



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104357535 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201410643281. 2

(22) 申请日 2007. 08. 31

(30) 优先权数据

60/841, 519 2006. 08. 31 US

(62) 分案原申请数据

200780039999. 9 2007. 08. 31

(71) 申请人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 J. R. 劳特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 梁谋 石克虎

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

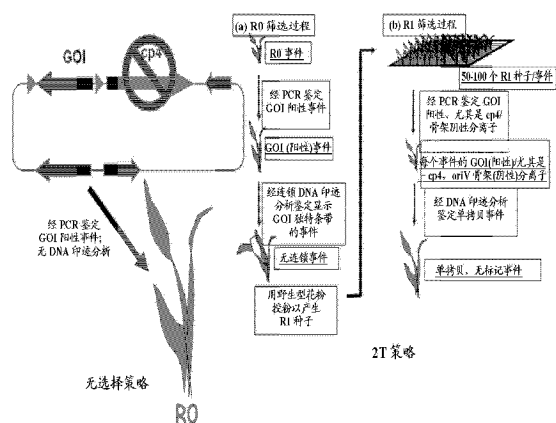
权利要求书2页 说明书26页 附图6页

(54) 发明名称

植物无选择转化

(57) 摘要

本发明涉及植物无选择转化方法。本发明提供用于鉴定再生转化植物和分化的转化植物部分的方法,所述方法在使植物细胞再生以得到分化组织之前,无需让植物细胞经历选择条件。在具体的实施方案中,所述植物细胞是玉米植物细胞。也提供了植物的培育和处理方法,包括对表现出特定目标性状的植物的鉴定方法。



1. 一种鉴定转基因玉米植物的方法,所述方法包括:
 - (a) 获得用含有目标核酸序列的 DNA 区段转化的玉米植物细胞;
 - (b) 不经过针对所述 DNA 区段存在的初次筛选,就从所述细胞再生出多个玉米植物或分化的玉米植物部分;
 - (c) 从所述多个玉米植物或分化的玉米植物部分中鉴定出至少第一转基因玉米植物或转基因分化植物部分。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述 DNA 区段不包含选择标记或目测标记基因。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述植物在固体培养基、液体培养基或者固体与液体培养基组合上生长而得以再生。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述植物通过仅在液体培养基上生长而得以再生,然后鉴定所述转基因玉米植物或转基因分化植物部分。
5. 权利要求 4 的方法,其中将细胞与 GOI 接触之后、鉴定转基因植物或转基因植物部分之前仅生长在液体培养基中的细胞的转化频率,与将细胞与 GOI 接触之后、鉴定转基因植物或转基因植物部分之前在固体培养基、半固体培养基、土壤或者固体培养基、半固体培养基、液体培养基和 / 或土壤的组合中生长的细胞的转化频率进行比较,前者相对更高。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述植物细胞是未成熟玉米胚细胞。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述未成熟玉米胚的长度为约 1.5 mm 至约 3.5 mm。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述未成熟玉米胚的长度为约 1.9 mm 至约 2.3 mm。
9. 权利要求 1 的方法,所述方法在步骤 (b) 与 (c) 之间还包括:
 - (1) 将所述多个玉米植物或分化的植物部分放入包含生长培养基或水的培养管或生长穴盆中,同时保留玉米植物各自的识别标记;和
 - (2) 让所述植物或植物部分经历至少第一测定,看所述 DNA 区段是否存在,从而根据所述测定结果来鉴定一个或多个植物或植物部分是转基因的。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述测定选自 DNA 印迹杂交、PCR、DNA 测序、RNA 印迹、蛋白质印迹、免疫测定和所述 DNA 区段所编码的酶活性测定。
11. 权利要求 9 的方法,其中所述测定是在将所述再生植物移入土壤前进行的。
12. 权利要求 10 的方法,其中鉴定缺乏目标核酸序列的推定转化的玉米植物或分化的植物部分,其中在包含来自所述多个玉米植物或分化的植物部分的合并核酸亚类的植物组织上进行所述测定。
13. 权利要求 1 的方法,其中在所述 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 6 周使所述玉米植物或玉米植物部分再生。
14. 权利要求 1 的方法,其中在所述 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 4 周使所述玉米植物或玉米植物部分再生。
15. 权利要求 1 的方法,其中在所述 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 3 周使所述玉米植物或玉米植物部分再生。
16. 权利要求 1 的方法,其中在所述 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 2 周使所述玉米植物或玉米植物部分再生。
17. 权利要求 1 的方法,其中在所述 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 1 周使所述玉米植物或玉米植物部分再生。

18. 权利要求 1 的方法,其中通过细菌介导的转化、电穿孔、PEG 介导的转化或粒子轰击法,将所述 DNA 区段引入所述玉米植物细胞中。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述细菌介导的转化是由选自土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 细胞、根瘤菌 (*Rhizobium*) 细胞、中华根瘤菌 (*Sinorhizobium*) 细胞和中间根瘤菌 (*Mesorhizobium*) 细胞的细菌细胞介导的。

20. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括在植物或植物部分再生后、使源自第一玉米植物细胞的玉米植物或植物部分经历培养条件的步骤,所述条件选择或允许筛选目标核酸序列的存在与否。

21. 权利要求 1 的方法,其中所述生长培养基是固体培养基。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述生长培养基是土壤。

23. 权利要求 1 的方法,其中所述再生植物或分化的植物部分就所述 DNA 区段的存在而言是一致的。

植物无选择转化

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 8 月 31 日的中国专利申请 200780039999.9“植物无选择转化”的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 本申请要求于 2006 年 8 月 31 日申请的美国临时申请顺序号 60/841,519 的优先权,该临时申请所公开的全部内容都通过引用结合到本文中。

1. 技术领域

[0004] 本发明涉及植物生物技术领域。具体地讲,本发明涉及产生转基因植物的方法,该方法在得到再生植物或植物部分之前无需使用选择标记基因。

2. 背景技术

[0005] 植物细胞的稳定转化和转基因植物的产生通常需要选择步骤,其中在接触一个或多个外源核酸序列(包括含有一个或多个编码目标基因和标记基因的序列的外源核酸序列)后,在选择剂存在下选择植物组织。经过这样的选择后,可使含有目标基因(GOI)的稳定转化植物再生并进行鉴定。然而,一旦产生含有 GOI 的转化植物后,通常就不再需要本身并非 GOI 的可选择或可筛选的标记基因,而且其存在可能使后续分析和产品开发工作变得复杂化。此外,需要强启动子以驱动选择标记,已经显示出会偏倚所需基因的表达(Yoo 等,2005)。

[0006] 已经报道了产生无标记基因的转基因植物的各种方法,例如共转化、可转座元件、位点特异性重组和染色体内重组(例如 Darbani 等,2007)。然而,这些系统大部分既耗时长又低效。Goldsbrough(2001)综述了在转基因植物的产生中避免使用或排除选择标记基因的方法。

[0007] De Vetten 等(2003;和美国专利申请公布说明书 2005/0097641)描述了营养体繁殖作物(例如马铃薯)的无标记转化方法,然而会产生嵌合植物。Palys 等(PCT 公布说明书 WO 2004/081184)介绍了番茄、莴苣和甘蓝的无选择转化。Francis 和 Spiker(2005)介绍了用基于 PCR 的筛选来鉴定转基因拟南芥(*Arabidopsis*)系,以免转基因整合中的选择偏倚。相比之下,本发明提供通过在获得再生玉米植物之前不需要存在选择剂或可筛选标记基因(例如目测标记基因)的方法而快速有效产生种系转化玉米植物的方法。

发明内容

[0008] 一方面,本发明提供转基因玉米植物的鉴定方法,所述方法包括:(a)获得用含有目标核酸序列的 DNA 区段转化的玉米植物细胞;(b)不经过测定所述 DNA 区段存在的初次筛选,就从所述细胞再生出多个玉米植株或分化的玉米植物部分;和(c)从多个玉米植株或分化的玉米植物部分中鉴定出至少第一转基因玉米植物或转基因分化植物部分。在一些实施方案中,DNA 区段不包含选择标记基因或目测标记基因。在其它实施方案中,植物在固体培养基、液体培养基或者固体与液体培养基组合上生长而得以再生。在具体的实施方

案中,植物通过接触 GOI 之后仅在液体培养基上生长的细胞、而在鉴定转基因玉米植物或转基因分化植物部分之前就得以再生。在某些实施方案中,将接触 GOI 之后仅生长在液体培养基中的细胞、而在鉴定转基因植物或转基因植物部分之前的细胞转化频率,与接触 GOI 之后在固体培养基或土壤上生长的细胞、而在鉴定转基因植物或转基因植物部分之前的细胞转化频率进行比较,前者相对更高。

[0009] 在某些实施方案中,植物细胞是未成熟的玉米胚细胞。在具体的实施方案中,未成熟玉米胚的长度约 1.5mm 至约 3.5mm,或长度约 1.9mm 至约 2.3mm。

[0010] 在某些实施方案中,所述方法在步骤 (b) 与 (c) 之间还包括 (1) 将多个玉米植物或分化的植物部分放入装有生长培养基或水的培养管或生长穴盆 (growth plug) 中并保留玉米植物各自的识别标记;和 (2) 让植物或植物部分经历至少第一测定,看 DNA 区段是否存在,从而根据测定结果来鉴定一个或多个植物或植物部分是转基因的。测定还可选自 DNA 印迹杂交、PCR、DNA 测序、RNA 印迹、蛋白质印迹、免疫测定和 DNA 区段所编码的酶活性测定。在具体的实施方案中,在将再生植株植入土壤之前进行测定。在其它实施方案中,鉴定推定缺乏目标核酸序列的转化玉米植物或分化的植物部分,其中在包含汇集所述多个玉米植物或分化的植物部分的合并核酸亚类的植物组织上进行测定。

[0011] 在一些实施方案中,在 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 6 周使玉米植物或玉米植物部分再生。在其它实施方案中,在 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 4 周使玉米植物或玉米植物部分再生。在又一些实施方案中,在 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 3 周使玉米植物或玉米植物部分再生。在再一些实施方案中,在 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 2 周使玉米植物或玉米植物部分再生。在其它实施方案中,在 DNA 区段转化到玉米植物细胞后不迟于 1 周使玉米植物或玉米植物部分再生。

[0012] 在某些实施方案中,通过细菌介导的转化、电穿孔、PEG 介导的转化或粒子轰击法,将 DNA 区段引入玉米植物细胞中。在具体的实施方案中,细菌介导的转化是由选自土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 细胞、根瘤菌 (*Rhizobium*) 细胞、中华根瘤菌 (*Sinorhizobium*) 细胞和中间根瘤菌 (*Mesorhizobium*) 细胞的细菌细胞介导的。

[0013] 该方法还可包括在植物或植物部分再生后、使从第一玉米植物细胞获取的玉米植物或植物部分经历培养条件的步骤,所述条件选择或允许筛选目标核酸序列的存在与否。在某些实施方案中,生长培养基是固体培养基。在又一些实施方案中,生长培养基是液体。在再一些实施方案中,生长培养基是土壤。在其它实施方案中,再生植物或分化的植物部分就 DNA 区段的存在而言是一致的。

[0014] 附图简述

[0015] 下列附图构成本说明书的组成部分,用于进一步证明本发明的某些方面。参考这些附图中的一幅或多幅并结合本文所给出的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0016] 图 1. 无选择 (“no sel”) 转化方案和 2T 转化方案的示意性比较。(有关 2T 策略的细节请参见 Huang 等,2004)。

[0017] 图 2. 用代表性再生品系的 GUS 进行的组织化学分析。

[0018] 图 3. 通过用草甘膦溶液喷洒各植株后“无选择”方法的草甘膦耐受性事件的恢复。

- [0019] 图 4. 来自如实施例 4 所述的所选 R₀ 植物的代表性 DNA 印迹分析数据。
- [0020] 图 5. 用 R₀ 花粉和与亲本系回交验证 GUS 基因的继代种系传递和分离。
- [0021] 图 6. 所选独立转化事件后代的 DNA 印迹分析数据, 证明转化序列 (CP4 基因) 的稳定传递。
- [0022] 图 7. 安排生长穴盆以允许在转基因序列存在的测定后容易鉴定各个植株。
- [0023] 图 8. 利用半固体培养基 - 比较有选择方法和无选择方法的再生方案的示意图。
- [0024] 图 9. 用获取再生植株之前的无选择液体培养的再生方案 - 增殖培养基的比较。

具体实施方式

[0025] 许多现代遗传转化植物的产品开发都包括将多个转基因性状集中在一起, 从而给农民们提供多个增值性状。该方法的一个主要瓶颈就是存在着选择标记基因, 在转化期间这些基因与目标基因 (GOI) 一起携带, 因为该过程通常依赖于使用选择标记基因以确保植物细胞的转化。尽管在转化后去除选择标记基因有多种方法可行, 但这些方法通常都耗时且效率也不高。

[0026] 本发明通过开发无需使用选择标记基因的有效转化方法, 以及用于推进无选择产生的转基因事件的有效的植物处理和筛选方法, 从而消除了上述瓶颈。具体地讲, 本发明涉及不用选择而提高植物转化效率和随后再生的方法, 导致产生无标记转基因事件。这是产生转基因作物的一项重大突破, 因为少标记的转化 (以及随后在选择剂不存在时进行植物再生) 避免了去除标记所带来的麻烦, 避免了因需要启动选择标记基因表达而使所得转化事件遗传结构发生偏倚, 同时也避免了后代生长期间的潜在困难 (例如因为相应 GOI 与选择标记编码基因的转基因分离)。该方法也消除了对用于可选择或可筛选标记基因的额外表达盒的需要, 因而降低了转化载体的大小并带来相关益处 (例如降低了因重复性盒序列所致沉默机会, 降低了启动子干扰并简化了转化载体的构建)。

[0027] 无选择标记转基因植物的高通量产生, 需要转化体的有效产生。优选的是无选择转化、尤其是在获得再生苗或完整小植株 (包含苗和根) 之前的无选择转化, 可以在选择剂不存在时进行。在某些实施方案中, 转化到靶植物细胞的核酸序列可不包含选择标记基因。在其它实施方案中, 可存在选择标记基因或目测标记基因, 但转化细胞和再生组织仍然不经历选择剂, 所述选择剂是选择标记基因所能耐受、抵抗或对其具有指定的其它可测定表型。

[0028] 此外, 优选这些转化体对于 GOI 的存在而言是非嵌合的 (即一致的), 因为对于 GOI 的存在而言是非一致的嵌合植物组织的存在, 使得对含 GOI 的后代植物的进一步分析、产生和鉴定变得复杂化。因此, 已经发现, 对常规产生非嵌合转基因植物而言的无选择转化 (包括随后的再生步骤) 需要有效产生大的转基因部分并快速产生苗原基 (shoot primordia)。

[0029] 此外, 在选择压力不存在时, 大量植物都可再生, 它们许多或大多数都缺乏 GOI。因此, 提供了用于再生、培育和鉴定潜在包含 GOI 的植物的有效方法。在某些实施方案中, 植物的再生是在半固体培养基中进行, 然后将推定的转化体移栽到土壤中。在其它实施方案中, 培养基可以是液体的。在又一些实施方案中, 在再生期间, 可采用半固体和液体培养基的组合, 以便在筛选和移至组织培养期间所用的不同生长条件时进行植物的处理并能节

省时间、金钱和费用。在再一些实施方案中,再生期间只使用液体培养基。在具体的实施方案中,在液体培养基上再生可提高目标基因所接触细胞的转化频率。

[0030] 在再生出转化植株的整个组织培养步骤中,选择剂的存在可使所选组织特性发生偏倚,所述偏倚基本上需要某水平的选择标记的表达,以使组织在选择压力下存活。举例来说,这可导致倾向得到异源核酸序列的多重或复合插入的转基因事件的偏倚。因此,本发明提供得到推定转化植物群体或系列的方法,所述方法不需要让植物在组织培养(例如愈伤组织增殖、预再生(pre-regeneration)和再生)阶段期间经历这样的选择压力,而且所述植物可表现出有利的 GOI 表达特性、和/或在指定事件中发现的转基因插入位点分子结构和遗传分离相关的有利特性。具体地讲,这样的有利特性可包括例如表现出 GOI 的有利表达水平的有效比例的转化事件,或表现出低拷贝数(即 1-2 拷贝)插入的有效比例的转化事件。在具体的实施方案中,低拷贝数转化事件缺乏 oriV 或其它载体骨架(backbone)序列,如果这些序列在转化过程开始最初接触植物细胞的原始转化构建体中存在的话。

[0031] 根据本发明方法,无这类选择的转化和再生是可重现且有效的。在某些实施方案中,转化频率(transformation frequency, TF)定义为所得到的稳定转化的一致(即非嵌合)植物的数量除以包含与异源核酸构建体接触的细胞的未成熟胚或其它外植体;转化频率为至少 3%,根据胚的大小和培养条件(包括再生方法种类)的不同,转化频率的范围为约 3%至约 60%。在具体的实施方案中,TF 的范围为约 10%至约 15%。或者,可用其它方式计算 TF,例如根据所得转化植株数量除以所述未成熟胚或其它外植体中再生并生长的植株数量而求出 TF。

[0032] 在某些实施方案中,无选择转化的作物选自单子叶作物,包括禾本科(Poaceae),例如玉米、水稻、高粱、小麦、黑麦、黍、甘蔗、燕麦、小黑麦、草坪草(turfgrass)和柳枝稷(switchgrass)植物。在一个具体的实施方案中,作物是玉米植物。在某些实施方案中,接触异源核酸序列的转化靶组织(例如外植体)包括分生组织,例如胚或苗分生组织(shoot meristem)。在某些实施方案中,外植体是胚。在具体的实施方案中,胚是未成熟胚。在再一些实施方案中,未成熟胚是未成熟玉米胚,大小介于约 1.9-3.5mm 之间,或大小介于约 1.6-1.8mm 之间。在具体的实施方案中,未成熟玉米胚的大小介于约 1.9-2.5mm 之间,优选约 2.3mm。在其它实施方案中,未成熟玉米胚的大小为约 2.5-3.2mm,或约 2.8-4.0mm。根据其发育阶段或分离时间、授粉后的天数(DAP)(例如约 9-14 天 DAP 或约 10-12DAP),也可选择未成熟胚作为转化靶。

[0033] 为了启动本发明的转化过程,首先需要选择准备插入到植物细胞或组织中的遗传组件。遗传组件可包括用本发明方法引入到植物细胞或组织中的任何核酸。遗传组件可包括非植物 DNA、植物 DNA 或合成 DNA。

[0034] 在一个优选的实施方案中,将遗传组件掺入到 DNA 组成中,例如包含至少一个或更多以下类型的遗传组件的重组双链质粒或载体分子:(a) 在植物细胞中起作用并导致产生 RNA 序列的启动子,(b) 导致产生农艺学有用产物的编码 RNA 序列的结构 DNA 序列,和(c) 在植物细胞中起作用并使聚腺苷酸化核苷酸添加到 RNA 序列 3' 端的 3' 非翻译 DNA 序列。

[0035] 载体可含有大量遗传组件以便转化植物细胞或组织并调节所需基因的表达。在一个优选的实施方案中,遗传组件是定向的,以便能表达 mRNA,而在一个实施方案中可翻译为蛋白质。以双链形式存在的植物结构编码序列(基因,cDNA、合成 DNA 或其它 DNA)的表达

包括通过 RNA 聚合酶从一条 DNA 链转录出信使 RNA (mRNA), 然后在核内加工 mRNA 初级转录物。该加工涉及将聚腺苷酸化核苷酸添加到 mRNA 的 3' 端的 3' 非翻译区。

[0036] 含所需遗传组件的质粒或载体的制备方法是本领域众所周知的。载体通常由大量遗传组件组成, 包括但不限于调节元件, 例如启动子、前导序列、内含子和终止序列。根据元件与它们所控制的序列或基因的接近度, 调节元件也称为顺式或反式调节元件。

[0037] 将 DNA 转录为 mRNA 是由通常称为“启动子”的 DNA 区调节的。启动子区含有这样的碱基序列: 所述序列发信号给 RNA 聚合酶而使其与 DNA 缔合并启动转录为 mRNA, 用 DNA 链之一为模板制备相应的 RNA 互补链。

[0038] 文献中已经介绍了在植物细胞中具有活性的大量启动子。这些启动子可包括但不限于根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 根瘤诱导质粒携带的胭脂碱合酶 (NOS) 和章鱼碱合酶 (OCS) 的启动子、花椰菜花叶病毒启动子 (例如花椰菜花叶病毒 (CaMV) 19S 启动子和 35S 启动子) 以及玄参花叶病毒 (FMV) 35S 启动子、增强型 CaMV35S 启动子 (e35S)、核酮糖二磷酸羧化酶小亚基 (ssRUBISCO, 一种非常丰富的植物多肽) 的光诱导型启动子。所有这些启动子都已用于产生各类 DNA 构建体, 其已在植物中表达。

[0039] 也可构建启动子杂合体以增强转录活性 (美国专利号 5, 106, 739), 或与所需转录活性、诱导性和组织特异性或发育特异性结合。在植物中起作用的启动子包括但不限于所述诱导型启动子、病毒启动子、合成启动子、组成型启动子以及用于时间调节、空间调节和时空调节的启动子。本领域也已知组织增强型启动子、组织特异性启动子或发育调节型启动子等其它启动子, 它们都可用于本发明的实践中。

[0040] 启动子可得自不同来源, 例如来自植物和植物 DNA 病毒, 包括但不限于 CaMV35S 和 FMV35S 启动子和从植物基因 (例如 ssRUBISCO 基因) 中分离的启动子。如下所述, 优选的是所选具体启动子应当能引起足够表达, 导致产生有效量的目标基因产物。

[0041] 如有必要, 可修饰本发明 DNA 构建体 (例如嵌合 / 重组植物基因) 中所用的启动子, 以影响其控制特性。可通过与操纵子区连接、随机或控制诱变等方式来衍生启动子。此外, 可改变启动子, 使其含有多个“增强子序列”以便提高基因表达。

[0042] 本发明 DNA 构建体所产生的 mRNA 也可含有 5' 非翻译前导序列。该序列可衍生自选择用于表达基因的启动子, 并可经过特异性修饰以增加 mRNA 的翻译。5' 非翻译区也可得自病毒 RNA、合适的真核基因或合成基因序列。这样的“增强子”序列有望提高或改变所得 mRNA 的翻译效率。本发明不限于这样的构建体: 其中非翻译区得自启动子序列所伴随的 5' 非翻译序列。相反, 非翻译前导序列可得自无关启动子或基因 (参见例如美国专利 5, 362, 865)。用于增强表达或影响基因转录或翻译的其它遗传组件也视为遗传组件。

[0043] 嵌合构建体 3' 非翻译区应含有转录终止子、或具有等同功能的元件以及在植物中起作用的聚腺苷酸化信号, 以使聚腺苷酸化核苷酸添加到 RNA 的 3' 端。合适 3' 区的实例是 (1) 含有土壤杆菌根瘤诱导 (Ti) 质粒基因 (例如胭脂碱合酶 (NOS) 基因) 聚腺苷酸化信号的 3' 转录、非翻译区, 和 (2) 植物基因例如大豆贮存蛋白基因和核酮糖 -1, 5- 二磷酸羧化酶小亚基 (ssRUBISCO) 基因。优选的 3' 区的实例来自豌豆的 ssRUBISCO E9 基因 (欧洲专利申请 0385962)。

[0044] 通常, 位于聚腺苷酸化位点下游几百个碱基对的 DNA 序列的作用是终止转录。该 DNA 序列在本文中称为转录终止区。该区是转录信使 RNA (mRNA) 的有效聚腺苷酸化所必需

的,称为 3' 非翻译区。RNA 聚合酶通过聚腺苷酸化发生位点转录编码 DNA 序列。

[0045] 在一个实施方案中, T-DNA 不包括可选择、可筛选或可记录的标记基因。或者,待转移的 DNA 可含有可选择、可筛选或可记录的标记基因,尽管在本发明的某些实施方案中,仅仅为了在再生发生后标记的存在而选择或筛选植物组织。这些遗传组件在本文中也称为功能性遗传组件,因为它们产生在转化植物鉴定中起作用的产物或具有农艺学用途的产物。利用选择组分的 DNA 在可再生植物组织(尤其是已再生组织)中起作用,以产生赋予植物组织抵抗别的毒性化合物的化合物。用作可选择、可筛选或可记录标记的目标基因包括但不限于编码 GUS 的 uidA、编码绿色荧光蛋白(GFP)的 gfp、花色素苷生物合成相关基因(CI, B-peru)、萤光素酶(LUX)基因和赋予例如卡那霉素等抗生素抗性的基因(Dekeyser 等, 1989)和赋予例如草甘膦等除草剂抗性的基因(Della-Cioppa 等, 1987)。其它选择方法也可采用,包括但不限于草胺膦(phosphinothricin)耐受性、双丙氨膦耐受性和阳性选择机制,它们也都落入本发明的范围之内。

[0046] 本发明可以与任何合适的植物转化质粒或载体一起使用,所述质粒或载体含有可选择或可筛选标记和所述相关调节元件,以及一个或多个核酸,其表达方式足以赋予特定性状。本发明所包括的合适的具有农艺学价值的结构基因的实例包括但不限于昆虫或病虫害耐受性基因、除草剂耐受性基因、品质改良基因(例如产量、营养增强、环境或胁迫的耐受性)、或者在植物生理、生长、发育、形态或植物产物方面的任何所需改变的基因。

[0047] 或者, DNA 编码序列可通过编码非翻译 RNA 分子而影响这些表型,其可导致对内源基因表达的定向抑制,例如通过反义或共抑制介导的机制(参见例如 Bird 等, 1991)。RNA 也可以是催化性 RNA 分子(例如核酶),所述分子经改造可切割所需内源 mRNA 产物(参见例如 Gibson 和 Shillitoe, 1997)。更具体地讲,有关基因表达在植物细胞中的反义调节的描述,可参见美国专利 5, 107, 065;有关植物中通过 dsRNA 转录所致的基因抑制的描述,可参见美国专利 6, 506, 559、美国专利申请公布说明书号 2002/0168707A1 和美国专利申请顺序号 09/423, 143(参见 WO 98/53083)、09/127, 735(参见 WO 99/53050)和 09/084, 942(参见 WO 99/61631),所有这些文献都通过引用结合到本文中。因此,能产生表达目标表型或形态变化的蛋白质或 mRNA 的任何基因都可用于本发明的实践。

[0048] 可通过本发明方法引入的示例性核酸包括例如来自另一物种的 DNA 序列或基因,或者甚至是原来存在于相同物种、但通过遗传工程方法(而非传统繁殖或育种技术)掺入到受体细胞的基因或序列。然而,术语外源也指在所转化的细胞中通常不存在的基因,或者仅在转化 DNA 区段或基因的某种形式、结构等中不存在的基因,或者是当人们需要时(例如过量表达)正常存在的基因。因此,术语“外源”基因或 DNA 是指引入受体细胞的任何基因或 DNA 区段,无论类似基因在所述细胞中是否已经存在。外源 DNA 所包括的 DNA 类型可包括植物细胞中已经存在的 DNA、来自另一植物的 DNA、来自不同生物体的 DNA 或外部产生的 DNA(例如含基因的反义信息的 DNA 序列)或编码基因的合成或修饰形式的 DNA 序列。

[0049] 将 DNA 引入细胞的技术是本领域技术人员众所周知的,可分为包括但不限于下列类型:(1) 化学方法;(2) 物理方法,例如显微注射、电穿孔和微弹轰击;(3) 病毒载体;(4) 受体介导机制;和(5) 根瘤菌介导(例如土壤杆菌介导)的植物转化方法(例如 Broothaerts 等, 2005)。

[0050] 对于土壤杆菌介导的转化,在构建植物转化载体或构建体之后,将体外制备成 DNA

组分的所述核酸分子引入合适的宿主（例如大肠杆菌 (*E. coli*)）中并与另一合适宿主（例如土壤杆菌）交配，或直接转化到感受态土壤杆菌。这些技术是本领域技术人员众所周知的，已经描述了用于包括以下许多植物系统在内的所述技术：大豆、棉花和小麦（参见例如美国专利号 5,569,834 和 5,159,135 和 WO 97/48814，通过引用全部结合到本文中）。

[0051] 本发明包括用细菌菌株将一个或多个遗传组件引入植物中。本领域技术人员将会知道土壤杆菌介导的转化方法在这类过程中的应用。携带 Ti 质粒或 Ri 质粒的根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 的许多野生型菌株和解武装菌株 (disarmed strain) 可用于将基因传递给植物。优选的土壤杆菌宿主分别含有解武装 Ti 质粒和 Ri 质粒（其不含引起根瘤或发根的癌基因），所述质粒用作载体并含有随后引入植物的目标基因。优选的菌株可包括但不限于来自 C58 菌株的根癌土壤杆菌，胭脂碱型菌株（可用于介导将 DNA 传递给植物细胞）、章鱼碱型菌株（例如 LBA4404）或琥珀碱型菌株（例如 EHA101 或 EHA105）。可以修饰与植物具有天然相互作用的其它细菌（例如中华根瘤菌、根瘤菌和中间根瘤菌）以介导将基因传递给各种不同植物。可以使这些植物相关的共生菌成为感受态，用于通过同时得到解武装 Ti 质粒和合适二元载体而进行基因传递 (Broothaerts 等, 2005)。这些菌株在植物转化中的应用已有报道，这些方法是本领域技术人员熟知的。

[0052] 外植体可来自单一基因型或来自基因型组合。任何可发芽的玉米种子都是有活力的原料。在一个优选的实施方案中，来自植物杂种的优良外植体可用作外植体。例如，可用含有几种基因型的杂种胚产生具有高培养响应（更高频率的胚性愈伤组织形成、生长率、植物再生率等）的快速生长的细胞系。在一个实施方案中，杂交育种的 F₁ 杂种或第一代后代可用作供体植物并与另一基因型杂交。本领域技术人员知道，当两个近交系杂交时会产生杂种优势（在本文中也称为“杂种活力”）。因此，本发明包括使用来自三系杂交的外植体，其中至少一个或更多近交系是高度可再生和可转化的，而且三系杂交外植体的转化和再生频率超过近交系各自的频率。其它组织也可用于本发明的实践。外植体可包括成熟胚、未成熟胚、分生组织、愈伤组织或可转化和可再生的任何其它组织。

[0053] 在转化过程中任何合适的植物培养基都可能使用。这些培养基的实例可包括但不限于 Murashige 和 Skoog (1962), N6 (Chu 等, 1975); Linsmaier 和 Skoog (1965); Uchimiya 和 Murashige (1962); Gamborg 氏培养基 (1968), D 培养基 (Duncan 等, 1985), McCown 氏 Woody 植物培养基 (McCown 和 Lloyd, 1981), Nitsch 和 Nitsch (1969), 以及 Schenk 和 Hildebrandt (1972) 或这些补充培养基的衍生物，以及以下描述的多种培养基。本领域技术人员知道，可以针对具体的目标变种来优化培养基和培养基补充物（例如用于转化和再生的营养物和生长调节剂）和其它培养条件（例如培养时的光强度、pH 和培养温度）。

[0054] 在包含苗、或者包含苗和根的小植株再生出来之后，可对小植株或小植株部分施用选择剂，例如如果选择标记基因与 GOI 一起转化到原始靶植物细胞中的话，或者如果 GOI 本身就编码选择标记的话。因此，当通过本发明方法产生植物后，可根据本发明将选择剂施用于所述植物，以便测定或鉴定显示有用特性的转化植物。

[0055] 本发明也包括有效处理再生植株的方法，所述方法允许鉴定含有 GOI 的转化植物。这些方法简化并理顺了再生和培育推定转化植物群体的过程，节省了过程所需的时间、空间和费用，并使该方法成为商业上可行的方法。

[0056] 在一个实施方案中，将植物靶组织（例如未成熟玉米胚 (IE)）与包含 GOI 的土壤

杆菌菌株在 23℃ 共培养例如 1-3 天,然后在相同的共培养培养基或愈伤组织增殖培养基上,在 30℃ 继续再培养~7-10 天。观察胚,以便鉴定哪些胚“有反应”,即产生可再生而形成小植株的胚性愈伤组织。然后,将具有愈伤组织的有反应的胚(通常是盾片愈伤组织)从共培养物中移入第一预再生培养基或第一再生培养基中,用合适的温度、光照和营养的培养条件,让愈伤组织进一步生长、分化和再生。可将愈伤组织放入半固体再生培养基中或放在其上。或者,可将它们放在接触液体再生培养基的支持物(例如培养板中的垫子(felt)和/或滤纸)上,使愈伤组织可以生长和分化。

[0057] 如有需要,可以培养接种的胚,例如在 30℃ 暗培养 1-2 周,包括移至新鲜营养培养基。在暗培养后,培养物可在再生培养基中在光照黑暗交替周期中生长,例如在 16/8 光照/黑暗周期下生长 1-3 周,在约 27℃,光强度为约 100 μ E,或根据所研究的植物种或变种的合适条件和植物组织培养领域技术人员知识。通常,在开始共培养的 1-3 周内植物开始再生,尤其是当存在生长的愈伤组织阶段(callus phase of growth)时。该方法也可包括预再生步骤,其包括使用含有比愈伤组织增殖培养基中的植物生长素水平更低的基础植物组织培养基。

[0058] 在半固体或液体培养基上培养和再生约 2-3 周后,可将从单个外植体(例如未成熟胚(IE))再生出的植株移入单个生长培养基容器中。一个这样的实例是 PHYTATRAY(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),其包含半固体或液体植物组织培养再生培养基并让其生长约 4 周,然后将所得植株移入生长培养基(例如土壤中的生长穴盆)中以便进行壮苗。因为移栽到土壤中是时间和劳动密集型过程,所以最好在移栽之前筛选各植株,或者甚至在将它们放入 PHYTATRAY 之前就筛选出存在 GOI 或其它目标性状的植株。在选择压力不存在时,再生小植株的数量可以比在愈伤组织生长和植物再生期间使用了选择剂的类似实验高出 20-50 倍。因此,提供了处理大量植物的方法,例如将其从组织培养期移至非无菌条件下生长时。本发明的再一个实施方案是在非无菌条件下使用园艺穴盆或分离的培养管或盘,以允许小植株生长并进行分析。这些小植株还可以这样培养:无需标记所有单个植株、而是对生长的植株进行适当分组,以便容易找出给定植株及其组织之间的相关性,所述组织经历一种或多种测定或筛选以鉴定含 GOI 的转化植物。

[0059] 在一个实施方案中,可采用基于 PCR 的筛选,以便在移入生长培养基(包括液体生长培养基,例如在 PHYTATRAY 中)之前就能排除非转化植物。因此,例如在用细菌菌株转化时如果使用约 5000 个未成熟玉米胚,则可产生约 25,000 株植物,需要约 5,000 个 PHYTATRAY。如果达到约 10% 的转化频率,处于 PHYTATRAY 生长期的再生植株的初次筛选将得到约 2500 株推定的转化植物,相当于 500 个有反应的胚或需要约 500 个 PHYTATRAY,它们可移入土壤中的生长穴盆。筛选方法可包括将来自各个 Phytatray 或任何其它生长容器(例如穴盆)的再生植株的组织合并起来。设计合并的组织可用于通过分析多个合并组织来鉴定群体的单个成员,而无需单独分析群体的每个成员。一个合并的方法是将来自 PHYTATRAY 或类似生长容器中的外植体(优选 IE)的所有植物分组,并弃去阴性容器,因而极大地减少了植物处理和检测相关工作量。合并在一起的植株数量还可进一步增加到 PCR 测定的检出限。

[0060] 可处理生长穴盆或将其分组,以提高进一步筛选步骤的效率,而且不需要给每个再生植株做标签。例如可将穴盆分组排列,以对应于测定模式使用的微量滴定板,例如植

物生长在 96 个穴盆组中,对应于 96 孔板。这可快速准确地建立测定结果与植物(测定组织正是自这些植物分离的)之间的关系。在某些实施方案中,在推定转化再生的无标记植物中检测 GOI 存在与否的测定可选自基于 PCR 的测定、DNA 印迹杂交、DNA 测序、RNA 印迹、蛋白质印迹、免疫测定和在与土壤杆菌共培养期间接触靶组织的转基因 DNA 区段所编码的酶活性测定。在一个具体的实施方案中,测定是基于 PCR 的测定。在某些实施方案中,基于 PCR 的测定或其它测定是在自再生植株分离的植物组织上进行的,其中再生植株生长在 PHYATRAY 或等同物上,随后才移栽到基于土壤的生长培养基上。

[0061] 对于得到无标记转基因植物而言,本发明的方法比其它典型方法更有效,所述其它方法例如土壤杆菌介导的方法,使用一个或多个含 GOI 的 T-DNA 和可选择或可筛选标记(图 1)。本发明的各实施方案提供的优势包括:

[0062] 1. 转化构建体较小,简化了克隆过程。

[0063] 2. 标记基因表达盒的消除释放了标记盒所需的表达元件,减少了因重复元件存在所致的重组稳定性的有关问题。标记盒中重复调节元件的消除也可降低基因沉默的可能性。

[0064] 3. R_0 植物的筛选方法更简化。在现有方法中,必须筛选至少两个元件(GOI 和选择标记基因)。在本发明方法中,无需筛选标记。另外,需要筛选 GOI 阳性植物以判定标记基因插入序列是否与 GOI 插入序列连锁,并且通常发现连锁,这会干扰对下一代缺乏选择标记的植物的鉴别能力。相反,连锁却并非本发明方法的问题。

[0065] 4. 也发现在后代中效率提高。对于现有方法(例如 2-T 转化方法),必须筛选一大群 F_1 植物或 R_1 植物才能鉴定 GOI 阳性的无标记植物。对于通过本发明方法产生的植物,不需要标记基因的分选。

[0066] 5. 允许更快速选出最好的含 GOI 事件、而不存在选择标记基因,因而有助于多个 GOI 的有效堆积,例如当选择标记基因编码目标农艺学性状时。

[0067] 本发明提供有效产生无标记转基因植物的方法,通常当原始靶外植体接触外源核酸后 7-10 周内,能够在基于土壤的培养基上生长。本发明的高通量方法允许开发有效的无选择转化系统。具体地讲,处理再生组织和再生植株的简化允许许多步骤的机械化并能节省时间、金钱和人机工程总费用。在每次转化实验中,本系统使用约 100 个胚,就可产生约 4-6 个可用的无标记转化事件(即单拷贝事件和无载体骨架事件),因此加快了转化植物产物的流程。

[0068] 实施例

[0069] 下列实施例用于说明本发明的实施方案。本领域技术人员应当知道,下列实施例中公开的技术代表本发明人发现的并在本发明实践中行之有效的技术。然而,根据本说明书,本领域技术人员应当知道,在不偏离本发明的构思、精神和范围的前提下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改动,而仍能得到同样或类似的结果。更具体地讲,应当清楚,某些化学和生理相关的试剂可以替代本文所述的试剂,而仍可达到相同或类似的结果。本领域技术人员显而易见的所有这些类似的替代和修改都视为在本发明的精神、范围和构思之内,如同所附权利要求书所限定的那样。

[0070] 实施例 1

[0071] 无标记转化

[0072] 可通过根瘤菌介导的方案进行可再生的未成熟玉米胚的转化,所述方案的一般性描述例如参见 Cai 等(美国专利申请公布说明书 20040244075)。具体地讲,使用改进的土壤杆菌介导的方法。从玉米穗中选出大小范围为 1.9-2.5mm(例如约 2.3mm)的未成熟胚并与 ABI 土壤杆菌菌株 C58 共培养,以介导 DNA 向含有目标重组构建体(例如同时含有处于肌动蛋白启动子表达控制之下的 GUS 和 CP4EPSPS 的 pMON93040)的植物细胞转移,从而允许对转化细胞和部分(sector)两者进行目测分析,并允许使用 Weathermax™ 草甘膦喷洒作为替代品,用于随后的再生后筛选,再进行转化植物的基于 PCR 的筛选的证实试验。也可使用较大的胚(例如大小为约 2.5mm 或最多至约 3.2mm),而且最好是通过在组织培养的预再生和再生期之前减少愈伤组织增殖而使每个胚产生很少植株。以下所用培养基组成见下表 1。用土壤杆菌接种后,将胚移至 Lynx 1947 或 Lynx 1898,在 23℃ 共培养 1-3 天,然后在 30℃ 在相同平板或愈伤组织增殖培养基(例如 Lynx 1316)上培养 7-14 天,最后在预再生培养基(Lynx 1844 ;2232 ;2197)或再生培养基(Lynx 1344、2282、2379 等)上培养。用下列两种方法进行植物的最后培育:1) 将来自每个胚源性愈伤组织的植株移至含 Lynx 1607 的 Phytatray™ 上或 2) 将来自每个胚源性愈伤组织的植株移至含液体 Lynx 2168 的 Phytatray™ 上。让植株在 Phytatray™ 中生长约 4 周,然后移至穴盆(Q Plugs,产自 International Horticultural Technologies, Hollister, CA)。在将植株移栽到穴盆前 1 周,当植株仍在 Phytatray™ 中时,自植株上采样并进行测定,以去除掉无 GOI 的植株。塞植后(post-plugging) 大约 10 天,自各植株采样,进行 DNA 印迹分析,鉴定 GOI 阳性植株并保留它们,使其进一步生长发育。

[0073]

表 1. 本发明不同方面所用的培养基组成。鉴定了代表性培养基的功能。

培养基成分/ L(供应商)	1898 共培养	1947	1316 愈伤 组织增殖	2133	2232	2197	2282	2379	1844 预再生	1344 再生	2168	1607 生长	1471
MS 基础盐 (Phytotech)	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g
MS 维生素 (100X) (Phytotech)	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
MSFromm 维生素 (1000X)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 mL	0	0	0
盐酸硫胺素 (Sigma)	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0	0	0	0	0	0
2,4-D (Phytotech)	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.2 mg	0.2 mg	0	0	0.2 mg	0	0	0	0
蔗糖(Phytotech)	30 g	30 g	30 g	30 g	50 g	50 g	50 g	60 g	40 g	30 g	60 g	60 g	60 g
脯氨酸(Sigma)	1.38 g	1.38 g	1.38 g	1.38 g	1.38 g	0	0	0	0	1.38 g	0	0	0
酪蛋白氨基酸 (Difco)	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0	0	0.5 g	0	0	0
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
低 EEO 琼脂糖 (Sigma)	5.5 g	5.5 g	5.5 g	5.5 g	5.5 g	0	0	0	0	0	0	0	0
Phytigel (Sigma)	0	0	3.0g	0	0	0	0	0	0	3.0g	0	0	0
Phytagar (Gibco)	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	6	6
高压灭菌后的添加物													
羧苄西林 (Phytotech)	50 mg	50 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg	250 mg	500 mg	100 mg	100 mg

[0074]

10-14 天,无选择。然后,愈伤组织在 Lynx 1844 培养基(表 1)预再生 10 天,接着在 Lynx 1344(表 1)上再生 10 天,最后在 Lynx 1471 上再生 3 周(表 1)。除了在 Lynx 1471 上培养之外,所有步骤都未使用选择剂;因此在共培养后 4 周在无选择剂下,发生愈伤组织的生长并再生出植株。最后一步在 Lynx 1471 上再生植株的生长是在低水平草甘膦(0.02mM,体积比)存在下进行至估计最大可能的转化频率。将组织移至 Lynx 1471 培养基之前,在转化后 4 周,将 24 个独立的来自胚的愈伤组织和相关组织染色以测定 GUS 活性。鉴定出 4 个 GUS 阳性苗,由此证明~16%转化效率。

[0078] 将组织移至 Phytatray 中的 Lynx 1471,让植株进一步生长,共再生出 43 个转基因事件,它们全都存活至移栽土壤。转化和拷贝数分析见下表 2。共有约 14%的存活植株逃逸,但约 45%的植株转化了 1-2 个插入序列。转化后 5 周,代表性再生愈伤组织系的组织化学分析见图 2。

[0079] 表 2. 仅在植物再生最后步骤期间用有选择的有效转化表明形成了无选择的有效转化部分。

[0080]

实验	外植体数量	移入土壤数量(存活)	0-拷贝	1-拷贝	2-拷贝	>2 拷贝	1 拷贝和 oriV (-)	2 拷贝和 oriV (-)
6678	200	43 (21.5%)	6 (14%)	12 (28%)	7 (16%)	8 (19%)	9 (21%)	4 (9%)

[0081] 实施例 3

[0082] 额外的玉米转化和再生实验,对推定转化植物的筛选

[0083] 又进行了 3 项研究以证实在任何时期都不用选择时转基因部分的有效再生是常规可行的。所用质粒是如上所述的 pMON93040。在 Lynx1898 上共培养 1 天后,在 Lynx 1316 上进行愈伤组织增殖达 10 天,在 Lynx 1844 上预再生 10 天,然后在 Lynx 1344 上再生 3 天,接着在 Lynx 1607 上生长。用单个玉米穗分离胚,用于每次实验,所述胚的大小范围为 2.8-3.2mm。在两项研究中,进行胚的接种,直接将分离胚接种到土壤杆菌悬液(在 $O.D._{660} = 1.0$ 时)中,而在其它研究中,胚初次分离到下列成分的 1ml 液体 Lynx 1013 培养基(1 升)中,接着用 $O.D._{660} = 1.0$ 的土壤杆菌悬液进行接种:MS 基础盐(Phytotech):2.165g;MS 维生素(100X;Phytotech):10ml;蔗糖(Phytotech):68.5g;脯氨酸(Fisher):0.115g.;葡萄糖(Phytotech)36g,用 KOH 将培养基调节至 pH5.4,然后过滤除菌。研究结果见下表 3。

[0084] 表 3. 额外的玉米无选择转化。

[0085]

实验	IES 数量		穴盆中的 植株数量	gus /CP4 阳性植株数量	事件数量/100 株植物 (估计)
6688-2	110 (48)*		230	8	3.5
6698-2	110 (52)*		240	9	3.8
6700-2	100 (50)*		253	20	7.9
			平均值/100 株植物		5.1
*括号中的数据表示有反应的胚的数量; ~50%胚在培养中有反应					
“IES 数量”=接种的未成熟胚的数量					

[0086] 在再生周期结束时,将每次实验的植株移栽到穴盆中,超过 95%的植株移栽成活,证明繁殖穴盆提供了处理大量植株的改良方式。移栽后约 10 天,用组织化学染色,对每棵植株叶片打孔测定 GUS 活性,再移栽 GUS 阳性植株,用于进一步生长和组织化学分析。为了进一步证明转化频率并提高方案的总效率,开发出一种基于 PCR 筛选的替代方法,其中将 1% WeatherMax™(草甘膦)施用于 GUS 阴性植株。鉴定出另外 5 株耐草甘膦植株(从实验 6700-2 鉴定出 3 株,从实验 6698-2 和实验 6688-2 中分别鉴定出 1 株(参见图 3 的代表性植株)。共 37 株植物得自穴盆中的 723 株植物,每株植物的收率估计为 5%的成功率(表 3)。用未成熟胚的无选择转化的结果表明,该方法是有用的,基于所筛选的植株数量计算具有平均为 5%的转化频率。

[0087] 为了进一步证明无选择转化方案的重现性并提高方案的总效率,开发出一种基于 PCR 筛选的替代方法,其中在 PHYTATRAY 中的无选择再生周期结束以后施用 1% WeatherMax™(草甘膦)。结果见下表 4 和表 5。

[0088] 表 4. 有效并可重现的玉米无选择转化

[0089]

实验	接种胚的 数量	IE 大小	筛选 phytas 数量	估计植株 数量	cp4+事 件数量	事件数量/100 株植物 (估计)
6705-1	130	2.8-3.2	19	380	9	2.4
6705-2	140	2.8-3.2	13	260	7	2.7
6706-3	110	1.8-2.0	22	440	35	8
6829-1	100	2.8-3.0	28	560	27	4.8
6829-2	100	2.8-3.0	30	600	43	7.2
6829-3	80	2.8-3.2	10	200	11	5.5
6829-4	80	2.8-3.2	9	180	3	1.7
6829-5	80	2.8-3.2	8	160	4	2.5
6829-6	80	2.8-3.2	7	140	2	1.4
	900		146	2920	141	4.8

[0090] 表 5. 具有较低拷贝插入序列的事件从无选择转化中有效恢复。

[0091]

实验	接种胚的数量	穴盆中存活的事件数量	总计 (1-2 个拷贝)
6705-1	130	9	7(77.7%)
6705-2	140	7	2(28.6%)
6706-3	110	35	29(82.9%)
6829-1	100	27	18(66.7%)
6829-2	100	43	30(69.8%)
6829-3	80	11	8(72.2%)
6829-4	80	3	2(66.7%)
6829-5	80	4	3(75.0%)
6829-6	80	2	1(50.0%)
总计	900	141	100(70.9%)

[0092]

[0093] 结果表明,在总共 900 个胚中,产生了 141 株耐草甘膦植株,包括具有较低目标基因拷贝数(1-2 个拷贝)的 100 株,即基于所接种的未成熟胚的数量计算具有平均为约 15% TF。

[0094] 进一步筛选(表 6)表明,在通过表 5 所示的 100 个低拷贝数事件的 DNA 印迹分析筛选出的 90 个事件中,存在 79 个独立整合事件。姊妹事件是具有相同条带模式并来自同一外植体的事件。更高转化频率导致具有姊妹事件的转基因事件的更高百分率。然而,其频率非常低,而且 DNA 印迹分析揭示~5%表现出克隆性(clonality),尤其是当 TF > 30% 时(表 5 和 6)。

[0095] 表 6. 无选择转化效率 - 所产生的独立整合事件的数量。

[0096]

实验	通过 DNA 印迹分析的事件数量 (1 和 2 个拷贝)	姊妹事件数量
6705-1	1	0
6705-2	7	0
6706-3	25	3
6829-1	16	1
6829-2	27	1
6829-3	8	0
6829-4	2	0
6829-5	3	0
6829-6	1	0
总计	90	5

[0097] 实施例 4

[0098] 证实无选择压力下转化和再生后,转移 DNA 的染色体整合

[0099] 使用例如 Dellaporta(1983) 所述方法,从 R_0 植物叶片中分离基因组 DNA。基因组 DNA (20–30 μ g) 用 HindIII 消化,在 0.7% (重量 / 体积) 琼脂糖凝胶上进行分离,再转移到带正电荷的尼龙膜 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 上。用非放射性的基于 DIG 的系统 (Roche Molecular Biochemicals),按照制造商的方案,进行膜的预杂交、杂交、洗涤和检测。CP4 基因的 DNA 序列经 PCR 标记,以产生探针。HindIII 酶在载体中切割一次 (靠近 CP4 表达盒的 5' 端),因此, DNA 印迹条带数对应于 CP4 基因拷贝数。在所选植株上进行 DNA 印迹分析,见表 3 (即选择 22 个较低拷贝事件)。 R_0 植物的代表性 DNA 印迹分析数据见图 4。分析表明,从 320 个胚产生的共 37 个事件中产生了 8 个 (单拷贝, oriV 阴性) 事件 (表 3)。为了进一步证实种系继代传递,将 R_0 植物与亲本非转化近交玉米系杂交。在该项研究中,使用来自 3 种独立品系的 R1 植物; ZM_187694 (4 拷贝 -cp4); ZM_189983 (0 拷贝, cp-4- 可能的 cp4 截短事件); ZM_187738 (3 拷贝 -cp4)。对发育中的穗的 gus 表达进行组织化学分析表明,阳性玉米粒与未表达玉米粒的比例为 1 : 1,表明转基因和连锁的种系传递 (图 5)。该结果证实无选择产生的转基因事件的转基因种系传递。用 CP4 基因作为探针,也通过 DNA 印迹分析对 3 个额外独立事件 ZM_187692、ZM_18997 和 ZM_18998 的后代进行了分析 (图 6),表明从这 3 种不同 R_0 植物获得的所有后代都表现出预期模式,即转基因事件向下一代稳定传递。

[0100] 实施例 5

[0101] 有效的植物处理

[0102] 有效处理多个植株的方法是在获得再生植株前不用选择剂的有效植物转化系统的一个重要组成部分。这是因为需要筛选大量植物,以鉴定具有合适的插入序列拷贝数和复杂性、以及 GOI 表达的转化植物。该“处理” (例如转移或移栽到培养基或土壤中以便进一步生长;和在筛选步骤期间保留识别标记) 允许在一个放有独立穴盆或培养管的容器内处理多个小植株,同时保留植株各自的识别标记,而且还有利于在无单个植物标签时进行数据采集。在“园艺穴盆”中培育植物、省略对每株植物分别做标签并开发用于采集测定数

据的方案以鉴定和向前推动所需事件,这一系列工作加快了基于在基因转移和再生期间无选择的转化流程。总之,本发明涉及有效的植物无选择转化系统、植物处理和数据采集的开发。

[0103] 将从与含有目标基因的土壤杆菌菌株共培养的愈伤组织再生出的推定转化植株,从例如 Phytatray™ 移栽到生长穴盆的土壤中。使用这些穴盆使植物的采样和分析更流畅并能节省生长空间。例如,将穴盆安排的模式对应于例如 96 孔微量滴定板的各孔(例如图 7),如果植物样品的测定在这样的微量滴定板中进行时。这允许方便地鉴定出具有目标测定表型的植物,而无需给每个植株单独做标签。

[0104] 通过基于 PCR 或其它分子筛选,完成不含 GOI 植株的早期排除,当植株在 PHYTATRAYS 的半固体或液体培养基中再生时,然后再将植株移栽到生长穴盆或土壤。

[0105] 实施例 6

[0106] 在转化植物再生期间用于培养的半固体培养基

[0107] 用于在转化和组织培养过程中愈伤组织生长、预再生和再生期间的培养用半固体培养基允许有效的组织操作。图 8 归纳了无选择剂时进行的转化研究(下图),与在选择剂存在下培养植物组织的平行研究(上图)进行比较。参见表 1 和表 7 的培养基成分。愈伤组织增殖、预再生和再生期均在所示的半固体培养基中进行。在第二再生期后,将植株移栽到生长穴盆中,测定 GOI 的存在。

[0108] 表 7. 在现有方法中使用的含有半固体含草甘膦选择培养基的培养基组成(Cai 等;美国专利申请公布说明书 2004/00244075)。

[0109]

培养基成分/L (供应商)	1233 (共培养)	1278 (选择)	1073 (第 1 次再生)	1071 (第 2 次再生)	1084 (生根)
MS 基础盐 (Phytotech)	2.165 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	2.165 g
MS 维生素(100X) (Phytotech)	10 mL	10 mL	0	0	0
MS Fromm 维生素 (1000X)*	0	0	1 mL	1 mL	0
BAP (Sigma)	0	0.01 mg	3.5 mg	0	0
盐酸硫胺素(Sigma)	0.5 mg	0.5 mg	0	0	0
2,4-D (Phytotech)	3 mg	0.5 mg	0	0	0
NAA (Sigma)	0	0	0	0	0.5 mg
IBA (Sigma)	0	0	0	0	0.75mg
蔗糖(Phytotech)	20 g	30 g	30 g	0	20 g
葡萄糖(Phytotech)	10 g	0	0	10 g	0
麦芽糖(Phytotech)	0	0	0	20 g	0
脯氨酸(Sigma)	115 mg	1.38 g	1.38 g	0	0
酪蛋白氨基酸 (Difco)	0	0.5 g	0.05 g	0.5	0
天冬酰胺一水合物 (Sigma)	0	0	0	0.15	0
肌醇(Sigma)	0	0	0	0.1 g	0
低 EEO 琼脂糖 (Sigma)	5.5 g	0	0	0	0
Phytigel (Sigma)	0	3 g	3 g	3 g	3 g
乙酰丁香酮 (Aldrich)	200 uM	0	0	0	0
羧苄西林 (Phytotech)	500 mg	500 mg	250 mg	250 mg	0
草甘膦(Gateway Chemical)	0	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM
硝酸银(Sigma)	3.4 mg	3.4 mg	0	0	0
pH	5.2	5.8	5.8	5.8	5.8

[0110] *含有 1250mg/L 烟酸 (Sigma), 250mg/L 盐酸吡哆醇 (Sigma), 250mg/L 盐酸硫胺素 (Sigma) 和 250mg/L 泛酸钙 (Sigma)。

[0111] 实施例 7

[0112] 转化植物再生期间的液体培养。

[0113] 在转化和组织培养过程中愈伤组织生长、预再生和再生期间的液体培养允许有效的组织操作。图 9 表明在再生前无选择剂时进行的转化和再生研究。愈伤组织增殖、预再生和再生期在所示的液体无草甘膦培养基中进行。在第二再生期 (其也可在半固体培养基

上发生)后,将植株移栽到生长穴盆中。GUS 组织化学测定可以与基于 PCR 或其它筛选方法(例如用草甘膦的替代筛选)联用,以检测在再生植株组织中例如草甘膦耐受性的表达。用无标记基因的载体(即 pMON97372)或有标记基因的载体(pMON93040)进行了这些实验。

[0114] 图 9 所示的用于研究的质粒是含 cp4 和 gus 基因的 pMON93040。将来自各穗的胚分离到装有 1ml 液体 Lynx 1013 培养基的培养皿中,并在 Lynx 1947 上共培养。如下表 8 所示,将胚分为不同处理组,包括有选择 8 周(处理 1);无选择 8 周,液体培养,在 PHYTATRAY 中的固体培养基上生长(处理 2);和无选择 8 周,液体培养,在 PHYTATRAY 中的液体培养基上生长(处理 3)。与用有选择获得的转化相比,用无选择的转化非常有效(~1/3X)。“液体穴盆”方法的结果归纳于下表 8。当小的外植体样品仅用液体培养(即处理 #3,,用 Lynx2168 作为最终生长培养基)培养时,效率更高,几乎与有选择所得到的一样高。如下表 9 所示,液体培养看来能促进转基因事件更有效再生。可能是不用继代培养,就可降低胁迫并加快植物再生。

[0115] 表 8. 用“液体穴盆方案”和无需使用选择的有效转化。

[0116]

实验#	处理	IE 大小	外植体数量(IE)	具有事件的 IE 数量	% TF
7530-1	液体有选择-8周	2.5-2.8	30	14	46.7
7531-1		1.9-2.1	30	16	53.3
7532-1		1.9-2.2	30	4	13.3
7533-1		2.5-2.8	30	7	23.3
总计			120	41	34.2
7529-1	无选择转化	2	60	5	8.3
7530-2	用 PHYTATRAY 液体培养步骤+草甘膦喷洒筛选	2.5-2.8	88	16	18.2
7531-2		1.9-2.1	68	13	19.1
7532-2		1.9-2.2	127	11	8.7
总计			343	45	13.1
7530-3	无选择转化,用液体培养并在移栽穴盆后用草甘膦喷洒筛选	2.5-2.8	21	9	42.9
7531-3		1.9-2.1	18	10	55.6
7532-3		1.9-2.2	22	4	18.2
总计			61	23	37.7

[0117] 表 9. 转化效率与再生效率的关系。

[0118]

实验#	处理	外植体数量(IE)	具有事件 的 IE 数量	%TF	穴盆中的 植株数量	事件数 量/100 株植物
7530-3	无选择转化, 用液	21	9	42.9	208	4.3
7531-3	体培养并在移栽	18	10	55.6	208	4.8
7532-3	穴盆后用草甘膦 喷洒筛选	22	4	18.2	208	1.9
总计		61	23	37.7	624	3.7

[0119] 实施例 8

[0120] 转化效率与愈伤组织增殖期间持续时间的关系

[0121] 愈伤组织增殖期间持续时间对转化频率的作用见下表 10。缩短愈伤组织期间的时间可提高 TF, 更快产生植物。

[0122] 表 10. 更长的愈伤组织增殖期对无选择转化的不利影响。

[0123]

实验#	处理	IE 大小	选择 数量	具有事件 的 IE 数量	%TF
7533-1	有选择-8 周 液体培养	2.5-2.8	30	7	23.3
7533-2	无选择-8 周 (2 周在 Lynx 2133 上)	2.5-2.8	104	8	7.7
7533-3	无选择-8 周 (1 周在 Lynx 2133 上)	2.5-2.8	97	19	19.6

[0124] 实施例 9

[0125] 用无选择快速液体培养进行转化和再生

[0126] 为了进一步使过程更流畅, 开发了长达 6 周的快速液体循环 (RLC) 方案, 其中省略愈伤组织增殖步骤 (Lynx 2133)。转化方案的步骤包括: 预再生 (Lynx 2197) 和再生期 (Lynx 2168 和 Lynx 1607, 例如图 9 和表 11)。含有 Cp4 和 gus 基因的 pMON93040 用于该项研究。将来自各穗的胚分离到装有液体培养基 (Lynx 1013) 的培养皿中, 在 Lynx 1947 培养基上共培养, 然后如下表 11 所示分为处理组。处理包括比较有选择或无选择的胚的 TF, 并比较在 Lynx 2197 增殖培养基上 1 周或 2 周的效果。如表 11 所示, 缩短在 Lynx 2197 增殖培养基上的持续时间确实会影响 TF。然而, 当采用在预再生培养基上生长的最佳持续时间时, 无选择转化所得到的 TF 与有选择所得到的 TF 类似。

[0127] 表 11. 用无选择的快速液体培养方案进行有效转化。

[0128]

实验#	处理	外植体数量 (IE)	具有事件的 IE 数量	%TF	移栽穴盆的植株数量	事件/100 株植物
7962-3	有选择 - 6 周液体	65	37	56.9	N/A	N/A
7963-1		65	16	24.6		
共 8 周液体有选择		130	53	40.8		
7965-1	6 周无选择, 其中	60	27	45.0	548	4.9
7963-2	2 周在 Lynx 2197 上	60	18	30.0	342	7
共无选择 2 周 Lynx 2197		120	45	37.5	890	5.1
7965-1	6 周无选择, 其中	60	12	20	493	2.4
7963-2	1 周在 Lynx 2197 上	60	13	21.7	274	4.7
共无选择 1 周 Lynx 2197		120	25	20.8	767	3.2

[0129] 在这些实验中,进一步缩短愈伤组织增殖、预再生和再生期的持续时间,并将使用选择与在非选择性培养基上生长进行比较。减少所需组织处理步骤进一步使该方法适合于自动化(另见下表 15)。

[0130] 对如上所述获得的所选植物的表达水平进行比较,表明按照针对 pinII 3' 转录终止信号的基于 PCR 的测定得到类似表达水平(表 12)。

[0131] 表 12. 对按照转基因拷贝数分类的植物进行表达分析。

[0132]

处理	PinII 3' UTR 拷贝数量	所测定植株数量	PinII 3' UTR 平均表达值	SD
有选择 RLC	1	70	1.432	1.5
	2	28	1.902	2.6
无选择 RLC*	1	44	0.957	3.37
	2	35	0.809	1.3

*来自“无选择”的植物在采样时为 2 周龄

[0133] 无选择的快速液体培养方案的总时间安排见下表 13。

[0134] 表 13. 无选择的快速液体培养方案。

[0135]

天数	培养基#	培养条件
第 0 天	Lynx 1947	1 天在 23℃, 黑暗; 6 天在 30℃, 黑暗
第 1 周	Lynx 2197 /2379/ 2282	30℃, 黑暗
第 2 周	Lynx 2168	30℃, 黑暗
第 3 周	Lynx 2168	27-28℃, 光照
第 4 周	Lynx 2168	27-28℃, 光照
第 5 周	Lynx 1607	将外植体移至 PHYTATRAY
~第 8 周	移栽	壮苗
移栽后 10 天	样品	用于草甘膦耐受性或用于 GUS 测定或用于 GOI 的 PCT 测定
移栽后 20 天	推进	确定事件数量并推进阳性事件

[0136] 为了证实以上基于表 13 所述方案所得结果,用 pMON93040 转化,进行了 3 项实验。如下表 14 所示将胚分为不同处理组。在这些实验中,GUS 测定在小植株上进行;不喷洒草甘膦。来自各穗的胚分离到装有 1ml 液体 Lynx 1013 培养基的培养皿中,并在 Lynx 1947 上共培养。如结果所示,与用有选择所得到的转化相比,用无选择的转化非常有效 (> 60%)。

[0137] 表 14. 快速转化方案对有选择和无选择都有效。

[0138]

实验#	处理	外植体数量 (IE)	事件数量	TF (%)	植株数量	事件 /100 株植物	SD	平均植物/ IE			
8105-4	RLC, 有选择	55	24	43.6	347	6.6	3.3	5.5			
8106-4		80	34	42.5							
8107-4		60	27	45							
平均值		195	85	43.6					N/A		
8108-1	RLC, 无选择	75	23	30.7							
8108-2		60	18	30	387	4.7	3.5	6.5			
8108-3		60	14	23.3	373	3.8	3.3	7.2			
平均值		195	55	28.2	369	5	3.4	6.4			

[0139] 为了更好地理解细胞增殖的特性及其对无选择转化的影响,用两种不同的共培养培养基 (含 0.5mg/l 2,4-D 的 Lynx 1947 和含 0.2mg/l 2,4-D 的 Lynx 2232) 进行额外实验。将来自每种共培养培养基的胚平分为 2 组,移入预再生培养基 (含 0.2mg/l 2,4-D-Lynx 2197) 或再生培养基 (不含任何生长调节剂-Lynx 2282) 中。用仅含 uidA 基因的少标记的转化载体 (pMON97372) 进行 5 次实验 (8415-8419)。实验方法的概述见图 9。植株在穴盆中定植后,将来自每个胚衍生品系的植物汇集在一起,染色测定 GUS,以鉴定阳性品系。然后,对阳性克隆的每个品系进行进一步 GUS 染色,以鉴定 GUS 阳性事件。将每个穗的约 1/5 的胚分别与对照 uidA+cp4 载体 (pMON97367) 一起接种,然后按照 RLC 方案 (例如表 13) 来

比较有选择和无选择的转化结果（实验 8420）。这些实验结果归纳于下表 15 和 16。

[0140] 表 15. 用 *gus* 载体 (pMON 97372) 的有效的无选择转化。

[0141]

实验#	处理	IE 大小	外植 体数 量(IE)	移栽 Phytatray 的数量	移栽穴 盆植株 总数	具有 事件 的 IE 数量	%TF (基于所 选择的 数量)	%TF (基于 Phytatray 上的数量)
8415-1	在 Lynx	2.3	60	30	273	9	15	30
8416-1	1947 上	2	60	37	273	9	15	24
8417-1	共培养-	2.4	60	42	281	3	5	7.1
8418-1	第 1 次	1.9	60	40	342	8	13.3	20
8419-1	再生在 Lynx 2197 上	2.1	60	37	405	7	11.7	18.9
总计			300	186	1574	36	12	19.4
8415-2	在 Lynx	2.3	60	34	295	9	15	26.5
8416-2	1947 上	2	60	34	274	7	11.7	20.6
8417-2	共培养-	2.4	60	45	290	7	11.7	15.6
8418-2	第 1 次	1.9	60	34	232	9	15	26.5
8419-2	再生在 Lynx 2282 上	2.1	60	41	445	5	8.3	12.2
总计			300	188	1574	37	12.3	19.7

[0142]

8416-3	在 Lynx	2	45	36	398	7	15.6	19.4
8417-3	2232 上	2.4	45	28	239	3	6.7	10.7
8418-3	共培养	1.9	45	22	276	5	11.1	22.7
8419-3	第 1 次 再生在 Lynx 2197 上	2.1	40	37	256	4	10	10.8
总计			175	123	1169	37	10.9	15.4
8416-4	在 Lynx	2	45	28	297	2	4.4	7.1
8417-4	2232 上	2.4	45	30	208	4	8.9	13.3
8418-4	共培养	1.9	45	33	226	4	8.9	12.1
8419-4	第 1 次 再生在 Lynx 2282 上	2.1	45	35	342	6	13.3	17.1
总计			180	126	1073	16	8.9	12.7

[0143] 表 16. 用有选择的转化实验 (pMON97367), 表明无选择转化是有效的。

[0144]

实验#	处理	对照	IE 大小 (mm)	选择 数量	具有事件 的 IE 数量	%TF (基于所 选择的数量)
8420-1	转化用 RLC 和 pMon97367	8415	2.3	50	6	12
8420-2		8416	2	40	5	12.5
8420-3		8417	2.4	40	4	10
8420-4		8418	1.9	50	4	8
8420-5		8419	2.1	50	3	6
总计				230	22	9.6

[0145] 如表 15 所示, 发现含 2,4-D 浓度比 Lynx 2232 更高的共培养培养基 Lynx 1947 更好。这些结果表明再生前细胞增殖有利于得到有效的无选择转化。此外, 外植体在无生长调节剂的培养基 (例如 Lynx 2282) 上再生、然后共培养并不会明显减少植物 / 胚数量。将采用 RLC 方案、用 pMON97367 转化的胚的转化频率进行比较, 表明无选择转化是有效的。此外, 拷贝数分析表明更高百分率的植物具有更低拷贝的插入序列 (表 17)。

[0146] 表 17: 无选择转化产生更高%的单拷贝 oriV 阴性事件。

[0147]

所测定的植株总数	%单拷贝事件, 缺乏 oriV
122	66 (55%)

[0148] 认为缺乏选择和 / 或更短的 T-DNA 可能是产生更高%可用事件的原因。对

于无选择处理, 优选胚的大小范围比 RLC 所用的胚大小范围 (1.9-2.1mm) 稍微大一些 (2.0-2.3mm)。通过 DNA 印迹杂交而验证的 ~ 120 个事件 (表 17) 表明, 所有事件都是独立的。这进一步强调在更早的发现: 在低 TF (~ 15%) 下得到的大多数事件都是独立事件, 表明在移栽生长穴盆前采用汇集策略, 可进一步提高方案的效率。

[0149] 实施例 10

[0150] 在移栽穴盆之前筛选植物, 以排除非转基因植物, 提高效率

[0151] 来自含最终生长培养基 (Lynx 1607) 的单个容器的植物汇集在一起, 用组织化学 GUS 测定来检测 gus 并用 PCR 检测转基因的存在。GUS 与 PCR 测定间有 100% 相关性。该研究允许排除无阳性事件的生长容器, 因此极大降低了植物处理的负担并提高通量。

[0152] * * * * *

[0153] 按照本说明书, 无需过度实验就可制备和实施本文所公开和要求保护的所有组合物和 / 或方法。尽管在优选的实施方案中已经描述了本发明的组合物和方法, 但是本领域技术人员显而易见的是, 在不偏离本发明的构思、精神和范围的前提下, 可以对本文所述的组合物和 / 或方法以及所述方法的步骤或步骤顺序进行改动。更具体地讲, 显而易见的是某些化学和生理相关的试剂可以替代本文所述的试剂, 而仍可达到相同或类似的结果。本领域技术人员显而易见的所有这些类似的替代和修改都视为在本发明的精神、范围和构思之内, 如同所附权利要求书所限定的那样。

[0154] 参考文献

[0155] 下列参考文献通过引用结合到本文中, 其程度是它们补充、解释、提供背景、或教导本文所用的方法、技术和 / 或组合物。

[0156] 美国专利 5, 362, 865

[0157] 美国专利 5, 106, 739

[0158] 美国专利 5, 107, 065

[0159] 美国专利 5, 159, 135

[0160] 美国专利 5, 569, 834

[0161] 美国专利 6, 506, 559

[0162] 美国专利申请顺序号 09/423, 143

[0163] 美国专利公布说明书 2002/0168707A1

[0164] 美国专利公布说明书 20040244075

[0165] 美国专利公布说明书 2005/0097641

[0166] Bird 等, *Biotech Gen. Engin. Rev.*, 9 :207-227, 1991.

[0167] Broothaerts 等, *Nature*, 433 (7026) :583-584, 2005.

[0168] Chu 等, *Scientia Sinica*, 18 :659, 1975.

[0169] Darbani 等, *Biotechnol. J.*, 2 :83-90, 2007.

[0170] De Vetten 等, *Nat. Biotechnol.*, 21 :439-442, 2003.

[0171] Dekeyser 等, *Plant Physiol.*, 90 :217-223, 1989.

[0172] Della-Cioppa 等, *Bio/Technology*, 5 :579-584, 1987.

[0173] Dellaporta *PlantMol. Biol. Rep.* 1 :19-21. 1983.

[0174] Duncan 等, *Planta*, 165 :322-332, 1985.

- [0175] 欧洲专利申请 0385962
- [0176] Francis 和 Spiker, *Plant J.*, 41 :464-471, 2005.
- [0177] Gamborg 等, *Exp. Cell Res.*, 50 :151, 1968.
- [0178] Gibson 和 Shillitoe, *Mol. Biotech.*, 7 :125-137, 1997.
- [0179] Goldsbrough, *Methods for avoidance and removal of selectable marker genes in crop transformation systems* (避免和去除作物转化系统中的选择标记基因的方法)
- [0180] [www.defra.gov.uk/environment/acre/uti/08.htm], 2001.
- [0181] Huang 等, *Transgenic Res.* 13 :451-61, 2004.
- [0182] Linsmaier 和 Skoog, *Physiol. Plant.*, 18 :100, 1965.
- [0183] McCown 和 Lloyd, *HortScience*, 16 :453, 1981.
- [0184] Murashige 和 Skoog, *Physiol. Plant*, 15 :473-497, 1962.
- [0185] Nitsch 和 Nitsch, *Science*, 163 :85-87, 1969.
- [0186] PCT 申请 WO 09/084, 942
- [0187] PCT 申请 WO 09/127, 735
- [0188] PCT 申请 WO 2004/081184
- [0189] PCT 申请 WO 97/48814
- [0190] PCT 申请 WO 98/53083
- [0191] PCT 申请 WO 99/53050
- [0192] PCT 申请 WO 99/61631
- [0193] Schenk 和 Hildebrandt, *Can. J. Bot.*, 50 :199-204, 1972.
- [0194] Uchimiya 和 Murashige, *Plant Physiol.* 15 :473, 1962.
- [0195] Yoo 等, *Planta*, 221 :523-530, 2005.

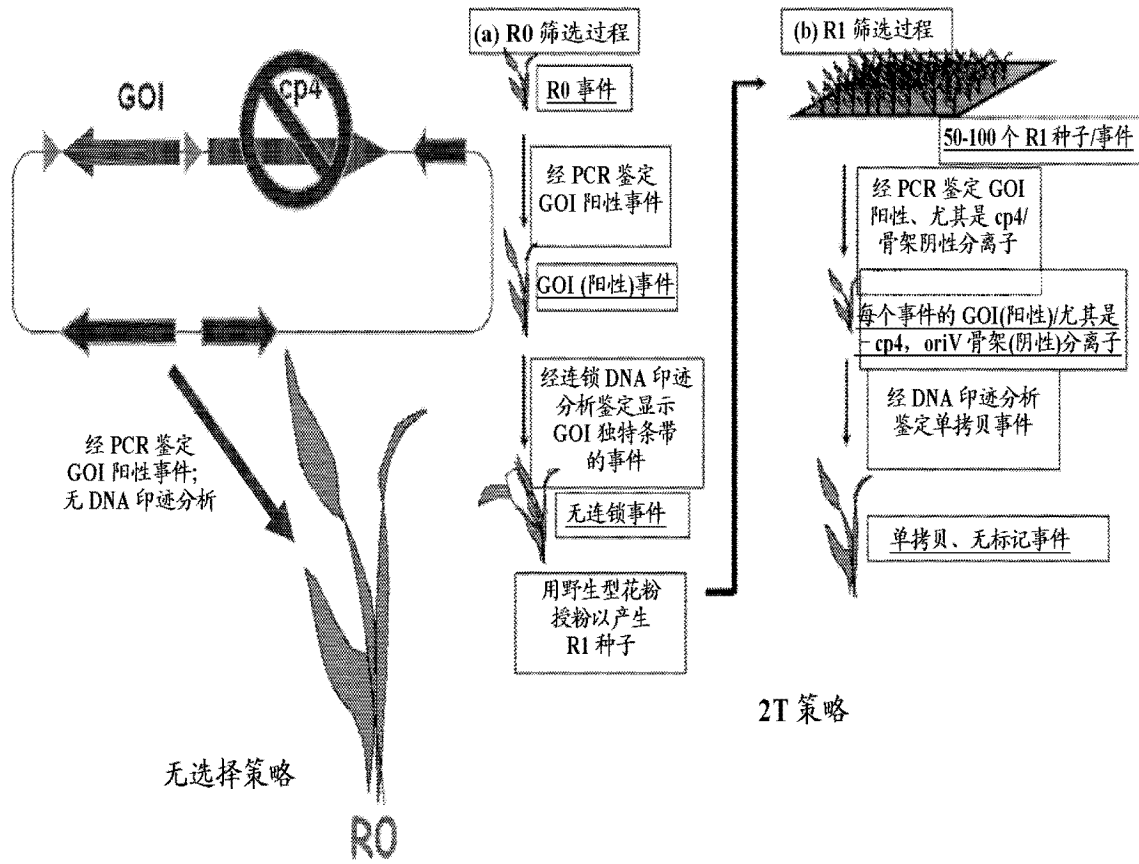


图 1

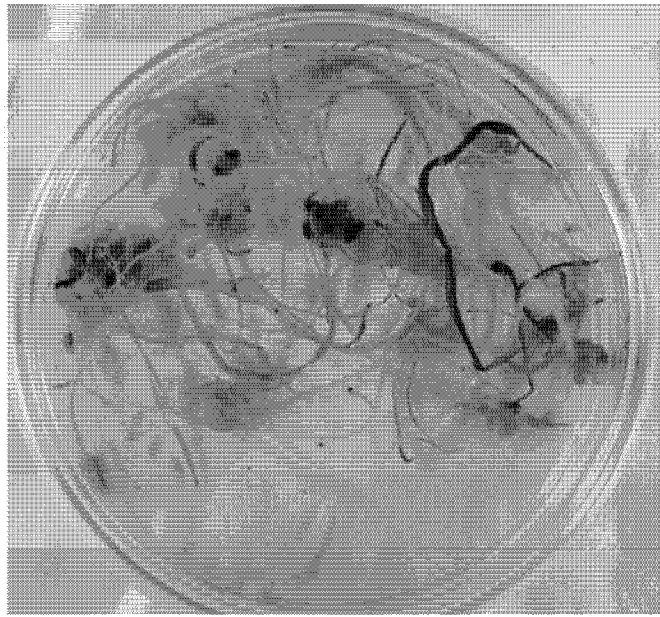


图 2

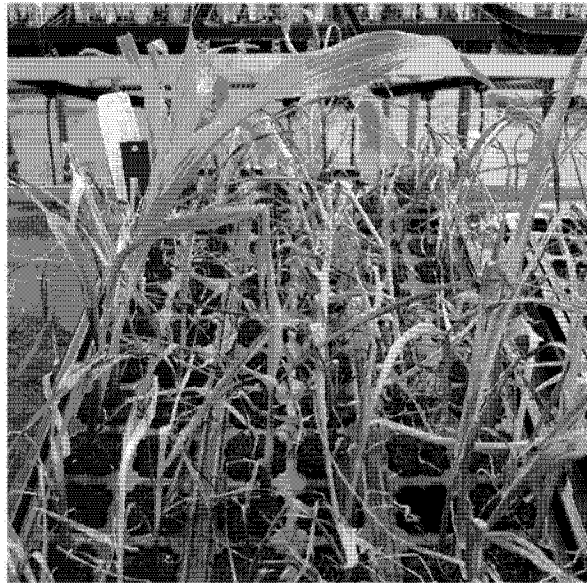


图 3

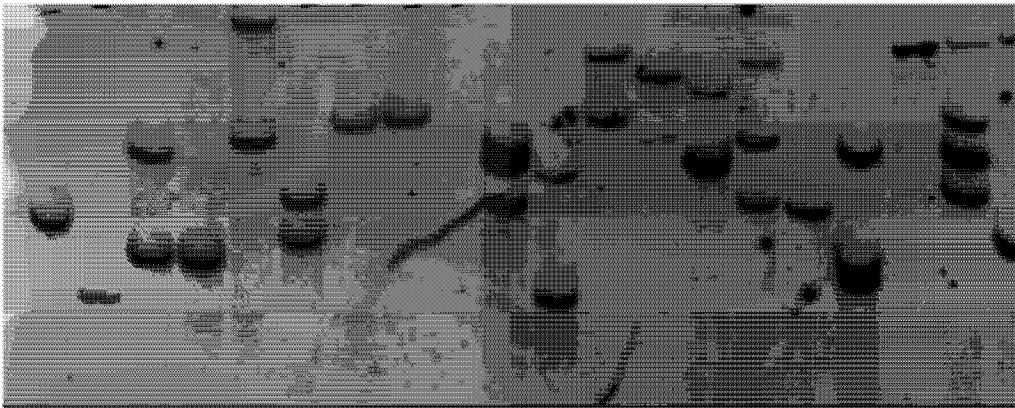


图 4

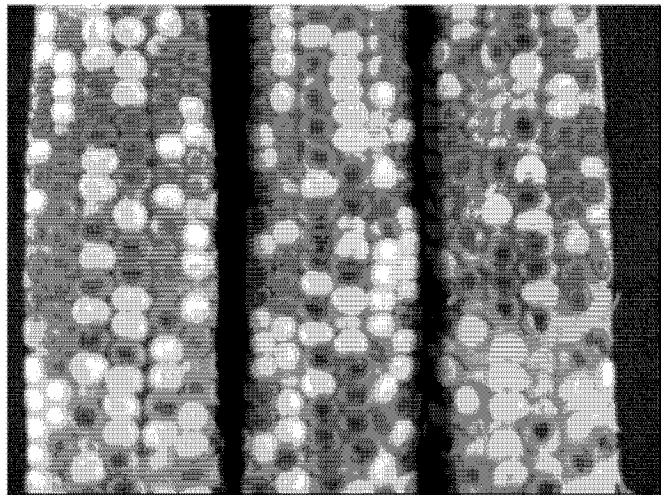


图 5

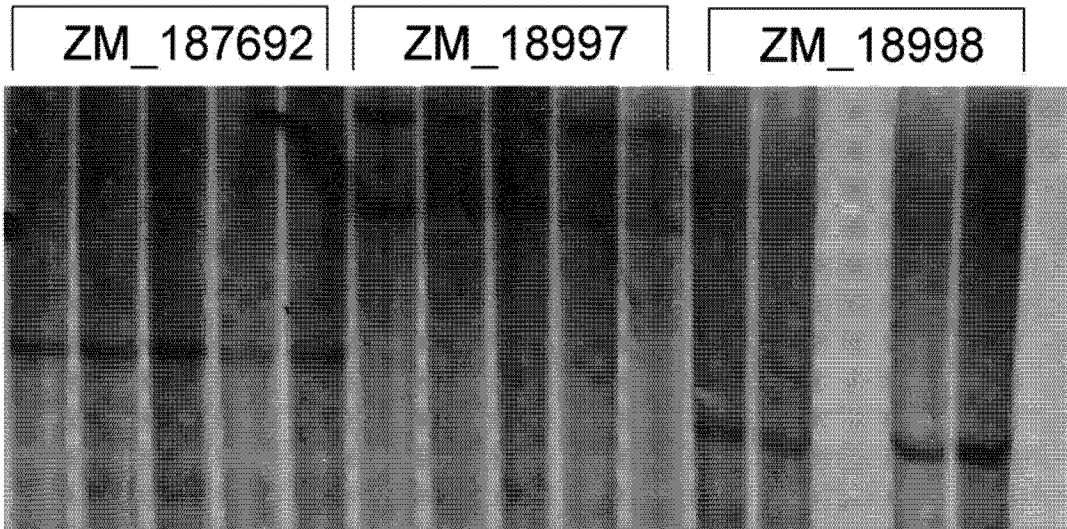


图 6

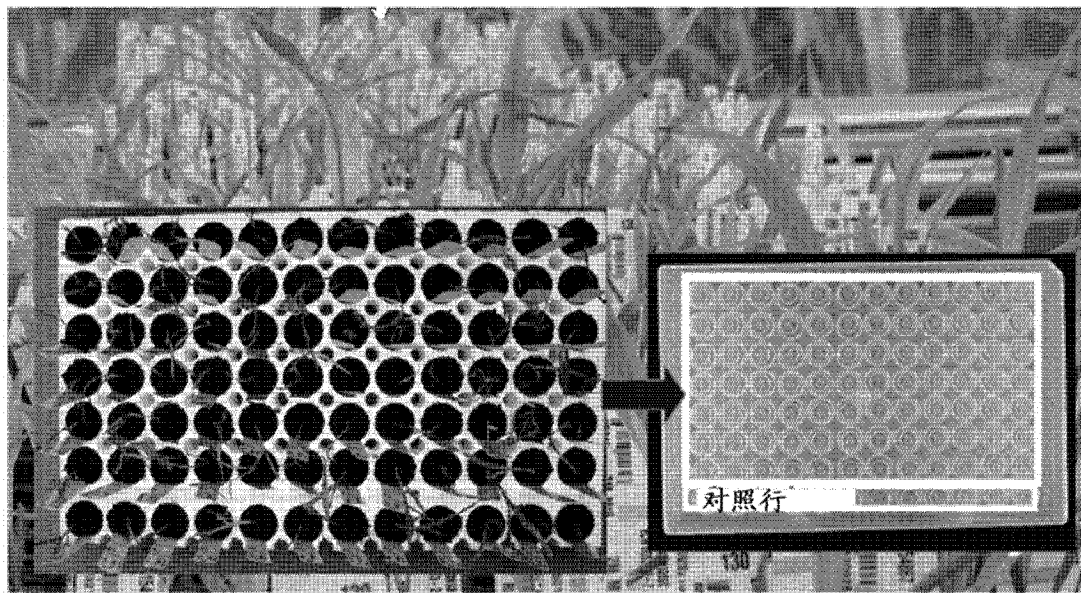


图 7

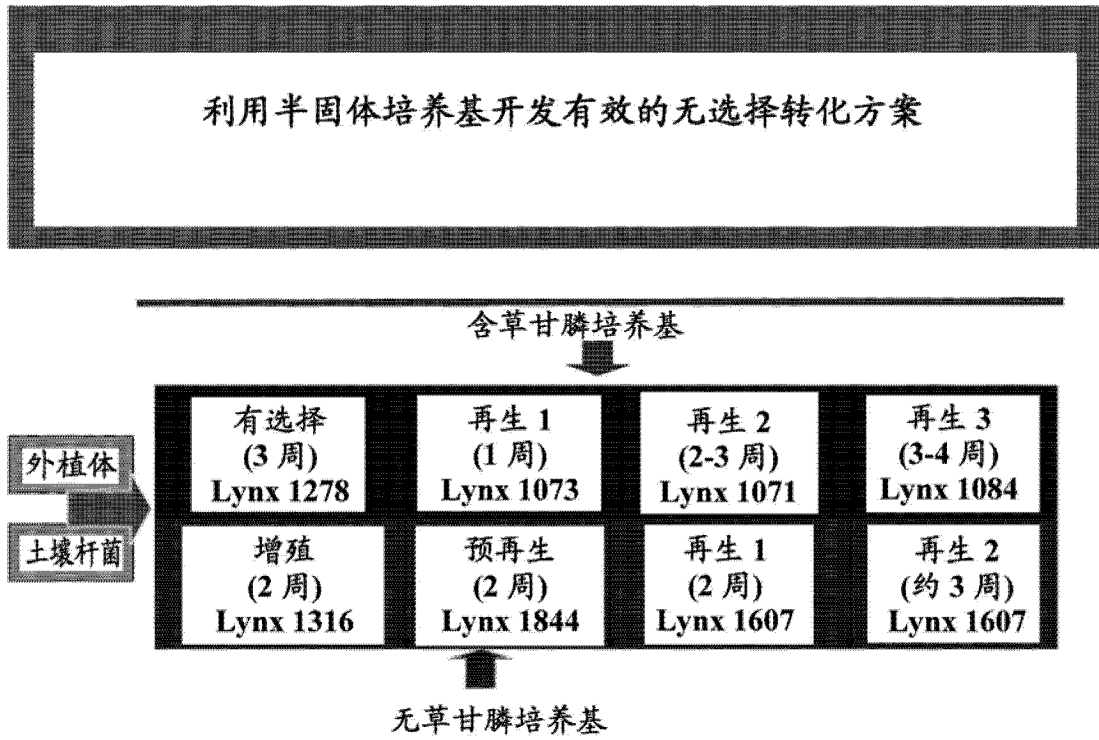


图 8

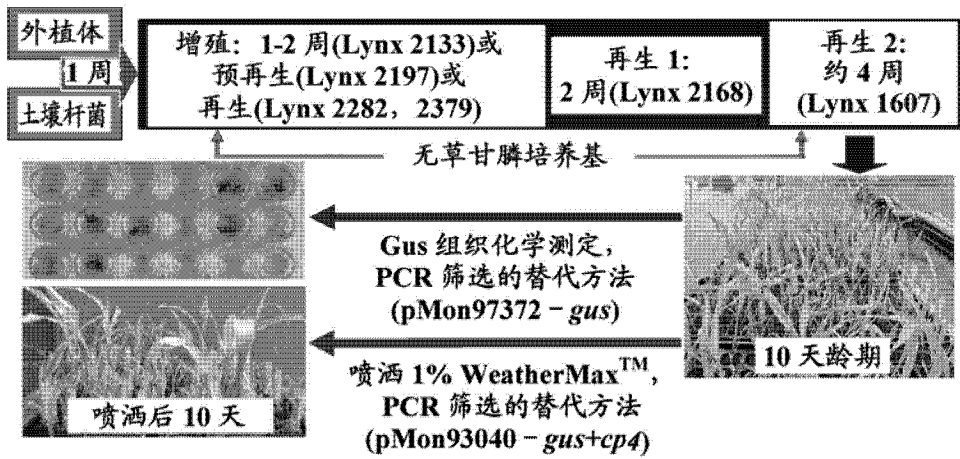


图 9A

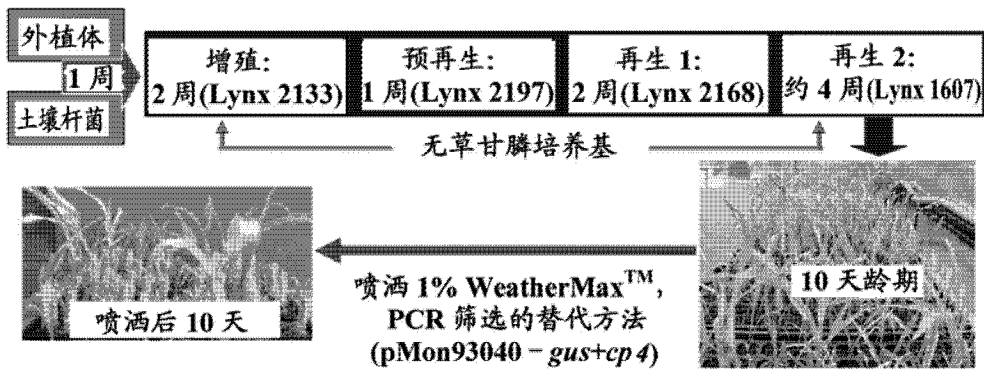


图 9B

专利名称(译)	植物无选择转化		
公开(公告)号	CN104357535A	公开(公告)日	2015-02-18
申请号	CN201410643281.2	申请日	2007-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	孟山都公司		
申请(专利权)人(译)	孟山都技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	孟山都技术有限公司		
[标]发明人	J R 劳特		
发明人	J.R.劳特		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12N15/8205 C12N15/8206 C12Q2600/13 C12N15/8265 C12N15/8207 C12Q2600/158 C12N15/8209 C12Q1/6895 C12N15/8201 C12N15/8202 C12Q1/6876 C12N15/821 C12N15/8212		
代理人(译)	梁谋		
优先权	60/841519 2006-08-31 US		
其他公开文献	CN104357535B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及植物无选择转化方法。本发明提供用于鉴定再生转化植物和分化的转化植物部分的方法，所述方法在使植物细胞再生以得到分化组织之前，无需让植物细胞经历选择条件。在具体的实施方案中，所述植物细胞是玉米植物细胞。也提供了植物的培育和处理方法，包括对表现出特定目标性状的植物的鉴定方法。

