



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.12.13**

**(21)** Номер заявки  
**201792344**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.04.11**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/29** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

**(54) ГЕН МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ ПШЕНИЦЫ WMS И ЕГО ПРОМОТОР  
СПЕЦИФИЧНОЙ ДЛЯ ПЫЛЬНИКА ЭКСПРЕССИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

**(31)** 201510303817.0

**(32)** 2015.06.04

**(33)** CN

**(43)** 2018.08.31

**(86)** PCT/IB2016/000537

**(87)** WO 2016/193798 2016.12.08

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ШАНЬДУН АГРИКАЛЧЕРАЛ  
ЮНИВЕРСИТИ (CN)**

**(72)** Изобретатель:  
**Фу Даолинь (US), Луо Миньчэн, Ци  
Цзюань, Ни Фэй, Люй Бо, Ван Шуюнь  
(CN)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** CN-A-104911194

DUAN, J. et al. "TSA: Triticum aestivum  
Ta\_Contig15055.ansp mRNA sequence" GENBANK  
ACCESSION JV888005, 17 August 2012  
(2012-08-17), see the whole document

DUAN, J. et al. "TSA: Triticum aestivum  
Ta\_Contig15055.ansp mRNA sequence" GENBANK  
ACCESSION JV888005, 17 August 2012  
(2012-08-17), see the whole document

CN-A-102533761

LIU, Xiuzhen et al. "Study of genes differential  
expression in wheat of Taigu genic malesterile using  
DDRT-PCR" Acta Botanica Boreali-Occidentalia  
Sinica, Vol. 23, No. 12, 31 December 2003  
(2003-12-31), ISSN: 1000-4025, pages 2163-2166,  
see the whole document

SUN, Zhengjuan. "The differentiation of  
protein expression of Ms2 in Taigu nuclear  
malesterility wheat" Chinese Master's Theses Full-text  
Database Agriculture Science and Technology, No. 8,  
15 August 2011 (2011-08-15), ISSN: 1674-0246, page  
D047-49, see the whole document

WANG, Huina. "Different proteomics research  
of wheat Taigu sterile near-isogenic lines" Chinese  
Master's Theses Full-text Database Agriculture  
Science and Technology, No. 12, 15 December 2014  
(2014-12-15), ISSN: 1674-0246, page D047-54, see  
the whole document

**(57)** Согласно настоящему изобретению предложен новый ген WMS, обеспечивающий мужскую стерильность пшеницы, его промотор специфичной для пыльника экспрессии и варианты их применения. Хорошо известный ген Ms2, вызывающий доминантную мужскую стерильность пшеницы, широко применялся для повторяющейся селекции в Китае. Подход на основе секвенирования РНК применяли для выявления специфичного для пыльника транскрипта в паре Ms2-изогенных линий, "Lumai 15" и "Lumai15+Ms2". Как следствие этого, был выявлен ген WMS, который проявляет специфичную для пыльника экспрессию на ранней стадии мейоза и только в пшенице, несущей ген Ms2. Регулирование WMS может привести к изменению мужской фертильности растений. Было установлено, что промотор WMS обладает специфичной для пыльника активностью. Следовательно, настоящее изобретение можно применять для достижения специфичной для пыльника экспрессии гена, для индукции мужской стерильности у различных видов растений, для разработки повторяющейся селекции различных видов растений, а также для того чтобы облегчить получение гибридных семян.

### Родственная заявка

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке на патент КНР № 201510303817.0, поданной 4 июня 2015 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к одному гену мужской стерильности пшеницы (WMS), его промотору, специфичному для пыльника, и вариантам их применения.

### Уровень техники

Мужскую стерильность растений можно использовать для того чтобы облегчить скрещивание с целью селективного размножения и получения гибридных семян (Rao et al., 1990; Kempken, Pring, 1999; Mackenzie, 2012). Во многих сельскохозяйственных культурах было обнаружено большое количество линий с мужской стерильностью, которые сохраняют в качестве ценных генетических ресурсов; также предпринимаются многочисленные попытки получить линии с мужской стерильностью, особенно для основных зерновых сельскохозяйственных культур, таких как кукуруза и рис. Компания Pioneer Hi-Bred International, Inc. разрабатывает технологию получения семян (SPT) (Waltz, 2012). Для кукурузы технология SPT объединяет использование доминантного гена Ms45 для придания мужской фертильности, рецессивного гена ms45 для придания мужской стерильности и гена DsRed2 в качестве маркера визуальной селекции. Ген Ms45 регулируется специфичным для пыльника промотором. Линия-закрепитель кукурузы DP-32138-1 (ms45/ms45, Ms45-DsRed2/\_) служит донором пыльцы для получения нетрансгенных линий кукурузы с мужской стерильностью (ms45/ms45), которые используются в качестве женского инбредного родительского растения для получения гибридных семян. Существуют другие исследования мужской стерильности кукурузы; мутагенез цитохром P450-подобного гена (Ms26) приводит к мужской стерильности у кукурузы (Djukanovic et al., 2013). С другой стороны, специфичная для пыльника экспрессия генов-мишеней имеет решающее значение для придания растению мужской стерильности без других побочных нарушений. Luo et al. (2006) обнаружили специфичный для тапетума ген RTS путем дифференциального скрининга библиотек к ДНК риса (Luo et al., 2006). Ген RTS преимущественно экспрессируется в тапетуме во время мейоза, и его экспрессия подавляется перед периодом цветения. Liu et al. (2013) выявили специфичный для пыльника ген белка-переносчика липидов риса (OsLTP6) с помощью высокопроизводительного скрининга профиля экспрессии (Liu et al., 2013). В целом, специфичная для пыльника экспрессия генов мужской фертильности/стерильности важна для внедрения важнейших линий для получения гибридных семян. Редактирование генома позволяет осуществлять специфичную модификацию генов-мишеней у млекопитающих и других эукариотических организмов (Cheng, Alper, 2014). В последнее время эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции (TALEN), и короткие палиндромные повторы, собранные в кластеры с регулярными промежутками (CRISPR)/Cas9, зарекомендовали себя как эффективные инструменты для пшеницы (Wang et al., 2014) и ячменя (Wendt et al., 2013; Gurushidze et al., 2014). Соответственно, редактирование генома можно применять для введения специфичной для мишени модификации в зерновых сельскохозяйственных культурах, которые можно использовать для получения продуктов с добавленной стоимостью.

Линия пшеницы с мужской стерильностью (далее называемая "Taigu") представляет собой мутированную линию гексаплоидной пшеницы с мужской стерильностью, созданную в Китае (Yang et al., 2009). Мужскую стерильность в "Taigu" определяет один доминантный ген Ms2. При скрещивании пшеницы "Taigu" с гексаплоидной пшеницей с мужской стерильностью их потомство F<sub>1</sub> разделяется на растения с мужской фертильностью/стерильностью: для половины растений характерна мужская фертильность, тогда как для другой половины растений характерна мужская стерильность (Deng, Gao, 1982). Для локуса Ms2 были разработаны фенотипические (карликовые, обусловленные Rht-Dlc) и молекулярные маркеры (Liu Deng, 1986; Cao et al., 2009). С 1983 года пшеница "Taigu" использовалась в качестве инструмента для периодической селекции в Китае. На сегодняшний день разработаны сотни китайских линий пшеницы для переноса гена Ms2 или тесно связанного локуса Rht-Dlc/Ms2 (в дальнейшем называемого RMs2), которые в совокупности называются "пшеница Taigu". К 2010 году сорок два сорта пшеницы с улучшенной устойчивостью к болезням и засолению почв, засухоустойчивостью или производительностью были созданы с помощью повторяющейся селекции на основе RMs2. Чтобы манипулировать геном Ms2 для получения лучшей производственной системы, авторы настоящего изобретения предприняли попытку клонировать ген Ms2 с использованием транскриптомного анализа.

### Краткое описание

Согласно настоящему изобретению предложен новый ген мужской стерильности (WMS) пшеницы, промотор указанного гена и варианты их применения. В настоящем изобретении применяется секвенирование РНК, чтобы охарактеризовать транскриптом пыльника "Lumai 15" и "Lumai 15+Ms2" (далее LM15<sub>Ms2</sub>) на ранней стадии мейоза. В результате был выявлен один ген WMS, который демонстрировал специфичную для пыльника экспрессию на ранней стадии мейоза и только в пшенице, несущей доминантный ген Ms2. Предполагается, что ген WMS вовлечен в развитие фенотипа мужской стерильности в пшенице, и манипулирование указанным геном WMS в растениях может изменить фертильность растений. Помимо этого, полагают, что промотор WMS обладает специфичной для пыльника активностью,

которая важна для обеспечения экспрессии генов, специфичной для пыльников. Соответственно, можно сказать, что настоящее изобретение обладает большой ценностью в качестве инструмента для обеспечения экспрессии генов, специфичной для пыльников, для развития мужской стерильности у разных видов растений, для разработки периодической селекции у разных видов растений, а также для того чтобы облегчить получение семян. В частности, согласно настоящему изобретению предложены:

- 1) выделенная ДНК, имеющая любой из следующих признаков (а)-(е):
  - (а) кДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;
  - (b) ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;
  - (с) ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;
  - (d) ДНК, кодирующая белок, который
  - (i) функционально эквивалентен белку, содержащему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и
  - (ii) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, в которой заменены, удалены, добавлены и/или вставлены одна или более аминокислот; и
  - (е) ДНК, которая (i) кодирует белок, который функционально эквивалентен белку, содержащему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и (ii) гибридизуется в строгих условиях с ДНК, содержащей нуклеотидные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1 и 6;
- 2) ДНК, кодирующая антисмысловую РНК, которая комплементарна продукту транскрипции ДНК, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 1 и 6;
- 3) ДНК, кодирующая РНК с рибозимной активностью, которая специфично расщепляет продукт транскрипции ДНК, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 1 и 6;
- 4) ДНК, кодирующая РНК, которая снижает экспрессию ДНК, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 1 и 6, путем совместного подавления при экспрессии в растительных клетках;
- 5) ДНК, кодирующая РНК, которая обладает признаком, являющимся доминантно-отрицательным для эндогенных транскриптов в клетках растений, кодируемых ДНК согласно п.1 или ДНК, кодирующая белок, который обладает признаком, являющимся доминантно-отрицательным для эндогенного белка в клетках растений, кодируемого ДНК согласно п.1;
- 6) вектор, содержащий ДНК согласно любому из пп.1-5;
- 7) трансформированная растительная клетка, в которую введена ДНК согласно любому из пп.1-5 или вектор согласно п.6;
- 8) трансформированное растение, содержащее трансформированные растительные клетки согласно п.7;
- 9) клон трансформированных растений или потомство трансформированных растений согласно п.8, причем указанный клон или потомство содержит трансформированные растительные клетки согласно п.7;
- 10) семя, ткань и орган из трансформированных растений согласно п.8 или 9, при условии, что они содержат трансформированные растительные клетки согласно п.7;
- 11) ДНК согласно любому из (а)-(с), обладающая активностью специфичного для пыльника промотора:
  - (а) ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;
  - (b) ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, в которой один или более нуклеотидов заменены, удалены, добавлены и/или вставлены; и
  - (с) ДНК, которая гибридизуется в строгих условиях с ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;
- 12) вектор, содержащий ДНК согласно п.11;
- 13) трансформированная растительная клетка, содержащая ДНК согласно п.11 или 12;
- 14) трансформированное растение, содержащее трансформированные растительные клетки согласно п.13;
- 15) клон трансформированных растений или потомство указанных трансформированных растений согласно п.14, причем указанный клон или потомство содержит трансформированные растительные клетки согласно п.13;
- 16) семя, ткань и орган из трансформированных растений согласно п.14 или 15, при условии, что они содержат трансформированные растительные клетки согласно п.13;
- 17) генетически модифицированная растительная клетка, полученная путем редактирования генома и/или индуцированного мутагенеза ДНК, содержащих нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1 и 4, причем указанные модификации регулируют мужскую фертильность растений;
- 18) генетически модифицированное растение, содержащее генетически модифицированные растительные клетки согласно п.17;
- 19) растительный клон или потомство генетически модифицированных растений согласно п.18, причем указанный клон или потомство содержит модифицированные растительные клетки согласно п.17; и
- 20) семя, ткань и орган из генетически модифицированных растений согласно п.18 или 19, при условии, что они содержат модифицированные растительные клетки согласно п.17.

### Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены результаты генотипирования по маркерам WMS-EM и WMS-PM. На верхних панелях представлены результаты генотипирования по маркеру WMS-EM, на нижних панелях представлены результаты генотипирования по маркеру WMS-PM; на левых панелях представлены генотипы обычной пшеницы (родительские линии) и клонов ВАС, на правых панелях представлены генотипы экзепляров F<sub>1</sub> из комбинации LM15<sub>Ms2</sub>/Lumai 15. Для растений F<sub>1</sub> было представлено шесть типичных растений, включая три растения с мужской стерильностью (S1, S2 и S3) и три растения с мужской фертильностью (F1, F2 и F3). Стрелки указывают на специфичные полосы, разделенные вследствие наличия признака мужской стерильности.

На фиг. 2 представлены клоны ВАС, несущие ген WMS/wms. P89 и P1076 были получены из 4D-хромосомы, несущей рецессивный ген wms; P204 и P1593 были получены из 4D-хромосомы, несущей доминантный ген WMS. Область с серой штриховкой представляет собой полную матрицу экспрессии гена WMS (например, SEQ ID NO: 4) в настоящем изобретении. Размер вставки каждого клона ВАС представлен в масштабированном виде.

На фиг. 3 представлены результаты исследования специфичной для пыльника экспрессии гена WMS. А) ОТ-ПЦР проводили для детектирования кДНК WMS в пыльнике, створке, листе, нижней цветковой чешуе, верхней цветковой чешуе, пестике, корне и стебле. В) Количественную ОТ-ПЦР проводили для измерения уровней кДНК WMS в пыльниках, GLP (створке, нижней цветковой чешуе, верхней цветковой чешуе), листе, пестике и стебле. Актин использовали в качестве контроля для исследований методами ОТ-ПЦР и количественной ОТ-ПЦР.

На фиг. 4 представлены результаты, подтверждающие специфичную для пыльника активность промотора WMS. А) Плазмиды получали для исследования активности промотора; PC613 представляет собой принимающий вектор, несущий кассету GFP, пригодную для технологии клонирования Gateway; PC966 несет кассету экспрессии P<sub>WMS</sub>::GFP, в которой P<sub>WMS</sub> представляет собой промотор WMS (SEQ ID NO: 5); PC976 несет геномную копию гена WMS (SEQ ID NO: 7); все три вектора имели аналогичный остов плазмиды pCambia1300. В) Кратковременная экспрессия флуоресцентного белка GFP в пыльниках пшеницы; стрелки обозначают флуоресцентные сигналы в зеленой части спектра. С) ОТ-ПЦР проводили для детектирования кДНК WMS в пыльниках, створке, листе, нижней цветковой чешуе, верхней цветковой чешуе, пестике и стебле трансгенной пшеницы "JZ7-2" (табл. 3), которая была получена в результате генетической трансформации с использованием PC976; также были использованы два контроля, включая пыльник 1 из "Lumai 15" и пыльник 2 из "Lumai 15<sub>Ms2</sub>", масштабная метка 100 мкм.

На фиг. 5 представлены результаты скрининга методом TILLING и фертильные пыльники растений M<sub>1</sub>, несущие индуцированные мутации в доминантном гене WMS. А) Наличие доминантного гена WMS подтверждали с помощью ПЦР с использованием WMS-FP12 и WMS-RP12 (верхняя панель); Детектирование мутации WMS методом TILLING проводили с использованием праймеров WMS-FP8 и WMS-RP8 в отобранных растениях M<sub>1</sub> (S: стерильный отросток; F: фертильный отросток, стрелки указывают полосу после расщепления Cell, нижняя панель). В) Развитие фертильных пыльников у отобранных мутированных вариантов M<sub>1</sub>, несущих ген WMS. "Lumai 15" и "Lumai 15<sub>Ms2</sub>" были включены в качестве контролей. Масштабная метка=1,5 мм.

На фиг. 6 показана генетическая комплементация доминантного гена WMS в "Bobwhite". А) Исследование методом ПЦР подтвердило геномную интеграцию (BAR и WMS) и экспрессию кДНК (WMS и актин) в поколении T<sub>0</sub>. В) Биологическое количественное исследование на основе BAR для определения устойчивости к гербицидам (верхняя панель, масштабная метка=2,5 мм); экспрессия кДНК WMS вызывала развитие фенотипа мужской стерильности в трансгенных растениях T<sub>0</sub> (нижняя панель, масштабная метка=1,5 мм). "Bobwhite" использовали в качестве контроля дикого типа.

На фиг. 7 показана генетическая комплементация доминантного гена WMS в Brachypodium "Bd21-3". А) Исследование методом ПЦР подтвердило геномную интеграцию (BAR и WMS) и экспрессию кДНК (WMS и актин) в поколении T<sub>0</sub>. В) Биологическое количественное исследование на основе BAR для определения устойчивости к гербицидам (верхняя панель, масштабная метка=2,5 мм); экспрессия кДНК WMS вызывала развитие фенотипа мужской стерильности в трансгенных растениях (нижняя панель, масштабная метка=0,5 мм). Brachypodium "Bd21-3" использовали в качестве контроля дикого типа.

### Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены ДНК, кодирующие белок WMS. Нуклеотидная последовательность кДНК WMS в "пшенице Taigu" представлена в SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность белка, кодируемого кДНК WMS, представлена в SEQ ID NO: 2, полноразмерная нуклеотидная последовательность, включая промотор, транскрипционный фрагмент и терминатор гена WMS в "пшенице Taigu", представлена в SEQ ID NO: 4, нуклеотидная последовательность промотора WMS в "пшенице Taigu" представлена в SEQ ID NO: 5, и нуклеотидная последовательность транскрипционного фрагмента гена WMS в "пшенице Taigu" представлена в SEQ ID NO: 6.

В область настоящего изобретения включена кДНК и геномная ДНК, которые кодируют белок WMS. Специалист в данной области техники может получить кДНК и геномную ДНК с использованием стандартных методов. кДНК может быть получена, например, путем:

- а) экстракции мРНК из "пшеницы Taigu" (например, "LM15Ms2");
- б) синтеза кДНК с использованием мРНК в качестве матрицы;
- в) амплификации кДНК WMS с использованием ПЦП-праймеров, специфичных для кДНК согласно настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 1);
- д) клонирования продукта ПЦП в векторы. Аналогичным образом, геномная ДНК может быть получена путем выделения из "пшеницы Taigu", создания геномной библиотеки (в которой ВАС, космида, фосмида и т.д. могут быть использованы в качестве вектора), с последующим скринингом положительных клонов с использованием фрагментов ДНК согласно настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 4).

Геномную ДНК также можно получить путем клонирования методом ПЦП на основе ДНК-матрицы согласно настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 4).

В область настоящего изобретения включены ДНК, которые кодируют белки, функционально эквивалентные белку WMS из пшеницы Taigu (например, SEQ ID NO: 2). В настоящей заявке "белки, функционально эквивалентные белку WMS из пшеницы Taigu", обозначают белки-мишени, которые обладают биологической или биохимической функцией, эквивалентной таковой для белка WMS согласно настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 2). Примеры включают индукцию стерильности растений. Для того чтобы оценить, может ли испытываемый ген индуцировать мужскую стерильность, "пшеница Taigu" может быть мутирована с помощью EMS-индуцированного мутагенеза, как показано в примере 7, и мутированные варианты с блокированной или подавленной функцией исследуемого гена могут быть выявлены с помощью TILLING, как показано в примере 8. Мужская стерильность, индуцированная исследуемым геном, может быть подтверждена с использованием генетической комплементации в линии пшеницы с мужской фертильностью "Bobwhite". Например, геномная аллель WMS (SEQ ID NO: 7) может быть введена в "Bobwhite" с использованием баллистической трансфекции, как показано в примере 9. Помимо этого целесообразно ввести геномную аллель WMS (SEQ ID NO: 7) в модельное растение *Brachypodium* с использованием *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, как показано в примере 10. Полученные фенотипы растений могут быть исследованы.

Другим примером такой функции является специфичная для пыльника экспрессия, которая характеризуется преобладающей экспрессией в пыльнике, которая по меньшей мере в пять раз или более, предпочтительно в десять раз или более, и более предпочтительно в 15 раз или более, превышает экспрессию в других тканях, перечисленных в примере 5. Чтобы оценить, подвергается ли исследуемый ген специфичной транскрипции в пыльнике растения, мРНК могут быть выделены из различных типов растительных тканей, и кДНК будут синтезированы на основании указанных мРНК. Количественную ПЦП с обратной транскрипцией (кОТ-ПЦП) можно использовать для измерения количества кДНК исследуемого гена в различных типах растительных тканей, как показано в примере 5.

ДНК, которые кодируют белки, функционально эквивалентные белку WMS (SEQ ID NO: 2), предпочтительно получают из однодольных, более предпочтительно из Gramineae и наиболее предпочтительно из видов Triticeae. Подходящие ДНК включают, например, аллели, гомологи, варианты, производные и мутированные варианты согласно настоящему изобретению (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 6), которые кодируют белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, в которой одна или более аминокислот заменены, удалены, добавлены или вставлены. Редактирование генома может быть использовано для блокирования генов-мишеней у растений и животных (Cheng, Alper, 2014). Ряд методик редактирования генома, включающих нуклеазу с цинковыми пальцами (ZFNs), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN) и короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR), были успешно использованы для пшеницы (Shan et al., 2014; Wang et al., 2014) и ячменя (Wendt et al., 2013; Gurushidze et al., 2014). Редактирование генома обычно приводит к удалению или вставке одного или нескольких оснований в целевой области, представляющей интерес, при этом вставки или удаления, которые происходят в кодирующих экзонах, могут вызывать изменение аминокислоты или укорачивание белка (Wang et al., 2014). До тех пор, пока ДНК, полученная в результате редактирования генома, кодирует белок, функционально эквивалентный природному белку WMS (SEQ ID NO: 2), такая ДНК может быть включена в качестве ДНК согласно настоящему изобретению, даже если внедренный белок WMS содержит одну или более замен, делеций, добавлений или вставок аминокислот. ДНК согласно настоящему изобретению также включают консервативные мутированные варианты, в которых нуклеотиды мутированы без мутации аминокислотной последовательности белка (консервативные мутации).

Специалисты в данной области техники могут модифицировать ген WMS и его гомологи согласно настоящему изобретению (SEQ ID NO: 1 и 6) с использованием методик редактирования генома. Помимо этого целевая мутация может быть введена посредством индуцированного мутагенеза или путем скрининга природных идиоплазм. Например, Slade et al. (2005) разработали EMS-индуцированную мутированную популяцию пшеницы и затем успешно выделили целевые мутации, используя метод нацеливания локальных повреждений в геномах (TILLING) (Slade et al., 2005). Помимо этого пул идиоплазм развивается с большим количеством спонтанных мутаций, что позволяет выявить мутацию-мишень при сборе идиоплазм, используя Ecotilling (Till et al., 2006). Специалисты в данной области техники легко разрабо-

тают мутированные популяции растений, с последующим выявлением мутаций в ДНК (SEQ ID NO: 1 и 6) согласно настоящему изобретению. В то же время спонтанные мутации ДНК (SEQ ID NO: 1 и 6) согласно настоящему изобретению в пуле идиоплазм или размножаемых линиях/сортах могут быть легко выявлены. Следовательно, область настоящего изобретения также включает:

(а) использование методик редактирования генома, индуцированного мутагенеза и естественного скрининга для получения растительных клеток, которые несут мутации ДНК (SEQ ID NO: 1 и 6) согласно настоящему изобретению;

(b) растение, несущее тип растительных клеток, описанных в (а);

(с) растительный клон или потомство типа растений, описанных в (b), при условии, что они содержат тип растительных клеток, описанный в (а);

(d) семя, ткань и орган клона или потомства, описанного в (b) и (с), при условии, что они содержат тип клетки, описанный в (а).

Другие способы получения ДНК, которые кодируют белки, функционально эквивалентные белку WMS (SEQ ID NO: 2), включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (Saiki et al., 1985; Hemsley et al., 1989; Landt et al., 1990), технологию рекомбинантной ДНК и синтез синтетических генов (Kosuri, Church, 2014), которые хорошо известны специалистам в данной области техники. В частности, специалист в данной области техники может с использованием стандартных способов выделить ДНК, высоко гомологичную гену WMS из пшеницы или других растений, с использованием ПЦР-праймеров, которые специфично гибридизуются с нуклеотидной последовательностью гена WMS (SEQ ID NO: 1 и 6), или с использованием фрагмента гена WMS (SEQ ID NO: 1 и 6) в качестве зонда для скрининга ДНК и библиотек кДНК ДНК, которые выделены с использованием технологии ПЦР технологии рекомбинантной ДНК, синтеза синтетических генов и т.д., и которые кодируют белки, функционально эквивалентные белку WMS (SEQ ID NO: 2), также включены в ДНК согласно настоящему изобретению. Применительно к аминокислотной последовательности выделенные таким образом ДНК, как полагают, являются высоко гомологичными аминокислотной последовательности белка WMS (SEQ ID NO: 2). Высокая степень гомологии означает идентичность последовательностей по всей длине аминокислотной последовательности по меньшей мере на 50% или более, предпочтительно на 70% или более и более предпочтительно на 90% или более (например, на 95, 96, 97, 98 и 99% и более). Идентичность аминокислотной и нуклеотидной последовательностей может быть определена с использованием алгоритма BLAST (Altschul et al., 1990; Karlin, Altschul, 1993). На основе указанного алгоритма были внедрены программы под названием BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN и TBLASTX (Korf et al., 2003). BLASTN выполняет поиск по базе данных нуклеотидных последовательностей с использованием запрашиваемого нуклеотида; BLASTP выполняет поиск по базе данных белков с использованием запрашиваемого белка; BLASTX выполняет поиск по базе данных белков, используя транслированный запрашиваемый нуклеотид; TBLASTN выполняет поиск по базе данных транслированных нуклеотидов с использованием запрашиваемого белка; TBLASTX выполняет поиск по базе данных транслированных нуклеотидов с использованием транслированного запрашиваемого нуклеотида. Основные этапы указанных методов анализа являются общедоступными (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Скрининг геномной ДНК или библиотек кДНК может быть основан на технологии Саузерн-блоттинга (Southern, 1975). Саузерн-блоттинг состоит из двух основных этапов. На первом этапе происходит прикрепление фрагментов ДНК к нитроцеллюлозной или нейлоновой мембране, и второй этап заключается в проведении гибридизации между меченым ДНК-зондом и фрагментом ДНК, присоединенным к мембране. Во время промывки необходимо создать строгие условия путем контроля температуры, содержания соли и времени. Строгость условий повышается при снижении содержания соли в буфере SCC (20×, 10×, 6×, 2×, 1×, 0,5×, 0,2×, 0,1×), повышении температуры (42, 50, 55, 60, 65, 70, 75°C) и увеличении продолжительности промывки (1 мин, 2 мин, 5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 30 мин). В настоящем изобретении термин "очень строгие условия" указывает на то, что этап промывки будет выполнен в разбавленном буфере SCC ( $\leq 1\times$ ), при высокой температуре ( $\geq 55^\circ\text{C}$ ) и в течение продолжительного периода времени ( $\geq 10$  мин).

Как полагают, ДНК (SEQ ID NO: 1 и 6), которые кодируют белок WMS согласно настоящему изобретению, также можно применять для придания стерильности растениям с мужской фертильностью. Другими словами, считается, что растения с мужской фертильностью могут приобрести стерильность в результате вставки ДНК (SEQ ID NO: 1 и 6), кодирующей белок WMS согласно настоящему изобретению, в подходящий вектор, введения указанного вектора в растительные клетки, которые способны формировать растения с мужской фертильностью, восстановления полученных рекомбинантных растительных клеток, с последующим воспроизведением трансгенных растений, для которых характерна мужская стерильность. Поскольку растения с мужской стерильностью не могут самоопыляться, их необходимо поддерживать с использованием пыльцы других растений с мужской фертильностью. С другой стороны, ДНК (SEQ ID NO: 1 и 6), которые кодируют белок WMS согласно настоящему изобретению, также можно применять, чтобы придать фертильность растениям с мужской стерильностью, которая обеспечивается геном WMS. Другими словами, считается, что фертильность можно придать растениям с мужской

стерильностью путем вставки антисмысловой РНК (асРНК) и/или шпилечной РНК (шРНК) для соответствующей ДНК (SEQ ID NO: 1), кодирующей белок WMS согласно настоящему изобретению, в подходящий вектор, введения указанного вектора в растительные клетки, которые способны формировать растения с мужской стерильностью, с последующим восстановлением полученных рекомбинантных растительных клеток. Поскольку сорта растений с мужской стерильностью не могут самоопыляться, их сложно поддерживать, даже если указанные сорта обладают желательными признаками. Однако если фертильность может быть восстановлена с использованием антисмыслового гена и/или шпилечной РНК для соответствующей ДНК (SEQ ID NO: 1 и 6), которая кодирует белок WMS, самоопыление становится возможным, также как и поддержание желательных признаков.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты регулируют экспрессию гена-мишени посредством транскрипционной интерференции, маскирования РНК, механизмов, зависящих от двухцепочечных РНК (дцРНК), и ремоделирования хроматина (Lapidot, Pilpel, 2006). Антисмысловые последовательности, используемые в настоящем изобретении, могут ингибировать экспрессию гена-мишени любым из вышеуказанных способов. В качестве одного из вариантов реализации настоящего изобретения, антисмысловая последовательность, которая сконструирована так, чтобы быть комплементарной нетранслируемой области, расположенной вблизи 5'-конца мРНК гена, будет эффективно ингибировать трансляцию указанного гена. Также можно использовать последовательность, комплементарную кодирующей области или 3'-концевой нетранслируемой области. Следовательно, ДНК, содержащие антисмысловые последовательности транслируемых областей гена, а также нетранслируемых областей, включены в антисмысловые ДНК, которые могут быть использованы для ДНК (SEQ ID NO: 1) согласно настоящему изобретению. Антисмысловую ДНК, которую используют в настоящем изобретении, лигируют в направлении 3'-конца относительно соответствующего промотора, такого как промотор убиквитина кукурузы (Ubi) (Christensen et al., 1992) или промотор WMS (SEQ ID NO: 5), и последовательность, содержащую сигнал терминации транскрипции, предпочтительно лигируют с 3'-концом ДНК. Полученные таким образом ДНК могут быть введены в желаемое растение с использованием известных способов. Антисмысловые последовательности ДНК предпочтительно представляют собой последовательности, комплементарные эндогенному гену или его части из растения, подлежащего трансформации, но не обязательно должны быть полностью комплементарными до тех пор, пока они могут эффективно ингибировать экспрессию гена. Транскрибируемая РНК предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более (например, 96, 97, 98, 99% или более) комплементарна транскрибируемым продуктам гена-мишени. Для эффективного ингибирования экспрессии гена-мишени с использованием антисмысловой последовательности антисмысловая ДНК должна содержать по меньшей мере 15 нуклеотидов или более, предпочтительно 100 нуклеотидов или более и еще более предпочтительно 500 нуклеотидов или более. Используемые антисмысловые ДНК обычно содержат менее 5 тыс.п.н. и предпочтительно менее 2,5 тыс.п.н.

Экспрессия эндогенного гена также может быть подавлена с использованием ДНК, которая кодирует ген-мишень (Hammond et al., 2001; Paddison et al., 2002). Для экспрессии шпилечных РНК в растительных клетках ДНК-матрица, которая сконструирована так, чтобы формировать шпилечные РНК или индуцировать РНК-интерференцию (РНКи), может быть соединена с последовательностью промотора, такого как промотор Ubi, и последовательностью терминации транскрипции. С помощью технологии шпилечных РНК или РНКи продукты транскрипции генов-мишеней согласно настоящему изобретению могут быть специфично подавлены, так же может быть подавлена экспрессия гена.

Подавление экспрессии эндогенного гена также может быть достигнуто путем совместного подавления в результате трансформации ДНК, содержащей последовательность, идентичную или сходную с последовательностью гена-мишени (Smyth, 1997; Ketting, Plasterk, 2000). Термин "совместное подавление" относится к явлению подавления экспрессии введенного экзогенного гена и эндогенного гена-мишени, когда ген, содержащий последовательность, идентичную или сходную с последовательностью эндогенного гена-мишени, вводят в растения путем трансформации. Например, чтобы получить растение, в котором ген WMS совместно подавлен, представляющие интерес растения трансформируют векторной ДНК, сконструированной для экспрессии гена WMS (SEQ ID NO: 1 и 6), или ДНК, содержащей сходную последовательность, затем из полученных таким способом растений отбирают растения с подавленной мужской стерильностью, по сравнению с растениями дикого типа. Гены, используемые для совместного подавления, не обязательно должны быть полностью идентичны генам-мишеням, однако должны содержать последовательность, которая идентична им по меньшей мере на 70% или более, предпочтительно на 80% или более, более предпочтительно на 90% или более (например, 95, 96, 97, 98, 99% и более). Идентичность последовательности может быть определена с использованием вышеописанного способа.

Помимо этого подавление экспрессии эндогенного гена в настоящем изобретении также может быть достигнуто путем трансформации растения геном, обладающим характеристиками, которые являются доминантно-отрицательными для гена-мишени. Ген, обладающий доминантно-отрицательными характеристиками, представляет собой ген, который при экспрессии способен устранить или уменьшить активность исходного эндогенного гена растения. У *Brachypodium* микроРНК (миРНК), miR5200, расще-

пляет мРНК гена FT, который активен во время цветения, и гиперэкспрессия miR5200 задерживает время цветения у *Brachypodium* (Wu et al., 2013). Некоторые миРНК или короткие интерферирующие РНК (киРНК) могут быть нацелены на WMS и его гомологи. Также может быть сконструирована синтетическая микроРНК (смиРНК), нацеленная на WMS и его гомологи. Подытоживая, следует отметить, что получение эффективных смиРНК, миРНК и киРНК можно контролировать, чтобы регулировать накопление мРНК WMS и его гомологов для управления мужской фертильностью растений.

Векторы, которые могут быть использованы при трансформации растительных клеток, могут включать разнообразные векторы, при условии, что указанные векторы могут экспрессировать вставленный ген в растительных клетках. Например, могут быть использованы векторы, которые содержат промоторы для экспрессии генов в конкретных тканях растений (например, промотор согласно настоящему изобретению, представленный в последовательности SEQ ID NO: 5) и промоторы для конститутивной экспрессии генов в растительных клетках (например, промотор Ubi). Помимо этого также могут быть использованы векторы, содержащие промотор, который активируется при индукции внешним стимулом. В настоящей заявке "растительные клетки" включают различные формы растительных клеток, например, клетки суспензионной культуры, протопласты, срезы растений и каллусы различных видов растений.

Вектор может быть введен в растительную клетку с использованием различных способов, известных специалистам в данной области техники, таких как способы с использованием полиэтиленгликоля, способы электропорации, способы опосредованные *Agrobacterium*, и способы бомбардировки частицами. Восстановление растений из трансформированных растительных клеток также возможно осуществлять с использованием способов, известных специалистам в данной области техники, в зависимости от типа растительных клеток. Например, многие методики получения рекомбинантных растений уже хорошо известны и широко используются в области настоящего изобретения. Подходящие способы включают способ введения генов в протопласты с использованием полиэтиленгликоля с последующим восстановлением растений, способ введения генов в протопласты с использованием электрического импульса с последующим восстановлением растений, способ непосредственного введения генов в клетки с использованием способа бомбардировки частицами с последующим восстановлением растений и способ введения генов с использованием *Agrobacterium* с последующим восстановлением растений. Подходящие способы могут быть соответствующим образом использованы в настоящем изобретении.

После получения трансформированных растений, в которые был введен геном ДНК согласно настоящему изобретению, потомство указанных растений можно получить путем полового или бесполого размножения. Репродуктивные материалы (семена, каллусы, протопласты и т.д.) могут быть получены из указанных растений, их потомства или клонов. Указанные растения могут быть выпущены в большом количестве, используя полученные материалы. В объем настоящего изобретения включены растительные клетки, содержащие введенную ДНК согласно настоящему изобретению, растения, содержащие указанные клетки, потомство или клоны указанных растений и репродуктивные материалы указанных растений, их потомство и их клоны. Следовательно, в область настоящего изобретения включены:

- (a) трансгенные растительные клетки, несущие ДНК согласно настоящему изобретению;
- (b) растение, несущее тип растительных клеток, описанных в (a);
- (c) клон растения или потомство типа растений, описанных в (b), при условии, что они содержат тип растительных клеток, описанный в (a);
- (d) семя, ткань и орган из клона или потомства, описанного в (b) и (c), при условии, что они содержат тип клеток, описанный в (a).

Можно ожидать, что фертильность/стерильность растений, полученных таким способом, отличается от таковой у растений дикого типа. Так, например, пшеница "Bobwhite" обладает мужской фертильностью, но экспрессия ДНК (например, SEQ ID NO: 4) придает мужскую стерильность трансгенной пшенице Bobwhite. С другой стороны, подавление экспрессии ДНК (например, SEQ ID NO: 4) в пшенице Taigu путем введения антисмысловой ДНК или тому подобного, как полагают, обеспечит развитие фенотипа мужской фертильности у указанной пшеницы. Способы согласно настоящему изобретению могут быть использованы у растений для регулирования фертильности/стерильности, чтобы подавить самоопыление и стимулировать перекрестное опыление, обеспечивая тем самым ценную характеристику гибридной силы. Согласно настоящему изобретению предложена ДНК, содержащая промотор со специфичной для пыльника активностью. Примером такого рода ДНК является геномная ДНК (SEQ ID NO: 4), расположенная в направлении 5'-конца относительно стартового кодона в ДНК (SEQ ID NO: 5), кодирующей белок WMS согласно настоящему изобретению. Промоторные ДНК согласно настоящему изобретению включают ДНК, которые высоко гомологичны нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, при условии, что они содержат промотор со специфичной для пыльника активностью. Примером указанных типов ДНК является ДНК с промоторной активностью, специфичной для пыльника, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, в которой один или более нуклеотидов заменены, удалены, добавлены или вставлены. Промоторы ДНК согласно настоящему изобретению предпочтительно получены из однодольных, более предпочтительно получены из Gramineae, и наиболее предпочтительно получены из видов Triticeae. Однако до тех пор, пока они содержат промотор со специфичной для пыльника активностью, источник их происхождения не является ограничивающим.



Вышеуказанные ДНК, кодирующие белок WMS согласно настоящему изобретению, можно применять для выделения ДНК, содержащей промотор со специфичной для пыльника активностью. Например, геномные ДНК, расположенные в направлении 5'-конца относительно ДНК, кодирующей белок WMS согласно настоящему изобретению, могут быть получены с использованием ДНК (SEQ ID NO: 6) согласно настоящему изобретению или ее части в качестве зонда для скрининга библиотеки геномной ДНК. Поскольку, как полагают, указанные геномные ДНК, расположенные в направлении 5'-конца, содержат промотор со специфичной для пыльника активностью, они имеют высокую промышленную ценность при использовании для специфичной экспрессии произвольных генов в пыльнике. "Произвольный ген" означает ДНК, чья транскрипция может быть индуцирована промотором ДНК (SEQ ID NO: 5) согласно настоящему изобретению. "Произвольный ген" может представлять собой любой кодирующий и не кодирующий фрагмент ДНК, причем не кодирующий фрагмент ДНК может обладать рибозимной активностью или может быть использован для создания смирНК, асРНК, шпилечных РНК, микроРНК, миРНК и так далее. Подходящий фрагмент ДНК будет обеспечивать специфичный для пыльника профиль экспрессии под контролем промотора WMS (SEQ ID NO: 5). Помимо этого, поскольку ДНК, которые кодируют белок WMS согласно настоящему изобретению, специфично экспрессируются в растительных пыльниках, как полагают, их можно применять в качестве маркеров для выявления ткани пыльника в срезах целых цветков.

ДНК с высокой степенью гомологии нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 также могут быть получены с использованием методов ПЦР (Saiki et al., 1985), технологии рекомбинантной ДНК и синтеза синтетических генов (Kosuri, Church, 2014). Например, ДНК с высокой степенью гомологии нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 может быть выделена из пшеницы и других видов растений с помощью ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или ее часть, в качестве матрицы, и с помощью олигонуклеотидов, которые специфично гибридизуются с молекулой ДНК (SEQ ID NO: 5), в качестве ПЦР-праймеров. Способы, хорошо известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для получения подходящей ДНК. Например, методики редактирования генома, которые хорошо известны в данной области техники (Cheng and Alper, 2014), можно применять для введения мутаций, включая одну или более замен, делеций, добавлений или вставок нуклеотидов в ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. Мутации также могут быть введены с помощью сайт-направленного мутагенеза, мутагенеза, индуцированного мутагеном/излучением, а также методов ПЦР (Saiki et al., 1985; Hemsley et al., 1989; Landt et al., 1990).

Известные количественные способы исследований с использованием репортерных генов или т.п. можно применять для того чтобы исследовать, обладает ли ДНК, полученная с использованием способов, описанных выше, специфичной для пыльника активностью промотора. Репортерный ген может представлять собой любой репортерный ген, при условии, что его экспрессия поддается детектированию. Например, репортерные гены, обычно используемые специалистами в данной области техники, включают ген люциферазы (LUC), ген  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS) и ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) и т.д. Уровень экспрессии репортерного гена может быть определен с использованием способов, известных специалистам в данной области техники, в соответствии с типом репортерного гена. Например, уровень экспрессии гена люциферазы, используемого в качестве репортера, может быть определен путем измерения флуоресценции флуоресцентного соединения, вызванной каталитическим действием продукта экспрессии гена люциферазы. Уровень экспрессии гена GUS может быть определен путем оценки интенсивности окрашивания 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-глюкуронида (X-Gluc) или люминесценции Glucuron (ICN), вызванной каталитическим действием продукта экспрессии гена GUS. Уровень экспрессии гена GFP может быть определен путем измерения флуоресценции GFP.

Промотор ДНК согласно настоящему изобретению можно применять для экспрессии произвольного гена специфичным для пыльника образом, например, путем

- (a) конструирования вектора, содержащего промоторную ДНК согласно настоящему изобретению;
- (b) функционального присоединения произвольного гена в направлении 3'-конца относительно промоторной ДНК согласно настоящему изобретению в указанном векторе (a);
- (c) создания трансгенных растительных клеток, несущих промотор WMS (SEQ ID NO: 5) или вектор, описанный в (b); и
- (d) получения трансгенных растений, содержащих трансгенные растительные клетки, описанные в (c).

"Функциональное соединение" означает связывание произвольного гена с промоторной ДНК согласно настоящему изобретению так, что указанный ген может экспрессироваться в ответ на активацию промоторной ДНК согласно настоящему изобретению. Поскольку промоторная ДНК согласно настоящему изобретению обладает высокой активностью, специфичной для пыльника, произвольные гены предпочтительно представляют собой гены, которые могут быть специфично экспрессированы в пыльнике. Например, ген WMS согласно настоящему изобретению, который связан со стерильностью/фертильностью пшеницы, может быть использован соответствующим образом. Общие методы генной инженерии могут быть использованы для конструирования вектора, содержащего промоторную

ДНК согласно настоящему изобретению. Отсутствуют какие-либо ограничения в отношении растительных клеток, в которые вводят вектор. Вышеуказанные способы, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для введения векторов в растительные клетки, для восстановления трансформированных растительных клеток с получением растений и т.д.

Следовательно, в область настоящего изобретения включены:

(a) генетически модифицированные растительные клетки, содержащие промоторную ДНК согласно настоящему изобретению;

(b) растения, содержащие тип клеток, описанный в (a);

(c) потомство или клоны растений, описанных в (b), при условии, что они содержат тип клеток, описанный в (a);

(d) семя, ткань и орган из клона или потомства, описанного в (b) и (c), при условии, что они содержат тип клеток, описанный в (a).

Специалисты в данной области техники могут модифицировать промотор WMS (SEQ ID NO: 5) и его гомологичную последовательность, используя редактирование генома, введение мутации(й) в промотор WMS (SEQ ID NO: 5) и его гомологичную последовательность с помощью мутагенеза, или путем выявления природной спонтанной мутации в промоторе WMS (SEQ ID NO: 5) и его гомологичной последовательности. Следовательно, в область настоящего изобретения включены:

(a) генетически модифицированные растительные клетки с изменением в промоторе WMS (SEQ ID NO: 5), полученным путем редактирования генома, мутагенеза и естественного отбора;

(b) растения, содержащие тип клеток, описанный в (a);

(c) потомство или клоны растений, описанных в (b), при условии, что они содержат тип клеток, описанный в (a);

(d) семя, ткань и орган из клона или потомства, описанного в (b) и (c), при условии, что они содержат тип клеток, описанный в (a).

Следовательно, в область настоящего изобретения включен ген WMS (SEQ ID NO: 1 и 6), гомологи WMS и их промотор (например, SEQ ID NO: 5). В другом варианте, специфичная экспрессия гена WMS (SEQ ID NO: 1 и 6) способна придать признак мужской стерильности обычным растениям с мужской фертильностью. Подавление экспрессии гена WMS в растениях придает признак мужской фертильности обычным растениям с мужской стерильностью. Помимо этого, поскольку промотор гена WMS, как полагают, обладает специфичной для пыльника активностью, целесообразной является специфичная экспрессия произвольных генов в пыльнике. Как ожидается, применение WMS (SEQ ID NO: 1 и 6), его гомологов и их промоторов (например, SEQ ID NO: 5) значительно улучшит селекцию растений и производство семян.

Настоящее изобретение далее будет подробно описано с использованием примеров, которые не должны быть истолкованы, как ограничивающее настоящее изобретение.

Настоящее изобретение было основано на паре Ms2-изогенных линий пшеницы "Lumai 15" и "LM15<sub>Ms2</sub>", которые были разработаны в Шаньдунском сельскохозяйственном университете. Растения пшеницы поддерживали в теплице с 16 ч фотопериодом ( $105 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ), дневной температурой 25-30°C и ночной температурой 15-20°C. Вода, стандартные химические вещества и растительные гормоны были получены от Fisher Scientific (Питтсбург, Пенсильвания, США) и Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США), культуральные среды для растительных тканей были получены от PhytoTechnology Laboratories (Оверленд-Парк, Канзас, США), микробные ростовые среды были получены от BD (Becton, Dickinson, Франклин Лейке, Нью-Джерси, США), антибиотики были получены от Gold Biotechnology (Сент-Луис, Миссури, США). ПЦР-праймеры согласно настоящему изобретению приведены в табл. 1.

Таблица 1. ППР-праймеры, используемые в настоящем изобретении

| № праймера | Последовательность праймера (от 5' к 3') | № последовательности |
|------------|------------------------------------------|----------------------|
| WMS-RP1    | AGGTTTGCTTGAGTTCCTCCCG                   | SEQ ID NO: 8         |
| WMS-RP2    | CCTTGTGGTGATGAGCGTGAAG                   | SEQ ID NO: 9         |
| WMS-FP1    | CGGGAGGAACCAAGCAAACCT                    | SEQ ID NO: 10        |
| WMS-FP2    | GAGTGGTTCACGTGCTGATTAC                   | SEQ ID NO: 11        |
| WMS-FP3    | CAGTACCCGAGTGGACAC                       | SEQ ID NO: 12        |
| WMS-RP3    | TAAATCACAGGCAGGATTTGATAAAC               | SEQ ID NO: 13        |
| WMS-FP4    | CCGTCAGCACACTGTACTTCA                    | SEQ ID NO: 14        |
| WMS-RP4    | CGATGTAGAGCCTCAAATCC                     | SEQ ID NO: 15        |
| WMS-FP5    | CACATGTTTGCCTCGAAATG                     | SEQ ID NO: 16        |
| WMS-RP5    | AAGAAACGAGCCGTCCAGTA                     | SEQ ID NO: 17        |
| WMS-FP6    | CGCAGTGGACACACGCTTAGCTT                  | SEQ ID NO: 18        |
| WMS-RP6    | TGAGTTGGAGTTGGTCCCATC                    | SEQ ID NO: 19        |
| WMS-FP7    | TCTCAGAAACGAGCCCCAAGT                    | SEQ ID NO: 20        |
| WMS-RP7    | GAACCATCCCTGGTCGATGT                     | SEQ ID NO: 21        |
| WMS-FP8    | GGCTCTGATACCAAATGTTGTTG                  | SEQ ID NO: 22        |
| WMS-RP8    | ATGGTGGTGTGCCCTAAAAAG                    | SEQ ID NO: 23        |
| WMS-FP9    | GCTTGAACTGCTGGTATATATG                   | SEQ ID NO: 24        |
| WMS-RP9    | GTAATCAGCACGTGAACCACTC                   | SEQ ID NO: 25        |
| WMS-FP10   | TGTTCTGGATTCGTGAGTGG                     | SEQ ID NO: 26        |
| WMS-RP10   | CGATCTCCGTGTCCATGTGCTAC                  | SEQ ID NO: 27        |
| WMS-FP11   | <u>GCGGCCGCGGGTGAGGCTTGC</u> CAAGG       | SEQ ID NO: 28        |
| WMS-RP11   | <u>GGCGCGCCG</u> GATCTCCGTGTCCATGTGCT    | SEQ ID NO: 29        |
| WMS-RP12   | CGTAGATGCGGACCCAGGGGAT                   | SEQ ID NO: 30        |
| BAR-FP1    | AAGCACGGTCAACTTCCGTA                     | SEQ ID NO: 31        |
| BAR-RP1    | GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC                     | SEQ ID NO: 32        |
| Actin-FP1* | TCAGCCATACTGTGCCAATC                     | SEQ ID NO: 33        |
| Actin-RP1* | CTTCATGCTGCTTGGTGC                       | SEQ ID NO: 34        |
| Actin-FP2  | GCCATGTACGTGCAATTCA                      | SEQ ID NO: 35        |
| Actin-RP2  | AGTCGAGAACGATACCAGTAGTACGA               | SEQ ID NO: 36        |

Примечание: чтобы облегчить клонирование гена сайт фермента рестрикции NotI был включен в ПЦР-праймер WMS-FP11, и сайт AscI был включен в ПЦР-праймер WMS-RP11. Сайты ферментов рестрикции были выделены с помощью подчеркивания. \*Праймеры для ОТ-ПЦР Actin-FP1 и Actin-RP1 были пригодны для использования в образцах кДНК пшеницы и *Brachypodium*.

#### Пример 1.

Исследование транскриптома выявило ген со специфичной для пыльника экспрессией.

Секвенирование РНК (РНК-секв.) включает прямое секвенирование кДНК с использованием технологии секвенирования ДНК с высокой пропускной способностью (Nagalakshmi et al., 2001). Подход на основе секвенирования РНК использовали, чтобы выявить специфичный для пыльника транскриптом в паре Ms2-изогенных линий, "Lumai 15" и "LM15<sub>Ms2</sub>". Расстояние между ушками верхних листьев и предпоследних листьев использовали в качестве критерия для выбора пыльников на аналогичной стадии развития. Пыльники, пестики и верхние листья собирали по отдельности на основном стебле или отростке, на котором расстояние между ушками достигло 4 см. Для пыльников получали три повторных образца для "Lumai 15" и "LM15<sub>Ms2</sub>", соответственно. Для пестиков и также для верхних листьев три повторных образца получали путем объединения равного количества тканей от "Lumai 15" и "LM15<sub>Ms2</sub>". Общую РНК экстрагировали с использованием TRIzol (Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) и отправляли для секвенирования РНК в компанию Berry Genomics (Пекин, Китай).

Библиотеки для секвенирования получали для среднего размера вставки 500 п.н. Секвенирование спаренных концевых фрагментов (PET) проводили для двух дорожек считанных спаренных фрагментов длиной 125 п.н. на HiSeq2500 (Illumina, Сан-Диего, США). Исходные данные предварительно обрабатывали с использованием Trimmomatic (Bolger et al., 2014), и окончательные данные получали после устранения адаптера, оснований с низким качеством (половина или более оснований считанной последовательности со значением качества  $Q \leq 3$ ) и неизвестных оснований (неизвестные основания для считанной последовательности  $>3\%$ ). Объединение окончательных данных транскриптома de novo проводили с использованием Trinity (Haas et al., 2013). Представленность транскриптома оценивали с использованием

RSEM (Li, Dewey, 2011), и дифференциально экспрессированные транскрипты/гены выявляли с помощью программы edgeR (Robinson et al., 2010). В целом, многие гены были связаны с более высокой экспрессией в пыльниках из "LM15<sub>Ms2</sub>", чем в пыльниках из "Lumai 15". В частности, неизвестный ген (SEQ ID NO: 1) специфично экспрессировался в "LM15<sub>Ms2</sub>", однако не поддавался детектированию в "Lumai 15", была высказана гипотеза, что указанный ген придает признак мужской стерильности пшенице (WMS) в "LM15<sub>Ms2</sub>". Неизвестный ген, обозначенный WMS, выбрали для функционального анализа.

#### Пример 2.

Клонирование полноразмерной кДНК гена WMS.

Общую РНК из пыльников "LM15<sub>Ms2</sub>", аликвоту РНК, отправленных на секвенирование РНК, использовали для получения кДНК с использованием набора для синтеза кДНК RevertAid First Strand (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). 5'- и 3'-концы кДНК гена WMS (SEQ ID NO: 1) выявляли в "LM15<sub>Ms2</sub>" с помощью RACE-ПЦР с использованием набора для амплификации кДНК SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Маунтин-Вью, Калифорния, США). Для проведения 5' RACE-ПЦР использовали два праймера WMS, WMS-RP1 и WMS-RP2, причем WMS-RP2 являлся вложенным по отношению к WMS-RP1. Для 3'-коцевой RACE-ПЦР использовали два других праймера WMS, WMS-FP1 и WMS-FP2, причем WMS-FP2 являлся вложенным по отношению к WMS-FP1. Секвенирование 5' и 3' продуктов RACE-ПЦР подтвердило полный размер гена WMS, собранного в ходе анализа продуктов секвенирования РНК. Соответственно, полноразмерную кДНК WMS клонировали из "LM15<sub>Ms2</sub>" с использованием праймеров WMS, WMS-FP3 и WMS-RP3, которые соответствовали нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1. кДНК длиной 1485 п.н. содержит открытую рамку считывания, содержащую 882 п.н. (ОРС). Два внутрирамочных стоп-кодона на 5'-конце кДНК свидетельствуют о том, что предсказанная ОРС является верной. В настоящем изобретении область, расположенную в направлении 5'-конца и непосредственно рядом с предсказанным старт-кодоном, рассматривали в качестве промотора гена WMS.

#### Пример 3.

Конструирование геномной библиотеки ВАС на "LM15<sub>Ms2</sub>".

Библиотеку бактериальных искусственных хромосом (ВАС) конструировали для "LM15<sub>Ms2</sub>" с использованием стандартных протоколов (Luo, Wing, 2003; Shi et al., 2011). В общих чертах, высокомолекулярную (ВММ) геномную ДНК экстрагировали из тканей листьев, частично расщепляли с помощью фермента рестрикции HindIII и разделяли на 1% агарозном геле методом электрофореза в пульсирующем поле (PFGE); Фрагменты ДНК с массой в диапазоне 100-300 тыс.п.н. выделяли из агарозного геля, повторно разделяли методом PFGE, лигировали в вектор ВАС pIndigoBAC536-S, который разрезали с помощью HindIII и дефосфорилировали; продукт лигирования трансформировали в клетки штамма E.coli DH10B, устойчивые к фагу T<sub>1</sub> (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США); Трансформанты отбирали на среде LB с добавлением 12,5 мг/л хлорамфеникола, 80 мг/л X-гал, 100 мг/л IPTG; белые колонии индивидуально собирали в 384-луночные планшеты для микротитрования. В результате 706176 клонов ВАС собирали и помещали в 1839 384-луночных планшетов (табл. 2). Испытание качества на 337 случайно отобранных клонах ВАС выявило, что средний размер вставки составляет 124,6 тыс.п.н., и частота ВАС без вставки составляет 0,50%. Следовательно, библиотека ВАС "LM15<sub>Ms2</sub>" представляла 5,5-кратное покрытие генома пшеницы (~16 млн.п.н.).

Таблица 2. Библиотека ВАС пшеницы "LM15<sub>Ms2</sub>"

| Код партии | Кол-во планшетов | Исслед. кол-во клонов | Частота ВАС без вставки (%) | Размер вставки (тыс. п. н.) | Кол-во клонов | Покрыв. генома | Доля библиотеки (%) |
|------------|------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|----------------|---------------------|
| A          | 1112             | 106                   | 0,00                        | 118,0                       | 427008        | 3,149          | 57,81               |
| B          | 330              | 123                   | 0,81                        | 132,2                       | 126720        | 1,047          | 19,22               |
| C          | 255              | 77                    | 2,59                        | 147,6                       | 97920         | 0,903          | 16,58               |
| D          | 142              | 31                    | 0,00                        | 102,1                       | 54528         | 0,348          | 6,39                |
| Всего      | 1839             | 337                   | 0,50                        | 124,6                       | 706176        | 5,5            | 100                 |

#### Пример 4.

Скрининг и секвенирование клонов ВАС "LM15<sub>Ms2</sub>".

Процедуру скрининга на основе ПЦР разработали для библиотеки ВАС.

"LM15<sub>Ms2</sub>". Библиотеку ВАС сначала дублировали путем инокуляции нового набора 384-луночных планшетов, первичный плазмидный пул получали из культуры каждого дублированного планшета с использованием набора ZR BAC DNA Miniprep (Zymo Research Corporation, Ирвин, Калифорния, США), и суперплазмидный пул получали путем объединения равного количества плазмидной ДНК из десяти первичных плазмидных пулов. В общей сложности получили 1839 первичных плазмидных пулов и 184 суперплазмидных пула.

Для скрининга библиотеки ВАС конструировали множество ПЦР-праймеров, соответствующих последовательности кДНК гена WMS (SEQ ID NO: 1) и испытывали их функциональность для геномных ДНК из "Lumai 15" и "LM15<sub>Ms2</sub>". В результате WMS-FP4 и WMS-RP4 амплифицировали один фрагмент в "Lumai 15" и два фрагмента в "LM15<sub>Ms2</sub>", причем больший фрагмент "LM15<sub>Ms2</sub>" формировал полосу на

том же уровне в 1% агарозном геле, как и фрагмент "Lumai 15" (фиг. 1). По-видимому, меньший фрагмент был специфичным для "LM15<sub>Ms2</sub>", наиболее вероятно для области Ms2, которая приводит к мужской стерильности "пшеницы Taigu". Действительно, меньший фрагмент был ассоциирован с мужской стерильностью в большой сегрегационной популяции (около 5000 растений), для которой семена собирали с растений с мужской стерильностью "LM15<sub>Ms2</sub>", которые были опылены пылью от растений с мужской фертильностью "Lumai 15", и популяция разделилась примерно на половину растений с мужской фертильностью и половину растений с мужской стерильностью. Соответственно, полученный из экзона ПЦР-маркер, WMS-EM, создавали с использованием праймеров WMS-FP4 и WMS-RP4.

Маркер WMS-EM использовали для скрининга суперплазмидных пулов и затем первичных плазмидных пулов библиотеки BAC "LM15<sub>Ms2</sub>". После идентификации первичного пула клон BAC определяли с использованием ПЦР в 384-луночном планшете. В общей сложности выделяли три BAC-клон (фиг. 2), при этом один клон дал меньший ПЦР-продукт, и два клона дали больший ПЦР-продукт. Вероятно, BAC-клоны (P89 и P1076), которые давали больший ПЦР-продукт, получали из 4D хромосомы, лишенной доминантного гена Ms2, в то время как клон BAC (P1593), который давал меньший ПЦР-продукт, получали из 4D хромосомы, несущей доминантный ген Ms2 (фиг. 1). Маркер WMS-EM для P1593 был полностью связан с мужской стерильностью, что указывает на доминантный ген WMS на P1593, в то время как маркер WMS-EM для P89/P1076 не выявил тесной связи с мужской стерильностью, что указывает на рецессивный ген wms на P89/P1076. Все три BAC-клона отбирали для секвенирования следующего поколения, предоставленного компанией Berry Genomics. Исходные данные секвенирования предварительно обрабатывали путем устранения адаптеров, оснований с низким качеством (половина или более оснований считанной последовательности со значением качества  $Q \leq 5$ ), а также неизвестных оснований (неизвестные основания считанной последовательности  $>10\%$ ). Вектор BAC (pIndigoBAC536-S) и геномную ДНК *E. coli* очищали, используя инструмент для оценки перекрестного соответствия пакета Phrap (Ewing et al., 1998). Сборку окончательных данных *de novo* выполняли для K-мерных деревьев различного размера (21-91) с помощью программы ABySS 1.5.2 (Simpson et al., 2009). K-мерное значение 41 выбирали для сборки данных секвенирования, что соответствует наилучшему значению N50. Анализ результатов секвенирования выявил, что P89 и P1076 содержат идентичный фрагмент массой 54056 п.н., представляющий одну и ту же хромосому, тем не менее, между P89/P1076 и P1593 наблюдали существенный полиморфизм. В соответствии с кДНК WMS (SEQ ID NO: 1), все три BAC содержали полную транскрибируемую область гена WMS/wms, предсказанная кДНК WMS P1593 была идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, однако содержала одиннадцать полиморфизмов одного нуклеотида (SNPs) между предсказанной кДНК wms P89/P1076 и нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1. Для сравнения, ген wms в P89 и P1076 был полноразмерным с учетом информации о последовательности промотора (SEQ ID NO: 3), однако ген WMS в P1593 был неполным, поскольку он располагался на одном конце BAC, что в результате привело к неполному промотору (фиг. 2). Следовательно, множество ПЦР-праймеров разрабатывали так, чтобы они соответствовали промотору wms (SEQ ID NO: 3), и затем испытывали их функциональность на геномных ДНК из "Lumai 15" и "LM15<sub>Ms2</sub>". В результате WMS-FP5 и WMS-RP5 амплифицировали две полосы в "Lumai 15", но три полосы в "LM15<sub>Ms2</sub>", причем меньший фрагмент "LM15<sub>Ms2</sub>" формировал полосу на том же уровне в 1% агарозном геле, как и фрагмент "Lumai 15" (фиг. 1). По-видимому, больший фрагмент был специфичным для "LM15<sub>Ms2</sub>". Следовательно, полученный из промотора ПЦР-маркер, WMS-PM, создавали с использованием праймеров WMS-FP5 и WMS-RP5. Маркер WMS-PM использовали для скрининга библиотеки BAC "LM15<sub>Ms2</sub>". Был выявлен дополнительный клон BAC P204 (фиг. 1 и 2), который был получен из 4D хромосомы с доминантным геном MS2. Аналогичным образом, клон BAC P204 секвенировали и собирали, при этом было установлено, что он содержит участок размером 1212 п.н., который аналогичен участку в клоне BAC P1593. Для сравнения ген wms (SEQ ID NO: 3) содержит 8657 пар оснований, однако соответствующая последовательность гена WMS содержит 10592 пар оснований (SEQ ID NO: 4), разница в размерах в основном обусловлена вставкой транспозона в промотор WMS.

#### Пример 5.

Исследование тканеспецифичной экспрессии гена WMS ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и кОТ-ПЦР использовали для измерения уровня мРНК гена WMS в каждой ткани пшеницы. Для ОТ-ПЦР использовали два праймера WMS, WMS-FP6 и WMS-RP6, и два праймера, Actin-FP1 и Actin-RP1, для контрольного белка актина. Для кОТ-ПЦР использовали два других праймера WMS, WMS-FP7 и WMS-RP7, и два праймера, Actin-FP2 и Actin-RP2, для контрольного белка актина (Fu et al., 2007). Ген WMS специфично экспрессировался в пыльниках пшеницы, но не в других тканях, таких как створка, лист, нижняя цветковая чешуя и верхняя цветковая чешуя, пестик, корень и стебель (фиг. 3А); уровень мРНК WMS в пыльнике был в 100 раз выше, чем в любых других исследованных тканях (фиг. 3В).

#### Пример 6.

Идентификация промотора WMS.

Область ДНК, расположенную в направлении 5'-конца относительно предсказанного старт-кодона, исследовали путем сравнения указанных генов, доминантного WMS и рецессивного wms. Для восстановления функционального промотора рассматривали возможность использования относительно длин-

ного фрагмента (от 2 до 4 тыс.п.н) для генов растений, особенно неизвестных генов. В настоящем изобретении фрагмент размером 3502 п.н. (SEQ ID NO: 3) рассматривали в качестве промотора для рецессивного гена *wms* в "Lumai 15". Соответствующая область доминантного гена WMS из "LM15<sub>Ms2</sub>" содержала 5578 п.н. (SEQ ID NO: 4). Выбранные промоторы WMS и *wms* содержали 2414 идентичных пар нуклеотидов на 5'-конце, тогда как оставшаяся часть последовательности промотора *wms* длиной 1088 п.н. существенно отличалась по сравнению с остальной частью последовательности промотора WMS длиной 3164 п.н. Увеличение размера промотора WMS в основном было обусловлено вставками двух транспозонов длиной 275 п.н. и 179 п.н., соответственно. Предположительно, область последовательности длиной 5578 п.н., расположенная в направлении 5'-конца относительно области гена WMS, обладала активностью, специфичной для пыльника.

Чтобы подтвердить специфичную для пыльника активность промотора WMS (SEQ ID NO: 5), получали две конструкции для экспрессии у растений, включая принимающий вектор PC613 и конструкцию PC966, содержащую репортерный белок GFP (PWMS::GFP) (фиг. 4A), в настоящей заявке PWMS обозначает промотор WMS (SEQ ID NO: 5). Ген GFP в PC613 и PC966 получали из pGWB4 (Nakagawa et al., 2007). PC613 и PC966 содержали аналогичный плазмидный остов pCAMBIA1300. Линкерная область ДНК между P<sub>WMS</sub> и GFP представляла собой 5'-TAGGGAGAGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGATCATG-3', 5'-концевые нуклеотиды TAGGGAG получали из конца промотора WMS, и 3'-концевой нуклеотид ATG обозначает стартовый кодон GFP. PC613 и PC966 вводили путем баллистической трансфекции в различные органы цветка (нижнюю цветковую чешую, верхнюю цветковую чешую, пестик и пыльник) в соответствии с инструкциями в примере 9. Флуоресценцию GFP наблюдали под флуоресцентным стереомикроскопом через три дня после баллистической трансфекции. Сигналы GFP детектировали в тканях после баллистической трансфекции конструкцией PC966 (P<sub>WMS</sub>::GFP), особенно в пыльнике, но не в тканях после баллистической трансфекции конструкцией PC613. Следовательно, промотор WMS (SEQ ID NO: 5) согласно настоящему изобретению обладает промоторной активностью и может стимулировать экспрессию GFP в пыльнике.

Для выполнения генетической комплементации (пример 9) и для проверки функции промотора WMS (SEQ ID NO: 5), геномную аллель WMS (SEQ ID NO: 7) клонировали и использовали для сборки конструкции для экспрессии у растений PC976 (фиг. 4A). Конструирование вектора и баллистическую трансфекцию выполняли, как описано в примере 9. В PC966 и PC976 использовали идентичные фрагменты промотора WMS (SEQ ID NO: 5). Тканеспецифичную экспрессию гена WMS регистрировали в трансгенной линии пшеницы "JZ7-2" (табл. 3), для детектирования использовали праймеры WMS, WMS-FP6 и WMS-RP6, и праймеры актина, Actin-FP1 и Actin-RP1. Как следствие этого промотор WMS (SEQ ID NO: 5) согласно настоящему изобретению вызывал специфичную для пыльника экспрессию гена WMS, которая отсутствовала в других тканях, включая лист, стебель, створку, нижнюю цветковую чешую, верхнюю цветковую чешую и пестик (фиг. 4C). В заключение следует отметить, что промотор WMS (SEQ ID NO: 5) способен вызывать специфичную для пыльника экспрессию. Следовательно, целесообразной является сборка кассеты экспрессии, содержащей промотор WMS (SEQ ID NO: 5) и ген-мишень. После введения в растения (например, зерновые сельскохозяйственные культуры, древесные породы, овощи и цветы) кассета экспрессии обеспечит специфичную для пыльника экспрессию гена-мишени. Это будет иметь большое значение для формирования мужской стерильности и других важных признаков у растений.

#### Пример 7.

Получение EMS-индуцированной популяции "LM15<sub>Ms2</sub>".

Мутированную популяцию "LM15<sub>Ms2</sub>", содержащую 1200 WMS-положительных растений M<sub>1</sub>, создавали с использованием 87,4 мкМ раствора этилметансульфоната (EMS; Sigma-Aldrich, Сет-Луис, Массачусетс, США). В общих чертах, по 400 семян (M<sub>0</sub>) от растений, полученных в результате скрещивания "LM15<sub>Ms2</sub>"/"Lumai 15", замачивали в 100 мл 87,4 мкМ EMS (0,9% в воде, об./об.), и затем инкубировали в работающем шейкере при 150 об./мин и 25°C в течение 10 ч. После обработки EMS семена промывали под проточной водой при комнатной температуре в течение 4 ч. Семена M<sub>1</sub> после мутагенеза помещали на влажную бумагу и поддерживали в пластиковой коробке (длина×ширина×высота=40 см×30 см×20 см), покрытой полиэтиленовой пленкой, и затем инкубировали при 25°C с 16 ч фотопериодом в течение 8 дней. Жизнеспособные саженцы с корнями пересаживали в почву и поддерживали в холодном помещении при 4°C и 12 ч фотопериоде в течение 6 недель. Яровизированные растения M<sub>1</sub> затем поддерживали в теплице при 25°C и 16 ч фотопериоде. В теплице поддерживали только растения, несущие доминантный ген WMS, и отбраковывали растения без доминантного гена WMS, которые давали мутированную популяцию, включая 1200 WMS-содержащих растений M<sub>1</sub>.

#### Пример 8.

Скрининг методом TILLING мутации WMS в EMS-обработанной популяции "LM15<sub>Ms2</sub>".

Вследствие присутствия доминантного гена WMS все 1200 WMS-содержащих растений M<sub>1</sub>, предположительно, характеризуются мужской стерильностью. Однако некоторые мутации в гене WMS, как

полагают, подавляют его функцию, вызывая мужскую фертильность. Следовательно, характеристики мужской фертильности/стерильности исследовали во всех колосьях 1200 WMS-содержащих растений  $M_1$ . Из 3138 осмотренных колосьев, двадцать колосьев имели фенотипы мужской фертильности, характеризующиеся обычным пыльником, пылением и завязыванием семян (фиг. 5).

Геномную ДНК получали из верхних листьев основного ствола растений  $M_1$  методом на основе саркозила (Yuan et al., 2012). Концентрации ДНК измеряли с использованием спектрофотометра Nano-Drop (Thermo Scientific, Уилмингтон, Делавэр, США) и нормировали до концентрации 100 нг/мкл. Равные количества четырех образцов ДНК объединяли и подготавливали для исследования в 96-луночном планшете. Образцы ДНК также получали из верхних листьев основных стеблей или отростков, которые давали колосья с мужской фертильностью. Каждую из указанных ДНК объединяли с равным количеством геномной ДНК из дикого типа "LM15<sub>MS2</sub>" с получением двукратного пула.

Общую геномную ДНК экстрагировали методом на основе саркозила (Yuan et al., 2012). Для всех растений сегмент верхнего листа (длинной 3-5 см) первичного отростка использовали для получения независимых образцов ДНК. Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра ND2000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, Делавэр, США), и доводили до 100 нг/мкл с использованием бидистиллированной воды. Каждые четыре образца ДНК объединяли и хранили в 96-луночных планшетах. Верхние листья двадцати отростков/колосьев с фенотипом мужской фертильности собирали и получали из них независимые образцы ДНК. В тех случаях, когда отросток с мужской фертильностью являлся первичным отростком, использовали образец ДНК первичного отростка. ДНК из каждого отростка с мужской фертильностью затем объединяли с равным количеством ДНК дикого типа "LM15<sub>MS2</sub>" и также хранили в 96-луночном планшете. Модифицированный подход TILLING (Uauy et al., 2009) использовали для детектирования индуцированных мутаций гена WMS. Метод детектирования с использованием полиакриламида включает двухэтапный скрининг. Первый этап скрининга методом ПЦР состоит из двух реакций ПЦР:

1) ПЦР для длинных фрагментов проводили для амплификации аллеля WMS во всех пулах ДНК с использованием набора KOD FX (Toyobo Co., Осака, Япония); для проведения ПЦР использовали селективные праймеры для ПЦР, WMS-FP8 и WMS-RP10; ПЦР проводили в 50 мкл смесей, содержащих 1× буфер для ПЦР (KOD-Plus-Neo), 1,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,2 мМ каждого дНТФ, 0,2 мкМ каждого праймера, 200 нг геномной ДНК, 1 Ед полимеразы Taq (KOD-Plus-Neo) и бидистиллированную ШО; реакции ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин, затем 35 циклов при 98°C в течение 10 с, 60°C в течение 30 с и 68°C в течение 6 мин и окончательное удлинение при 68°C в течение 10 мин; продукт ПЦР разводили в 500 раз с использованием бидистиллированной H<sub>2</sub>O и затем использовали в качестве матрицы для следующей реакции ПЦР;

2) второй этап ПЦР проводили в 25 мкл смесей, содержащих 1× буфер для ПЦР (1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ каждого дНТФ (Promega, Мэдисон, США), 0,2 мкМ каждого праймера, 2 мкг ДНК-матрицы из разбавленного продукта ПЦР, 1 Ед полимеразы Taq (Promega) и бидистиллированную H<sub>2</sub>O; матрицу размером 5922 п.н. разделяли на три фрагмента для амплификации: первый фрагмент амплифицировали с использованием WMS-FP8 и WMS-RP8, второй фрагмент амплифицировали с использованием WMS-FP9 и WMS-RP9 и третий фрагмент амплифицировали с использованием WMS-FP10 и WMS-RP10; реакции ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация при 94°C в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94°C в течение 30 с, 61°C в течение 30 с, 72°C в течение 90 с, и окончательное удлинение при 72°C в течение 10 мин. В конце реакции ПЦР проводили этап денатурации и повторного отжига (99°C в течение 10 мин, 90 циклов при 72°C в течение 20 с со снижением на 0,3°C в каждом цикле), чтобы обеспечить образование гетеродуплексов, если мутация присутствует в пуле.

После этапа повторного отжига продукт ПЦР расщепляли с помощью экстракта сока сельдерея (CJE), который получали с использованием протокола, описанного Till et al. (Till et al., 2006). Количество CJE для расщепления гетеродуплексов оптимизировали, как это было предложено Uauy et al. (Uauy et al., 2009). Реакция CJE включала: 14 мкл продукта ПЦР, 1 мкл CJE, 2 мкл 10× буфера для расщепления (Till et al., 2006) и 3 мкл бидистиллированной H<sub>2</sub>O до конечного объема 20 мкл. Расщепление проводили при 45°C в течение 30 мин и немедленно останавливали реакцию путем добавления 5 мкл ЭДТА (75 мМ) в расчете на один образец и тщательно перемешивали. К образцам добавляли по 5 мкл буфера для загрузки, содержащего краситель бромфеноловый синий (6×), и приблизительно 24 мкл реакционной смеси вносили в 3% полиакриламидный гель (акриламид:бис в соотношении 19:1). Положительные пулы идентифицировали путем детектирования расщепленных продуктов ПЦР, объединенный размер которых был сопоставим с размером интактного продукта ПЦР. В отношении двукратных пулов ДНК присутствие расщепленной полосы ПЦР указывало на точечную мутацию в матрице ПЦР выбранного образца ДНК. В отношении четырехкратных пулов ДНК присутствие расщепленной полосы ПЦР указывало на то, что один образец ДНК из идентифицированного пула ДНК должен нести точечную мутацию в матрице ПЦР, которая может быть идентифицирована на втором этапе скрининга.

Второй этап скрининга выполняли, чтобы определить, какие отдельные ДНК в четырехкратном пуле ДНК действительно несут мутацию. Каждый образец ДНК затем объединяли с равным количеством

геномной ДНК из дикого типа "LM15<sub>Ms2</sub>" с получением двукратного пула; указанные двукратные пулы ДНК затем подвергали скринингу для определения продуктов расщепления, обнаруженных на первом этапе скрининга.

Чтобы выявить изменение нуклеотида проводили стандартную реакцию ПЦР на выбранной индивидуальной ДНК; продукт ПЦР секвенировали, чтобы выявить точечную мутацию (фиг. 5). Для колосьев M<sub>1</sub> с мужской фертильностью идентифицированные точечные мутации вновь подтверждали в растениях M<sub>2</sub>. Скрининг методом TILLING выявил 35 мутантов среди 1200 первичных отростков, в то время среди 20 отростков с мужской фертильностью было выявлено восемь мутированных вариантов (фиг. 5). В соответствии с данными, полученными для первичных отростков, частота мутаций гена WMS составляет около 2,92%. Однако среди 20 отростков с мужской фертильностью было обнаружено восемь отростков, несущих детектируемые мутации, и 12 отростков, вероятно, не имели мутаций в гене WMS. Если предположить отсутствие корреляции между WMS и мужской фертильностью (нулевая гипотеза), то частота мутаций в популяции (2,92%) может быть использована для вычисления ожидаемых значений для присутствия мутации и отсутствия мутации среди 20 отростков с мужской фертильностью, которые составляют 0,58 и 19,42, соответственно. Однако критерий согласия хи-квадрат отклонил нулевую гипотезу ( $\chi^2=97,13$ ,  $df=1$ ,  $P=6,49 \times 10^{-23}$ ). Следовательно, ген WMS вероятно определяет мужскую стерильность в пшенице Taigu.

#### Пример 9.

Получение трансгенной пшеницы Bobwhite с использованием баллистической трансфекции.

Для выполнения генетической комплементации геномный фрагмент размером 10592 п.н. (SEQ ID NO: 7) гена WMS клонировали из "LM15<sub>Ms2</sub>" с использованием набора FX KOD и двух специфичных ПЦР-праймеров, WMS-FP11 и WMS-RP11. После клонирования продукта ПЦР во вставляемый вектор и принимающий вектор получали конструкцию для экспрессии у растений (PC976), которая несла селективный маркер BAR (фиг. 4A). В настоящем изобретении получали ВАС-клоны, несущие ген WMS. Это облегчит клонирование гена WMS (SEQ ID NO: 7) из ВАС клонов согласно настоящему изобретению. Если необходимо прямое клонирование из пшеницы Taigu, ПЦР со сравнением с эталоном (Vasl et al., 2004) облегчит амплификацию полноразмерного гена WMS (SEQ ID NO: 7).

Протоколы для тканевой культуры и баллистической трансфекции пшеницы адаптировали из предыдущих исследований (Weeks et al., 1993; Lv et al., 2014). Незрелые зерновки из сорта T. aestivum "Bobwhite" собирали через две недели после цветения, стерилизовали с помощью 70% (об./об.) этанола, содержащего 0,05% (об./об.) твин-20 в течение 5 мин, затем с использованием 20% (об./об.) хлорной извести Clorox с добавлением 0,05% (об./об.) твин-20 в течение 15 мин, и промывали 3-5 раз с использованием стерильной дистиллированной воды. Незрелые зародыши (приблизительно 1 мм в длину) выделяли из стерилизованных зерновок, помещали в среду для диссекции так, чтобы щиток был направлен вверх (MS-основание 4,3 г/л, мальтоза 40 г/л, тиамин-HCl 0,5 мг/л, L-аспарагин 0,15 г/л, 2,4-D 2 мг/л, CuSO<sub>4</sub> 0,78 мг/л, Phytigel 2,5 г/л, pH 5,8), и поддерживали в течение 4-6 дней при температуре 22-23°C в темноте. Незрелые зародыши затем обрабатывали в течение четырех часов в средах с высокой осмолярностью (MS-основание 4,3 г/л, мальтоза 40 г/л, сахароза 171,15 г/л, тиамин-HCl 0,5 мг/л, L-аспарагин 0,15 г/л, 2,4-D 2 мг/л, CuSO<sub>4</sub> 0,78 мг/л, Phytigel 2,5 г/л, pH 5,8), и подвергали баллистической трансфекции. Через двадцать часов после баллистической трансфекции незрелые зародыши переносили в среды для восстановления (состав которых аналогичен составу сред для диссекции), поддерживали в течение 2-х недель при температуре 22-23°C в темноте. Полученные из зародышей каллусы переносили в среды для восстановления (среда для диссекции, дополненная 0,1 мг/л 6-BA и 3 мг/л биалафоса) и поддерживали в течение двух недель в вегетационной камере (22-23°C, 16 ч свет/8 ч темнота, интенсивность света 25 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>). Восстановленные проростки (2-3 см) переносили в среды для укоренения (среда для диссекции, ослабленная в два раза, с добавлением 3 мг/л биалафоса), и выдерживали при тех же условиях окружающей среды, как и для восстановления. Жизнеспособные проростки с хорошо развитыми корнями укореняли в почву в теплице.

Баллистическую трансфекцию проводили с использованием системы для доставки PDS-1000/He Particle (Bio-Rad Laboratories, США). Для проведения трех трансфекций 2 мг микроносителей (частицы золота диаметром 0,6 мкм; Bio-Rad, США) взвешивали в 1,5 мл микроцентрифужных пробирках, стерилизовали путем смешивания с 35 мкл чистого этанола, выделяли путем осаждения (12000 об./мин в течение 5 с), удаляли супернатант, промывали в 200 мкл ледяной стерильной дистиллированной воды и собирали путем осаждения с последующим удалением супернатанта. Предварительно обработанные микроносители ресуспендировали в 245 мкл предварительно охлажденной стерильной воды, содержащей 20 мкг плазмидной ДНК, и объединяли с 250 мкл предварительно охлажденного раствора CaCl<sub>2</sub> (2,5 M). При необходимости растворы на предыдущих этапах тщательно перемешивали с помощью пипетки. Затем к суспензии микроносителей добавляли 50 мкл предварительно охлажденного раствора спермидина (1,45%, об./об.) и сразу же смешивали при помощи вортекса в холодной комнате (4°C) в течение 15-20 мин. Микроносители, покрытые плазмидной ДНК, выделяли путем центрифугирования (12000 об./мин в течение 10 с), с последующим удалением супернатанта, и затем повторно суспендировали в 36 мкл чис-



того этанола. Для каждой баллистической трансфекции по 10 мкл суспензии золота вносили в центр диска для микроносителей (Био-Rad), высушивали на воздухе в ламинарном проточном боксе, и помещали пусковой контейнер для микроносителей под разрывным диском, который разрывается при давлении 1100 фунтов на квадратный дюйм. Шестдесят незрелых зародышей, расположенных в виде круга диаметром 3,5 см, помещали на 6 см ниже пускового контейнера для микроносителей. Систему PDS-1000/He использовали в соответствии с инструкцией изготовителя. Условия бомбардировки включали давление гелия 1300 фунтов на квадратный дюйм и вакуум при 25 мм ртутного столба. В общей сложности 2742 незрелых зародыша пшеницы бомбардировали конструкцией PC976, и 26 растений восстановили из каждого отдельного зародыша (табл. 3). Предполагаемые трансгенные растения сначала подвергали скринингу в теплице путем проверки их устойчивости к 0,3% (об./об.) гербициду Finale®. На стадии удлинения стебля все отростки (один лист на один отросток, 3 см сегмента на лист) покрывали гербицидом. Чувствительность к гербициду оценивали через пять дней после нанесения гербицида. Покрываемая область оставалась зеленой и здоровой на отростках, устойчивых к гербициду, однако исчезала на отростках, чувствительных к гербициду. Только пять растений проявили устойчивость к гербициду (фиг. 6 и табл. 3). На стадии цветения три растения обладали мужской стерильностью, и два из них были также устойчивы к гербициду (фиг. 6 и табл. 3). Затем предполагаемые трансгенные растения исследовали для того чтобы выявить присутствие маркера селекции BAR и гена WMS с использованием ПЦП-праймеров BAR-FP1, BAR-RP1, WMS-FP8 и WMS-RP12. Семь растений показали положительные результаты на наличие BAR и гена WMS (табл. 3). ОТ-ПЦП использовали для исследования транскрипции WMS в молодых колосьях с помощью ПЦП-праймеров WMS-FP6 и WMS-RP6 для гена WMS и Actin-FP1 и Actin-RP1 для внутреннего контроля. кДНК WMS поддавалась детектированию только в трех трансгенных растениях с мужской стерильностью (фиг. 6). В заключение следует отметить, что введение геномного фрагмента WMS (SEQ ID NO: 7) и экспрессия кДНК WMS (SEQ ID NO: 1) привела к развитию фенотипа мужской стерильности в трансгенной пшенице. Следовательно, введение геномного фрагмента WMS (SEQ ID NO: 7) или кДНК WMS (SEQ ID NO: 1) под контролем соответствующего промотора в фертильные растения (такие как зерновые культуры, древесные породы, цветы и овощи) может обеспечить получение трансгенных растений с мужской стерильностью. Это позволит значительно улучшить повторяющуюся селекцию растений и получение гибридных семян.

Таблица 3. Присутствие гена WMS в трансгенных растениях пшеницы T<sub>0</sub>

| № растения | № каллуса | Нанесение гербицида | гДНК BAR | гДНК WMS | кДНК WMS | Мужская стерильность |
|------------|-----------|---------------------|----------|----------|----------|----------------------|
| JZ6-1      | 217       | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| JZ6-2      | 227       |                     |          | -        | -        | -                    |
| JZ6-3      | 251       | +                   | +        | +        | -        | -                    |
| JZ6-4      | 253       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ6-5      | 260       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ6-6      | 269       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ6-7      | 279       | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| JZ6-8      | 290       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ6-9      | 293       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ7-1      | 400       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ7-2      | 402       | -                   | +        | +        | +        | +                    |
| JZ7-3      | 415       | +                   | +        | +        | -        | -                    |
| JZ7-4      | 416       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ7-5      | 417       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ7-6      | 420       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-1      | 439       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-2      | 445       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-3      | 446       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-4      | 452       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-5      | 454       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-6      | 458       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-7      | 459       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-8      | 460       | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| JZ9-9      | 463       | +                   | +        | +        | -        | -                    |
| JZ9-10     | 464       | -                   | +        | +        | -        | -                    |
| JZ9-11     | 467       | -                   | -        | -        | -        | -                    |

Примечание: "+" указывает на устойчивость к гербициду, положительный результат на наличие гена BAR, положительный результат на наличие гена WMS, положительный результат на наличие кДНК WMS и мужскую стерильность; Клетки с символом "+" были затенены серым цветом. Количество растений положительных в отношении каждого исследуемого признака было подчеркнуто в строках промежуточных итогов.

#### Пример 10.

Получение трансгенных растений *Brachypodium* с использованием *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Результаты, полученные в настоящем изобретении, подтвердили функционирование гена WMS в модельном растении *Brachypodium*. Конструкцию для экспрессии у растений PC976 (фиг. 4А) вводили в штамм *Agrobacterium* "AGL1" путем электропорации. Трансгенные растения *Brachypodium* получали с использованием протокола *Agrobacterium*-опосредованной трансформации (Bragg et al., 2012).

Для получения инокулята *Agrobacterium* AGL1, несущие конструкцию PC976, наносили штрихом на твердую среду MG/L (триптон 5 г/л, дрожжевой экстракт 2,5 г/л, NaCl 5 г/л, D-маннит 5 г/л,  $MgSO_4$  0,1 г/л,  $K_2HPO_4$  0,25 г/л, L-глутаминовая кислота 1,2 г/л, порошок агар 15 г/л, pH 7,2) с добавлением соответствующих антибиотиков (канамицин 50 мг/л, карбенициллин 100 мг/л и рифампицин 40 мг/л), инкубировали в течение двух дней при 28°C в темноте, собирали путем соскабливания колоний *Agrobacterium* со среды MG/L и ресуспендировали до достижения  $OD_{600}=0,6$  в жидкой СМ.

Незрелые семена собирали из изолята *B. distachyon* "Bd21-3" на этапе налива семян, стерилизовали в 10% (об./об.) хлорной извести Clorox®, дополненной 0,1% (об./об.) тритоном X-100, в течение 4 мин и промывали 3 раза стерильной водой. Незрелые зародыши (длинной 0,3-0,7 мм) выделяли из стерилизованных семян, расположенных щитком вверх на средах для инициации каллуса (СМ: LS-основание 4,43 г/л,  $CuSO_4$  0,6 мг/л, сахароза 30 г/л, 2,4-D 2,5 мг/л, Phytigel 2 г/л, pH 5,8) и инкубировали при 28°C в темноте. Через четыре недели каллусы стали видны вследствие пролиферации клеток щитка; для субкультивирования и *Agrobacterium*-опосредованной трансформации отбирали только желтоватые эмбриогенные каллусы.

Эмбриогенные каллусы инфицировали в течение 5 минут путем погружения в свежий инокулят *Agrobacterium*, который содержал 200 мкМ ацетосирингона и 0,1% (мас./об.) Synperonic PE/F68, высушивали на фильтровальной бумаге для удаления свободной суспензии инокулята и инкубировали на трех слоях фильтровальной бумаги в течение 3 дней при температуре 22°C в темноте. После совместного культивирования каллусы сначала поддерживали на средах СМ, дополненных 150 мг/л тиментина и 40 мг/л гигромицина в течение одной недели при 28°C в темноте, и затем культивировали в течение еще двух недель. Жизнеспособные каллусы переносили на среды для восстановления (Bragg et al., 2012) (LS-основание 4,43 г/л,  $CuSO_4$  0,6 мг/л, мальтоза 30 г/л, кинетин 0,2 мг/л, Phytigel 2 г/л, pH 5,8), содержавшие 150 мг/л тиментина и 40 мг/л гигромицина, и поддерживали при 28°C в условиях LD (16 ч свет/8 ч темнота, интенсивность света 20 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>). После того как восстановленные побеги достигли 1-2 см в длину их переносили в среды для укоренения (Bragg et al., 2012) (MS-основание с витамином 4,42 г/л, сахароза 30 г/л, Phytigel 2 г/л, pH 5,8), которые содержали 150 мг/л тиментина, и поддерживали при тех же условиях, как и на этапе восстановления. После того как восстановленные побеги давали здоровые корни (2-3 см) их укореняли в почву в теплице.

В общей сложности 100 каллусов инфицировали штаммом *Agrobacterium* AGL1, несущим конструкцию PC976. Одиннадцать растений были восстановлены из восьми независимых каллусов (табл. 4). Предполагаемые трансгенные растения первоначально подвергали скринингу в теплице путем проверки их устойчивости к 0,3% (об./об.) гербициду Finale®. На стадии трех листьев (приблизительно 10 см в высоту) все отростки (один лист на отросток, 1 см сегмент на лист) обрабатывали гербицидом.

Чувствительность к гербициду оценивали через пять дней после нанесения гербицида. Покрытая область оставалась зеленой и здоровой на устойчивых к гербициду отростках, однако исчезала на отростках, чувствительных к гербициду. Десять растений проявили устойчивость к гербициду (фиг. 7 и табл. 4). На стадии цветения десять растений имели фенотип мужской стерильности и также были устойчивы к гербициду (фиг. 7 и табл. 4). Затем предполагаемые трансгенные растения исследовали, чтобы выявить присутствие маркера селекции BAR и гена WMS с использованием ПЦР-праймеров BAR-FP1, BAR-RP1, WMS-FP8 и WMS-RP12. Все десять растений были положительными в отношении генов BAR и WMS (табл. 4). ОТ-ПЦР использовали для проверки транскрипции WMS в молодых колосьях с использованием ПЦР-праймеров WMS-FP6 и WMS-RP6 для гена WMS и Actin-FP1 и Actin-RP1 для внутреннего контроля. кДНК WMS поддавалась детектированию в десяти трансгенных растениях с мужской стерильностью (фиг. 7, табл. 4). В совокупности, среди 11 предполагаемых трансгенных растений десять растений были устойчивы к гербициду, положительны в отношении трансгенов BAR и WMS, положительны в отношении кДНК WMS и имели фенотип мужской стерильности. В то время как только одно растение было чувствительно к гербициду, не содержало трансгены BAR и WMS, не содержало кДНК WMS и имело фенотип мужской фертильности. Следовательно, геномный фрагмент WMS (SEQ ID NO: 7) может эффективно индуцировать мужскую стерильность в *Brachypodium*.

В свою очередь, введение геномного фрагмента WMS (SEQ ID NO: 7) или кДНК WMS (SEQ ID NO: 1) под контролем соответствующего промотора в фертильные растения (такие как зерновые культуры, древесные породы, цветы и овощи) может вызвать развитие фенотипа мужской стерильности у трансгенных растений. Это позволит значительно улучшить повторяющуюся селекцию растений и получение гибридных семян.

Таблица 4. Присутствие гена WMS в трансгенных растениях *Brachypodium T<sub>0</sub>*

| № растения | № каллуса | Нанесение гербицида | гДНК BAR | гДНК WMS | кДНК WMS | Мужская стерильность |
|------------|-----------|---------------------|----------|----------|----------|----------------------|
| 22-1       | 22-1      | -                   | -        | -        | -        | -                    |
| 22-2       | 22-2      | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-7       | 22-7      | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-8       | 22-8      | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-9       | 22-9      | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-5A      | 22-5      | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-5B      | 22-5      | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-6A      | 22-6      | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-6B      | 22-6      | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-12A     | 22-12     | +                   | +        | +        | +        | +                    |
| 22-12B     | 22-12     | +                   | +        | +        | +        | +                    |

Примечание: "+" указывает на устойчивость к гербициду, положительный результат на наличие гена BAR, положительный результат на наличие гена WMS, положительный результат на наличие кДНК WMS и мужскую стерильность; "-" указывает на чувствительность к гербициду, отрицательный результат на наличие гена BAR, отрицательный результат на наличие гена WMS, отрицательный результат на наличие кДНК WMS и мужскую фертильность. Клетки с символом "+" были затенены серым цветом. Количество растений положительных в отношении каждого исследуемого признака было подчеркнуто в строках промежуточных итогов.

## Литература

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B.** (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114-2120.
- Bragg, J.N., Wu, J., Gordon, S.P., Guttman, M.E., Thilmony, R., Lazo, G.R., Gu, Y.Q., Vogel, J.P.** (2012). Generation and characterization of the Western Regional Research Center Brachypodium T-DNA insertional mutant collection. *PLoS ONE* **7**, e41916.
- Cao, W., Somers, D.J., Fedak, G.** (2009). A molecular marker closely linked to the region of *Rht-D1c* and *Ms2* genes in common wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* **52**, 95-99.
- Cheng, J.K., Alper, H.S.** (2014). The genome editing toolbox: a spectrum of approaches for targeted modification. *Current Opinion in Biotechnology* **30**, 87-94.
- Christensen, A., Sharrock, R., Quail, P.** (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* **18**, 675-689.
- Deng, J., Gao, Z.** (1982). Discovery and determination of a dominant male sterile gene and its importance in genetics and wheat breeding. *Science China: Chemistry* **25**, 508-520.
- Djukanovic, V., Smith, J., Lowe, K., Yang, M., Gao, H., Jones, S., Nicholson, M.G., West, A., Lape, J., Bidney, D., Carl Falco, S., Jantz, D., Alexander Lyznik, L.** (2013). Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (*MS26*) using a re-designed I-CreI homing endonuclease. *The Plant Journal* **76**, 888-899.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P.** (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research* **8**, 175-185.
- Fu, D., Dunbar, M., Dubcovsky, J.** (2007). Wheat VIN3-like PHD finger genes are up-regulated by vernalization. *Molecular Genetics and Genomics* **277**, 301-313.
- Gurushidze, M., Hensel, G., Hiekel, S., Schedel, S., Valkov, V., Kumlehn, J.** (2014). True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *PLoS ONE* **9**, e92046.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A.** (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* **8**, 1494-1512.

- Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon, G.J.** (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* **2**, 110-119.
- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M.D., Cortopassi, G., Galas, D.J.** (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **17**, 6545-6551.
- Karlin, S., Altschul, S.F.** (1993). Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 5873-5877.
- Kempken, F., Pring, D.** (1999). Plant breeding: Male sterility in higher plants - fundamentals and applications. In *Progress in Botany*, K. Esser, J.W. Kadereit, U. Lüttge, and M. Runge, eds (Springer Berlin Heidelberg), pp. 139-166.
- Ketting, R.F., Plasterk, R.H.A.** (2000). A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* **404**, 296-298.
- Korf, I., Yandell, M., Bledell, J.** (2003). An essential guide to the basic local alignment search tool: BLAST. (Sebastopol, CA: O'Reilly Associates).
- Kosuri, S., Church, G.M.** (2014). Large-scale *de novo* DNA synthesis: technologies and applications. *Nature Methods* **11**, 499-507.
- Landt, O., Grunert, H.-P., Hahn, U.** (1990). A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**, 125-128.
- Lapidot, M., Pilpel, Y.** (2006). Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO Reports* **7**, 1216-1222.
- Li, B., Dewey, C.** (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323.
- Liu, B., Deng, J.** (1986). A dominant gene for male sterility in wheat. *Plant Breeding* **97**, 204-209.
- Liu, X., Shangguan, Y., Zhu, J., Lu, Y., Han, B.** (2013). The rice *OsLTP6* gene promoter directs anther-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements. *Planta* **238**, 845-857.
- Luo, H., Lee, J.-Y., Hu, Q., Nelson-Vasilchik, K., Eitas, T., Lickwar, C., Kausch, A., Chandlee, J., Hodges, T.** (2006). *RTS*, a rice anther-specific gene is required for male fertility and its promoter sequence directs tissue-specific gene expression in different plant species. *Plant Molecular Biology* **62**, 397-408.
- Luo, M., Wing, R.** (2003). An improved method for plant BAC library construction. In *Plant Functional Genomics*, E. Grotewold, ed (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 3-19.

- Lv, B., Nitcher, R., Han, X., Wang, S., Ni, F., Li, K., Pearce, S., Wu, J., Dubcovsky, J., Fu, D.** (2014). Characterization of *FLOWERING LOCUS T1 (FT1)* gene in *Brachypodium* and wheat. *PLoS ONE* **9**, e94171.
- Mackenzie, S.** (2012). Male sterility and hybrid seed production. In *Plant Biotechnology and Agriculture*, A.A.M. Hasegawa, ed (San Diego: Academic Press), pp. 185-194.
- Nagalakshmi, U., Waern, K., Snyder, M.** (2001). RNA-seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. In *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **104**, 34-41.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., Conklin, D.S.** (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development* **16**, 948-958.
- Rao, M.K., Devi, K.U., Arundhati, A.** (1990). Applications of genie male sterility in plant breeding. *Plant Breeding* **105**, 1-25.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K.** (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of *beta*-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Gao, C.** (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols* **9**, 2395-2410.
- Shi, X., Zeng, H., Xue, Y., Luo, M.** (2011). A pair of new BAC and BIBAC vectors that facilitate BAC/BIBAC library construction and intact large genomic DNA insert exchange. *Plant Methods* **7**, 33.
- Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S.J.M., Birol, I.** (2009). ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research* **19**, 1117-1123.
- Slade, A.J., Fuerstenberg, S.I., Loeffler, D., Steine, M.N., Facciotti, D.** (2005). A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotechnology* **23**, 75-81.
- Smyth, D.R.** (1997). Gene silencing: Cosuppression at a distance. *Current Biology* **7**, R793-R796.

- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-517.
- Till, B.J., Zerr, T., Comai, L., Henikoff, S.** (2006). A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nature Protocols* **1**, 2465-2477.
- Uauy, C., Paraiso, F., Colasuonno, P., Tran, R., Tsai, H., Berardi, S., Comai, L., Dubcovsky, J.** (2009). A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC Plant Biology* **9**, 115.
- Vasl, J., Panter, G., Bencina, M., Jerala, R.** (2004). Preparation of chimeric genes without subcloning. *BioTechniques* **37**, 726-730.
- Waltz, E.** (2012). Tiptoeing around transgenics. *Nature Biotechnology* **30**, 215-217.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., Qiu, J.-L.** (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* **32**, 947-951.
- Weeks, J.T., Anderson, O.D., Blechl, A.E.** (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol* **102**, 1077-1084.
- Wendt, T., Holm, P., Starker, C., Christian, M., Voytas, D., Brinch-Pedersen, H., Holme, I.** (2013). TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology* **83**, 279-285.
- Wu, L., Liu, D., Wu, J., Zhang, R., Qin, Z., Liu, D., Li, A., Fu, D., Zhai, W., Mao, L.** (2013). Regulation of *FLOWERING LOCUS T* by a MicroRNA in *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell* **25**, 4363-4377.
- Yang, L., Liu, B., Zhai, H., Wang, S., Liu, H., Zhou, Y., Meng, F., Yang, J., Zhu, G., Chui, S., Zhang, Q., Wei, Y.** (2009). Dwarf male-sterile wheat: A revolutionary breeding approach to wheat. In *Induced plant mutations in the genomics era*, Q.Y. Shu, ed (Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations), pp. 370-372.
- Yuan, C., Jiang, H., Wang, H., Li, K., Tang, H., Li, X., Fu, D.** (2012). Distribution, frequency and variation of stripe rust resistance loci *Yr10*, *Lr34/Yr18* and *Yr36* in Chinese wheat cultivars. *Journal of Genetics and Genomics* **39**, 587-592.

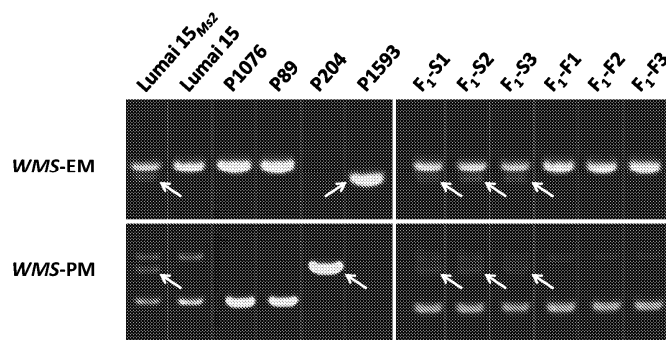
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная ДНК, кодирующая белок, индуцирующий мужскую стерильность кукурузы, причем указанная ДНК выбрана из любого из (а)-(е):
  - а) кДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1;
  - б) ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;
  - с) ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;
  - д) ДНК, кодирующая белок, который индуцирует мужскую стерильность пшеницы, и при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 2;
  - е) ДНК, которая кодирует белок, который индуцирует мужскую стерильность пшеницы и гибридизуется в жестких условиях с ДНК, содержащей нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1 или 6.
2. Вектор, содержащий выделенную ДНК по п.1.
3. Вектор по п.2, характеризующийся тем, что вектор дополнительно содержит ДНК согласно любому из (а)-(с), которая обладает специфичной для пыльника активностью промотора:
  - а) ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;
  - б) ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5; и
  - с) ДНК, которая гибридизуется в жестких условиях с ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.
4. Растительная клетка для получения растения с мужской стерильностью, трансформированная ДНК по п.1.
5. Растительная клетка по п.4, трансформированная вектором, содержащим выделенную ДНК по п.1.
6. Растительная клетка по п.5, характеризующаяся тем, что вектор дополнительно содержит ДНК согласно любому из (а)-(с), которая обладает специфичной для пыльника активностью промотора:
  - а) ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;
  - б) ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, в которой один или более нуклеотидов заменены, удалены, добавлены и/или вставлены; и

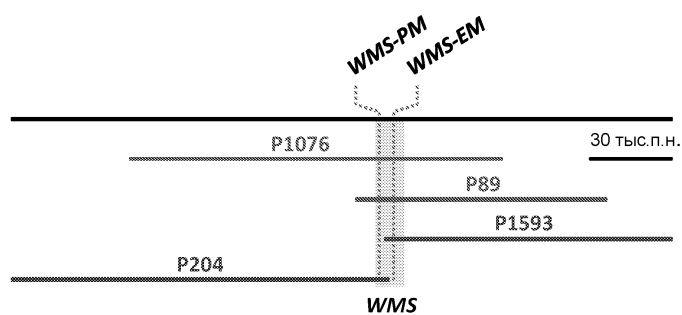
с) ДНК, которая гибридизуется в жестких условиях с ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

7. Трансформированное растение для повторяющейся селекции, содержащее указанную трансформированную растительную клетку по п.4, причем указанное трансформированное растение характеризуется мужской стерильностью.

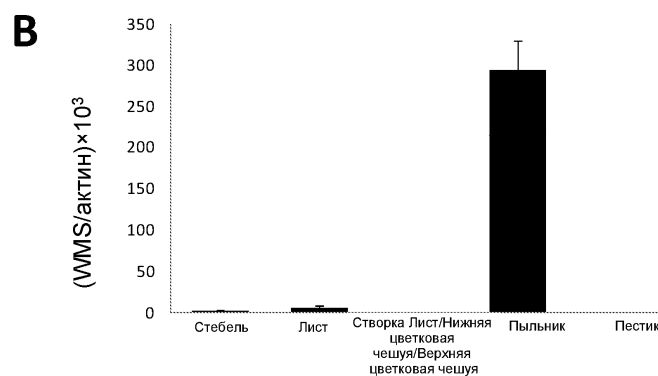
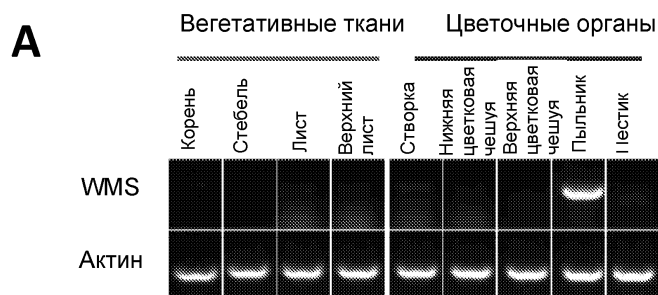
8. Часть растения для получения растений с мужской стерильностью, включая семя, ткань или орган трансформированного растения по п.7.



ФИГ. 1

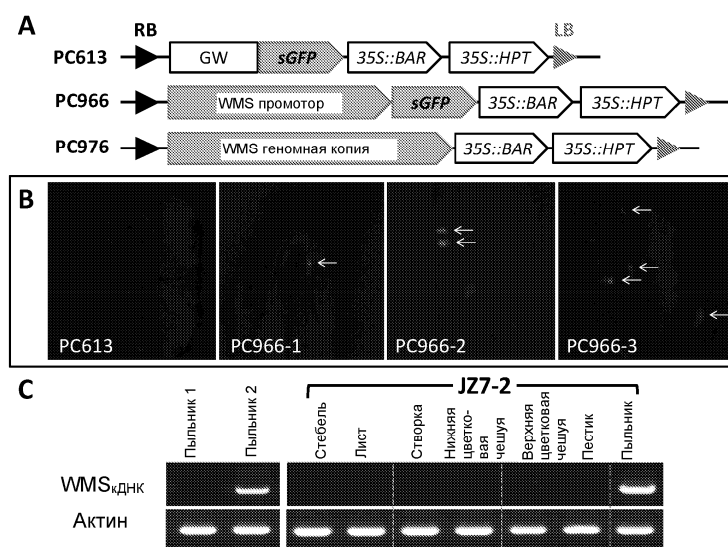


ФИГ. 2

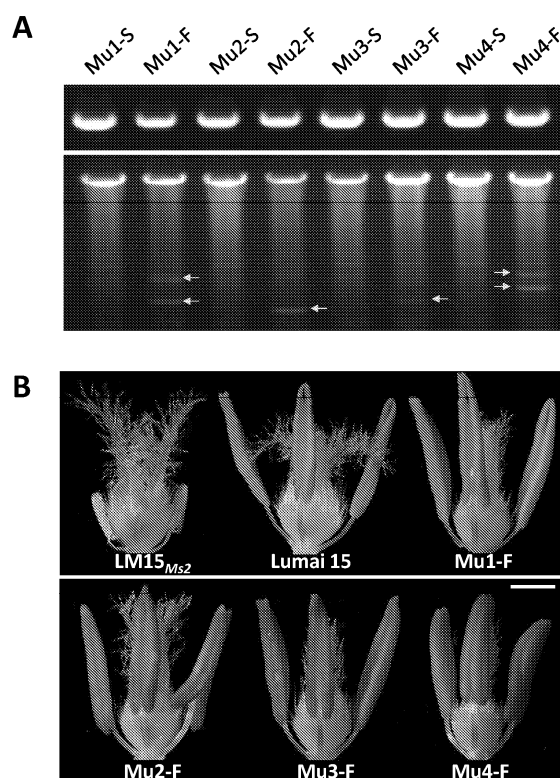


ФИГ. 3А, В

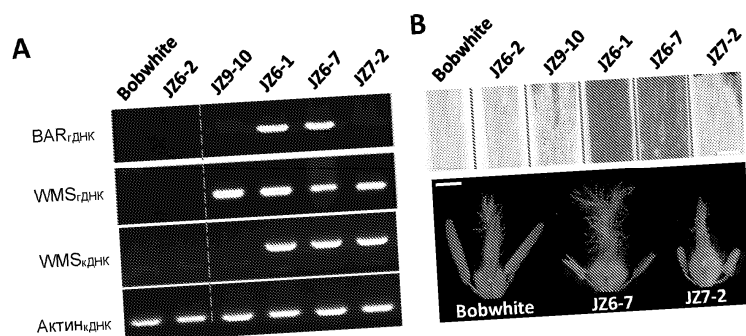




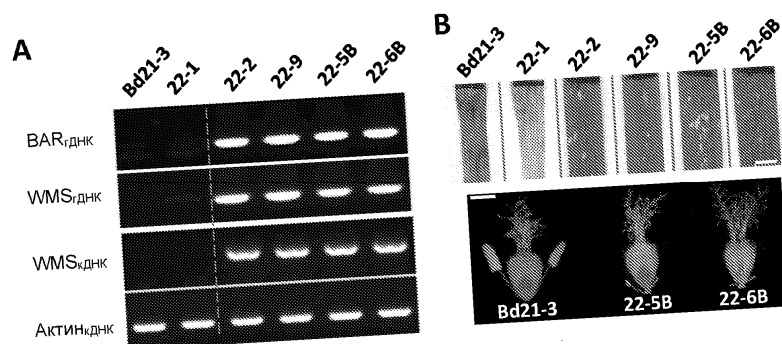
Фиг. 4A-C



Фиг. 5A, B



Фиг. 6A, B



Фиг. 7А, В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2