerde DA1 ve DA2 arasındaki muhtemel ilişkiyi daha detaylı
 araştırmak amacıyla, onların in vivo etkileşimlerini tespit etmek için
 eş-immüno-çökeltme analizini kullandık. *Nicotiana*
 15 *benthamiana* yapraklarında kısa bir süre için eşzamanlı 35S:Myc-
 DA1 ve 35S:GFP-DA2 ekspresyonu yaptık. *Nicotiana*
benthamiana yapraklarında kısa süreli 35S:GFP ve 35S:Myc-DA1 eş-
 ekspresyonu bir negatif kontrol olarak kullanıldı. GFP-DA2 ve
 GFP'yi immüno-çökeltmek için, toplam proteinler izole edildi ve
 20 ayrıca, GFP-Trap-A agaroz boncuklarıyla inkübe edildi. Çökeltiler,
 sırasıyla anti-GFP ve anti-Myc antikoru kullanılarak tespit edildiler.
 Şekil 14'te de gösterildiği üzere, Myc-DA1, immüno-çökeltilmiş
 GFP-DA2 kompleksinde tespit edilirken, negatif kontrolde (GFP)
 tespit edilmedi ve bu da, bitkilerde DA1 ve DA2 arasında fiziksel bir
 25 ilişki olduğuna işaret etti. Pull-down eseyinde DA1'in C-terminal
 bölgesi DA2 ile etkileşime geçtiği için (Şekil 12), bitkilerde DA1'in
 C-terminal bölgesinin DA2 ile etkileşime geçip geçmediğini de
 sorguladık. Eş-immüno-çökeltme analizi DA1'in C-terminal

bölgesinin (Myc-DA1-C) GFP-DA2 kompleksinde tespit edildiğini, ancak negatif kontrolde (PEX10-GFP, bir RING-tipi E3 ubiquitin ligazı) tespit edilmediğini gösterdi (Platta ve ark., 2009; Kaur ve ark., 2013). Dolayısıyla, bu sonuçlar DA2 ile in vitro ve in vivo ortamda etkileşim için DA1'in C-terminal bölgesine ihtiyaç duyulduğuna işaret etmektedir.

Damarlı bitkilerde tohum büyüklüğü evrimsel uyum için önemli bir belirleyici faktördür ve ayrıca, tahıl evcilleştirmede önemli bir agronomik özelliktir (Gomez, 2004; Orsi ve Tanksley, 2009). Tohum büyüklüğünü kontrol etmek için maternal hareket eden birtakım faktörler, örneğin ARF2/MNT, AP2, KLU/CYP78A5, EOD3/CYP78A6 ve DA1 tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bu faktörlerin tohum büyüklüğü kontrolündeki genetik ve moleküler mekanizmaları hemen hemen hiç bilinmemektedir. Ubiquitin reseptörü DA1'in tohum büyüklüğünü kontrol etmek için E3 ubiquitin ligazı EOD1/BB ile birlikte sinerjik olarak hareket ettiğini daha önce gösterdik (Li ve ark., 2008).

Bu çalışmada, Arabidopsis DA2'yi tohum büyüklüğü kontrolüne katılan başka bir RING E3 ubiquitin ligazı olarak tanımladık. Genetik analizler, DA2'nin nihai tohum büyüklüğünü kontrol etmek için DA1 ile birlikte sinerjik olarak çalıştığını, ancak bunu E3 ubiquitin ligazı EOD1'den bağımsız olarak yaptığını göstermektedirler. DA1'in DA2 ile fiziksel olarak etkileşime geçtiğini de ortaya çıkardık. Elde ettiğimiz sonuçlar, Arabidopsis'te nihai tohum büyüklüğünü kontrol eden ve DA1, DA2 ve EOD1'i içeren bir ubiquitin temelli sistemi tanımlamaktadırlar.

2.9 DA2, tohum büyüklüğünü kontrol etmek için maternal olarak hareket eder

da2-1 fonksiyon kaybı mutanti tohum ve organların büyük olmasını
 5 sağlarken, DA2'yi gereğinden fazla eksprese eden bitkiler küçük
 tohum ve organlar verdiler (Şekil 1A) ve bu da, DA2'nin tohum ve
 organ büyüklüğü kontrolü için negatif bir faktör olduğuna işaret etti.
 DA2'nin tohum ve organ büyümesini nasıl kontrol ettiği konusunda
 hiçbir şey bilinmemesine rağmen, Arabidopsis DA2'nin yakın
 10 zamanda organ büyümesi için bir pozitif regülatör olarak teklif
 edilmiş olması şaşırtıcıdır (Van Daele ve ark., 2012). Bu çalışmada,
 DA2'nin tohum ve organ büyümesi kontrolü için negatif bir faktör
 olarak faaliyet gösterdiğini kanıtlayacak yeterli delile sahibiz. da2-1
 fonksiyon kaybı mutanti, tohum ve organların büyük olmasını sağladı
 15 (Şekil 1 ilâ 4). da2-1 mutasyonunun da1-1 ve da1-ko1 tohum ve organ
 büyüklüğü fenotiplerini sinerjik olarak artırması da bunu
 desteklemektedir (Şekil 1 ilâ 4). da2-1 mutasyonu, eod1-2 tohum ve
 organ büyüklüğü fenotiplerini de artırdı ve bu da, da2-
 1 mutasyonunun tohum ve organ büyümesini desteklediğini bir kez
 20 daha gösterdi. da2-1 mutanti, integumentlerde daha fazla hücre
 barındıran büyük ovüller oluşmasını sağladı ve ayrıca, da2-
 1 mutasyonu da1-1 ovül büyüklüğü fenotipini sinerjik olarak artırdı
 (Şekil 6).

25 Buna ek olarak, DA2 and DA2L'yi gereğinden fazla eksprese eden
 çoğu transgenik bitki, vahşi tip bitkilerden daha küçüktü (Şekil 2;
 Şekil S9). Bu transgenik bitkilerin organ büyüme fenotipleri, kendi
 ilgili ekspresyon seviyeleriyle ilişkiliydi (Şekil S4 ve S9). Bundan

dolayı, verilerimiz DA2'nin tohum ve organ büyüklüğü için bir negatif regülatör olarak işlev gördüğünü açıkça göstermektedirler. Büyük organlara sahip birtakım Arabidopsis mutantları da büyük tohumlar geliştirdi (Krizek, 1999; Mizukami ve Fischer, 2000; Schruff ve ark., 2006; Li ve ark., 2008; Adamski ve ark., 2009) ve bu da, organ büyüklüğü ve tohum büyümesi arasında muhtemel bir bağ olduğunu ortaya koydu. Bunun aksine, büyük organlara sahip birtakım diğer mutantlarda, normal büyüklükte tohumlar görüldü (Hu ve ark., 2003; White, 2006; Xu ve Li, 2011) ve bu da, organ ve tohum büyüklüğünün her durumda pozitif ilişkili olmadığına işaret etti. Bu sonuçlar, tohum ve organların kendi ilgili büyüklüklerini kontrol edecek hem ortak hem de ayrı yolları olduğunu ortaya koymaktadırlar.

15 Karşılıklı çapraz deneyler, DA2'nin tohum büyümesini etkilemek için maternal olarak hareket ettiğini ve ayrıca, DA2 için embriyo ve endosperm genotiplerinin tohum büyüklüğünü etkilemediğini gösterdi (Şekil 6). Ovülü saran integumentler, maternal dokulardır ve fertilizasyondan sonra tohum zarfını oluştururlar. Örneğin *arf2*, *da1-1* ve *klu* ovüllerinde görülenler gibi maternal integument büyüklüğündeki değişikliklerin tohum büyüklüğündeki değişikliklere katkıda buldukları bilinmektedir (Schruff ve ark., 2006; Li ve ark., 2008; Adamski ve ark., 2009). Olgun *da2-1* ovülleri, olgun vahşi tip ovüllerden daha büyüklere (Şekil 5 ve 7). *da2-1* mutasyonu, *da1-1* ovüllerinin integument büyüklüğünü de sinerjik olarak artırdı. Dolayısıyla, maternal integument büyüklüğünü kontrol etmenin, nihai tohum büyüklüğünü belirlemeye yönelik kilit mekanizmalardan biri olduğu bu çalışmalardan elde edilen genel bir anafikirdir. Bugüne

kadar izole edilen tohum büyüklüğü kontrolü bitki maternal faktörlerinin (örneğin KLU, ARF2 ve DA1) integument büyüklüğünü etkilemesi de bu düşünceyle tutarlıdır (Schruff ve ark., 2006; Li ve ark., 2008; Adamski ve ark., 2009).

5

İntegument veya tohum zarfı büyüklüğü, koordine iki prosesle, yani hücre proliferasyonu ve hücre genişlemesiyle tespit edilir. Olgun ovüllerin integumentlerinde bulunan hücre sayısı, fertilizasyondan sonra tohum zarfı büyüme potansiyelini belirler.

10

Örneğin, arf2 mutantları daha fazla hücre barındıran büyük ovüller oluşturdu ve bu, büyük tohumlara yol açtı (Schruff ve ark. 2006); öte yandan, klu mutantları daha az hücre barındıran küçük ovüllere sahipti ve bu, küçük tohumlarla sonuçlandı (Adamski ve ark., 2009). Elde ettiğimiz sonuçlar, hem da1-1 ve da2-1 tohumlarının

15

integumentlerinde vahşi tip tohumlarından daha fazla hücre bulunduğunu, hem de da1-1 ve da2-1'in integumentlerde hücre proliferasyonunu desteklemek için sinerjik olarak hareket ettiklerini göstermektedirler. da1-1, da2-1 ve da1-1 da2-1 tohumlarının dış

20

integumentlerdekilere göre daha kısa olduklarını da gözlemledik; bu da, maternal integumentte hücre proliferasyonu ve hücre elongasyonu arasında muhtemel bir dengeleme mekanizması olduğunu akla getirdi.

Dolayısıyla, tohum büyümesi üzerinde fiziksel bir kısıt olarak hareket eden maternal integument veya tohum zarfının nihai tohum büyüklüğü

25

için bir üst limit belirleyebilmesi muhtemeldir.

2.10 Tohum büyüklüğünün ubiquitin aracılı kontrolü için genetik bir çerçeve

DA2, daha önce tarif edilen bitki RING domainlerinin herhangi birinden farklı bir tahmini RING domainine sahip bir protein kodlar. DA2'nin RING domaini, pirinç GW2'ninkiyle (C5HC2) en yüksek oranda homoloji paylaşan domaini, ancak bir asparajın artığıyla ikame edilmiş bir korunmuş metal ligand amino asit (bir histidin artığı) içermiyordu (Song ve ark., 2007). DA2'nin RING domaininin GW2'de bulunanın bir varyantı olması hâlâ mümkündür. E3 ubikuitin ligazlarında, müteakip proteazomal degradasyon için genelde onları hedef alan birçok RING tipi domain bulunmaktadır (Smalle ve Vierstra, 2004). Rekombinant DA2'nin E3 aktivitesini bir in vitro ubikuitin-ligaz eseyinde test ettik ve DA2'nin bir fonksiyonel E3 ubikuitin ligazı olduğunu gösterdik; bu da, DA2'nin 26S proteazom aracılığıyla ubikuitin-bağımlı degradasyon için hücre proliferasyonunun pozitif regülatörlerini hedef alabildiğini akla getirdi. Arabidopsis'te ve diğer bitki türlerinde, DA2 ile RING domaini dışında homoloji paylaşan proteinler bulunmaktadır. Arabidopsis'te, DA2 benzeri protein (DA2L), DA2 ile kapsamlı bir amino asit benzerliğine sahiptir. Tıpkı 35S:DA2 bitkileri gibi, DA2L'yi gereğinden fazla eksprese eden hatlarda da küçük bitkiler görüldü (Şekil 18) ve bu da, DA2 ve DA2L'nin benzer işlev görebileceklerine işaret etti. Pirinçte DA2 homologu, tohum büyüklüğü için bir negatif regülatör olarak hareket ettiği bilinen RING tipi (C5HC2) protein GW2'dir (Song ve ark., 2007). Bununla birlikte, pirinçte, GW2'nin tohum büyüklüğü kontrolündeki genetik ve moleküler mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemektedir.

Ubikuitin bağlama aktivitesine sahip bir ubikuitin reseptörü olan DA1'i, daha önce, tohum büyüklüğü için bir negatif regülatör olarak

tanımladık (Li ve ark., 2008). Modifiye edici bir incelemede, E3
 ubikuitin ligazı BB'ye allelik olan (Disch ve ark., 2006) bir da1-
 1 artırıcısı (EOD1) tanımlandı (Li ve ark., 2008). Çift eod1-2 da1-
 1 mutantlarına ilişkin analiz, DA1 ve EOD2 arasındaki sinerjik genetik
 5 etkileşimleri ortaya çıkardı (Li ve ark., 2008) ve bu da, onların ortak
 bir hedef(ler)in aktivitesini modüle etmek suretiyle tohum büyümesini
 kontrol edebileceklerini akla getirdi. Her ne kadar da1-1 ve eod1-
 2 arasındaki genetik etkileşimler tohum ve organ büyüklüğünü de
 sinerjik olarak artırmış olsalar da, yaptığımız genetik analizler,
 10 DA2'nin tohum büyümesini etkilemek için EOD1'den bağımsız
 hareket ettiğini göstermektedirler ve bu da, DA2 ve EOD1'in, DA1
 yoluyla ortak regülasyonla birlikte degradasyon için farklı büyüme
 stimülatörlerini hedef alabileceklerini akla getirmektedir. Dolayısıyla,
 elde ettiğimiz bulgular, tohum ve organ büyüklüğünün üç adet
 15 ubikuitin ilişkili proteinle, yani DA1, DA2 ve EOD1 ile kontrol
 edilmesine ilişkin bir çerçeve oluşturmaktadırlar. Buna ek olarak,
 GW2'nin gereğinden fazla eksprese edilmesinin, Arabidopsis'te
 tohum ve organ büyümesini sınırladığını gözlemledik; bu da,
 Arabidopsis ve pirinçte muhtemel bir korunmuş fonksiyon
 20 bulunabileceğine ilişkin gösterge sunmaktadır. DA1 ve EOD1'in
 GW2 ve pirinç homologlarından oluşan kombinasyonun pirinçte dane
 büyüklüğü üzerindeki etkilerini araştırmak ilginç olabilirdi.

2.11 Tohum büyüklüğü kontrolünde DA1 ve DA2'nin muhtemel 25 bir moleküler mekanizması

Elde ettiğimiz sonuçlar, E3 ubikuitin ligazı DA2'nin, ubikuitin
 reseptörü DA1 ile in vitro ve in vivo ortamda etkileşime girdiğini

göstermektedirler (Şekil 12-14). Bununla birlikte, DA2'nin proteazomal degradasyon için DA1'i hedef alması muhtemel değildir, çünkü DA1 geninin bir T-DNA sokulmuş mutanlığı (da1-ko1) da2-1'in tohum büyüklüğü fenotipini sinerjik olarak artırmaktadır (Şekil 3 ve 4). Bununla birlikte, birçok başka ubiquitin modifikasyonu tipi, proteinleri proteazomdan bağımsız bir şekilde regüle etmektedir (Schnell ve Hicke, 2003). Örneğin, monoubikuitinasyon, sinyalleme proteinlerinin, endositozun ve histon modifikasyonunun aktive edilmesine katkı yapmaktadır (Schnell ve Hicke, 2003). Hayvanlarda, ubiquitin reseptörü eps15'in monoubikuitinasyonu, E3 ligazlarının eps15 ve Nedd4 ailesi arasındaki etkileşime bağlıdır (Woelk ve ark., 2006). Bunun aksine, ubiquitin reseptörlerinin bir E3-bağımsız monoubikuitinasyonu da rapor edilmiştir (Hoeller ve ark., 2007). DA1'in DA2 ile etkileşime geçtiğini göz önünde bulundurarak, DA2'nin DA1'i ubiquitinleyip ubiquitinleyemeyeceğini ya da monoubikuitinleyip monoubikuitinleyemeyeceğini test ettik. E1, E2 ve ubiquitin mevcudiyetinde, DA2-His, bir E3 ubiquitin ligazı aktivitesine sahipti. Bununla birlikte, E1, E2, ubiquitin ve DA2-His (E3) mevcudiyetinde, reaksiyon koşullarımız altında hiçbir ubiquitinlenmiş DA1-HA tespit edilmedi. Ubiquitin reseptörleri, UIM domainleri yoluyla E3'lerin poliubikuitinlenmiş substratlarıyla etkileşime geçebilirler ve proteazomla kendi degradasyonlarını kolaylaştırabilirler (Verma ve ark., 2004). DA1'in UIM domainlerinin ubiquitin bağlayabildiklerini daha önce gösterdik (Li ve ark., 2008).

25

DA1, kendi C-terminal bölgesi aracılığıyla DA2 ile girdiği etkileşimle birlikte ele alındığında (Şekil 12 ve 14), DA2'nin ubiquitinlenmiş substratlarının proteazomla degradasyonuna aracılık etmede rol

oynayabilir. Mekanizmalardan biri DA1'in DA2 ile etkileşime girmesini içerebilir ve bu da, DA1'in DA2'nin ubiquitinlenmiş sübstrat(lar)ını spesifik olarak tanımasına yardımcı olur. DA1, daha sonra, UIM domaini aracılığıyla ubiquitinlenmiş sübstrat(lar)ın poliubikuitin zincirlerini bağlayabilir ve ubiquitinlenmiş sübstrat(lar)ın degradasyonuna aracılık edebilir. Tohum verimini iyileştirmek dünya genelinde tahıl üreticileri için önemli bir hedeftir ve tohumların büyüklüğü, genel tohum veriminin önemli bir bileşenidir. DA2'yi, tohum büyüklüğünü etkilemek için DA1'le sinerjik olarak işlev gören önemli bir tohum büyüklüğü regülatörü olarak tanımladık.

DA1, ayrıca, tohum büyümesini etkilemek için EOD1 ile birlikte sinerjik olarak hareket eder. Bir dominant negatif da1-1 mutasyonunun (Zmda1-1) gereğinden fazla eksprese edilmesinin mısırın tohum kütlesini artırdığı rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2012); bu da, farklı tohum tahıllarının DA1, DA2 ve EOD1 etkilerini, bu tahıllarda tohum büyüklüğünü artıracak şekilde genetik olarak değiştirmek amacıyla birleştirmek için bir umut olduğuna işaret etmektedir.

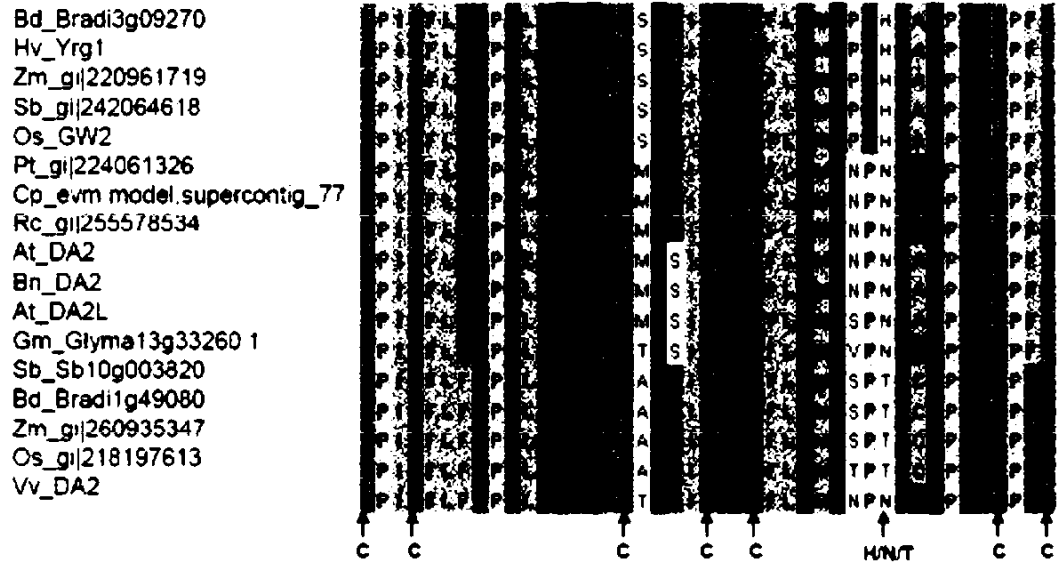
20

25

Referanslar

- Adamski, N.M. ve ark. (2009) PNAS ABD 106, 20115-20120.
- Alexandru, G. ve ark. (2008) Cell 134, 804-816.
- 5 Alonso-Blanco, C. ve ark. (1999).PNAS ABD 96, 4710-4717.
- Bandau, S. ve ark. (2012) BMC Biol 10, 36.
- Bednarek, J. et a J. Exp. Bot. (2012) 63 16 5945-5955
- Curtis, M.D. ve ark. (2003) Plant physiology 133,462-469.
- Disch, S. ve ark. (2006) Curr Biol 16, 272-279.
- 10 Fan, C. ve ark. (2006) Theor Appl Genet 112, 1164-1171.
- Fang, W. ve ark. (2012) Plant J 70, 929-939.
- Garcia, D. ve ark. (2005) Plant cell 17, 52-60.
- Garcia, D. ve ark.(2003) Plant Physiology 131, 1661-1670.
- Gegas, V.C. ve ark. (2010) Plant hücresi 22, 1046-1056.
- 15 Gomez, J.M. (200) Int J Org Evol 58,71-80.
- Hoeller, D. ve ark. (2007) Mol Cell 26, 891-898.
- Hu, Y. ve ark. (2003) Plant cell 15, 1951-1961.
- Jofuku, K.D. ve ark. (2005) PNAS ABD 102, 3117-3122.
- Kaur, N. ve ark. (2013). J Int Plant Biol 55, 108-120.
- 20 Krizek, B.A. (1999. Dev Genet 25, 224-236.
- Lanctot, A.A. ve ark. (2013). Developmental cell 25, 241-255.
- Li, Y., ve ark. (2008) Genes Dev 22,1331-1336.
- Li, Y. ve ark. (2006) Genome Res 16, 414-427.
- Lopes, M.A. ve ark. (1993) Plant cell 5, 1383-1399.
- 25 Luo, M. ve ark. (2005) PNAS ABD 102, 17531-17536.
- Mizukami, Y ve ark. (2000) PNAS ABD 97, 942-947.
- Moles, A.T. ve ark. (2005) Science 307, 576-580.
- Ohto, M.A., ve ark. (2005) PNAS ABD 102, 3123-3128.

- Ohto, M.A. ve ark. (2009) *Sex Plant Reprod* 22, 277-289.
- Orsi, C.H. ve ark. (2009) *PLoS Genet* 5, e1000347.
- Perez-Perez, J.M. ve ark. (2009) *Trends Genet* 25, 368-376.
- Platta, H.W. ve ark. (2009) *Mol Cell Biol* 29, 5505-5516.
- 5 Schnell, J.D. ve ark. (2003) *J Biol Chem* 278, 35857-35860.
- Schruff, M.C. ve ark. (2006) *Development* 133, 251-261.
- Seo, H.S. ve ark.(2003) *Nature* 423, 995-999.
- Shomura, A., ve ark. (2008) *Nat Genet* 40, 1023-1028.
- Smalle, J. ve ark. (2004) *Annual review of plant biology* 55, 555-590.
- 10 Song, X.J. ve ark. (2007) *Nat Genet* 39, 623-630.
- Stone, S.L. ve ark. (2005) *Plant physiology* 137, 13-30.
- Van Daele, I. ve ark. (2012) *Plant Biotech J* 10,488-500.
- Verma, R. ve ark. (2004) *Cell* 118, 99-110.
- Voinnet, O. ve ark. (2003) *Plant J* 33, 949-956.
- 15 Wang, A. ve ark. (2010) *Plant J*.
- Wang, ve ark. (2012) *African Journal of Biotechnology* 11, 13387-13395.
- Weng, J. ve ark. (2008) *Cell Res* 18, 1199-1209.
- Westoby, M. ve ark. (2002) *Ann. Rev. Ecol. System.* 33, 125-159.
- 20 White, D.W. (2006) *PNAS ABD* 103, 13238-13243.
- Woelk, T. ve ark. (2006) *Nat Cell Biol* 8, 1246-1254.
- Xie, Q. ve ark. (2002) *Nature* 419, 167-170.
- Xu, R. ve ark. (2011) *Development* 138, 4545-4554.
- Zhou, Y. ve ark. (2009) *Plant cell* 21, 106-117.



Tablo 1: DA2 RING domainlerinin hizalanması (SEKANS KOD NO: 3-19)

```

Pt_GI-224061326.pro  MGNKLG---RRQVVDERYTRFQGLYVHKDVDHKKLRKLI LSKLAPCFGDDSDND-- 55
Rc_GI-255578534.pro  MGNKLG---RRQVVDERYTRFQGLYVHKDVDHKKLRKLI LSKLAPCFGDDSDND-- 55
Vv_GI-147817790.pro  MGNKLG---RRQVVDERYTRFQGLYVHKDVDHKKLRKLI LSKLAPCFGDDSDND-- 55
Gm_GI-356549538.pro  MGNKLG---RRQVVDERYTRFQGLYVHKDVDHKKLRKLI LSKLAPCFGDDSDND-- 55
At_GI-18411948.pro   MGNKLG---RRQVVDERYTRFQGLYVHKDVDHKKLRKLI LSKLAPCFGDDSDND-- 55
Ta_GI-408743661.pro  MGNRIGG--RRKAGVEERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 56
Nv_GI-164371454.pro  MGNRIGG--RRKAGVEERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 56
Bd_GI-357140854.pro  MGNRIGG--RRKAGVEERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 56
Oa_GI-115445269.pro  MGNRIQG--RRKAGVEERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 57
Sb_GI-242064618.pro  MGNRIQG--RRKAGVEERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 58
Zm_GI-220961719.pro  MGNRIQG--RRKAGVEERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 56
Ta_GI-408743658.pro  MGNRIQG--RRKAGVEERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 56
Bd_GI-357125256.pro  MGN-----RQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 39
Oa_GI-218197613.pro  MGNVQVGRRRRPAVDERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 58
Zm_GI-260935347.pro  MGNVQVGRRRRPAVDERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 58
Sb_GI-242092026.pro  MGNVQVGRRRRPAVDERYTRFQGLYVHKDIDQKKLRKLI LSKLAPCFGDDAAGG-- 58

```

*** 0000 : 0:0 :***:00:00:00000 0 : :

```

Pt_GI-224061326.pro  ---HEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 112
Rc_GI-255578534.pro  ---HEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 112
Vv_GI-147817790.pro  ---FEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 112
Gm_GI-356549538.pro  ---REEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 112
At_GI-18411948.pro   LEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 112
Ta_GI-408743661.pro  --DLEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 114
Nv_GI-164371454.pro  --DLEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 114
Bd_GI-357140854.pro  --DLEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 114
Oa_GI-115445269.pro  --DLEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 115
Sb_GI-242064618.pro  --DLEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 116
Zm_GI-220961719.pro  DLDLEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 118
Ta_GI-408743658.pro  --DLEEPIICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 114
Bd_GI-357125256.pro  ---LDECPICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 115
Oa_GI-218197613.pro  ---LDECPICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 115
Zm_GI-260935347.pro  ---LDECPICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 115
Sb_GI-242092026.pro  ---LDECPICFLYTPSLNRSRCCCKGICTECFLOKQKPNSTRPTQCPTCKTANVAVEYRG 115

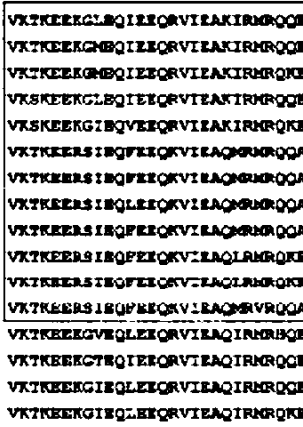
```

:*****:*****:00 0:*****: : :*****:00 :*****

```

Pt_GI-224061326.pro  VKTKKEKGLBQIEEQRVIEAKIRMQQELQDEERNQKRLDVSSSSAMIAPG-ELECGPT 171
Rc_GI-255578534.pro  VKTKKEKGLBQIEEQRVIEAKIRMQQELQDEERNQKRLDVSSSSAMIAPG-EVECGBA 171
Vv_GI-147817790.pro  VKTKKEKGLBQIEEQRVIEAKIRMQQELQDEERNQKRLDVSSSSAMIAPG-EVEYSTT 171
Gm_GI-356549538.pro  VKTKKEKGLBQIEEQRVIEAKIRMQQELQDEERNQKRLDVSSSSAMIAPG-DVYSSEW 171
At_GI-18411948.pro   VKTKKEKGLBQIEEQRVIEAKIRMQQELQDEERNQKRLDVSSSSAMIAPG-EMEYGST 171
Ta_GI-408743661.pro  VKTKKEEISIQFEEQKRVIEAQMNRQQAQLQDEEDNMRKQSRCSSSRTIAPTTEVEYRDI 174
Nv_GI-164371454.pro  VKTKKEEISIQFEEQKRVIEAQMNRQQAQLQDEEDNMRKQSRCSSSRTIAPTTEVEYRDI 174
Bd_GI-357140854.pro  VKTKKEEISIQFEEQKRVIEAQMNRQQAQLQDEEDNMRKQSRCSSSRTIAPTTEVEYRDI 174
Oa_GI-115445269.pro  VKTKKEEISIQFEEQKRVIEAQMNRQQAQLQDEEDNMRKQSRCSSSRTIAPTTEVEYRDI 175
Sb_GI-242064618.pro  VKTKKEEISIQFEEQKRVIEAQMNRQQAQLQDEEDNMRKQSRCSSSRTIAPTTEVEYRDI 176
Zm_GI-220961719.pro  VKTKKEEISIQFEEQKRVIEAQMNRQQAQLQDEEDNMRKQSRCSSSRTIAPTTEVEYRDI 178
Ta_GI-408743658.pro  VKTKKEEISIQFEEQKRVIEAQMNRQQAQLQDEEDNMRKQSRCSSS-CRTPNYAVEYRGV 174
Bd_GI-357125256.pro  VKTKKEEKGLEEQRVIEAQIRNRBQEIKDDAERLNKQ--TATLSDVITTPQVECCBA 154
Oa_GI-218197613.pro  VKTKKEEKTGIEEQRVIEAQIRNRBQEIKDDAERLNKQ--AAALTDVVTAQVEHCDT 173
Zm_GI-260935347.pro  VKTKKEEKGLEEQRVIEAQIRNRBQEIKDDAERLNKQ--TATLGDVVASAQVCSNT 173
Sb_GI-242092026.pro  VKTKKEEKGLEEQRVIEAQIRNRBQEIKDDAERLNKQ--TATLGDVVASAQVCSNT 173

```



```

Pt_GI-224061326.pro  TVPS-DTTPVE-----SGEIVSSQYS-----SRUPPHAGANRDOEFDLQLEDIMVNEA 218
Rc_GI-255578534.pro  AVQS-FRSPLE-----AEQSIYSQFS-----IRUPPHYRANRDOEFDLQLEDIMVNEA 218
Vv_GI-147817790.pro  AVPS-FRSPVE-----GDEIDSSQDPRAASDCITQTLPPRQNRDEEFDLQLEDIMVNEA 223
Gm_GI-356549538.pro  AVSSSBSVVE-----MDEIVSSQDSCATSVYRAGATTRINRDOEFDLQLEDIMVNEA 224

```

```

At_GI-18411948.pro          SAIS-YNKLMD-----DGEIAPSQMAS---VVRQHSRPRQNRKDEVCVLEELMVMKA 220
Ta_GI-408743661.pro        CSTS-YSPVSY--QCTEQETCCSSSEPCSAQAMRSEFHSRHRTRDDNIDMNIEDMVMKA 231
Hv_GI-164371454.pro        CSTS-YAAPFY--RCTEQETCCSSSEPCSAQAMRSEFHSRHRTRDDNIDMNIEDMVMKA 231
Bd_GI-357140854.pro        CSTS-YSPVSY--QCTEQEAECCSSSEPCSAQAMRSEFVNSRHRTRDDNIDMNIEDMVMKA 231
Os_GI-115445269.pro        CSTS-FSPVSY--RCARQETCCSSSEPCSAQAMRSEFHSRHRTRDDNIDMNIEDMVMKA 232
Sb_GI-242064618.pro        CSTS-FSPVSY--QCTEQGMECCSSSEPCSAQAMRSEFFHSRHRTRDDNIDMNIEDMVMKA 233
Zm_GI-220961719.pro        CSTS-FSPVSY--GRTRQGMCCSSSEPCSSQAMRSEFFHSRHRTRDDNIDMNIEDMVMKA 235
Ta_GI-408743658.pro        KTKREBSIQFRDQKVIKQNRVQQAQDEEDDKRFRQSRCE--SSMCMNIEDMVMKA 231
Bd_GI-357125256.pro        OCTSTFAASSA-----QCNDALLSQVQHSPELLKNSERLKPQREKRGVDVLEEVMKA 208
Os_GI-218197613.pro        QGASTTVKSSG-----QGSDMLSSQVQMAELLKTSERLKPQREKRGVDVLEEVMKA 227
Zm_GI-260935347.pro        DGASTAVANSP-----RCNDVLSSEVQHSPELLSRNSEAFKQRCGNRFVDVLEEVMKA 227
Sb_GI-242092026.pro        DGASTGAASSP-----QCSDAISSEVQHSPELLLRNSEAFKQRCGNRFVDVLEEVMKA 227

```

```

Pt_GI-224061326.pro        IMLSIG-ENCRQKQKPLCGDAAP----PAQYTMARIVTTP---ANAPPLAGSSSSSPGG 268
Rc_GI-255578534.pro        IMLSIG-ENCRQKQKPIYTDAAAS----SENVAVQCNTALQ---ANQP-VTESSSSPGG 267
Vv_GI-147817790.pro        IMLSIG-DNGRRHRMPLYGDTTT----ABQYVTEENTVLP---ANQP-QVESSSSPGG 272
Gm_GI-356549538.pro        IMLSIG-ENCRRRMLSFVDATSGHTVACGRIVSSVSSVSS----VMGP-PTSSSSSPGG 278
At_GI-18411948.pro        IMLSVQ-BTGTQRMSASGEITS----SRQYVDMHSYVSSPPFVTPIVEPATPSSSGG 274
Ta_GI-408743661.pro        IMRISQ-BQGSIGNPACGSTMV-----FEQP-7CERQ---AFVAAPPIEIPNP-GG 276
Hv_GI-164371454.pro        IMRISQ-BQGSIGNPACGSTMV-----FEQP-7CERQ---AFVAAPPIEIPNP-GG 276
Bd_GI-357140854.pro        IMRISQ-BQGSIGNPACGSTMV-----VIEPPSEREQ---AFVPAF-LEIIEP-GG 276
Os_GI-115445269.pro        IMRISQ--CSIGNPVCGMFME-----VIEPPSEREQ---PTVPAASLEIIEP-GG 276
Sb_GI-242064618.pro        IMRISQ-BQGMILVMPVCGSYFP-----VIEPPSEREQ---AFVPAAPLEIIEP-GG 276
Zm_GI-220961719.pro        IMRISQ-BQGSIGNPACGSTMV-----VIEPPSEREQ---AFVPAAPLEIIEP-GG 282
Ta_GI-408743658.pro        IMLSVQ-D--ASGNPQITGAAP-----PTIIPRSYD-----TSVTASRAAAPS-G 253
Os_GI-218197613.pro        IMLSIG-DQELASGNPFCGMYVE-----SVNPPRSFE-----GMITPAASAASSA 272
Zm_GI-260935347.pro        IMLSIG-DQELASGNPFCVSTTP-----SSIPSRPFD-----GMITPAASAASSA-G 272
Sb_GI-242092026.pro        IMLSIG-DQELASGNPFCVSTTP-----SSIPSRPFD-----GMITTPAASAASSA-G 271

```

```

Pt_GI-224061326.pro        LACAIAALAEKQQTQGES--IVNHSRQSPFNMPLST--SFTYMLSDADNYSFAQSSN 325
Rc_GI-255578534.pro        LACAIAALAEKQQTQGES--FAHNSRQSPFNMPLPGG--SFTYMLSDADNYSFAQSSN 324
Vv_GI-147817790.pro        LACAIAALAEKQQTQGES--STWYNSRQSPFNMPLPGG--SRFSNRVVIQYPRNYPDISSND 329
Gm_GI-356549538.pro        LACAIAALAEKQQTQGES--MOLTHNSRQSPFNTLPGG--SRFVNLQVLDNYSFAQSSN 330
At_GI-18411948.pro        LSCAIAALAEKQVCGESSRHRTRDDNIDMNIEDMVMKA--CDHYTDIEQEVGIDMHEHRR- 332
Ta_GI-408743661.pro        FSCAVAAAEHQ--FSNDFSYMAGSSAFFVDFHFRF--CHIAGGSMCAVE--SSPDSWGI 333
Hv_GI-164371454.pro        FSCAVAAAEHQ--FSNDFSYMAGSSAFFVDFHFRF--CHIAGGSMCAVE--SSPDSWGI 333
Bd_GI-357140854.pro        FSCAVAAAEHQ--FFNDFSYMAGSSAFFVDFHFRF--CHISCCSMCAVD--SSPDSWGI 333
Os_GI-115445269.pro        FSCAVAAAEHQ--FFNDFSYMAGSSAFFVDFHFRF--CHIAGGSMCAVE--SSPDSWGI 333
Sb_GI-242064618.pro        YSCAVAAAEHQ--FASNDFSYMAGSSAFFVDFHFRF--CHISCCSMCAVD--SSPDSWGI 337
Zm_GI-220961719.pro        YSCAVAAAEHQ--AFNDFSYMAGSSAFFVDFHFRF--CHISCCSMCAVD--SSPDSWGI 340
Ta_GI-408743658.pro        MNMNIEDMVMKA-AIMRISQSQ--GSIGNPCCGSTMV--EQFTREKQAFVAAPLEIIEP 333
Bd_GI-357125256.pro        FACAVAAALAEKQHMVGS--SIPATQASRHTLSRSDRSFTEDLSIAGSSSSGTVDES 308
Os_GI-218197613.pro        FACAVAAALAEKQHMVGS--SSTATCNTSRCDILSRSDRSFTEDLSIAGSSSSGARSSEK 330
Zm_GI-260935347.pro        FACAVAAALAEKQHMVGS--SSASPCQTRFQELSRFDRSTTQQLSVAGSSSSDRVREL 333
Sb_GI-242092026.pro        FAFVAALAEKQHMVGS--SSASACQTRFQILSRSDRSFTEDLSVAGSSSSDRVREL 329

```

```

Pt_GI-224061326.pro        VLPDCRMIVTRDDGHWGADRSDAARAGTSYASSETAEDAGGISLLPFP--PPTDEICG 383
Rc_GI-255578534.pro        MLSDCRMA--RDDVQVADRSDAARAGTSYASSETTEDSDGISVVLFPFPLPFPDRIVC 382
Vv_GI-147817790.pro        ALPDGCLAVTRDDGHWGADRSSEVABAGTSYASSDATDEAGGVAA-----LPTDRAEG 383
Gm_GI-356549538.pro        EPLDKAVTMTNRHNSRHRTRDDNIDMNIEDMVMKA--ETATRYTNSVAARDRSGKSS-----LPRSDNDG 300
At_GI-18411948.pro        -----MNYEMGETCSGMSYVSSYMTGCGFKN-----PDPDP----- 363
Ta_GI-408743661.pro        ASSCSRREVVREDEGCSIDHWSEGAAGTSYAGSDIVVADAGTTFP-----LPVTDH--- 384
Hv_GI-164371454.pro        APSGTRFUDVREDEGCSIDHWSEGAAGTSYAGSDIVVADAGTTFP-----LPPADN--- 384
Bd_GI-357140854.pro        PPSCSR--EMIREGECSTDWSEGAAGTSYAGSDIVVADAGTTFP-----LPPAEN--- 383
Os_GI-115445269.pro        APSCSR--EYVREDEGCSADHWSEGAAGTSYAGSDIVVADAGTTFP-----LPPAEN--- 383

```

Sb_GI-242064618.pro	APSCER-EVVRDEGECSTDHWSGALACTSYAGEDIMADTGTMQP-----LPTAEN--- 387
Zm_GI-220961719.pro	APSCER-EVVRDEGECSTADHWSGALACTSYAGEDIMADAGAMQP-----LPTAEN--- 390
Ta_GI-408743658.pro	GPSCSRREVVREBEGECSTDHLSGALACTSYAGSDIVVDAGTMLP-----LPTADN--- 384
Bd_GI-357125256.pro	SINRTRQTRREGAEHSNN--DRWSEVADASTSCAGEDITREAGAAAL-----VASDG--- 357
Os_GI-218197613.pro	SSNQMHQTRDCMETSNN--ERWSEKALASSSFTGSDLTTEAGAAAN-----SGG--- 375
Zm_GI-260935347.pro	PTANTHRTIEAAEYSNSNVQWSEVALAGTSLALEDGTFVEAGVDNS-----STAG--- 380
Sb_GI-242092026.pro	SSSTHRTIEGSEYENSNGRWSEVALAGTSLALADVIVEAGVGN-----STVGV--- 379
	: : : : : *
Pt_GI-224061326.pro	SFQNVSGPIP-ESFEEQMLANAVSLAEARMTSG--PQSAMQ 423
Rc_GI-255578534.pro	S--DQGIVP-ESFEEQMLANAVSLAEAQMTGG--AGSAMQ 420
Vv_GI-147817790.pro	SFQNVGCPVPSFEEQMLANAVSLAEARMTS---TQCVWQ 423
Gm_GI-356549538.pro	SLQSATPPIVPSFEEQMLANAVSLAEARMTSG--QSASWQ 431
At_GI-10411940.pro	----FLVIVPSFEEQMLANAVSMAEVHATTTCAPEVTWQ 401
Ta_GI-408743661.pro	-YSKVASHFRPESIEEQMYSMAVSLAEA-HGRTHY-QQLAML 424
Nv_GI-164371454.pro	-YSMAASHFRPESIEEQMYSMAVSLAEA-HGRTHY-QQLTWL 424
Bd_GI-357140854.pro	-YMGAPSHFRPESIEEQMYSMTVSLAEA-HGRTHS-QQLAML 423
Os_GI-115445269.pro	-FAMAPSHFRPESIEEQMYSMAVSLADG-HGRTHS-QQLAML 423
Sb_GI-242064618.pro	-PTMAPSHFRPESIEEQMYSMAVSLAEANHGRTQA-QQLAML 428
Zm_GI-220961719.pro	-FAMGFSHFRPESVVEEQMYSMAVSLAEANHGRTQA-QQLAML 431
Ta_GI-408743658.pro	-YSKVASHFRPESIEEQMYSMAVSLAEA-HGRTHS-QQLAML 424
Bd_GI-357125256.pro	--SSIGSGNIPDSFEEQMLAISLSLV DARAKASSPCGLTWQ 398
Os_GI-218197613.pro	--SDTGAGSIPDSFEEQMLAMLSLV DARAKASSPG--LTWR 414
Zm_GI-260935347.pro	--SNIDSVSVPSFEEQMLAMLSLV DARARAGSPG--LAMR 419
Sb_GI-242092026.pro	--SNIGSSVPSFEEQMLAMLSLV DARARAGSPC--LAMR 418
	: * : * * * : : : * : : *

Tablo 2: DA2 polipeptidlerinin hizalanması (SEKANS KOD NO: 20-35)

* simgesi, özdeş artıkları gösterir

: simgesi, korunmuş artıkları gösterir

. simgesi, yarı korunmuş artıkları gösterir

RING somaini ve birinci ve ikinci konsensus domainleri kutu içine alınmıştır.


```

At_GI-15240018.pro  EADIQKAKQKRLATHEAKLDLATHEAKQLDLAIQEPNAGQEEEMAKRTKELERDAQIAN 99
At_GI-334188680.pro  .....LYKDVILRQRRSEADQIEMRIQDSFVYQK  TSRCPQRSEDCQIAR 75

Ss_GI-514815267.pro  .....MGLNLSKIFKGGVN  RVSRRGRYNGNSKE  GYS 29
Bd_GI-357157184.pro  .....MGLNLSKIFKGGVN  RVSRRGRYNGNSKE  GYS 29
Br_DAlb.pro  .....MGLNLSKIFKGGNQ  RNFELGNRYTHWGGYTYNYP 33
Br_DAla.pro  .....MGLNLSKIFKGGNQ  RFLGNNDKDHN  GYVQYYP 31
At_GI-15221983.pro  .....MGLNLSKIFKGGNQ  RLRVGRNKHNHN  VYDNY 32
Tc_GI-508722773.pro  .....MGLNLSKIFKGGNQ  RPSRGG  HHG  NYV 25
Gm_GI-356564241.pro  .....MGLNLSKIFKGGSDNKLSEGGYKEDA  GYY 29
Gm_GI-356552145.pro  .....MGLNLSKIFKGGSDNKLSEGGYKEDA  GYY 29
Vv_GI-302142429.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 28
Vv_GI-359492104.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 28
Sl_GI-460385048.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 28
Cs_GI-218197709.pro  IELQQLVLYKQPKHSVDSNIAINS  MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 364
Cs_GI-115466772.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 33
Bd_GI-357160893.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 33
Bd_GI-357164660.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 33
Sb_GI-242092232.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 33
Zm_GI-212275448.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 33
At_GI-240256211.pro  .....MGLNLSKIFKGGSH  KISEGNYHGRY  GDT 33
At_GI-145360806.pro  HISNPIFPGVCSRSSECYRDKKMLKRVKLPKSGNDGCSGATVWHPFQFSDENM 82
At_GI-22326876.pro  EYVVIKAAAGDQDQVSGITRESYITIKRFDYIIDKRPDLSRKPRTNRSRSLK  1080
At_GI-30698242.pro  ALYTRKIRA  INQDFLKFQQLIQLIQRNQQQYMGSMQASVSTKADLLSDICNPKFK  157
At_GI-15240018.pro  VLQHEERE  RLINKEALEDEDELLARTLEESLENNRRRDMFEDQVNFQDQ  150
At_GI-334188680.pro  ELQYVEET  ELDRSVVDEE  GQ 96

Ss_GI-514815267.pro  TQSTRKY  36
Bd_GI-357157184.pro  SENIR  34
Br_DAlb.pro  -HEHS  EPBAETDA  DHT 48
Br_DAla.pro  -HDEPEADIDPDPDFDE  TWT 52
At_GI-15221983.pro  TASHDQEPAAADTDADNDP  HMT 55
Tc_GI-508722773.pro  EDHP  G 32
Gm_GI-356564241.pro  LPSTB  34
Gm_GI-356552145.pro  LPSTB  34
Vv_GI-302142429.pro  VQNEP  33
Vv_GI-359492104.pro  VQNEP  33
Sl_GI-460385048.pro  KEDDE  33
Cs_GI-218197709.pro  GNSAVVTVYFLESTFQGLDQLLLATDLRQLVIVDDVCKLRQQAQPVLIHMYGQLLQ  424
Cs_GI-115466772.pro  SNSAVV  40
Bd_GI-357160893.pro  SSSVVT  40
Bd_GI-357164660.pro  SSSAVN  40
Sb_GI-242092232.pro  SSSVVT  40
Zm_GI-212275448.pro  SSSVVT  40
At_GI-240256211.pro  RYSARCSDFDKKEIECALALS  SGLVIVPQDQKRIE  73
At_GI-145360806.pro  VFPLPB  89
At_GI-22326876.pro  LSSTSSKVRSGWVVRWLGCF  LQPKLRSRRTALSKA  1122
At_GI-30698242.pro  .....
At_GI-30698240.pro  LCLVAQPEVVKPWLKRPLELIGNLPEDGV  VIVVVAIYALQNTLVTK  207
At_GI-15240018.pro  LALIVQESLNNGEYPIR  LSEYK  SISRRAPELVQK  FARA  189
At_GI-334188680.pro  LSKIVNESLKE  107

Ss_GI-514815267.pro  GAGNED  E  DNDRAIALSLSEGDQKRAIDTENLD  SD  74
Bd_GI-357157184.pro  .....GAYDESDNE  DIDRAIALSLSEDPKPKAIIDPDYS  70
Br_DAlb.pro  QEPSTSEETWNGKNE  EVDRVIALSLSE  ENQRPETNG  88

```

Br_DAla.pro QRPSTSEKDTG QGENE DIDRAIALSLLENSQQYNNICAAH 93
 At_GI-15221983.pro QRPSTSEKDTSEKQGENE DIDRAIALSLLEE NQRPSTBISG 94
 Tc_GI-508722773.pro NAPSVE GDANQSELENE DVDRALALSLEEG SQKSKRVID 90
 Gm_GI-356564241.pro GVTN HUNENE DIDRAIALSLVEESRRANNNVWGER 69
 Gm_GI-356552145.pro QVTNDANNGSQXQGENE DIDRAIALSLVEETQKANNVWV 73
 Vv_GI-302142429.pro SCBQDVMAETENE DIDRAIALSLSEE EQKSKRVID 68
 Vv_GI-359492104.pro SCBQDVMAETENE DIDRAIALSLSEE EQKSKRVIDM 69
 Sl_GI-460385048.pro STARDNSHELE DIDRAIALSLSEE EQKSKRVID 66
 Os_GI-218197709.pro TSHARQHGQVPSRPNK DTRALALSLEEEQRKAKATEKD 465
 Os_GI-115466772.pro DVPSRPNK DTRALALSLEEEQRKAKATEKD 73
 Bd_GI-357160893.pro DVLSEFONE DIDRAIALSLSEE QRKSKGTCGD 72
 Bd_GI-357164660.pro YALSEFONE DIDRAIALSLSEEQRKSKGTCGD 73
 Sb_GI-242092232.pro DIFSEFVNE DIDRAIALSLSEEQRKAKTIDKD 73
 Zm_GI-212275448.pro DILSEFONE DIDRAIALSLSEEQKKAIDKD 73
 At_GI-240256211.pro YKSETRDDDDDEDEDEINRAQLAAMTEERRVAQCIIEEREFRRARAQLESTEKLLAK 133
 At_GI-145380806.pro SLEDRSRARONE ELDRSISLADN TKRPHGTQNS 125
 At_GI-22726876.pro IRRALREKRIENYKEL QALIRSKKTKKTRQADRRDQTKHADER 1167
 At_GI-30698242.pro MVRKRPQEKDEKI IIRKVKRESLKLAKQAKKRILESKIQ 41
 At_GI-30698240.pro LCHDADVKRKPQIFPI SVSKFPNVALTGHKLEHTQKANEYEN 252
 At_GI-15240018.pro VKESLKNKGRKQFEDH QVKRDEQLALIVQESLNNVESPPLREK 234
 At_GI-334188680.pro KRSKQFEDD QVENDQQALMVQESLYMVLSAQLEED 145

Sl_GI-514815267.pro EQLARALQENTSEFLKDEQLAR ALQESMVGNS 108
 Bd_GI-357157184.pro LLEDEQLAR ALNESLNTGSP 90
 Br_DAlb.pro ANKHAN MDDEQLAR AIQESMARN 113
 Br_DAla.pro AGRYAN VOEDEQLAR AIQESMVGNT 119
 At_GI-15221983.pro KYSHPVSEDEQLAR ALQESMVGNS 119
 Tc_GI-508722773.pro DEYQLEDEQLAR ALQESLNFPP 94
 Gm_GI-356564241.pro TQSTQELLEDEQLAR AIQESLNLSP 94
 Gm_GI-356552145.pro DYSQLEDEQLAR AIQESLNLSP 98
 Vv_GI-302142429.pro NEFQLEDEQLAR AIQESLNIBSP 92
 Vv_GI-359492104.pro LDNEFQLEDEQLAR AIQESLNIBSP 95
 Sl_GI-460385048.pro SEYQLEDEQLAR ALQESLNVSP 90
 Os_GI-218197709.pro NILEDEQLAR AIQESLNVSP 487
 Os_GI-115466772.pro HILEDEQLAR AIQESLNVSP 95
 Bd_GI-357160893.pro LHLEDEQLAR AIHESLNVSP 94
 Bd_GI-357164660.pro QHLEDEQLAR AIQESLNVSP 95
 Sb_GI-242092232.pro HILEDEQLAR AIQESLNVSP 95
 Zm_GI-212275448.pro HILEDEQLAR AIQESLNVSP 95
 At_GI-240256211.pro ARLEEEEMRRSKAQLSEDELLAK ALQESMVGSP 167
 At_GI-145380806.pro MMDRQFDR PFGGLNDSSP 145
 At_GI-22326876.pro EQRKHSKDRERE IESNEFERARISNDIVTEELVLRGGRKQLDQKADENE 1221
 At_GI-30698242.pro GKRIQVDDO QLANTSEKNDQ 62
 At_GI-30698240.pro ELDAMLTYOQLLRQGRNGSILLVLEOV MAZERSLGRKFL 292
 At_GI-15240018.pro NMSIRAPVUNDEQLAK AVENSLEGRQ 262
 At_GI-334188680.pro KNISTIPPLVEDAQLK VIVESAKGRQ 173

Sl_GI-514815267.pro PR-----QHTPIEDVHFKAPASSTPPYVPPNISRVA 142
 Bd_GI-357157184.pro PR QNVTVVVPSRVTREPTDVFVLSSEFRACA 124
 Br_DAlb.pro ---SIT---YDFGNAY---ENGRMGGGNVYNDQDIYYPRPIAPSPFRICA 156
 Br_DAla.pro PRKRESS---YDIGNAYAGDVTYNGRMGGGNVYANDIYYPRPTAPPSPFRICA 173
 At_GI-15221983.pro PRKRESENT YDMGNAYAGDVTYNGRMGGGNVYANDIYYPRPIAPPSPFRICA 173
 Tc_GI-508722773.pro P-----QYENANGHQPMPVHPMCPFRICA 118
 Gm_GI-356564241.pro P-----RYGNENMYQPEIQYFFLG---ICA 118
 Gm_GI-356552145.pro P-----RYGNENMYQPPIQYFFMSPFRICA 122
 Vv_GI-302142429.pro PQ-----HNGN-----GQNTYQPIPPYSTGFRICA 120
 Vv_GI-359492104.pro PQ-----HNGN-----GQNTYQPIPPYSTGFRICA 123

Sl_GI-460385048.pro PQ-----MVSMDHGQGVNVTGKATFYHDVDFYASFRVCA 126
 Os_GI-218197709.pro -----FRARENGANQGNQYQPLPFNFSSGFRICA 517
 Os_GI-115466772.pro -----FRARENGANQGNQYQPLPFNFSSGFRICA 125
 Bd_GI-357160893.pro PCARDNGSEFET APDNGSPPFAIKNESRFRARENGIANKKNSIQHSDFNFSSGFRICA 151
 Bd_GI-357164660.pro -----FRARERSRFRARENGSANGQNSYQL PLMPSSGFRICA 133
 Sb_GI-242092232.pro P-----PARENGSANGQNAQPLPFNFSSGFRACA 125
 Zn_GI-212275448.pro PRRNGSAN GGTNYHFFRBTGNATQPPARENGSANGKATYHPLPFNFSSGFRACA 148
 At_GI-240256211.pro P-----RYDPCNIDQPTFFLIPSHRICV 191
 At_GI-145360806.pro IP-----PYEFSYQVRRQRICG 163
 At_GI-22326876.pro INK-----SKDVVEE-----EVNPFLEK 1241
 At_GI-30698242.pro INK-----SKDVVEE-----DVNPFPS--I 80
 At_GI-30698240.pro IQLPDYKILVTSRFEPTSEQPTFHKLPLIDQVEECRDLIEENEKLE---EVNPFLEKCG 348
 At_GI-15240018.pro IRQ-----SKDEVEECQMLL-----ELNPFPSLCC 287
 At_GI-334188680.pro IRE-----FKDPVEEDQNLPRVLDGVNHPSEICD 202

Sl_GI-514815267.pro GCKTPIQGRFLSNDQSVWHPQCFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--DHAYHRSQYKERY H 198
 Bd_GI-357157184.pro GNNPIGHRFLSNDQSVWHPQCFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NQPTKKSQYKDFP H 180
 Br_DAlb.pro GDNSEIGHGRFLNCLNLAWHPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NYPTKKSQYKERY H 212
 Br_Data.pro GDNSEIGHGRFLNCLNLAWHPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NYPTKKSQYKERY H 229
 Tc_GI-508722773.pro GDNTEIGHGRFLNCLNLAWHPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NYPTKKSQYKERY H 174
 Cm_GI-356564241.pro GQYTEIGHGRFLNCLNLAWHPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NYPTKKSQYKERY H 174
 Rm_GI-356562146.pro GQYTEIGHGRFLNCLNLAWHPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NYPTKKSQYKERY H 178
 Vv_GI-302142429.pro GDNTEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NYPTKKSQYKERY H 176
 Vv_GI-359492104.pro GDNTEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NYPTKKSQYKERY H 179
 Sl_GI-460385048.pro GDNTEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NYPTKKSQYKERY H 182
 Os_GI-218197709.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 573
 Os_GI-115466772.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 181
 Bd_GI-357160893.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 207
 Bd_GI-357164660.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 189
 Sb_GI-242092232.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 181
 Zn_GI-212275448.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 204
 At_GI-240256211.pro GQQAIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 247
 At_GI-145360806.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 219
 At_GI-22326876.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 1296
 At_GI-30698242.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 128
 At_GI-30698240.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 404
 At_GI-15240018.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 343
 At_GI-334188680.pro GDNSEIGHGRFLSNGAVWHPPECFRQYGCQIPISEYEFVAVHE--NHPYKKSQYKERY H 256

Sl_GI-514815267.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 258
 Bd_GI-357157184.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 240
 Br_DAlb.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 272
 Br_Data.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 289
 At_GI-15221983.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 289
 Tc_GI-508722773.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 234
 Cm_GI-356564241.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 234
 Cm_GI-356562146.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 238
 Vv_GI-302142429.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 236
 Vv_GI-359492104.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 239
 Sl_GI-460385048.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 242
 Os_GI-218197709.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 633
 Os_GI-115466772.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 241
 Bd_GI-357160893.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 267
 Bd_GI-357164660.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 249
 Sb_GI-242092232.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 241
 Zn_GI-212275448.pro PKDVKRSEFIPINAGLIEYRAHFFWVQKYCPSEHEDQTPROCSERMEPRNTRYVLLD 264

At_GI-240256211.pro PNCVCHMFIPTNPAFLIEYTRAPFPMQKYCPSEHERDCTPRCCSCERNEPNDTKYLILDD 307
 At_GI-145360806.pro PNCVCHMFIPTNPAFLIEYTRAPFPMQKYCPSEHERDCTPRCCSCERNEPNDTKYLILDD 279
 At_GI-22326876.pro PNCVCHMFIPTNPAFLIEYTRAPFPMQKYCPSEHERDCTPRCCSCERNEPNDTKYLILDD 1355
 At_GI-30698242.pro RNCYVCEQKIPVNAEGRKPSSEPPFWKRYCPINDEDCTAKCCSCERLEBPRTNVMGLD 188
 At_GI-30698240.pro YCYVCKEKK MKCYMINDPFWKRYCPVNEADGTPKCCSCERLEBPRTNVMGLD 457
 At_GI-15240018.pro YCYVCKEKK -----MKCYMINDPFWKRYCPVNEADGTPKCCSCERLEBPRTNVMGLD 396
 At_GI-334188680.pro PNCVCHMFIPTNPAFLIEYTRAPFPMQKYCPSEHERDCTPRCCSCERNEPNDTKYLILDD 311
 * * *

Sa_GI-514815267.pro GRKLCLECLHTAINDTNECQPLIYDIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 318
 Bd_GI-357157184.pro GRKLCLECLHTAINDTNECQPLIYDIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 300
 Br_DA1b.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 332
 Br_DA1a.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 349
 At_GI-15221983.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 349
 Tc_GI-508722773.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 294
 Gm_GI-356564241.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 294
 Gm_GI-356552145.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 298
 Vv_GI-302142429.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 296
 Vv_GI-359492104.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 299
 Sl_GI-460385048.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 302
 Os_GI-218197709.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 693
 Os_GI-115466772.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 301
 Bd_GI-357160893.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 327
 Bd_GI-357164660.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 300
 Sb_GI-242092232.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 301
 Zn_GI-212275448.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 324
 At_GI-240256211.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 367
 At_GI-145360806.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 339
 At_GI-22326876.pro FANLCIEGMSAVMDTNECQPLIYDIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 1415
 At_GI-30698242.pro FANLCIEGMSAVMDTNECQPLIYDIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 248
 At_GI-30698240.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 331
 At_GI-15240018.pro GRKLCLECLDSSVMDTPCCQPLYLQIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 456
 At_GI-334188680.pro FANLCIEGMSAVMDTNECQPLIYDIQEPYEGLNKQVEQVPLLLVERQALNEAREGKRN 371
 * * *



Sl_GI-514815267.pro G-HHLP--ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 373
 Bd_GI-357157184.pro G-HHLP--ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 355
 Br_DA1b.pro GHYHMP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 385
 Br_DA1a.pro GHYHMP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 405
 At_GI-15221983.pro GHYHMP--ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 404
 Tc_GI-508722773.pro GHYHMP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 350
 Gm_GI-356564241.pro GHYHMP ETRGLCLSEE LSTFRAPRL G TAMDRAQDYPRTTRCDVTAAILL 345
 Gm_GI-356552145.pro GHYHMP ETRGLCLSEE LSTFRAPRL G TAMDRAQDYPRTTRCDVTAAILL 349
 Vv_GI-302142429.pro GHHHMP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 352
 Vv_GI-359492104.pro GHHHMP--ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 355
 Sl_GI-460385048.pro GHHHMP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 358
 Os_GI-218197709.pro GHHHLP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 348
 Os_GI-115466772.pro GHHHLP--ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 356
 Bd_GI-357160893.pro GHHHLP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 382
 Bd_GI-357164660.pro GHHHLP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 344
 Sb_GI-242092232.pro GHHHLP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 356
 Zn_GI-212275448.pro GHHHLP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 378
 At_GI-240256211.pro GHHHLP--ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 423
 At_GI-145360806.pro GHHHMP ETRGLCLSEEDQVSTILRAPFI--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 394
 At_GI-22326876.pro DNQCQQLMVRGIEISEEQIVTSV8QVRR--GLNRGILDVTS8QVRRCEVTAAILL 1474
 At_GI-30698242.pro DYHR--AAVTRGLNSEEQIVPSIINGPMMFDKLIIDIVTS8QVRS GPEVIGLII 304
 At_GI-30698240.pro DWHY EVLIRAYMSDQKIMIVVEEDPT GQKQLIDNDETPQGVVHEKVTAILL 570
 At_GI-15240018.pro DYQY--EVTREICLSEEDQVTSV8QVRR--GPNRILDNITQPKLVRRCEVTAAILL 512

```

At_GI-334188680.pro  DNQH---GVVTRICICLSEQQIVNSVFKKPKTK  SPNGELVSLGTEPQKVVGGKCVTAILIL  427

Si_GI-514815267.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHAYLRLLK-----  GYRTLSQEV  406
Bd_GI-357157184.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHAYLRLLK-----  GYRTLSQEV  388
Br_Dalb.pro          YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  418
Br_Dala.pro          YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  438
At_GI-15221983.pro   YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  437
Tc_GI-508722773.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  383
Gm_GI-356564241.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  378
Gm_GI-356552145.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  382
Vv_GI-302142429.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLRN-----  GYRTLSQDV  385
Vv_GI-359492104.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLRN-----  GYRTLSQDV  388
Sl_GI-460385048.pro   YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLR-----  GYRTLSQDV  391
Os_GI-218197709.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  781
Oe_GI-115466772.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  389
Bd_GI-357160893.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQEV  415
Bd_GI-357164660.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQEV  397
Sb_GI-242092232.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQEV  389
Zm_GI-212275448.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLK-----  GYRTLSQDV  411
At_GI-240256211.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLRN-----  GYRTLSQEV  456
At_GI-145360806.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLRN-----  GYRTLSQEV  427
At_GI-22326876.pro   YGLPRLLTGSILAEHPPGHAYLRLLN-----  GYRTLSQVL  1507
Ar_GI-30698240.pro   YGLPRLLTGSILAEHPPGHAYLRLLN-----  GYRTLSQVL  337
At_GI-30698240.pro   YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLRN-----  GYRTLSQVL  603
At_GI-15240018.pro   YGLPRLLTGSILAEHPPGHAYLRLLN-----  GYRTLSQVL  545
At_GI-334188680.pro  YGLPRLLTGSILAEHPPGHANRLRNQTGTGQVFANQIGSSQLKVLPGITGYNLKLKL  487
.....

Si_GI-514815267.pro  EDICQVLAHMLLESEITIGGSDMATTSAASS  897S  5SSKKA  KTFERKL  458
Bd_GI-357157184.pro  EDICQVLSHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  440
Br_Dalb.pro          EDICQVMAHMLLEEARLAAGSPGSHAAASSSS  882-----  GGVKQP  RSQFERKL  467
Br_Dala.pro          EDICQVMAHMLLEEARLAAGSRNSNVAASSSS  88-----  RGVKQP  RSQFERKL  485
At_GI-15221983.pro   EDICQVMAHMLDAELAAGPTNNAAGSSSSS  88-----  QGLKQP  RSQFERKL  485
Tc_GI-508722773.pro  EDICQVLAHMLLTLGUYAN  88NVAASSSS  88-----  SRLKQP  RPQFERKL  431
Gm_GI-356564241.pro  EDICQVLAHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  427
Gm_GI-356552145.pro  EDICQVLSHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  431
Vv_GI-302142429.pro  EDICQVLAHMLDAELTSGS  88-----  SQQERKL  415
Vv_GI-359492104.pro  EDICQVLAHMLDAELTSGSSNV  88PSTSSAS  88-----  5SSKKA  CSQFERKL  435
Sl_GI-460385048.pro  EDICQVLAHMLLETQIATIPSSNGCAITSS  88M  5SSKQI  RSEFERKL  439
Os_GI-218197709.pro  EDICQVLAHMLTSEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  831
Oe_GI-115466772.pro  EDICQVLAHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  439
Bd_GI-357160893.pro  EDICQVLAHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  465
Bd_GI-357164660.pro  EDICQVLAHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  444
Sb_GI-242092232.pro  EDICQVLAHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  439
Sb_GI-212275448.pro  EDICQVLAHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  461
At_GI-240256211.pro  EDICQVLAHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  507
At_GI-145360806.pro  EDICQVLSHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  481
At_GI-22326876.pro   EDICQVLSHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  1560
At_GI-30698240.pro   EDICQVLAHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  397
At_GI-30698240.pro   EDICQVLSHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  609
At_GI-15240018.pro   EDICQVLSHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  601
At_GI-334188680.pro  EDICQVLSHMLLESEITIGAGGNTAATSVPS  88AP  5SSKKA  KTFERKL  538
.....

Si_GI-514815267.pro  DEFFKHQIETDPSVAYGDFRAGRAVERYG  LNSTLDHMLTGRFF  504
Bd_GI-357157184.pro  DEFFKHQIETDPSVAYGDFRAGRAVERYG  LNSTLDHMLTGRFF  487
Br_Dalb.pro          DEFFKHQIETDPSVAYGDFRAGRAVERYG  LNSTLDHMLTGRFF  514
Br_Dala.pro          DEFFKHQIETDPSVAYGDFRAGRAVERYG  LNSTLDHMLTGRFF  532

```

```

At_GI-15221983.pro  GEFFKHQIESDASPVYGGGFRAGRLAVHKYG--LRKTLKHIQNTGRFFV 532
To_GI-508722773.pro  GEFFKHQIESDTSPVYGGGFRAGHQAVTKYG--LRKTLKHIRNTGRFFV 478
Gm_GI-356564241.pro  GEFFKHQIESDISPVYGGGFRAGQKAVRKYG--LQRTLKHIRNTGTEFFV---- 474
Gm_GI-356552145.pro  GEFFKHQIESDISPVYGGGFRAGQKAVSKYG--LQRTLKHIRNTGTEFFV 478
Vv_GI-302142429.pro  GQFFKHQIESDTSLVYGGGFRAGHQAVLKYG--LPATLKHIIHLTGNEFFV-- 462
Vv_GI-359492104.pro  GQFFKHQIESDTSLVYGGGFRAGHQAVLKYG--LPATLKHIIHLTGNEFFV---- 482
Sl_GI-460385048.pro  GDFFKHQIESDTSPIYGGGFRAGQAVLKYG--LERTLDHIRNTGTEFFV 486
Os_GI-218197709.pro  GDFFKHQIESDTSMAYGGGFRAGNRAVLQYG--LKRTLKHIRLTGTEFFV---- 878
Os_GI-115466772.pro  GDFFKHQIESDTSMAYGGGFRAGNRAVLQYG--LKRTLKHIRLTGTEFFV---- 486
Bd_GI-357160893.pro  GDFFKHQIESDTSVAYGGGFRAGNRAVLQYG--LKRTLKHIRLTGTEFFV 512
Bd_GI-357164660.pro  GDFFKHQIESDTSVAYGGGFRAGNRAVLQYG--LKRTLKHIRLTGTEFFV---- 491
Sb_GI-242092232.pro  GDFFKHQIEYDTSMAYGGGFRAGNRAVLQYG--LKRTLKHIRLTGTEFFV---- 486
Zm_GI-212275448.pro  GDFFKHQIEYDTSMAYGGGFRAGNRAVLHYG--LKRTLKHIRLTGTEFFV 508
At_GI-240256211.pro  GEFFKHQIESDSSAYGGGFRAGNRAVLKYG--LKRTLKHIRLTGTEFFV 553
At_GI-145360806.pro  GEFFKHQIAHDASPAYGGGFRAGNRAAKKYG--LRRLDHIIRLTGTEFFL--- 528
At_GI-22326876.pro  VNEFKHQIETDESPEFGDGFPRKVNROGASNNHSLKDTLKEIISISKTPQYSKL 1613
At_GI-30698242.pro  VEFCKNQIKEDDSPVYGLGQFRQVYEMVENVNYNLDCLKDIYASASNATFDSTV 450
At_GI-30698240.pro  VEFCKNQIETDESPEVYGLGQFRQVYEMVENVNS--SLQETLKEILRR----- 702
At_GI-15240018.pro  VEFCKNQIETDDSPVYGLGQFRQVYEMVENVNS--SLQETLKEILRQR----- 644
At_GI-334188680.pro  VEFCKNQIETDDSPVYGVGFRKVNQMVSDS--SLHKLKIQHNTKPDSDNL 587

```

Tablo 3: DA1 proteinlerinin hizalanması (SEKANS KOD NO: 41-64)

```

Zm_GI-223973923.pro -----MNSS--RQMLHYINTGFPYITITESPMDFFEGLYARA 36
Sb_GI-242042045.pro -----MNSC--RQMLHYINTGFPYITITESPMDFFEGLYARA 36
Zm_GI-226496789.pro -----MTSS--RQMLHYINTGFPYITITESPMDFFEGLYARA 36
Os_GI-222624282.pro MTSHERDTEVTRMQVRDPSECMNGS--RQMLHYINTGFPYITITESPMDFFEGLYARA 58
Os_GI-115451045.pro -----MNCS--RQMLHYINTGFPYITITESPMDFFEGLYARA 36
Bd_GI-357113826.pro -----MNCS--RQMLHYINTGFPYITITESPMDFFEGLYARA 36
Sl_GI-460410949.pro -----MNMN--QQTEIYYTNGAMPYNSIGSPMDFFGGVYDNI 36
Rc_GI-255582236.pro -----MEVHYINTGFPYITITESFLDFFEGLSHPV 30
Pt_GI-224059640.pro -----MEVHYNTDFFPYITITESPMDFFEGLYARA 30
Gm_GI-356548935.pro -----MNDG--RQMGVHYVDAGFPYAVNDFVDFPQGFIVPV 36
Gm_GI-356544176.pro -----MNDQ--RQMGVHYVDAGFPYAVNDFVDFPQGFIVPV 36
Vv_GI-359487286.pro -----MNGN--RQMGVHYINTGFPYITITESPMDFFEGLYARA 36
Tc_GI-508704801.pro -----MNGN--RQMGVHYIDTGFYITITESPMDFFEGLYARA 36
Fp_GI-462414664.pro -----MNGN--QGMVHYIDTGFYITITESPMDFFGGVYVPM 36
Cr_GI-482561003.pro -----MNGD--RPVEDAHYTRAEFFYAASCSYIDFYCGAPQCF 37
At_GI-22331928.pro -----MNGD--RQMGVHYIDTGFYITITESPMDFFGGVYVPM 38
Sl_GI-460370551.pro -----MNGD--QHEMAYHNMNGFPYVNPESFFGLDGVSAPI 37

```

* : ** . . . *

```

Zm_GI-223973923.pro DFALDGFQDQ--GNFYWMHHTNSYKYGYSGPG--NYTSAHVVIDDIDYMRADGGRR 92
Sb_GI-242042045.pro DFALDGFQDQ--GNFYWMHHTNSYKYGYSGPC--NYTSAHVVIDDIDYMRADGGRR 92
Zm_GI-226496789.pro DFALDGFQDQ--GNFYWMHHTNSYKYGYSGSC--NYTSAHVVIDDIDYMRADGGRR 92
Os_GI-222624282.pro DFALADAFHDQ--ANFYWMHHTNSYKYGYSGAG--NYTSAHVVIDDIDYMRADGGRR 114
Os_GI-115451045.pro DFALADAFHDQ--ANFYWMHHTNSYKYGYSGAG--NYTSAHVVIDDIDYMRADGGRR 92
Bd_GI-357113826.pro DFALADAFHDQ--ANFYWMHHTNSYKYGYSGAS--NYTSAHVVIDDIDYMRADGGRR 92
Sl_GI-460410949.pro NTIFADFPYAQ--ES-LYPSISTNPKYGYSEAGSFTYDIDREYVWMDYMRADGGRR 93
Rc_GI-255582236.pro HYAHTQQVLDQ--VQENAYWMDHMKYKFGSGPGST--YDF---YEVMDNLPMDVSRST 85
Pt_GI-224059640.pro HYAHTQPMHD--QDNAYWMDHMKYKFGSGPGSTYSP---YEVMDNLPMDVSRST 84
Gm_GI-356548935.pro NYAFAGSIPDQ--ESVYWMHHTNPKYKFGSGPGSTSYSS---YEVMDNLPMDVSRST 90
Gm_GI-356544176.pro NYAFAGSIPDQ--ESVYWMHHTNPKYKFGSGPGSTSYSS---YEVMDNLPMDVSRST 90
Vv_GI-359487286.pro NYAQALAMHNSQSIQENFYWMHHTNSYKYGYSGPGST--YDF---YEVMDNLPMDVSRST 92
Tc_GI-508704801.pro NYTHTVPMQDQ---ENIYWMHHTNPKYKFGSGPGST--YDF---YEVMDNLPMDVSRST 89
Fp_GI-462414664.pro NYTHAMPMHDQ---ETAYWMDHMKYKFGSGPGSNTSYGNT--YEVMDNLPMDVSRST 91
Cr_GI-482561003.pro NYTHAGTM----DMLYWMHHTNPKYKFGSGEDNPSFYNS---YDMHDLSPMSIGRTN 88
At_GI-22331928.pro NYTHAATMSPQ---DMLYWMHHTNPKYKFGSGEDNPSFYNS---YDMHDLSPMSIGRTN 92
Sl_GI-460370551.pro IQYHNSQVQIQ--DQENAYWMDHMKYKFGSNTSYGNT---ETGMDNLPMDVSRST 93

```

. . . * : ** . . . *

```

Zm_GI-223973923.pro WNTTTPVMDVDSANVVLQGG--EAPRTTNTINKECIQQ--VHQSPGSPVVMQDIDPDM 150
Sb_GI-242042045.pro WNTTTPVMDVDSANVVLQGS--EAPRTTNTITTEECIQQ--VHQSPGSPVVMQDIDPDM 150
Zm_GI-226496789.pro WNTTTPVMDVDSANVVLQGG--EAPRTTNTITTEECIQQ--VHQSPGSPVVMQDIDPDM 150
Os_GI-222624282.pro WDNATPVMDVDSANVVLQGG--ETPHANTSTTEECIQQVVMQSSSPQVVMQDIDPDM 173
Os_GI-115451045.pro WDNATPVMDVDSANVVLQGG--ETPHANTSTTEECIQQVVMQSSSPQVVMQDIDPDM 151
Bd_GI-357113826.pro WDNATPVMDVDSANVVLQGAARAFHFRASSTTEECIQQVVMQSSSPQVVMQDIDPDM 152
Sl_GI-460410949.pro LENDTTPVMDVDSANVVLQGG--EISGNSLTFNVECPG--QINTDSEVVMQDIDPDM 148
Rc_GI-255582236.pro WEYFVVMQEEA--TTDTQSEGDVAVVGHASPEECIPM--HT--SGDSPQVVMQDIDPDM 142
Pt_GI-224059640.pro WEYFVVMQEEA--TTDTQSEGDVAVVGHASPEECIPM--HT--SGDSPQVVMQDIDPDM 105
Gm_GI-356548935.pro WEYFSTITVEEPATDSDPFRDGVVSMQTIPEECSPM--KHESNSSSQVVMQDIDPDM 149
Gm_GI-356544176.pro WEYFSTITVEEPATDSDPFRDGVVSMQTIPEECSPM--KHESNSSSQVVMQDIDPDM 149
Vv_GI-359487286.pro WEYFSSM--IVREPTTITETQFCNEVMDVHAIPHECSPM--HY--SATSBQVVMQDIDPDM 149
Tc_GI-508704801.pro WYFSTL--NREEPATIDMQGGKAVVGINAIPHECITM--HQ--SNSSSQVVMQDIDPDM 146
Fp_GI-462414664.pro WEHFSVM--NREEPANIDSHPEEDAVA--EAPHECITM--QQ--NTNTSQVVMQDIDPDM 147
Cr_GI-482561003.pro WEYHFMVND--FDITLARSVQIGDSDEHSEARDCIAN--EHDPSQVVMQDIDPDM 145
At_GI-22331928.pro WYHFMVND--FDITLARSVQIGDSDEHSEARDCIAN--EHDPSQVVMQDIDPDM 150
Sl_GI-460370551.pro WEYHFMVND--FDITLARSVQIGDSDEHSEARDCIAN--EHDPSQVVMQDIDPDM 150

```

. . . * : ** . . . *

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- WO 2009047525 A [0043] [0069] [0073]
- US 5231020 A [0106]
- WO 9534668 A [0106]
- EP 1407000 B1 [0132]
- WO 9214828 A [0134]
- US 5100792 A [0135]
- EP 444882 A [0135]
- EP 434616 A [0135]
- EP 290395 A [0135]
- WO 8706614 A [0135]
- WO 9209696 A [0135]
- WO 9400583 A [0135]
- EP 331083 A [0135]
- EP 175966 A [0135]
- DE 4005152 [0135]
- WO 9012096 A [0135]
- US 4684611 A [0135]
- EP 486234 A [0136]
- EP 486233 A [0136]

10 Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **ALONSO-BLANCO, C.** PNAS USA, 1999, vol. 96, 4710-7 [0002]
- **SONG, X.J.** Nat Genet, 2007, vol. 39, 623-30 [0002] [0003]
- **WEISS, J.** Int J Dev Biol, 2005, vol. 49, 513-25 [0002]
- **DINNENY, J.R.** Development, 2004, vol. 131, 1101-10 [0002] [0003]
- **DISCH, S.** Curr Biol, 2006, vol. 16, 272-9 [0002]
- Science, 2000, vol. 289, 85-8 [0002]
- **HORIGUCHI, G.** Plant J, 2005, vol. 43, 68-78 [0002] [0003]
- **HU, Y.** Plant J, 2006, vol. 47, 1-9 [0002] [0003]
- **HU, Y.** Plant Cell, 2003, vol. 15, 1951-61 [0002]
- **KRIZEK, B.A.** Dev Genet, 1999, vol. 25, 224-36 [0002] [0003]
- **MIZUKAMI, Y.** PNAS USA, 2000, 102, 3117-3122 [0003]
- **JOFUKU, K.D.** PNAS USA, 2005, vol. 102, 3117-3122 [0003]
- **MIZUKAMI, Y.** Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, vol. 97, 942-7 [0003]
- **ALTSCHUL et al.** J. Mol. Biol., 1990, vol. 215, 405-410 [0088]
- **PEARSON ; LIPMAN.** PNAS USA, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0088]
- **SMITH; WATERMAN.** J. Mol Biol., 1981, vol. 147, 195-197 [0088]
- Nucl. Acids Res., 1997, vol. 25, 3389-3402 [0088]
- In Vitro Mutagenesis Protocols; Methods in Molecular Biology [0096]
- **SAMBROOK J et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSH Press, 2012 [0096]
- Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 2013 [0096]
- **URNOV, F.D. et al.** Nature reviews.

- vol. 97, 942-7 [0002]
- **NATH, U.** Science, 2003, vol. 299, 1404-7 [0002] [0003]
 - **OHNO, C.K.** Development, 2004, vol. 131, 1111-22 [0002] [0003]
 - **SZECSI, J.** Embo J, 2006, vol. 25, 3912-20 [0002] [0003]
 - **WHITE, D.W.** PNAS USA, 2006, vol. 103, 13238-43 [0002] [0003]
 - **HORVATH, B.M.** Embo J, 2006, vol. 25, 4909-20 [0002] [0003]
 - **GARCIA, D.** Plant Cell, 2005, vol. 17, 52-60 [0002] [0003]
 - **FAN, C.** Theor. Appl. Genet., 2006, vol. 112, 1164-1171 [0003]
 - **SCHRUFF, M.C.** Development, 2006, vol. 137, 251-261 [0003]
 - **OHTO, M.A.** PNAS USA, 2005, vol. 102, 3123-3128 [0003]
 - **FIRE A. et al.** Nature, 1998, vol. 391 [0108]
 - **ZAMORE P.D.** Nature Structural Biology, 2001, vol. 8 (9), 746-750 [0108]
 - **JOHN et al.** PLoS Biology, 2004, vol. 11 (2), 1862-1879 [0112]
 - **MYERS.** Nature Biotechnology, 2003, vol. 21, 324-328 [0114]
 - **SHINAGAWA et al.** Genes and Dev., 2003, vol. 17, 1340-5 [0114]
 - **SMITH et al.** Nature, 1988, vol. 334, 724-726 [0117]
 - **ENGLISH et al.** The Plant Cell, 1996, vol. 8, 179-188 [0117]
 - **BOURQUE.** Plant Science, 1995, vol. 105, 125-149 [0117]
 - **FLAVEL.** PNAS USA, 1994, vol. 91, 3490-3496 [0117]
 - **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0130]
 - **AUSUBEL et al.** Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1992 [0130]
 - **BEVAN.** Nucl. Acids Res., 1984, vol. 12, 8711-8721 [0130]
 - Plant transformation and expression Genetics, 2010, vol. 11, 636-646 [0096]
 - **JOUNG, J.K. et al.** Nature reviews. Molecular cell biology, 2013, vol. 14, 49-55 [0096]
 - **GASIUNAS, G. et al.** PNAS USA, 2012, vol. 109, E2579-2586 [0096]
 - **CONG, L. et al.** Science, 2013, vol. 339, 819-823 [0096]
 - **VAN DER KROL et al.** The Plant Cell, 1990, vol. 2, 291-299 [0106]
 - **NAPOLI et al.** The Plant Cell, 1990, vol. 2, 279-289 [0106]
 - **ZHANG et al.** The Plant Cell, 1992, vol. 4, 1575-1588 [0106] [0117]
 - **ANGELL ; BAULCOMBE.** The EMBO Journal, 1997, vol. 16 (12), 3675-3684 [0106]
 - **VOINNET ; BAULCOMBE.** Nature, 1997, vol. 389, 553 [0106]
 - **WEEKS et al.** Plant Physiology, 1993, vol. 102, 1077-1084 [0134]
 - **SOMERS et al.** Bio/Technology, 1992, vol. 10, 1589-1594 [0134]
 - **NILSSON, O. et al.** Transgenic Research, 1992, vol. 1, 209-220 [0134]
 - **GREEN et al.** Plant Tissue and Cell Culture. Academic Press, 1987 [0135]
 - **FREEMAN et al.** Plant Cell Physiol., 1984, vol. 29, 1353 [0135]
 - **KINDLE.** PNAS U.S.A., 1990, vol. 87, 1228 [0135]
 - **OARD.** Biotech. Adv., 1991, vol. 9, 1-11 [0135]
 - Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.
 - **VASIL et al.** Laboratory Procedures and Their Applications. Academic Press, 1984, vol. I, II and III [0137]
 - **WEISSBACH ; WEISSBACH.** Methods for Plant Molecular Biology. Academic Press, 1989 [0137]
 - **SAMBROOK ; RUSSELL.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0157]
 - Current Protocols in Molecular Biology.

- vectors. **GUERINEAU** ;
MULLINEAUX. Plant Molecular Biology Labfax. BIOS Scientific Publishers, 1993, 121-148 [0130]
- **TORIYAMA et al.** Bio/Technology, 1988, vol. 6, 1072-1074 [0134]
 - **ZHANG et al.** Plant Cell Rep., 1988, vol. 7, 379-384 [0134]
 - **ZHANG et al.** Theor Appl Genet, 1988, vol. 76, 835-840 [0134]
 - **SHIMAMOTO et al.** Nature, 1989, vol. 338, 274-276 [0134]
 - **DATTA et al.** Bio/Technology, 1990, vol. 8, 736-740 [0134]
 - **CHRISTOU et al.** Bio/Technology, 1991, vol. 9, 957-962 [0134]
 - **PENG et al.** International Rice Research Institute, 1991, 563-574 [0134]
 - **CAO et al.** Plant Cell Rep., 1992, vol. 11, 585-591 [0134]
 - **LI et al.** Plant Cell Rep., 1993, vol. 12, 250-255 [0134]
 - **RATHORE et al.** Plant Molecular Biology, 1993, vol. 21, 871-884 [0134]
 - **FROMM et al.** Bio/Technology, 1990, vol. 8, 833-839 [0134]
 - **GORDON-KAMM et al.** Plant Cell, 1990, vol. 2, 603-618 [0134]
 - **D'HALLUIN et al.** Plant Cell, 1992, vol. 4, 1495-1505 [0134]
 - **WALTERS et al.** Plant Molecular Biology, 1992, vol. 18, 189-200 [0134]
 - **KOZIEL et al.** Biotechnology, 1993, vol. 11, 194-200 [0134]
 - **VASIL, I. K.** Plant Molecular Biology, 1994, vol. 25, 925-937 [0134]
 - **GEGAS, V.C. et al.** Plant Cell, 2010, vol. 22, 1046-1056 [0233]
 - **GOMEZ, J.M.** Int J Org Evol, vol. 58, 71-80 [0233]
 - **HOELLER, D. et al.** Mol Cell, 2007, vol. 26, 891-898 [0233]
 - **HU, Y. et al.** Plant Cell, 2003, vol. 15, 1951-1961 [0233]
 - **JOFUKU, K.D. et al.** PNAS USA, 2005, vol. 102, 3117-3122 [0233]
 - **KAUR, N. et al.** J Int Plant Biol, John Wiley & Sons, 1992 [0157]
 - The Practical Approach Series. DNA Cloning. IRL Press, 1995 [0157]
 - **INNIS et al.** PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, 1990 [0157]
 - **NOLLAU et al.** Clin. Chem., 1997, vol. 43, 1114-1120 [0157]
 - Laboratory Protocols for Mutation Detection. Oxford University Press, 1996 [0157]
 - **NEWTON; GRAHAM.** PCR. BIOS Scientific Publishers Limited, 1997 [0157]
 - **D M KEMENY.** A Practical Guide to ELISA. Pergamon Press, 1991 [0158]
 - **C P PRICE ; D J NEWMAN.** Principles and Practice of Immunoassay. Stockton Press in USA & Canada and by Macmillan Reference in the United Kingdom, 1997 [0158]
 - **ADAMSKI, N.M. et al.** PNAS USA, 2009, vol. 106, 20115-20120 [0233]
 - **ALEXANDRU, G. et al.** Cell, 2008, vol. 134, 804-816 [0233]
 - **ALONSO-BLANCO, C. et al.** PNAS USA, 1999, vol. 96, 4710-4717 [0233]
 - **BANDAU, S. et al.** BMC Biol, 2012, vol. 10, 36 [0233]
 - **BEDNAREK, J. J.** Exp. Bot., 2012, vol. 63 (16), 5945-5955 [0233]
 - **CURTIS, M.D. et al.** Plant physiology, 2003, vol. 133, 462-469 [0233]
 - **DISCH, S. et al.** Curr Biol, 2006, vol. 16, 272-279 [0233]
 - **FAN, C. et al.** Theor Appl Genet, 2006, vol. 112, 1164-1171 [0233]
 - **FANG, W. et al.** Plant J, 2012, vol. 70, 929-939 [0233]
 - **GARCIA, D. et al.** Plant Cell, 2005, vol. 17, 52-60 [0233]
 - **GARCIA, D. et al.** Plant Physiology, 2003, vol. 131, 1661-1670 [0233]
 - **SCHNELL, J.D. et al.** J Biol Chem, 2003, vol. 278, 35857-35860 [0233]
 - **SCHRUFF, M.C. et al.** Development, 2006, vol. 133, 251-261 [0233]
 - **SEO, H.S. et al.** Nature, 2003, vol. 423,

- 2013, vol. 55, 108-120 [0233]
- **KRIZEK, B.A.** Dev Genet, 1999, vol. 25, 224-236 [0233]
 - **LANCTOT, A.A. et al.** Developmental cell, 2013, vol. 25, 241-255 [0233]
 - **LI, Y. et al.** Genes Dev, 2008, vol. 22, 1331-1336 [0233]
 - **LI, Y. et al.** Genome Res, 2006, vol. 16, 414-427 [0233]
 - **LOPES, M.A. et al.** Plant Cell, 1993, vol. 5, 1383-1399 [0233]
 - **LUO, M. et al.** PNAS USA, 2005, vol. 102, 17531-17536 [0233]
 - **MIZUKAMI, Y et al.** PNAS USA, 2000, vol. 97, 942-947 [0233]
 - **MOLES, A.T. et al.** Science, 2005, vol. 307, 576-580 [0233]
 - **OHTO, M.A. et al.** PNAS USA, 2005, vol. 102, 3123-3128 [0233]
 - **OHTO, M.A. et al.** Sex Plant Reprod, 2009, vol. 22, 277-289 [0233]
 - **ORSI, C.H. et al.** PLoS Genet, 2009, vol. 5, e1000347 [0233]
 - **PEREZ-PEREZ, J.M. et al.** Trends Genet, 2009, vol. 25, 368-376 [0233]
 - **PLATTA, H.W. et al.** Mol Cell Biol, 2009, vol. 29, 5505-5516 [0233]
 - **SHOMURA, A. et al.** Nat Genet, 2008, vol. 40, 1023-1028 [0233]
 - **SMALLE, J. et al.** Annual review of plant biology, 2004, vol. 55, 555-590 [0233]
 - **SONG, X.J. et al.** Nat Genet, 2007, vol. 39, 623-630 [0233]
 - **STONE, S.L. et al.** Plant physiology, 2005, vol. 137, 13-30 [0233]
 - **VAN DAELE, I. et al.** Plant Biotech J, 2012, vol. 10, 488-500 [0233]
 - **VERMA, R. et al.** Cell, 2004, vol. 118, 99-110 [0233]
 - **VOINNET, O. et al.** Plant J, 2003, vol. 33, 949-956 [0233]
 - **WANG, A. et al.** Plant J., 2010 [0233]
 - **WANG et al.** African Journal of Biotechnology, 2012, vol. 11, 13387-13395 [0233]
 - **WENG, J. et al.** Cell Res, 2008, vol. 18, 1199-1209 [0233]
 - **WESTOBY, M. et al.** Ann. Rev. Ecol. System., 2002, vol. 33, 125-159 [0233]
 - **WHITE, D.W.** PNAS USA, 2006, vol. 103, 13238-13243 [0233]
 - **WOELK, T. et al.** Nat Cell Biol, 2006, vol. 8, 1246-1254 [0233]
 - **XIE, Q. et al.** Nature, 2002, vol. 419, 167-170 [0233]
 - **XU, R. et al.** Development, 2011, vol. 138, 4545-4554 [0233]
 - **ZHOU, Y. et al.** Plant Cell, 2009, vol. 21, 106-117 [0233]

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1

A = Toplam tohum yüzdesi (tohum alanı)

5 B = Tohum büyüklüğü

C = vahşi tip değer yüzdesi (beher meyve için tohum sayısı)

D = vahşi tip değer yüzdesi (beher bitki için tohum ağırlığı)

E = vahşi tip değer yüzdesi (beher bitki için tohum sayısı)

F = vahşi tip değer yüzdesi (bitki boyu)

10

ŞEKİL 3

G = vahşi tip değer yüzdesi (tohum ağırlığı)

ŞEKİL 4

15 H = vahşi tip değer yüzdesi (kotiledon alanı)

I = vahşi tip değer yüzdesi (embriyo hücrelerinin büyüklüğü)

J = vahşi tip değer yüzdesi (tohum alanı)

ŞEKİL 6

20 K = Tohum alanı

ŞEKİL 7

L = vahşi tip değer yüzdesi (Ovül alanı)

M = Dış integumentte bulunan hücreler

25 N = Dış integument hücre uzunluğu

ŞEKİL 8

O = RING

ŞEKİL 10

$P = DA2/ACTIN7$ oranı

$R =$ vahşi tip değerin yüzdesi (petal alanı)

5 **ŞEKİL 12**

$S =$ blot boyama

ŞEKİL 13

$T =$ C-terminal

10

ŞEKİL 15

$U =$ vahşi tip değerin yüzdesi (çiçek ağırlığı)

$V =$ vahşi tip değerin yüzdesi (petal hücre büyüklüğü)

$Y =$ vahşi tip değerin yüzdesi (palisat hücrelerin büyüklüğü)

15 $Z =$ vahşi tip değerin yüzdesi

$A1 =$ vahşi tip değerin yüzdesi (yaprak büyüklüğü)

ŞEKİL 18

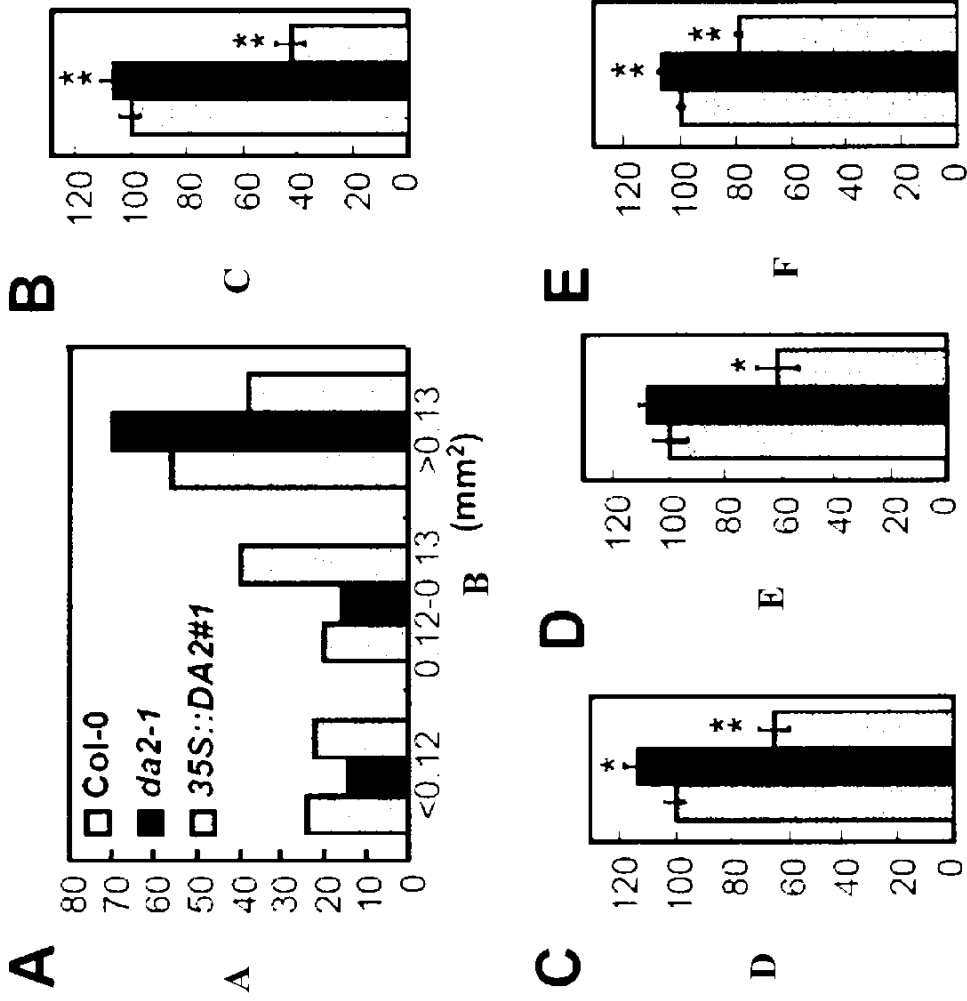
$B1 =$ döngü

20

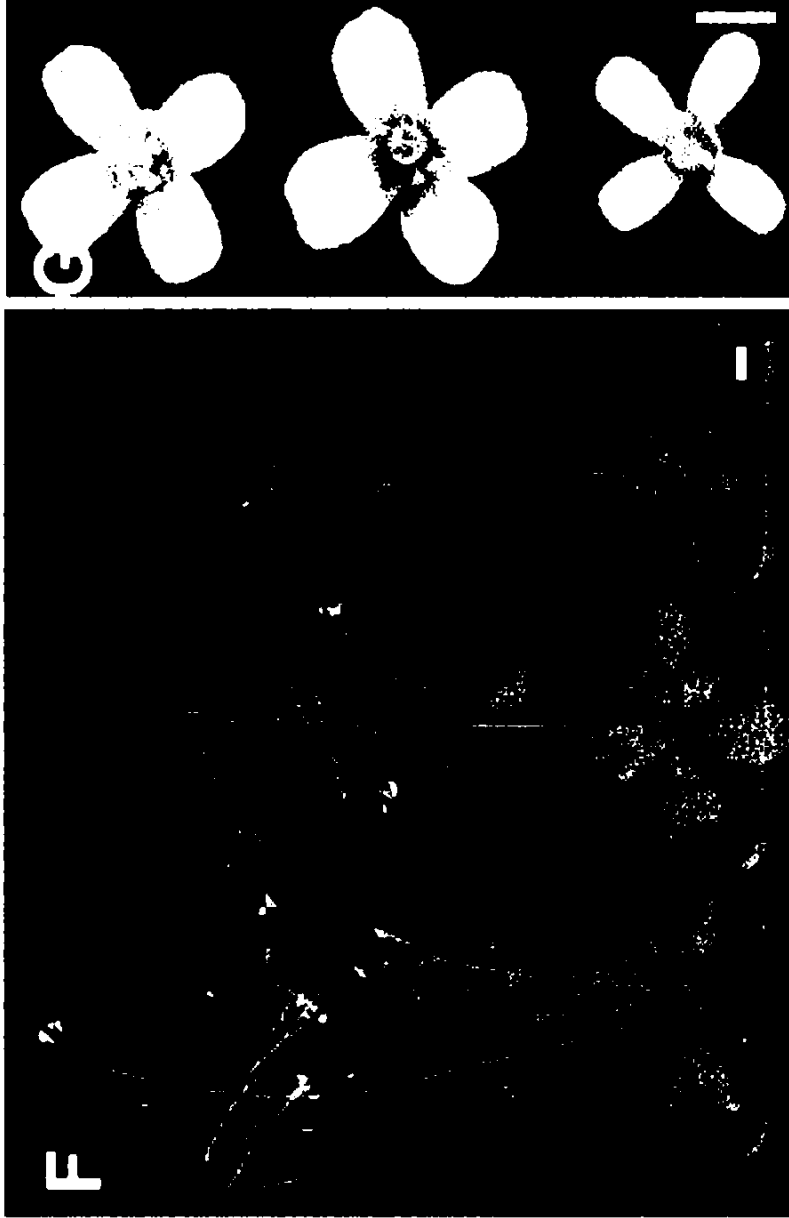
ŞEKİL 19

$C1 = GW2/ACTIN7$ oranı

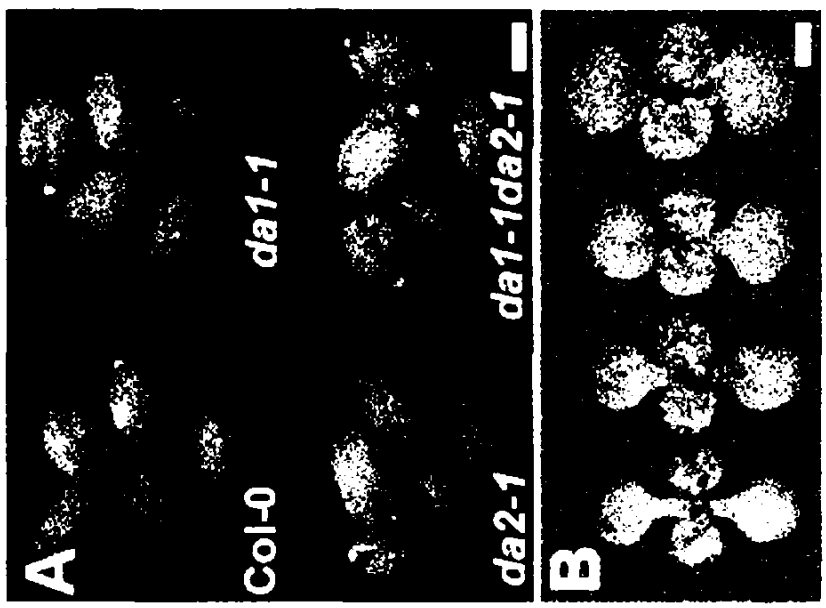
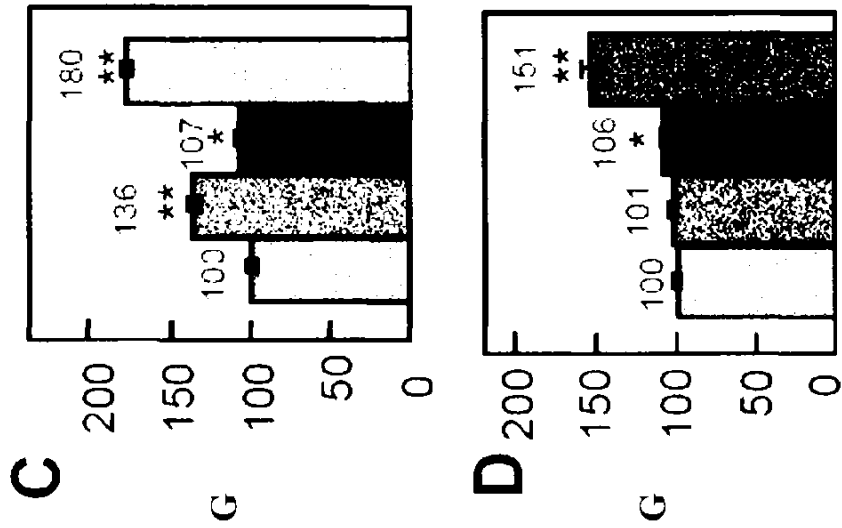
25



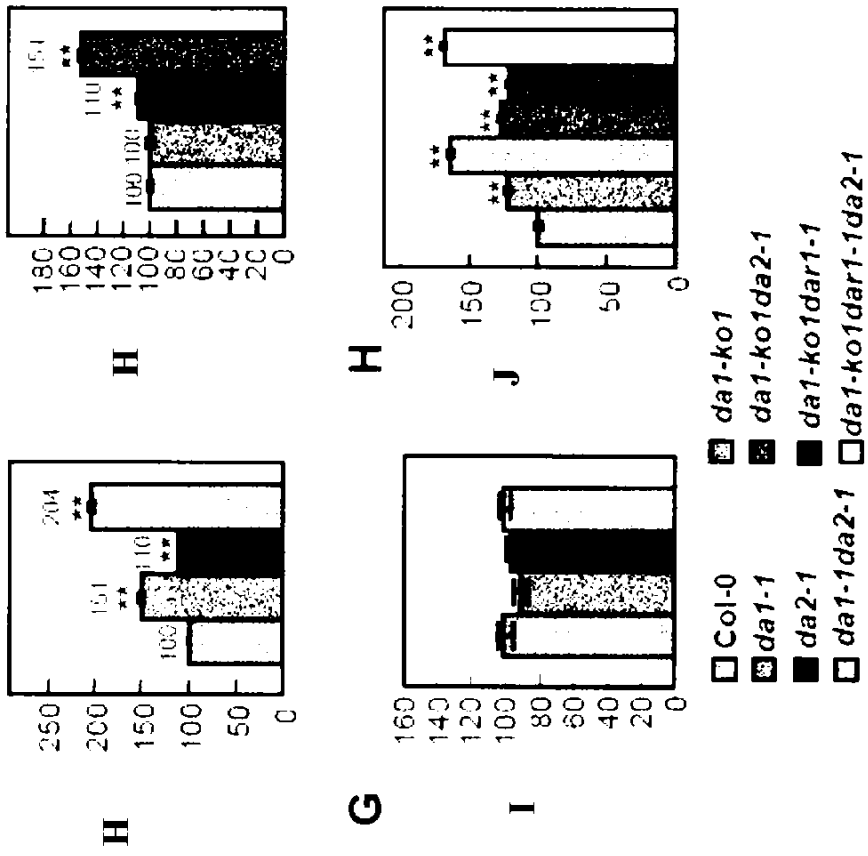
ŞEKİL 1



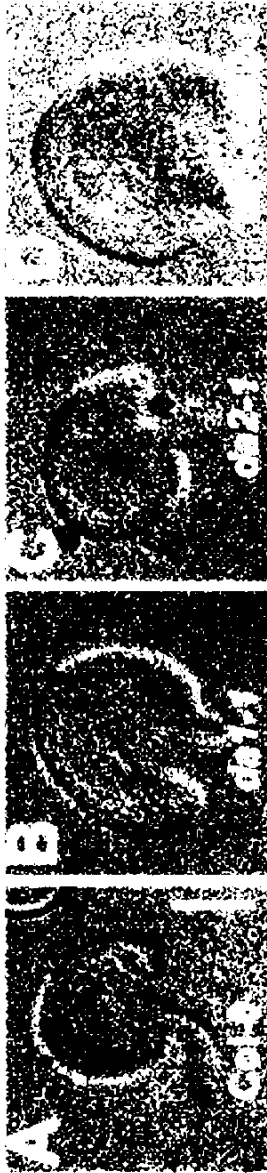
ŞEKİL 2



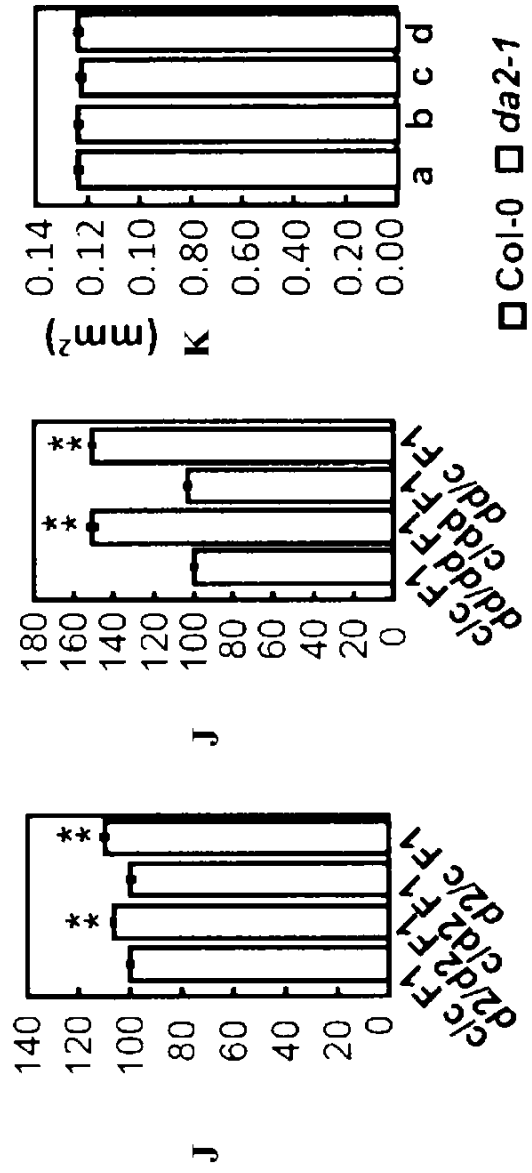
ŞEKİL 3



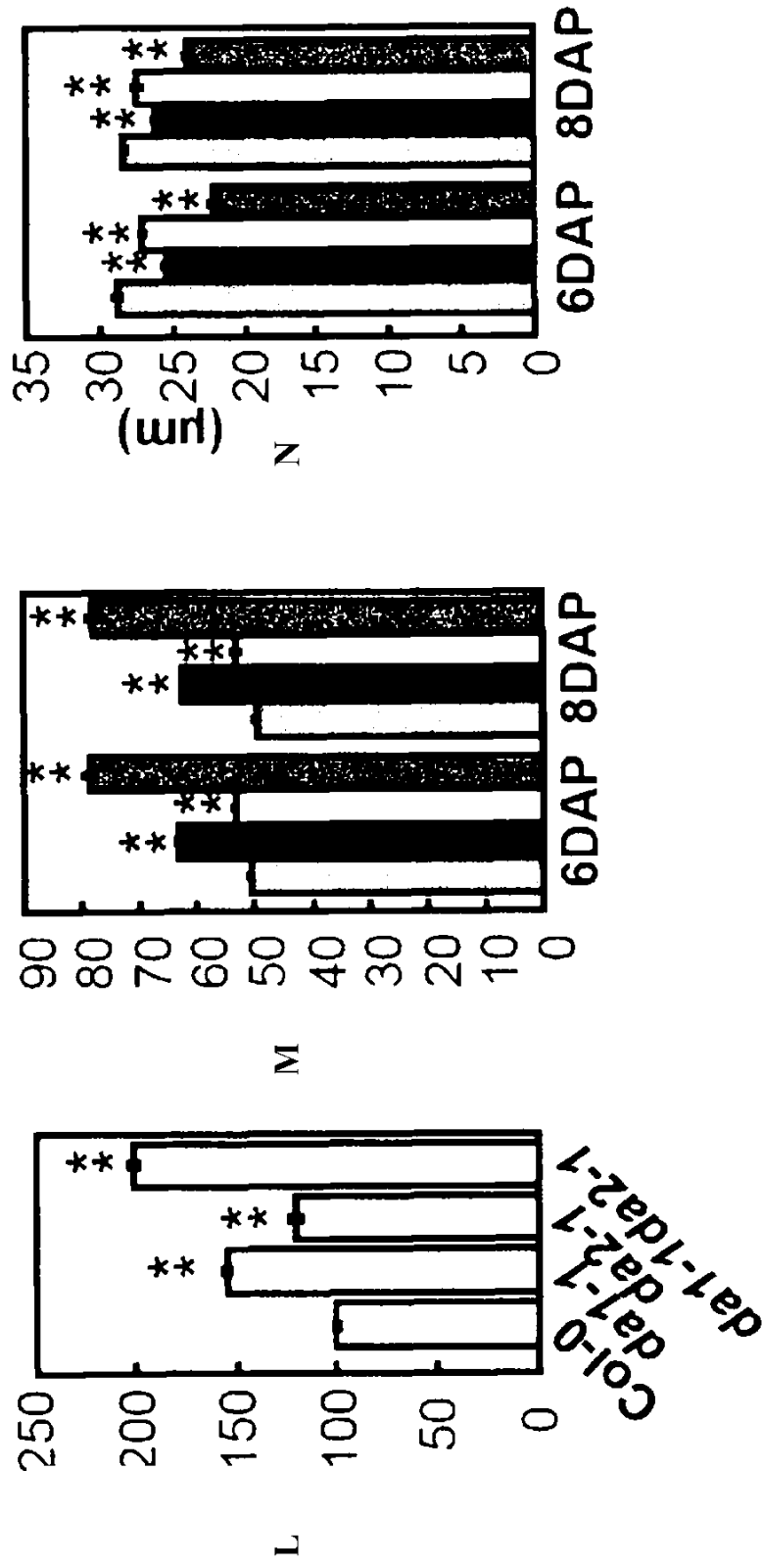
ŞEKİL 4



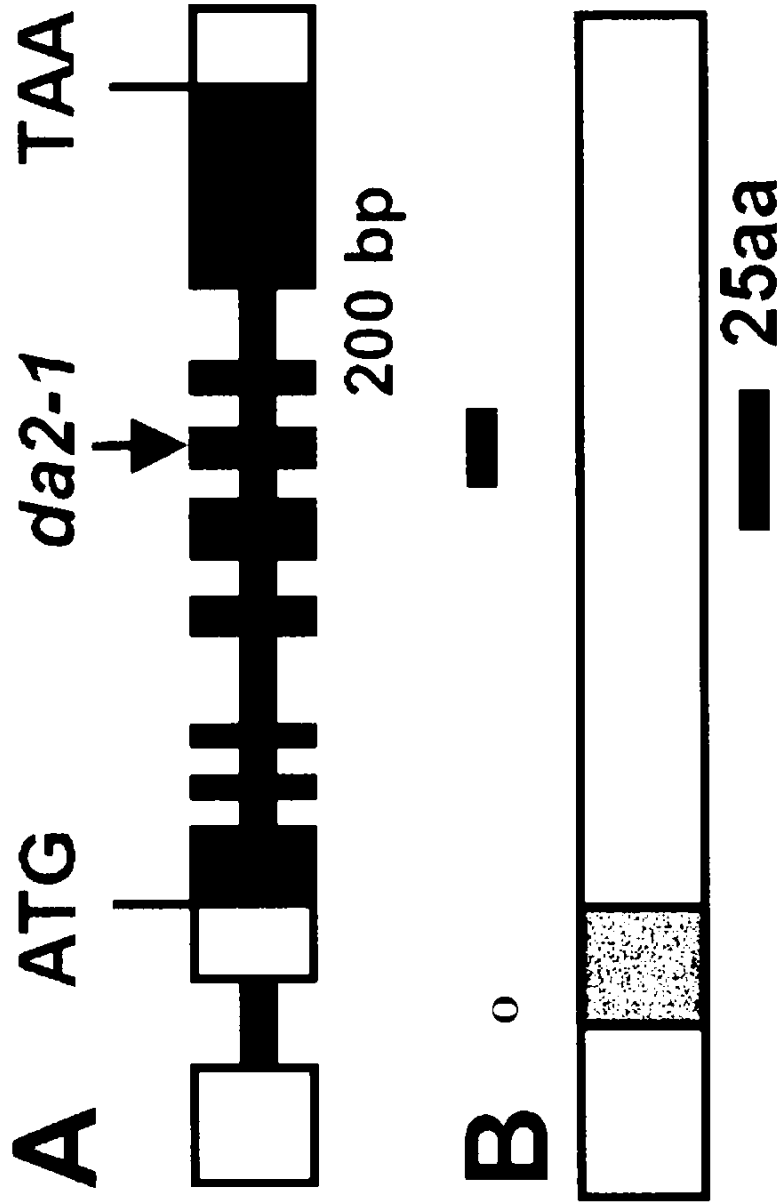
ŞEKİL 5



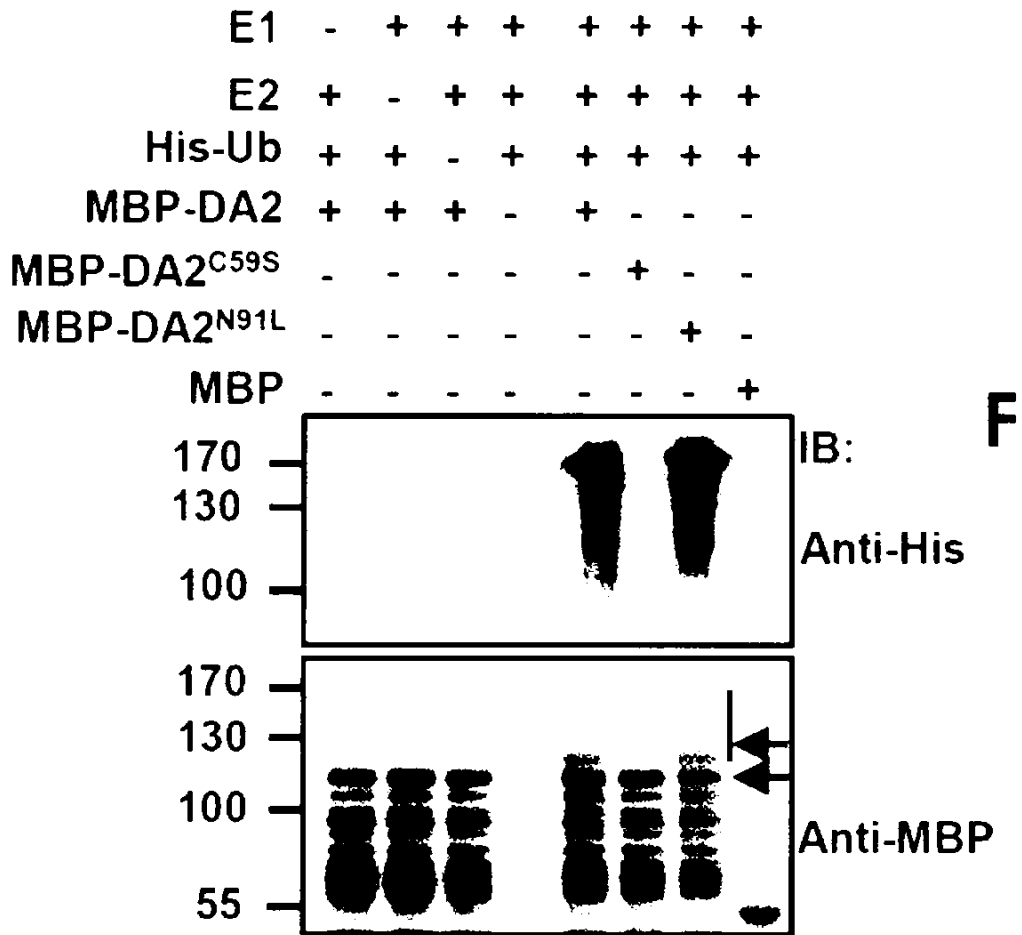
ŞEKİL 6



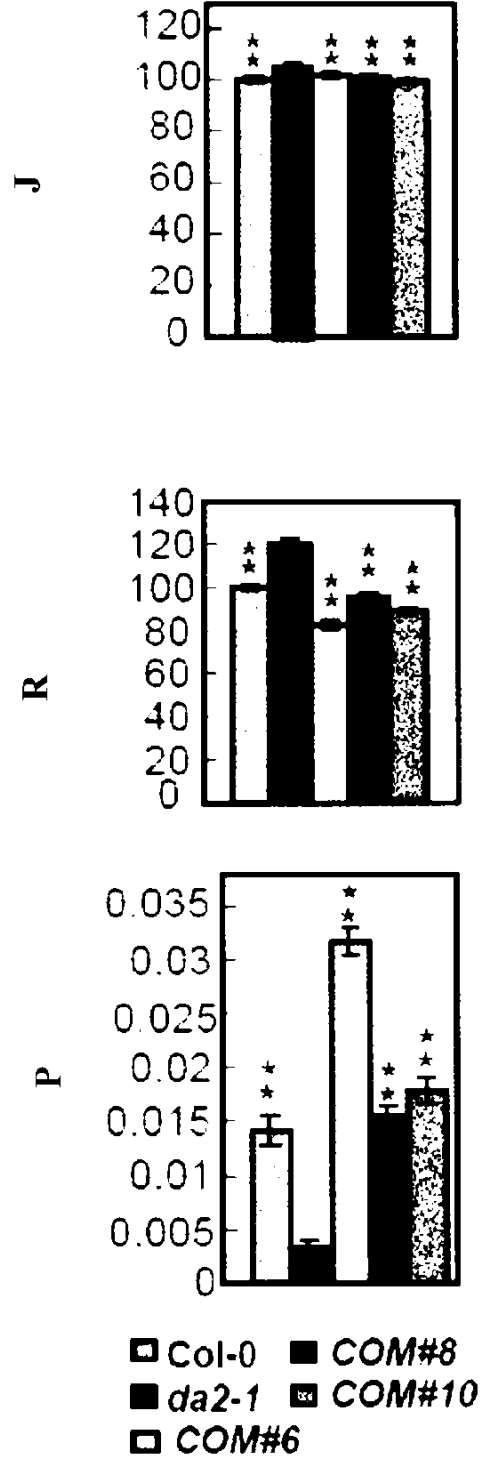
ŞEKİL 7



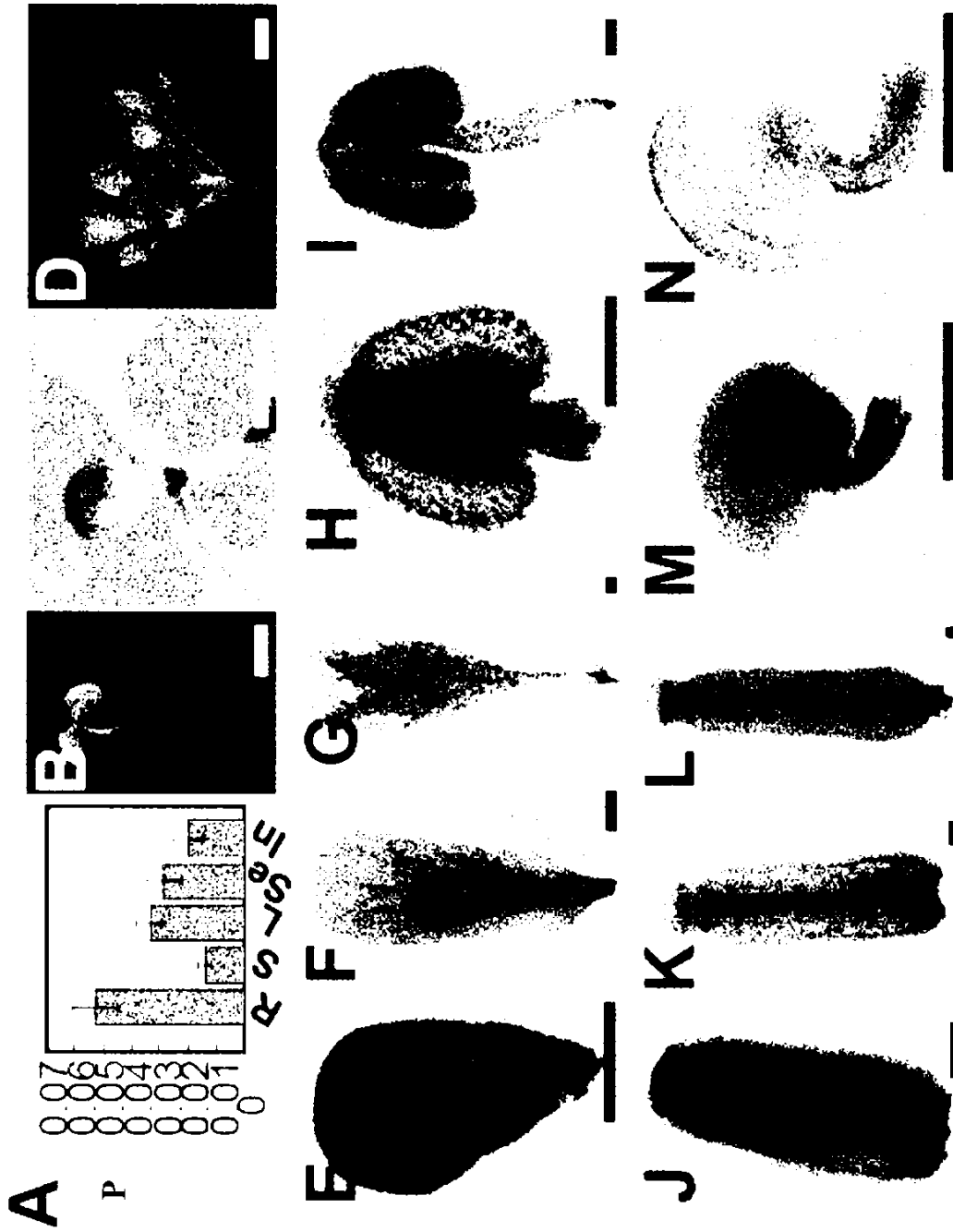
ŞEKİL 8



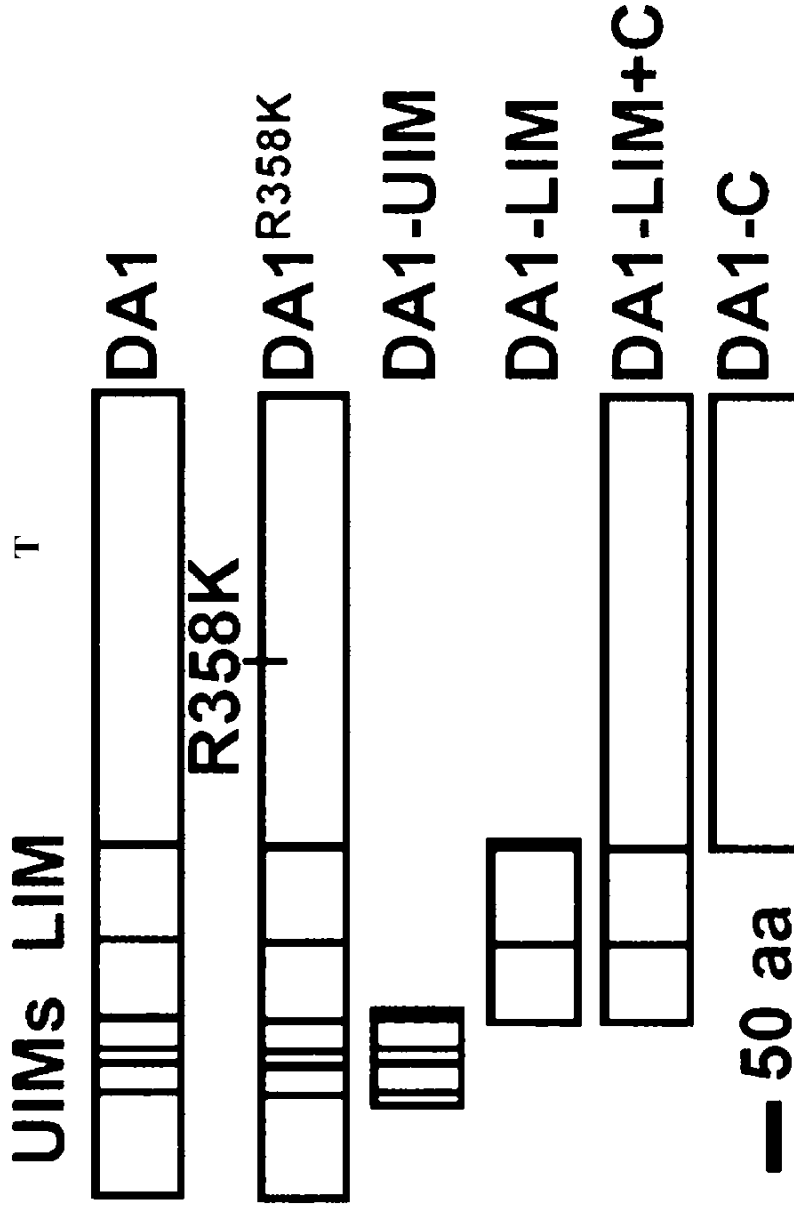
ŞEKİL 9



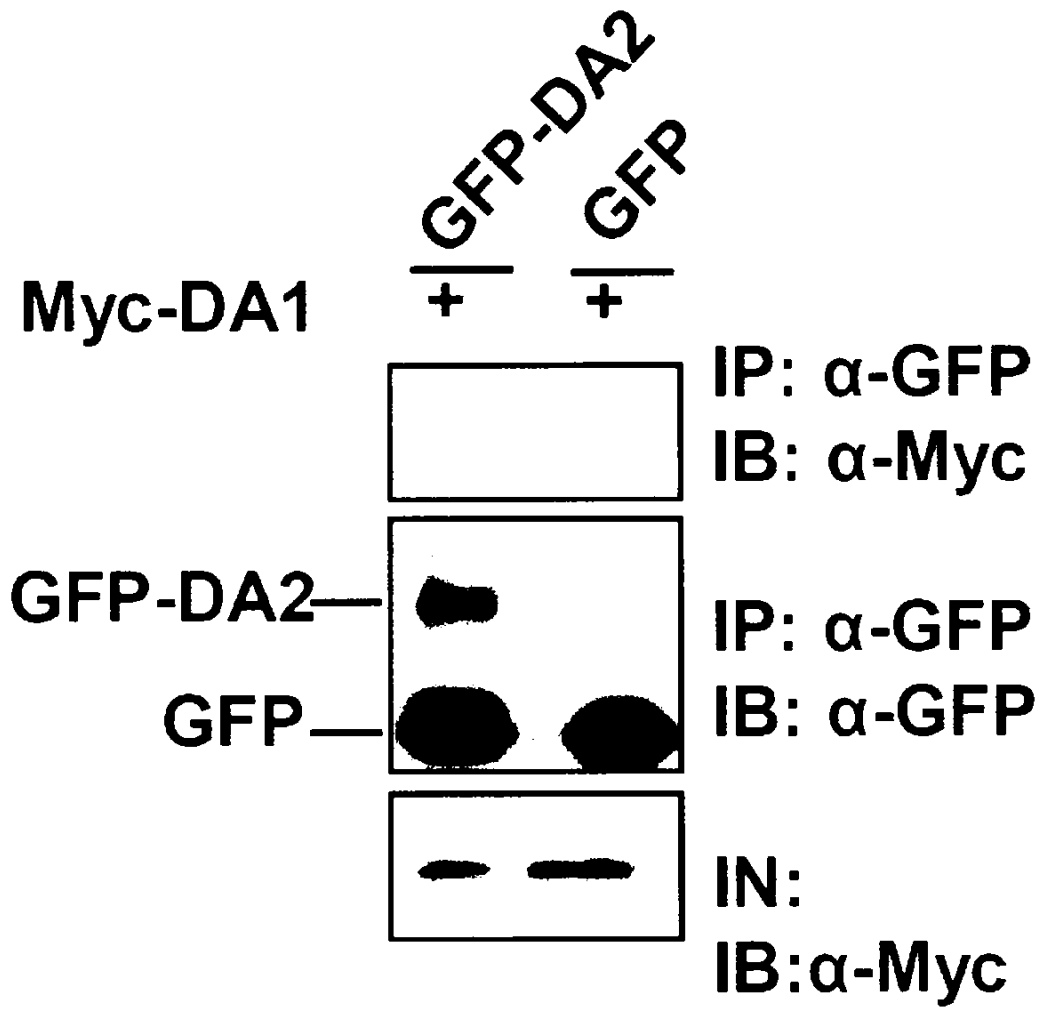
ŞEKİL 10



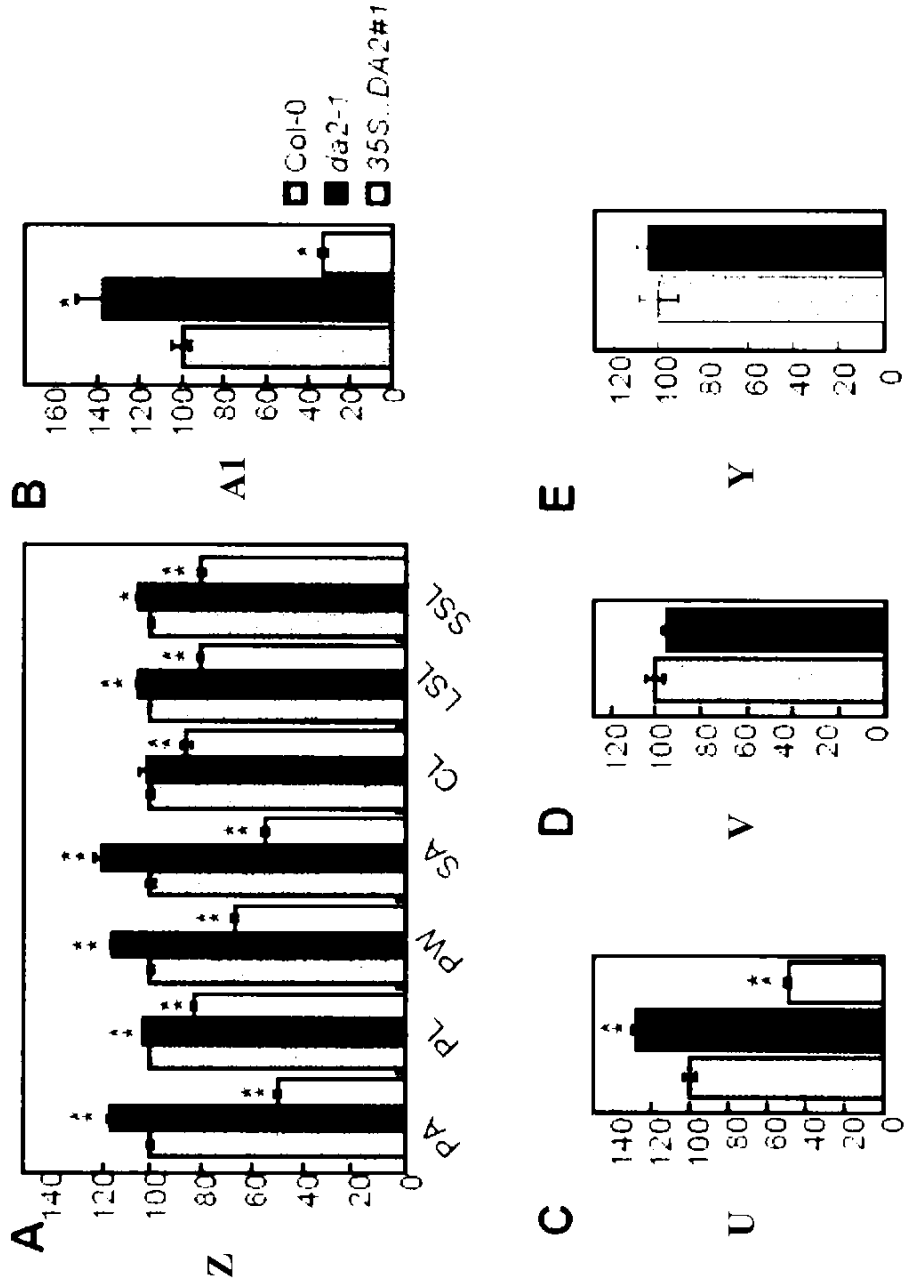
ŞEKİL 11



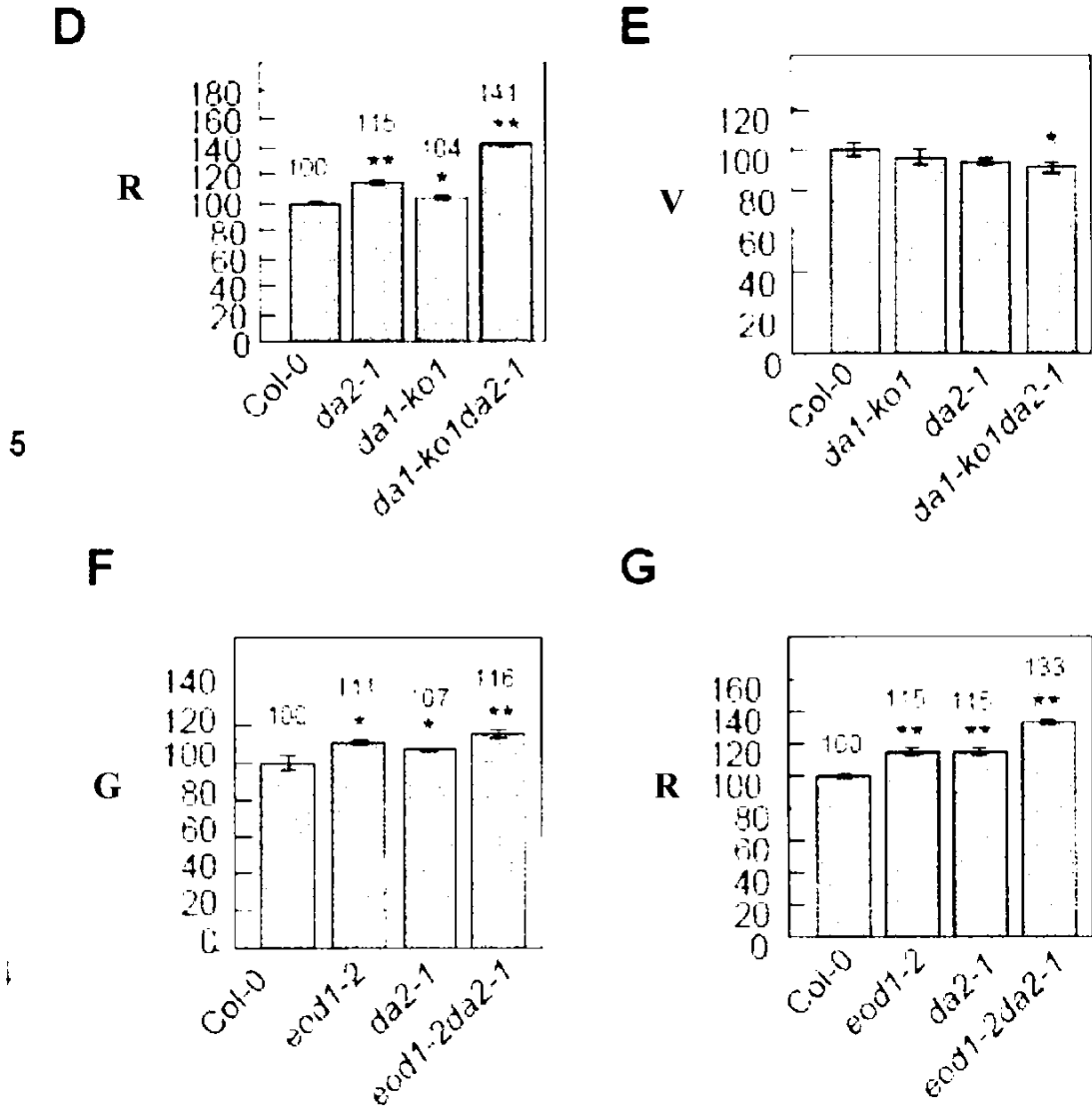
ŞEKİL 13



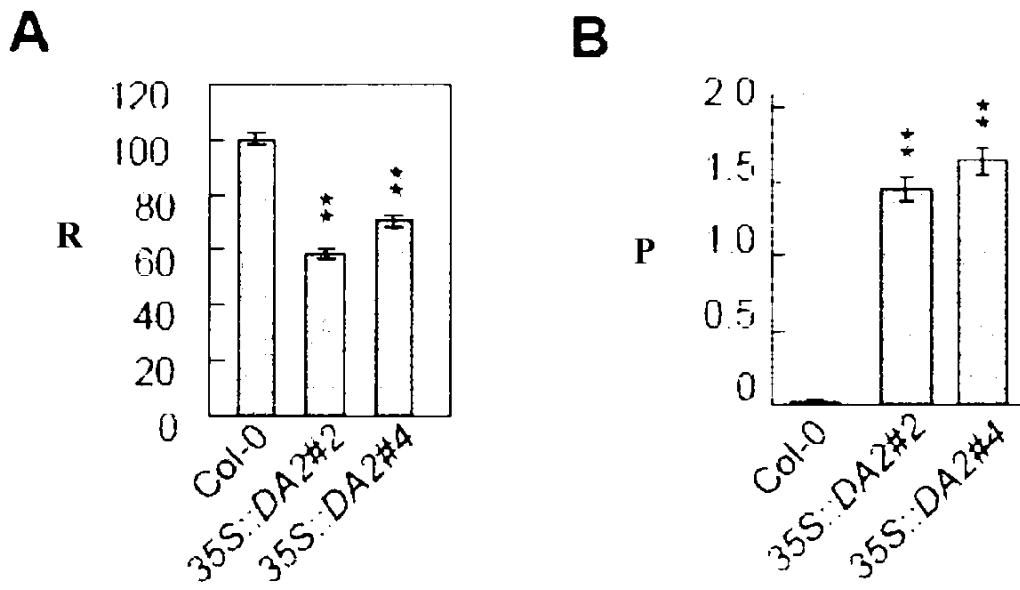
ŞEKİL 14



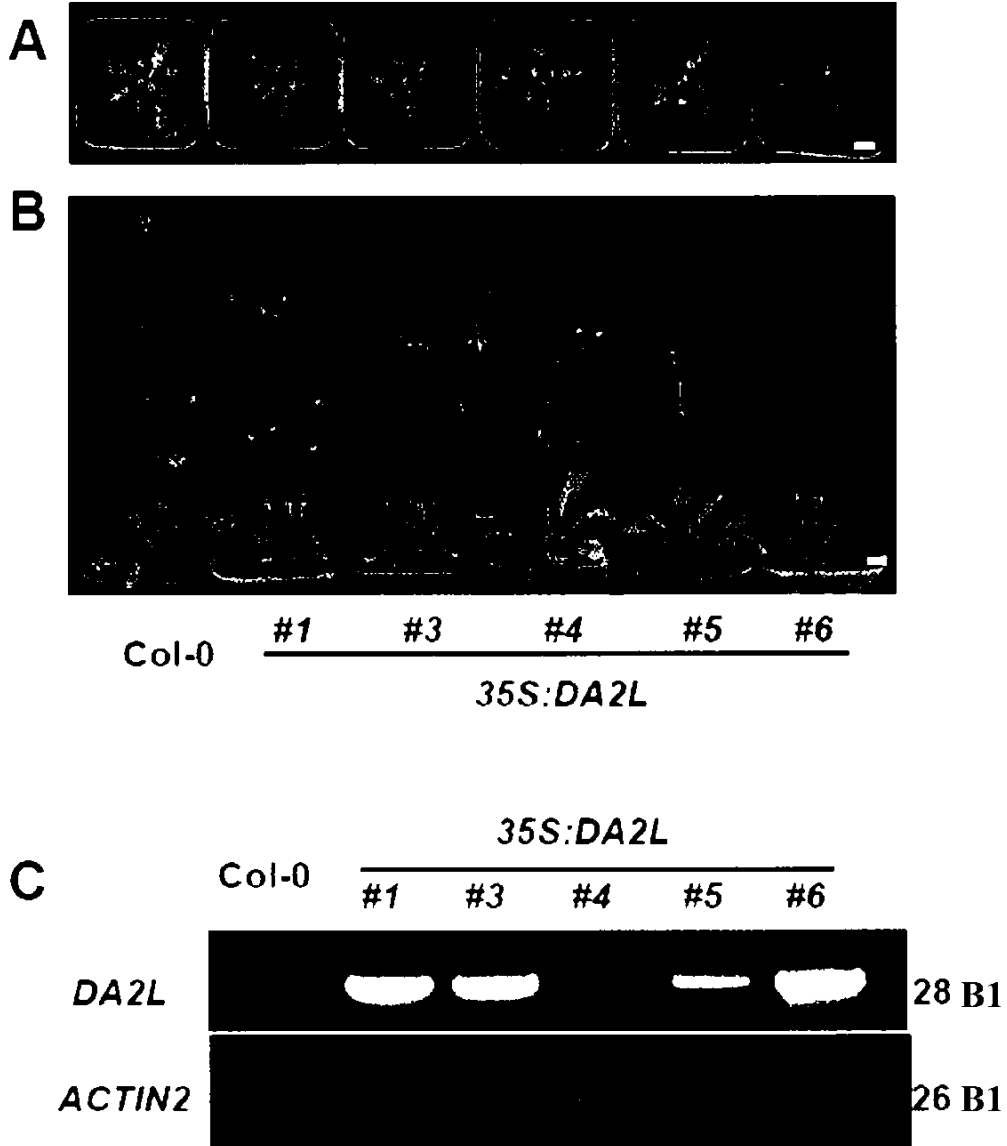
ŞEKİL 15



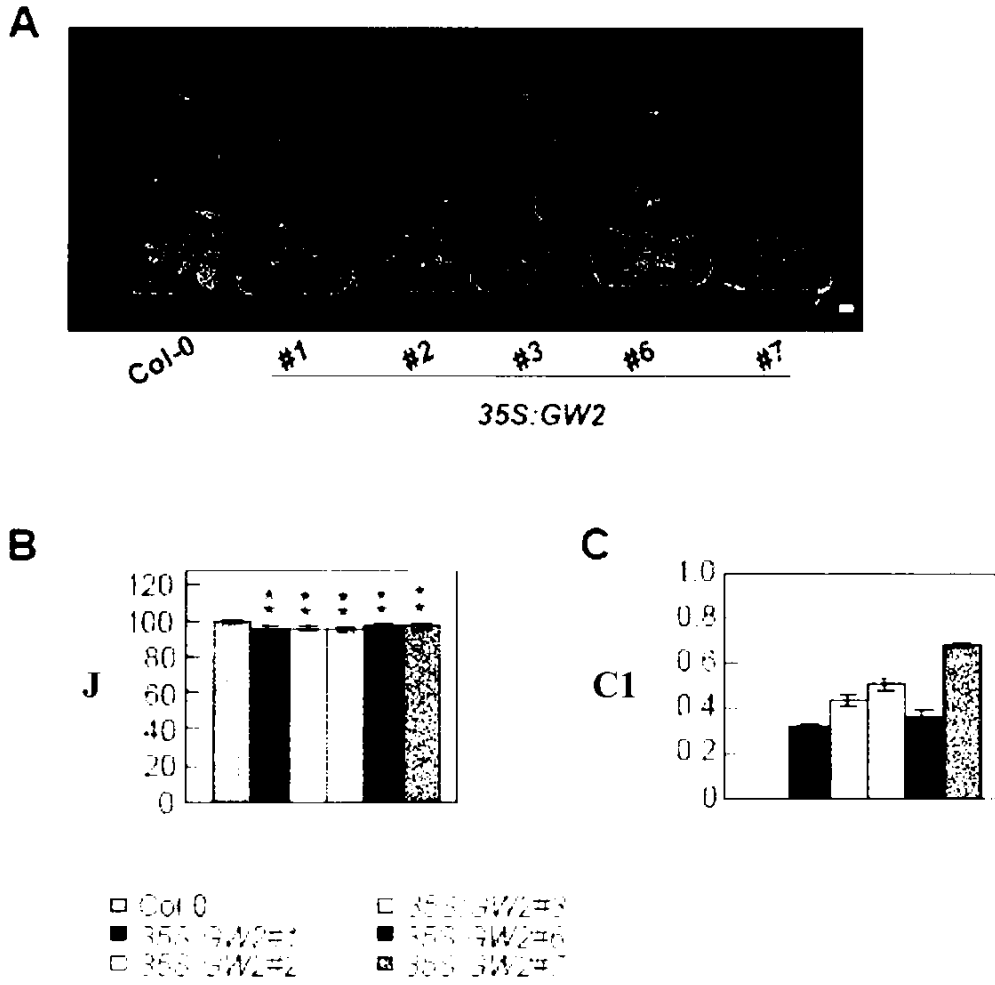
ŞEKİL 16



ŞEKİL 17



ŞEKİL 18



ŞEKİL 19