

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201792344 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2018.08.31

(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

(86) PCT/IB2016/000537

(87) WO 2016/193798 2016.12.08

(71) Заявитель:

ШАНЬДУН АГРИКАЛЧЕРАЛ  
ЮНИВЕРСИТИ (CN)

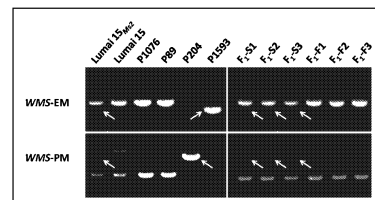
(72) Изобретатель:

Фу Даолин (US), Луо Миньчэн, Ци  
Цзюань, Ни Фэй, Люй Бо, Ван Шуюнь  
(CN)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(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.



201792344  
A1

201792344  
A1

# ГЕН МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ ПШЕНИЦЫ WMS И ЕГО ПРОМОТОР СПЕЦИФИЧНОЙ ДЛЯ ПЫЛЬНИКА ЭКСПРЕССИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

## РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

- 5 [0001] 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

- 10 [0002] Настоящее изобретение относится к одному гену мужской стерильности пшеницы (WMS), его промотору, специфичному для пыльника, и вариантам их применения.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

- 15 [0003] 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  
20 основных зерновых сельскохозяйственных культур, таких как кукуруза и рис.

- [0004] 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  
25 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  
30 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  
35 кДНК 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.

[0005] 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.

[0006] 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  $F_1$  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-D1c*) 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-D1c/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

[0007] Согласно настоящему изобретению предложен новый ген мужской стерильности (WMS) пшеницы, промотор указанного гена и варианты их применения.

[0008] 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 (a)-(e): (a) кДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; (b) ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; (c) 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 (e) 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 [5] ДНК, кодирующая РНК, которая обладает признаком, являющимся доминантно-отрицательным для эндогенных транскриптов в клетках растений, кодируемых ДНК согласно [1] или ДНК, кодирующая белок, который обладает признаком, являющимся доминантно-отрицательным для эндогенного белка в клетках растений, кодируемого ДНК согласно [1];
- [6] вектор, содержащий ДНК согласно любому из [1] - [5];
- 10 [7] трансформированная растительная клетка, в которую введена ДНК согласно любому из [1] - [5] или вектор согласно [6];
- [8] трансформированное растение, содержащее трансформированные растительные клетки согласно [7];
- [9] клон трансформированных растений или потомство трансформированных растений  
15 согласно [8], причем указанный клон или потомство содержит трансформированные растительные клетки согласно [7];
- [10] семя, ткань и орган из трансформированных растений согласно [8] или [9], при условии, что они содержат трансформированные растительные клетки согласно [7];
- [11] ДНК согласно любому из (a)-(c), обладающая активностью специфичного для  
20 пыльника промотора: (a) 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 (c) ДНК, которая гибридизуется в строгих условиях с ДНК, содержащей нуклеотидную  
25 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;
- [12] вектор, содержащий ДНК согласно [11];
- [13] трансформированная растительная клетка, содержащая ДНК согласно [11] или [12];
- [14] трансформированное растение, содержащее трансформированные растительные клетки согласно [13];
- 30 [15] клон трансформированных растений или потомство указанных трансформированных растений согласно [14], причем указанный клон или потомство содержит трансформированные растительные клетки согласно [13];
- [16] семя, ткань и орган из трансформированных растений согласно [14] или [15], при условии, что они содержат трансформированные растительные клетки согласно [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;
- 5 [18] генетически модифицированное растение, содержащее генетически модифицированные растительные клетки согласно [17];
- [19] растительный клон или потомство генетически модифицированных растений согласно [18], причем указанный клон или потомство содержит модифицированные растительные клетки согласно [17]; и
- 10 [20] семя, ткань и орган из генетически модифицированных растений согласно [18] или [19], при условии, что они содержат модифицированные растительные клетки согласно [17].

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

- 15 [0009] 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 экземпляров F<sub>1</sub> из
- 20 комбинации LM15<sub>M<sub>s</sub>2</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.
- [00010] На Фиг. 2 представлены клоны ВАС, несущие ген *WMS/wms*. P89 и P1076
- 25 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.
- 30 [00011] 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.

[00012] На Фиг. 4 представлены результаты, подтверждающие специфичную для пыльника активность промотора *WMS*. А) Плазмиды получали для исследования активности промотора; РС613 представляет собой принимающий вектор, несущий кассету GFP, пригодную для технологии клонирования Gateway; РС966 несет кассету экспрессии  $P_{WMS}::GFP$ , в которой  $P_{WMS}$  представляет собой промотор WMS (SEQ ID NO: 5); РС976 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» (таблица 3), которая была получена в результате генетической трансформации с использованием РС976; также были использованы два контроля, включая пыльник 1 из «Lumai 15» и пыльник 2 из «Lumai 15<sub>Ms2</sub>», масштабная метка 100 мкм.

[00013] На Фиг. 5 представлены результаты скрининга методом TILLING и фертильные пыльники растений  $M_1$ , 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  $M_1$  (S: стерильный отросток; F: фертильный отросток, стрелки указывают полосу после расщепления *CelI*, нижняя панель). В) Развитие фертильных пыльников у отобранных мутированных вариантов  $M_1$ , несущих ген *WMS*. «Lumai 15» и «Lumai 15<sub>Ms2</sub>» были включены в качестве контролей. Масштабная метка = 1,5 мм.

[00014] 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  $T_0$ . 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  $T_0$  (нижняя панель, масштабная метка = 1,5 мм). «Bobwhite» использовали в качестве контроля дикого типа.

[00015] 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 количественно 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

[00016] 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.

[00017] 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, «LM15<sub>Ms2</sub>»); б) синтеза кДНК с использованием мРНК в качестве матрицы; в) амплификации кДНК *WMS* с использованием ПЦР-праймеров, специфичных для кДНК согласно настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 1); д) клонирования продукта ПЦР 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 ПЦР на основе ДНК-матрицы согласно настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 4).

[00018] 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.

[00019] 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 ПЦР с обратной транскрипцией (кОТ-ПЦР) можно использовать для измерения количества кДНК исследуемого гена в различных типах растительных тканей, как показано в примере 5.

[00020] 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.

[00021] Редактирование генома может быть использовано для блокирования геном-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).

[00022] 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 разработают 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: (a) 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 (a); (c) растительный клон или потомство типа растений, описанных в (b), при условии, что они содержат тип растительных клеток, описанный в (a); (d) семя, ткань и орган клона или потомства, описанного в (b) и (c), при условии, что они содержат тип клетки, описанный в (a).

[00023] 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).

[00024] 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>).

[00025] 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 °С, 50 °С, 55 °С, 60 °С, 65 °С, 70 °С, 75 °С) 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 ( $\geq 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и в течение продолжительного периода времени ( $\geq 10$  мин).

[00026] 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 самоопылиться, 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 самоопылиться, 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.

[00027] 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.

[00028] 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.

[00029] 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.

[00030] 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, расщепляет 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.

5 [00031] 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.

15 [00032] 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.

25 [00033] 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.

5 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),  
10 при условии, что они содержат тип клеток, описанный в (a).

[00034] 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,  
15 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  
20 перекрестное опыление, обеспечивая тем самым ценную характеристику гибридной силы.

[00035] 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  
25 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,  
30 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  
35 происхождения не является ограничивающим.



[00036] 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 некодирующий фрагмент ДНК, причем некодирующий 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.

[00037] 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.

[00038] 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 и 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).

[00039] 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.

[00040] Промотор ДНК согласно настоящему изобретению можно применять для экспрессии произвольного гена специфичным для пыльника образом, например, путем (а) 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 (а); (с) 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 (с). «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.

[00041] 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).

[00042] 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).

[00043] 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.

[00044] Настоящее изобретение далее будет подробно описано с использованием примеров, которые не должны быть истолкованы, как ограничивающее настоящее изобретение.

5

## ПРИМЕРЫ

[00045] 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 °С и ночной температурой 15- 20 °С. 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 Лейкс, Нью-Джерси, США), антибиотики были получены от Gold Biotechnology (Сент-Луис, Миссури, США). ПЦР-праймеры согласно настоящему изобретению приведены в таблице 1.

10

15

**Таблица 1: ПЦР-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	CGGGAGGAACTCAAGCAAACCT	SEQ ID NO: 10
WMS-FP2	GAGTGGTTCACGTGCTGATTAC	SEQ ID NO: 11
WMS-FP3	CAGTACCCGCAGTGGACAC	SEQ ID NO: 12
WMS-RP3	TAAATCACAGGCAGGATTTGATAAAC	SEQ ID NO: 13
WMS-FP4	CCGTCAGCACACTGTA CT TCA	SEQ ID NO: 14
WMS-RP4	CGATGTAGAGCCTCAAATCC	SEQ ID NO: 15
WMS-FP5	CACATGTTTTCGCTCGAAATG	SEQ ID NO: 16
WMS-RP5	AAGAAACGAGCCGTCCAGTA	SEQ ID NO: 17
WMS-FP6	CGCAGTGGACACACGCTTAGCTT	SEQ ID NO: 18
WMS-RP6	TGAGTTGGAGTTGGTCCCCATC	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	GCTTGAAACTGCTGGTATATATG	SEQ ID NO: 24
WMS-RP9	GTAATCAGCACGTGAACCACTC	SEQ ID NO: 25
WMS-FP10	TGTTCCCTGGATTTCGTGAGTGG	SEQ ID NO: 26
WMS-RP10	CGATCTCCGTGTCCATGTGCTAC	SEQ ID NO: 27
WMS-FP11	<u>GCGGCCGC</u> GGGTGAGGCTTTGCCAAGG	SEQ ID NO: 28
WMS-RP11	<u>GGCGCGCC</u> GATCTCCGTGTCCATGTGCT	SEQ ID NO: 29
WMS-RP12	CGTAGATGCGGACCCAGGGGAT	SEQ ID NO: 30
BAR-FP1	AAGCACGGTCAACTCCGTA	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	GCCATGTACGTCGCAATTCA	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-FP11. 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

[00046] 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.

15 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).

[00047] 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).  
5 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>M<sub>s</sub>2</sub>», чем в пыльниках из «Lumai 15». В частности, неизвестный ген (SEQ ID NO: 1) специфично экспрессировался в «LM15<sub>M<sub>s</sub>2</sub>», однако не  
10 поддавался детектированию в «Lumai 15», была высказана гипотеза, что указанный ген придает признак мужской стерильности пшенице (WMS) в «LM15<sub>M<sub>s</sub>2</sub>». Неизвестный ген, обозначенный *WMS*, выбрали для функционального анализа.

## **Пример 2**

### **Клонирование полноразмерной кДНК гена *WMS***

[00048] Общую РНК из пыльников «LM15<sub>M<sub>s</sub>2</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>M<sub>s</sub>2</sub>» с помощью RACE-ПЦР с использованием набора для амплификации кДНК SMARTer RACE (Clontech Laboratories,  
25 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  
30 *WMS*, собранного в ходе анализа продуктов секвенирования РНК. Соответственно, полноразмерную кДНК *WMS* клонировали из «LM15<sub>M<sub>s</sub>2</sub>» с использованием праймеров *WMS*, WMS-FP3 и WMS-FP3, 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  
35 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>M52</sub>»**

5 [00049] Библиотеку бактериальных искусственных хромосом (ВАС) конструировали для «LM15<sub>M52</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);

10 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 разрежали с помощью HindIII и дефосфорилировали; продукт лигирования трансформировали в клетки штамма *E.coli* DH10B, устойчивые к фагу T1 (Invitrogene, Карлсбад, Калифорния, США); Трансформанты отбирали на среде LB с добавлением 12,5

15 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 (таблица 2). Испытание качества на 337 случайно отобранных клонов ВАС выявило, что средний размер вставки составляет 124,6 тыс.п.н., и частота ВАС без вставки составляет 0,50%. Следовательно,

20 библиотека ВАС «LM15<sub>M52</sub>» представляла 5,5-кратное покрытие генома пшеницы (~16 млн.п.н.).

**Таблица 2: Библиотека ВАС пшеницы «LM15<sub>M52</sub>»**

Код партии	Кол-во планшетов	Исслед. кол-во клонов	Частота ВАС без вставки (%)	Размер вставки (тыс.п.н.)	Кол-во клонов	Покрытие 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>M52</sub>»**

25 [00050] Процедуру скрининга на основе ПЦР разработали для библиотеки ВАС «LM15<sub>M52</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 ВАС 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.

5 [00051] 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 10 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.

20 [00052] Маркер *WMS-EM* использовали для скрининга суперплазмидных пулов и затем первичных плазмидных пулов библиотеки ВАС «LM15<sub>Ms2</sub>». После идентификации первичного пула клон ВАС определяли с использованием ПЦР в 384-луночном планшете. В общей сложности выделяли три ВАС-клона (Фиг. 2), при этом один клон дал меньший ПЦР-продукт, и два клона дали больший ПЦР-продукт. Вероятно, ВАС-клоны (P89 и 25 P1076), которые давали больший ПЦР-продукт, получали из 4D хромосомы, лишенной доминантного гена *Ms2*, в то время как клон ВАС (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 30 тесной связи с мужской стерильностью, что указывает на рецессивный ген *wms* на P89/P1076. Все три ВАС-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 35 качества  $Q \leq 5$ ), а также неизвестных оснований (неизвестные основания считанной



последовательности >10%). Вектор ВАС (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 К-мерных деревьев различного размера (21-91) с помощью программы ABySS 1.5.2 (Simpson et al., 2009). К-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 ВАС 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 ВАС, что в результате привело к неполному промотору (Фиг. 2).

[00053] 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 ВАС «LM15<sub>MS2</sub>». Был выявлен дополнительный клон ВАС P204 (Фиг. 1 и 2), который был получен из 4D хромосомы с доминантным геном MS2. Аналогичным образом, клон ВАС P204 секвенировали и собирали, при этом было установлено, что он содержит участок размером 1212 п.н., который аналогичен участку в клоне ВАС 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***

[00054] 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).

## 10 **Пример 6**

### **Идентификация промотора *WMS***

[00055] 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 длинного 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.

[00056] 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 ( $P_{WMS}::GFP$ ) (Фиг. 4А), в настоящей заявке  $P_{WMS}$  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  $P_{WMS}$  и GFP представляла собой 5'-TAGGGAGAGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGATCATG-3', 5'-

концевые нуклеотиды TAGGGAG получали из конца промотора *WMS*, и 3'-концевой нуклеотид ATG обозначает старт-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 ( $P_{WMS}::GFP$ ), 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.

[00057] 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. 4А). 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» (таблица 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. 4С). В заключение следует отметить, что промотор *WMS* (SEQ ID NO: 5) способен вызывать специфичную для пыльника экспрессию.

[00058] 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.

### 30 **Пример 7**

#### **Получение EMS-индуцированной популяции «LM15<sub>Ms2</sub>»**

[00059] Мутированную популяцию «LM15<sub>Ms2</sub>», содержащую 1200 *WMS*-положительных растений  $M_1$ , создавали с использованием 87,4 мкМ раствора этилметансульфоната (EMS; Sigma-Aldrich, Сет-Луис, Массачусетс, США). В общих чертах, по 400 семян ( $M_0$ ) 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 °С в течение 10 ч. После обработки EMS семена промывали под проточной водой при комнатной температуре в течение 4 часов. 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 °С с 16 ч фотопериодом в течение 8 дней. Жизнеспособные саженцы с корнями пересаживали в почву и поддерживали в холодном помещении при 4 °С и 12 ч фотопериоде в течение 6 недель. Яровизированные растения M<sub>1</sub> затем поддерживали в теплице при 25 °С 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>»**

[00060] 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<sub>1</sub>. Из 3138 осмотренных колосьев, двадцать колосьев имели фенотипы мужской фертильности, характеризующиеся обычным пыльником, пылением и завязыванием семян (Фиг. 5).

[00061] Геномную ДНК получали из верхних листьев основного ствола растений M<sub>1</sub> методом на основе саркозила (Yuan et al., 2012). Концентрации ДНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop (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

[00062] 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.

[00063] 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 H<sub>2</sub>O; реакции ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация при 94 °С в течение 2 мин, затем 35 циклов при 98 °С в течение 10 с, 60 °С в течение 30 с и 68 °С в течение 6 мин и окончательное удлинение при 68 °С 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 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °С в течение 30 с, 61 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 90 с, и окончательное удлинение при 72 °С в течение 10 мин. В конце реакции ПЦР проводили этап денатурации и повторного отжига (99 °С в течение 10 мин, 90 циклов при 72 °С в течение 20 с со снижением на 0,3 °С в каждом цикле), чтобы обеспечить образование гетеродуплексов, если мутация присутствует в пуле.

[00064] После этапа повторного отжига продукт ПЦР расщепляли с помощью экстракта сока сельдерея (СЖЕ), который получали с использованием протокола, описанного Till et al. (Till et al., 2006). Количество СЖЕ для расщепления гетеродуплексов оптимизировали, как это было предложено Uauy et al. (Uauy et al., 2009). Реакция СЖЕ включала: 14 мкл продукта ПЦР, 1 мкл СЖЕ, 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 °С 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.

[00065] 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>M<sub>s</sub>2</sub>» с получением двукратного пула; указанные двукратные пулы ДНК затем подвергали скринингу для определения продуктов расщепления, обнаруженных на первом этапе скрининга.

[00066] 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>.

[00067] 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 ( $\chi^2 = 97,13$ ,  $df = 1$ ,  $P = 6,49 \cdot 10^{-23}$ ). Следовательно, ген *WMS* вероятно определяет мужскую стерильность в пшенице Taigu.

### **Пример 9**

#### **Получение трансгенной пшеницы Bobwhite с использованием баллистической трансфекции**

10 [00068] 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  
15 селективный маркер BAR (Фиг. 4А). 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).

20 [00069] 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 Слогх с  
25 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-НСl 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  
30 г/л, pH=5,8), и поддерживали в течение 4-6 дней при температуре 22-23 °С 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-НСl 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  
35 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 °С в темноте. Полученные из зародышей каллусы переносили в среды для восстановления (среда для диссекции, дополненная 0,1 мг/л 6-ВА и 3 мг/л биалафоса) и поддерживали в течение двух недель в вегетационной камере (22-23 °С, 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.

10 [00070] 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 М). При необходимости растворы на 15 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 °С) 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 чистого этанола. Для каждой баллистической трансфекции по 10 мкл суспензии золота вносили в центр диска для микроносителей (Bio-Rad), высушивали на воздухе в ламинарном проточном боксе, и помещали пусковой контейнер для микроносителей под разрывным диском, который 20 разрывается при давлении 1100 фунтов на квадратный дюйм. Шестьдесят 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.

25 [00071] В общей сложности 2742 незрелых зародыша пшеницы бомбардировали конструцией РС976, и 26 растений восстановили из каждого отдельного зародыша



(таблица 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. Покрытая 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 таблица 3). На стадии цветения три растения обладали мужской стерильностью, и два из них были также устойчивы к гербициду (Фиг. 6 и таблица 3). Затем предполагаемые трансгенные растения исследовали для того чтобы выявить присутствие маркера селекции BAR и гена WMS с использованием ПЦР-праймеров BAR-FP1, BAR-RP1, WMS-FP8 и WMS-RP12. Семь растений показали положительные результаты на наличие BAR и гена WMS (таблица 3). ОТ-ПЦР использовали для исследования транскрипции WMS в молодых колосьях с помощью ПЦР-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**

[00072] Результаты, полученные в настоящем изобретении, подтвердили функционирование гена *WMS* в модельном растении *Brachypodium*. Конструкцию для экспрессии у растений РС976 (Фиг. 4А) вводили в штамм *Agrobacterium* «AGL1» путем электропорации. Трансгенные растения *Brachypodium* получали с использованием протокола *Agrobacterium*-опосредованной трансформации (Bragg et al., 2012).

[00073] Для получения инокулята *Agrobacterium* AGL1, несущие конструкцию РС976, 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<sub>4</sub> 0,1 г/л, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 г/л, L-глутаминовая кислота 1,2 г/л, порошок агара 15 г/л, рН=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 °С в темноте, собирали путем соскабливания колоний *Agrobacterium* со среды MG/L и ресуспендировали до достижения OD<sub>600</sub>=0,6 в жидкой СИМ.

5 [00074] 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 (длиной 0,3-0,7 мм) выделяли из стерилизованных семян, расположенных щитком вверх на средах для инициации каллуса (СИМ: LS-основание 4,43 г/л, CuSO<sub>4</sub> 0,6 мг/л, сахароза 30 г/л, 2,4-D 2,5 мг/л, Phytigel 2 г/л, pH=5,8) и инкубировали  
10 при 28 °С в темноте. Через четыре недели каллусы стали видны вследствие пролиферации клеток щитка; для субкультивирования и *Agrobacterium*-опосредованной трансформации отбирали только желтоватые эмбриогенные каллусы.

[00075] Эмбриогенные каллусы инфицировали в течение 5 минут путем погружения в свежий инокулят *Agrobacterium*, который содержал 200 мкМ ацетосирингона и 0,1%  
15 (масс./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 °С в темноте. После совместного культивирования каллусы сначала поддерживали на средах СИМ, дополненных 150 мг/л тиментина и 40 мг/л гигромицина в течение одной недели при 28 °С в темноте, и затем культивировали в  
20 течение еще двух недель. Жизнеспособные каллусы переносили на среды для восстановления (Bragg et al., 2012) (LS-основание 4,43 г/л, CuSO<sub>4</sub> 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 °С в условиях LD (16 часов свет/8 часов темнота, интенсивность света 20 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>). После того как восстановленные побеги достигли  
25 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.

30 [00076] В общей сложности 100 каллусов инфицировали штаммом *Agrobacterium* AGL1, несущим конструкцию PC976. Одиннадцать растений были восстановлены из восьми независимых каллусов (таблица 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  
35 отпрыски (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 таблица 4). На стадии цветения десять растений имели фенотип мужской стерильности и также были устойчивы к гербициду (Фиг. 7 и таблица 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 (таблица 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, таблица 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*.

[00077] 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  
5 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  
10 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  
15 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*)  
20 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-  
25 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, Í.** (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.
- 5 **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.
- 10 **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  
15 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.**  
20 (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.
- 25 **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.

SEQUENCE LISTING

<110> SHANDONG AGRICULTURAL UNIVERISTY

<120> WHEAT MALE-STERILITY GENE WMS AND ITS ANTHHER-SPECIFIC EXPRESSION PROMOTER AND USES THEREOF

<130> DFU-025433WO ORD

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1485

<212> DNA

<213> Triticum aestivum Line 'Lumai 15+MS2'

<220>

<221> Coding Region of the WMS Gene (CDS)

<222> (97)..(978)

<223> Full-Length CDNA of the WMS Gene

<400> 1

cagtaccgc agtggacaca cgcttagctt tagctacgta ggcgcagcag ccggaaacta	60
gctagcaggt cgagaaggcc ggccggaggt agggagatgg cagggcacca cagcccctcg	120
gcggcctcgg cactgcgtga aaaagacacg ctggtgaggt gtctcgtggg atcaggtccc	180
ggcggcggcg ctcatgccgg gaccttcggc gctgtgcggg acttcctcat ccagttccgc	240
gaccaaggaa tcccctgggt ccgcatctac gagtcaacct cggcttggca gcagcaatcc	300
ggcgggctgc tgatccagga ttgggacgga gacgccgcgg cggagggagc caaggtgttc	360
ttcacgctca tcaccacaag gaggggcggc gccattaaca ggagggcact gggagggcggg	420
acgtggaaa gcaaggccgc gcccagggtg ggggacgagg tcgccgtcag cacactgtac	480
ttcaaacggg gcgggtccag cggcagatta ttcaccgcct tggagatcca tctcagaaac	540
gagccccaag ttgctatctg cctgctgcat ccgactaact atctgtatag cattcgggat	600
ttgaggctct acatcgacca gggatggttc ccgggaggaa ctcaagcaaa cctgggcgcg	660
gagcaatata aagatcctga tgttcctgga ttcgtgagtg gttcacgtgc tgattacacc	720
actattctgt tttctagcag tgagactatt tacgaccagc aatcgattca ttcctccggg	780
gctgctctgc cacctcatga tgcattctctg gatgctatct ctcaccacct gttttcagaa	840
aacaactcaa cgccagagtt tgggtggacag tatttctcatg ctgatgaaat atcaatcctt	900
aatgaatact acaatacctt gatggggacc aactccaact caggattgca tgccttatcc	960
gcagcattct caagttgatg atacgtcatc cccggactac gactacaatc ctttcggaga	1020
gttttgagat tgagagatga catatgagca gtgctgtctg tacatattat ttcttgatga	1080
gtttctaatt atgaactctt gaataatctt gtcccgggtgg acaatgctgt attttatgag	1140
tcttggtagg aatgtatatg tttgggtataa aatcgggtgaa ggggtgcatgt agtgtatgac	1200

atcgctttga cggaggaggt gctgattgta cgggactgaa ctgaaggcaa gacagcagca 1260  
 agcaagcact gacaacgtgt ggattgaata tagctcagac ggctgagagc cggagggtcat 1320  
 caggcagcat gctcaacgcc ggagggtcaat tgtaattttt atgtaatata atttgcctta 1380  
 gtgttgcaat atgtacaaat attttagtat tttagcctgt gattcatcgg tccatattaa 1440  
 tgttattgtg tgaataaatg tttatcaaat cctgcctgtg attta 1485

<210> 2  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum 'Lumai 15+MS2'

<400> 2

Met Ala Gly His His Ser Pro Ser Ala Ala Ser Ala Leu Arg Glu Lys  
 1 5 10 15

Asp Thr Leu Val Arg Cys Leu Val Gly Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala  
 20 25 30

His Ala Gly Thr Phe Gly Ala Val Arg Asp Phe Leu Ile Gln Phe Arg  
 35 40 45

Asp Gln Gly Ile Pro Trp Val Arg Ile Tyr Glu Ser Thr Pro Ala Trp  
 50 55 60

Gln Gln Gln Ser Gly Gly Leu Leu Ile Gln Asp Trp Asp Gly Asp Ala  
 65 70 75 80

Ala Ala Glu Gly Ala Lys Val Phe Phe Thr Leu Ile Thr Thr Arg Arg  
 85 90 95

Gly Gly Ala Ile Asn Arg Arg Ala Leu Gly Gly Gly Thr Trp Thr Ser  
 100 105 110

Lys Ala Ala Pro Arg Val Gly Asp Glu Val Ala Val Ser Thr Leu Tyr  
 115 120 125

Phe Lys Arg Gly Gly Ser Ser Gly Arg Leu Phe Thr Ala Leu Glu Ile  
 130 135 140

His Leu Arg Asn Glu Pro Gln Val Ala Ile Cys Leu Leu His Pro Thr  
 145 150 155 160

Asn Tyr Leu Tyr Ser Ile Arg Asp Leu Arg Leu Tyr Ile Asp Gln Gly  
 165 170 175

Trp Phe Pro Gly Gly Thr Gln Ala Asn Leu Gly Ala Glu Gln Tyr Gln

180

185

190

Asp Pro Asp Val Pro Gly Phe Val Ser Gly Ser Arg Ala Asp Tyr Thr  
195 200 205

Thr Ile Leu Phe Ser Ser Ser Glu Thr Ile Tyr Asp Gln Gln Ser Ile  
210 215 220

His Ser Ser Gly Ala Ala Leu Pro Pro His Asp Ala Ser Leu Asp Ala  
225 230 235 240

Ile Ser His His Leu Phe Ser Glu Asn Asn Ser Thr Pro Glu Phe Gly  
245 250 255

Gly Gln Tyr Ser His Ala Asp Glu Ile Ser Ile Leu Asn Glu Tyr Tyr  
260 265 270

Asn Thr Leu Met Gly Thr Asn Ser Asn Ser Gly Leu His Ala Leu Ser  
275 280 285

Ala Ala Phe Ser Ser  
290

<210> 3  
<211> 8657  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum 'Lumai 15'

<220>  
<221> The Genomic Region of the WMS GENE  
<222> (3503)..(7721)  
<223> The Full-Length Genomic Region of the WMS Gene

<400> 3  
gcgcccgcggtgaggcttt gccaaggcat caatggatcc cgaggacatg ctgctcgcgt 60  
cggctcctccg ccgctccctg acgatgtcgg agacagatgc gggcggtgg gtggggcatt 120  
ggcgaggcgc tgggtgatct ggaggacatg ctctctcgtgt cggctcctccg ccgctccctg 180  
acgacggtag agacggatgc gcggtgatgg gtgaggcggtt ggggaggctc cgggtgatcc 240  
cgagaacacc ctctcgcgat cggctccccg ctgcttgcta acgacggcgg agagggatgc 300  
gggcgggcgg gtgaggcggtt ggagaggcgc tgggtgatcc agaggacacg ctctctgtgc 360  
ggatcctccg ccgctccctg atggcagcga agagggatgc gggcgggcgg gtgaggcggtt 420  
ggggaggcgc cgggtgatcc cgaggacacg ctctcgcgt cggctcctccg ccgctccctga 480  
cgacgacgga gacggatgca cggcggcggg tgaggcggtg gcgaggcgtc ggtggatccc 540  
gaagacacgc tctcgcggtt ggtcctccgc tgctcgtgta caatggcaga gagggatgcg 600  
tggcggcggg tgaggcggtg gagaggcgtc gatggatccg gaggacacgc tctcgtgctc 660

aatcctccgc	cggtcctga	tgacggcgga	gaggggtgcg	cggcggcggg	tgaggcattg	720
gggagggcgt	ggtggatccc	gaggacatgc	tctcgcgctc	ggtcctccgc	tgccccctga	780
cgaaggcga	gacggatgcg	aggcgccggg	tgaggcattg	tcgaggcgtc	ggtggatccc	840
gaggacacgc	tcgtcaagtc	agtcctccgc	cgctccctgt	cgacggtgga	gacggtttca	900
tggcgatggg	tgaggcgtcg	gcaaacgcgt	gcaactgggg	atccttagga	cacgctcgtt	960
acgtcgggtc	tccgccgctc	cctgacgatg	gtggagactg	atgcacggcg	gctctggcat	1020
cgagctgtcc	gagcacgagg	caatggtgca	agttgcggcg	aaggcgaaca	ccgaggagta	1080
ggagcgcttg	ctccaggggc	tggccgcgca	gatctcctcg	gacggccatg	accctccgac	1140
ggccaaggcc	agcgcacgac	cccaaacgga	cgctccggtt	ggcctgcttt	cgtctgtttg	1200
cggcggcaat	gggttcgccc	atgtctgctt	gggtccggtg	ggttgctgat	atgcccacg	1260
cacggccgca	ccccaaatca	tgtccagggg	ggacgtgatt	aaaaaacac	aaaaactaaa	1320
atgaaatgcc	aaaaaatta	aataaatgca	agcataaaaa	tataaacat	aaattaacca	1380
tcacggccac	aaaacggccc	agttccatgg	ttcacataga	cataattaac	ataaaaaaa	1440
aataaaaccg	ccgccacgc	gctcctgccc	tgcccgtcgc	cgtcttctca	gtggccgccc	1500
ttgtcgtcgt	tgctcgtgac	gaggtcgacg	tagtccggcg	gcgtccagag	gtgggacggc	1560
ggtgcgtggg	acacgggggc	gggctggaag	gcgggaggtg	cctacacctc	ctcctcctgt	1620
ggcgacgcct	cccgtcctcg	tgaccatggc	gttggtggggc	accagtccac	tgctagccca	1680
ccaggcccgg	gtggaacaca	gccacgggct	cctcctccat	cacctcctcc	gtcctcacca	1740
tctccagctc	ggggatggcg	acgtcgcggg	ccgcagagag	ggccatcctc	tcttcgaggc	1800
cctcccattg	gcgctcatcg	tgcgtcttca	tggagtcctc	catgacacgt	tgcatgagcc	1860
gggcctcctc	ctccgctgtc	atgcgaggag	gtgggtgggg	cagcggagat	ggtgaaggcg	1920
acggcgtggg	cgtgaggccg	cgcacccgcg	tacgcctgcg	cacctgggga	gcagccgctg	1980
cgcgctctcg	acgtggccgt	cgcggccccg	acaaggtgcc	ggcgaagaaa	aaggcgcgac	2040
gcgtgtcgtg	ctcgtcccga	aaccacgtgt	cccacaggtc	ggagtcgggg	gcgtaccgag	2100
ggtcgtagta	caggtcgtcc	ggcaggaggc	ggcggcggca	ctggatctcc	tcgcggcgcg	2160
cacggccgct	cgtcgggacc	ggcgggatcg	gcacccggtt	ggcggagaga	tgccagttat	2220
tggggaggtg	cacgtcgtc	catgggagcg	gcgtcctcgt	ctcccaataa	cgccggcata	2280
catccgctg	gatgtactgc	tggtcgcgct	tgccgccggc	cgtagggccg	atggtgaatg	2340
gggcaggcgt	gggggctcga	tgccggtggg	atgcgggctc	ctctttcatg	gagccgcggc	2400
ggcggcccga	ggacgagcca	gcctcgtggg	cgcgcttccc	cttgcgaccg	gtgttccaga	2460
accccatggc	tgcgaggcgg	ccggccgacg	agatcgagga	cggggagagg	gagagctagg	2520
gtttgggggtg	tgctcgggtt	cgaggaggca	gcacgggctg	gagtgagag	tgtggacgac	2580

gaccgggtcca	cggtttccca	tttaagaagg	acgggtgactg	tttgctggac	ggatgacagg	2640
tggggccgac	cgcgcgtgcg	cattaatgtt	ggctgggtggg	aggtaggtgt	ccgcctgcca	2700
cgcggcctcg	aagcggacga	gcgacgcgtc	cgtttgctgt	ccgccgac	ccaaatccgg	2760
cacatgtttg	cgctcgaat	gggtcggcct	ggacacaaaa	cggaccagat	gggctcaggc	2820
cgtcgcgcgc	tgggccgtgg	gatttgttcg	ttttgtccca	aatggacggg	gccggacggg	2880
atgggggtcgc	gcgcaagggc	gagagcagaa	ccatcgaccg	caagcgggtga	ttttgtgcgc	2940
accttctgcc	ataggtgtag	ctcgtcgact	gccaaagtata	tactgtctc	gcgatttgag	3000
catagagtca	atcgattttc	ctggccaatg	gcgtcaaggg	gagagatttg	gtcaatgggc	3060
ggaagtcgca	gacccatgta	catgtgcacg	ggtaggggtgc	ttatgtgatt	tgacctctct	3120
acggcgcacc	agtactggac	ggctcgtttc	ttattctaaa	cacagatact	agtgtgcacc	3180
ctgttgatat	ttgatatttg	agatttgaga	gtgcggcacc	cgactgcaca	gtccacatgc	3240
atgcagctgg	ctctttctct	tgacttgaca	cgctctcgct	tctcccatt	cctgcccgcg	3300
ccggcgtctc	cacccgactt	gatcgacatc	ggcatcggca	tcggcctcgg	catcggcccc	3360
tcgacgacgc	tcagtatata	agcgatcggg	ctggtaggagc	tgcttgagc	accgcagtg	3420
gacacacgct	tagcttttagc	tacgtaggcg	cagcagccgg	aaactagcta	gcaggtcgag	3480
aaggccggcc	ggaggtaggg	agatggcagg	gcaccacagc	ccctcggcgg	cctcggcact	3540
gcgtgaaaaa	gacacgctgg	tgggggtgtct	cgtagggatca	ggtagccggc	gcggcgctca	3600
tgccgggacc	ttcgacgctg	tgccgggactt	cctcatccag	ttccgcgacc	aaggaatccc	3660
ctgggtccgc	atctacgagt	caaccccggc	ttggcagcag	caatgtgagt	aatctaactt	3720
ccactgttga	ttgatctgca	taatgtact	cattctcact	atcgctggc	cggcctcgtg	3780
atcaacatga	atgcgcgcgt	atgttatgca	gccggcgggc	tgctgatcca	ggattgggac	3840
ggagacgccg	cggcggaggg	agccaagggtg	ttcttcacgc	tcacaccac	aaggaggggc	3900
ggcgcatta	acaggagggc	actgggaggc	gggacgtgga	caagcaaggc	cgcgccagg	3960
gtaggggacg	aggtcgccgt	cagcactg	tacttcaaac	ggggcgggtc	cagcggcaga	4020
ttattcaccg	ccttgagat	ccatctcaga	aacgaggtat	gctgtgcttg	ctccatccat	4080
cgcatttttt	ttgttttggt	ttaaatttgc	ttatgcgact	atatattatc	atggttggtg	4140
cccacgttgt	tcaaagattt	gcgcccctgc	ttgaaactgc	tggtatata	gaaccctttt	4200
cttaagcttc	ggtgtaggac	tacggctccg	ttcgtttttt	ctccttctct	cgccaaaaca	4260
aattccatct	caccgatctc	ttctcccgtc	ggcgacgaac	cctagctacg	tacctagcca	4320
gctcggatca	gtccgcttcc	cttcaaaaaa	agaaaaataa	aatccatct	cactgaagtt	4380
gcatttcaac	attgctgttc	cgtacatcta	aacttatata	tgaaccctt	tgtcaagcta	4440
aatttcaacg	gcaagtgtgg	tcaactatct	catgttgact	tgatgagcat	gtgcccggcc	4500

gatcgatgta	gtagaaggag	aagagctagc	gaacaagaca	aaaaatcagg	agaatcatga	4560
cgacatgatc	aacagtagat	tagtcctttt	tattatatag	gatgatccca	attcgtttgt	4620
tctctagcta	gagcaatata	atactatagg	atcagtactt	tttaggggca	caccaccata	4680
aggttagtcc	taagttgacc	ttcttctgct	gcccttaaac	ctcgtcgtca	tagcccagct	4740
agtaaaccct	ctccctcggg	ctgtttctta	cgagcccaag	cagcccgttc	cgtttctca	4800
cgagcccaag	cccagcttgt	aaacccttcc	gtccccgcgc	tcgctctcgtc	cagtccagac	4860
ccctcttctc	ttctagtcaa	cggtcgcccg	cggcggcggc	gccaagtcat	ccaagacaca	4920
gagcgctcag	ccgcagcccc	gaaccctaga	aatcaagcga	acgcggcggc	gaggttccgg	4980
ttggggagat	gcacttcttt	tttcagcaag	tcagtgaaaa	ttatatgttg	atctttcgtg	5040
tttgtttctg	tttttctagc	ccaagtgtgc	tatctgcctg	ctgcatccga	ctaaatatct	5100
gtatagcatt	cgggatttga	ggctctacat	cggccaggta	aatatcttct	atctccagtt	5160
ttggttttca	cccgtgggcg	ctactttcaa	tgttcgggtc	acaagccaat	tagctgattc	5220
agttgctgaa	cgataaaaaca	agaccgattc	cactatgcat	gttttgctac	aaatgaatga	5280
gccaacaac	attactatga	ggttactctc	ctctttcagg	gatggttccc	gggaggaact	5340
caagcaaacc	tgggcgcgga	gcaatatcaa	ggtattcata	agtcatgatt	gatccccaat	5400
gccttcgaca	gtttaactga	aacaggcacc	atctgtactt	ttggtgaaac	atagtgatct	5460
ttgatctggg	tacatagata	gccctgattt	catatatcta	cgtccttaca	ttagtcatgg	5520
aaatatgaaa	acgaggtaga	ttgatctggt	atctttatcct	attacttagc	atctttgtac	5580
ttgtacatct	tatttcggca	gataaattta	aaaccaccaca	gctgatatat	atattatcct	5640
caatttatac	actatttgat	gaattgataa	ggtaagaact	cataagtcga	gaactctaga	5700
tatataccag	ggacgtctac	tatcagaaca	catgattgaa	cataaatcaa	tactgcaga	5760
atgatatttg	aactaagcgt	ttatcagtca	taagatagac	atattgttgt	tttccaatat	5820
atattgtgga	atttaatctg	ggctatatgt	aatagctcca	attctctcgc	ctgtggcata	5880
ttaaatcgca	ttggtcttac	actggcagaa	gttttacatg	ctaccttgct	tgcagatcct	5940
gatgtttctg	gattcgtgag	tggttcacgt	gctgattaca	ccactattct	gttttctagc	6000
agtgaggtaa	ttaagctttc	catgcacaaa	ctagaacaag	ttaccaccaa	atcttagatct	6060
cttgtaaac	ccctatgctt	atctaaatgt	gacaactcaa	gttctattat	ctctagtaag	6120
aagacataga	agatgtttta	ttaagtcaat	ttctgttctt	acgtactccc	tctgtcccac	6180
aatgtaacac	gtttaacgtc	ttgcattgtg	ggacggaggg	agagaacttg	tcatttgctt	6240
actggtattg	gagttagact	ggtatactta	attgggaaat	cattttgaaa	actaaggcat	6300
cgagtccttc	actgttctgg	gtgtactgag	gtaaacaaca	tgcacttcgg	atgagatggg	6360
agaattaggc	tatttagcact	caggatttagc	ctacagatag	gttttatgca	cagcacaacc	6420

tatatatgag	atattttaca	taccgtatga	tacctgtaaa	cattgataag	tggatatatct	6480
caacaccatg	cataattaat	tgcaatacta	cagaatgtac	tagacaattc	tggaccctcc	6540
gatttggatc	tggcggccga	tatagtcctt	ctcccatggt	gtttttgtta	tatagaacac	6600
ttgtttggag	tgaatttagc	gtacattatc	tggaacttca	gtttttgtct	gttgataatt	6660
ggcttacagc	tgcatttcag	aacataacaa	tgtgagtttg	aacagactat	ttacgaccag	6720
caatcgattc	attcctccgg	ggctgctctg	ccacctcatg	atgcatctct	ggatgctatt	6780
tctcaccacc	tgttttcaga	aaacaactca	acgccagagg	tactatacaa	ttacattcat	6840
cctcggctct	gttgcacac	cacatthtat	tttatttttc	agttgatcta	cgatttccgt	6900
gttttagttg	ccacatata	tgcaagtaaa	ctgatcttat	atttcctttt	gcttgcagtt	6960
tgggtggacag	tattctcatg	ctgatgaaat	atcaatcctt	actgaatact	acaatacctt	7020
gatggggacc	aactccaact	caggatagca	tggtagcgtt	ctttgctggt	gaaataagtg	7080
gtaacgtagg	accaacaaca	ttgctttttc	aaaatttcaa	gtagtttggg	cctgaataca	7140
agtaagaaaa	agatgatcct	tcagtgttct	gttctctttg	gctaaaatga	caagtaatth	7200
gcacctttct	cctgtttttg	aatattattg	ttacacactt	gaatccatag	ggttttatag	7260
caactttgga	ggatttttatt	ccgttggatt	gctcatggat	acccttgatc	aaagtaatga	7320
ccatcataat	ttctatgaat	tgtatthttc	tacaccctt	ttcccgtagg	attctacaca	7380
ccaagaatt	ttgccgttgt	tgtcaagtgg	tgttcacctg	cacgtgctac	cttcaatggt	7440
tgttccagaa	gccaatthac	tacattgatt	cgatagagca	cacagtacta	agcctactaa	7500
taggtthttc	cacagcacta	ccattgtthaa	tatatatgta	catacgagat	attgtgcata	7560
ctgttataag	gttactgthaa	atatcgatta	gtgatatgtc	cttgcaaaac	aagaagagaa	7620
gtttgtaggg	ccgtgtthta	gtcccacaca	tatgttgaaa	tcgagctgac	cttatgttcc	7680
ctthttthtt	tgcagcctta	tccgcagcat	tctcaagttg	atgatacgtc	atccccggac	7740
tacgactaca	atcctthtcgg	agagtthttga	gattgagaga	tgacatatga	gcagtgtctgt	7800
ctgtacatat	tattthcttgt	acagtthtcta	attatgaaact	cttgaataat	cttgtcccgg	7860
tggacaatgc	tgtatthttat	gagtcttgggt	aggaatgtat	gtgtthtggta	taaaatcgggt	7920
gaagggtgca	tgtagtgtat	gacatcgctt	tgacggagga	ggtgctgatt	gtacgggact	7980
gaactgaagg	caagacagca	gcaagcaagc	actgacaaag	tatggattga	atatagctca	8040
gatggctgag	agccggagggt	catcaggcac	gatgctcaac	gccggagggtc	aattgtaatt	8100
thtatgthaat	ataatthtgc	ctagtgttgc	aatatgtaca	aatatthttag	tattthtagca	8160
tgtgattcat	cggthccatat	thaatgttatt	gtgtgthaa	atgtthtatca	aatcctgcct	8220
gtgattthac	tgcccattgtt	thaggattth	atthttgthaat	cactthattga	cttagcaaa	8280
aagatgthaa	thtattcgggt	ataagththaat	aaaaagtgthaa	acagththaa	cggtthttca	8340



aggaatgata tacttagtaa aagaatggaa ggttggacaa agcattgcg c tggcagaaa 8400  
 aaggaacgat ttgttttttg aactagtata gagatttcac ttgagctgag ggccattaca 8460  
 caccaactgt atatgtttca gctctgcaac agcatcgtcg tgatggtcgt catttgatct 8520  
 cctacctga ccgagtagct catcaaccga gttattttgc agtacatcaa acaaatatgg 8580  
 gtcgtccatt cccatcatct gatagtctag atccatccat actaccgtat tttagtagca 8640  
 catggacacg gagatcg 8657

<210> 4  
 <211> 10592  
 <212> DNA  
 <213> Triticum aestivum 'Lumai 15+MS2'

<220>  
 <221> The Genomic Coding Region of the WMS Gene  
 <222> (5579)..(9656)  
 <223> The Full-Length Genomic Coding Region of the WMS Gene

<400> 4  
 gcgcccgcg gtaggcttt gccaaaggcat caatggatcc cgaggacatg ctgctcgcgt 60  
 cggctctccg ccgctccctg acgatgtcgg agacagatgc gggcggtgg gtggggcatt 120  
 ggcgagcgc tggatgatct ggaggacatg ctctcgtgt cggctctccg ccgctccctg 180  
 acgacgtag agacggatgc gcggtgatgg gtgaggcggt ggggaggctc cggatggatcc 240  
 cgagaacacc ctctcgcac cggcccccg ctgcttgcta acgacggcgg agagggatgc 300  
 gggcgggcg gtagggcggt ggagaggcgc tggatggatcc agaggacacg ctctctgtgc 360  
 ggatcctccg ccgctccctg atggcagcga agagggatgc gggcgggcg gtagggcggt 420  
 ggggagcgc cggatggatcc cgaggacacg ctctcgcgt cggctctccg ccgctccctga 480  
 cgacgacgga gacggatgca cggcgggcg ttagggcggt gcgaggcgtc ggtggatccc 540  
 gaagacagc tctcgcggt ggtcctccg tgcctcgtga caatggcaga gagggatgcg 600  
 tggcgggcg ttagggcggt gagaggcgtc gatggatccg gaggacacgc tctcgtgtc 660  
 aatcctccg cggctccctga tgacggcgg gaggggtgcg cggcgggcg ttaggcattg 720  
 gggagcgc ggtggatccc gaggacatgc tctcgcgtc ggtcctccg tgcctccctga 780  
 cgaaggcga gacggatgca aggcggcgg ttaggcattg tcgaggcgtc ggtggatccc 840  
 gaggacacgc tcgtcaagtc agtctccg ccgctccctgt cgacggtgga gacggtttca 900  
 tggcgatgg ttagggcgtc gcaaacgcgt gactgggtg atccttagga cacgctcgtt 960  
 acgtcggctc tccgcccgtc cctgacgat gtggagactg atgcacggcg gctctggcat 1020  
 cgagctgtcc gagcacgagg caatggtgca agttgcggcg aaggcgaaca ccgaggagta 1080  
 ggagcgctt ctccaggggc tggccgcgca gatctcctc gagggccatg accctccgac 1140

ggccaaggcc agcgcacgac cccaaacgga cgtccggttt ggcctgcttt cgtctgtttg	1200
cggcggcaat gggttcgccc atgtctgctt gggtcggtt ggttgtcgat atgcccacg	1260
cacggccgca ccccaaatca tgtccagggt ggacgtgatt aaaaaaacac aaaaactaaa	1320
atgaaatgcc aaaaaatta aataaatgca agcataaaaa tataaaacat aaattaacca	1380
tcacggccac aaaacggccc agttccatgg ttcacataga cataattaac ataaaaacia	1440
aataaaaccg ccgcccacgc gctcctgccc tgcccgtcgc cgtcttctca gtggccgccc	1500
ttgtcgtcgt tgtcgtgac gaggtcgacg tagtccggcg gcgtccagag gtgggacggc	1560
ggtgcgtggt acacgggggc gggctggaag gcgggaggtg cctacacctc ctctcctgt	1620
ggcgacgcct cccgctccgg tgaccatggc gttgtggggc accagtccac tgctagccca	1680
ccaggcccgg gtggaacaca gccacgggct cctcctccat cacctcctcc gtccaccca	1740
tctccagctc ggggatggcg acgtcgccgg ccgcagagag ggccatcctc tcttcgaggc	1800
cctcccattg gcgctcatcg tgcgtcttca tggagtcctc catgacacgt tgcatgagcc	1860
gggcctctc ctccgctgtc atgcgaggag gtggtggtgg cagcggagat ggtgaaggcg	1920
acggcgtggg cgtgaggccg cgcacccgcg tacgcctgcg cacctgggga gcagccgctg	1980
cgcgctctcg acgtggccgt cgcggccccg acaagggtgc ggcgaagaaa aaggcgcgac	2040
gcgtgtcgtg ctcgctccga aaccacgtgt cccacaggtc ggagtcgggg gcgtaccgag	2100
ggtcgtagta caggctgtcc ggcaggaggc ggcggcggca ctggatctcc tcgcggcgcg	2160
cacggccgct cgtcgggacc ggcgggatcg gcacccggtt ggcggagaga tgccagttat	2220
tggggagggtg cacgtcgtc catgggagcg gcgtcctcgt ctcccaataa cgccggcata	2280
catccgctg gatgtactgc tggctcgcgt tgccgccggc cgtagggccg atggtgaatg	2340
gggcaggcgt gggggctcga tgcggtggtg atgcgggctc ctctttcatg gagcccgggc	2400
ggcggcccga ggacaagcca gcctcgtggt cgcgcttccc cttgcgaccg gtgttccaga	2460
accccatggc tgcgaggcgg ccggccgacg agatcgagga cggggagagg gagagctagg	2520
gtttgggggtg tgtcgggttt cgaggaggca gcacgggctg gagtggggag tgtggacgac	2580
gaccggtcca cggtttcca ttaagaagg acggcgactg tttgctggac ggatgacagg	2640
tggggccgac cgcgctgtg cattaatggt ggctggtggg aggtagggtg ccgcctgcta	2700
cgcggcctcg aggcggacga gcgacgcgtc cgtttgctgt ccgccgac ccaaatccgg	2760
cacatgtttg cgctcgaat ggatcggccc ggacacaaaa cggaccagat aggttcaggc	2820
cgtcgcgcgc tgggcgtggg atttgttctt ttgtccaaa tggacggggc cggacgggat	2880
ggggtcgcgc gcaagggcga gagcagaacc atcgaccgca agcggtgatt ttctgcgcac	2940
cttctgccat aggtgtagct cgtcgaccgc caagtatatc actgtctcgc gatttgagca	3000
tagagtcaat cgattttcct ggccaatggc gtcaagggga gagatttggg caaatggggc	3060

gaagtcgcag	acccatgtat	atgtgcacgg	gtgggtgggt	gccttagggc	atttacaacg	3120
caaggcgcta	aggcgggcgc	cagggtcagg	atcctagtcg	tttggcttag	ttcccgtcca	3180
aatttgagaa	ttgagctggc	atcgatgcca	tataagtcgt	cgggcgtcgg	gcgctaactc	3240
agttttctgt	ctattttatg	tgtgtagcgc	tcatacgtgg	ctctcagcgt	tggaagaggg	3300
actcttagcc	caggcgctag	gaagaaaata	ctattttatt	tccagtcaag	tgcttgatta	3360
ggcgccctcc	attggagatg	cccttatgtg	cctctctacg	ccgcagcagc	cggaaactac	3420
ggcgcaccag	tactggacgg	ctcgtttctt	attctaaaca	cagatactag	tgttgttgcc	3480
gccagtcctc	cgccgcccga	gctctctctc	tctctctccc	tcgcacaaac	atagaagaaa	3540
gaaggaagag	gagcgatgca	gtggacacaa	caagctttac	gcggtgcacg	tacgctgccg	3600
gccgcacgaa	cagccgatcg	ttttcattcc	tgagctcgaa	ctcagccacc	ggacaacaac	3660
gagtacacag	agggccttct	atacccaagc	tacacacatc	aggctagcta	ccacacgcaa	3720
gcacgcatgc	atccactgca	gcgaaagcta	actacatgca	cgcatgcagc	ccacgacccg	3780
gctgcatgac	gcccgcgcct	gccgagtcca	cgatccgcac	ggcgtgacca	actaactgca	3840
tgcaactaga	cggagcgccc	acgcaacgcc	cgccccgcgc	tcctcagctc	ccgcgcccgc	3900
cgcgcacgca	cgccaacggg	atagcactgg	ttccagcgcc	tggcgcggtc	acacctcgcg	3960
cgcccgctca	accaacacac	acacacatga	ccccgcccgc	cacccgcccgc	gcccgacacg	4020
cccggcgcaa	tcgcggtggc	ttatgcecaa	cactcacccc	ccttagccac	gaattacagc	4080
aggtaggttc	atcatcgtcg	atgtcgccat	ggccgtcgca	tcgcaccgct	gcggcctccg	4140
ccatgccgtc	gacgtcgttg	tagccgcccgc	cgctctgacg	tcgctgccac	acctgccacc	4200
gtgccgcccgt	gcccttcgcg	tgcactcccc	gcgctcccgg	cccgcgctcc	cgcgcgcacg	4260
tacgctatct	gcgcaactag	gtccagtgtc	tcgacgcggt	ccactcccac	ggtcccgcag	4320
cgtctggtgc	gcaccataaa	cacgcaccgg	tcgcgcccgg	ctcgccaccg	cgtcttattg	4380
ccctgcactg	ccgtgccgtc	aaccgtagcg	cagcgccctc	acggctcgtcg	cgccgagccg	4440
ccgcgccctc	tgcgacacca	cgcaggtcct	ccgcgacctc	ctcgtctccg	cgaccgccac	4500
tgctcgcccgc	gcgcacggca	tcacgccaca	ccgccgtgga	ctcgccgcgc	gttgccgcag	4560
ccacgcgctc	gccgcacgcc	cggcatcacg	ccacaccgcc	gtggactcgc	cgcgcggtgc	4620
cgagatcttc	atgtccgccc	cgcgccacgg	ccgccccccg	aacctgtggc	tctgatacca	4680
aatgttgttg	ccgccagtcc	ctcgccgccc	gagctctctc	tctctctctc	cctcgcaaaa	4740
acatagaaga	aagaaggaag	aggagcgatg	cagtggacac	aacaagcttt	acgcggtgca	4800
cgtacgctgc	cggccgcacg	aacagccgat	cgttttcatt	cctgagctcg	aactcagcca	4860
ccggacaaca	acgagtacac	agagggcctt	ctatacccaa	gctacacaca	tcaggctagc	4920
taccacacgc	aagcacgcat	gcatccactg	cagcgaaagc	taactacatg	cacgcatgca	4980

gccacgacc	eggctgcatg	acgcccgcgc	ctgccgagtc	cacgatccgc	acggcgtgac	5040
caactaactg	catgcaacta	gacggagcgc	ccacgcaacg	cccgccccgc	gtcctcagc	5100
tcccgcgcc	gccgcgcacg	cacgccaacg	ggatacgact	ggttccagcg	cctggcgcg	5160
tcacacctcg	cgcgctcgtc	taaccaacac	acacacacat	gaccccgcgc	cgcacccgcc	5220
gcgcccgaca	cgcccggcgc	aatcgcggtg	gcttatgccc	aacaactagt	gtgcacctcg	5280
ttgagagtgc	ggcacccgac	tgcacagtgc	acatgcatgc	agctggctct	ttctcttgac	5340
ttgacacgct	ctcgttctc	ccgattcctg	cccgcgcgg	cgtctccacc	cgacttgatc	5400
gacatcggca	tcggcatcgg	cctcggcatc	ggcccctcga	cgacgctcag	tatataagcg	5460
atcgggctgg	tggagctgct	tgcagtacc	gcagtggaca	cacgcttagc	tttagctacg	5520
taggcgcagc	agccggaaac	tagctagcag	gtcgagaagg	ccggccggag	gtagggagat	5580
ggcagggcac	cacagcccct	cggcggcctc	ggcactgcgt	gaaaaagaca	cgctggtgag	5640
gtgtctcgtg	ggatcaggtc	ccggcggcgg	cgctcatgcc	gggaccttcg	gcgctgtgcg	5700
ggacttctc	atccagttcc	gcgaccaagg	aatcccctgg	gtccgcatct	acgagtcaac	5760
cccggcttgg	cagcagcaat	gtgagtaatc	taatctccac	tgttgattga	tctgcataat	5820
gctactcatt	ctcactatcg	cctggccggc	ctcgtgatca	acatgaatgc	gcgctatgt	5880
tatgcagccg	gcgggctgct	gatccaggat	tgggacggag	acgccgcggc	ggagggagcc	5940
aagggttct	tcacgctcat	caccacaagg	aggggcggcg	ccattaacag	gagggcactg	6000
ggaggcggga	cgtggacaag	caaggccgcg	cccagggtag	gggacgaggt	cgccgtcagc	6060
acactgtact	tcaaacgggg	cgggtccagc	ggcagattat	tcaccgcctt	ggagatccat	6120
ctcagaaacg	aggtatgctg	tgcttgctcc	atccatcgca	tttttttgt	tttgttttaa	6180
atttgcttat	gcgactatat	attatcatgg	ttgttgccca	cgttgttcaa	agatttgcg	6240
cctgcttga	aactgctggt	atatatgaac	ccttttctta	agcttcggtg	taggactacg	6300
gctcgttcg	tttttctcc	ttctctcgcc	aaaacaaatt	ccatctcacc	gatctctct	6360
ccgtcggcga	cgaaccctag	ctcggatcag	tccgcttccc	ttcaaaaaaa	agaaaaataa	6420
aatccatct	caactgaagt	gcatttcaac	attgctgttc	cgtacatcta	aacttacata	6480
tgacgacatg	atcaacagta	gattagtcct	ttttattata	tataggatga	tccaattcg	6540
tttgttctct	agctagagca	atataaact	ataggatcag	tacttttttag	gggcacacca	6600
ccataagggt	agtccctaagt	tgaccttctt	ctgctgcctt	taaacctcgt	cgatcatagcc	6660
cagctagtaa	accctcgccc	tcggctctgtt	tcttacgagc	ccaagcagcc	cgttccgttt	6720
cctcacgagc	ccaagcccag	cttgtaaacc	cttccgtccc	ccgcctcgtc	tcgtccagtc	6780
cagaccctc	ttctcttcta	gtcaacggtc	gccggcggcg	gcggcgccaa	gtcatccaag	6840
acagagagcg	ctcagccgca	gccccgaacc	ctagaaatca	agcgaacgcg	gcggcgagg	6900

tccggttggg	gagatgcact	tcttttttca	gcaagtcagt	gaaaattata	tgttgatctt	6960
tcgtgtttgt	ttctgttttt	ctagccccaa	gttgctatct	gcctgctgca	tccgactaac	7020
tatctgtata	gcattcggga	tttgaggctc	tacatcgacc	aggtaaatat	tttctatttc	7080
cagttttggt	ttcacccgt	gggcgctact	ttcaatgttc	ggtctacaag	ccaattagct	7140
actgtagatt	gattcagttg	ctgaacgata	aaacaagacc	gattccacta	tgcatgtttt	7200
gctacaaatg	aatgagccca	acaacattac	tatgaggtta	ctctcctctt	tcagggatgg	7260
ttcccgggag	gaactcaagc	aaacctgggc	gcgaggcaat	atcaagggtat	tcataagtca	7320
tgattgatcc	ccaatgcctt	cgacagttta	actgaaacag	gcaccatctg	tacttttggt	7380
gaaacatagt	gatctttgat	ctgggtacat	agatagccct	gatttcatat	atctacgtcc	7440
ttacattagt	catggaaata	tgaaaacgag	gtagattgat	ctgttatttt	atcctattac	7500
ttagcatttt	tgtacttgta	catcttattt	cggcagataa	atttaaaacc	ccacagctga	7560
tatatatatt	atcctcaatt	tatacactat	ttgatgaatt	gataaggtaa	gaactcataa	7620
gtcgagaact	ctagatatat	accagggacg	tctactatca	gaacacatga	ttgaacataa	7680
atcaatcact	gcagaatgat	atltgaacta	agcgtttatc	agtcataaga	tagacatatt	7740
gttgttttcc	aatatatatt	gtggaattta	atctgggcta	tatgtaatag	ctccaattct	7800
ctgcgctgtg	gcatattnaa	tcgcattggt	cttactctgg	cagaagtttt	acatgctacc	7860
ttgcttgtag	atcctgatgt	tcctggattc	gtgagtgggt	cacgtgctga	ttacaccact	7920
attctgtttt	ctagcagtga	ggtaattaag	ctttccatgc	acaaactaga	acaagttacc	7980
accaaattta	gatttcttgt	acaaccctta	tgcttatcta	aatgtgacaa	ctcaagttct	8040
attatctcta	gtaagaagac	atagaagatg	ttttattaag	tcaatttctg	ttcttacgta	8100
ctccctctgt	cccacaatgt	aacacgttta	acgtcttgca	ttgtgggacg	gagggagaga	8160
acttgtcatt	tgcttactgg	tattggagtt	agactgggat	acttaattgg	gaaatcattt	8220
tgaaaactaa	ggcatcgagt	ccttctactgt	tctgggtgta	ctgaggtaaa	caacatgcac	8280
ttcggatgag	atggggagaat	taggctatta	gcactcagga	ttagcctaca	gataggtttt	8340
atgcacagca	caacctatat	atgagatatt	ttacataccg	tatgatacct	gtaaacattg	8400
ataagtggta	tatctcaaca	ccatgcataa	ttaattgcaa	tactacagaa	tgtactagac	8460
aattctggac	cctccgattt	ggatctggcg	gccgatatag	tccttctccc	atgttgtttt	8520
tgttatatag	aacacttggt	tggagtgaat	ttagcgtaca	ttatctggaa	cttcagtttt	8580
tgtctgttga	taattggctt	acagctgcat	ttcagaacat	aacaatgtga	gtttgaacag	8640
actattnacg	accagcaatc	gattcattcc	tccggggctg	ctctgccacc	tcatgatgca	8700
tctctggatg	ctattnctca	ccacctgttt	tcagaaaaca	actcaacgcc	agaggtaacta	8760
tacaattaca	ttcatcctcg	gtcttggtgc	atcaccacat	tttattttat	ttttcagttg	8820

atctacgatt	tccgtgtttt	agttgccaca	tatattgcaa	gtaaactgat	cttatatttc	8880
cttttgcttg	cagtttgggtg	gacagtattc	tcatgctgat	gaaatatcaa	tccttaatga	8940
atactacaat	accttgatgg	ggaccaactc	caactcagga	ttgcatggta	cgcttctttg	9000
ctgttgaaat	aagtggtaac	gtaggaccaa	caacattgct	ttttcaaaat	ttcaagtagt	9060
ttggacctga	atacaagtaa	gaaaaagatg	atccttcagt	gttctgttct	ctttggctaa	9120
aatgacaagt	aatttgcacc	tttctcctgt	tttggaatat	tattgttaca	cacttgaatc	9180
catagggttt	tatagcaact	ttggaggatt	ttattccggt	ggattgctca	tggataacct	9240
tgatcaaagt	aatgaccatc	ataatctcta	tgaattgtat	tttcctacac	cccttttccc	9300
gtaggattct	acacaccaaa	gaatcttgcc	gttgttgtca	agtgggtgtc	acctgcacgt	9360
gctaccttca	atgtttgttc	cagaagccaa	ttaactacat	tgattcgtat	gagcacacag	9420
tactaagcct	actaataggt	ttttccacag	cactaccatt	gttaatatat	atgtacatat	9480
gagatattgt	gcatactggt	ataaggttac	tgtaaataatc	gattagtgat	atgtccttgc	9540
aaaacaagaa	gagaagtttg	tagggccgtg	ttttagtccc	acacatatgt	tgaaatcgag	9600
ctgaccttat	gttcccgttt	ttttttgcag	ccttatccgc	agcattctca	agttgatgat	9660
acgtcatccc	cggactacga	ctacaatcct	ttcggagagt	tttgagattg	agagatgaca	9720
tatgagcagt	gctgtctgta	catattattt	cttgtacagt	ttctaattat	gaactcctga	9780
ataatcttgt	cccgggtggac	aatgctgtat	tttatgagtc	ttggtaggaa	tgtatatggt	9840
tggtataaaa	tcggtgaagg	gtgcatgtag	tgtatgacat	cgctttgacg	gaggaggtgc	9900
tgattgtacg	ggactgaact	gaaggcaaga	cagcagcaag	caagcactga	caacgtgtgg	9960
attgaatata	gctcagacgg	ctgagagccg	gagggtcatca	ggcacgatgc	tcaacgccgg	10020
aggtcaattg	taatctttat	gtaatataat	ttgccctagt	gttgcaatat	gtacaaatat	10080
tttagtattt	tagcctgtga	ttcatcggtc	catattaatg	ttattgtgtg	aataaatggt	10140
tatcaaatcc	tgctgtgat	ttatctgccc	atgttttagg	atctttatctt	gtaatcactt	10200
attgacttag	caaagaagat	gtaagtttat	tcggtataag	ttaataaaaa	gtgaaacagt	10260
taaggcgggt	tttcaaggaa	tgatatactt	agtaaaagaa	tggaagggtg	gacaaagcat	10320
tgcgcttggc	agaaaaagga	acgatttggt	ttttgaacta	gtatagagat	ttcacttgag	10380
ctgagggcca	ttacacacca	actgtatatg	tttcagctct	gcaacagcat	cgtcgtgatg	10440
gtcgtcattt	gatctcttac	ctcgaccgag	tagctcatca	accgagttat	tttgcagtac	10500
atcaaacaaa	tatgggtcgt	ccattcccat	catctgatag	tctagatcca	tccatactac	10560
cgtatcttag	tagcacatgg	acacggagat	cg			10592

<210> 5  
 <211> 5578  
 <212> DNA

<213> Triticum aestivum 'Lumai 15+MS2'

<220>

<221> misc\_feature

<223> The Promoter of the WMS Gene

<400> 5

gcggccgcgg	gtgaggcttt	gccaaggcat	caatggatcc	cgaggacatg	ctgctcgcgt	60
cggtcctccg	ccgctccctg	acgatgtcgg	agacagatgc	gcgccggtgg	gtggggcatt	120
ggcgaggcgc	tgggtggatct	ggaggacatg	ctcctcgtgt	cggtcctccg	ccgctccctg	180
acgacggtag	agacggatgc	gcggtgatgg	gtgaggcggt	ggggaggctc	cggtggatcc	240
cgagaacacc	ctcctcgcac	cggccccccg	ctgcttgcta	acgacggcgg	agagggatgc	300
gcgccggcgg	gtgaggcggt	ggagaggcgc	tgggtggatcc	agaggacacg	ctccttgtgc	360
ggatcctccg	ccgctccctg	atggcagcga	agagggatgc	gcgccggcgg	gtgaggcggt	420
ggggaggcgc	cggtggatcc	cgaggacacg	ctcctcgcgt	cggctcctccg	cgctccctga	480
cgacgacgga	gacggatgca	cggcggcggg	tgaggcggtg	gcgaggcgtc	ggtggatccc	540
gaagacacgc	tcctcgcggt	ggtcctccgc	tgctcgcgtg	caatggcaga	gagggatgcg	600
tggcggcggg	tgaggcggtg	gagaggcgtc	gatggatccg	gaggacacgc	tcctcgtgtc	660
aatcctccgc	cggtccctga	tgacggcggg	gaggggtgcg	cggcggcggg	tgaggcattg	720
gggaggcgct	ggtggatccc	gaggacatgc	tcctcgcgtc	ggtcctccgc	tgccccctga	780
cgaaggcгаа	gacggatgcg	aggcgcggg	tgaggcattg	tcgaggcgtc	ggtggatccc	840
gaggacacgc	tcgtcaagtc	agtcctccgc	cgctccctgt	cgacggtgga	gacggtttca	900
tggcgatggg	tgaggcgtcg	gcaaacgcgt	gactgggtgg	atccttagga	cacgctcgtt	960
acgtcggctc	tccgccgctc	cctgacgatg	gtggagactg	atgcacggcg	gctctggcat	1020
cgagctgtcc	gagcacgagg	caatggtgca	agttgcggcg	aaggcgaaca	ccgaggagta	1080
ggagcgcttg	ctccaggggc	tggccgcgca	gatctcctcg	gacggccatg	accctccgac	1140
ggccaaggcc	agcgcacgac	cccaaacgga	cgctccggtt	ggcctgcttt	cgtctgtttg	1200
cggcggcaat	gggttcgccc	atgtctgctt	gggtccggtg	ggttgtcgat	atgcccacg	1260
cacggccgca	ccccaaatca	tgtccagggt	ggacgtgatt	aaaaaacac	aaaaactaaa	1320
atgaaatgcc	aaaaaaatta	aataaatgca	agcataaaaa	tataaaacat	aaattaacca	1380
tcacggccac	aaaacggccc	agttccatgg	ttcacataga	cataattaac	ataaaaaaca	1440
aataaaaccg	ccgcccacgc	gctcctgccc	tgcccgtcgc	cgtcttctca	gtggccgccc	1500
ttgtcgtcgt	tgctcgtgac	gaggtcgacg	tagtccggcg	gctccagag	gtgggacggc	1560
ggtgcgtggt	acacgggggc	gggctggaag	gcgggagggt	cctacacctc	ctcctcctgt	1620
ggcgacgcct	cccgtccgg	tgaccatggc	gttgtggggc	accagtccac	tgctagccca	1680

ccaggccccg	gtggaacaca	gccacgggct	cctcctccat	cacctcctcc	gtcctcacca	1740
tctccagctc	ggggatggcg	acgtcgcccg	ccgcagagag	ggccatcadc	tcttcgagggc	1800
cctcccattg	gcgctcatcg	tgcgtcttca	tggagtcctc	catgacacgt	tgcatgagcc	1860
gggcctcctc	ctccgctgtc	atgcgaggag	gtggtggtgg	cagcggagat	ggtgaaggcg	1920
acggcgtggg	cgtgaggccg	cgcaccccg	tacgcctgcg	cacctgggga	gcagccgctg	1980
cgcgctctcg	acgtggccgt	cgcggccccg	acaaggtgcc	ggcgaagaaa	aaggcgcgac	2040
gcgtgtctgt	ctcgtcccga	aaccacgtgt	cccacaggtc	ggagtccgggg	gcgtaccgag	2100
ggtcgtagta	caggtcgtcc	ggcaggaggc	ggcggcggca	ctggatctcc	tcgcggcgcg	2160
cacggccgct	cgtcgggacc	ggcgggatcg	gcacccggtt	ggcggagaga	tgccagttat	2220
tggggaggtg	cacgtcgctc	catgggagcg	gcgtcctcgt	ctcccaataa	cgccggcata	2280
catccgcgtg	gatgtactgc	tggtcgcgct	tgccgcccgc	cgtagggccg	atggtgaatg	2340
gggcaggcgt	gggggctcga	tgccggtggtg	atgcgggctc	ctctttcatg	gagccgcggc	2400
ggcggcccga	ggacaagcca	gcctcgtggt	cgcgcttccc	cttgcgaccg	gtgttccaga	2460
accccatggc	tgcgaggcgg	cgggccgacg	agatcgagga	cggggagagg	gagagctagg	2520
gtttgggggtg	tgctggggtt	cgaggaggca	gcacgggctg	gagtggggag	tgtggacgac	2580
gaccggtcca	cggtttccca	tttaagaagg	acggcgactg	tttgctggac	ggatgacagg	2640
tggggccgac	cgcgcgtgtg	cattaatggt	ggctggtggg	aggtaggtgg	ccgcctgcta	2700
cgcggcctcg	aggcggacga	gcgacgcgtc	cgtttgctgt	ccgccgcgac	ccaaatccgg	2760
cacatgtttg	cgctcgaaat	ggatcggccc	ggacacaaaa	cggaccagat	aggttcagggc	2820
cgtcgcgcgc	tgggcgtggg	atgtgttctt	ttgtcccaaa	tggacggggc	cggacgggat	2880
ggggtcgcgc	gcaagggcga	gagcagaacc	atcgaccgca	agcggtgatt	ttctgcgcac	2940
cttctgccat	aggtgtagct	cgtcgaccgc	caagtatadc	actgtctcgc	gatttgagca	3000
tagagtcaat	cgattttctt	ggccaatggc	gtcaagggga	gagatttggt	caaatggggc	3060
gaagtgcgag	acccatgtat	atgtgcacgg	gtgggtgggt	gccttagggc	atttacaacg	3120
caaggcgcta	aggcgggcgc	cagggtcagg	atcctagtcg	tttggcttag	ttcccgtcca	3180
aatttgagaa	ttgagctggc	atcgatgcca	tataagtcgt	cgggcgtcgg	gcgctaactc	3240
agttttctgt	ctattttatg	tgtgtagcgc	tcatacgtgg	ctctcagcgt	tgggaagaggg	3300
actcttagcc	caggcgttag	gaagaaaata	ctattttatt	tccagtcaag	tgccctgatta	3360
ggcgcctcct	attggagatg	cccttatgtg	cctctctacg	ccgcagcagc	cggaaactac	3420
ggcgcaccag	tactggacgg	ctcgtttctt	attctaaca	cagatactag	tgttggtgcc	3480
gccagtcctc	cgccgcccga	gctctctctc	tctctctccc	tcgcacaaac	atagaagaaa	3540
gaaggaagag	gagcgatgca	gtggacacaa	caagctttac	gcggtgcacg	tacgctgccg	3600



gccgcacgaa	cagccgatcg	ttttcattcc	tgagctcgaa	ctcagccacc	ggacaacaac	3660
gagtacacag	agggccttct	atacccaagc	tacacacatc	aggctagcta	ccacacgcaa	3720
gcacgcatgc	atccactgca	gcgaaagcta	actacatgca	cgcatgcagc	ccacgacccg	3780
gctgcatgac	gcccgcgcct	gccgagtcca	cgatccgcac	ggcgtgacca	actaactgca	3840
tgcaactaga	cggagcgccc	acgcaacgcc	cgccccgcgc	tcctcagctc	ccgcgcccgc	3900
cgcgcacgca	cgccaacggg	atagcactgg	ttccagcgcc	tggcgcggtc	acacctcgcg	3960
cgctccgtcta	accaacacac	acacacatga	ccccgcccgc	cacccgcccgc	gcccgacacg	4020
cccggcgcaa	tcgcggtggc	ttatgcccac	cactcaccac	ccttagccac	gaattacagc	4080
aggtaggttc	atcatcgtcg	atgtcgccat	ggccgtcgca	tcgcaccgct	gcggcctccg	4140
ccatgcgcgc	gacgtcgttg	tagccgcccgc	cgctcctgacg	tcgctgccac	acctgccacc	4200
gtgccgcccgt	gcccttcgcg	tgactcccc	gcgctcccgg	cccgcgctcc	cgcgcgcacg	4260
tacgctatct	gcgcaactag	gtccagtgtc	tcgacgcggt	ccactcccac	ggtcccgacg	4320
cgctctggtgc	gcaccataa	cacgcaccgg	tcgcgcccgg	ctcgccaccg	cgctcttattg	4380
ccctgcactg	ccgtgccgtc	aaccgtagcg	cagcgcctcc	acggtcgctg	cgccgagccg	4440
ccgcggcctc	tgcgacacca	cgcaggtcct	ccgcgacctc	ctcgtctccg	cgaccgccac	4500
tgctcgcccgc	gcgcacggca	tcacgccaca	ccgccgtgga	ctcgcccgcgc	gttgccgacg	4560
ccacgcgctc	gccgcacgcc	cggcatcacg	ccacaccgcc	gtggactcgc	cgcgcggttc	4620
cgagatcttc	atgtccgccc	cgcgccacgg	ccgccccccg	aacctgtggc	tctgatacca	4680
aatgttggtg	ccgccagtcc	ctcgcccggc	gagctctctc	tctctctctc	cctcgcaaaa	4740
acatagaaga	aagaaggaag	aggagcgatg	cagtggacac	aacaagcttt	acgcggtgca	4800
cgtagcgtgc	cggccgcacg	aacagccgat	cgttttcatt	cctgagctcg	aaactcagcca	4860
ccggacaaca	acgagtacac	agagggcctt	ctatacccaa	gctacacaca	tcaggctagc	4920
taccacacgc	aagcacgcat	gcatccactg	cagcgaaaagc	taactacatg	cacgcatgca	4980
gcccacgacc	cggctgcatg	acgcccgcgc	ctgccgagtc	cacgatccgc	acggcgtgac	5040
caactaactg	catgcaacta	gacggagcgc	ccacgcaacg	cccgccccgc	gctcctcagc	5100
tcccgcgccc	gccgcgcacg	cacgccaacg	ggatacgact	ggttccagcg	cctggcgcgg	5160
tcacacctcg	cgcgctcgtc	taaccaacac	acacacacat	gaccccgcgc	cgcacccgcc	5220
gcgcccgaca	cgcccggcgc	aatcgcggtg	gcttatgccc	aacaactagt	gtgcacctcg	5280
ttgagagtgc	ggcaccggac	tgcacagtgc	acatgcatgc	agctggctct	ttctcttgac	5340
ttgacacgct	ctcgtttctc	ccgattcctg	cccgcgcccg	cgctctccacc	cgacttgatc	5400
gacatcggca	tcggcatcgg	cctcggcatc	ggcccctcga	cgacgctcag	tatataagcg	5460
atcgggctgg	tggagctgct	tgcagtaccc	gcagtgagca	cacgcttagc	tttagctacg	5520

taggcgcagc agccggaaac tagctagcag gtcgagaagg cgggccggag gtagggag 5578

<210> 6  
<211> 4681  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum 'Lumai 15+MS2'

<220>  
<221> The Genomic Coding Region of the WMS Gene  
<222> (97)..(4174)  
<223> Transcribable Genomic Region of the WMS Gene

<400> 6  
cagtaccgc agtggacaca cgcttagctt tagctacgta ggcgcagcag ccggaaacta 60  
gctagcaggt cgagaaggcc ggccggaggt agggagatgg cagggcacca cagcccctcg 120  
gcggcctcgg cactgcgtga aaaagacacg ctggtgaggt gtctcgtggg atcaggtccc 180  
ggcggcggcg ctcatgccgg gaccttcggc gctgtgctggg acttcctcat ccagttccgc 240  
gaccaaggaa tcccctgggt ccgcatctac gagtcaacct cggcttggca gcagcaatgt 300  
gagtaatcta atctccactg ttgattgatc tgcataatgc tactcattct cactatcgcc 360  
tggccggcct cgtgatcaac atgaatgcgc gcgtatgtta tgcagccggc gggctgctga 420  
tccaggattg ggacggagac gccgcggcgg agggagccaa ggtgttcttc acgctcatca 480  
ccacaaggag gggcggcgcc attaacagga gggcactggg aggcgggacg tggacaagca 540  
aggccgcgcc cagggtaggg gacgaggtcg ccgtcagcac actgtacttc aaacggggcg 600  
ggtccagcgg cagattattc accgccttgg agatccatct cagaaacgag gtatgctgtg 660  
cttgctccat ccatcgcatt ttttttgttt tgttttaaat ttgcttatgc gactatata 720  
tatcatgggt gttgccacg ttgttcaaag atttgcgccc ctgcttgaaa ctgctggat 780  
atatgaacc ttttcttaag cttcggtgta ggactacggc tccgttcggt ttttctcctt 840  
ctctcgccaa aacaaattcc atctcaccga tctcttctcc gtcggcgacg aaccctagct 900  
cggatcagtc cgcttcctt caaaaaaag aaaaataaaa atccatctca ctgaagttgc 960  
atttcaacat tgctgttccg tacatctaaa cttacatag acgacatgat caacagtaga 1020  
ttagtccttt ttattatata taggatgatc ccaattcggt tgttctctag ctagagcaat 1080  
ataatactat aggatcagta ctttttaggg gcacaccacc ataagggttag tcctaagttg 1140  
accttcttct gctgcctta aacctcgtcg tcatagecca gctagtaaac cctcgcctc 1200  
ggtctgtttc ttacgagccc aagcagcccg ttccgtttcc tcacgagccc aagcccagct 1260  
tgtaaaccct tccgtcccc gcctcgtctc gtccagtcca gaccctctt ctcttctagt 1320  
caacggtcgc cggcggcggc ggcgccaagt catccaagac agagagcgt cagccgcagc 1380  
cccgaaccct agaaatcaag cgaacgcggc ggcgaggttc cggttgggga gatgcacttc 1440  
ttttttcagc aagtcagtga aaattatatg ttgatcttcc gtgtttgttt ctgtttttct 1500

agccccaagt	tgctatctgc	ctgctgcac	cgactaacta	tctgtatagc	attcgggatt	1560
tgaggctcta	catcgaccag	gtaaataatt	tctattttcca	gttttggttt	tcacccgtgg	1620
gcgctacttt	caatgttcgg	tctacaagcc	aattagctac	tgtagattga	ttcagttgct	1680
gaacgataaa	acaagaccga	ttccactatg	catgttttgc	tacaaatgaa	tgagcccaac	1740
aacattacta	tgaggttact	ctcctctttc	agggatgggt	cccgggagga	actcaagcaa	1800
acctgggcgc	ggagcaatat	caaggtattc	ataagtcatg	attgatcccc	aatgccttcg	1860
acagtttaac	tgaaacaggc	accatctgta	cttttgttga	aacatagtga	tctttgatct	1920
gggtacatag	atagccctga	tttcatatat	ctacgtcctt	acattagtca	tggaaatatg	1980
aaaacgaggt	agattgatct	gttattttat	cctattactt	agcatttttg	tacttgtaca	2040
tcttatttcg	gcagataaat	ttaaaacccc	acagctgata	tatatattat	cctcaattta	2100
tacactattt	gatgaattga	taaggtaaga	actcataagt	cgagaactct	agatatatac	2160
cagggacgtc	tactatcaga	acacatgatt	gaacataaat	caatcactgc	agaatgatat	2220
ttgaactaag	cgtttatcag	tcataagata	gacatattgt	tgttttccaa	tatatattgt	2280
ggaatttaat	ctgggctata	tgtaatagct	ccaattctct	gcgctgtggc	atattaaatc	2340
gcattggctc	tacactggca	gaagttttac	atgctacctt	gcttgcagat	cctgatgttc	2400
ctggattcgt	gagtggttca	cgtgctgatt	acaccactat	tctgttttct	agcagtgagg	2460
taattaagct	ttccatgcac	aaactagaac	aagttaccac	caaatttaga	tttcttgtac	2520
aaccctatg	cttatctaaa	tgtgacaact	caagttctat	tatctctagt	aagaagacat	2580
agaagatggt	ttattaagtc	aatttctggt	cttacgtact	ccctctgtcc	cacaatgtaa	2640
cacgtttaac	gtcttgcatt	gtgggacgga	gggagagAAC	ttgtcatttg	cttactggta	2700
ttggagttag	actgggtatac	ttaattggga	aatcattttg	aaaactaagg	catcgagtcc	2760
ttcactgttc	tggtgtact	gaggtaaaca	acatgcactt	cggatgagat	gggagaatta	2820
ggctatttagc	actcaggatt	agcctacaga	taggttttat	gcacagcaca	acctatatat	2880
gagatatttt	acataccgta	tgatacctgt	aaacattgat	aagtgggata	tctcaacacc	2940
atgcataatt	aattgcaata	ctacagaatg	tactagacaa	ttctggaccc	tccgatttgg	3000
atctggcggc	cgatatagtc	cttctcccat	gttgtttttg	ttatatagaa	cacttgtttg	3060
gagtgaattt	agcgtacatt	atctggaact	tcagtttttg	tctgttgata	attggcttac	3120
agctgcattt	cagaacataa	caatgtgagt	ttgaacagac	tatttacgac	cagcaatcga	3180
ttcattcctc	cggggctgct	ctgccacctc	atgatgcac	tctggatgct	atctctcacc	3240
acctgttttc	agaaaacaac	tcaacgccag	aggactata	caattacatt	catcctcggt	3300
cttgttgcat	caccacattt	tattttattt	ttcagttgat	ctacgatttc	cgtgttttag	3360
ttgccacata	tattgcaagt	aaactgatct	tatatttctc	tttgcttgca	gtttgggtgga	3420

cagtattctc atgctgatga aatatcaatc cttaatgaat actacaatac cttgatgggg 3480  
accaactcca actcaggatt gcatgggtacg cttctttgct gttgaaataa gtggtaacgt 3540  
aggaccaaca acattgcttt ttcaaaatth caagtagttt ggacctgaat acaagtaaga 3600  
aaaagatgat ccttcagtgt tctgttctct ttggctaaaa tgacaagtaa tttgcacctt 3660  
tctcctgttt tggaatatta ttgttacaca cttgaatcca tagggtttta tagcaacttt 3720  
ggaggatthtt attccgttgg attgctcatg gatacccttg atcaaagtaa tgaccatcat 3780  
aatttctatg aattgtatth tcctacacc cttttcccggt aggattctac acaccaaaga 3840  
atthttgccgt tgttgtcaag tgggtgtcac ctgcacgtgc taccttcaat gtttgttcca 3900  
gaagccaatt aactacattg attcgtatga gcacacagta ctaagcctac taataggthtt 3960  
ttccacagca ctaccattgt taatatatat gtacatatga gatattgtgc atactgttat 4020  
aaggthactg taaatatcga ttagtgatat gtccttgcaa aacaagaaga gaagthttgta 4080  
gggccgtgth ttagtcccac acatatgtht aaatcgagct gaccttatgt tcccgtthtt 4140  
thttgcagcc ttatccgcag cattctcaag ttgatgatac gtcacccccg gactacgact 4200  
acaatcctth cggagagtht tgagattgag agatgacata tgagcagtg c tgtctgtaca 4260  
tattatthct tgtacagtht ctaattatga actcttgaat aatcttgtcc cgggtggacaa 4320  
tgctgtatth tatgagctt ggtaggaatg tatatgthtt gtataaaatc ggtgaagggth 4380  
gcatgtagtg tatgacatcg cthtgacgga ggaggthctg attgtacggg actgaactga 4440  
aggcaagaca gcagcaagca agcactgaca acgtgtggat tgaatatagc tcagacggct 4500  
gagagccgga ggtcatcagg cacgatgctc aacgccggag gtcaattgta atthttatgt 4560  
aatataatth gccctagtgt tgcaatatgt acaaatatth tagtatthta gcctgtgatt 4620  
catcggthca tattaatgth attgtgtgaa taaatgthta tcaaatcctg cctgtgatt 4680  
a 4681

<210> 7  
<211> 10600  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum 'Lumai 15+MS2'

<220>  
<221> The Genomic Coding Region of the WMS Gene  
<222> (5579)..(9656)  
<223> The Full-Length Genomic DNA Vector of the WMS Gene

<400> 7  
gcgcccgcg gtaggctth gccaaaggcat caatggatcc cgaggacatg ctgctcgcgt 60  
cggctctccg ccgctccctg acgatgtcgg agacagatgc gcggcggtgg gtggggcatt 120  
ggcgaggcgc tgggtggatct ggaggacatg ctctctgtgt cggctctccg ccgctccctg 180

acgacggtag	agacggatgc	gcggtgatgg	gtgaggcggt	ggggaggctc	cggtggatcc	240
cgagaacacc	ctcctcgc	cggtcccccg	ctgcttgcta	acgacggcgg	agagggatgc	300
gcggcggcgg	gtgaggcggt	ggagaggcgc	tggaggatcc	agaggacacg	ctccttgctc	360
ggatcctccg	ccgctccctg	atggcagcga	agagggatgc	gcggcggcgg	gtgaggcggt	420
ggggaggcgc	cggtggatcc	cgaggacacg	ctcctcgcgt	cggtctccgc	cgctccctga	480
cgacgacgga	gacggatgca	cggcggcggg	tgaggcggtg	gcgaggcgtc	ggtggatccc	540
gaagacacgc	tcctcgcgtt	ggtcctccgc	tgctcgtgta	caatggcaga	gagggatgcg	600
tggcggcggg	tgaggcggtg	gagaggcgtc	gatggatccg	gaggacacgc	tcctcgtgtc	660
aatcctccgc	cggtccctga	tgacggcggg	gaggggtgcg	cggcggcggg	tgaggcattg	720
gggaggcgtc	ggtggatccc	gaggacatgc	tcctcgcgtc	ggtcctccgc	tgccccctga	780
cgaaggcga	gacggatgcg	aggcggcggg	tgaggcattg	tcgaggcgtc	ggtggatccc	840
gaggacacgc	tcgtcaagtc	agtcctccgc	cgctccctgt	cgacggtgga	gacggtttca	900
tggcgatggg	tgaggcgtcg	gcaaacgcgt	gcactggtgg	atccttagga	cacgctcgtt	960
acgtcgggtc	tccgccgctc	cctgacgatg	gtggagactg	atgcacggcg	gctctggcat	1020
cgagctgtcc	gagcacgagg	caatggtgca	agttgcggcg	aaggcgaaca	ccgaggagta	1080
ggagcgtttg	ctccaggggc	tggccgcgca	gatctcctcg	gacggccatg	accctccgac	1140
ggccaaggcc	agcgcacgac	cccaaacgga	cgctccggtt	ggcctgcttt	cgctctgtttg	1200
cggcggcaat	gggttcgccc	atgtctgctt	gggtccggtg	ggttgctgat	atgcccacg	1260
cacggccgca	ccccaaatca	tgtccagggt	ggacgtgatt	aaaaaaacac	aaaaactaaa	1320
atgaaatgcc	aaaaaaatta	aataaatgca	agcataaaaa	tataaaacat	aaattaacca	1380
tcacggccac	aaaacggccc	agttccatgg	ttcacataga	cataattaac	ataaaaaaaa	1440
aataaaaccg	ccgcccacgc	gctcctgccc	tgcccgtcgc	cgtcttctca	gtggccgccc	1500
ttgtcgtcgt	tgctcgtgac	gaggtcgacg	tagtccggcg	gctccagag	gtgggacggc	1560
ggtgcgtggt	acacgggggc	gggctggaag	gcgggagggtg	cctacacctc	ctcctcctgt	1620
ggcgcgcct	cccgtcctcg	tgaccatggc	gttggtggggc	accagtccac	tgctagccca	1680
ccaggcccgg	gtggaacaca	gccacgggct	cctcctccat	cacctcctcc	gtcctcacca	1740
tctccagctc	ggggatggcg	acgtcgccgg	ccgcagagag	ggccatcctc	tcttcgaggc	1800
cctcccattg	gcgctcatcg	tgctcttca	tggagtcctc	catgacacgt	tgcatgagcc	1860
gggcctcctc	ctccgctgct	atgcgaggag	gtgggtggtg	cagcggagat	ggtgaaggcg	1920
acggcgtggg	cgtgaggccg	cgcacccgcg	tacgcctgcg	cacctgggga	gcagccgctg	1980
cgctcctcgt	acgtggccgt	cgcggccccg	acaagggtgcc	ggcgaagaaa	aaggcgcgac	2040
gcgtgctcgt	ctcgtcccga	aaccacgtgt	cccacaggctc	ggagtcgggg	gcgtaccgag	2100

ggtcgtagta	caggtcgtcc	ggcaggaggc	ggcggcggca	ctggatctcc	tcgcggcgcg	2160
cacggccgct	cgtcgggacc	ggcgggatcg	gcacccggtt	ggcggagaga	tgccagttat	2220
tggggaggtg	cacgtcgctc	catgggagcg	gcgtcctcgt	ctcccaataa	cgccggcata	2280
catccgcgtg	gatgtactgc	tggtcgcgct	tgccgccggc	cgtagggccg	atggtgaatg	2340
gggcaggcgt	gggggctcga	tgccggtggtg	atgcgggctc	ctctttcatg	gagccgcggc	2400
ggcggcccga	ggacaagcca	gcctcgtggt	cgcgcttccc	cttgcgaccg	gtgttccaga	2460
accccatggc	tgcgaggcgg	ccggccgacg	agatcgagga	cggggagagg	gagagctagg	2520
gtttgggggtg	tgctgggttt	cgaggaggca	gcacgggctg	gagtggggag	tgtggacgac	2580
gaccggtcca	cggtttccca	tttaagaagg	acggcgactg	tttgctggac	ggatgacagg	2640
tggggccgac	cgcgcgtgtg	cattaatggt	ggctggtggg	aggtaggtgg	ccgcctgcta	2700
cgccgctcgc	aggcggacga	gcgacgcgtc	cgtttgctgt	ccgccgcgac	ccaaatccgg	2760
cacatgtttg	cgctcgaat	ggatcggccc	ggacacaaaa	cggaccagat	aggttcaggc	2820
cgctcgcgcg	tgggcgtggg	atltgttctt	ttgtcccaa	tggacggggc	cggacgggat	2880
ggggtcgcgc	gcaagggcga	gagcagaacc	atcgaccgca	agcggtgatt	ttctgcgcac	2940
cttctgccat	aggtgtagct	cgctgaccgc	caagtatatc	actgtctcgc	gatttgagca	3000
tagagtcaat	cgatlttctt	ggccaatggc	gtcaagggga	gagatlttgg	caaatggggc	3060
gaagtcgcag	acccatgtat	atgtgcacgg	gtgggtgggt	gccttagggc	atltacaacg	3120
caaggcgcta	aggcgggcg	cagggtcagg	atcctagtcg	tttggttag	ttcccgtcca	3180
aatltgagaa	ttgagctggc	atcgatgcca	tataagtcgt	cgggcgctcg	gcgctaactc	3240
agltttctgt	ctatlttatg	tgtgtagcgc	tcatacgtgg	ctctcagcgt	tggagagggg	3300
actcttagcc	caggcgctag	gaagaaaata	ctatlttatt	tccagtcaag	tgcttgatta	3360
ggcgccctcc	attggagatg	cccttatgtg	cctctctacg	ccgcagcagc	cggaaactac	3420
ggcgcaccag	tactggacgg	ctcgtlttctt	atltctaaaca	cagatactag	tglttgltgccc	3480
gccagtcctt	cgccgccgga	gctctctctc	tctctctccc	tcgcacaaac	atagaagaaa	3540
gaaggaagag	gagcgatgca	gtggacacaa	caagctlttac	gcggtgcacg	tacgctgccc	3600
gccgcacgaa	cagccgatcg	ltttcattcc	tgagctcgaa	ctcagccacc	ggacaacaac	3660
gagtacacag	agggcctltt	atacccaagc	tacacacatc	aggctagcta	ccacacgcaa	3720
gcacgcatgc	atccactgca	gcgaaagcta	actacatgca	cgcgatgcagc	ccacgacccc	3780
gctgcatgac	gcccgcgctt	gccgagtcca	cgatccgcac	ggcgtgacca	actaactgca	3840
tgcaactaga	cggagcgccc	acgcaacgcc	cgccccgcgc	tcctcagctc	ccgcgcccgc	3900
cgcgcacgca	cgccaacggg	atacgactgg	ltccagcgcc	tggcgcggtc	acacctcgcg	3960
cgctccgtcta	accaacacac	acacacatga	ccccgccgcg	caccgcgcgc	gcccgcacgc	4020

cccggcgcaa	tcgcggtggc	ttatgccc	caactc	ccttagcc	gaattacagc	4080
aggtgagttc	atcatcgtcg	atgtcgccat	ggccgtcgca	tcgcaccgct	gcggcctccg	4140
ccatgccgtc	gacgtcgttg	tagccgccgc	cgctctgacg	tcgctgccac	acctgccacc	4200
gtgccgccgt	gcccttcgcg	tgcactcccc	gcgctcccgg	cccgcgctcc	cgcgcgcacg	4260
tacgctatct	gcgcaactag	gtccagtgtc	tcgacgcggt	ccactcccac	ggccccgacg	4320
cgtctgggtc	gcaccataa	cacgcaccgg	tcgcgcccgg	ctcgccaccg	cgtcttattg	4380
ccctgcactg	ccgtgccgtc	aaccgtagcg	cagcgctctc	acggctcgctg	cgccgagccg	4440
ccgcgccctc	tgcgacacca	cgcaggtcct	ccgcgacctc	ctcgtctccg	cgaccgccac	4500
tgctcgccgc	gcgcacggca	tcacgccaca	ccgccgtgga	ctcgccgcgc	gttgccgacg	4560
ccacgcgctc	gccgcacgcc	cggcatcacg	ccacaccgcc	gtggactcgc	cgcgcgttgc	4620
cgagatcttc	atgtccgccg	cgcgccacgg	ccgcccccg	aacctgtggc	tctgatacca	4680
aatgttggtg	ccgccagtcc	ctcgccgccg	gagctctctc	tctctctctc	cctcgcacaa	4740
acatagaaga	aagaaggaag	aggagcgatg	cagtggacac	aacaagcttt	acgcggtgca	4800
cgtacgctgc	cggccgcacg	aacagccgat	cgttttcatt	cctgagctcg	aactcagcca	4860
ccggacaaca	acgagtacac	agagggcctt	ctatacccaa	gctacacaca	tcaggctagc	4920
taccacacgc	aagcacgcat	gcatccactg	cagcgaaagc	taactacatg	cacgcatgca	4980
gccacgacc	cggctgcatg	acgcccgcgc	ctgccgagtc	cacgatccgc	acggcgtgac	5040
caactaactg	catgcaacta	gacggagcgc	ccacgcaacg	cccgccccgc	gctcctcagc	5100
tcccgcgcc	gccgcgcacg	cacgccaacg	ggatacgact	ggttccagcg	cctggcgcg	5160
tcacacctcg	cggtccgctc	taaccaacac	acacacacat	gacccccg	cgccccgcc	5220
gcgcccgaca	cgcccggcgc	aatcgcggtg	gcttatgccc	aacaactagt	gtgcacctcg	5280
ttgagagtgc	ggcaccgac	tgcacagtgc	acatgcatgc	agctggctct	ttctcttgac	5340
ttgacacgct	ctcgcttctc	ccgattcctg	cccgcgccc	cgtctccacc	cgacttgatc	5400
gacatcggca	tcggcatcgg	cctcggcatc	ggccccctga	cgacgctcag	tatataagcg	5460
atcgggctgg	tggagctgct	tgcaagtacc	gcagtggaca	cacgcttagc	tttagctacg	5520
taggcgcagc	agccggaac	tagctagcag	gtcgagaagg	ccggccggag	gtagggagat	5580
ggcagggcac	cacagcccct	cggcggcctc	ggcactgcgt	gaaaaagaca	cgctggtgag	5640
gtgtctcgtg	ggatcaggtc	ccggcggcgg	cgctcatgcc	gggaccttcg	gcgctgtgcg	5700
ggacttcctc	atccagttcc	gcgaccaagg	aatcccctgg	gtccgcatct	acgagtcaac	5760
cccggcttgg	cagcagcaat	gtgagtaatc	taatctccac	tgttgattga	tctgcataat	5820
gctactcatt	ctcactatcg	cctggccggc	ctcgtgatca	acatgaatgc	gcgcgtatgt	5880
tatgcagccg	gcgggctgct	gatccaggat	tgggacggag	acgcccggc	ggagggagcc	5940

aaggtgttct	tcacgctcat	caccacaagg	aggggcggcg	ccattaacag	gagggcactg	6000
ggaggcggga	cgtggacaag	caaggccgcg	cccagggtag	gggacgaggt	cgccgtcagc	6060
acactgtact	tcaaacgggg	cgggtccagc	ggcagattat	tcaccgcctt	ggagatccat	6120
ctcagaaacg	aggtatgctg	tgcttgctcc	atccatcgca	ttttttttgt	tttgttttaa	6180
atttgcttat	gcgactatat	attatcatgg	ttgttgccca	cgttgttcaa	agatttgcg	6240
ccctgcttga	aactgctggt	atatatgaac	ccttttctta	agcttcggtg	taggactacg	6300
gctccgttcg	ttttttctcc	ttctctcgcc	aaaacaaatt	ccatctcacc	gatctcttct	6360
ccgtcggcga	cgaaccctag	ctcggatcag	tccgcttccc	ttcaaaaaaa	agaaaaataa	6420
aatccatct	cactgaagtt	gcatttcaac	attgctgttc	cgtaacatcta	aacttacata	6480
tgacgacatg	atcaacagta	gattagtcct	ttttattata	tataggatga	tccaattcg	6540
tttgttctct	agctagagca	atataaact	ataggatcag	tacttttttag	gggcacacca	6600
ccataagggt	agtcctaagt	tgaccttctt	ctgctgcctt	taaacctcgt	cgatcatagcc	6660
cagctagtaa	accctcgccc	tcgggtctggt	tcttacgagc	ccaagcagcc	cgttccgttt	6720
cctcacgagc	ccaagcccag	cttgtaaacc	cttccgtccc	ccgcctcgtc	tcgtccagtc	6780
cagaccctc	ttctcttcta	gtcaacggtc	gccggcggcg	gcgggcgcaa	gtcatccaag	6840
acagagagcg	ctcagccgca	gccccgaacc	ctagaaatca	agcgaacgcg	gcgggcaggt	6900
tccggttggg	gagatgcact	tcttttttca	gcaagtcagt	gaaaattata	tgttgatctt	6960
tcgtgtttgt	ttctgttttt	ctagccccaa	gttgctatct	gcctgctgca	tccgactaac	7020
tatctgtata	gcattcggga	tttgaggctc	tacatcgacc	aggtaaatat	tttctatttc	7080
cagttttggt	tttccccgt	gggcgctact	ttcaatgttc	ggtctacaag	ccaattagct	7140
actgtagatt	gattcagttg	ctgaacgata	aaacaagacc	gattccacta	tgcatgtttt	7200
gctacaaatg	aatgagccca	acaacattac	tatgaggtta	ctctcctctt	tcagggatgg	7260
ttcccgggag	gaactcaagc	aaacctgggc	gcgaggaat	atcaagggtat	tcataagtca	7320
tgattgatcc	ccaatgcctt	cgacagttta	actgaaacag	gcaccatctg	tacttttgtt	7380
gaaacatagt	gatctttgat	ctgggtacat	agatagccct	gatttcatat	atctacgtcc	7440
ttacattagt	catggaaata	tgaaaacgag	gtagattgat	ctgttatttt	atcctattac	7500
ttagcatttt	tgtacttgta	catcttattt	cggcagataa	atttaaaacc	ccacagctga	7560
tatatatatt	atcctcaatt	tatacactat	ttgatgaatt	gataaggtaa	gaactcataa	7620
gtcgagaact	ctagatatat	accagggacg	tctactatca	gaacacatga	ttgaacataa	7680
atcaatcact	gcagaatgat	atgtgaacta	agcgtttatc	agtcataaga	tagacatatt	7740
gttgttttcc	aatatatatt	gtggaattta	atctgggcta	tatgtaatag	ctccaattct	7800
ctgcgctgtg	gcatatataa	tcgcattggt	cttacactgg	cagaagtttt	acatgctacc	7860



ttgcttgacag atcctgatgt tcctggattc gtgagtggtt cacgtgctga ttacaccact	7920
attctgtttt ctagcagtga ggtaattaag ctttccatgc acaaactaga acaagttacc	7980
accaaattta gatttcttgt acaacccta tgcttatcta aatgtgacaa ctcaagttct	8040
attatctcta gtaagaagac atagaagatg ttttattaag tcaatttctg ttcttacgta	8100
ctccctctgt cccacaatgt aacacgttta acgtcttgca ttgtgggacg gagggagaga	8160
acttgtcatt tgcttactgg tattggagtt agactggat acttaattgg gaaatcattt	8220
tgaaaactaa ggcacgagt ctttctactgt tctgggtgta ctgaggtaaa caacatgcac	8280
ttcggatgag atgggagaat taggctatta gcactcagga ttagcctaca gataggtttt	8340
atgcacagca caacctatat atgagatatt ttacataccg tatgatacct gtaaaccattg	8400
ataagtggta tatctcaaca ccatgcataa ttaattgcaa tactacagaa tgtactagac	8460
aattctggac cctccgattt ggatctggcg gccgatatag tccttctccc atgttgtttt	8520
tgttatatag aacacttggt tggagtgaat ttagcgtaca ttatctggaa cttcagtttt	8580
tgtctgttga taattggctt acagctgcat ttcagaacat aacaatgtga gtttgaacag	8640
actatttacg accagcaatc gattcattcc tccggggctg ctctgccacc tcatgatgca	8700
tctctggatg ctatttctca ccacctgttt tcagaaaaca actcaacgcc agaggtaacta	8760
tacaattaca ttcacctcg gtcttggtgc atcaccacat tttattttat ttttcagttg	8820
atctacgatt tccgtgtttt agttgccaca tatattgcaa gtaaactgat cttatatttc	8880
cttttgcttg cagtttggtg gacagtattc tcatgctgat gaaatatcaa tccttaatga	8940
atactacaat accttgatgg ggaccaactc caactcagga ttgcatggta cgcttctttg	9000
ctgttgaaat aagtggtaac gtaggaccaa caacattgct ttttcaaat ttcaagtagt	9060
ttggacctga atacaagtaa gaaaaagatg atccttcagt gttctgttct ctttggttaa	9120
aatgacaagt aatttgcacc tttctcctgt tttggaatat tattgttaca cacttgaatc	9180
catagggttt tatagcaact ttggaggatt ttattccgtt ggattgctca tggataccct	9240
tgatcaaagt aatgaccatc ataatttcta tgaattgtat tttcctacac cccttttccc	9300
gtaggattct acacaccaa gaattttgcc gttgttgca agtgggtgtc acctgcacgt	9360
gctaccttca atgtttgttc cagaagcaa ttaactacat tgattcgtat gagcacacag	9420
tactaagcct actaataggt ttttccacag cactaccatt gttaatatat atgtacatat	9480
gagatattgt gcatactgtt ataaggttac tgtaaataac gattagtgat atgtccttgc	9540
aaaacaagaa gagaagtttg tagggccgtg ttttagtccc acacatatgt tgaaatcgag	9600
ctgaccttat gttcccgttt ttttttgacg ctttatccgc agcattctca agttgatgat	9660
acgtcatccc cggactacga ctacaatcct ttcggagagt tttgagattg agagatgaca	9720
tatgagcagt gctgtctgta catattattt cttgtacagt ttctaattat gaactcttga	9780

ataatcttgt cccggtggac aatgctgtat tttatgagtc ttggtaggaa tgtatatggt 9840  
 tggataaaa tcggtgaagg gtgcatgtag tgtatgacat cgctttgacg gaggaggtgc 9900  
 tgattgtacg ggactgaact gaaggcaaga cagcagcaag caagcactga caacgtgtgg 9960  
 attgaatata gctcagacgg ctgagagccg gaggtcatca ggcacgatgc tcaacgccgg 10020  
 aggtcaattg taatTTTTat gtaatataat ttgccctagt gttgcaatat gtacaaatat 10080  
 tttagtattt tagcctgtga ttcctcggtc catattaatg ttattgtgtg aataaatggt 10140  
 tatcaaacc tcctgtgat ttatctgccc atgttttagg attttatttt gtaatcactt 10200  
 attgacttag caagaagat gtaagtttat tcggtataag ttaataaaaa gtgaaacagt 10260  
 taaggcgggt tttcaaggaa tgatatactt agtaaaagaa tggaagggtg gacaaagcat 10320  
 tgcgcctggc agaaaaagga acgatttgtt ttttgaacta gtatagagat ttcacttgag 10380  
 ctgagggcca ttacacacca actgtatatg tttcagctct gcaacagcat cgtcgtgatg 10440  
 gtcgtcattt gatctctac ctcgaccgag tagctcatca accgagttat tttgcagtac 10500  
 atcaaaaaa tatgggtcgt ccattcccat catctgatag tctagatcca tccatactac 10560  
 cgtattttag tagcacatgg acacggagat cgggcgcgcc 10600

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic PCR Primer

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> WMS-RP1

<400> 8  
 aggtttgctt gagttcctcc cg 22

<210> 9  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic PCR Primer

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> WMS-RP2

<400> 9  
 ccttgtggtg atgagcgtga ag 22

<210> 10

<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP1

<400> 10  
cgggaggaac tcaagcaaac ct

22

<210> 11  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP2

<400> 11  
gagtggttca cgtgctgatt ac

22

<210> 12  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP3

<400> 12  
cagtacccgc agtggacac

19

<210> 13  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-RP3

<400> 13

taaatcacag gcaggatttg ataaac

26

<210> 14  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP4

<400> 14  
ccgtcagcac actgtacttc a

21

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP4

<400> 15  
cgatgtagag cctcaaattcc

20

<210> 16  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-RP5

<400> 16  
cacatgtttg cgctcgaaat g

21

<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>

<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP5  
  
<400> 17  
aagaaacgag ccgtccagta 20

<210> 18  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP6  
  
<400> 18  
cgcagtgac acacgcttag ctt 23

<210> 19  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-RP6  
  
<400> 19  
tgagttggag ttggtcccca tc 22

<210> 20  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP7  
  
<400> 20  
tctcagaaac gagccccaag t 21

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>

<223> Synthetic PCR Primer

<220>

<221> misc\_feature

<223> WMS-RP7

<400> 21

gaaccatccc tggtcgatgt

20

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic PCR Primer

<220>

<221> misc\_feature

<223> WMS-FP8

<400> 22

ggctctgata ccaaagtgtg ttg

23

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic PCR Primer

<220>

<221> misc\_feature

<223> WMS-FP8

<400> 23

atggtggtgt gccctaaaa ag

22

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic PCR Primer

<220>

<221> misc\_feature

<223> WMS-FP9

<400> 24

gcttgaaact gctggtatat atg

23

<210> 25

<211> 22

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-RP9

<400> 25  
gtaatcagca cgtgaaccac tc 22

<210> 26  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP10

<400> 26  
tgttcctgga ttcgtgagtg g 21

<210> 27  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-RP10

<400> 27  
cgatctccgt gtccatgtgc tac 23

<210> 28  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-FP11

<400> 28  
gcggccgcgg gtgaggcttt gccaaagg 27

<210> 29  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-RP11

<400> 29  
ggcgcgcccg atctccgtgt ccatgtgcta c

31

<210> 30  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> WMS-RP12

<400> 30  
cgtagatgcg gaccagggg at

22

<210> 31  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> BAR-FP1

<400> 31  
aagcacggtc aacttccgta

20

<210> 32  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature



<223> BAR-RP1

<400> 32  
gaagtccagc tgccagaaac 20

<210> 33  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Actin-FP1

<400> 33  
tcagccatac tgtgccaatc 20

<210> 34  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Actin-FP1

<400> 34  
cttcatgctg cttggtgc 18

<210> 35  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Actin-FP2

<400> 35  
gccatgtacg tcgcaattca 20

<210> 36  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic PCR Primer

<220>

<221> misc\_feature

<223> Actin-RP2

<400> 36

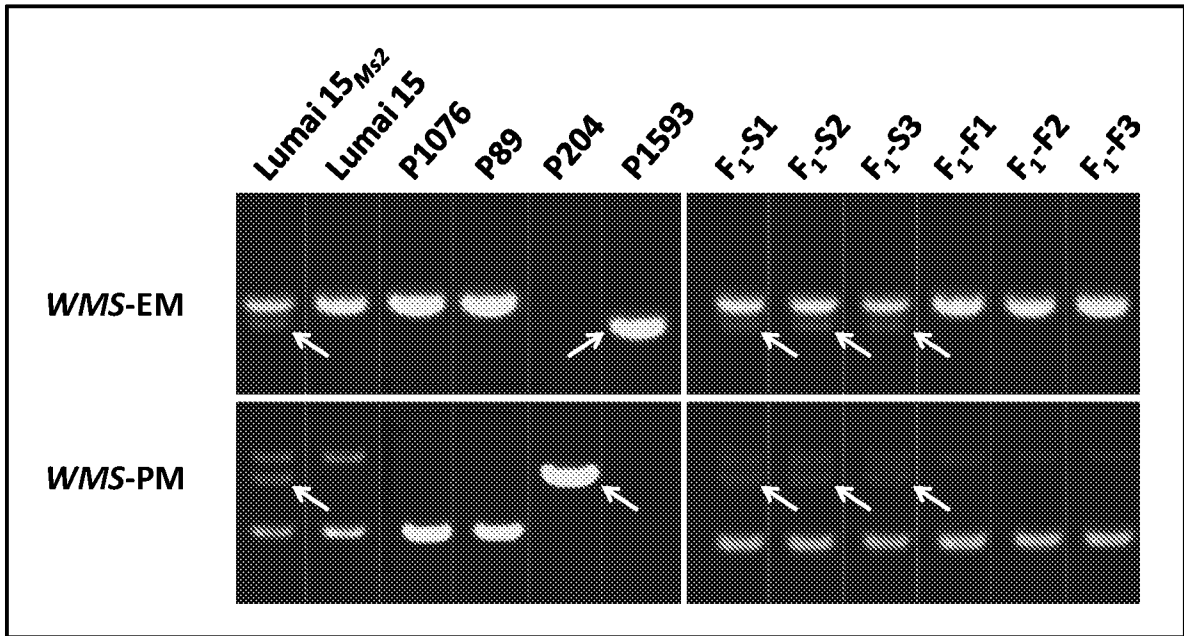
agtcgagaac gataccagta gtacga

26

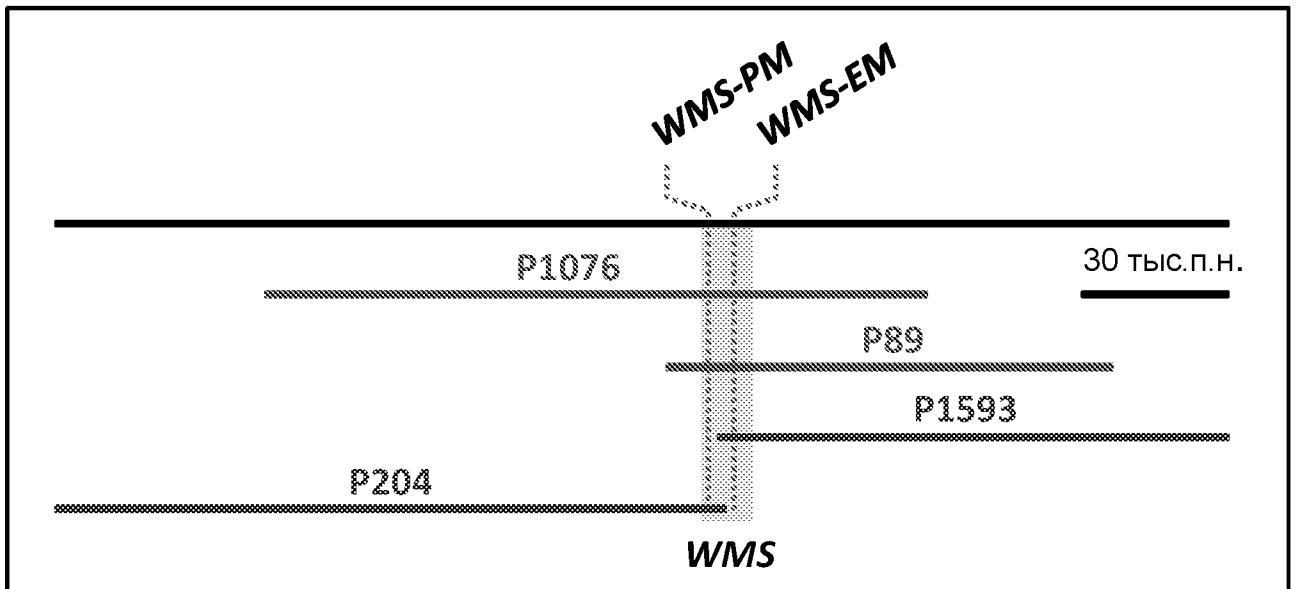
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная ДНК согласно любому из (a)-(e):
  - a). кДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1;
  - b). ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;
  - c). ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;
  - d). ДНК, кодирующая белок, который (i) функционально эквивалентен белку, содержащему аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и (ii) содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, в которой заменены, удалены, добавлены и/или вставлены одна или более аминокислот; и
  - e). ДНК, которая (i) кодирует белок, который функционально эквивалентен белку, содержащему аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и (ii) гибридизуется в жестких условиях с ДНК, содержащей нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1 и 6.
2. ДНК, кодирующая антисмысловую РНК, комплементарную продукту транскрипции ДНК, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 1 и 6.
3. ДНК, кодирующая РНК с рибозимной активностью, которая специфично расщепляет продукт транскрипции ДНК, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 1 и 6.
4. ДНК, кодирующая РНК, которая снижает экспрессию ДНК, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 1 и 6, за счет 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 по п. 1; или ДНК, кодирующая белок, который обладает признаком, являющимся доминантно-отрицательным для эндогенного белка в клетках растений, кодируемого ДНК по п. 1.
6. Вектор, содержащий ДНК по любому из п. 1-5.
7. Трансформированная растительная клетка, в которую введена ДНК по любому из пп. 1-5 или вектор по п. 6.
8. Трансформированное растение, содержащее указанные трансформированные растительные клетки по п. 7.

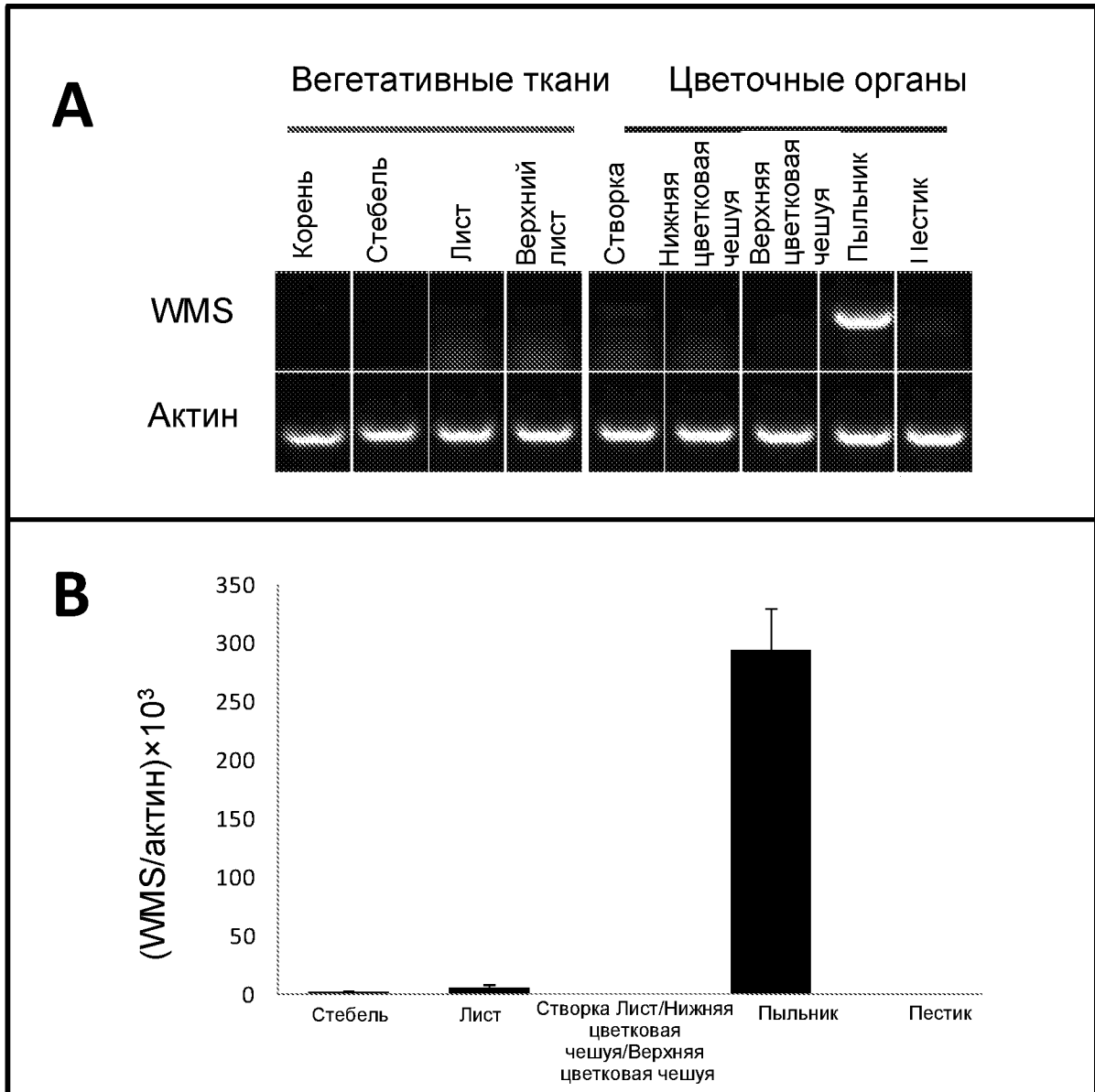
9. Трансформированный клон растения или потомство трансформированных растений по п. 8, при условии, что указанный клон или потомство содержит указанные трансформированные растительные клетки по п. 7.
10. Семя, ткань и орган из трансформированных растений по п. 8 или 9, при условии, что они содержат указанные трансформированные растительные клетки по п. 7.
11. 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.
12. Вектор, содержащий ДНК по п. 11.
13. Трансформированная растительная клетка, содержащая ДНК по п. 11 или 12.
14. Трансформированное растение, содержащее указанные трансформированные растительные клетки по п. 13.
15. Клон трансформированных растений или потомство трансформированных растений по п. 14, при условии, что указанный клон или потомство содержит указанные трансформированные растительные клетки по п. 13.
16. Семя, ткань и орган из трансформированных растений по п. 14 или 15, при условии, что они содержат указанные трансформированные растительные клетки по п. 13.
17. Генетически модифицированная растительная клетка, полученная путем редактирования генома и/или индуцированного мутагенеза в отношении ДНК, содержащих нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1 и 4, при условии, что указанные модификации регулируют мужскую фертильность растения.
18. Генетически модифицированное растение, содержащее указанные генетически модифицированные растительные клетки по п. 17.
19. Клон растений или потомство генетически модифицированных растений по п. 18, при условии, что указанный клон или потомство содержит указанные модифицированные растительные клетки по п. 17.
20. Семя, ткань и орган из указанных генетически модифицированных растений по п. 18 или 19, при условии, что они содержат указанные модифицированные растительные клетки по п. 17.



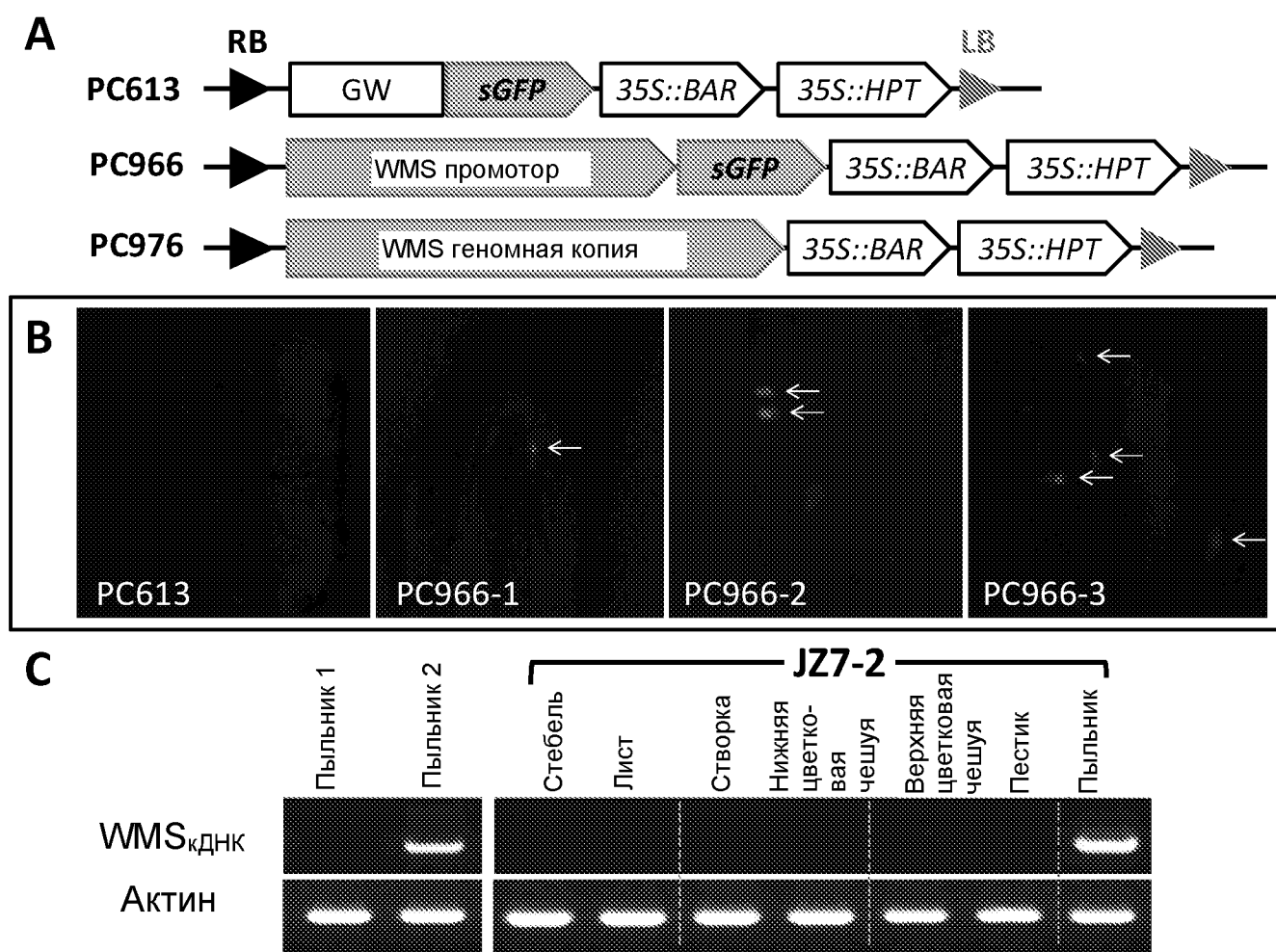
Фиг. 1



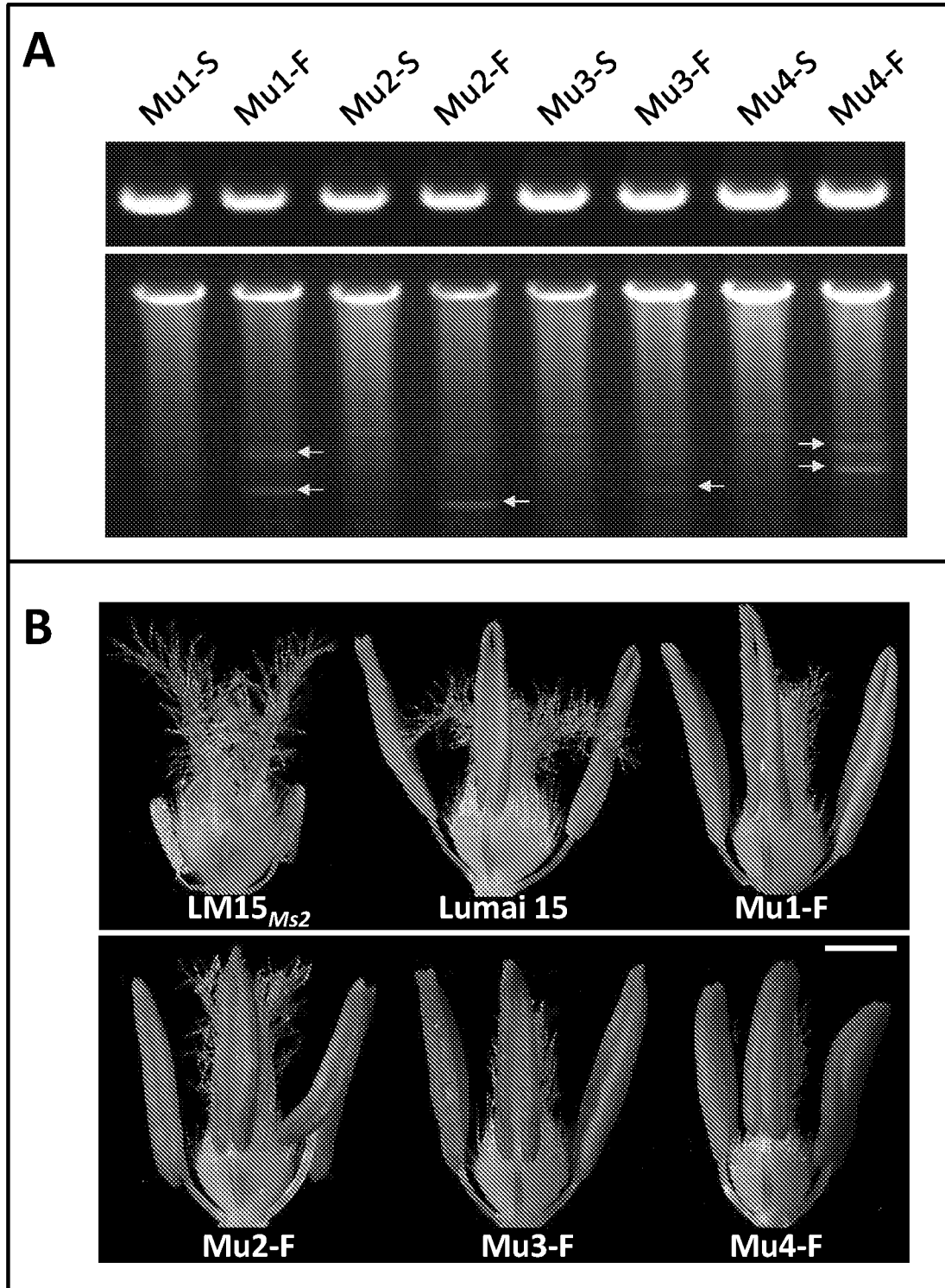
Фиг. 2



Фиг. 3А-В

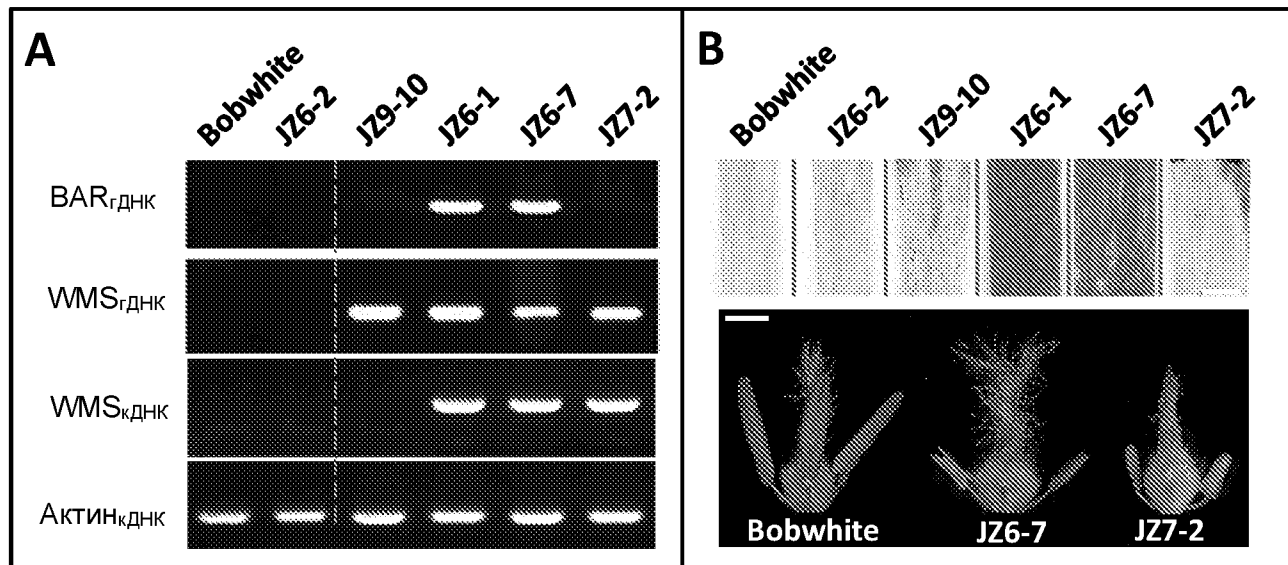


Фиг. 4А-С

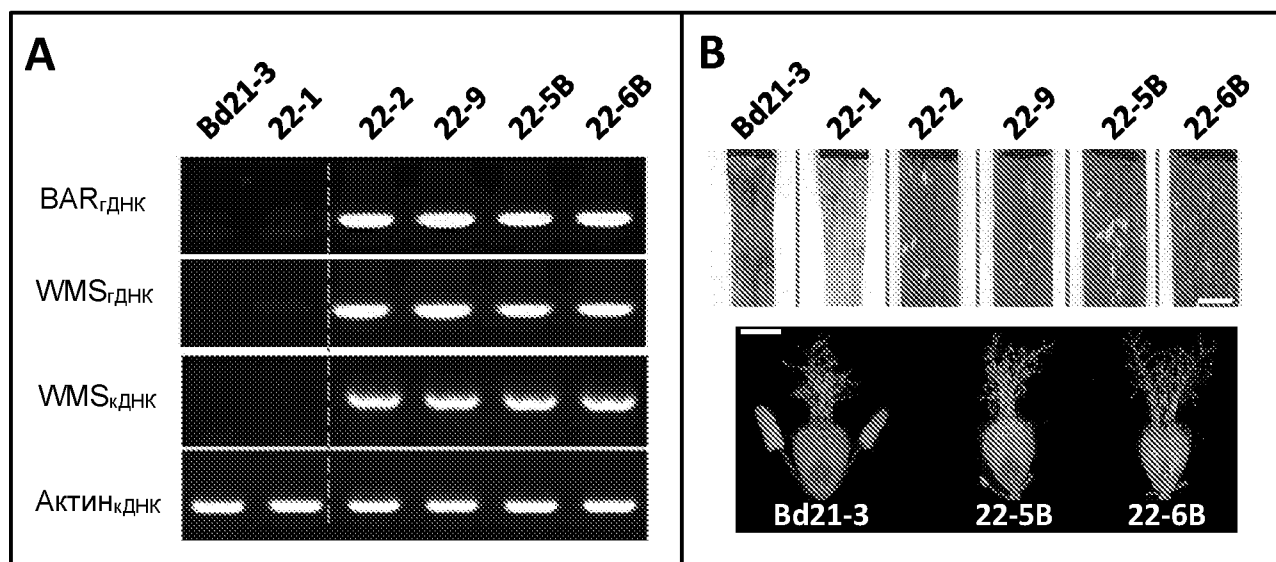


Фиг. 5А-В





Фиг. 6А-В



Фиг. 7А-В