

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201892117 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2019.03.29

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)  
*A01H 1/04* (2006.01)  
*A01H 5/10* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2017.03.29

---

(54) НЕРАЗРУШАЮЩЕЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СЕМЯН

---

(31) 16163397.9

(32) 2016.03.31

(33) EP

(86) PCT/EP2017/057438

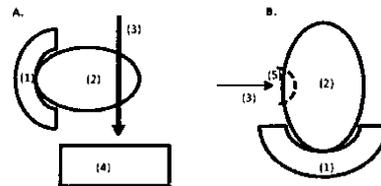
(87) WO 2017/167816 2017.10.05

(71) Заявитель:  
БАСФ СЕ (DE)

(72) Изобретатель:  
Кох Райнхард, Эллингер Филипп,  
Янзен Нина (DE), Рае Штефен, Ван  
Дер Меерен Кристоф (BE), Клаузен  
Мартин (DE)

(74) Представитель:  
Юрчак Л.С. (KZ)

(57) Предложены способы и средства для надежного выделения материнской и/или отцовской ДНК из отдельных семян без существенного влияния на последующее проращивание анализируемых семян. Этот способ особенно подходит для анализа генома семени хлебного злака с небольшими зернами, включая пшеницу. Способы могут включать ферментативные обработки для улучшенного выделения ДНК.



201892117

A1

A1

201892117

## НЕРАЗРУШАЮЩЕЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СЕМЯН

### Область изобретения

[1]. Изобретение относится к области молекулярного анализа генома растения. Предложены способы и средства для надежного выделения материнской и/или отцовской ДНК из отдельных семян без существенного влияния на последующее проращивание анализируемых семян. Этот способ особенно подходит для анализа генома хлебных злаков с небольшими семенами, включая пшеницу. Эти способы могут использоваться при различных обстоятельствах, в том числе в селекционной работе.

### Предпосылка

[2]. Исследования и разработки в семенной отрасли все чаще используют геномный анализ для выявления и наблюдения за растениями с улучшенными и/или желательными характеристиками. Такие характеристики могут быть получены с помощью традиционных способов размножения, мутагенеза, трансформации и т.д. Традиционно геномный анализ во время этих процессов выполняется на растительных культурах или растениях, которые выросли до достаточно развитого состояния, чтобы обеспечить забор ткани без ущерба для растений. После идентификации желательных растений им дают возможность расти дальше и производить семена, в то время как нежелательные растения отбрасываются. Такой процесс является довольно неэффективным с точки зрения использования ценного пространства в теплицах или других объектах для выращивания.

[3]. ДНК также может быть выделена из отдельных семян, но более ранние процедуры выделения приводили к разрушению семян. Поэтому были разработаны способы, включающие забор части семени, без ущерба для способности зародыша прорасти и превратиться в растение. Анализ ДНК выполняется на части образца или кусочке семени. Кусочки семени были отделены, например, автоматическим режущим устройством или лазерным лучом. Такие способы описаны в

WO 2011/082316, WO 2011/119763, WO 2011/163326, WO 2012/122156, WO 2014/071271.

[4]. В патентах США US8,959,833 и US7,703,238 описывается высокопроизводительный неразрушающий способ для анализа отдельных семян в популяции семян, причем, способ включает забор образца ткани из каждого одного или нескольких отдельных семян в популяции с использованием автоматизированного пробоотборника при сохранении жизнеспособности прорастания одного или более семян, взятых в выборку, и анализ одного или нескольких образцов ткани на наличие или отсутствие одной или нескольких характеристик, указывающих, по меньшей мере, на одну генетическую или химическую характеристику.

[5]. В публикации WO 2004/056984, озаглавленной «Ферментативный способ выделения ДНК из растительной ткани», описаны способы выделения ДНК из растительной ткани, в которых используется смесь ферментов, разрушающих клеточные стенки. Изобретение также относится к аналитическим наборам для выделения ДНК из растительной ткани, где набор содержит смесь ферментов, разрушающих клеточные стенки. В описании предлагается применять способы для семян.

[6]. Manen и др., 2005 (VMS Plant biology, 2005, 5.23) описывают полностью автоматизированный ферментативный способ экстракции ДНК из растительных тканей.

[7]. Zheng и др. (BioTechniques, 58: 234-243, 2015) раскрыли способы неразрушающей высокоэффективной экстракции ДНК и генотипирования семян хлопчатника путем отбора небольших количеств семядольной ткани непроросших семян, иммобилизованных в модифицированных 96-луночных пластинках. Иммобилизация семян в лунках включала применение водорастворимого клея. Выделенные количества образца обрабатывали в формате пластинки с использованием процесса экстракции ДНК с помощью гидроксида. Аликвоты разбавляли до генотипирования на основе ПЦР

(полимеразной цепной реакции) для ПЕН (полиморфизмов единичного нуклеотида) (анализы KASP (конкурентная аллель-специфическая ПЦР)) и ППП (простые повторяющиеся последовательности).

[8]. WO 2014/195199, озаглавленный «Неразрушающее выделение ДНК из семян кукурузы», относится к системам и способу выделения ДНК из биологических материалов, таких как семена, при сохранении жизнеспособного семени для дальнейшего использования. Семена, из которых выделена ДНК, остаются жизнеспособными и используются или отбрасываются на основе анализа ДНК из раствора, полученного после вымачивания семян. Раствор, полученный после вымачивания семян, может иметь по существу все смешанные материнские ДНК из семян, выделенные из растворов вымачивания семян, при использовании не повреждающей предварительной обработки семян. Этот способ считается особенно полезным для семян кукурузы. Раскрытые способы имеют общую стадию раскрытия эндосперма семян и вымачивания семян в не разрушающем растворе для высвобождения ДНК. В примерах раствор для высвобождения ДНК представляет собой щелочной раствор, содержащий 20 мМ NaOH.

[9]. Несмотря на наличие нескольких методик генотипирования семян неразрушающим образом, остается потребность в альтернативной и/или улучшенной, более надежной и более здоровой технологии выделения ДНК (включая отцовскую ДНК) из семян, в частности, семян хлебных злаков, таких как семена пшеницы.

[10]. Данное изобретение обеспечивает такие способы, какие описаны в различных вариантах осуществления, примерах и пунктах формулы изобретения.

#### **Краткое описание изобретения**

[11]. В первом варианте осуществления предложен способ выделения нуклеиновых кислот, включая ДНК, из семени хлебного злака с

небольшими зернами и/или анализа популяции семян хлебного злака с небольшими зернами, включающий стадии:

а. раскрытия эндосперма, по меньшей мере, одного отдельного семени указанной популяции путем, при необходимости по меньшей мере, частичного удаления конца семени хлебного злака, противоположного микропилярному концу семени;

б. инкубации семени в водном растворе в течение времени, достаточного для высвобождения нуклеиновых кислот, например от 15 минут до 4 часов или от 30 минут до 2 часов, включая ДНК из семян и образования раствора, содержащего нуклеиновые кислоты, такие как ДНК, при необходимости включающего один или несколько разрушающих углеводов ферментов, таких как фермент, разрушающий клеточную стенку, фермент, гидролизующий сложный эфир, такой как эстераза, кутиназа или липаза, или амилаза, при необходимости один или несколько ферментов, выбираемых из пектиназы, целлюлазы, ксиланазы, амилазы или *Candida antarctica* липазы В;

в. при необходимости концентрирования и/или очистки нуклеиновых кислот, таких как ДНК, от вымачивающего раствора;

г. при необходимости анализа раствора или нуклеиновых кислот, включая ДНК, для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты, представляющей интерес; а также

д. при необходимости выращивания растения из семени.

[12]. Популяция семян может быть рассортирована в субпопуляции семян, где интересующая ДНК может быть обнаружена или не обнаружена, или может быть рассортирована в субпопуляции семян в соответствии с гомозиготным, гемизиготным, гетерозиготным или азиготным появлением представляющей интерес ДНК. ДНК может иметь материнское происхождение и/или отцовское происхождение.

[13]. В альтернативном варианте осуществления микропилярный конец семени может быть покрыт защитным покрытием, таким как гильза на основе силикона или нетоксичная дисперсия на водной

основе, которая может использоваться для фиксации и для защиты, такая как дисперсия алифатического поликарбоната и сложного эфира – поли(простого эфира) полиуретана, включаемая в виде импранила (Impranil®) DNL или водорастворимого клея, например, вспомогательного столярного клея. Незакрытый конец семени можно обрабатывать абразивным материалом, таким как песчаные или стеклянные бусины, до тех пор, пока эндосперм не будет раскрыт, или его можно обработать с помощью наждачной бумаги или напильника до тех пор, пока эндосперм не будет раскрыт или может быть удален механически, например, используя нож или ножницы для ногтей.

[14]. В еще одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ анализа популяции семян хлебного злака с небольшими зернами, включающий стадии:

а. раскрытия эндосперма, по меньшей мере, одного отдельного семени указанной популяции путем частичного удаления конца семени зернового злака, противоположного микропиллярному концу семени;

б. инкубации семени в водном растворе, включающем один или несколько ферментов, выбранных из пектиназы, целлюлозы, ксиланазы, амилазы или *Candida antarctica* липазы В, в течение времени, достаточного для высвобождения и/или диффузии нуклеиновых кислот из семени, и образования раствора, включающего нуклеиновые кислоты;

в. при необходимости концентрирования и/или очистки нуклеиновых кислот от вымачивающего раствора;

г. анализа раствора или нуклеиновых кислот для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты, представляющей интерес; а также

д. при необходимости выращивания растения из семени.

[15]. Также вариантом осуществления изобретения является обеспечение способа выделения материнской ДНК из семян хлебного злака с небольшими зернами, включающего стадии:

а. инкубации семени в водном растворе в течение времени, достаточного для высвобождения и/или диффузии нуклеиновых кислот из семени, в результате чего образуется раствор,

содержащий нуклеиновые кислоты, где указанный раствор содержит один или несколько разлагающих углеводы ферментов, таких как фермент, разрушающий стенку клетки, фермент, гидролизующий сложный эфир, такой как эстераза, кутиназа или липаза, или амилаза, при необходимости один или несколько ферментов, выбираемых из пектиназы, целлюлазы, ксиланазы, амилазы или *Candida antarctica* липазы В;

б. при необходимости концентрирования, амплифицирования и/или очистки нуклеиновых кислот от вымачивающего раствора;

в. при необходимости анализа раствора или нуклеиновых кислот для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

#### **Краткое описание рисунков**

[16]. Фигура 1. Схематическое представление использования потока струи воды для удаления конца семени хлебного злака с небольшими зернами, находящегося против микропилярного конца, или для раскрытия эндосперма. А. Вид сбоку. В. Вид сверху. (1) Средство для фиксации, (2) семя хлебного злака с небольшими зернами, (3) струя воды, (4) емкость для сбора воды, (5) раскрытый эндосперм.

[17]. Фигура 2. Пример предварительно сформированной формы с углублениями, у которых длина больше ширины, для закрепления семян хлебных злаков с небольшими зернами.

[18]. Фигура 3. А. Семя пшеницы, защищенное силиконовой гильзой, с раскрытым концом семени с кистью или бородой. В. Защищенное семя пшеницы в трубке со стеклянными шариками. С. Семя пшеницы после обработки стеклянными шариками. D. Обработанное семя пшеницы, удаленное из гильзы. Е. Семя пшеницы с микропилярным концом, защищенным с помощью импранила. F. Семя пшеницы после защиты с помощью импранила и обработки стеклянными шариками.

[19]. На фигуре 4 нанесены результаты анализа Такмана (Taqman®), проведенного на образцах ДНК, экстрагированных, как описано в Примерах, из семян, собранных из урожая сорта 1, сорта 2 и семян F1 (первое поколение), полученных при скрещивании сорта 1 с сортом 2. Сигналы флуоресценции (•) образцов ДНК, не обработанных ферментами, кластеризуются в овалах, окруженных сплошной линией, тогда как сигналы образцов ДНК, обработанных ферментами, кластеризуются в овалах, окруженных пунктирной линией. Флуоресцентные сигналы образцов ДНК, полученных из материала листьев (положительный контроль), представлены: ■ (сорт 1), \* (сорт 2), ▲ (семена F1).

[20]. На фиг.5 представлены 4 примера графиков результатов анализа Такмана, проведенных на образцах ДНК, экстрагированных, как описано в Примерах, из семян, собранных из семи родительских линий пшеницы и из семян F1 (первое поколение скрещивания), собранных из семян, полученных при скрещивании разных сортов. А. маркер 1; В. маркер 2; С. маркер 3; и D. маркер 4.

#### **Подробное описание нескольких вариантов осуществления изобретения**

[21]. Данное изобретение основано на том наблюдении, что в семенах хлебных злаков конец семени, противоположный микропилярному концу, где находится эмбрион, может быть удален, по меньшей мере, частично, что приводит к раскрытию эндосперма и других слоев ткани, окружающей эндосперм, позволяя нуклеиновым кислотам, таким как ДНК, диффундировать в раствор, в котором семя вымачивают, без ущерба для жизнеспособности и последующей способности семени к прорастанию. Нуклеиновые кислоты, включая ДНК, могут быть проанализированы с использованием способов, общих в данной области, при необходимости после концентрации, амплификации и/или очистки. Таким образом предоставляется способ, позволяющий неразрушающее генотипирование семян.

[22]. В семенах пшеницы конец, противоположный микропилярному концу семени, можно легко распознать, поскольку в этой части семени присутствуют волосатые выступы, которые обычно называют кистью или бородой. Было обнаружено, что манипуляции в этой части для удаления внешних слоев семени (околоплодника, семенного слоя, гиалинового слоя, слоя алейрона) и/или раскрытия эндосперма оказывают незначительное влияние на прорастание семян или вообще не влияют на него. Удобно, что конец семени злака, особенно семени пшеницы, можно поцарапать с помощью напильника, механически удалить, например, с помощью ножа или ножниц для ногтей или обработать абразивным материалом до тех пор, пока наружные слои в этой области не будут удалены и эндосперм не будет раскрыт. По меньшей мере, до одной пятой от конца семени, противоположного микропилярному концу, можно удалить, например, путем обработки напильником или царапанием или обработкой абразивным материалом. Следует, однако, отметить, что в случае частичного удаления внешних слоев семян для раскрытия эндосперма, например, путем создания отверстия через внешние слои в эндосперм, ограничения не столь строгие, как в случае полного удаления. Единственное требование состоит в том, чтобы обработка для раскрытия эндосперма не приводила к повреждению эмбриона. Этого можно достичь, удалив лишь небольшую часть наружных слоев, чтобы раскрыть эндосперм, и это можно сделать предпочтительно вокруг центра, где семя является самым широким, или в половине семени, противоположной микропилярному концу.

[23]. Таким образом, в первом варианте осуществления предлагается способ анализа популяции семян хлебных злаков с небольшими зернами, включающий стадии раскрытия эндосперма, по меньшей мере, одного отдельного семени указанной популяции путем, по меньшей мере, частичного удаления конца семени злака, противоположного микропилярному концу семени, и инкубации семени в водном растворе в течение времени, достаточного для высвобождения нуклеиновых кислот из семени, в результате чего образуется раствор, содержащий нуклеиновые кислоты, с

последующим анализом указанного раствора или указанных нуклеиновых кислот для обнаружения присутствия интересующей нуклеиновой кислоты. При необходимости нуклеиновые кислоты могут быть сконцентрированы, амплифицированы и/или очищены от вымачивающего раствора. Также при необходимости можно вырастить растение из указанного семени.

[24]. Нуклеиновая кислота или ДНК, выделенные из семян, могут быть проанализированы на наличие конкретной трансгенной нуклеиновой кислоты или ДНК, или для обнаружения присутствия конкретного аллеля или маркера в ДНК и, следовательно, в соответствующих семенах. Затем семена можно разделить на субпопуляции семян, в которых обнаружена конкретная ДНК, аллель или маркер, и таких семян, в которых конкретная ДНК, аллель или маркер не обнаружены. Другие способы создания субпопуляций могут быть основаны на обнаружении ДНК, аллеля или маркера в гомозиготном, гемизиготном или гетерозиготном, или азиготном состоянии. Нежелательные субпопуляции могут быть отброшены.

[25]. В растениях околоплодная ткань возникает или происходит от стенки зрелой яйцеклетки, которая является материнской тканью и включает только материнскую ДНК. Другие ткани семени под семенным покровом имеют как отцовское, так и материнское происхождение и включают как отцовскую, так и материнскую ДНК. В то время как определение материнской ДНК имеет важные применения, включая определение материнской линии, характеристику линейных генетических (расхождений) сходств и т. д., также важно уметь определять родословную отцовской линии, особенно в гибридных растениях. Поэтому важно уметь выделять ДНК из тканей семян, таких как семена хлебных злаков с небольшими зернами, которые расположены под покровом семени.

[26]. Авторы изобретения также обнаружили, что извлечение нуклеиновой кислоты или ДНК из семян, у которых конец, противоположный микропилярному концу семени злаков, был частично

удален или у которых эндосперм был раскрыт каким-либо другим способом, может быть улучшено посредством инкубации семян в водном растворе, включающем один или несколько ферментов, разрушающих углеводы, таких как ферменты, разрушающие клеточные стенки, ферменты, гидролизующие сложный эфир, и/или амилазы.

[27]. Используемый здесь термин «фермент, разрушающий клеточную стенку» относится к гидролитическому ферменту, который может катализировать деполимеризацию полимеров, находящихся в стенках клеток растений, включая полисахариды, находящиеся в стенках клеток растений. Стенки клеток растений представляют собой гетерогенные структуры, состоящие из полисахаридов, белков и ароматических полимеров. Состав и структура стенки клетки значительно различаются среди линий растений, но все они содержат микрофибриллы целлюлозы, встроенные в матрицу пектина, гемицеллюлозы, лигнина и структурных белков. Дополнительные полисахариды, содержащиеся в стенках клеток, включают ксилоглюкан, ксилан, глюкуроарабиноксилан.

[28]. Подходящим источником ферментов, разрушающих стенки клетки, являются патогенные и/или сапрофитные грибы. Разрушающие стенки клетки ферменты, произведенные фитопатогенными грибами, сосредоточены на разложении целлюлозы, ксилана и пектина. Ферменты, которые способны гидролитически расщеплять гликозидные связи в олиго- или полисахаридах, как правило, относятся к гликозидгидролазам.

[29]. Разрушающие целлюлозу ферменты катализируют гидролиз целлюлозы с участием двух типов целлюлаз: экзоглюканазы (целлобиогидролазы) или эндоцеллюлазы/эндоглюканазы (эндо- $\beta$ -1,4-глюканазы) с последующим действием  $\beta$ -глюкозидазы, которая гидролизует растворимые целлодекстрин-олигомеры в глюкозу. Строгое разделение целлюлаз на эндо- и экзоцеллюлазы является упрощением, поскольку целлюлазы проявляют перекрывающиеся режимы действия.

[30]. Разрушающие гемицеллюлозу ферменты разрушают гемицеллюлозу, термин, используемый для описания нецеллюлозных полисахаридов клеточной стенки, включающих ксилоглюканы, ксиланы и галактоманнаны. Скелет ксилоглюкана может быть разрушен как специфическими, так и неспецифическими эндо- $\beta$ -1,4-глюканазами, а эндо- $\beta$ -1,4-глюканазы с ксилоглюканазной активностью можно обнаружить у грибов. Эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазы расщепляют гликозидные связи в скелете ксилана. Разрушающие маннан ферменты содержат  $\beta$ -маннаназу (1,4- $\beta$ -D-маннановую манногидролазу) и  $\beta$ -маннозидазу (1,4- $\beta$ -D-маннопиранозидгидролазу). Для полной деполимеризации гемицеллюлозы может дополнительно использовать  $\alpha$ -галактозидазы,  $\alpha$ -арабинозидазы,  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -глюкуронидазы.

[31]. Пектин может быть разрушен полигалактуронидазами или может быть расщеплен негидролитической реакцией, называемой  $\beta$ -отрывом, которая использует пектинлиазы и пектатлиазы.

[32]. Кутиназы представляют собой серинэстеразы, действующие на карбоксильную сложноэфирную связь кутина (сложный полиэфир, состоящий из гидрокси- и гидроксиэпокси-жирных кислот). Липаза В также относится к классу серинэстераз.

[33]. Амилазы представляют собой ферменты (гликозидгидролазы), которые гидролизуют крахмал в сахара, действуя на  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи.  $\alpha$ -Амилазы разрушают длинноцепочечные углеводы, что в конечном итоге приводит к мальтотриозе и мальтозе от амилозы, или мальтозе, глюкозе и декстрину от амилопектина.  $\beta$ -Амилаза катализирует гидролиз второй  $\alpha$ -1,4-гликозидной связи на невозстанавливаемом конце, с расщеплением на две единицы глюкозы (мальтозы) в то же время.  $\gamma$ -Амилаза расщепляет  $\alpha$  (1-6) гликозидные связи, а также последние  $\alpha$  (1-4) гликозидные связи на невозстанавливаемом конце амилозы и амилопектина, что дает глюкозу.

[34]. Особенно подходящие ферменты для способов изобретения включают пектиназу, такую как пектиназа из *Aspergillus niger*; целлюлазу, такую как целлюлаза из *Trichoderma reesei* ATCC 26921; ксиланазу, такую как ксиланаза из *Trichoderma longibrachiatum*; амилазу, такую как амилаза из *Bacillus licheniformis*, и липазу В из *Candida antarctica*, такую как *Candida antarctica* липаза В, рекомбинантно продуцируемая в *Aspergillus oryzae*. Приведенные в качестве примера ферменты являются коммерчески доступными и могут быть приобретены, например, у фирмы Sigma Aldrich.

[35]. В одном варианте осуществления семена обрабатывают смесью пектиназы, целлюлозы, ксиланазы, амилазы и липазы В из *Candida antarctica*.

[36]. Типичные используемые концентрации ферментов варьируются около 20 мг/мл, но могут использоваться другие концентрации, в том числе от 1 до 100 мг/мл.

[37]. В способах согласно изобретению семена, в которых был раскрыт эндосперм, инкубируют в водном растворе в течение времени, достаточного для высвобождения нуклеиновых кислот из семени и образования раствора, содержащего нуклеиновые кислоты. Используемое здесь выражение «в течение времени, достаточного для высвобождения нуклеиновых кислот из семени» относится ко времени, достаточному для того, чтобы нуклеиновые кислоты, такие как ДНК, диффундировали из семени и были обнаружены в растворе. Обычно время составляет от 10 минут до 4 или 5 часов, в частности, от 30 минут до 2 часов. Понятно, что время, необходимое нуклеиновым кислотам, включая ДНК, для высвобождения из семени, может варьироваться от одного вида растений к другому виду растений и может даже варьироваться между разновидностями растений одного и того же вида. Кроме того, время, необходимое или достаточное для извлечения ДНК из семян, а также количество извлеченной ДНК может варьироваться в зависимости от наличия или отсутствия, и/или концентрации ферментов в растворе, в котором

инкубируют семена. Время инкубации в присутствии ферментов может, в зависимости от концентрации ферментов, влиять на последующую способность к прорастанию обработанных семян.

[38]. Водный раствор, используемый для инкубации семян, может представлять собой буферный раствор, такой как буфер, содержащий 10 мМ фосфата натрия, при pH 7,3. Водный раствор может дополнительно содержать детергент, такой как 1% додецилсульфат натрия. Водный раствор может также содержать натриевую соль лимонной кислоты, например, в концентрации 50 мМ. Дополнительные ингредиенты могут быть добавлены для инактивации или ингибирования ДНКаз. Понятно, что другие буферные растворы или другие детергенты или другие дополнительные ингредиенты, такие как, например, лимонная кислота, и их использование хорошо известны специалисту в данной области. В одном варианте осуществления водный раствор представляет собой нейтральный раствор, с pH около 7, такой как между 6,5 и 7,5.

39]. В одном варианте (независимо от того, включает ли способ ферментативную обработку, как описано здесь, или нет), эндосперм семян может быть раскрыт с использованием струи воды, например, для удаления внешних слоев семени(ян), для удаления конца, противоположного микопиллярному концу семян, или для протачивания отверстия в семени. Использование струи воды является полезным, в связи с тем, что частицы или части семян, которые удаляются из семян, смываются струей воды, тем самым снижая риск перекрестного загрязнения между различными семенами. Кроме того, этот способ не предполагает использование твердого инструмента, такого как отсекающее устройство, напильник, сверло, дремель или тому подобные, которые могут переносить перекрестно загрязняющий материал из одного семени в другое. Тепловая и механическая нагрузка, создаваемая струей воды, также довольно мала, так что семена, поверхности семян (а также удаленные части семян) остаются неповрежденными, а способность к прорастанию сохраняется. Кроме того, из-за относительно небольших сил,

которые используются, конструкция удерживающего устройства для удержания семян может быть упрощена.

[40]. Режущие устройства для водоструйной резки (коммерчески) доступны и могут быть приобретены, например, у фирмы Flow International Corporation ([www.flowwaterjet.com](http://www.flowwaterjet.com)) или фирмы KMT Waterjet Systems Inc ([www.kmtwaterjet.com](http://www.kmtwaterjet.com)), но это лишь часть поставщиков. В одном варианте осуществления струя воды может иметь давление около 6000 бар, диаметр струи 0,1 мм и глубину резания 250 мкм.

[41]. Для того чтобы удалить конец, противоположный микопиллярному концу семени, водной струей или иным образом раскрыть эндосперм, может быть выгодно зафиксировать семена в определенной ориентации (схематически представленной на фиг.1). Такая фиксация семян может быть достигнута, например, путем пониженного давления в углублении в удерживающем материале. После окончания обработки струей воды семена затем могут быть высвобождены снятием пониженного давления или с помощью избыточного давления. Могут применяться другие способы ориентирования и удерживания семян во время водоструйной обработки, включая установку семян в предварительно сформированных формах с углублениями, длина которых больше чем ширина, для семян хлебных злаков с небольшими зернами (рис. 2). Даже ожидается, что для того, чтобы сделать отверстие в середине семени хлебных злаков с небольшими зернами, не потребуются предварительная или принудительная ориентация семян.

[42]. Способы согласно изобретению могут быть адаптированы к автоматическому или полуавтоматическому способу для увеличения пропускной способности анализа. С этой целью семена могут быть предварительно закреплены в определенной ориентации, например, используя способ, описанный выше, и обработаны для раскрытия эндосперма, например, используя описанную выше водную струю, затем высвобождены и перенесены на пластинки со многими лунками,

где обработанные семена инкубируют в растворе, высвобождающем ДНК, как описано в этой заявке, при необходимости включающем ферменты, как описано здесь. После этого жидкости, содержащие высвобожденную ДНК, могут автоматически переноситься и анализироваться в соответствии с любым способом, применяемым в данной области, в то время как семена сушат, при необходимости после полоскания, и хранят в ожидании результатов анализа.

[43]. По меньшей мере, частичное удаление конца семени, противоположного микропилярному концу семени, также может быть удобно достигнуто путем нанесения покрытия на микропилярный конец (содержащий эмбрион) до того, как семя подвергают абразивным условиям, таким как обработка абразивными материалами. Абразивные материалы хорошо известны специалистам в данной области и включают кальцит (карбонат кальция), наждак, алмазную пыль, новакулит, пульпит, песок, корунд, гранат, песчаник, триполи, порошкообразный полевой шпат, ставролит, боразон (кубический нитрид меди), керамический оксид алюминия, керамический оксид железа, сухой лед, стеклянный порошок, стальной абразив, карбид кремния (карборунд) оксид циркония с оксидом алюминия, карбид бора, шлаки и другие.

[44]. Покрытие микропилярного конца может быть достигнуто путем вставки микропилярного конца семени в плотно прилегающую силиконовую гильзу. В случае семени пшеницы противоположный конец с бородой или кистью по-прежнему подвергается раскрытию с, по меньшей мере, частичным удалением наружных слоев семени абразивным материалом.

[45]. Покрытие микропилярного конца может быть также достигнуто путем покрытия микропилярного конца семени, такого как семя пшеницы, нетоксичным материалом для покрытия, включая воски, клеи, глазури или лаки. Одним из примеров материала покрытия может быть древесный клей или столярный клей, или желтый клей, предпочтительно водорастворимый нетоксичный древесный клей.

Другой материал покрытия представлен водными полиуретановыми дисперсиями.

[46]. Используемый здесь полиуретан является продуктом присоединения, по меньшей мере, одного полиизоцианатного компонента и, по меньшей мере, одного полиольного компонента. Полиизоцианатный компонент обычно содержит, по меньшей мере, один диизоцианат. Изоцианатный компонент может дополнительно также содержать изоцианаты с более высокой функциональностью, например, триизоцианаты или олигомерные изоцианаты, имеющие в среднем более двух и предпочтительно три или более изоцианатных групп. Полиольный компонент обычно содержит, по меньшей мере, один диол. Полиольный компонент может дополнительно содержать полиолы с более высокой функциональностью или олигомерные полиолы, имеющие в среднем более двух ОН-групп, предпочтительно три, четыре или более ОН-групп. Полиуретан может дополнительно содержать мочевиные группы, образованные при реакции аминов с изоцианатами.

[47]. Водные полиуретановые покрытия представляют собой дисперсии на водной основе, которые обладают превосходными эксплуатационными характеристиками, содержат нелетучие органические соединения, что делает их очень подходящими при нескольких покровных применениях. Водные полиуретановые дисперсии готовят, по меньшей мере, в две стадии: получения преполимера и получения дисперсии. На первой стадии получают преполимер с концевыми изоцианатами путем комбинации химических реагентов, включающих, по меньшей мере, одно изоцианатное реакционноспособное соединение, способное придать некоторую гидрофильность материалу, нейтрализуя реакционноспособную изоцианатную группу нейтрализующим агентом, имеющим подходящий органический противоион, и при необходимости подвергая реакции с концевым агентом цепи, по меньшей мере, часть концевых изоцианатных групп преполимера с концевой изоцианатной группой. На второй стадии водную дисперсию

полиуретана получают путем диспергирования преполимера в воде с получением дисперсии на водной основе и удлинения цепи преполимера с помощью агента, удлиняющего цепь. Молекулярную массу полиуретанового полимера, содержащегося в водной полиуретановой дисперсии, можно регулировать путем добавления, по меньшей мере, одного концевых агента цепи к реакционной смеси и/или путем контроля количества аминов в нейтрализующем агенте по отношению к кислотным функциональным группам в реакционноспособном изоцианатном соединении. Преполимер с концевыми изоцианатами получают из реакционной смеси, содержащей, по меньшей мере, один диизоцианат, по меньшей мере, один дифункциональный полиол, по меньшей мере, одно изоцианатное реакционноспособное соединение, нейтрализующий агент, при необходимости концевой агент цепи, при необходимости катализатор и при необходимости растворитель. Реакция протекает с использованием стехиометрического избытка, по меньшей мере, одного диизоцианата относительно, по меньшей мере, одного бифункционального полиола и, по меньшей мере, одного изоцианатного реакционноспособного соединения с получением олигомера, который может содержать уретановые и мочевиновые функциональные группы.

[48]. Дисперсии после высушивания становятся твердыми, но в то же время позволяют семенам прорасти. Предпочтительно для дисперсии существуют конкретные параметры пленки, имеющие прочность на растяжение 25–150 МПа (мегапаскалей) и 100% модуль 3–30 МПа. Еще более предпочтительными специфическими параметрами пленки являются прочность на растяжение 35–70 МПа и 100% модуль 4–20 МПа. Прочность на растяжение определяется силой, приложенной к образцу, деленной на площадь поперечного сечения образца, прочность на растяжение измеряется в единицах силы, разделенных на единицы площади, обычно Н/см<sup>2</sup>, прочность на растяжение также может быть измерена в фунтах на квадратный дюйм (1Н/см<sup>2</sup> = 1,45 фунт/кв.дюйм). Предельная прочность на растяжение определяется силой, необходимой для растягивания материала, пока

не произойдет разрыв. Сила также может быть измерена в мегапаскалях (МПа). Перевод составляет  $1 \text{ МПа} = 100 \text{ Н/см}^2$ . Модуль является мерой того, насколько хорошо какой-то материал сопротивляется деформации. Модуль 100% соответствует силе, необходимой для растягивания материала в два раза по сравнению с его первоначальным размером.

[49]. В одном предпочтительном варианте осуществления используемая водная полиуретановая дисперсия представляет собой дисперсию импранила DLU. Указанный водный полиуретан представляет собой анионную алифатическую полиэфир-полиуретановую дисперсию. Импранил DLU подходит для изготовления текстильных покрытий, а также для покрытия и отделки различных технических изделий, таких как внешняя одежда, сумки, багаж, верхняя часть кожаных туфель, ремни, обтягивающие штаны, стеклянные ткани и ткани из синтетических волокон.

[50]. В еще одном конкретном варианте осуществления водная полиуретановая дисперсия, используемая для покрытия семени, представляет собой дисперсию импранила XR 2611. Указанный водный полиуретан представляет собой анионную алифатическую полиэфир-полиуретановую дисперсию. Импранил XR 2611 подходит для приготовления текстильных покрытий, а также для покрытия и отделки различных технических изделий, таких как внешняя одежда, сумки, багаж, верхняя часть кожаных туфель и тому подобное. Импранил XR 2611 до сих пор никогда не рассматривался для целей покрытия семян.

[51]. Согласно другому варианту осуществления изобретения водная полиуретановая дисперсия состоит из алифатических изоцианатов и полиолов.

[52]. Хотя это необязательно, полиуретановое покрытие может быть удалено с семени либо после обработки абразивным материалом, либо после времени, необходимого для того, чтобы нуклеиновая кислота растворилась из обработанного семенного материала с, по

меньшей мере, частично раскрытым эндоспермом. Удаление может быть проведено механически. Удаление полиуретанового покрытия также может быть проведено путем ферментативной обработки, такой как обработка липазами или кутиназами. Удаление древесного клея может быть достигнуто путем растворения в воде.

[53]. Защитное покрытие должно покрывать, по меньшей мере, микропилярный конец семени, предпочтительно, по меньшей мере, половину семени, особенно предпочтительно около 4/5 семени.

[54]. Было замечено, что, по меньшей мере, материнская ДНК также может быть высвобождена из тканей околоплодника семян хлебных злаков с небольшими зернами, таких как пшеница, без применения абразивной обработки, а только при обработке ферментами, как описано в других разделах данной заявки. Таким образом, в одном альтернативном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ выделения материнской ДНК из семян хлебных злаков с небольшими зернами, включающий стадии:

а. инкубации семени в водном растворе в течение времени, достаточного для высвобождения нуклеиновых кислот из семени, в результате чего образуется раствор, содержащий нуклеиновые кислоты, причем, указанный водный раствор содержит один или несколько ферментов, разлагающих углеводы, таких как фермент, разрушающий клеточные стенки, ферменты, гидролизующие сложные эфиры, такие как кутиназа, эстераза или липаза, или амилаза, при необходимости один или несколько ферментов, выбираемых из пектиназы, целлюлазы, ксиланазы, амилазы или *Candida antarctica* липазы В;

б. при необходимости концентрирования, амплифицирования и/или очистки нуклеиновых кислот от вымачивающего раствора;

в. при необходимости анализа указанного раствора или указанных нуклеиновых кислот для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты, представляющей интерес; а также

г. при необходимости выращивания растения из указанного семени.

[55]. ДНК в растворах согласно изобретению может быть сконцентрирована и/или очищена любым способом, известным специалистам.

[56]. Выделенная ДНК может дополнительно подвергаться любому из обычных способов анализа ДНК, включая ПЦР-анализ, количественные ПЦР-анализы в реальном времени, анализы Такмана, анализы Kasp™, а также другие методы анализа ДНК. Потенциальные применения включают в себя обнаружение полиморфизмов единичного нуклеотида, анализ количества копий, вариации количества копий, а также расширенный анализ всего генома и тому подобное.

[57]. Способы изобретения могут быть выполнены вручную, но также могут быть проведены автоматизировано или полуавтоматизировано.

[58]. Предполагается, что способы согласно изобретению могут быть применены к любым семенам любого растения, будь то двудольные или однодольные. Кроме того, предполагается, что способы согласно изобретению будут особенно пригодны для неразрушающего анализа генома семян однодольных растений, особенно семян хлебных злаков с небольшими зернами, включая пшеницу, рожь, сорго, рис, овес или просо, особенно пшеницу.

[59]. Термин «пшеница», «семена пшеницы» или «растение пшеницы», как здесь используется, означает виды растений рода *Triticum* или растения, полученные в результате скрещивания с растениями рода *Triticum*, особенно виды растений рода *Triticum* или растений, образующихся в результате скрещивания с растениями рода *Triticum*, которые используются в сельском хозяйстве в коммерческих целях и особенно предпочтительно *Triticum aestivum* или *Triticum durum*. Растения, полученные при таком скрещивании, включают растения тритикале.

[60]. Используемое здесь слово «comprissing = содержащий» должно интерпретироваться как указание на наличие указанных признаков,

нечто целого, стадий или компонентов, как указано, но не исключает наличия или добавления одного или нескольких признаков, нечто целого, стадий или компонентов или их групп.

[61]. Следует отметить, что, как используется здесь, слова «a», «an» и «the» включают единичные и множественные ссылки, если контекст явно не указывает иначе, то есть такие слова могут относиться к «одному», «одному или больше» или по «крайней мере, одному». Так, например, ссылка на «a reagent = реагент» включает один или несколько таких различных реагентов, а ссылка на «the method = способ» включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными здесь.

[62]. Все публикации и патенты, цитированные в этом изобретении, включены в качестве ссылки в полном объеме. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или несовместим с этим описанием, описание будет заменять любой такой материал.

[63]. Методы рекомбинантной ДНК или молекулярные анализы при необходимости могут проводиться в соответствии со стандартными протоколами, как описано в Sambrook и др., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY и в Ausubel и др., (1994), *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, Volumes 1 and 2*, USA. Стандартные материалы и методы работы с молекулами растений описаны в R.D.D. Croy, *Plant Molecular Biology Labfax*, (1993), совместно опубликованных BIOS Scientific Publications Ltd (UK) и Blackwell Scientific Publications, UK. Другие ссылки на стандартные методы молекулярной биологии включают Sambrook и Russell, (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY и Brown, (1998), *Molecular*

Biology LabFax, Volumes I and II, Second Edition, Academic Press (UK). Описание стандартных материалов и методов для полимеразных цепных реакций можно найти в Dieffenbach и Dveksler, (1995), PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, и в McPherson и др., (2000), PCR - Basics: From Background to Bench, First Edition, Springer Verlag, Germany.

[64]. Список последовательностей, содержащийся в файле с именем «BCS16-2005\_ST25-W01.txt», который составляет 1 килобайт (размер, измеренный в Microsoft Windows®), содержит 4 последовательности ПОСЛ. ИД №: 1 по ПОСЛ. ИД №: 4, подан при этом в электронном виде и включен здесь в качестве ссылки.

[65]. Во всем описании и примерах делается ссылка на следующие последовательности, представленные в списке последовательностей:

ПОСЛ. ИД № 1: нуклеотидная последовательность Такман праймера 1 последовательность;

ПОСЛ. ИД № 2: нуклеотидная последовательность Такман праймера 2 последовательность;

ПОСЛ. ИД № 3: нуклеотидная последовательность Такман пробы 1 последовательность;

ПОСЛ. ИД № 4: нуклеотидная последовательность Такман пробы 2 последовательность.

## ПРИМЕРЫ

**Пример 1. Сравнение ДНК, выделенной из различных единичных семян пшеницы после абразивной обработки, с ферментативной обработкой или без нее**

[66]. Семена первого сорта пшеницы (Сорт 1), семена второго сорта пшеницы (Сорт 2) и семена F<sub>1</sub>, полученные в результате скрещивания обоих сортов, использовали для выделения ДНК из

отдельных семян неразрушающим образом. Семена были либо подвергнуты только абразивной обработке, либо они были подвергнуты абразивной обработке и обработке ферментами. Был проведен анализ полиморфизма единичного нуклеотида в геномной области, который различается у сорта 1 и 2, для того чтобы определить выделяет ли способ выделения обе как материнскую, так и отцовскую ДНК (в семенах F1).

[67]. Конец семени пшеницы с кистью или бородой удаляли при истирании с помощью напильника (например, пилочки для ногтей). До одной пятой от общего объема семени может быть удалено. Лучше всего, когда после абразивной обработки раскрывается белый крахмал.

[68]. Семя помещали в трубку Эппендорфа с направленной вверх истертой частью. Семя инкубировали в буферном растворе (10 мМ фосфата натрия, 1% ДСН (додецилсульфат натрия) и 50 мМ калиевой соли лимонной кислоты, доведенном до pH 7,3), чтобы высвободить гДНК. Для выделения ДНК с участием ферментов истертые семена обрабатывали вышеуказанным буферным раствором, дополнительно включающим:

- пектиназу из *Aspergillus niger* (# P4716-25KU);
- целлюлазу из *Trichoderma reesei* ATCC26921 # (C2730-50ML);
- ксиланазу из *Trichoderma longibrachiatum* # (X2629-100G);
- амилазу из *Bacillus licheniformis* (# A3403-1MU);
- липазу В *Candida antarctica*, рекомбинантно продуцируемую *Aspergillus oryzae* (# 62288-250MG-F).

[69]. Все ферменты были приобретены у фирмы Sigma Aldrich (порядковые номера приведены в скобках).

[70]. Ферменты, которые были приготовлены в виде порошков, растворяли в 10 мМ фосфатнатриевом буфере, pH 7,0. Каждый фермент растворяли в этом буфере с концентрацией 100 мг фермента

в 1 мл буфера. Ферменты растворяли отдельно. Жидкие ферменты использовались по мере их приготовления.

[71]. Смесь ферментов содержала равные объемы всех пяти ферментных растворов. Например, если требуется 2 мл ферментной смеси то смешивают 400 мкл каждого жидкого фермента и 400 мкл каждого свежеразведенного фермента.

[72]. Семена вымачивали в 200 мкл буфера и 16 мкл смеси ферментов добавляли к семени для образцов семян, обрабатываемых ферментами. Семена инкубировали в ферментной буферной смеси при комнатной температуре и встряхивали в термомиксере со скоростью 1100 об/мин. Время обработки варьировалось: 0,5 ч, 1 ч или 2 ч.

[73]. После инкубации удаляли буфер, в который высвобождалась ДНК. Этот раствор можно хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Семена хранили при  $4^{\circ}\text{C}$  до использования для прорастания.

[74]. Хранимые буферные растворы с ДНК очищали с использованием набора «Charge Switch® gDNA Plant kit» фирмы Life technologies, слегка адаптированного на первой стадии:

- буфер осаждения ChargeSwitch (N5) охлаждали на льду
- реагент А получали, как описано в руководстве
- 200 мкл инкубационной жидкости + 1000 мкл буфера для лизиса (включая реагент А) смешивали
- добавили 2 мкл РНКазы А
- добавили 100 мкл ДСН, как указано в наборе
- раствор инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре
- добавили 400 мкл буфера осаждения ChargeSwitch (N5) и перемешивали
- образцы центрифугировали в течение 5 минут при комнатной температуре
- прозрачный раствор пипетировали в новую реакционную трубку объемом 2 мл.

[75]. Связывание с магнитными шариками, промывку и элюирование ДНК из магнитных шариков выполняли, как описано в руководстве изготовителя. Типичные объемы элюата около 150 мкл высушивали в приборе SpeedVac до тех пор, пока объем не был сконцентрирован до примерно 30 мкл.

[76]. Такман ПЦР анализ проводили в соответствии со стандартными условиями (объем образца 4,4 мкл с концентрацией ДНК от 20 до 45 нг/мкл) с использованием следующих праймеров и зондов, предназначенных для обнаружения полиморфизма единичного нуклеотида [A/C] между ДНК из сорта 1 и ДНК из сорта 2:

- праймер 1: 5'-ТТТССТТСТАССАТАGACGAGAAAGC-3' (ПОСЛ. ИД № 1)
- праймер 2: 5'-СТGGТТСТСТАТGTCАТТАТТТGТAAАТGТAAАТ-3' (ПОСЛ. ИД № 2)
- зонд 1 (детектирует «А-аллель»): 5'-GCAGCACACACACGT-3' (ПОСЛ. ИД № 3), несущий флуорофор VIC
- зонд 2 (детектирует «С-аллель»): 5'-GCAGCACACACCCGT -3' (ПОСЛ. ИД № 4, несущий флуорофор FAM.

[77]. Экспериментальные образцы содержали образцы ДНК из семян каждого сорта и семян поколения F<sub>1</sub>, выделенные с ферментативной обработкой или без нее, положительные контрольные образцы ДНК, выделенные из листьев каждого сорта и листьев поколения F<sub>1</sub>, полученного при скрещивании обоих сортов, с использованием набора для выделения ДНК «ChargeSwitch DNA isolation kit», а также контроля без матрицы.

[78]. На фигуре 4 показаны результаты анализа Такмана. Как свидетельствует детектирование сигналов амплифицирования вокруг наклона 45 градусов для образцов ДНК из семян F<sub>1</sub>, оба способа выделения (с ферментативной обработкой и без нее) приводят к образованию образцов, содержащих отцовскую и материнскую ДНК. Образцы ДНК из ферментативно обработанных семян сгруппированы вместе с положительным контролем, что указывает на лучший

результат амплифицирования и лучшее и/или более концентрированное высвобождение ДНК из семян.

[79]. Обработанные семена затем тестировали на прорастание путем инкубации обработанных семян на слое фильтровальной бумаги (толщиной несколько мм), пропитанной водопроводной водой до насыщения, и инкубирования при комнатной температуре. Испаренную воду замещали, исходя из потери веса. 14 из 15 семян сорта 1, подвергнутых абразивной обработке и ферментной обработке, проросли; 13 из 15 семян сорта 2, подвергнутых абразивной обработке и ферментной обработке, проросли; от 5 до 8 семян (в зависимости от эксперимента) поколения F1 проросли. Однако ожидалось, что семена поколения F1 будут иметь худшее качество.

**Пример 2. Обоснованность способа анализа ДНК, включающего ферментативную обработку для нескольких отдельных семян пшеницы разных родительских линий и их гибридов для разных маркеров**

[80]. Семена из семи линий пшеницы и семена F1, полученные в результате скрещиваний между этими линиями, использовали для выделения ДНК из отдельных семян неразрушающим способом с использованием метода ферментативной обработки, как описано в примере 1. Полиморфизмы единичного нуклеотида в геномной области, которые отличаются между сортами, анализировали, для того чтобы определить извлекает ли метод выделения как материнской, так и отцовской ДНК (в семенах F1).

[81]. 7 различных родительских линий пшеницы и их F1 потомков были проанализированы с использованием 12 различных наборов праймеров и зондов для обнаружения 12 разных ПЕН, которые могут быть распознаны/дискриминированы в родительских линиях.

[82]. Такман ПЦР анализы проводили в соответствии со стандартными условиями, используя 12 различных наборов праймеров

и зондов для обнаружения 12 различных ПЕН, которые могут быть распознаны в родительских линиях.

[83]. На фигуре 5 показаны результаты анализа Такмана для 4 отдельных наборов праймеров и зондов, в качестве примеров. В каждом случае сигналы амплифицирования были обнаружены вокруг наклона 45 градусов для образцов ДНК из семян поколения F1.

Список последовательностей

<110> BASF SE  
 <120> Неразрушающее генотипирование семян  
 <130> 180897W001  
 <160> 4  
 <170> Патент в версии 3.5  
 <210> 1  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Такман праймера 1 последовательность  
 <400> 1  
 tttccttcta ccatagacga gaaagc 26  
 <210> 2  
 <211> 34  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Такман праймера 2 последовательность  
 <400> 2  
 ctggttctct atgtcattat ttgtaaagt aaat 34  
 <210> 3  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Такман зонда 1 последовательность  
 <400> 3  
 gсagсасаса сасgt 15  
 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Такман зонда 2 последовательность  
 <400> 4  
 gсagсасаса сссgt 15

## Формула изобретения

1. Способ выделения нуклеиновых кислот из семени хлебного злака с небольшими зернами и/или анализа популяции семян хлебного злака с небольшими зернами, включающий стадии:

а. раскрытия эндосперма, по меньшей мере, одного отдельного семени указанной популяции путем, по меньшей мере, частичного удаления конца семени хлебного злака противоположного микропилярному концу семени;

б. инкубации семени в водном растворе в течение времени, достаточного для высвобождения нуклеиновых кислот из семени, в результате чего образуется раствор, содержащий нуклеиновые кислоты;

в. при необходимости концентрирования, амплифицирования, и/или очистки нуклеиновых кислот от вымачивающего раствора;

г. при необходимости анализа указанного раствора или указанных нуклеиновых кислот для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты, представляющей интерес; а также

д. при необходимости выращивания растения из указанного семени.

2. Способ по п. 1, в котором указанную популяцию семян сортируют в субпопуляции семян, где указанную представляющую интерес ДНК можно обнаружить или не обнаружить.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором указанную популяцию сортируют в субпопуляции семян в соответствии с гомозиготным, гемизиготным, гетерозиготным или азиготным проявлением указанной ДНК, представляющей интерес.

4. Способ по любому из п.п. 1 - 3, в котором указанная представляющая интерес нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

5. Способ по любому из п.п. 1 - 3, в котором указанная представляющая интерес нуклеиновая кислота представляет собой отцовскую ДНК.

6. Способ по любому из п.п. 1 - 3, в котором указанная представляющая интерес нуклеиновая кислота представляет собой материнскую ДНК.

7. Способ по любому из п.п. 1 - 6, в котором указанный раствор для инкубации семян содержит один или несколько ферментов, вызывающих разрушение углеводов, таких как фермент, разрушающий клеточную стенку, фермент, гидролизующий сложный эфир, такой как эстераза, кутиназа или липаза, или амилаза, при необходимости один или несколько ферментов, выбираемых из пектиназы, целлюлазы, ксиланазы, амилазы или *Candida antarctica* липазы В.

8. Способ по любому из п.п. 1 - 7, в котором указанное время инкубации в растворе составляет от 15 минут до 4 часов.

9. Способ по любому из п.п. 1 - 7, в котором указанное время инкубации в растворе составляет от 30 минут до 2 часов.

10. Способ по любому из п.п. 1 - 9, в котором микропилярный конец семени покрыт защитным слоем.

11. Способ по п. 10, в котором микропилярный конец семени содержится внутри гильзы, такой как гильза на основе силикона.

12. Способ по п. 10, в котором микропилярный конец семени покрыт нетоксичным покровным материалом, включая воски, клеи, лаки или политуры.

13. Способ по п. 10, в котором микропилярный конец семени покрыт древесным клеем или столярным клеем или желтым клеем, предпочтительно водорастворимым нетоксичным древесным клеем.

14. Способ по п. 10, в котором микропилярный конец семени покрыт водным полиуретаном, таким как дисперсия алифатического поликарбоната со сложноэфирным-полипростоэфирным полиуретаном, таким как импранил (Impranil ®).

15. Способ по любому из п.п. 10 - 14, в котором незакрытый конец семени обрабатывают абразивом, таким как песок или стеклянные шарики, до тех пор, пока эндосперм не будет раскрыт.

16. Способ по любому из п.п. 1 - 15, в котором микропилярный конец семени обрабатывают наждачной бумагой или напильником до тех пор, пока эндосперм не будет раскрыт.

17. Способ по любому из п.п. 1 - 15, в котором микропилярный конец семени механически удаляют, например, ножом или ножницами для ногтей.

18. Способ по любому из п.п. 1 - 15, в котором эндосперм раскрывают потоком струи воды.

19. Способ по любому из п.п. 1 - 18, в котором семя хлебного злака представляет собой семя пшеницы, а конец семени, противоположный микропилярному концу семени, - это конец, имеющий кисть или бороду.

20. Способ анализа популяции семян хлебного злака с небольшими зернами, включающий стадии:

а. раскрытия эндосперма, по меньшей мере, одного отдельного семени указанной популяции путем частичного удаления конца семени зернового злака, противоположного микропилярному концу семени;

б. инкубации семени в водном растворе, включающем один или несколько ферментов, выбранных из пектиназы, целлюлозы, ксиланазы, амилазы или *Candida antartica* липазы В, в течение времени, достаточного для высвобождения нуклеиновых кислот

из семени, в результате чего образуется раствор, содержащий нуклеиновые кислоты;

в. при необходимости концентрирования и/или очистки нуклеиновых кислот от вымачивающего раствора;

г. анализа указанного раствора или указанных нуклеиновых кислот для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты, представляющей интерес; а также

д. при необходимости выращивания растения из указанного семени.

21. Способ выделения нуклеиновых кислот из семени хлебного злака с небольшими зернами и/или анализа популяции семян хлебного злака с небольшими зернами, включающий стадии:

а. раскрытия эндосперма, по меньшей мере, одного отдельного семени указанной популяции;

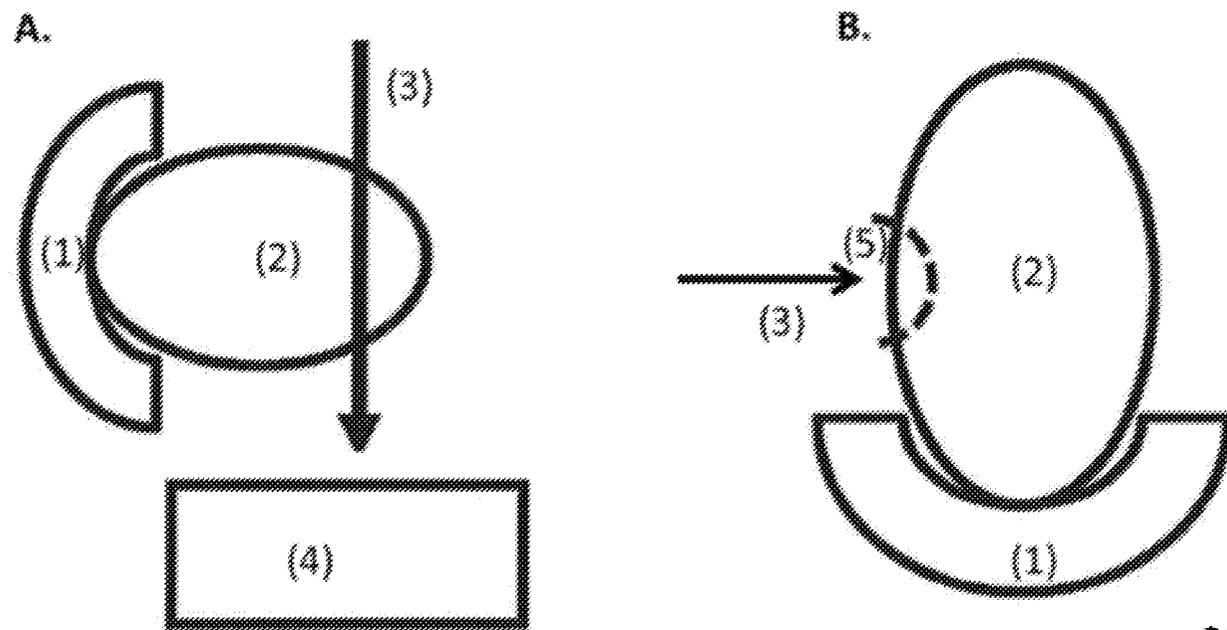
б. инкубации семени в водном растворе в течение времени, достаточного для высвобождения нуклеиновых кислот из семени, в результате чего образуется раствор, содержащий нуклеиновые кислоты, где указанный раствор для инкубации семян содержит один или несколько разлагающих углеводы ферментов, таких как фермент, разрушающий стенку клетки, фермент, гидролизующий сложный эфир, такой как эстераза, кутиназа или липаза, или амилаза, при необходимости один или несколько ферментов, выбираемых из пектиназы, целлюлазы, ксиланазы, амилазы или *Candida antarctica* липазы В;

в. при необходимости концентрирования, амплифицирования и/или очистки нуклеиновых кислот от вымачивающего раствора;

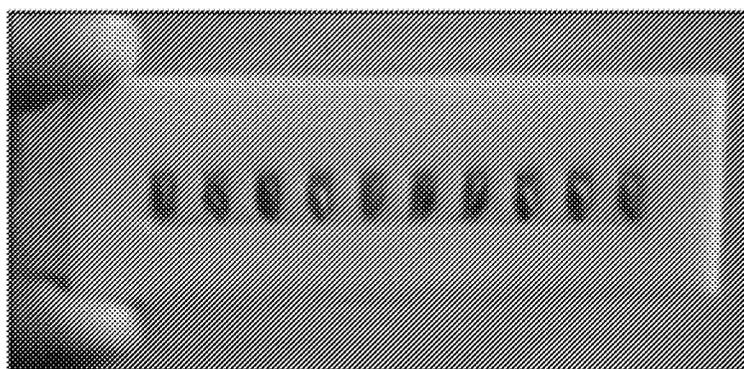
г. при необходимости анализа указанного раствора или указанных нуклеиновых кислот для обнаружения присутствия нуклеиновой кислоты, представляющей интерес; а также

д. при необходимости выращивания растения из указанного семени.

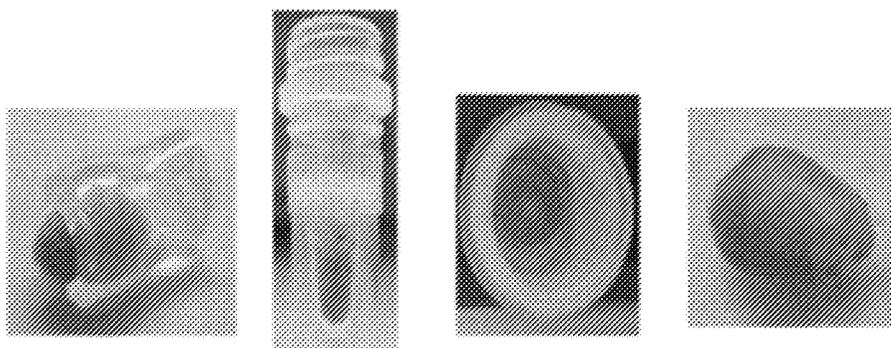
22. Способ по п. 21, в котором раскрытие эндосперма осуществляют потоком струи воды.



Фигура 1



Фигура 2

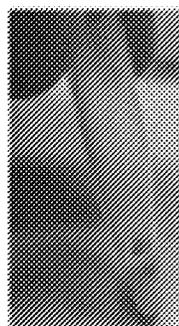


A

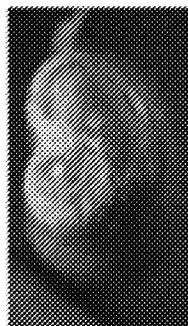
B

C

D

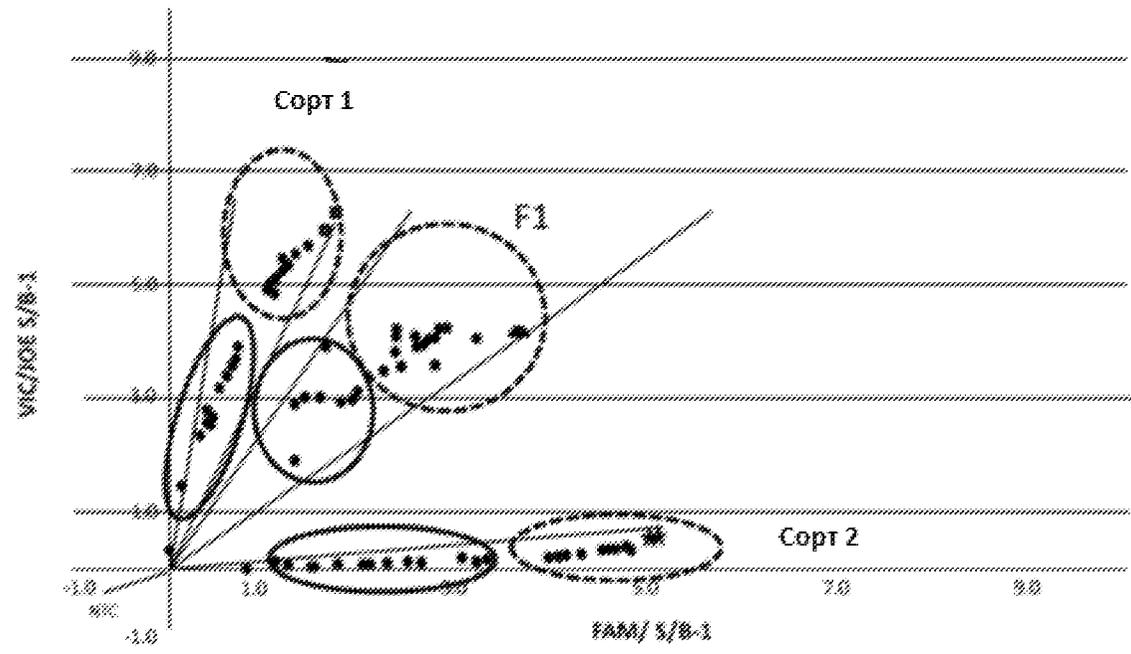


E

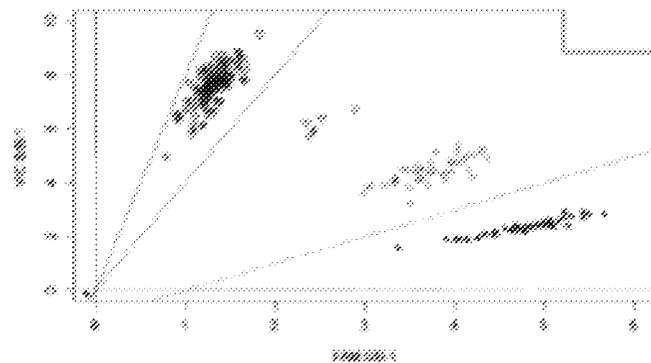


F

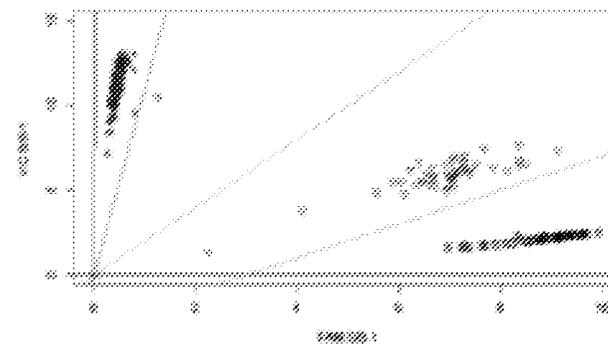
Фигура 3



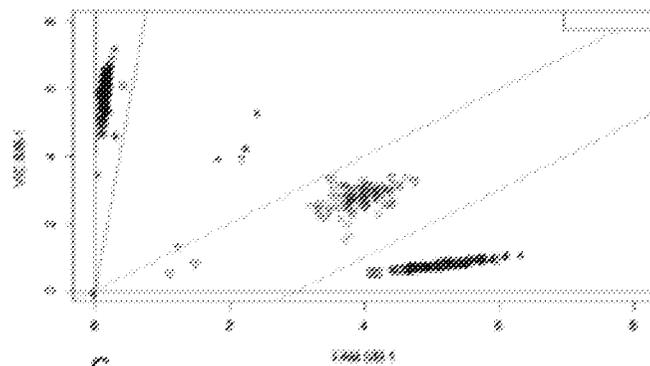
Фигура 4



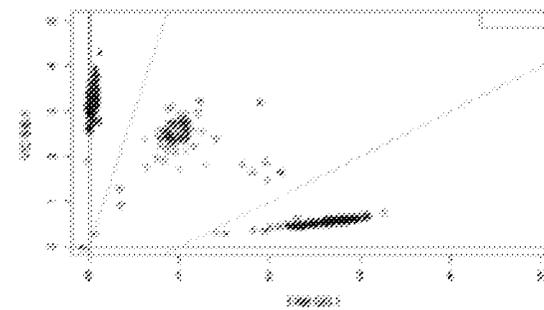
A.



B.



C.



D.

Фигура 5