

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018年11月15日 (15.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/205521 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/109813

(22) 国际申请日: 2017年11月8日 (08.11.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710321452.3 2017年5月9日 (09.05.2017) CN

(71) 申请人: 未名兴旺系统作物设计前沿实验室
(北京) 有限公司 (FRONTIER LABORATORIES
OF SYSTEMS CROP DESIGN CO., LTD.) [CN/CN];
中国北京市昌平区中关村生命科学园医疗产业
园9号楼4层405, Beijing 102206 (CN)。 北京大学

(PEKING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海
淀区颐和园路5号, Beijing 100871 (CN)。

(72) 发明人: 李健 (LI, Jian); 中国北京市昌平区中
关村生命科学园医疗产业园9号楼4层405,
Beijing 102206 (CN)。 王峥 (WANG, Zheng); 中
国北京市昌平区中关村生命科学园医疗产
业园9号楼4层405, Beijing 102206 (CN)。 马力
耕 (MA, Ligeng); 中国北京市昌平区中关村生
命科学园医疗产业园9号楼4层405, Beijing
102206 (CN)。 邓兴旺 (DENG, Xingwang); 中
国北京市昌平区中关村生命科学园医疗产业
园9号楼4层405, Beijing 102206 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

(54) Title: WHEAT FERTILITY-RELATED GENE TAMS7 AND APPLICATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 小麦育性相关基因TaMS7及其应用方法

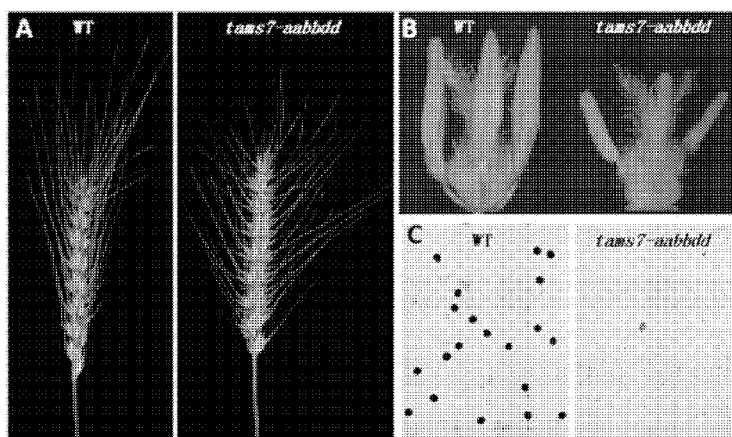


图 4

(57) Abstract: Disclosed are a wheat fertility-related gene TaMS7 and an application method thereof, wherein some fall within the field of biotechnology. By analysing the whole genome expression profile of wheat anthers in different development stages, the wheat fertility-related gene TaMS7 is obtained, and by adjusting the expression of the gene, the fertility of the plant is regulated, so as to produce and maintain the wheat male sterility lines and to prepare hybrid seeds, wherein some has important theoretical and practical significance for establishing efficient wheat hybrid seed production techniques, and for studying the wheat male sterility mechanism and heterosis.

(57) 摘要: 一种小麦育性相关基因TaMS7及其应用方法, 属于生物技术领域。通过对不同发育时期小麦花药的全基因组表达谱分析, 获得了小麦育性相关基因TaMS7, 并且通过调节该基因的表达以调控植物育性, 用以生产并保持小麦雄性不育系以及制备杂交种子, 对于建立高效的小麦杂交种制种技术、研究小麦雄性不育机理和杂种优势具有重要的理论和实践意义。

[见续页]

WO 2018/205521 A1

JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

小麦育性相关基因 *TaMS7* 及其应用方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及小麦的杂交育种方法，包括小麦核不育系繁殖和杂交种子制备，更具体地涉及一个小麦雄性核不育基因及其突变体及其在杂交育种中的应用。

技术背景

小麦是自花授粉作物，其杂种优势利用的核心是建立高效生产小麦杂交种的技术体系。目前小麦生产上杂种优势利用的途径主要有三种：一是三系法，即利用核质互作雄性不育系，通过不育系、保持系和恢复系三系互作配套生产杂交种；二是化杀法，即应用化学杀雄剂诱导小麦雄性不育以进行杂交制种；三是二系法，即利用光温敏不育系随光温的变化进行杂交制种。三系法自上世纪 50 年代开始研究，迄今已经育成的小麦核质互作不育系有 70 多种，研究最多的有 T 型、K 型、Q 型等不育系，其胞质主要来自各种山羊草、提莫菲维小麦、野生燕麦、簇毛麦等。虽然这些不育系大都实现了三系配套，但是由于其自身在遗传上存在一些难以克服的缺陷，比如恢复源较少、异源细胞质的不良影响、强优势组合选出率低、不育系种子纯度低等，都未能在生产上大面积推广应用。上世纪 80 年代，化杀法的研究进入高潮，由于克服了三系法的种种问题，化杀法曾被认为是一种很有希望的杂交制种新技术。但是化学杀雄剂存在稳定性差、易残留、容易产生毒副作用、环境污染重等问题，因此想要大面积应用于生产，关键还需要研制出一种理想的化学杀雄剂。在三系法和化杀法困难重重的情况下，二系法杂交小麦发展迅速并逐渐成为今后小麦杂种优势研究和利用的主要发展趋势。二系法的核心是光温敏不育系，这是一种基因型与环境互作导致的雄性不育类型。由于实现了一系两用（兼具不育系和保持系的功能），简化了不育系的繁殖程序，制种简单且恢复源广，容易获得优势组合，因此具有很高的推广价值。目前我国独创的二系法杂交小麦应用技术体系，整体领先于国际水平，选育的杂交小麦品种抗逆性强，水肥利用率高，增产幅度可达 15%-20%，对粮食生产节本增效作用显著。但是，光温敏不育系的雄性不育高度依赖环境因素，环境的变化严重影响杂种种子的产量、质量和纯度，因此，两系法杂交小麦突破生产尚需时日，关键是要解决环境的影响。

在上述传统的常规育种模式遇到瓶颈的情况下，以现代分子生物学为主导的生物育种技术很可能是突破瓶颈的关键。小麦杂种优势利用的核心是建立高效的生产小麦杂交种的技术体系，而建立高效的小麦杂交种制种技术的关键是要有合适的雄性不育系母本。雄性不育指的是植物在有性繁殖过程中不能产生具有正常功能的花药、花粉或雄配子，对雄性不育机理的揭示，是利用杂种优势提高小麦产量和品质的基础。小麦基因组庞大且复杂，所以对小麦

雄性不育的机理研究迄今为止积累的资料非常有限。因此，将现代分子生物学和细胞生物学手段应用于小麦雄性不育机理研究，对于加强小麦杂种优势研究和利用具有重要的理论和实践意义。

发明内容

本文提到的所有参考文献都通过引用并入本文。

除非有相反指明，本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。除非有相反指明，本文所使用的或提到的技术是本领域普通技术人员公知的标准技术。材料、方法和例子仅作阐述用，而非加以限制。

本发明提供了一个育性相关基因 *TaMS7*，所述育性相关基因的核苷酸序列选自下列组的序列之一：

- (a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；
- (b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；
- (c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或
- (d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性，且具有育性相关功能的 DNA 序列；或
- (e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

本领域技术人员应该知晓，本发明所述的育性相关基因还包括与 *TaMS7* 基因的核苷酸序列或蛋白序列高度同源，并且具有同样的育性调控或恢复功能的同源基因序列。所述高度同源且具有育性调控功能的同源基因包括在严谨条件下能够与具有 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示序列的 DNA 杂交的 DNA 序列。或是其编码的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的蛋白氨基酸序列具有 85% 以上相似性的核苷酸序列。本文中使用的“严谨条件”是公知的，包括诸如在含 400mM NaCl、40mM PIPES (pH6.4) 和 1mM EDTA 的杂交液中于杂交，优选杂交温度是 53°C-60°C，杂交时间为 12-16 小时，然后在 62°C-68°C 下用含 0.5×SSC、和 0.1%SDS 的洗涤液洗涤 15-60 分钟。

上述同源基因还包括与 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示序列的全长有至少 80%、85%、90%、95%、98%、或 99% 序列相似性，且具有育性调控功能的 DNA 序列，可以从任何植物中分离获得。其中，序列相似性的百分比可以通过公知的生物信息学算法来获得，包括 Myers 和 Miller 算法、Needleman-Wunsch 全局比对法、Smith-Waterman 局部比对法、Pearson 和 Lipman 相似性搜索法、Karlin 和 Altschul 的算法。这对于本领域技术人员来说是公知的。

本发明还提供了一种表达盒，所述表达盒含有本发明所公开的育性相关基因的 DNA 序列，

所述育性相关基因的核苷酸序列选自下列组的序列之一：

- (a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；
- (b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；
- (c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或
- (d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性, 且具有育性恢复功能的 DNA 序列；或
- (e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

具体地, 上述表达盒中的育性相关基因还可操作性的连有一个可驱动其表达的启动子, 所述启动子包括但不限于组成型表达启动子、诱导型启动子、组织特异表达启动子、或时空特异表达启动子。更具体地, 所述启动子是一个花药特异表达启动子。优选地, 所述花药特异表达启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示。

本发明上述表达盒, 还进一步的包含一个花粉失活基因, 所述花粉失活基因可以干扰植株中含有该花粉失活基因的雄性配子的功能或形成。所述花粉失活基因包括但不限于 barnase 基因、淀粉酶基因、DAM 甲基化酶等。更具体的, 所述花粉失活基因是玉米 α 淀粉酶基因, 优选其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示。

本发明上述表达盒, 还进一步的包含一个筛选基因, 所述筛选基因可以用于将含有该表达盒的植株、植物组织细胞或载体筛选出来。所述筛选基因包括但不限于抗生素抗性基因、或是抗除草剂基因、或是荧光蛋白基因等。具体地, 所述筛选基因包括但不限于: 氯霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、链霉素抗性基因、奇霉素抗性基因、磺胺类抗性基因、草甘磷抗性基因、草丁膦抗性基因、bar 基因、红色荧光基因 DsRED、mCherry 基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因等。

本发明还公开了一种植物育性调控的方法, 所述方法通过将育性相关基因转入到 *ms7* 雄性不育突变体, 使 *ms7* 雄性不育突变体的雄性育性恢复, 其中所述的育性相关基因的核苷酸序列选自下列组的序列之一：

- (a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；
- (b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；
- (c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或
- (d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性, 且具有育性恢复功能的 DNA 序列；或
- (e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

本发明还提供了一种调控植物育性的方法，通过影响育性基因 *TaMS7* 的表达来调控植物的育性。包括但不限于通过突变 *TaMS7* 基因的方法，获得 *ms7* 雄性不育突变体材料；或是通过基因互补的方法，将 *TaMS7* 基因用于恢复由相应的 *TaMS7* 基因突变所导致的雄性不育，使 *ms7* 雄性不育突变体恢复成可育。在本发明中，所述的突变包括在育性调控基因的核苷酸序列上进行取代、缺失或添加一个或多个核苷酸。获得突变的方法包括但不限于物理诱变、化学诱变或 RNAi、TALEN、CRISPR-Cas9 等基因编辑方法。

本发明还包括一种获得 *ms7* 雄性不育突变体的方法，所述方法通过突变植物内源的育性调控基因 *TaMS7*，或突变与其高度同源的基因的核苷酸序列，使该植物体丧失雄性育性的过程。所述育性调控基因 *TaMS7* 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示。所述育性调控基因 *TaMS7* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示。所述“突变”包括但不限于以下方法，如用物理或化学的方法所导致的基因突变，化学方法包括用 EMS 等诱变剂处理所导致的诱变，所述突变还可以是点突变，也可以是 DNA 缺失或插入突变，也可以通过 RNAi 等基因沉默手段或者通过基因定点突变的方法，所述基因定点突变的方法包括但不限于 ZFN 定点突变方法、TALEN 定点突变方法、和/或 CRISPR/Cas9 等基因编辑方法。

本发明还提供了一种 *ms7* 突变体材料的应用方法，其特征在于所述突变材料是由核苷酸序列的突变所造成，含有该突变后的核苷酸序列的植株具有雄性不育的表型，其中所述核苷酸序列为 *TaMS7* 基因的核苷酸序列，优选如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示。所述突变体材料的应用，包括但不限于在杂交育种中的应用，更具体的是指将 *ms7* 突变体植株作为不育系母本，与恢复系杂交，生产杂交种子。

本发明还公开了一种雄性不育系的保持方法，所述方法以 *ms7* 雄性不育突变体为转化受体材料，将紧密连锁的 3 个目标基因转化至该不育突变体受体植株中。所述 3 个目标基因分别是育性相关基因 *TaMS7*、花粉失活基因和筛选标记基因。其中，育性相关基因 *TaMS7* 可使不育的转化受体育性恢复，花粉失活基因可使含有转化的外源基因的花粉失活，即失去授精能力，筛选基因可以用于转基因种子或组织和非转基因种子或组织的分拣，分拣出的非转基因种子用作不育系生产杂交种，转基因种子用作保持系来源源不断地、稳定地生产不育系。

本发明中，在小麦植株中所述 *ms7* 雄性不育突变体是指由 *TaMS7* 突变所导致的雄性不育突变体。本发明中 *ms7* 雄性不育突变体也可以称为 *ms7* 不育系或 *ms7* 雄性不育系。

上述雄性不育系的保持方法中，所述的花粉失活基因包括但不限于 *barnase* 基因、淀粉酶基因、DAM 甲基化酶等。更具体的，所述花粉失活基因是玉米 α 淀粉酶基因 Zm-AA，优选其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示。所述花粉失活基因与偏好于雄性配子表达的启动子相

连。更具体地，所述偏好于雄性配子表达的启动子包括但不限于PG47启动子、Zm13启动子等。所述筛选基因可以用于将含有该表达盒的植株或载体筛选出来。所述筛选基因包括但不限于抗生素抗性基因、或是抗除草剂基因、或是荧光蛋白基因等。具体地，所述筛选基因包括但不限于：氯霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、链霉素抗性基因、奇霉素抗性基因、磺胺类抗性基因、草甘磷抗性基因、草丁膦抗性基因、bar基因、红色荧光基因DsRED、mCherry基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因等。

更具体地，本发明还公开了一种雄性不育系的繁殖方法，所述方法包括以下步骤：

(a)向 *ms7* 雄性不育系中转入下述载体，以获得含有下述载体的保持系，所述载体包含：育性相关基因 *TaMS7*，所述育性相关基因 *TaMS7* 可以恢复 *ms7* 雄性不育系的雄性生育力；和花粉失活基因，所述花粉失活基因表达时，会干扰植株中含有该花粉失活基因的雄性配子的功能或形成，从而使得所述植株中产生的具有活性的雄性配子都是不含所述载体的；和筛选基因，所述筛选基因可以用于转基因种子或组织和非转基因种子或组织的分拣。

(b) 将转入上述载体后形成的保持系植株自交，同时产生不含载体的 *ms7* 雄性不育系和含载体的保持系种子；或是将保持系植株的花粉赶到 *ms7* 雄性不育系植株上，使 *ms7* 雄性不育系授粉繁殖出 *ms7* 雄性不育系的种子。

上述雄性不育系的繁殖方法中，所述的花粉失活基因包括但不限于barnase基因、淀粉酶基因、DAM甲基化酶等。更具体的，所述花粉失活基因是玉米 α 淀粉酶基因Zm-AA，优选其核苷酸序列如SEQ ID NO: 25所示。所述花粉失活基因与偏好于雄性配子表达的启动子相连。更具体地，所述偏好于雄性配子表达的启动子包括但不限于PG47启动子、Zm13启动子等。所述筛选基因可以用于将含有该表达盒的植株或载体筛选出来。所述筛选基因包括但不限于抗生素抗性基因、或是抗除草剂基因、或是荧光蛋白基因等。具体地，所述筛选基因包括但不限于：氯霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、链霉素抗性基因、奇霉素抗性基因、磺胺类抗性基因、草甘磷抗性基因、草丁膦抗性基因、bar基因、红色荧光基因DsRED、mCherry基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因等。

本发明还公开了一种保持系的生产方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 向 *ms7* 雄性不育系中转入下述载体，即获得了 *ms7* 雄性不育系的保持系，所述载体包含：育性相关基因 *TaMS7*，所述育性相关基因 *TaMS7* 可以恢复 *ms7* 雄性不育系的雄性生育力；和花粉失活基因，所述花粉失活基因表达时，会干扰植株中含有该花粉失活基因的雄性配子的功能或形成，从而使得所述植株中产生的可育雄性配子都是不含所述载体的；和筛选基因，所述筛选基因可以用于转基因种子和非转基因种子的分拣。

上述保持系的生产方法中,所述的花粉失活基因包括但不限于barnase基因、淀粉酶基因、DAM甲基化酶等。更具体的,所述花粉失活基因是玉米 α 淀粉酶基因Zm-AA,优选其核苷酸序列如SEQ ID NO: 25所示。所述花粉失活基因与偏好于雄性配子表达的启动子相连。更具体地,所述偏好于雄性配子表达的启动子包括但不限于PG47启动子、Zm13启动子等。所述筛选基因可以用于将含有该表达盒的植株或载体筛选出来。所述筛选基因包括但不限于抗生素抗性基因、或是抗除草剂基因、或是荧光蛋白基因等。具体地,所述筛选基因包括但不限于:氯霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、链霉素抗性基因、奇霉素抗性基因、磺胺类抗性基因、草甘磷抗性基因、草丁膦抗性基因、bar基因、红色荧光基因DsRED、mCherry基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因等。

本发明还公开了一种保持系的繁殖方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 向 *ms7* 雄性不育系中转入下述载体,即获得了 *ms7* 雄性不育系的保持系,所述载体包含:育性相关基因 *TaMS7*,所述育性相关基因 *TaMS7* 可以恢复 *ms7* 雄性不育系的雄性生育力;和花粉失活基因,所述花粉失活基因表达时,会干扰植株中含有该花粉失活基因的雄性配子的功能或形成,从而使得所述植株中产生的可育雄性配子都是不含所述载体的;和筛选基因,所述筛选基因可以用于转基因种子和非转基因种子的分拣;和

(b) 将转入上述载体后形成的保持系植株自交,即按 1:1 的比例繁殖获得了不含载体的 *ms7* 雄性不育系种子和含载体的保持系种子。

本发明还公开了一种种子的生产方法,所述方法包括:

(a) 向 *ms7* 雄性不育系中引入下述载体,获得 *ms7* 雄性不育系的保持系,所述载体包含:育性相关基因 *TaMS7*,所述育性相关基因 *TaMS7* 可以恢复 *ms7* 雄性不育系的雄性生育力;和花粉失活基因,所述花粉失活基因表达时,会干扰植株中含有该花粉失活基因的雄性配子的功能或形成,从而使得所述植株中产生的可育雄性配子都是不含所述载体的。

(b) 将转入上述载体后的保持系植株自交;和

(c) 自交后即获得含有所述载体的保持系种子和不含载体的 *ms7* 雄性不育系。

本发明上述的雄性不育系的繁殖或保持方法、保持系的生产方法或繁殖方法、种子的生产方法等中,其中步骤(a)也可以是向普通的植株中引入含有育性相关基因 *TaMS7*、花粉失活基因和筛选基因的载体,获得含有所述载体的转基因植株后,再与 *ms7* 雄性不育系杂交,经过定向选育,获得背景为 *ms7* 雄性不育系、并且含有所述载体的保持系植株。

本发明上述的雄性不育系的繁殖方法或保持方法、保持系的生产方法或繁殖方法、种子的生产方法等中,其中所述的育性相关基因的核苷酸序列选自下列组的序列之一:

- (a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；
- (b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；
- (c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或
- (d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性, 且具有育性恢复功能的 DNA 序列；或
- (e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

上述育性相关基因 *TaMS7* 还可操作性的连有一个花药特异表达的启动子, 可以驱动 *TaMS7* 基因在植物花粉中的表达。所述花药特异表达的启动子选自由 MS26、NP1、MSP1、PAIR1、PAIR2、ZEP1、MELL、PSS1、TDR、UDT1、GAMYB4、PTC1、API5、WDA1、CYP704B2、MS26、MS22、DPW、MADS3、OSC6、RIP1、CSA、AID1、5126 或 Ms45 等育性调控基因的启动子构成的组之一。更具体的, 所述花药特异表达启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示。上述育性相关基因 *TaMS7* 还可操作性的连有一个终止子, 所述终止子可以是已经公开的任一个基因的终止子, 具体地, 所述终止子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 22、23 或 24 所示。

本发明上述的雄性不育系的繁殖或保持方法、保持系的生产方法或繁殖方法、种子的生产方法等中, 所述的花粉失活基因包括但不限于 barnase 基因、淀粉酶基因、DAM 甲基化酶等。更具体的, 所述花粉失活基因是玉米 α 淀粉酶基因 Zm-AA, 优选其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示。所述花粉失活基因与偏好于雄性配子表达的启动子相连。更具体地, 所述偏好于雄性配子表达的启动子包括但不限于 PG47 启动子、Zm13 启动子等。

本发明上述的雄性不育系的繁殖或保持方法、保持系的生产方法或繁殖方法、种子的生产方法等中, 其中所述的筛选基因包括但不限于抗生素抗性基因、除草剂抗性基因或荧光基因。具体地, 所述筛选基因包括但不限于: 氯霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、链霉素抗性基因、奇霉素抗性基因、磺胺类抗性基因、草甘磷抗性基因、草丁膦抗性基因、bar 基因、红色荧光基因 DsRED、mCherry 基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因等。

本发明还提供了一种花药特异表达启动子, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示。将 SEQ ID NO: 16、17 或 18 与报告基因 GUS 相连, 构建载体转化水稻和小麦, 检测分析转基因植株中的 GUS 表达活性和表达模式, 通过对转基因植株的根、茎、叶和花进行 GUS 染色分析, 结果发现本发明所提供的启动子驱动 GUS 基因在植物花粉中表达。说明本发明所提供的 SEQ ID NO: 16、17 或 18 是一个花药特异性表达的启动子。

本发明所提供的植物花药特异表达启动子，含有序列表中如 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示的核苷酸序列，或包含与 SEQ ID NO: 16、17 或 18 中所列核苷酸序列具有 90% 以上相似性的核苷酸序列，或包含来源于 SEQ ID NO: 16、17 或 18 序列上的 500 个及 500 以上连续的核苷酸片段，并且可以驱动与该启动子操作性连接的核苷酸序列在植物花粉中的表达。含有上述序列的表达载体、转基因细胞系以及宿主菌等均属于本发明的保护范围。扩增本发明所公开的 SEQ ID NO: 16、17 或 18 启动子的任一核苷酸片段的引物对也在本发明的保护范围之内。

本发明所述的“启动子”是指一种 DNA 调控区域，其通常包含能指导 RNA 聚合酶 II 在特定编码序列的合适转录起始位点起始 RNA 合成的 TATA 盒。启动子还可包含其它识别序列，这些识别序列通常位于 TATA 盒的上游或 5' 端，通常被称为上游启动子元件，起调控转录效率的作用。本领域技术人员应该知晓，虽然已经鉴定了针对本发明公开的启动子区域的核苷酸序列，但是分离和鉴定处于本发明鉴定的特定启动子区域的 TATA 盒上游区域的其它调控元件也在本发明的范围内。因此，本文公开的启动子区域通常被进一步界定为包含上游调控元件，例如用于调控编码序列的组织表达性和时间表达功能的那些元件、增强子等。以相同的方式，可以鉴定、分离出使得能在目标组织（例如雄性组织）中进行表达的启动子元件，将其与其它核心启动子一起使用，以验证雄性组织优先的表达。核心启动子指起始转录所需的最小限度的序列，例如被称为 TATA 盒的序列，这是编码蛋白质的基因的启动子通常都具有的。因此，可选地，*TaMS7* 基因的上游启动子可与其自身的或来自其它来源的核心启动子关联使用。

核心启动子可以是任何一种已知的核心启动子，例如花椰菜花叶病毒 35S 或 19S 启动子（美国专利 No. 5, 352, 605）、泛素启动子（美国专利 No. 5, 510, 474）、IN2 核心启动子（美国专利 No. 5, 364, 780）或玄参花叶病毒启动子。

所述基因启动子的功能可以通过以下方法进行分析：将启动子序列与报告基因可操作性连接，形成可转化的载体，再将该载体转入植株中，在获得转基因后代中，通过观察报告基因在植物各个组织器官中的表达情况来确认其表达特性；或者将上述载体亚克隆进用于瞬时表达实验的表达载体，通过瞬时表达实验来检测启动子或其调控区的功能。

用来测试启动子或调控区域功能的适当表达载体的选择将取决于宿主和将该表达载体引入宿主的方法，这类方法是本领域普通技术人员所熟知的。对于真核生物，在载体中的区域包括控制转录起始和控制加工的区域。这些区域被可操作地连接到报告基因，所述报告基因包括 YFP、UidA、GUS 基因或荧光素酶。包含位于基因组片段中的推定调控区的表达载体可

以被引入完整的组织，例如阶段性花粉，或引入愈伤组织，以进行功能验证。

此外，本发明的启动子还可与并非 *TaMS7* 基因的核苷酸序列相连，以表达其它异源核苷酸序列。本发明的启动子核苷酸序列及其片段和变体可与异源核苷酸序列一起组装在一个表达盒中，用于在目的植株中表达，更具体地，在该植株的雄性器官中表达。所述表达盒有合适的限制性酶切位点，用于插入所述启动子和异源核苷酸序列。这些表达盒可用于对任何植株进行遗传操作，以获得想要的相应表型。

本发明所公开的花药特异表达启动子，可用于驱动下列异源核苷酸序列的表达，以使转化的植株获得雄性不育的表型，所述异源核苷酸序列可编码促使碳水化合物降解的酶或修饰酶、淀粉酶、脱支酶和果胶酶，更具体的如 *barnase* 基因、玉米 α 淀粉酶基因、生长素基因、*rot B*、细胞毒素基因、白喉毒素、DAM 甲基化酶，或是显性的雄性不育基因。

在某些实施方式中，本发明中所提到的可操作性地连接在本发明启动子下游的核苷酸序列，其中所述的“核苷酸序列”可以是操作性连接于本文所公开的启动子之后的结构基因、调节基因、结构基因的反义基因、调节基因的反义基因或者能够干扰内源基因表达的小 RNA。

本发明还提供了一个转录终止子序列，所述转录终止子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 22、23 或 24 所示，具有终止基因转录表达的功能。

本发明还提供了一种表达盒、载体或工程菌株，所述表达盒、载体或工程菌株中包含了本发明所提供的花药特异表达启动子 SEQ ID NO: 16、17 或 18。具体地，可以将本发明所提供的育性相关基因 *TaMS7* 的核苷酸序列构建到本发明所提供的启动子 SEQ ID NO: 16、17 或 18 的下游，从而驱动该育性基因在转化受体植株中的表达。

本发明的所提供的花药特异表达启动子可用于外源基因在花粉中的特异性表达，从而避免该外源基因在植物其他组织中持续表达所带来的不利影响，还可以用于植物花粉生长发育相关基因的功能分析和鉴定；可用于雄性不育系和保持系的创建；并可应用于花粉败育实验中，从而避免由植物转基因漂移或花粉逃逸所带来的生物安全问题，对植物雄性不育系和保持系的创造具有重要意义。

本发明所提供的 *TaMS7* 基因的核苷酸序列和启动子序列或表达盒可被插入载体、质粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体或其他适合转化进宿主细胞中的任何载体中。优选的宿主细胞是细菌细胞，尤其是用于克隆或储存多核苷酸、或用于转化植物细胞的细菌细胞，例如大肠杆菌、根瘤土壤杆菌和毛根土壤杆菌。当宿主细胞是植物细胞时，表达盒或载体可插入至被转化的植物细胞的基因组中。插入可以是定位的或随机的插入。

本发明所述的将核苷酸序列、载体或表达盒转入植株或引入植株或对植株进行转化，均

指通过常规的转基因方法，将核苷酸序列、载体或表达盒转入到受体细胞或受体植株中。植物生物技术领域技术人员已知的任何转基因方法均可被用于将重组表达载体转化进植物细胞中，以产生本发明的转基因植物。转化方法可包括直接和间接的转化方法。合适的直接方法包括聚乙二醇诱导的 DNA 摄入、脂质体介导的转化、使用基因枪导入、电穿孔、以及显微注射。所述转化方法也包括农杆菌介导的植物转化方法等。

与现有技术相比，本发明具有如下的有益效果：本发明提供了一种育性相关基因 *TaMS7* 及其启动子，及将该基因用于 *ms7* 雄性不育系的繁殖和保持的方法。本发明所提供的育性相关基因、核雄性不育系的育性保持和不育系的繁殖方法，对作物的杂交育种生产来说，具有重大的生产推广价值和应用价值。本发明提供的育性基因以及该基因突变产生的不育系为小麦杂交育种提供了资源，也为构建第三代杂交育种体系提供了必要的元件，该基因突变产生的雄性不育系，用来生产杂交种子，对于突破并改良现有的“三系”和“两系”杂交技术有重要意义。

附图说明

图 1 是 comp155942_c0_seq4 在花粉处于减数分裂期(WT-0)、单核期(WT-1)、双核期(WT-2)和三核期(WT-3)的花药中的表达水平分析，横坐标是花粉不同发育时期，纵坐标是 FPKM，反映基因的表达水平。

图 2 是 *TaMS7* 的 3 个同源基因在小麦不同组织器官和不同发育时期的花药中的 RT-PCR 分析；1 表示根，2 表示茎，3 表示叶片，4 表示花粉处于减数分裂期的穗子，5 表示花粉处于单核期的花药，6 表示花粉处于双核期的花药，7 表示花粉处于三核期的花药，8 表示花粉处于单核期的花中除花药以外其它的花器官，9 表示花粉处于双核期的花中除花药以外其它的花器官，10 表示花粉处于三核期的花中除花药以外其它的花器官。

图 3 是采用 CRISPR-Cas9 技术得到的 7 个小麦核隐性雄性不育突变体株系的基因型和表型：*a1*、*a2* 分别表示 *TaMS7-A* 突变的两种类型，*b1* 表示 *TaMS7-B* 突变的一种类型，*d1*、*d2* 分别表示 *TaMS7-D* 突变的两种类型。

图 4 是 *TaMS7-A*、*TaMS7-B*、*TaMS7-D* 三个基因均发生突变后的小麦植株具有完全雄性不育的性状：A 图为野生型与突变体植株的穗，B 图为野生型与突变体植株的花药和雌蕊，C 图为野生型与突变体植株花粉的 I₂-KI 染色照片。

具体实施方式

下面对本发明的实施例作详细说明，本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

实施例 1. 不同发育时期小麦花药的全基因组表达谱分析和花粉发育早期花药表达 contig 的获得

取花粉处于减数分裂期、单核期、双核期和三核期的小麦花药，用 Trizol (Invitrogen) 提取总 RNA，并进行 DNaseI (Promega) 处理，进而纯化 mRNA (Ambion)。将纯化的 mRNA 进行反转录 (Invitrogen)、超声打断 (Fisher)、制备文库 (illumina) 并扩增 (illumina)，最后在 illumina 机器上进行测序反应。

小麦转录组高通量测序的结果首先通过 Trinity 软件进行序列拼接，得到的拼接序列进一步去除冗余以及相似性聚类。对于拼接得到的转录本 contig 的表达变化分析，各样品中高通量测序的序列首先通过 TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) 软件与转录本拼接的结果进行比对。而后 Cufflink 软件能够计算比对上的转录本 contigs 的均一化表达量，用“外显子每百万比对片段的千碱基数 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM)”表示。

通过对不同发育时期小麦花药的全基因组表达谱分析，找到花粉处于减数分裂期和单核期的花药中高表达而在花粉处于双核和三核期的花药中不表达的转录本 contig7231 个。如图 1 所示，comp155942_c0_seq4 在花粉处于减数分裂期和单核期的花药中高表达而在花粉处于双核和三核期的花药中不表达。将 comp155942_c0_seq4 所对应的基因命名为 *TaMS7*。

实施例 2. RT-PCR 验证 *TaMS7* 基因的组织表达特异性

由于小麦是由 A、B、D 三套基因组组成的异源六倍体，基因的平均拷贝数为 2.8 个，其中接近一半的基因 (46%) 有 3-4 个拷贝，12% 的基因有 1-2 个拷贝，42% 的基因拷贝数 ≥ 5 个。从 comp155942_c0_seq4 的序列出发，利用 CerealsDB 和 IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium) 公布的普通小麦的测序信息，以及 2013 年 Nature 上发表的小麦祖先乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu*, A 基因组供体) 和粗山羊草 (*Aegilops tauschii*, D 基因组供体) 的测序信息进行电子克隆，获得了 3 个 *TaMS7* 基因，分别命名为 *TaMS7-A*, *TaMS7-B* 和 *TaMS7-D*。3 个 *TaMS7* 基因的基因组 DNA 序列分别为 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示，三者之间的同源性和 CDS 序列分别如 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示，三者之间的同源性和蛋白序列分别如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 所示，三者之间的同源性和蛋白序列分别如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 所示，三者之间的同源性和蛋白序列分别如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 所示，三者之间的同源性和蛋白序列分别如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 所示，三者之间的同源性和蛋白序列分别如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 所示。分别设计针对 *TaMS7-A*, *TaMS7-B* 和 *TaMS7-D* CDS 的特异性引物，利用 RT-PCR 方法，对这三个基因在小麦根、茎、叶、不同发育时期的花药及除花药以外的其他花器官等多种组织材料中进行表达特异性分析，结果如图 2 所示，*TaMS7* 基因只在花粉处于减数分裂期的穗和花粉处于单核期的花药中特异

表达，在花粉处于双核期和三核期的花药中不表达，在花粉处于各发育时期的除花药以外的其他花器官和根、茎、叶中都不表达，说明 *TaMS7* 基因是花药特异表达、且只在花粉发育早期的花药中特异表达的基因，驱动其表达的启动子也是一个花药特异表达的启动子。

TaMS7-A 基因的 RT-PCR 引物为：

引物 1：5'- ATACTGACACAAGTTTATGGGGCTG -3' (SEQ ID NO:10)

引物 2：5'- AATTACATTCAAATATGGCTCCTTG -3' (SEQ ID NO:11)

TaMS7-B 基因的 RT-PCR 引物为：

引物 3：5'- GGCCTCGTGAACCTCGTCGTATC -3' (SEQ ID NO:12)

引物 4：5'- TGAATTACATGCAAATTTGGCTCCG-3' (SEQ ID NO:13)

TaMS7-D 基因的 RT-PCR 引物为：

引物 5：5'- ATGTCCAACCAGGAGCACTTCAC -3' (SEQ ID NO:14)

引物 6：5'- GCACAGTTTTTTGAAGCAATGTTG -3' (SEQ ID NO:15)

实施例 3. *TaMS7* 基因启动子序列的获得

从 *TaMS7-A*、*TaMS7-B* 和 *TaMS7-D* 基因的基因组 DNA 序列出发，利用 CerealsDB 和 IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium) 公布的普通小麦的测序信息，以及 2013 年 Nature 上发表的小麦祖先乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu*, A 基因组供体) 和粗山羊草 (*Aegilops tauschii*, D 基因组供体) 的测序信息进行电子克隆，获得了 *TaMS7-A*、*TaMS7-B* 和 *TaMS7-D* 基因的启动子，分别命名为 *TaMS7-A* 启动子、*TaMS7-B* 启动子和 *TaMS7-D* 启动子，在本发明中所述启动子也可分别称为 *pTaMS7-A*、*pTaMS7-B* 和 *pTaMS7-D*，其长度分别为 2601bp、2635bp 和 2821bp，其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示。

实施例 4. *TaMS7-D* 启动子的克隆和植物表达载体的构建

为了进一步核实上述启动子的功能，本发明进行了 *TaMS7-D* 启动子的功能验证实验。将植物表达载体 pBI121 用限制性内切酶 HindIII 和 EcoRI 双酶切，得到的 35S:GUS 片段用 T4 DNA ligase 连入同样用 HindIII 和 EcoRI 双酶切的 CAMBIA 公司的 pCAMBIA2300 载体，新的载体被命名为 *p2300 35S:GUS*。

从 *TaMS7-D* 启动子的 5'端和 ATG 上游设计引物：

引物 7：5'- aagcttCTGACATAGTACATGTAATCTTTAAATCCATAAC -3' (SEQ ID NO:19)

引物 8：5'- ggatccTTGCGCCGGCGAGCTCGGC -3' (SEQ ID NO:20)

引物 7 中序列 aagctt 是 HindIII 的酶切位点，引物 8 中序列 ggatcc 是 BamHI 的酶切位点。

以小麦的基因组 DNA 为模板，用引物 7 和引物 8 进行扩增，反应条件是：94℃预变性 5 分钟；94℃变性 30 秒；60℃退火 30 秒；72℃延伸 2 分 30 秒；35 个循环；72℃延伸 10 分钟。反应结束后，PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测回收，产物连入 pMD20-T 载体中，筛选阳性克隆并进行测序验证，序列如 SEQ ID NO:18 所示，该质粒称为 *T-pTaMS7-D*。

用限制性内切酶 HindIII 和 BamHI 双酶切 *T-pTaMS7-D*，得到的 *TaMS7-D* 启动子用 T4 DNA ligase 连入用 HindIII 和 BamHI 双酶切的 *p2300 35S:GUS* 载体，得到植物表达载体 *p2300 pTaMS7-D:GUS*。

实施例 5. 水稻的遗传转化和转基因水稻植株不同组织器官 GUS 基因表达的组织化学检测

利用热激法将植物表达载体 *p2300 TaMS7-Dp:GUS* 转入农杆菌 AGL0 菌株。

用农杆菌侵染水稻胚性愈伤，暗中共培养 2-3 天，然后经过两步抗性筛选、预分化、分化和生根培养等步骤，最终获得具有卡那霉素抗性的、转 *p2300 TaMS7-Dp:GUS* 水稻 T₀ 代植株。

选择合适大小的转基因幼苗或特定组织浸入 GUS 染液中，37℃染色过夜，吸去反应液，乙醇梯度脱色，显微镜观察。结果表明，在转基因水稻的根、茎和叶等营养器官中都检测不到 GUS 基因的表达，在花粉处于双核期和三核期的花药和其他花器官、花粉处于减数分裂期和单核期的除花药以外的其它花器官中也检测不到 GUS 基因的表达，*TaMS7-D* 启动子只能启动 GUS 基因在花粉处于减数分裂期和单核期的花药中表达，说明 *TaMS7-D* 启动子是一个花粉发育早期花药特异表达的启动子。按照 *TaMS7-D* 启动子的功能验证过程，对 *TaMS7-A* 启动子和 *TaMS7-B* 启动子也进行了功能验证，发现 *TaMS7-A* 启动子和 *TaMS7-B* 启动子也是一个花药特异表达的启动子，和实施例 2 中的实验结果一致。

实施例 6. *TaMS7* 育性基因的定点敲除及突变体的表型分析

本发明采用 CRISPR-Cas9 技术对小麦基因组进行定点突变实验。具体的，在本发明中，*TaMS7* 育性基因的靶序列选为 CTGGTGGACCAGCCCATGGT (SEQ ID NO: 21)，该序列为 *TaMS7-A*、*TaMS7-B*、*TaMS7-D* 的共有序列，分别位于 *TaMS7-A* 正链中的第 1017-1036 位核苷酸、*TaMS7-B* 正链中的第 1035-1054 位核苷酸、*TaMS7-D* 正链中的第 1038-1057 位核苷酸。将带有靶序列的 sgRNA 表达框与 Cas9 表达框构建到同一载体 pAHC20 上，与表达 *bar* 基因的质粒一起，利用基因枪法共转化小麦幼胚，获得了转基因小麦植株。

对转基因小麦植株进行分子鉴定，发现在 *TaMS7-A*、*TaMS7-B*、*TaMS7-D* 三个基因靶序列的位置都发生了突变：其中 *TaMS7-A* 基因发生的突变有两种类型，分别为缺失 5 个碱基和插入 55 个碱基；*TaMS7-B* 基因发生的突变有一种，为缺失 13 个碱基的同时又插入了 54 个碱

基；*TaMS7-D* 基因的突变有两种类型，一种为缺失 9 个碱基，另一种为缺失 7 个碱基的同时插入 103 个碱基（见图 3）。

对 *TaMS7-A*、*TaMS7-B*、*TaMS7-D* 三个基因的靶序列都发生纯合突变或双等位基因突变的植株进行表型观察，发现具有这种基因型的植株的花药瘦小、不开裂、内部没有花粉，表现为完全的雄性不育（见图 4），用野生型对其授粉保种；而 *TaMS7-A*、*TaMS7-B*、*TaMS7-D* 三个基因中只有一个或两个基因发生纯合突变或双等位基因突变的植株，没有雄性不育表型。说明本发明的 *TaMS7* 基因就是一个隐性的核雄性不育基因。

实施例 7. 转基因功能互补

将 *TaMS7-A*、*TaMS7-B* 和 *TaMS7-D* 编码区的基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3) 分别构建到 pAHC20 载体上，前面分别加各自的上游启动子序列 2.5kb (SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18) 用于驱动基因的表达，后面分别加 1.4kb 的下游序列 (SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24)，载体分别命名为 *pAHC20 pTaMS7-A:gTaMS7-A*、*pAHC20 pTaMS7-B:gTaMS7-B* 和 *pAHC20 pTaMS7-D:gTaMS7-D*。

利用基因枪法，将上述三个功能互补载体分别转化或是共转化小麦 *Tams7-abd* 突变体，对获得的转基因阳性植株的花粉进行 I₂-KI 染色观察，结果显示转基因阳性植株花粉均发育正常、表现为可育。这些分析进一步证明 *TaMS7* 基因参与花粉发育调控，该基因突变导致雄性不育表型。

实施例 8. *TaMS7* 基因在新一代杂交育种技术中的应用

TaMS7 基因可以用于新一代杂交育种技术，该技术的核心思想是：以小麦核隐性雄性不育突变体为转化受体材料，通过将紧密连锁的 3 个目标基因转化至不育突变体中，其中，隐性核雄性不育基因可使转化受体育性恢复，花粉失活基因可使含有外源基因的花粉失活，即失去授精能力，筛选基因可以用于转基因种子和非转基因种子的分拣，分拣出的非转基因种子即为不育系，而转基因种子用作保持系。通过保持系给不育系授粉杂交，可以在不育系上结实，由此繁殖不育系。而保持系通过自交可以源源不断地得以繁殖。由于该技术利用生物技术生产非转基因产品，解决了小麦杂交制种过程中面临人工或机械去雄问题，省去人工去雄或机械去雄步骤，可以提供更高质量及纯度的种子给种植者，节约劳动成本。

根据以上原理，更具体地，采用小麦 *TaMS7* 基因构建植物表达载体。在构建小麦的植物表达载体之前，发明人首先分别对表达载体内的 *ZmBT1-ZmAA*、*TaMS7* 和 *mCherryW* 三个表达盒单独进行了小麦转化，并进一步对各个表达盒的功能进行了验证。结果表明各个表达盒单独转化小麦时，都能够工作良好，达到预期的设计效果。

进一步，发明人通过装配下述 DNA 元件，构建了转化载体：

1) 以 pAHC20 载体为基础，可操作性连入以下各个表达盒；

2) *TaMS7* 基因育性恢复表达盒，含有育性相关基因 *TaMS7* 及其启动子和终止子均来自小麦品种 CB037，小麦中来自 A、B、D 基因组上的三个 *TaMS7* 基因，即 *TaMS7-A*，*TaMS7-B* 和 *TaMS7-D* 均可同时用于恢复小麦 *ms7* 不育系的育性，或是单独用于恢复小麦 *ms7* 不育系的育性。其中 *TaMS7-A* 基因的基因组 DNA 序列、启动子序列和终止子序列分别如 SEQ ID NO: 1，SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 22 所示；*TaMS7-B* 基因的基因组 DNA 序列、启动子序列和终止子序列分别如 SEQ ID NO: 2，SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 23 所示；*TaMS7-D* 基因的基因组 DNA 序列、启动子序列和终止子序列分别如 SEQ ID NO: 3，SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 24 所示。

3) 花粉失活基因表达盒 PG47: *ZmBT1-ZmAA-IN2-1*，花粉失活基因为 *ZmAA*，转运肽为 *ZmBT1*，*ZmBT1-ZmAA*（其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示）的开放读码框连接于启动子 PG47（其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示）的下游、终止子 IN2-1（其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示）的上游。

4) 筛选标记基因表达盒 CaMV35S 增强子-LTP2: *mCherryW-PINII*，*mCherryW* 基因（SEQ ID NO: 28）的开放读码框连接于 CaMV35S 增强子-LTP2 启动子（SEQ ID NO: 29）和 PINII 终止子（SEQ ID NO: 30）之间，重组成 *mCherryW* 的基因表达盒（CaMV35S 增强子-LTP2: *mCherryW-PINII*）。

本发明同时构建了 *TaMS7* 基因育性恢复表达盒中只含单个 *TaMS7* 基因，及另外两个花粉失活基因表达盒和筛选标记基因表达盒的载体。此外，也构建了 *TaMS7* 基因育性恢复表达盒中含有两个 *TaMS7* 基因，及另外两个花粉失活基因表达盒和筛选标记基因表达盒的载体。

利用基因枪法，将上述两种载体分别转化小麦 *Tams7-abd* 突变体，分别得到 8 株、12 株和 9 株转基因单拷贝的转基因阳性植株。对转基因植株及对照进行花粉活性检测，结果显示，非转基因的野生型小麦植株花粉不育比例小于 2%，非转基因的小麦 *Tams7-abd* 突变体植株的花药中没有花粉，而转基因植株的花药中有花粉，但不育花粉的比例为 50%左右，表明本发明所提供的载体中 *TaMS7* 基因恢复了 *Tams7-abd* 突变体雄性不育的表型，同时 *ZmBT1-ZmAA* 基因能够到达预期的花粉失活功能。

对上述转基因植株所结 T₁ 代种子进行荧光分离比例调查，结果表明这些种子均显示 1:1 分离比，即携带外源基因的荧光种子和不携带外源基因的非荧光种子表现为 1:1 分离，表明本发明所提供的载体各元件作为整体表达良好，可以实现创制和繁殖不育系的目的；其中，

TaMS7 基因可以恢复雄性不育突变体受体的育性, *ZmBT1-ZmAA* 基因和 *mCherryW* 基因的表达可以分别实现预期的花粉失活功能和种子荧光标记功能。由此, 建立新一代杂交育种技术体系, 即在小麦 *ms7* 雄性核不育系的基础上, 转入上述载体以形成保持系, 含有该外源载体的保持系可以用于源源不断的生产保持系和 *ms7* 不育系, 以解决小麦 *ms7* 雄性核不育系无法繁殖的问题, 获得的 *ms7* 雄性不育系可以用于生产制种, 及生产杂交种。

上述技术体系也可以通过以下方式获得, 即在普通野生型小麦的基础上, 转入上述载体, 再将转入了上述载体的植株与 *ms7* 雄性不育系杂交, 杂交获得的植株再自交后进行筛选, 即获得背景为纯合 *ms7* 突变的含有外源转入载体的保持系, 含有该外源载体的保持系可以用于源源不断的生产保持系和 *ms7* 不育系。

1.一种育性相关基因，其特征在于所述育性相关基因 *TaMS7* 的核苷酸序列选自下列组的序列之一：

(a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；

(b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；

(c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或

(d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性，且具有育性恢复功能的 DNA 序列；或

(e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

2.一种表达盒、表达载体或工程菌，其特征在于所述表达盒、表达载体或工程菌包含权利要求 1 所述的育性相关基因。

3.一种育性恢复基因、表达盒、表达载体或工程菌在调控植物育性中的应用，其特征在于所述育性恢复基因、表达盒、表达载体、工程菌含有如下所示的核苷酸序列之一：

(a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；

(b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；

(c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或

(d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性，且具有育性恢复功能的 DNA 序列；或

(e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

4.一种调控植物育性的方法，所述方法通过过表达、抑制或突变植株中的育性恢复基因，影响其表达水平，进而调控植物育性，其特征在于：所述育性恢复基因 *TaMS7* 的核苷酸序列选自下列组的序列之一：

(a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；

(b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；

(c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或

(d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性，且具有育性恢复功能的 DNA 序列；或

(e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

5.根据权利要求 4 所述的方法，其中所述的突变包括在育性恢复基因的核苷酸序列上进行取代、缺失或添加一个或多个核苷酸。

6.根据权利要求 4-5 之任一所述的方法，其中所述的“突变”包括但不限于以下方法，如用物

理或化学的方法所导致的基因突变，化学方法包括用 EMS 等诱变剂处理所导致的诱变，或是通过 RNAi 等基因沉默手段或者通过基因编辑等方法，所述基因定点突变的方法包括但不限于 ZFN、TALEN、和/或 CRISPR/Cas9 等基因编辑方法。

7. 根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于所述方法包括用 *TaMS7* 基因的核苷酸序列互补由 *TaMS7* 基因突变所导致的雄性不育表型，使 *ms7* 雄性不育系恢复成可育。

8. 权利要求 4-7 之任一所述的方法在调控植物育性中的应用。

9. 一种雄性不育系的生产或繁殖方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 向 *ms7* 雄性不育系中转入下述载体，以获得含有下述载体的保持系，所述载体包含：育性恢复基因 *TaMS7*，所述育性恢复基因 *TaMS7* 可以恢复 *ms7* 雄性不育系的雄性生育力；和花粉失活基因，所述花粉失活基因表达时，会干扰植株中含有该花粉失活基因的雄性配子的功能或形成，从而使得所述植株中产生的可育雄性配子都是不含所述载体的；和筛选基因，所述筛选基因可以用于转基因种子和非转基因种子的分拣；和

(b) 将转入上述载体后形成的保持系植株自交，同时产生不含载体的 *ms7* 雄性不育系种子和含载体的保持系种子；或是用保持系植株的花粉给 *ms7* 不育系植株授粉上，使 *ms7* 不育系授粉繁殖出 *ms7* 不育系种子。

10. 根据权利要求 9 所述的生产或繁殖方法，其中所述的育性恢复基因 *TAMS7* 的核苷酸序列选自下列组的序列之一：

(a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；

(b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；

(c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或

(d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性，且具有育性恢复功能的 DNA 序列；或

(e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

11. 根据权利要求 10 所述的生产或繁殖方法，其中所述的育性恢复基因 *TAMS7* 由一个花粉特异性表达的启动子驱动表达，优选所述花粉特异性表达启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示。

12. 根据权利要求 9-11 之任一所述的生产或繁殖方法，其中所述的花粉失活基因包括但不限于 *barnase* 基因、淀粉酶基因、DAM 甲基化酶等，优选的所述花粉失活基因是玉米 α 淀粉酶基因，更优选的其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示。

13. 根据权利要求 12 所述的生产或繁殖方法，其中所述的花粉失活基因与偏好于雄性配子表

达的启动子相连，优选地所述启动子是 PG47 启动子或 Zm13 启动子。

14. 根据权利要求 9-13 之任一所述的繁殖方法，其中所述的筛选基因包括但不限于抗生素抗性基因、或抗除草剂基因、或荧光蛋白基因等，优选的所述筛选基因包括但不限于：氯霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、链霉素抗性基因、奇霉素抗性基因、磺胺类抗性基因、草甘磷抗性基因、草丁膦抗性基因、bar 基因、红色荧光基因 DsRED、mCherry 基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因等。

15. 一种保持系的生产或繁殖方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 向 *ms7* 雄性不育系中转入下述载体，即获得了 *ms7* 雄性不育系的保持系，所述载体包含：育性恢复基因 *TaMS7*，所述育性恢复基因 *TaMS7* 可以恢复 *ms7* 雄性不育系的雄性生育力；和花粉失活基因，所述花粉失活基因表达时，会干扰植株中含有该花粉失活基因的雄性配子的功能或形成，从而使得所述植株中产生的可育雄性配子都是不含所述载体的；和筛选基因，所述筛选基因可以用于转基因种子和非转基因种子的分拣；和

(b) 将转入上述载体后形成的保持系植株自交，同时产生不含载体的 *ms7* 雄性不育系种子和含载体的保持系种子。

16. 根据权利要求 15 所述的生产或繁殖方法，其中所述的育性恢复基因 *TaMS7* 的核苷酸序列选自下列组的序列之一：

(a) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的核苷酸序列；

(b) 其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8 或 9 所示的核苷酸序列；

(c) 在严谨条件下能够与 (a) 或 (b) 中所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；或

(d) 与 (a) - (c) 所述序列有至少 80% (优选为至少 85%) 序列相似性，且具有育性恢复功能的 DNA 序列；或

(e) 与 (a) - (d) 之任一所述序列互补的 DNA 序列。

17. 根据权利要求 16 所述的生产或繁殖方法，其中所述的育性恢复基因 *TaMS7* 由一个花粉特异性表达的启动子驱动表达，优选所述花粉特异性表达启动子的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示。

18. 根据权利要求 15-17 之任一所述的生产或繁殖方法，其中所述的花粉失活基因包括但不限于 barnase 基因、淀粉酶基因、DAM 甲基化酶等，优选的所述花粉失活基因是玉米 α 淀粉酶基因，更优选的其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示。

19. 根据权利要求 18 所述的生产或繁殖方法，其中所述的花粉失活基因与偏好于雄性配子表达的启动子相连，优选地所述启动子是 PG47 启动子或 Zm13 启动子。

20.根据权利要求 15-19 之任一所述的繁殖方法，其中所述的筛选基因包括但不限于抗生素抗性基因、或抗除草剂基因、或荧光蛋白基因等，优选的所述筛选基因包括但不限于：氯霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、链霉素抗性基因、奇霉素抗性基因、磺胺类抗性基因、草甘磷抗性基因、草丁膦抗性基因、bar 基因、红色荧光基因 DsRED、mCherry 基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因等。

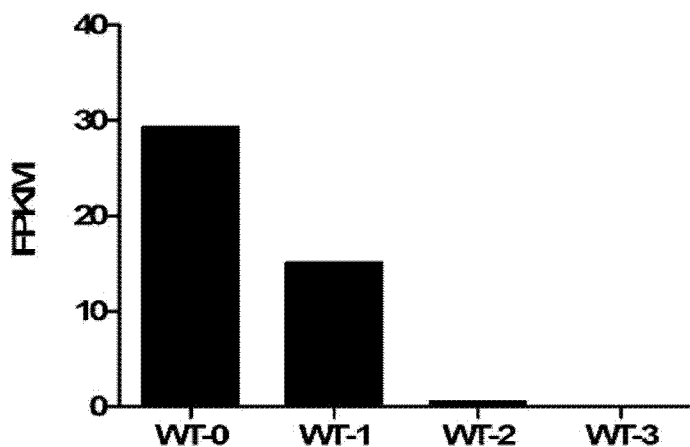


图 1



图 2

A

TaMS7-A/B/D CACAGCATCCAGGTGCTGGTGGACCAGCCCATGGTCGGGCAGGGCGT
TaMS7-a1 CACAGCATCCAGGTGCTGGTGGACCAG...GGTCGGGCAGGGCGT -5
TaMS7-a2 CACAGCATCCAGGTGCTGGTGGACCAGCCCAT/GGTCGGGCAGGGCGT +55
TaMS7-b1 CACGGCATCCAGGTGCTGGTGGACCAGCC.../GCGT -13/+51
TaMS7-d1 CACGGCATCCAGGTGCTGGTGGACCAGCC...GCAGGGCGT -9
TaMS7-d2 CACGGCATCCAGGTGCTGGTGGAC.../TGGTCGGGCAGGGCGT -7/+103

B

株系	<i>TaMS7-A</i>	<i>TaMS7-B</i>	<i>TaMS7-D</i>	表型
7	<i>a1a2</i>	<i>b1b1</i>	<i>d2d2</i>	雄性不育
11	<i>a2a2</i>	<i>b1b1</i>	<i>d1d1</i>	雄性不育
18	<i>a2a2</i>	<i>b1b1</i>	<i>d2d2</i>	雄性不育
20	<i>a2a2</i>	<i>b1b1</i>	<i>d1d2</i>	雄性不育
24	<i>a2a2</i>	<i>b1b1</i>	<i>d1d1</i>	雄性不育
33	<i>a2a2</i>	<i>b1b1</i>	<i>d1d1</i>	雄性不育
41	<i>a1a2</i>	<i>b1b1</i>	<i>d1d2</i>	雄性不育

图 3

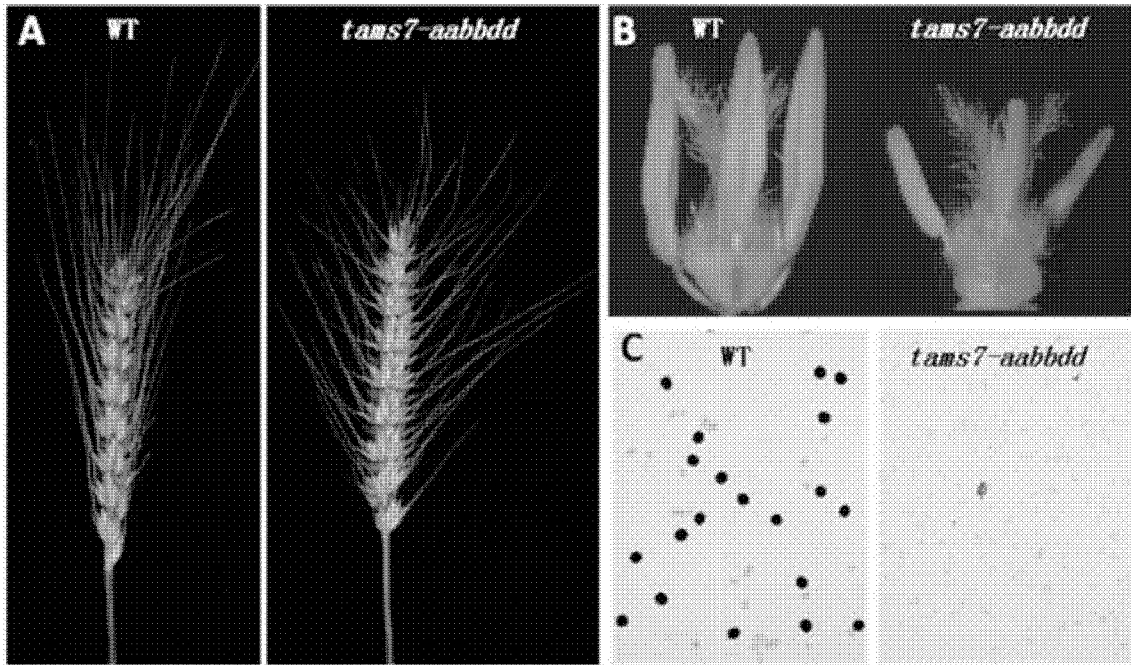


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/109813

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/29 (2006.01) i; C07K 14/415 (2006.01) i; C12N 15/82 (2006.01) i; A01H 5/00 (2018.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C07K; A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, WANFANG, EBI, NCBI, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED: 未名兴旺系统作物设计前沿实验室(北京)有限公司, 北京大学, 李健, 王峥, 马力耕, 邓兴旺, 李早霞, TaMS7, 育性相关基因, SEQ ID NO: 1-24, 育性恢复, ms7 雄性不育系, 雄性生育力, 花粉失活基因, bamase 基因, 淀粉酶基因, DAM 甲基化酶, 雄性核不育系, 繁殖, 花粉, 去雄, 保持系, 不育系, 小麦, fertility gene, fertility, recover, sterility, wheat

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105567732 A (SHENZHEN INSTITUTE OF MOLECULAR CROP DESIGN et al.), 11 May 2016 (11.05.2016), claims 1-17, description, paragraphs 36-49, 72, 76, 79, 92 and 98-101, and embodiment 12	1-20
X	NCBI Reference Sequence: XM_020320296.1. "Predicted: Aegilops Tauschii Subsp. Tauschii Protein Hothead-Like (Loc109761481), mRNA", GenBank, 24 February 2017 (24.02.2017), entire document	1-2
X	GenBank: AK376315.1, "Hordeum Vulgare Subsp. Vulgare mRNA for Predicted Protein, Complete cds, Clone: NIASHv3120L16", GenBank, 20 May 2011 (20.05.2011), entire document	1-2
A	WO 2014131342 A1 (FRONTIER LABORATORIES OF SYSTEMS CROP DESIGN CO., LTD. et al.), 04 September 2014 (04.09.2014), entire document	1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 10 January 2018	Date of mailing of the international search report 29 January 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Juanjuan Telephone No. (86-10) 82246978

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/109813

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104004775 A (FRONTIER LABORATORIES OF SYSTEMS CROP DESIGN CO., LTD. et al.), 27 August 2014 (27.08.2014), entire document	1-20
A	CN 103805630 A (FRONTIER LABORATORIES OF SYSTEMS CROP DESIGN CO., LTD. et al.), 21 May 2014 (21.05.2014), entire document	1-20
A	CN 103820445 A (SHENZHEN INSTITUTE OF MOLECULAR CROP DESIGN et al.), 28 May 2014 (28.05.2014), entire document	1-20
A	WO 2016100309 A1 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.), 23 June 2016 (23.06.2016), entire document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/109813

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105567732 A	11 May 2016	CN 105755009 A	13 July 2016
		CN 105566473 A	11 May 2016
		EP 2918681 A4	12 October 2016
		US 2015353958 A1	10 December 2015
		WO 2014071849 A1	15 May 2014
		CN 104053778 A	17 September 2014
		CN 104053778 B	05 December 2017
		CN 105746362 A	13 July 2016
		CN 105602952 A	25 May 2016
		CN 105669848 A	15 June 2016
		EP 2918681 A1	16 September 2015
		CN 105585622 A	18 May 2016
		WO 2014131342 A1	04 September 2014
CN 104004775 A	27 August 2014	None	
CN 103805630 A	21 May 2014	None	
CN 103820445 A	28 May 2014	CN 103820445 B	06 July 2016
WO 2016100309 A1	23 June 2016	CA 2971425 A1	23 June 2016

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/29(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; C12N 15/82(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; C07K; A01H</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, WANFANG, EB1, NCBI, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED: 未名兴旺系统作物设计前沿实验室(北京)有限公司, 北京大学, 李健, 王峥, 马力耕, 邓兴旺, 李早霞, TaMS7, 育性相关基因, SEQ ID NO: 1-24, 育性恢复, ms7雄性不育系, 雄性生育力, 花粉失活基因, barnase基因, 淀粉酶基因, DAM甲基化酶, 雄性核不育系, 繁殖, 花粉, 去雄, 保持系, 不育系, 小麦, fertility gene, fertility, recover, sterility, wheat</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 105567732 A (深圳市作物分子设计育种研究院等) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 权利要求1-17, 说明书第36-49、72、76、79、92、98-101段, 实施例12</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>NCBI Reference Sequence: XM_020320296.1. "PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. tauschii protein HOTHEAD-like (LOC109761481), mRNA" GenBank, 2017年 2月 24日 (2017 - 02 - 24), 全文</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>GenBank: AK376315.1. "Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone:NIASHv3120L16" GenBank, 2011年 5月 20日 (2011 - 05 - 20), 全文</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014131342 A1 (未名兴旺系统作物设计前沿实验室北京有限公司等) 2014年 9月 4日 (2014 - 09 - 04) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 105567732 A (深圳市作物分子设计育种研究院等) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 权利要求1-17, 说明书第36-49、72、76、79、92、98-101段, 实施例12	1-20	X	NCBI Reference Sequence: XM_020320296.1. "PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. tauschii protein HOTHEAD-like (LOC109761481), mRNA" GenBank, 2017年 2月 24日 (2017 - 02 - 24), 全文	1-2	X	GenBank: AK376315.1. "Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone:NIASHv3120L16" GenBank, 2011年 5月 20日 (2011 - 05 - 20), 全文	1-2	A	WO 2014131342 A1 (未名兴旺系统作物设计前沿实验室北京有限公司等) 2014年 9月 4日 (2014 - 09 - 04) 全文	1-20
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 105567732 A (深圳市作物分子设计育种研究院等) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 权利要求1-17, 说明书第36-49、72、76、79、92、98-101段, 实施例12	1-20															
X	NCBI Reference Sequence: XM_020320296.1. "PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. tauschii protein HOTHEAD-like (LOC109761481), mRNA" GenBank, 2017年 2月 24日 (2017 - 02 - 24), 全文	1-2															
X	GenBank: AK376315.1. "Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone:NIASHv3120L16" GenBank, 2011年 5月 20日 (2011 - 05 - 20), 全文	1-2															
A	WO 2014131342 A1 (未名兴旺系统作物设计前沿实验室北京有限公司等) 2014年 9月 4日 (2014 - 09 - 04) 全文	1-20															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2018年 1月 10日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 1月 29日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>李娟娟</p> <p>电话号码 (86-10)82246978</p>															

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 104004775 A (未名兴旺系统作物设计前沿实验室北京有限公司等) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 全文	1-20
A	CN 103805630 A (未名兴旺系统作物设计前沿实验室北京有限公司等) 2014年 5月 21日 (2014 - 05 - 21) 全文	1-20
A	CN 103820445 A (深圳市作物分子设计育种研究院等) 2014年 5月 28日 (2014 - 05 - 28) 全文	1-20
A	WO 2016100309 A1 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) 2016年 6月 23日 (2016 - 06 - 23) 全文	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/109813

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105567732	A	2016年 5月 11日	CN	105755009	A	2016年 7月 13日
				CN	105566473	A	2016年 5月 11日
				EP	2918681	A4	2016年 10月 12日
				US	2015353958	A1	2015年 12月 10日
				WO	2014071849	A1	2014年 5月 15日
				CN	104053778	A	2014年 9月 17日
				CN	104053778	B	2017年 12月 5日
				CN	105746362	A	2016年 7月 13日
				CN	105602952	A	2016年 5月 25日
				CN	105669848	A	2016年 6月 15日
				EP	2918681	A1	2015年 9月 16日
				CN	105585622	A	2016年 5月 18日
WO	2014131342	A1	2014年 9月 4日	CN	104379751	A	2015年 2月 25日
CN	104004775	A	2014年 8月 27日		无		
CN	103805630	A	2014年 5月 21日		无		
CN	103820445	A	2014年 5月 28日	CN	103820445	B	2016年 7月 6日
WO	2016100309	A1	2016年 6月 23日	CA	2971425	A1	2016年 6月 23日