

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-171330

(P2020-171330A)

(43) 公開日 令和2年10月22日(2020.10.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/82 (2006.01)	C 1 2 N 15/82	Z N A Z 2 B O 3 O
C 1 2 N 15/52 (2006.01)	C 1 2 N 15/52	Z 4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A O 1 H 5/10 (2018.01)	A O 1 H 5/10	

審査請求 有 請求項の数 5 O L 外国語出願 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-129706 (P2020-129706)	(71) 出願人	501231613
(22) 出願日	令和2年7月30日 (2020.7.30)		モンサント テクノロジー エルエルシー
(62) 分割の表示	特願2018-208984 (P2018-208984)		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン
	の分割		トルイス、ノース・リンドバーグ・ブール
原出願日	平成19年5月11日 (2007.5.11)		バード800番
(31) 優先権主張番号	60/799,875	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成18年5月12日 (2006.5.12)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100132263
			弁理士 江間 晴彦
		(72) 発明者	イエ・シュドン
			アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン
			トルイス、ノース・リンドバーグ・ブール
			バード800番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マーカーフリーのトランスジェニック植物を得るための方法および組成物

(57) 【要約】

【課題】本発明は、関心のあるトランスジーンを含むが、マーカー遺伝子を欠くトランスジェニック種子を同定するための方法および組成物を提供する。

【解決手段】検出可能な表現型を生じる同定配列の使用は、関心のある遺伝子に連鎖していないトランスジーン配列が関心のある遺伝子をコードする配列から分離している種子および植物をスクリーニングする効率を増大する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2、配列番号：3または配列番号：2もしくは配列番号：3に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、かつフィトエンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含む2 T-DNAベクター。

【請求項 2】

請求項1記載の核酸が植物中で機能的な異種プロモーターに作動可能に連結している、請求項1に記載のベクター。

【請求項 3】

請求項1記載のベクターを含む宿主細胞。

10

【請求項 4】

宿主細胞が細菌細胞または植物細胞である請求項3記載の宿主細胞。

【請求項 5】

請求項1記載のベクターを含むトランスジェニック植物または種子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、参照することによってその全体の開示が本明細書に取り込まれる2006年5月12日に出願した米国仮特許出願60/799,875に基づく優先権を主張する。

【0002】

20

(1. 発明の分野)

本発明は一般的にトランスジェニック植物に関する。より詳細には、本発明は、形質転換植物中の望ましくないまたは不必要なDNAの同定および除去に関する。

【背景技術】

【0003】

(2. 関連技術の説明)

形質転換植物中の不必要なまたは望ましくないDNAの同定は、多くの研究の主題であり、かかる植物からこれらのトランスジェニック配列を除去するために多くの異なる方法が努力して調べられている（例えば、Hansonら、1999；Daleら、1991；Ebinumaら、1997；Yoderら、1994；Kononovら、1997；HareおよびChua、2002；Scuttら、2002；Puchta、2003；de Vettenら、2003；Halpin、2005；米国特許公開公報20030110532；米国特許公開公報20040237142；米国特許第6,458,594号）。一般的には、トランスジェニック植物の農業的に有用な特性に寄与しないトランスジェニックDNAを含まない植物を同定することは有利である。

30

【0004】

アグロバクテリウム（Agrobacterium）を媒介とする形質転換によって植物にトランスジーンを導入する多くの方法は、トランスジーンおよび関連する遺伝子エレメントを取り込み、ついでこれらを植物のゲノムに移入するT-DNA（トランスファードDNA）を利用する。一般的に、トランスジーン（または複数のトランスジーン）は右側ボーダーDNA分子（RB）および左側ボーダーDNA分子（LB）によって境界が形成され、植物ゲノムに移入され、1またはそれを超える遺伝子座に組み込まれる。DNA構築物が1を超えるT-DNAを含む場合、それらのT-DNAおよびその中に含まれるトランスジーンは別の遺伝子座で植物ゲノムに組み込まれ得ることが観察されている（Framondら、1986）。これは、同時形質転換（co-transformation）といわれる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

同時形質転換法は、別のT-DNAを運搬しているプラスミドで形質転換したアグロバクテリウム菌株の混合物でT-DNAを送達することによって行い得る。同時形質転換は、各々が1のT-DNAを含有する2またはそれを超えるDNA構築物で1のアグロバク

50

テリウム菌株を形質転換することによっても行い得る。さらなる方法は、単一のDNAベクター上の2のT-DNA、および異なる遺伝子座にT-DNAを組み込んだトランスジェニック細胞および植物を用いる。マイクロプロジェクトイルを用いるボンバードメントを含むDNAを導入する物理的方法のような非-アグロバクテリウム媒介形質転換系においては、2のDNA分子を独立して標的ゲノムに組み込み、ついでその後の世代において独立して分離することができる。配列の独立した挿入およびその遺伝的分離を許容する2のT-DNA構築物の使用は記載されている（例えば、米国特許第5,731,179号；Zhouら，2003；Breitlerら，2004；Satoら，2004）。前記したことは当該技術分野における理解をさらに深めるが、製品開発をより効率的に行うマーカーフリー植物を得るための改善された方法および組成物に対する要望が存在し続けている。以前に記載されているスクリーニング法は非常に労働集約的であり、例えばR0および／またはR1植物材料を成長させた後にサザンブロットまたはPCR（登録商標）分析を必要とする。

10

【0006】

米国特許公開公報20060041956は、アグロバクテリウム媒介形質転換と結合した視覚的マーカー遺伝子の使用を記載している。しかしながら、当該公開公報は、どこでかかるマーカーが選択可能またはスクリーニング可能なマーカー遺伝子に結合し、関心のある遺伝子に結合しないという方法については記載していない。したがって、農業的に有用でないマーカー配列および／または他のトランスジェニックDNAを欠く植物を同定および除去し得る簡便性および効率性を改善する方法および組成物に対して当該技術分野における大きな要望が存在し続けている。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

1の態様において、本発明は、a) 関心のある核酸を含む第1のDNAセグメントおよび植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結したDNAカセットに物理学および／または遺伝学的に連結した植物マーカー遺伝子を含む第2のDNAセグメントで形質転換したトランスジェニック植物の種子を得、ここに該DNAカセットは当該DNAカセットを含む種子に検出可能な表現型を付与し；b) 検出可能な表現型の不存在について種子をスクリーニングし；ついで、c) 検出可能な表現型を欠く少なくとも第1の種子を選択して、マーカー遺伝子を含まない種子を得る、工程を含むトランスジェニック植物からマーカーフリー種子を調製する方法を提供する。1の形態において、工程c)は、さらに、関心のある核酸の存在について種子をアッセイし、ついで、関心のある核酸を含みかつ選択可能なマーカー遺伝子を欠く種子を選択することを含む。

30

【0008】

ある種の形態において、DNAカセットは選択可能なマーカー遺伝子に翻訳的または転写的に融合することができ；すなわち、それは選択可能なマーカー遺伝子に翻訳的または転写的に融合したRNAをコードし得る。さらなる形態において、DNAカセットは、内因性遺伝子に少なくとも19または21bpのホモロジーを有するアンチセンスまたはセンスDNAフラグメントを含み、例えば、該アンチセンスまたはセンスDNAフラグメントは種子中で機能的なプロモーターに作動可能に連結している。いまだ他の形態において、DNAカセットはDNAフラグメントの一对の逆方向反復配列を含み、ここに各フラグメントは少なくとも19または21bpのサイズであり、該DNAフラグメントは種子中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した内因性遺伝子に相同である。内因性遺伝子に相同である逆方向DNAフラグメント反復配列は、選択可能なマーカー遺伝子内のイントロンに置くこともできる。ある種の形態においては、DNAカセットは少なくとも19または21のヌクレオチドを含むセンスまたはアンチセンスRNAをコードし、ここにDNAフラグメントは内因性遺伝子に相同である。

40

【0009】

本発明に係るマーカーフリー種子を調製する方法においては、選択した種子はスクリーニング可能な遺伝子またはスクリーニング可能なDNAカセットを欠くことができる。トランスジェニック植物の種子を得ることは、第1および第2のDNAセグメントでいずれ

50

か以前の世代のトランスジェニック植物またはその先祖を、別のDNA構築物上の第1および第2のDNAセグメントで形質転換または同時形質転換することも含み得る。トランスジェニック植物の種子を得ることは、トランスジェニック植物またはいずれか以前の世代のその先祖を、第1および第2のDNAセグメントを含む単一のDNA構築物で形質転換することも含み得る。第1および第2のDNAセグメントは、異なるT-DNAボーダー配列によって境界を形成し得る。本発明の方法においては、トランスジェニック植物は、(i) 左側および右側T-DNAボーダーによって挟まれた第1のDNAセグメント、および(ii) 第2のセットの左側および右側T-DNAボーダーによって挟まれた第2のDNAセグメントを含むDNA構築物で、植物またはいずれか以前の世代のその先祖を形質転換することによって作製することができ、ここに該第2のDNAセグメントはトランスジェニック植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した選択可能なマーカー遺伝子をさらに含む。第1および第2のDNAセグメントは、トランスジェニック植物に遺伝子的に連結してもしなくてもよい。

10

【0010】

本発明により使用するトランスジェニック植物は、アグロバクテリウム (Agrobacterium)、リゾビウム (Rhizobium)、メソリゾビウム (Mesorhizobium) またはシノリゾビウム (Sinorhizobium) 属から選択される細菌株によって媒介される形質転換によって、第1および第2のDNAセグメントを植物またはいずれか以前の世代のその先祖に導入することによって作製することができる。トランスジェニック植物は、例えばマイクロプロジェクトイル・ボンバードメントによっても作製することができる。

20

【0011】

本発明と一緒に使用する選択可能なマーカーは、CP4 EPSPS、bar、DMO、NptII、グリホセートアセチルトランスフェラーゼ、変異型アセト乳酸シンターゼ、メトトレキサート抵抗性DHFR、ダラボンデハロゲナーゼ、PMI、Prottox、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼおよび5-メチルトリプトファン抵抗性アントニル酸シンターゼよりなる群から選択される生成物をコードし得る。本発明と一緒に使用するDNAカセット配列は、例えば、crtB、gus、gfp、sacB、lux、アントシアニン合成遺伝子、DefH9-iaaM、rolB、OsCDPK2、AP2、ARF2、ANT転写因子、LEC2、Snf-1、cobA、KAS4、splA、ゼイン逆方向繰返し配列、B-peruおよび酵母ATP-PFKよりなる群から選択し得る。カセットは、胚、種子内胚乳、子葉、アリューロンおよび種皮から選択される組織中で機能的なプロモーターに作動可能に連結することができる。プロモーターは、例えば、ナピンプロモーター、ベーターファゼオリンプロモーター、ベーターコングリニシンサブユニットプロモーター、ゼインプロモーター、Osgt-1プロモーター、オレオシンプロモーター、デンプン合成酵素プロモーター、グロブリン1プロモーター、オオムギLTP2プロモーター、アルファアミラーゼプロモーター、キチナーゼプロモーター、ベーターグルカナーゼプロモーター、システインプロテイナーゼプロモーター、グルタレドキシシンプロモーター、HVA1プロモーター、セリンカルボキシペプチダーゼIIプロモーター、カタラーゼプロモーター、アルファグルコシダーゼプロモーター、ベーターアミラーゼプロモーター、VP1プロモーター、USPプロモーター、USP88プロモーター、USP99プロモーター、レクチン、およびブロンズ (bronze) 2プロモーターよりなる群から選択し得る。検出可能な表現型は、触媒活性の検出によってアッセイし得る。検出可能な表現型は、種子の色、種子の不透明性、種子の発芽可能性、種子の大きさ、種子の生存能力、種子の形、種子のテクスチャー、および欠陥のあるもしくは発育不全種子よりなる群から選択し得る。種子のスクリーニングは、自動種子ソーティング機によって行い得る。

30

40

【0012】

もう1の態様において、本発明は、(a) 植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した関心のある遺伝子を挟む左側および右側T-DNAボーダーを含む第1のDNAセグメント、および(b) DNAカセットを含む種子に検出可能な表現型を付与するDN

50

Aカセットに作動可能に連結した種子中で機能的なプロモーターを挟む第2のセットの左側および右側T-DNAボーダーおよび植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した選択可能なマーカー遺伝子を含む第2のDNAセグメントを含むDNA構築物を提供する。関心のある遺伝子は、除草剤耐性、昆虫もしくは有害生物抵抗性、病気抵抗性、増加したバイオマス、修飾された脂肪酸代謝、修飾された炭水化物代謝、および修飾された栄養品質よりなる群から選択される特性を付与し得る。構築物においては、DNAカセットおよび選択可能なマーカー遺伝子は同一のプロモーターに作動可能に連結し得る。1の形態において、DNAカセットおよび選択可能なマーカー遺伝子は、異なるプロモーターに作動可能に連結する。特定の形態において、選択可能なマーカー遺伝子は、CP4 EPSPS、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ、DMO、NptII、グリホサートアセチルトランスフェラーゼ、変異型アセト乳酸シンターゼ、メトトレキサート耐性DHFR、ダラボンデハロゲナーゼ、PMI、Protax、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼおよび5-メチルトリプトファン抵抗性アントラニル酸シンターゼよりなる群から選択される生成物をコードする。もう1の形態において、DNAカセットは、crtB、gus、gfp、sacB、lux、アントシアニン合成遺伝子、DefH9-iaaM、rolB、OsCDPK2、AP2、ARF2、ANT転写因子、LEC2、Snf-1、cobA、KAS4、splA、ゼイン逆方向繰り返し配列、B-peruおよび酵母ATP-PFKよりなる群から選択される。DNAカセットは、胚、種子内胚乳、子葉、アリューロンおよび種皮よりなる群から選択される組織中で機能的なプロモーターに作動可能に連結することができる。1の形態において、DNAカセットは、ナピンプロモーター、ベーターファゼオリンプロモーター、ベーターコングリシニンサブユニットプロモーター、ゼインプロモーター、Osgt-1プロモーター、オレオシンプロモーター、デンプン合成酵素プロモーター、グロブリン1プロモーター、オオムギLTP2プロモーター、アルファアミラーゼプロモーター、キチナーゼプロモーター、ベーターグルカナーゼプロモーター、システインプロテイナーゼプロモーター、グルタレドキシンプロモーター、HVA1プロモーター、セリンカルボキシペプチダーゼIIプロモーター、カタラーゼプロモーター、アルファグルコシダーゼプロモーター、ベーターアミラーゼプロモーター、VP1プロモーター、USP88またはUSP99プロモーターおよびブロンズ2プロモーターよりなる群から選択されるプロモーターに作動可能に連結する。

【0013】

いまだもう1の態様において、本発明は、本明細書に記載する構築物で形質転換したトランスジェニック細胞および植物を提供する。1の形態において、植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した関心のある遺伝子を挟む左側および右側T-DNAボーダーを含む第1のDNAセグメント、および植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結したDNAカセットおよび選択可能なマーカー遺伝子を含む種子に検出可能な表現型を付与するDNAカセットに作動可能に連結した種子中で機能的なプロモーターを挟む第2のセットの左側および右側T-DNAボーダーを含む第2のDNAセグメントを含むDNA構築物で同時形質転換したトランスジェニック植物を提供する。かかる植物の細胞も提供する。

【0014】

なおいまだもう1の態様において、本発明は、右側および左側T-DNAボーダーを含むDNA構築物を提供し、ここに植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した関心のある遺伝子を含む第1のDNAセグメントは右側ボーダーの後に位置し、植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結したDNAカセットおよび選択可能なマーカー遺伝子のようなマーカー遺伝子を含む植物種子に検出可能な表現型を付与するDNAカセットを含む第2のDNAセグメントは左側ボーダーの後に位置する。

【0015】

なおいまだもう1の態様において、本発明は、右側および左側T-DNAボーダーを含むDNA構築物を提供し、ここに植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結したD

N A カセットおよび選択可能なマーカー遺伝子を含む植物種子に検出可能な表現型を付与する D N A カセットを含む第 1 の D N A セグメントは右側ボーダーの後に位置し、植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した関心のある遺伝子を含む第 2 の D N A セグメントは左側ボーダーの後に位置する。

【0016】

なおいまだもう 1 の態様において、本発明は、2 の右側 T-DNA ボーダーを含む D N A 構築物を提供し、ここに植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した関心のある遺伝子を含む第 1 の D N A セグメントは 1 の右側ボーダーの後に位置し、植物中で機能的なプロモーターに作動可能に連結した D N A カセットおよび選択可能なマーカー遺伝子を含む植物に検出可能な表現型を付与する D N A カセットを含む第 2 の D N A セグメントは他の右側ボーダーの後に位置する。

10

【0017】

いまだもう 1 の態様において、本発明は、配列番号：2、配列番号：3、または配列番号：2 もしくは配列番号：3 に対して少なくとも 70 %、75 %、85 % または 95 % の同一性を有する配列を含み、かつ、フィトエンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸配列を提供する。1 の形態において、本発明は、配列番号：2 または配列番号：3 の核酸配列を含む組換え D N A 構築物；または、植物中で機能的な外因性プロモーターに作動可能に連結した、配列番号：2 または配列番号：3 に少なくとも 71 %、80 %、90 %、95 %、98 % または 99 % の同一性を有する配列を含み、かつ、フィトエンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする組換え D N A 構築物も提供する。かかる配列を含む宿主細胞、ここに該細胞が細菌細胞または植物細胞であることは、本発明のもう 1 の形態である。もう 1 の形態において、本発明は、配列番号：2 または配列番号：3、配列番号：2、配列番号：3、または配列番号：2 もしくは配列番号：3 に対して少なくとも 71 %、80 %、90 %、95 %、98 % または 99 % の同一性を有し、かつ、フィトエンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする配列を含むトランスジェニック植物または種子を提供する。

20

【0018】

以下の図面は本願明細書の一部をなし、それを含めて本発明のある種の態様をさらに説明する。本発明は、本明細書に示す具体的な形態の詳細な説明と組み合わせて図面を参照することによってより良好に理解し得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図 1 A】 p M O N 1 0 3 3 8 の概略図。

【図 1 B】 p M O N 1 0 3 3 9 の概略図。

【図 1 C】 p M O N 6 7 4 6 5 の概略図。

【図 2】 p M O N 6 7 4 6 5 で形質転換したダイズ組織における C r t B 発現。

【図 3】 事象 A 3 3 9 0 8 からの種子中の C r t B 発現。

【図 4】 未熟 R 1 種子における c r t B、g u s および C P 4 / E P S P S の発現。

【図 5】 成熟 R 1 種子における c r t B の発現。

【図 6】 p M O N 6 7 4 6 5 種子の G U S 発現。

40

【図 7】 G U S 陽性種子上の C P 4 および C r t B P C R。

【図 8】 トランスジェニック事象をスクリーニングするための連鎖-サザンおよびスクリーニング可能なマーカーの比較。

【図 9】 マーカーフリー種子のための C P 4 選択可能なマーカー遺伝子に連結したスクリーニング可能な遺伝子を含む構築物の使用によって移入した D N A 配列の概要。A) R B および L B によって挟まれた 1 の T-DNA 中に位置し、アグロバクテリウム媒介形質転換に使用する 1 の構築物中の C P 4 選択可能なマーカー遺伝子に連結したスクリーニング可能な遺伝子を含む第 2 の T-DNA に物理学的に連結した G O I；B) 2 のボーダーを含む 1 のベクター、ここに G O I は R B の後に位置する一方、スクリーニング可能および選択可能なマーカー遺伝子は第 2 の R B の後または L B の後にバックボーンと一緒に位置

50

する；C) G O I およびスクリーニング可能な遺伝子-D N A は 2 のベクターに分離しており、1 のアグロバクテリウム細胞または別のアグロバクテリウム細胞のいずれかで形質転換する；D) G O I およびスクリーニング可能および選択可能なマーカー遺伝子からの 2 の D N A セグメントの可能な連結。G O I 単独のみが正常な種子概観を示す一方、スクリーニング可能な遺伝子を含む細胞は視認できる表現型を示す；E) 2 の別の D N A セグメントは、非-細菌媒介形質転換に使用する G O I またはスクリーニング可能および選択可能なマーカー遺伝子のいずれかを含む。

【図 1 0】 p M O N 6 7 4 2 0 は、同時形質転換用の G O I 構築物を表す。

【図 1 1】 種子-特異的ゼインプロモーターによって駆動する、シゾサッカロマイセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) A T P 依存性ホスホフルクトキナーゼを含むプラスミド p M O N 9 9 5 7 5。

【図 1 2】 種子特異的酵母 A T P 依存ホスホフルクトキナーゼが破壊された正常な穀粒発達を発現するトウモロコシ穂。

【図 1 3】 マーカー遺伝子のイントロン内に位置する反復繰り返しが見認できる表現型を生じることの説明のために用いる d s R N A をコードする構築物の概略図。

【図 1 4】 視認できる表現型を生じるイントロン内に埋め込まれた反復繰り返し。

【図 1 5】 視認できる表現型に通じるトウモロコシ穂中の α -ゼインのサイレンシング。

【図 1 6】 K A S 4 を含む p M O N 8 3 5 3 0 の概略図。

【図 1 7】 p M O N 8 3 5 3 0 で形質転換したダイズ種子の子孫。左側の種子は K A S 4 の発現に起因して収縮していて選択可能なマーカーの存在を示す一方、右の種子は正常であってマーカーフリーである。

【図 1 8】 2 T D N A 構築物中の同定配列として有用な K A S 4 を含む p M O N 1 0 7 3 1 4 の概略図。

【図 1 9】 同定遺伝子として有用な s p l A を含む p M O N 6 8 5 8 1 の概略図。

【図 2 0】 p M O N 6 8 5 8 1 で形質転換した子孫ダイズ種子。右側の種子は s p l A の発現に起因して収縮していてスクリーニング可能または選択可能なマーカーの存在を示す一方、左の種子は正常であってマーカーフリーである。

【図 2 1】 2 の T-D N A ベクター形式-概略図。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 0】

(発明の詳細な説明)

【0 0 2 1】

以下は、本発明を実施することにおいて当業者を助けるために提供した本発明の詳細な説明である。当業者は、本発明の趣旨または範囲から逸脱することなく、本明細書に記載した形態における修飾および変化をなすことができる。

【0 0 2 2】

本発明は、種子発現した同定遺伝子、配列またはカセットによって付与される表現型に基づいて、同定遺伝子およびマーカー遺伝子配列を含む種子から、同定配列およびマーカー遺伝子配列を欠くが目的の遺伝子または複数の遺伝子 (G O I) を含む種子を効率的に区別することを許容する構築物および方法を提供することによって、先行技術における欠点を克服する。詳細には、本発明は、1 の形態において、(i) 関心のある遺伝子；および (i i) 種々の植物組織中で発現し得る選択可能またはスクリーニング可能な遺伝子に物理学的に連結した種子中で発現する同定遺伝子を含む形質転換構築物および植物細胞を形質転換する方法を提供し、ここに該構築物および/または形質転換法は (i) および (i i) の遺伝因子が独立して植物ゲノムに取り込まれ、したがって遺伝学的に互いに分離するように設計することができる。

【0 0 2 3】

種子組織における同定配列の発現またはその欠失は、種子発現型同定配列および物理学的に連結した選択可能またはスクリーニング可能なマーカー遺伝子を欠く種子および植物の直接的同定を許容する一方、関心のあるトランスジーンをいまだ含む種子および植物の

10

20

30

40

50

選択を許容する。関心のある遺伝子を含み、種子レベルでマーカー遺伝子を欠く種子を選択することは、それが比較的費用集約的および労働集約的である以前に利用されていたスクリーニング方法の必要性を回避する点において著しい進歩を表す。また、スクリーニングとして省力し得る時間は、例えば連鎖—サザン分析に必要なように、次世代の植物が組織収穫を許容する生長を必要とすることなく、発芽の前またはその間に行うことができる。

【0024】

1の形態において、植物組織の形質転換は、アグロバクテリウムまたは他のリゾビア（Rhizobia）媒介法（例えば、参照することによって本願明細書に特異的に取り込まれる、「Use of Non-Agrobacterium Bacterial Species for Plant Transformation」なる発明の名称で2006年5月16日に出願された米国仮特許出願60/800,872および指定代理人ファイル番号MONS: 100USP1を参照されたい）、および種子で発現する同定配列を含むDNA配列および物理学的に連鎖した選択可能またはスクリーニング可能なマーカー遺伝子をT-DNA上または他の配列上に一緒に存在させ、それを植物細胞に移入する方法（例えば、T-DNA RBおよび／またはLB配列によって挟まれた、またはボーダー配列を含まない）によって行う。同定配列およびマーカー遺伝子は、関心のある遺伝子をそれ自体のRBおよびLB配列によって挟まれた別のT-DNA上に存在させつつ物理学的に連鎖した植物に移し得、または他の配列を植物細胞に移してそれを独立した遺伝子座に組み込むことができる（例えば、図21）。選択可能および／またはスクリーニング可能なマーカーは、形質転換した植物組織の同定を許容する。受精能力のある植物を得ることができ、次世代において表現型の分離を継がせるために、育種スキームにおいて自家受粉または交雑することができる。かかる育種を行う戦略は当該技術分野でよく知られており、異なる植物間で詳細に変化し得る。同定配列の種子発現または発現の欠損は、マーカーおよび同定配列の存在に関して種子の容易な同定を許容する。例えば、関心のある遺伝子は、除草剤耐性、抗生物質抵抗性、昆虫抵抗性、病気抵抗性、ストレス耐性（例えば、渇水および低温）、高められた栄養効率性、高められた栄養含量（例えば、アミノ酸、タンパク質、糖、炭水化物、脂肪酸および／または油）、不稔系、産業用酵素（例えば、医薬およびバイオ燃料用の加工酵素）および高められた収量よりなる群から選択される特性をコードする少なくとも1の植物発現カセットを含み得る。

【0025】

植物細胞に移行し得る配列（例えば、T-DNA）は、形質転換に利用する細菌株中の1の形質転換ベクターに存在し得る。もう1の形態において、同定配列および植物選択可能なマーカーを含む配列、および、関心のある遺伝子（または複数の遺伝子）は細菌株中の別の形質転換ベクター上に存在し得る。いまだもう1の形態において、同定配列および植物選択可能なマーカーを含むT-DNAおよび関心のある遺伝子を含むT-DNAは、形質転換と一緒に用いる別の細菌細胞または細菌株に見出し得る。

【0026】

いまだもう1の形態において、(i) 関心のある遺伝子；および(ii) 種子中で発現し、かつ、選択可能またはスクリーニング可能なマーカー遺伝子に物理学的に連鎖した同定配列を含むDNA配列は、マイクロプロジェクティル・ボンバードメントのような物理学的方法によって植物細胞に導入することができる。かかる形態において、(i) および(ii) のDNA配列は、DNAでのマイクロプロジェクティルのコーティングの前またはその間に一緒に混合し得る別のDNAフラグメント上に位置させることができる。DNA配列は単一のマイクロプロジェクティル上に存在させることができ、あるいは、それはボンバードメントに先立って一緒に混合する別のマイクロプロジェクティル上に存在させることができる。

【0027】

同定配列によって伝達される表現型は、構成的種子特異的プロモーターに連結した外因性または内因性の遺伝子の異所過剰発現、またはアンチセンスRNA、RNA干渉または同時抑制技術を用いた内因性遺伝子のダウンレギュレーションによって達成し得る。内因

性遺伝子の例には、限定されるものではないが、糖／デンプン代謝、タンパク質代謝および脂肪代謝に関与する遺伝子が含まれ得る。

【0028】

1の形態において、同定配列の種子発現は、同定配列を含むトランスジェニック植物の種子に検出可能な表現型を生じる。幾つかの形態において、表現型は、視覚検査によって検出することができ、種子の色、不透明性（または透明性）、蛍光、テクスチャー、大きさ、形、発芽能、生存能力あるいは一般的に物理学的または生化学的にアッセイ可能であって非トランスジェニック受容遺伝子型において見出されるものとは異なるいずれかの成分または特性における変化が含まれ得る。ある種の形態において、同定配列には、g u s A、g f p（Pangら，1996）、フィトエンシンターゼ、またはフィトエンデサチュラーゼをコードする遺伝子、またはアントシアニン遺伝子（P 1、L c、B－P e r u、C 1、R、R c、m y b Aまたはm y b 1（例えば、Selingerら，1998；ludwigら，1989；Himiら，2005；Kobayashiら，2002））が含まれる。特定の形態において、同定遺伝子は、トウモロコシ植物のような単子葉植物における発現に最適化されたc r t B配列を含む遺伝子を含む、フィトエンシンターゼをコードするc r t B遺伝子を含む（米国特許第5,429,939号；米国特許第6,429,356号；米国特許第5,545,816号）。このことに関して使用し得る遺伝子のもう1の例は、種子顔料の生成に関与する遺伝子である。

【0029】

他の形態において、表現型は、触媒活性の検出によってアッセイ可能である。いまだ他の形態において、表現型は組織切除表現型、例えば花粉、卵または種子組織の形成における遮断である。生殖体の生成または生存能力に必要な遺伝子をサイレンシング（silence）する、マーカー遺伝子を含む受精を減少または妨害する組成物および方法も、想像される。例えば、花粉の発達および生存能力に必要な遺伝子のサイレンシングを生じる配列を使用し得る。マーカー遺伝子を運搬する減数分裂分離から誘導された花粉は発達せず、あるいは見えないであろう。したがって、花粉を介したマーカー遺伝子の子孫への伝達が防がれる。異系交配授粉においては、すべての子孫がマーカーフリーであろう。他の内因性遺伝子のサイレンシングを生じる配列の使用から、種子表現型を生じる他の内因性遺伝子のサイレンシングを生じる配列（m i R N Aを含むR N A i技術）までの使用も予想される。かかる遺伝子には、限定されるものではないが：ゼインのような種子貯蔵タンパク質、O p a q u e 2、w a x yをコードするかまたはその発現を修飾する遺伝子、ならびに種子における炭水化物、タンパク質、および／または脂質蓄積に関与するタンパク質をコードする他の遺伝子が含まれる。

【0030】

非－生存花粉の表現型を付与する同定配列の発現も望ましい。同定配列を有していない花粉穀物のみが卵を受精することができ、したがって、花粉－特異的プロモーターの制御下の同定配列を運搬するトランスジェニック系統を雄性授粉者として用いる場合に同定配列およびマーカー配列を含まない種子の収量を増加するからである。同定配列は、花粉に対して致死性であるかまたは花粉発芽に対して阻害的であるタンパク質を生成し得る。あるいは、必須の内因性花粉遺伝子に相同である一対の逆方向反復塩基配列の発現を用いて、遺伝子をサイレンシングし、花粉を非－生存性とすることができる。花粉特異的な遺伝子およびプロモーターの例は当業者に知られており、例えば、L A T 5 2およびL A T 5 9遺伝子、ならびに記載されているトマトのプロモーター（Eyalら，1995）が含まれる。

【0031】

もう1の形態において、同定配列は、関心のある遺伝子を有する種子の選択をさらに高め、同定配列およびマーカー遺伝子を有する種子を排除するために、種子および花粉の両方において発現させることができる。これは、2のトランスジーンからなる同定配列を用いることによって行い得、そのうちの1は種子中で発現し、もう1は花粉中で発現する。あるいは、花粉および種子中の同じ同定配列を発現し得るプロモーターも、花粉および種子の両方において検出可能な表現型を生じることができる。花粉および種子の両方で発現するプロモーターの例には、トウモロコシWaxy遺伝子（z m G B S；Shureら，1983）、

およびイネ小サブユニットA D P－グルコースピロホスフォリアーゼ（o s A G P；Andersonら，1991）である。花粉および種子の発現パターンもRussellおよびFromm，1997に記載されている。

【0032】

あるいは、同定配列は、検出可能な表現型が得られるように、細胞または種子代謝の炭水化物、タンパク質、脂質または他の生成物を変化し得る。1の形態において、同定配列は、同定配列およびマーカー遺伝子を含有する種子におけるデンプン蓄積を破壊するレバンスクラゼまたは酵母A T P依存性ホスホフルクトキナーゼ（A T P－P F K）をコードするs a c B遺伝子の内胚乳－特異的発現を許容する（Caimiら，1996；図12）。同定配列は遺伝子とすることができる。同定配列はさらに転写または翻訳融合物をコードし得る（例えば、米国特許第6,307,123号；米国特許公開20060064772）。 10

【0033】

米国特許第6,307,123号は、選択可能なマーカー遺伝子（n p t I I）とスクリーニング可能なマーカー遺伝子（g f p）との間の翻訳融合物の構築に関する。該方法を適用して、本明細書に記載する同定配列と本明細書に記載する選択可能またはスクリーニング可能なマーカーとの間の融合物を生成することができる。

【0034】

ポリペプチド融合物を作製するために用いることができるもう1の方法は、ユビキチン（U b）プロセッシング経路に基づく。この方法を用いて、2のタンパク質ドメインを含む長いポリペプチドを2の別々の活性タンパク質に切断する。この方法においては、単一の遺伝子カセットが2のO R Fをコードすることができ、その場合の2のO R F、例えばc r t BおよびE P S P S－C P 4はU bの14のC末端アミノ酸につづいて完全長のU b配列によって分離される。イン・ビボ（in vivo）翻訳後、内因性の脱－ユビキチン化酵素（D U B）がポリタンパク質を3の別々のユニットに切断する：1）U bの14のC末端アミノ酸中で終了する同定配列c r t Bを含むN－末端タンパク質；2）U bプロモーター、および3）選択可能なマーカーE P S P S－C P 4をコードするC－末端ポリペプチド。かかる方法は、当業者に知られている（例えば、Walkerら，2007）。 20

【0035】

同定配列と選択可能またはスクリーニング可能なマーカーとの転写融合は、内部リボソーム入口部位（I R E S）を用いることによって作製し得る。例えば、c r t BのO R FにつづいてE P S P S－C P 4のO R Fをコードする転写物は、それらの間に位置する機能的I R E Sを用いて作製し得る。幾つかのI R E Sは当業者に知られている（例えば、参照することによって本願明細書に取り込まれる、Dinkovaら，2005およびその中の参考資料；および、米国特許第7,119,187号を参照されたい）。 30

【0036】

種子組織における同定配列の表現型は、かすある中で視覚、生化学、免疫学および核酸ベース（例えば、P C R－ベース）の方法を含む方法によって検出し得る。同定配列は、検出かのような表現型をマーカー遺伝子の表現型から区別し得る種子組織における検出可能な表現型を付与し得る。同定配列によって付与された表現型は、種子発芽を変更することを含めることができる。同定配列は、表現型を識別し得るように、胚、内胚乳、子葉（または複数の子葉）、および種皮（種皮）を含む種子（穀粒）の1またはそれを超える部分で発現し得る。 40

【0037】

同定配列は、種なしの表現型も起し得る。1の形態において、組織破壊を行うために、同定配列は植物におけるd e f H 9－i a a Mまたはr o l Bの胚珠特異的発現を指示し（例えば、Rotinoら，1997、Carmiら，2003、GenBank AM422760、X64255、AE009418）、それは発達を阻害し、マーカーおよび同定配列を含む子房において種なし表現型を生じる。いまだもう1の形態において、同定配列は、種子発達を中断する穀物作物におけるO s C D P K 2の過剰発現を指示する（Morelloら，2000；例えば、GenBank Y13658）。 50

【0038】

遺伝子エレメントを設計して、内因性遺伝子の発現を抑制して、マーカー遺伝子を含まない種子からそれを含む種子の識別を許容する種子表現型を生じることが出来る。この同定配列の遺伝子エレメントは、例えばマーカーDNAカセット内に存在させて、種子表現型がマーカーの存在に連鎖させてマーカーを含む種子の迅速な同定を許容するようにマーカー遺伝子に物理学的に連鎖させる。

【0039】

RNAiを用いて、容易に記録される、好ましくは目視し得る、種子表現型を生じる1またはそれを超える遺伝子をサイレンシングすることができる。RNAi媒介種子表現型に必要なDNA配列はマーカー遺伝子と同じT-DNA上に位置する。マーカー遺伝子を含むいずれの子孫種子も、種子表現型を示し、容易に同定されるであろう。かかる種子は、マーカー遺伝子の存在について生育およびスクリーニングする必要がないであろう。したがって、同定配列によって付与された表現型を有さない種子のみが生育し、および／または、GOIの存在についてスクリーニングされる。種子が自家授粉または異系交雑からのものであるかに依存して、この方法は自家授粉植物種について少なくとも3×または異系交雑植物種については1×によって植えるおよびスクリーニングする必要がある種子の数を減少する。

【0040】

RNAi関連経路を用いて標的遺伝子をサイレンシングするために用いることができる広範な種々の組成物が、当業者に知られている。1の形態は、配列の逆方向反復塩基配列を転写するDNAカセットを集め、典型的には少なくとも約19-21bp長であってサイレンシングに標的化する1またはそれを超える遺伝子の部分に対応する二本鎖RNA(dsRNA)を作製することである。dsRNAは約19-21bp長であってサイレンシングに標的化する1またはそれを超える遺伝子の部分に対応することができる。同定配列を含むこのDNAカセットは、選択可能なマーカー遺伝子と同一のT-DNA内に位置する。当業者に知られている遺伝子をサイレンシングする他の方法には、限定するものではないが：同時抑制、アンチセンス、miRNA（天然または設計した）の発現、トランス作用siRNAの発現、およびリボザイムの発現が含まれる。いずれのこれらの方法も、遺伝子サイレンシング効果が必要な配列がマーカー遺伝子と同一のT-DNAに位置する場合には、用いることができる。

【0041】

同定配列は種子のサイズを増大または減少することができる。1の形態において、同定配列は、同定配列および選択可能なマーカー遺伝子を含むより大きな種子を生じる、アンチセンスRNAまたはRNA干渉またはコサプレッション技術（Jofukuら，2005）によってAP2遺伝子（例えば、GenBank U12546）のダウンレギュレーションを付与する。より大きな種子のサイズは、ARF2遺伝子（Schruffら，2006；例えば、GenBank受理番号NM 203251；NM 180913）、またはANT転写因子（MizukamiおよびFisher，2000；例えば、GenBank NM 202701、NM 119937、NM 180024、NM 101474、NM 202110）の異所の発現によっても行い得る。もう1の形態において、同定配列は、アンチセンスRNAもしくはRNAiまたはコサプレッション技術によるLEC2（例えば、GenBank AF400123）またはSnf-1（GenBank AB101657、AB101657、AB101655）遺伝子のダウンレギュレーションを運んでおり、これは減少した種子サイズに通じる（Mendozaら，2005；Radchukら，2006）。変化した種子サイズは、重量、形または手動および／もしくは機械的手段による篩い分けによって容易にソートすることができる。

【0042】

特定の検出可能な表現型を有する種子の同定のために本発明を用いて自動スクリーニング技術を実行し得ることが特に予期される。このようにして、多数の種子を効率的にスクリーニングすることができ、同定配列を欠く種子を収集し得る。自動技術は、人的技術の信頼よりもより迅速で、より安価でより正確となり得る。この方法で 사용할ことができるかかる種子ソーティング機器は記載されている。例えば、米国特許第4,946,046号は、色に従って種子をソートする装置を記載している。この機器においては、種子を回転式ド

ラムの均一な列のくぼみに置き、該種子をデジタル式イメージングカメラおよび光源の下側を通過させることによって、色に従って種子をソートする。イメージはカメラによって読まれ、コンピュータに送られ、それはドラム速度センサーからの情報も受ける。コンピュータは空気の突風を引き起こすシグナルを生成して、色の付いた種子を含むくぼみの底部の開口を通して空気を吹き込んでかかる種子を収集する。収集した種子は収集ホッパーに送給され、色の付いていない種子は別のホッパーに送給される。

【0043】

色の付いた種子の検出に用いる光源の波長ならびに色の付いた種子と検出カメラとの間に位置するバリアフィルタを変化させることによって、潜在的にはいずれの同定マーカもこの技術を用いて検出することができる。例えば、GFPを発現する種子を検出するためには、励起光は青色光UVスペクトル、典型的には約395nmである。UV放射に好適な光源は当業者によく知られており、キセノンおよび水銀ランプが含まれる。好適なフィルタセットも当業者によく知られており、例えば、BP450-490励起フィルタ、FT510発色光スプリッタおよびBP515-565バリアフィルタ(Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)が含まれる。かかるフィルタセットおよび放射波長は、その開示全体が参照することによって本明細書に取り込まれるHeimおよびTsienにより詳細に論じられている。

【0044】

1またはそれを超える同定配列(または複数の同定配列)を含む構成を使用することによって、選択力を複数の選択可能なおよび/またはスクリーニング可能な遺伝子および関心のある遺伝子に拡張することができる。したがって、種々の異なる形質転換事象を表す多数のトランスジェニック種子を効率的にスクリーニングすることができ、目的のセットの同定配列を有する(または欠く)種子のみを選択することができる。

【0045】

組換えDNAベクターは、例えば、線状DNAセグメントまたは閉環プラスミドとすることができる。ベクター系は単一のベクターもしくはプラスミド、または植物ゲノムに導入すべき全DNAと一緒に含む2またはそれを超えるベクターまたはプラスミドとすることができる。本明細書に記載する核酸分子は、例えば、植物細胞中で機能して連結したコード配列または他のDNA配列の発現を駆動する好適なプロモーターの制御下のベクターに好適に挿入することができる。この目的に多くのベクターが利用可能であり、適当なベクターの選択は当該ベクターに挿入すべき核酸のサイズおよび当該ベクターで形質転換すべき特定の宿主細胞に主に依存するであろう。各ベクターは、その機能ならびに一緒に使用した場合は和合性である特定のベクターおよび植物細胞に依存する種々のコンポーネントを含む。

【0046】

植物細胞の安定な形質転換およびトランスジェニック植物の確立に好適な多数のベクターがよく知られている。例えば、Gelvinら(1990)。典型的には、章物発現ベクターには、限定されるものではないが、関心のある転写ユニットの1またはそれを超える遺伝子が含まれ、その各々には5'非翻訳領域が含まれ、それには作動可能に連結されたタンパク質コード配列(「オープンリーディングフレーム」、ORF)の転写(例えば、エンハンサー、転写開始点ほかのようなシス作用プロモーター配列)および翻訳(例えば、リボソーム結合部位)を制御する配列が含まれ; 3'非翻訳領域が含まれ、それには植物遺伝子の3'末端からのさらなる調節領域((Thornburgら, 1987); Anら, 1989)、例えばmRNA安定性を上昇する3'ターミネーター領域が含まれる。あるいは、植物発現ベクターは、例えば、RNAi-媒介アプローチによって植物遺伝子発現を変化させ得るmRNA分子が発現されるように設計することもできる。さらに、かかる構築物は通常、選択可能および/またはスクリーニング可能なマーカ転写ユニットおよび所望により細菌宿主細胞中でベクターの複製のために必要な複製開始点または他の配列を含むことができる。

【0047】

構築物は、例えば、ori322のようなエスシェリキア・コリの複製開始点、ori

10

20

30

40

50

VまたはoriRiのような広範な宿主範囲の複製開始点のような細菌細胞中の複製機能、ならびに、スペクチノマイシンまたはストレプトマイシンに対する抵抗性を付与するTn7アミノグルコシド・アデニルトランスフェラーゼ(aadA)をコードするSpec/Strepまたはゲンタマイシン(Gm、Gent)選択マーカー遺伝子のような選択マーカーのコード領域のような抗生物質選択を提供するプラスミド骨格DNAセグメントも含むことができる。植物形質転換については、宿主細菌株は、発現ユニットの移入機能を有するプラスミドを運搬しているアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens) ABI、C58、LBA4404、EHA101またはEHA105とする場合がある。植物形質転換の当業者に知られている他の菌株は、本発明において機能し得る。

10

【0048】

植物発現ベクターは、所望により、RNAプロセシングシグナル、例えばトランスジェン中のポリペプチドコード配列の上流または下流に位置し得るイントロンを含むことができる。また、発現ベクターは、植物遺伝子の3'非翻訳領域からのさらなる調節配列も含むことができる。これらの3'非翻訳領域は、mRNA転写終結シグナルを含む。植物発現ベクターに含まれる他の運動可能なエレメントには、5'リーダー配列、ランジットシグナル配列、およびコード配列が含まれ得る。

【0049】

発現およびクローニングベクターには、植物選択マーカーともいわれる選択遺伝子が含まれ得る。この遺伝子は、選択培養様式で成長させる形質転換した植物細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択遺伝子は、除草剤を含む抗生物質、または他の毒素、例えばネオマイシン、メトトレキサート、ジカンバ、グルホシネートまたはグリホセート、のような選択因子に対する抵抗性を付与するタンパク質をコードする。外因性タンパク質またはそのフラグメントで首尾よく形質転換した細胞は、例えば、薬剤抵抗性を付与するタンパク質を生成し、かくして選択様式で生存する。種々の選択可能/スクリーニング可能/評点付け可能なマーカーおよびそれらをコードする遺伝子の例は、MikiおよびMcHugh, 2004に開示されている。

20

【0050】

mRNAを生成する発現ベクターは、宿主植物細胞で認識され、関心のある核酸分子またはそのフラグメントをコードする核酸に作動可能に連結されている。誘導性または組織特異的なプロモーターも含むことができる。植物プロモーターは以下に論じる。

30

【0051】

1の形態において、使用する植物形質転換ベクターには、本発明の1またはそれを超えるヌクレオチド配列に作動可能に連結した外因性種子特異的プロモーターを含む単離されたおよび精製されたDNA分子が含まれる。もう1の形態において、プロモーターは種子発現されるが種子特異的でなく、かくして植物細胞におけるmRNA以外のものの生成を許容する。当業者であれば、DNAのセグメントをトランスジェニック植物における発現のために単一のコンボジットDNAセグメントに結合し得ることを容易に理解するであろう。

【0052】

本発明と一緒に用いる宿主細胞の形質転換に好適な方法は、プロトプラストの形質転換による(米国特許第5,508,184号; Omirullehら, 1993)、乾燥/阻害-媒介DNA取込みによる(Potrykusら, 1985)、エレクトロポレーションによる(米国特許第5,384,253号)、炭化珪素ファイバーとの振とうによる(Kaepplerら, 1990; 米国特許第5,302,523号; および米国特許第5,464,765号)、アグロバクテリウム-媒介形質転換による(米国特許第5,563,055号; 第5,591,616号; 第5,693,512号; 第5,824,877号; 第5,981,840号; 第6,384,301号)およびDNAコート粒子の加速による(米国特許第5,015,580号; 第5,550,318号; 第5,538,880号; 第6,160,208号; 第6,399,861号; 第6,403,865号; Padgettら, 1995)などのような、それによってDNAを細胞に導入することができる実質的にいずれの方法も含むと考えられる。これらのような技術の適用を通して、実質的にいずれの種の細

40

50

胞も安定に形質転換することができる。多細胞生物種の場合、形質転換細胞はトランスジェニック生物に再生することができる。

【0053】

発現ベクターを植物に導入する最も広範に利用されている方法は、アグロバクテリウムの天然形質転換系に基づく（例えば、Horschら，1985）。アグロバクテリウム・ツメファシエンスおよびリゾゲネスのTiおよびRiプラスミドは、各々、植物の遺伝子形質転換に寄与する遺伝子を運搬している。アグロバクテリウムベクター系およびアグロバクテリウム-媒介遺伝子トランスファーの説明は多くの参考文献によって提供されており、それにはGruberら，1993；Mikiら，1993，Moloneyら，1989，および米国特許第4,940,838号および第5,464,763号が含まれる。シノリゾビウム（*Sinorhizobium*）、リゾビウム（*Rhizobium*）およびメソリゾビウム（*Mesorhizobium*）のような天然に植物と相互作用する他の細菌を修飾して多数の多様な植物への遺伝子トランスファーを媒介することができる（Broothaertsら，2005）。これらの植物関連の共生細菌は、ディスアームドTiプラスミドおよび好適なバイナリーベクターの両方を獲得することによって遺伝子トランスファーにコンピテントとすることができる。アグロバクテリウム-媒介形質転換法を介してトランスファーすべきDNA配列には、植物細胞中で発現すべき1またはそれを超える遺伝子を含むトランスファーDNA（T-DNA）の範囲を通常決定する右側ボーダー（RB）および左側ボーダー（LB）配列のような1またはそれを超える「ボーダー」配列が含まれ、さらに、オーバードライブ配列（Toroら，1989）または参照することによって本明細書に取り込まれる米国仮特許出願60/831,814に開示されているような複数のオーバードライブ配列のようなエンハンサー配列を含むことができる。

【0054】

ワタ形質転換の関係で特に有用となり得る技術は、米国特許第5,846,797、5,159,135号、第5,004,863号および第6,624,344号に開示されている。特にアブラナ属植物を形質転換する技術は、例えば米国特許第5,750,871号に開示されており；ダイズを形質転換する技術は、例えば、Zhangら，1999、米国特許第6,384,301号および米国特許第7,002,058号に開示されている。本発明を用いた用途を見出し得る植物のいくつかの非限定的な例には、アルファルファ、オオムギ、豆類、ビート、ブロッコリ、キャベツ、ニンジン、キャノーラ、カリフラワー、セロリー、ハクサイ、トウモロコシ、ワタ、キュウリ、ナス、ウイキョウ、インゲンマメ、ヒョウタン、ニラネギ、レタス、メロン、エンバク、オクラ、タマネギ、エンドウ、コショウ、カボチャ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ダイコン、イネ、サトウモロコシ、ダイズ、ハウレンソウ、カボチャ、スウィートコーン、テンサイ、ヒマワリ、トマト、スイカおよびコムギが含まれる。

【0055】

ベクターまたは構築物は、種々の調節領域も含み得る。5'非翻訳リーダー配列は、選択したプロモーターに由来して本発明のDNA分子の外因性遺伝子配列を発現することができ、望まれる場合には、mRNAの翻訳が上昇するように特異的に修飾することができる。5'非翻訳領域は選択したプロモーターから誘導して本発明のDNA分子の外因性遺伝子配列を発現させることができ、望ましい場合は、mRNAの翻訳を増大するように特異的に修飾することができる。5'非翻訳領域は、植物ウイルスRNA（例えば、タバコモザイクウイルス、タバコエッチウイルス、トウモロコシ矮化モザイクウイルス、アルファルファモザイクウイルス）から、好適な真核生物遺伝子、植物遺伝子（コムギおよびトウモロコシ・クロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子リーダー）から、または合成遺伝子配列からも得ることができる。リーダー配列は、非関連のプロモーターまたはコード配列からも誘導し得る。本発明の関係で有用なリーダー配列には、トウモロコシHsp70リーダー（参照することによってその全体が本明細書に取り込まれる、米国特許第5,362,865号および米国特許第5,859,347号）およびTMVオメガエレメント（Gallieら，1989）が含まれる。翻訳リーダーの例には、数ある中でも、トウモロコシおよびペチュニアのヒートショックタンパク質リーダー（米国特許第5,362,865）、植物ウイルスコートタンパク質リーダー、植物rubiscoリーダー、GmHsp（米国特許第5,659,122

号)、PhDnaK(米国特許第5,362,865号)、AtAnt1、TEV(CarringtonおよびFreed, 1990)、AGRtunos(GenBank受理番号V00087; Bevanら, 1983)、OsAct1(米国特許第5641876号)、OsTP1(米国特許第7,132,528号)およびOsAct15(米国特許公開番号20060162010)が含まれる。

【0056】

イントロン配列は単子葉植物細胞中のトランスジーンの発現を援助することが当該技術分野で知られている。イントロンの例には、トウモロコシ・アクチンイントロン(米国特許第5,641,876号)、トウモロコシHSP70イントロン(ZmHSP70; 米国特許第5,859,347号; 米国特許第5,424,412号)およびイネTP1イントロン(OsTP1; 米国特許第7,132,528)が含まれ、本発明を実施するのに有利である。

10

【0057】

ベクターはトランジット・ペプチド核酸配列も含むことができる。カロテノイド合成に関与するものを含む多くのクロロプラスト局在タンパク質が前駆体として核遺伝子から発現し、インポート工程の後に削除されるクロロプラストトランジットペプチド(CTP)によってクロロプラストに標的化される。他のかかるクロロプラストタンパク質の例には、リブローズ-1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼの小サブユニット(SSU)、ならびに集光性複合体タンパク質Iおよびタンパク質IIが含まれる。非-クロロプラストタンパク質をCTPとの融合タンパク質の使用によってクロロプラストに標的化し得ること、ならびに、CTP配列がタンパク質をクロロプラストに標的化するのに十分であることはイン・ビボ(in vivo)およびイン・ビトロ(in vitro)で実証されている。アラビドプシス・タリアーナ(Arabidopsis thaliana)(At)EPSPS CTP(Kleeら, 1987)およびペチュニア・ハイブリダ(Ph)EPSPS CTP(della-Cioppaら, 1986)のような好適なクロロプラスト・トランジットペプチドの取込みが、外因性タンパク質配列をトランスジェニック植物のクロロプラストに標的化することが示されている。当業者であれば、必要であれば、特定のCTPの機能性を利用して所与の遺伝子産物をクロロプラストに輸入する種々のキメラ構築物を作製し得ることを認識するであろう。本発明を実施するのに有用となり得る他のCTPには、PsRbcS由来CTP(ピサム・サティバム(Pisum sativum)Rubisco小サブユニットCTP; Coruzziら, 1984); ArRbcS CTP(アラビドプシス・タリアーナRubisco小サブユニット1A CTP; CTP1; 米国特許第5,728,925号); AtShkG CTP(CTP2; Kleeら, 1987); AtShkGZm CTP(CTP2合成; 単子葉植物発現に最適化したコドン; W004009761の配列番号: 14); PhShkG CTP(ペチュニア・ハイブリダEPSPS; CTP4; 単子葉植物発現に最適化したコドン; Gasserら, 1988); TaWaxy CTP(トリチカム・アエスチバム(Triticum aestivum)顆粒結合デンプン合成酵素CTP合成、トウモロコシ発現に最適化したコドン; Clarkら, 1991); OsWaxy CTP(オリザ・サティバ(Oryza sativa)デンプン合成酵素CTP; Okagaki, 1992); NtRbcS CTP(ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)リブローズ1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニットクロロプラスト・トランジット・ペプチド; Mazurら, 1985); ZmAS CTP(ゼア・メイズ(Zea mays)アントラニル酸シンターゼ・アルファ2サブユニット遺伝子CTP; Gardinerら, 2004); およびRgAS CTP(ルタ・グラベオレンズ(Ruta graveolens)アントラニル酸シンターゼCTP; Bohlmannら, 1995)が含まれる。有用となり得る他のトランジット・ペプチドには、トウモロコシcab-m7シグナル配列(PCT WO 97/41228)およびエンドウ(Pisum sativum)グルタチオン還元酵素シグナル配列(PCT WO 97/41228)が含まれる。

20

30

40

【0058】

転写の終結は、組換えトランスジーン(例えば、関心のある遺伝子、スクリーニング可能な遺伝子を含む同定配列、または植物選択マーカー遺伝子)に作動可能に連結した3'非-翻訳DNA配列によって行い得る。組換えDNA分子の3'非-翻訳領域は、植物中で機能してRNAの3'末端にアデニル酸ヌクレオチドの付加を引き起こすポリアデニル化シグナルを含む。3'非-翻訳領域は植物細胞中で発現する種々の遺伝子から得ること

50

ができる。ノパリンシンターゼ 3' 非翻訳領域 ((Fraleyら, 1983) はこのキャパシティーにおいて通常使用される。ピサム・サティバム (*Pisum sativum*) R b c 2 遺伝子からのポリアデニル化分子 (P s . R b c S 2 - E 9 ; Coruzziら, 1984)、A G R t u . n o s (Genbank受理番号E01312)、E 6 (受理番号U30508)、イネ・グルテリン (Okitaら, 1989) および T a H s p 1 7 (コムギ低分子量ヒートショックタンパク質遺伝子; 受理番号X13431) は本発明を用いる使用に特に有利となり得る。

【0059】

構造プロモーターの使用が望ましい本発明の形態のためには、いずれのよく知られた構造植物プロモーターも使用することができる。構造植物プロモーターには、例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 3 5 S プロモーターが含まれ、それは単子葉 (例えば、D ekeyserら, 1990) ; Teradaら, 1990) を含む大部分の植物組織において構造的な高レベルの発現を付与し (例えば、Odellら, 1985)、ノパリンシンターゼプロモーター (Anら, 1988)、オクトピンシンターゼプロモーター (Frommら, 1989)、カリフラワーモザイクウイルス 1 9 S プロモーター、ゴマノハグサモザイクウイルス 3 5 S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター、マンノピンシンターゼプロモーターおよびヒストンプロモーターが含まれる。

【0060】

本発明の他の形態のために、環境、ホルモン、化学的および／または発生シグナルにตอบสนองして調節されるよく知られた植物遺伝子プロモーターを用いることができ、それには、(1) 熱 (Callisら, 1988)、(2) 光 (例えばエンドウ r b c S - 3 A プロモーター、Kuhlemeierら, 1989; トウモロコシ r b c S プロモーター、SchaffnerおよびSheen, 1991; またはクロロフィル a / b - 結合タンパク質プロモーター、Simpsonら, 1985)、(3) アブシジン酸のようなホルモン (Marcotteら, 1989)、(4) 傷 (例えば、wunl, Siebertzら, 1989); または (5) ジャスモン酸メチル、サリチル酸ほかのような化学物質によって調節されるプロモーターが含まれる。また、(6) 器官-特異的プロモーター (例えば、Roshalら, 1987; Schernthanerら, 1988; Bustosら, 1989) を用いることも有利になり得る。

【0061】

トランスジェニック植物中のポリヌクレオチドの組織-特異的発現を駆動するために使用し得る広範な種々の植物プロモーター配列が存在する。事実、本発明の特定の形態において、使用するプロモーターは種子特異的なプロモーターである。 β -コングリシニンのプロモーター (Chenら, 1989) またはナピンプロモーターのような他の種子-特異的プロモーターは、植物種子成熟の間に調節され (Kridlら, 1991; Kohno-Muraseら, 1994)、オオムギ H v . P e r 1 (Staceyら, 1996)、ファゼオリン (Bustosら, 1989)、ダイズトリプシンインヒビター (Riggsら, 1989)、A C P (Baersonら, 1993)、ステアロイル-A C P デサチュラーゼ (Slocombeら, 1994)、ダイズ β -コングリシニンの α' サブユニット (P-G m 7 S、例えばChenら, 1986を参照されたい)、V i c i a f a b a U S P (P-V f . U s p、例えば配列番号: 1、2 および 3、米国特許出願20030229918を参照されたい)、グロブリンプロモーター (例えば、BelangerおよびKriz, 1991を参照されたい)、ダイズ β -コングリシニンのアルファ・サブユニット (7 S アルファ; 参照することによって取り込まれる米国特許第6,825,398号) およびゼア・メイズ (*Zea mays*) L 3 オレオシンプロモーター (P-Z m . L 3、例えばHongらを参照されたい; また、参照することによってその開示が具体的に本明細書に取り込まれる米国特許第6,433,252号) が含まれる。

【0062】

ゼインはゼア・メイズ (*Zea mays*) 内胚乳に見出される一群の貯蔵タンパク質である。ゼイン遺伝子のゲノムクローンが単離されており (Pedersenら, 1982; 米国特許第6,326,527号)、15 k D a、16 k D a、19 k D a、22 k D、27 k D a およびガンマ遺伝子を含むこれらのクローンからのプロモーターも用いることができる。例えば、ゼア・メイズで機能することが知られている他のプロモーターには、以下の遺伝子のプロモータ

ーが含まれる：w a x y (RussellおよびFromm, 1997; Shureら, 1983)、B r i t t l e (Girouxら, 1994)、S h r u n k e n 2、分枝酵素IおよびII、デンプン合成酵素、脱分枝酵素、オレオシン、グルテリン、スクロースシンターゼ。ゼア・メイズ内胚乳発現用の他のプロモーターは、イネからのグルテリン遺伝子のプロモーター、より詳細にはO s g t - 1プロモーター (Zhengら, 1993) である。イネにおけるかかるプロモーターの例は、A D P G P Pサブユニットのプロモーター、顆粒結合および他のデンプン合成酵素、分枝酵素、脱分枝酵素、スクロースシンターゼ (Yangら, 1990) およびB e t 1 1 (基底内胚乳移動層) およびグルテリン1が含まれる。

【0063】

本発明で有用となり得る他のプロモーターの例は、米国特許第6,437,217号 (トウモロコシR S 8 1プロモーター)、米国特許第5,641,876号 (イネアクチンプロモーター; O s A c t 1)、米国特許第6,426,446号 (トウモロコシR S 3 2 4プロモーター)、米国特許第6,429,362号 (トウモロコシP R - 1プロモーター)、米国特許第6,232,526号 (トウモロコシA 3プロモーター)、米国特許第6,177,611号 (構造的トウモロコシプロモーター)、米国特許第5,322,938号、第5,352,605号、第5,359,142号および第5,530,196号 (3 5 Sプロモーター)、米国特許第6,433,252号 (トウモロコシL 3オレオシンプロモーター)、米国特許第6,429,357号 (イネアクチン2プロモーターならびにイネアクチン2イントロン)、米国特許第5,837,848号 (根特異的プロモーター)、米国特許第6,294,714号 (光誘導プロモーター)、米国特許第6,140,078号 (塩誘導プロモーター)、米国特許第6,252,138号 (病原菌誘導プロモーター)、米国特許第6,175,060号 (リン欠乏誘導プロモーター)、米国特許第6,635,806号 (ガンマーコイキシンプロモーター) および米国特許第7,151,204号 (トウモロコシクロロプラスト・アドラーゼプロモーター) が含まれる。用途を見出し得るさらなるプロモーターは、ノパリンシンターゼ (N O S) プロモーター (Ebertら, 1987)、オクトピンシンターゼ (O C S) プロモーター (それはアグロバクテリウム・ツメファシエンズの癌腫誘導プラスミド上に運搬されている)、カリフラワーマザイクウイルス (CaMV) 1 9 Sプロモーター (Lawtonら, 1987)、CaMV 3 5 Sプロモーター (Ode11ら, 1985)、ゴマノハグサマザイクウイルス3 5 Sプロモーター (Walke rら, 1987) のようなカリモウイルスプロモーター、スクロースシンターゼプロモーター (Yangら, 1990)、R遺伝子複合体プロモーター (Chandlerら, 1989) およびクロロフィル結合a / b結合タンパク質遺伝子プロモーターほかが含まれる。本発明においては、エンハンサー配列を有するC a M V 3 5 S (e 3 5 S; 米国特許第5,322,938号; 第5,352,605号; 第5,359,142号; および第5,530,196号)、F M V 3 5 S (米国特許第6,051,753号; 第5,378,619号)、peanut chlorotic streak caulimovirus (P C l S V; 米国特許第5,850,019号)、A t . A c t 7 (受理番号U27811)、A t . A N T 1 (米国特許公開公報20060236420)、F M V . 3 5 S - E F 1 a (米国特許公開公報20050022261)、e I F 4 A 1 0 (受理番号X79008) およびA G R t u . n o s (GenBank受理番号V00087; Depic kerら, 1982; Bevanら, 1983)、イネサイトゾル・トリオースリン酸イソメラーゼ (OsTP I; 米国特許第7,132,528号)、およびイネアクチン1 5 遺伝子 (O s A c t 1 5; 米国特許公開公報20060162010) プロモーターは特に有利である。幾つかの例、例えばO s T P I およびO s A c t 1 5 において、プロモーターは5' U T R および / または第1のイントロンを含むことができる。当業者によって知られている本発明を実施するのに有用な他のプロモーターも本発明によって予想されている。

【0064】

植物発現ベクターは、本発明において使用して分離する細胞または発現用 (発現の喪失) の子孫をモニターすることができるスクリーニング可能または評点付け可能なマーカー遺伝子カセットも含むことができる。例示的なマーカーは知られており、種々の発色性基質の酵素をコードする β -グルクロニダーゼ (G U S) (Jeffersonら, 1987a; Jefferso nら, 1987b); 植物組織中でのアントシアニン色素 (赤色) の生成を調節する産物をコードするR-遺伝子座 (Dellaportaら, 1988); β -ラクタマーゼ遺伝子 (Sutcliffeら, 1978); 種々の発色性基質の酵素をコードする遺伝子 (例えば、P A D A C、発色性セフ

ァロスポリン) ; ルシフェラーゼ遺伝子 (Owら, 1986) ; 発色性カテコールを変換することができるカテコルジオキシゲナーゼをコードする x y 1 E 遺伝子 (Zukowskyら, 1983) ; α -アミラーゼ遺伝子 (Ikaturら, 1990) ; チロシンを D O P A およびドーパミンに酸化し、ついでメラニンに縮合することができる酵素をコードするチロシナーゼ遺伝子 (Katzら, 1983) ; 緑色蛍光タンパク質 (Elliotら, 1999) および α -ガラクトシダーゼ) が含まれる。スクリーニング可能または評点付け可能なマーカー遺伝子は、スクリーニング可能または評点付け可能な遺伝子を含む同定配列と同じ遺伝子産物をコードすることができ、あるいは異なる遺伝子産物をコードすることができる。しかしながら、同定配列は卵、花粉または種子組織で発現され、一方スクリーニング可能または評点付け可能なマーカー遺伝子は形質転換植物細胞を同定する工程の間に発現する。同定配列は構成的に発現させることもできるが、卵、花粉または種子組織における表現型を運ぶのみでもよい。

10

【0065】

トランスジェニック植物は、植物細胞培養の分野でよく知られている方法によって形質転換植物細胞から再生することができる。アグロバクテリウム形質転換法を用いて形成したトランスジェニック植物は、典型的に、1つの染色体に挿入された単一の単純な組換え D N A 配列を含み、トランスジェニック事象といわれる。かかるトランスジェニック植物は、挿入した外因性配列に対して異型接合であるといえることができる。トランスジーンに関して同型接合であるトランスジェニック植物は、単一の外因性遺伝子配列を含む独立した分離するトランスジェニック植物をそれ自体に交雑 (自家授粉) することによって得ることができ、例えば F 0 植物から F 1 種子を得ることができる。生成した F 1 種子の 1 / 4 はトランスジーンに関して同型接合であろう。F 1 種子を発芽させると植物を生じ、それは典型的には異型接合体および同型接合体の間の区別を許容する S N P アッセイまたは加熱増幅アッセイを用いて接合性について試験することができる (すなわち、接合性アッセイ)。

20

【0066】

多数の同定配列を使用することができ、例えば、その発現が視認し得る表現型を生じ得る遺伝子を用いることができ、それには g u s、g f p および l u c の使用が含まれる (例えば、Owら, 1986 ; WO 97/41228 および米国特許第6,583,338号 ; 例えばM26194 ; M15077を参照されたい)。「shurunken」種子表現型に通じるレバンスクラーゼ遺伝子、S a c B (Caimiら, 1996 ; 例えば、X02730)、または発芽の素材に通じるピロホスファターゼ遺伝子 (Hajirezaeiら, 1999) も用いることができる。フィトエンシンターゼをコードする遺伝子 (c r t B) も当該技術分野において知られており、それには、数ある中でもエルビニア・ウレドボラ (Erwinia uredovora) (例えば、Misawaら, 1990 ; Sandmann および Misawa, 1992 ; 米国特許第5,429,939号 ; 第6,429,356号) およびパントエア/エンテロバクター・アグロメランス (Pantoea/Enterobacter agglomerans) (例えば、GenBank M38423 ; M87280) からのものが含まれる。

30

【0067】

多面発現性種子発現型を生成する大部分のトランスジーンは、スクリーニング可能なマーカーに連結した視認し得る標識遺伝子として用いて、関心のある陽性種子のマーカーフリー遺伝子を同定することができる。視認可能な表現型はトランスジーン of 異所性過剰発現によって生成することができ、またはアンチセンス R N A、R N A 干渉または同時抑制技術によって内因性代謝経路遺伝子のダウンレギュレーションからも生じ得る。

40

【0068】

以下の定義および方法を提供して本発明をより良好に規定し、当業者が本発明を実施することに案内する。別段指摘しない限り、用語は、関連する技術における当業者による慣用的な用法に従って理解されるべきである。分子生物学における一般的な用語の定義は、Riegerら (1991) ; および Lewin (1994) にも見出すことができる。37 C F R セクション 1. 8 2 2 に記載されている D N A 塩基の命名法を用いる。

【0069】

「C P 4」、「a r o A : C P 4」、「A G R T U . a r o A : C P 4」、「C P 4

50

EPSPS」および「EPSPS CP4」とは、EPSPシンターゼ遺伝子およびアグロバクテリウム・ツメファシエンス (AGRTU) CP4株から精製したタンパク質をいい、それは植物で発現した場合、グリホセートおよびグリホセート含有除草剤処方に対する耐性を付与する（参照することによってその全体が本明細書に取り込まれる米国特許第5,633,435号）。遺伝子配列はネイティブであっても、植物において発現を高めるために修飾されていてもよい。

【0070】

DNA「セグメント」とは、DNA構築物のDNA配列の領域をいう。DNAセグメントは、アグロバクテリウム-媒介植物細胞形質転換に用いる構築物に見出されるT-DNA分子の中、間に存在するかまたはそれを挟んで存在することができる。例えば、DNAセグメントは、細菌中のプラスミドの複製のための遺伝子エレメントまたは他の種々のエレメント、ならびに、植物細胞形質転換に使用するよう設計されたDNA構築物の発現カセットを含むことができる。したがって、「DNAカセット」は、細胞中のDNA配列の発現のためのエレメント（または複数のエレメント）を含むDNAセグメントを含むことができる。

10

【0071】

「融合タンパク質」とは、単一の単位として発現される翻訳融合物をいい、非-融合出発遺伝子配列によってコードされるタンパク質の表現型を付与する遺伝子産物をいまだ産生する。

【0072】

「単離した」核酸とは、天然発生する核酸、すなわち他の染色体および染色体外のDNAおよびRNAを含む生物の細胞中の他の核酸配列から、慣用的な核酸精製方法によって実質的に分離または精製されたものである。該語は、組換え核酸および化学合成核酸も包含する。

20

【0073】

「グリホセート抵抗性遺伝子」とは、植物中でトランスジーンとして発現した場合に、さもなければ植物を損傷または殺すであろう除草剤グリホセートの耐性レベルの能力を付与するいずれの遺伝子をもいう。当業者に知られているいずれのグリホセート耐性遺伝子も、本発明の実施における使用に好適である。グリホセート（N-ホスホノメチルグリシンおよびいずれのその塩のいずれか除草剤的に活性な形を含む）は、酵素5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ（EPSPS）を阻害する。グリホセート耐性を付与するために、種々の天然および変異型EPSPS酵素がトランスジェニック植物で発現されており、それらのいずれのものも本発明において使用することができる。これらのEPSPSの幾つかの例には、米国特許第4,940,835号、第4,971,908号、第5,145,783号、第5,188,642号、第5,310,667号および第6,803,501号と一致して記載および／または単離されたものが含まれる。それらは、アグロバクテリウム種 CP4株（AGRTU. aroA:CP4）から単離されたクラスII EPSPS遺伝子のような、構造的に異なる非-相同EPSPS遺伝子から誘導することができる。

30

【0074】

「同定配列」なる語は、種子または生殖体の色、不透明性または透明性、蛍光、テクスチャー、サイズ、形、発芽能または生存能のような検出可能な表現型、または細胞もしくは種子の代謝の他の産物を付与する生成物をコードする核酸をいう。同定配列は、RNA-i媒介法を介するような、他の遺伝子の発現のダウンレギュレーションを介して表現型を付与し得るヌクレオチド配列（例えば、遺伝子フラグメント）を含み得る。ある種の形態において、同定配列は、gusA、gfpまたはcrtB遺伝子のようなスクリーニング可能な遺伝子を含む。特定の形態において、同定配列は、エルビニア・ハービコーラ（Erwinia herbicola）パントエア・アグロメランズ（Pantoea agglomerans；参照することによって本明細書に取り込むGenBank M38423；および米国特許第5,429,939号、第6,429,356号）からのフィトエンシンターゼをコードするcrtB遺伝子を含む。同定配列は、抗生物質抵抗性または除草剤耐性をコードするもののような植物の選択可能、スクリーニ

40

50

ング可能および／または評点付け可能なマーカー遺伝子に物理学的に連結する。同定配列は、種子における検出可能な（例えば、スクリーニング可能または選択可能な）表現型を付与することができる。

【0075】

第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的な関係で位置する場合には、第1の核酸配列は第2の核酸配列と「作動可能に」結合しているまたは「連結している」。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響する場合は、プロモーターはタンパク質コード配列に作動可能に連結している。一般的に、作動可能に連結したDNA配列は隣接しており、2のタンパク質コード領域を結合する必要がある場合は、同じ読み枠で隣接している。

10

【0076】

「植物」なる語は、単子葉（例えば、ユリ、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギほか）、双子葉（例えば、ダイズ、ワタ、トマト、キャノーラ、ジャガイモ、アラビドプシス（*Arabidopsis*）、タバコほか）、裸子植物（マツ、モミ、ヒマラヤスギほか）を含むいずれの高等植物またはその子孫を包含し、植物の再生単位（例えば、種子、球根、塊茎、または植物を再生できる植物からの他の部分もしくは組織）、果実、花ほかを含む。

【0077】

「組換え核酸」は、例えば化学合成または遺伝子工学的技術によって核酸の単離したセグメントの操作によって2の別の方法で分離した配列のセグメントの人工的な組み合わせによって作製する。

20

【0078】

「DNA構築物」または「DNAベクター」なる語は、組換えDNA技術によって機能的に影響を及ぼす様式で連結されたプロモーター、タンパク質コード配列、3'非翻訳領域ほかのような1またはそれを超えるDNA配列を含む、いずれかの起源に由来する、いずれかのプラスミド、コスミド、ウイルス、自律的複製配列、ファージまたは他の環状一本鎖もしくは二本鎖のDNAまたはRNAをいう。植物形質転換用の組換えDNAベクターは、細菌細胞中で複製することができる一般的には二本鎖の環状プラスミドである。組換え核酸構築物を作製および使用する慣用的な組成物および方法はよく知られている。例えば、数ある中でもSambrookら、1989；およびAusubelら、1992（定期的に改訂されている）およびClarkら（1997）。

30

【0079】

「プロモーター」または「プロモーター領域」なる語は、RNAポリメラーゼの認識部位および／または転写の開始に必要な他の因子を正確な部位に提供することによってメッセンジャーRNA（mRNA）の生成を制御することによってコード配列の発現を制御する、通常はコード配列の上流（5'）側に見出される核酸配列をいう。本明細書で予期するように、プロモーターまたはプロモーター領域には、種々の調節配列への連結、ランダムもしくは制御した突然変異導入、およびエンハンサー配列の付加もしくは倍加によって誘導した種々のプロモーターが含まれる。プロモーター領域は、mRNAを生成するその能力によって実証されるように、好適な組換えベクターの一部として宿主に導入した場合に、その制御下でコード配列の転写を駆動することに寄与する。

40

【0080】

「再生」とは、植物細胞（例えば、植物プロトプラストまたは外植片）から植物を成長させる工程をいう。

【0081】

「選択可能なマーカー」とは、その発現が核酸配列を含む細胞の同定を促進する表現型を付与する核酸配列をいう。選択可能なマーカーには、毒性化学物質に対する抵抗性（例えば、抗生物質抵抗性）を付与するもの、または、視覚的に区別される特徴（例えば、色の変化または蛍光）を付与するものが含まれる。

【0082】

有用な優勢植物選択可能なマーカー遺伝子には、数ある中でも、抗生物質抵抗性遺伝子

50

(例えば、ハイグロマイシン、イミダゾリノン、カナマイシン、ブレオマイシン、G 4 1 8、ストレプトマイシンまたはスペクチノマイシンに対する抵抗性) ; および除草剤抵抗性遺伝子 (例えば、ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ、修飾 A L S、B A R、修飾クラス I E P S P S、クラス I I E P S P S、DMO) をコードする遺伝子が含まれる。

【0083】

「評点付け可能なマーカー遺伝子」または「スクリーニング可能なマーカー遺伝子」という用語の中に含まれるものは、形質転換細胞を同定または選択する手段としてその分泌を検出し得る分泌可能なマーカーをコードする遺伝子である。例としては、抗体相互作用によって同定することができる分泌可能な抗原、または触媒的に検出することができる分泌可能な酵素さえもコードするマーカーが含まれる。検出可能である小さい拡散可能なタンパク質、細胞外溶液中に検出することができる小さい活性酵素 (例えば、 α -アミラーゼ、 β -ラクタマーゼ、ホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ)、または細胞壁に挿入または捕捉されたタンパク質 (拡張またはタバコ P R-S の発現単位に見出されるもののようなリーダー配列を含むタンパク質のような) を含む多数のクラスに入る。他の可能な選択可能および/またはスクリーニング可能なマーカー遺伝子は、当業者に明らかであろう。

【0084】

「T-DNA」とは、アグロバクテリウムまたは他のリゾビア媒介形質転換法を介して植物ゲノムに組み込まれる DNA 分子をいう。T-DNA 分子の少なくとも 1 の末端は、アグロバクテリウム T i または R i プラスミドからの T-DNA の少なくとも 1 のボーダー領域によって挟まれる。これらのボーダー領域は、一般的に右側ボーダー (R B) および左側ボーダー (L B) 領域といい、その起源に依存してヌクレオチド配列および長さの変化として存在する (例えば、アグロバクテリウムのノパリンまたはオクトピン産生株)。トランスジーンを植物に移入するために設計される DNA 構築物に一般的に使用される右側領域は数百ポリヌクレオチド長となる場合があり、植物のゲノムへの T-鎖組込みを案内する T-鎖形成の後に、T i または R i ヘルパープラスミド由来の v i r D 2 エンドヌクレアーゼが DNA を消化し、5' 末端に共有的に結合するニック部位を含む場合がある。T-DNA 分子 (または複数の分子) は、一般的に 1 またはそれを超える植物発現カセットを含む。

【0085】

「トランスジーン」なる語は、該細胞または生物に形質転換した細胞または生物に対して非天然であるいずれの核酸配列をもいう。「トランスジーン」とは、コード配列または調節配列を修飾することによって異所的に発現するいずれの内因性配列をもいう場合がある。「トランスジーン」は、指示した組換えによる非天然または天然の核酸配列の挿入によって修飾された天然の植物遺伝子のコンポーネント部分をも含む。

【実施例】

【0086】

実施例 1

同定配列およびマーカー遺伝子、および関心のある遺伝子を含む 2 T-DNA ベクターの調製

標準的な分子クローニング法 (Sambrook ら, 1989) に従って、2 の T-DNA 植物発現ベクター、p M O N 6 7 4 6 5、p M O N 1 0 1 3 3 8 および p M O N 1 0 1 3 3 9 (図 1) を構築した。1 の T-DNA はカナマイシンに対する抵抗性をコードする n p t I I 遺伝子に作動可能に連結された C a M V 3 5 S プロモーターおよび G U S レポーター遺伝子に作動可能に連結した C a M V 3 5 S プロモーターを含む。他の T-DNA は、グリホセート抵抗性を付与するナピン: c t p-c r t B: ナピン 3' カセットおよび 3 5 S: c t p: C P 4 E P S P S カセットを含む。o r i V 複製起点を有する p M O N 6 7 4 6 5 中の c r t B は、ブラシカ・ナプス (Brassica napus) からの 1.8 k b 種子特異的ナピンプロモーターおよび 1 k b ナピンターミネーターによって駆動した。o r i V 複製

起点を有する pMON101338 中および pRi 複製起点を有する pMON101339 中の crtB は、短いバージョンのナピンプロモーター (1 kb) およびターミネーター (0.3 kb) によって駆動した。エルビニア (Erwinia) 種からのフィトエンシターゼをコードする crtB 遺伝子は、形質転換頻度に影響することなくダイズ種子にオレンジ色を付与する。

【0087】

実施例 2

pMON67465 を用いたダイズ組織片の形質転換および再生

ダイズ (栽培品種 A3244) 組織を、実質的に以前に記載されているように (米国特許第 6,384,301 号、参照することによって本願明細書に取り込まれる)、アグロバクテリウム媒介法を介して pMON67465 (図 1) で形質転換した。簡単には、手で切除したダイズ分裂組織片をアグロバクテリウムと 23℃ にて 2-4 日、アグロバクテリウムと同時培養し、PLANTCON 中の 75 μM グリホセート選択を含む WPM 固形培地に移し、16/8 (明/暗) 期下 28℃ にて培養した。2 週間後、組織片を新鮮な WPM 培地に移し、シュート収穫まで培養した。2 週間後、真の三つ葉を有するシュートを切断し、BMR 発根培地上で 2-4 週間培養した。発根した苗木を、種子成熟のために温室中で生育させた。分析した 40 の事象の中で、72.5% が両方の T-DNA による同時形質転換を示した。40 の事象の中の 45% が nptII および gus 遺伝子の両方を含んでいた。pMON67465 からの T-DNA を含む事象 A33908 をさらに分析した。

【0088】

プラスミド pMON67465 を有するさらなる事象は同一栽培品種 A3244 へのプラスミドの再形質転換によって得、13 のトランスジェニック系統を 0.22% の形質転換頻度で得た。13 系統のうちの 7 は、gus または CP4 マーカー遺伝子の存在または不存在についての PCR を介した正常外観種子の分析後に、関心のある遺伝子陽性であり、マーカーフリーであった (図 6)。R0 植物からの橙色種子も、crtB 遺伝子および CP4 マーカー遺伝子の存在について PCR によって分析した。3 を除くすべての橙色種子が crtB および CP4 の両方について陽性であることが判明した (図 7) が、CP4 または crtB 遺伝子を含む正常外観種子は存在せず (図 7、白色の欄)、これは crtB 表現型が CP4 選択可能なマーカー遺伝子に強固に連鎖していることを示した。

【0089】

したがって、選択可能なマーカー遺伝子に連鎖したスクリーニング可能な遺伝子を含む同定配列を有する 2 の T-DNA 構築物の使用は、関心のある遺伝子を含むが選択可能なマーカーをコードする配列を欠くトランスジェニック事象のより効率的なスクリーニングおよび選択を許容する。連鎖-サザンベースのアプローチ (「標準 2T」)、および関心のある遺伝子および選択可能なマーカーが独立して分離している子孫種子を同定するための標識ベース (すなわち、同定配列ベース) のスクリーニングの間の例示的な比較は、図 8 に見出される。同定配列アプローチの脂肪は、より多くのトランスジェニック事象、およびさらなる分析に有用な子孫を同定するための各事象のより多くの子孫をスクリーニングすることを許容する。

【0090】

実施例 3

ダイズ事象 A33908 および R1 子孫種子における crtB/GUS/CP4 発現

事象 A33908 からの組織の目視検査 (図 2) は、茎および開いた若葉が橙色キャスト (cast) を示した。葉および根組織は、crtB 発現植物において別段表現的に正常であった。R0 植物の種子 (すなわち、R1 世代) からの種皮はわずかな crtB 発現を示したが、A33908 由来の種子の子葉は異なる橙色を示し、そのうちの幾つかはしわになった表現型を有していた (図 3)。

【0091】

事象 A33908 からの 12 の未熟 R1 種子を種皮から切開し、CP4-EPSPS ELISA、および crtB および GUS 目視分析に付した (図 4)。crtB、GUS

10

20

30

40

50

およびCP4-EPSPS表現型の分離が明らかであった。9/12の種子が3のアッセイすべてにおいて陽性であった。1/12の種子がCrtBおよびCP4-EPSPS陽性であったが、GUS陰性であり、gus遺伝子の欠失を有する、pMON67465の2のT-DNAの分離を示した。2/12の種子はCP4-EPSPS ELISA陰性であった。これらの種子は両方ともCrtB陰性であってGUS陽性であり、したがって同定配列(crtB)および選択可能なマーカーCP4-EPSPS遺伝子の間の連鎖、およびgus遺伝子座からのこれらのトランスジェニック遺伝子座の分離を示している。分離した種子における表現型比は、2の優性遺伝子座のメンデル分離と一致した。

【0092】

実施例4

R1種子目視分析

A33908からの成熟種子を色、大きさおよび形について目視分析した(図5)。(i)マーカーフリー正常(例えば、黄色および平面)；(ii)橙色および平面；および(iii)橙色および収縮した種子が見られた。

【0093】

実施例5

GUS陽性種子に対するPCR分析

INVADER PCR(例えばMeinら, 2000)を用いて、トランスジェニックダイズ植物の種子におけるpMON67465によって送達されるCP4-EPSPS、crtBおよびgus遺伝子の分離を追跡した。事象A33908は、CP4-EPSPSマーカー遺伝子の単一のコピーおよびNPTII遺伝子の単一のコピーを含むことが決定された。橙色：正常種子の分離は、事象A33908において予想される3:1の結果となった(表1)。

【0094】

【表1】

表1：トランスジェニック植物の子孫の表現型および遺伝子型

家系	Invader CP4	Invader NPT II	橙色／正常種子 のカウント	予想 3:1 橙色／正常種子 のカウント	χ^2
GM A33908	1	1	86/26	84/28	0.19
GM A33909	2	1	98/56	115.5/38.5	10.61
GM A33926	1	1	130/72	151.5/50.5	12.20
GM A33927	1	2	134/56	142.5/47.5	2.03
GM A33936	2	0	62/30	69/23	2.84
GM A33951	1	2	77/25	76.5/25.5	
GM A33959	2	2	79/40	89.25/29.75	4.71
GM A33960	2	4	57/18	56.25/18.75	0.04

【0095】

実施例6

同定配列としてのATP-PFKの使用

トウモロコシを含むデンプンを豊富に含む穀物粒について、収縮または破壊された種子発育の表現型を生じる糖／デンプン代謝の操作を利用し得る。sacBの種子特異的発現(Caimiら, 1996)、またはトウモロコシ穂における酵母ATP依存性ホスホフルクトキナーゼの種子特異的発現(ATP-PFK；例えばGenBank 受理番号NC_003423、bases 2297466..2300294)は破壊された穀粒発育を生じた(図12)。CP4選択可能なマーカーおよびATP-PFKを含む構築物pMON99575は、関心のある遺伝子を含む1のT-DNA構築物との同時形質転換に、各々がこれらの構築物のうちの1を含む2のアグロバクテリウム株の細胞を混合し、ついで混合した細菌培養物で植物細胞を形質転換することにより直接的に用い得る。あるいは、種子特異的発現するATP-PFKカセット

は、マーカーフリー種子の効率的同定のために、同定配列として2のT-DNA構築物にサブクロニングし得る。この遺伝子を含む穀粒は極めて収縮し、発芽しない。同定配列フリーであってマーカー遺伝子フリーの穀粒のみが正常な外観を示している。

【0096】

実施例7

同定配列としてのポルフィリン合成に関与する遺伝子の使用

S-アデノシル-L-メチオニン依存性ウロポルフィリノーゲンIII (ウロゲン) メチルトランスフェラーゼ (SUMT) は、イー・コリ (E. coli)、酵母およびCHO細胞中で過剰発現させた場合に明赤色蛍光のポルフィリノイド化合物を生成する。この特性は形質転換イー・コリ (E. coli) コロニーの目視選択を可能にし (RossnerおよびScott, 1995)、形質転換した酵母細胞およびCHO細胞の自動ソーティングを可能にした (WildtおよびDeuschle, 1999)。この蛍光は、ジエーおよびトリメチル化ウロゲン (ジヒドロシロヒドロクロリンおよびトリメチルピロロコルフィンの結果であり、その両方はポルフィリン合成経路に見出される化合物である (すなわち、クロロフィルおよびコバラミン)) 。

【0097】

プロピオニバクテリウム・フリーデレンレイチ (*Propionibacterium freudenreichii*) からのSUMTをコードするcobA (GenBank受入番号U13043; 参照することによって本明細書に取り込まれる) で形質転換した細胞は、605 nmの発光帯とともに384 nmおよび500 nmに吸収ピークを有する蛍光シグナルを与える。cobAウロゲンメチルトランスフェラーゼによって生成する蛍光ポルフィリノイドは、植物材料をマーキングするための良好なスペクトルシグナルを有する。384または500 nmのいずれかでの励起は、強力なクロロフィル吸収を回避し、得られる赤色発光はそれが (500 nm吸収起源からの) 実体ストークシフトを有し、遠赤外におけるクロロフィル自己蛍光と重複しないために容易に検出される (Haseloff, 1999)。

【0098】

トウモロコシSUMT (GenBank D83391) のカルボキシ末端、アラビドプシス (*Arabidopsis*) Upm1 (GenBank L47479) およびイー・コリ (E. coli) CysG (GenBank X14202) タンパク質は、パイ・フリーデレンレイチの遺伝子 (cobA)、シュードモナス・デニトリフィカンス (cobA; GenBank M59236) およびシネコシスティス (*Synechocystis*) 種 (正式には、アナシスティス・ニデュランス (*Anacystis nidulans*); GenBank X70966) (いずれも参照することによって本明細書に取り込まれる) によってコードされるタンパク質に極めて類似し、同様に使用することができる。

【0099】

実施例8

検出可能な種子表現型を生成するための遺伝子サイレンシングの使用

マーカー遺伝子カセットのイントロン内に位置する逆方向繰り返し配列は、植物細胞における有効な遺伝子サイレンシングに通じる。これは、米国特許公開公報2006/0200878号に開示されている (例えば、参照することによって本明細書に取り込まれる図7、8、9)。イントロン内に位置する逆方向反復塩基配列によってコードされるdsRNAが遺伝子サイレンシングを誘起することができるかを試験するために、ルシフェラーゼ遺伝子の~400 bpセグメントの逆方向反復塩基配列 (配列番号: 1) をEPSPS-CP4遺伝子カセット (pMON73874) 中のイネアクチン1プロモーターのイントロンに設置し、トウモロコシ葉プロトプラストの一過性の形質転換においてルシフェラーゼ遺伝子を抑制する構築物の能力を試験した。対照として、対照プラスミドがルシフェラーゼ遺伝子の代わりにGUS遺伝子のセグメントの逆方向反復塩基配列を有する (pMON73875) 以外は同様のプラスミドを試験した。最後に、逆方向反復塩基配列を有していない以外は同一であるさらなる対照、pMON25492、も用いた (図13)。

【0100】

ホタル・ルシフェラーゼの抑制およびRENILLAルシフェラーゼ (Promega Corp.,

Madison, WI) 内部対照に対する標準化のためのトウモロコシ葉プロトプラストの経時的遺伝子サイレンシング系においてこれら3のプラスミドを試験すると、イントロン内に逆方向反復塩基配列をコードするdsRNAを有するプラスミド(pMON73874)が対照pMON73875およびpMON25492に対してルシフェラーゼを抑制することができることが判明した(図14)。実験は2回繰り返したが、同様の結果であった。

【0101】

遺伝子サイレンシング・アプローチを介してトウモロコシ穀粒表現型を創製し得るかを試験するために、Waxy遺伝子を抑制するように設計した構築物を作製した。pMON81990はWaxy遺伝子の一部分の逆方向反復塩基配列を含む。pMON81990を含むトランスジェニック・トウモロコシ植物は、デンプン生成に対するヨウ素を用いた花粉および穀粒の染色によって判定して、独立したR0植物の少なくとも65%においてWaxy遺伝子のサイレンシングを示した。比較すると、Waxyのセンスフラグメントを発現するpMON81993を含む植物は、Waxy遺伝子の有効なサイレンシングを示さなかった。

【0102】

視認し得る表現型に通じるゼイン(種子貯蔵タンパク質)をコードする遺伝子のサイレンシングも示された。pMON73567には、トウモロコシ穀粒の α -ゼインをコードする遺伝子の配列の逆方向反復塩基配列も含まれる。逆方向反復塩基配列の転写はこれらの遺伝子のサイレンシングを生じ、試験した29のR0植物のうち26において19kDおよび22kDの α -ゼインのレベルを低下した。図15は、このdsRNAをコードする配列で形質転換した細胞から生じた穀粒が明らかな視認し得る表現型を有し、ここで減少したゼインを有する穀粒は野生型穀粒よりも透明性が低い。

【0103】

したがって、マーカー遺伝子のイントロン内に存在するdsRNAをコードする配列は、本発明に係る同定配列として用いることができる。例えば、選択可能なマーカー遺伝子のイントロン中に選択可能なマーカーとしてCP4 EPSPSのようなグリホセート耐性遺伝子およびかかるdsRNAコード配列を含む構築物は、各々これらの構築物のうちの1を含む2のアグロバクテリウム菌株の細胞を混合し、植物細胞を混合した細菌培養物で形質転換することによって、関心のある遺伝子を含む1のT-DNA構築物での同時形質転換に用いることができる。あるいは、dsRNAをコードするカセットは、マーカーフリー種子の有効な同定のために、同定配列として2T-DNA構築物にサブクローニングし得る。当業者であれば、マイクロプロジェクトイル・ボンバードメント媒介植物細胞形質転換に用いるための類似の構築物を設計することもできるであろう。

【0104】

実施例9

同定配列としてのKAS4の使用

バイナリーベクターpMON83530(図16)は、同一T-DNA上の選択可能なマーカーとしてのCP4植物発現可能なカセットと一緒にダイズUSP88プロモーター(米国特許第7,078,588号)によって駆動されるKAS4(ケトアセチル-AC Tシンターゼ; GenBank受理番号AF060518)を含む。KAS4遺伝子の種子特異的発現は、遺伝子を含まない正常な種子から簡単に区別し得る(図17)。構築物は同定配列として直接的に使用することができ、かかる同定配列および選択可能なマーカーを含むT-DNAは、関心のある遺伝子を含むT-DNAを含む第2の構築物と一緒に、各々これらの構築物を含むアグロバクテリウム菌株を混同し、混合した細菌培養物で植物細胞を形質転換することによって、同時形質転換し得る。

【0105】

KAS4発現カセットはpMON107314に示す2T-DNAプラスミドにも存在し(図18)、ここに1のT-DNAが同定配列としてのsplA遺伝子(アグロバクテリウム・ツメファシエンスからのスクロースホスホリアーゼ; Genbank受理番号AE009432)およびマーカー遺伝子を含み、もう1のT-DNAが当業者に知られているルーチンの

クローニング法によって構築される関心のある遺伝子を含み得る。ついで、2のT-DNAプラスミドは、例えば、ダイズ形質転換のために用いることができる。同定遺伝子は、同定遺伝子によって提供される表現型に基づいてマーカー遺伝子なしに種子の選択に用いる。

【0106】

実施例10

同定配列としてのspLA遺伝子の使用

バイナリーベクターpMON68581（図19）は、同一のT-DNA上に選択可能なマーカーとしてのCP4植物発現可能なカセットと一緒に、ダイズ7Sアルファプロモーターによって駆動されるspLA（アグロバクテリウム・ツメファシエンスからのスクロースホスホリアーゼ；GenBank受理番号AE009432）を含む。spLA遺伝子の種子特異的発現は、遺伝子を含まない正常な種子から簡単に区別し得る収縮した種子を生じる（図20）。構築物は同定配列として直接的に使用することができ、かかる同定配列および選択可能なマーカーを含むT-DNAは、関心のある遺伝子を含むT-DNAを含む第2の構築物と、各々これらの構築物のうちの1を含む2のアグロバクテリウム菌株を混合し、植物細胞を混合した細菌培養物で形質転換することによって、同時形質転換し得る。spLA発現カセットは当業者に知られているルーチンのクローニング法によって、2のT-DNAベクターに容易にサブクローニングすることもでき、ここに1のT-DNAは同定配列としてのspLAおよびマーカー遺伝子を含み、もう1のT-DNAは関心のある遺伝子を含む。ついで、2のT-DNAプラスミドは、例えばダイズ形質転換のために用いることができる。同定配列は、同定配列によって提供される表現型に基づいて選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカー遺伝子なしに、種子選択に用いる。

【0107】

実施例11

マーカーフリー・トウモロコシ種子の作製における幾つかの同定配列の使用

複数の2のT-DNA植物発現ベクターを構築した。各々の構築物において、第1のT-DNAセグメントは関心のある核酸の例として植物で発現可能なuidAトランスジーンを含み、第2のT-DNAセグメントは選択可能なマーカーとしての植物で発現可能なCP4 EPSPSトランスジーンおよび下記の表に示す同定配列からなる。单子葉植物における発現用に設計されたcrtBの配列は、当該技術分野で知られている方法によって調製した（例えば、配列番号：2、配列番号：3に見出されるコドン最適化によって）。pMON68412は配列番号：3を含む。第1のT-DNAは右側および左側ボーダーによって挟まれる一方で第2のT-DNAはベクター骨格に位置し、2のT-DNA形式はタンデム形式として一般的に知られている（Huangら，2005）。トウモロコシ組織は、当該技術分野で知られている方法によって各々の構築物で別々に形質転換した。各同定遺伝子を用いた予想される表現型を下記の表2に示す。内胚乳中での同定配列の発現のための別のプロモーターには、イネからのグルテリン1プロモーター、トウモロコシからのwaxyプロモーター、およびトウモロコシからのbrittle2プロモーターが含まれる。

【0108】

10

20

30

40

【表 2】

表 2：所定の同定配列で予想される例示的な表現型

同定配列カセット				
プロモーター	同定配列	ターミネーター	構築物	同定配列および選択可能なマーカー遺伝子を運搬する種子の表現型
トウモロコシ 27 k D ゼイン	crtB	イネ TM 5'UTR	pMON68412	内胚乳中のカロテノイド顔料; 欠陥のある穀粒発達
トウモロコシ 27 k D ゼイン	19および22kDゼイン逆方向反復塩基配列(米国特許公開20060200878)	イネ TM 5'UTR	pMON68413	不透明な内胚乳
トウモロコシ 27 k D ゼイン	ホスファノールキナーゼ (pfk)	イネ TM 5'UTR	pMON68414	収縮した内胚乳
トウモロコシ 27 k D ゼイン	B peru	イネ TM 5'UTR	pMON68415	内胚乳中のアントシアニン顔料
なし	なし	なし	pMON97371	なし

10

20

【0109】

本明細書に開示し、特許請求するすべての組成物および方法は、本願明細書の開示に鑑みて過度な実験なしに作製および実施することができる。本発明の組成物および方法を前記の形態および例示的な実施例の観点から記載したが、当業者であれば、本発明の概念、趣旨および範囲から逸脱することなく、変形、変化、修飾および改変を本明細書に記載した組成物、方法ならびに本明細書に記載した方法の工程または一連の工程に適用し得ることが明らかであろう。より具体的には、同一または同様の結果を達成しつつ、両方が化学的および物理学的に関連するある種の因子を、本明細書に記載した因子に代えて用い得ることは明らかであろう。当業者に対して明らかなすべてのかかる同様の置換および変形は、添付する特許請求の範囲によって規定される本発明の意図、範囲および概念の中にあるとみなされる。

30

【0110】

参照

以下の参考文献は、それらが本明細書に記載したものについての例示的方法または本命支所に記載するものの他の詳細な補足を提供する程度において、参照することによって本願明細書に特異的に取り込まれる。

米国特許第4,940,835号; 米国特許第4,940,838号; 米国特許第4,946,046号; 米国特許第4,971,908号; 米国特許第5,015,580号; 米国特許第5,145,783号; 米国特許第5,188,642号; 米国特許第5,302,523号; 米国特許第5,310,667号; 米国特許第5,362,865号; 米国特許第5,384,253号; 米国特許第5,429,939号; 米国特許第5,464,763号; 米国特許第5,464,765号; 米国特許第5,508,184号; 米国特許第5,538,880号; 米国特許第5,545,816号; 米国特許第5,550,318号; 米国特許第5,563,055号; 米国特許第5,591,616号; 米国特許第5,633,435号; 米国特許第5,693,512号; 米国特許第5,731,179号; 米国特許第5,824,877号; 米国特許第5,859,347号; 米国特許第5,981,840号; 米国特許第6,160,208号; 米国特許第6,307,123号; 米国特許第6,326,527号; 米国特許第6,384,301号; 米国特許第6,399,861号; 米国特許第6,403,865号; 米国特許第6,429,356号; 米国特許第6,433,252号; 米国特許第6,458,594号; 米国特許第6,583,338号; 米国特許第6,803,501号; 米国特許第6,825,398号; 米国特許第7,078,588号; 米国特許第7,119,187号; 米国特許第7,151,204号。

40

米国特許公開20030110532; 米国特許公開20030229918; 米国特許公開20040237142; 米国

50

特許公開20060041956; 米国特許公開20060064772; 米国特許公開20060200878

国際公開WO 00/018939

国際公開WO 97/41228

Anら, *Plant Physiol.*, 88:547, 1988.

Anら, *The Plant Cell*, 1:115, 1989.

Andersonら, *Gene* 97:199-205, 1991.

Ausubelら, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc., New York, 1992.

Baersonら, *Plant Mol. Biol.*, 22(2):255-267, 1993.

BelangerおよびKriz, *Genet.*, 129:863-872, 1991.

Bohlmannら, *Plant J.*, 7 (3): 491-501, 1995.

Breitlerら, *Transgenic Res.*, 13:271-287, 2004.

Broothaertsら, *Nature* 433:629-633, 2005.

Bustosら, *Plant Cell*, 1:839-853, 1989.

Caimiら, *Pl. Physiol.* 110:355-363, 1996

Callisら, *Plant Physiol.*, 88:965, 1988.

Carmiら, *Planta*, 217:726-735, 2003.

Chenら, *Dev. Genet.*, 10:112-122, 1989.

Chenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8560-8564, 1986.

Clarkら, In: *Plant Molecular Biology, A Laboratory Manual*, Springer, NY, 1997.

Clarkら, *Plant Mol. Biol.*, 16 (6): 1099-1101, 1991.

Coruzziら, *EMBO J.*, 3:1671-1679, 1984.

Daleら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10558-10562, 1991.

Daleyら, *Plant Cell Reports*, 17:489-496, 1998.

De Neveら, *Plant J.*, 11:15-29, 1997.

de Vettenら, *Nat. Biotechnol.* 21:439-442, 2003.

DeBlockら, *Theor. Appl. Genet.*, 82:257-263, 1991.

Dekeyserら, *Plant Cell*, 2(7):591-602, 1990.

della-Cioppaら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:6873-6877, 1986.

Dellaportara, *Stadler Symposium*, 11:263-282, 1988.

Depickerら, *Mol. Gen. Genet.*, 201:477-484, 1985.

Dinkovaら, *Plant J.* 41:722-31, 2005.

Doyleら, *J. Biol. Chem.* 261:9228-9238, 1986.

Ebinumaら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2117-2121, 1997.

Elliotら, *Plant cell Rep.*, 18:707-714, 1999.

Eyalら, *Plant Cell*, 7:373-84, 1995.

Fraleyら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4803-4807, 1983.

Framondら, *Mol. Gen. Genet.* 202:125-131, 1986.

Frommら, *Plant Cell*, 1(10):977-84, 1989.

Gallieら, *The Plant Cell*, 1:301-311, 1989.

Gardinerら, *Plant Physiol.*, 134: 1317-1326, 2004.

Gasserら, *J. Biol. Chem.*, 263: 4280-4287, 1988.

Gelvinら, In: *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990.

Girouxら, *Plant Physiol.*, 106:713-722, 1994.

Gordon-Kammら, *Plant Cell* 2:603-618, 1990.

Gruberら, In: *Vectors for Plant Transformation, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick and Thompson (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, 89-119, 1993.

Hajirezaieら, *Potato Res.* 42:353-372, 1999.

Halpin, *Pl. Biotechnol. J.* 3:141-155, 2005.

10

20

30

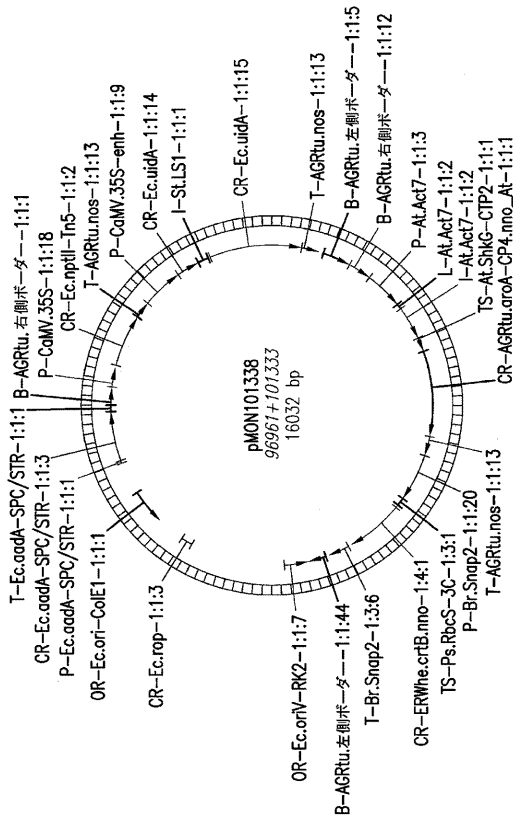
40

50

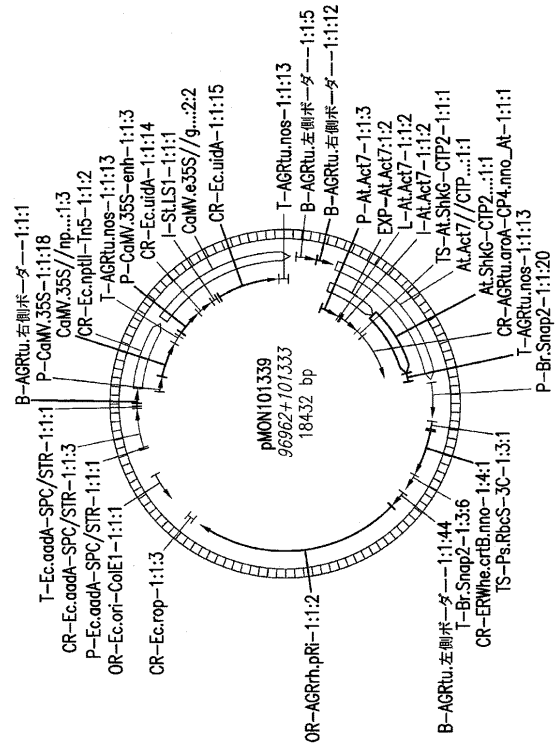
- Hansonら, *Plant J.* 19:727-734, 1999.
- HareおよびChua, *Nature Biotechnol.* 20:575-580, 2002.
- Haseloff, *Methods in Cell Biology*, V58:139-151, 1999.
- HeimおよびTsien, *Curr. Biol.*, 6(2):178-182, 1996.
- Himiら, *Genome* 48:747-754, 2005.
- Hongら, *Plant Mol. Biol.*, 34(3):549-555, 1997.
- Horschら, *Science*, 227:1229, 1985.
- Huangら, *Transgenic Research*, 13: 451, 2004.
- Ikatuら, *Bio/Technol.*, 8:241-242, 1990.
- Jeffersonら, *EMBO J.*, 6:3901-3907, 1987b. 10
- Jeffersonら, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5:387-405, 1987a.
- Jofukuら, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102:3117-3122, 2005.
- Kaeppelerら, *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Katzら, *J. Gen. Microbiol.*, 129:2703-2714, 1983.
- Kleeら, *Mol. Gen. Genet.*, 210:437-442, 1987.
- Kobayashiら, *Planta*, 215:924-933, 2002.
- Kohno-Muraseら, *Plant Mol. Biol.*, 26:1115-1124, 1994.
- Komariら, *Plant J.*, 10:165-174, 1996.
- Kononovら, *Plant J.* 11:945-957, 1997.
- Kridlら, *Seed Sci. Res.*, 1:209-219, 1991 20
- Kuhlemeierら, *Plant Cell*, 1:471, 1989.
- Leustekら, *J. Biol. Chem.*, 272:2744-2752, 1997.
- Lewin, In: *Genes V*, Oxford University Press, NY, 1994.
- Ludwigら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:7092, 1989.
- Marcotteら, *Plant Cell*, 1:969, 1989.
- Mazurら, *Nucleic Acids Res.*, 13:2373-2386, 1985.
- McKnightら, *Plant Mol Biol.*, 8:439-445, 1987.
- Meinら, *Genome Res.*, 10:330-343, 2000.
- Mendozaら, *FEBS Letters*, 579:4666-4670, 2005.
- Mikiら, In: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick and Thompson (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993. 30
- MikiおよびMcHugh, *J. Biotechnol.*, 107:193, 2004.
- Misawaら, *J. Bacteriol.*, 172:6704-6712, 1990.
- MizukamiおよびFisher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:942-947, 2000.
- Moloneyら, *Plant Cell Reports*, 8:238, 1989.
- Morelloら, *Transgenic Res.* 9:453-462, 2000.
- Odellら, *Nature*, 313:810-812, 1985.
- Okagaki, *Plant Mol. Biol.*, 19: 513-516, 1992.
- Okitaら, *J Biol Chem.* 264:12573 1989.
- Omirulלהら, *Plant Mol. Biol.*, 21:415-28, 1993. 40
- Owら, *Science*, 234:856-859, 1986.
- Pangら, *Plant Physiol.*, 112: 893-900, 1996.
- Padgettら, *Crop Sci.* 35: 1451-1461, 1995.
- Pedersenら, *Cell*, 29:1015-1026, 1982.
- Petitら, *Mol. Gen. Genet.*, 202:388-393, 1986.
- Poirierら, *Theor. Appl. Genet.*, 100:487-493, 2000.
- Potrykusら, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Puchta, *Pl. Cell Tiss. Org. Cult.* 74:123-143, 2003.
- Radchukら, *Plant Physiol.*, 140:263-278, 2006.
- Riegerら, In: *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th Ed., Springer-V 50

- erlag, NY, 1991.
- Riggsら, *Plant Cell*, 1(6):609-621, 1989.
- Roshalら, *EMBO J.*, 6:1155, 1987.
- RossnerおよびScott, *BioTechniques*, V19(5):760-764, 1995.
- Rotinoら, *Nat. Biotechnol.* 15:1398-141, 1997.
- RussellおよびFromm, *Transgenic Res.*, 6:157-68, 1997.
- Sakakibaraら, *Plant J.*, V10(5):883-892, 1996.
- Sambrookら, In: *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- SandmannおよびMisawa, *FEMS Microbiol Lett.*, 69(3):253-257, 1992. 10
- Satoら, *Crop Sci.* 44:646-652, 2004.
- SchaffnerおよびSheen, *Plant Cell*, 3:997, 1991.
- Schellmannら, *EMBO J.* 21,5036 -5046, 2002.
- Schernthanerら, *EMBO J.*, 7:1249, 1988.
- Schruffら, *Development*, 133:251:261, 2006.
- Scuttら, *Biochimie* 84: 1119-1126, 2002.
- Selingerら, *Genetics*, 149:1125-1148,1998.
- Shewmakerら, *Plant J.*, 20(4):401-412, 1999.
- Shureら, *Cell* 35:225-233, 1983.
- Siebertzら, *Plant Cell*, 1:961, 1989. 20
- Simpsonら, *EMBO J.*, 4:2723, 1985.
- Slocombeら, *Plant Physiol.*, 104(4):167-176, 1994.
- Staceyら, *Plant Mol. Biol.*, 31:1205-1216, 1996
- Sutcliffeら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3737-3741, 1978.
- Teradaら, *Mol. Gen. Genet.*, 220:389-392, 1990.
- Thornburgら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 744-748, 1987.
- Toroら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8558-8562, 1989.
- Walkerら, *Plant Biotechnol J.* 5:413-21, 2007.
- WildtおよびDeuschle, *Nature Biotechnology*, V17:1175-1178, 1999.
- Xingら, *In Vitro Cell Devel. Biol. Plant* 36:456-463, 2000. 30
- Yangら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
- Yoderら, *Bio/Technology* 12:263-268, 1994.
- Zhengら, *Mol. Cell Biol.*, 13:5829-5842, 1993.
- Zhouら, *Acta Botanica Sinica* 45:1103-1108, 2003.
- Zukowskyら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1101-1105, 1983.

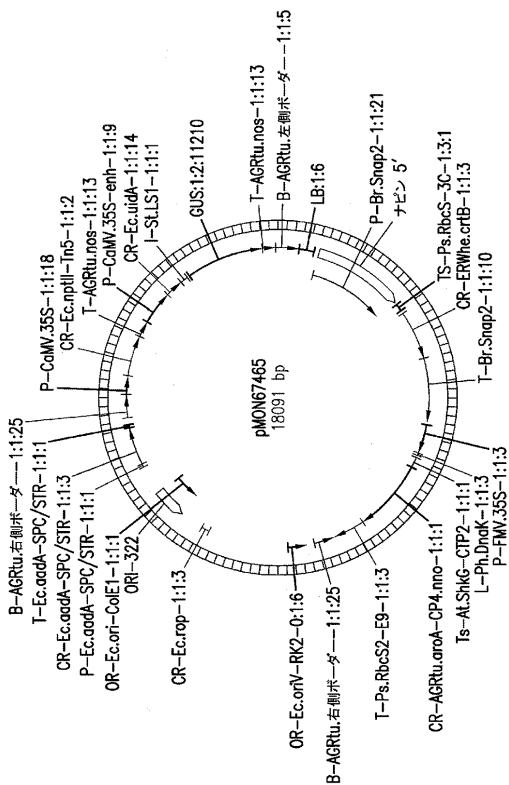
【図 1 A】



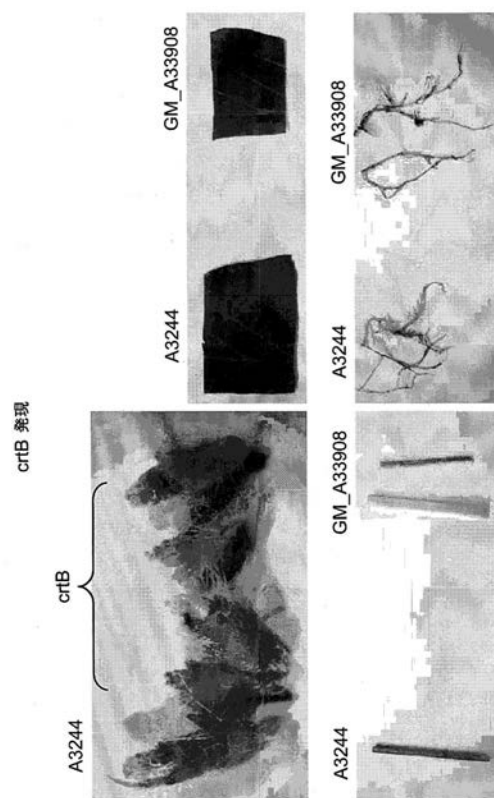
【図 1 B】



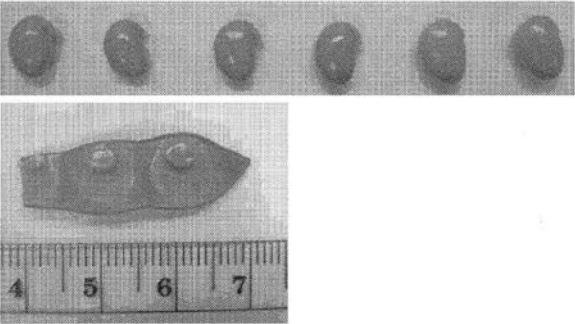
【図 1 C】



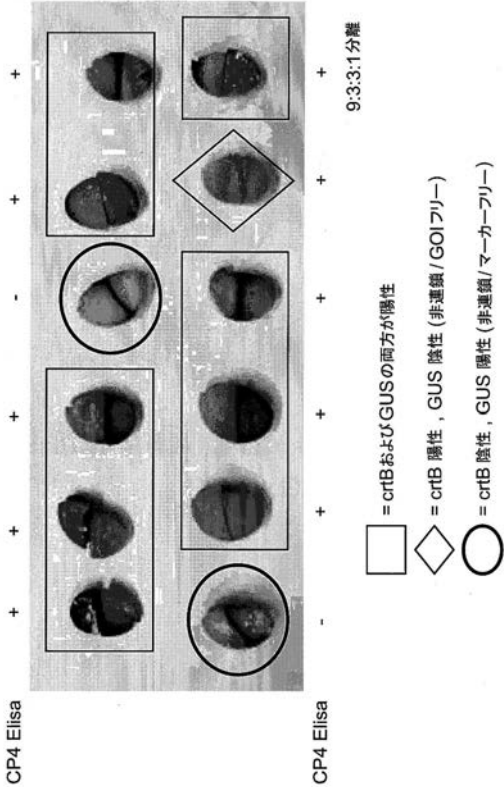
【图 2】



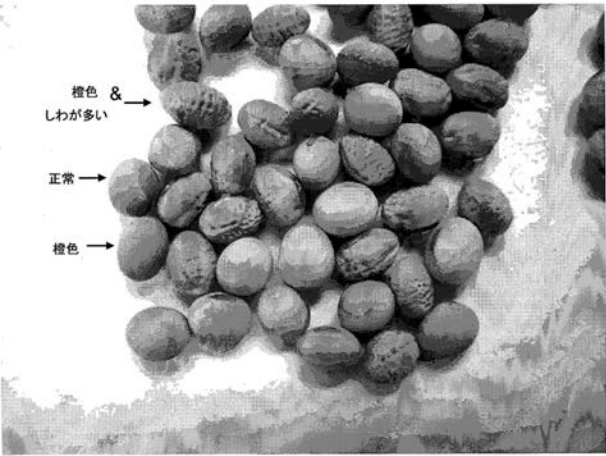
【図 3】



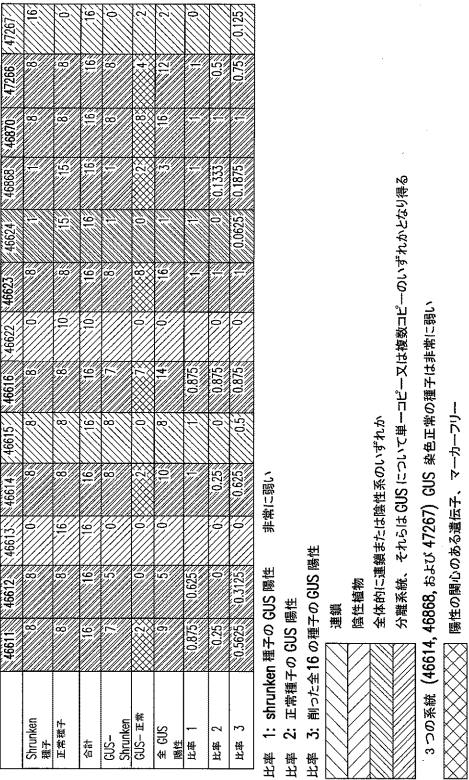
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+
B	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+
C	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+
D	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+
E	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+
F	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+
G	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+
H	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+

CP4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+	47266+
B	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+	46870+
C	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+	46615+
D	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+	46614+
E	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+	46511+
F	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+	46616+
G	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+
H	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+	46623+

CrB

すべての黄色種子は *gus* および CP4 PCR 陽性で、*gus* 染色陽性である正常な種子、*gus* 染色陽性可能性のある *crB* 切欠は *crB* PCR 陽性につながる

【図 8】

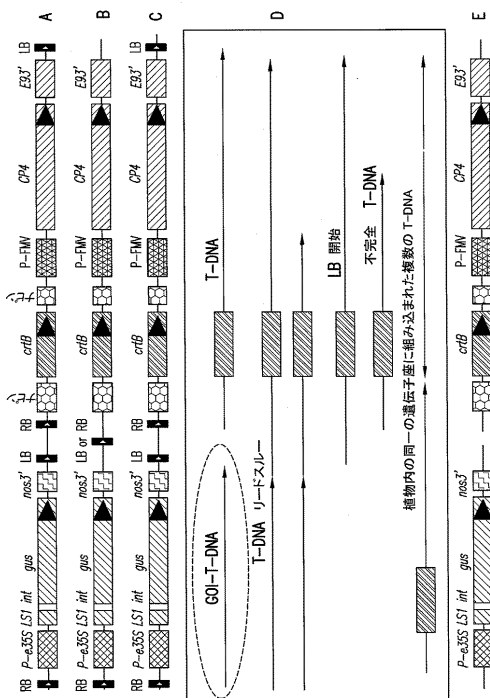
標準 2T

100 事象
 69 (GOI スクリーニング後)
 45 (低コピー後)
 14 (連鎖サザン後)
 14 (生殖細胞系決定なし)
 R1に対して14事象
 1050 子孫を植栽した (75/事象)
 1050 グリホセートスプレのため
 263 接合性試験のため

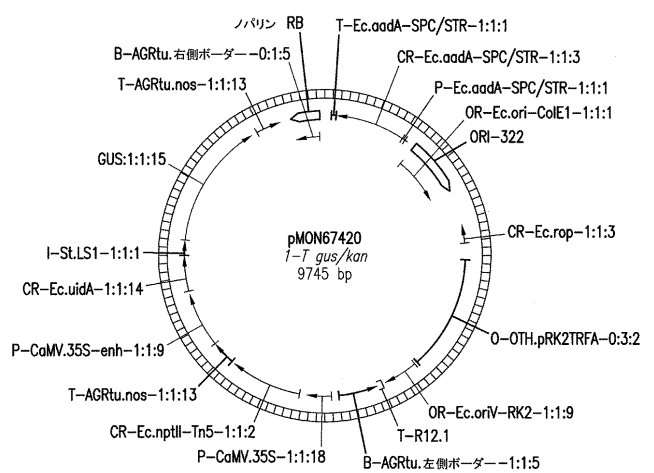
2T w/crtB 標識連鎖マーカー

100 事象
 69 (GOI スクリーニング後)
 45 (低コピー後)
 45 (連鎖サザンなし)
 38 (*crB* からの生殖細胞系決定後)
 R1に対して38事象
 722 子孫を植栽した (19 黄色種子/事象)
 グリホセートスプレなし
 722 接合性試験のため

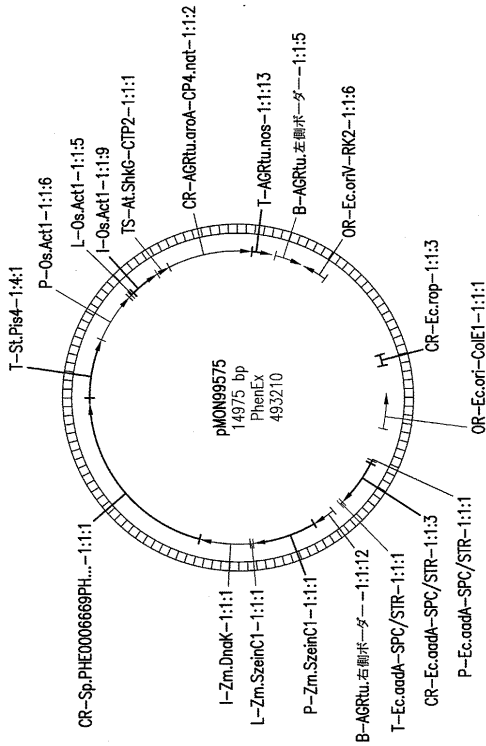
【図 9】



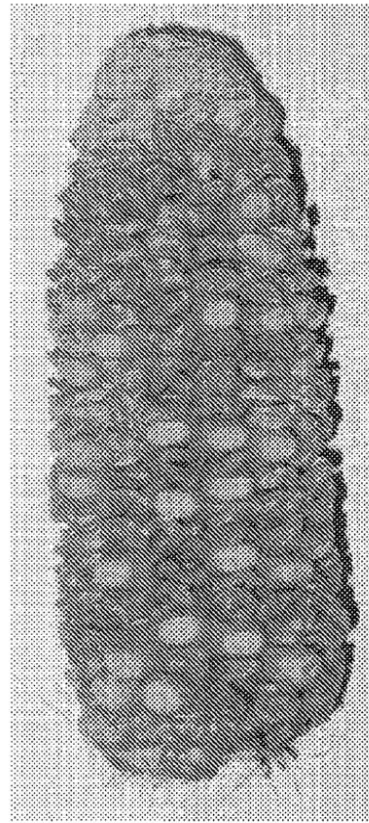
【図 10】



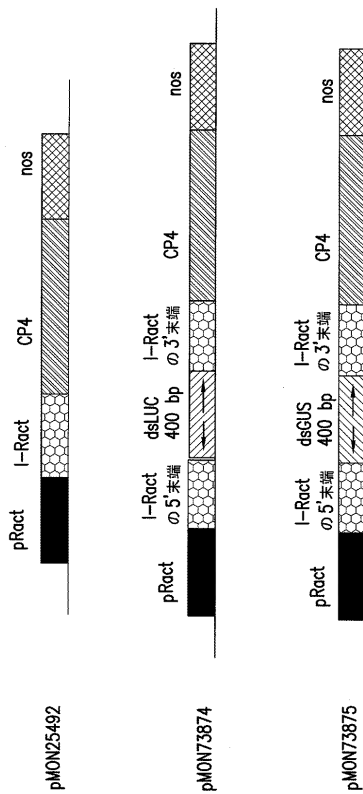
【 図 1 1 】



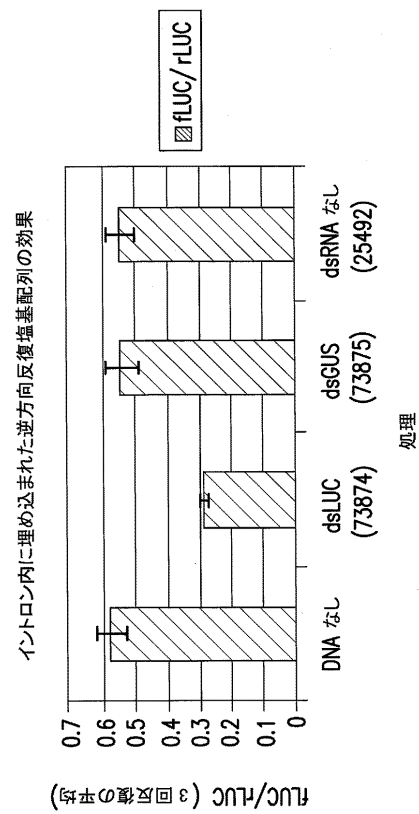
【図 1 2】



【图 1 3】

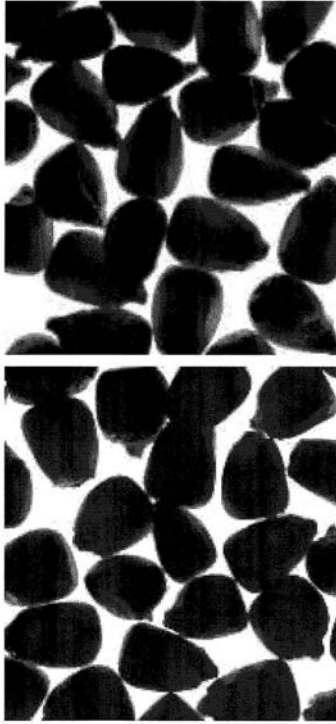


【 図 1 4 】

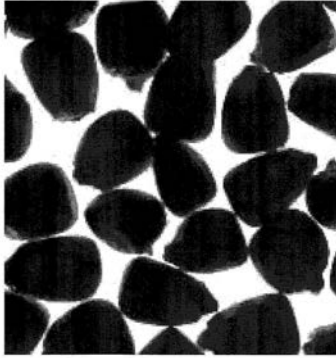


【図 15】

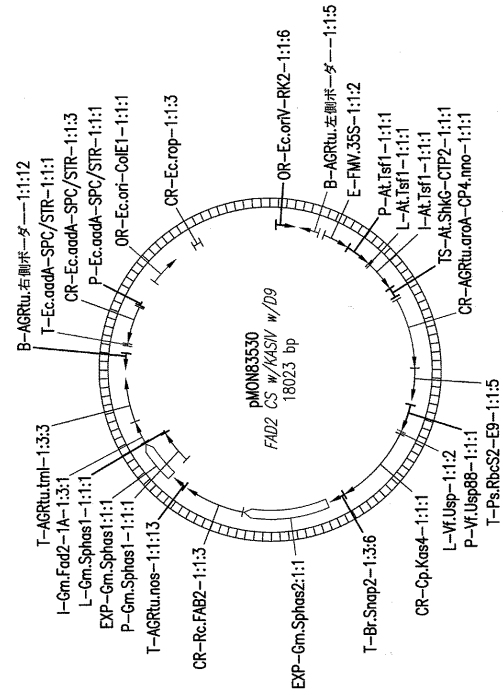
野生型穀粒



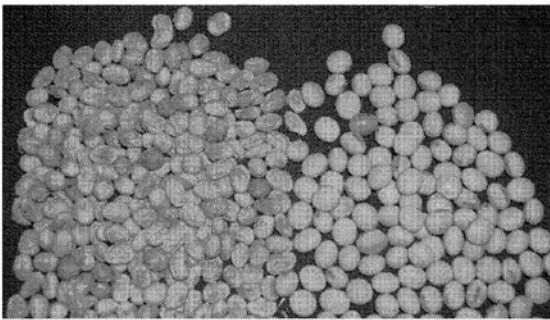
ゼイン減少穀粒



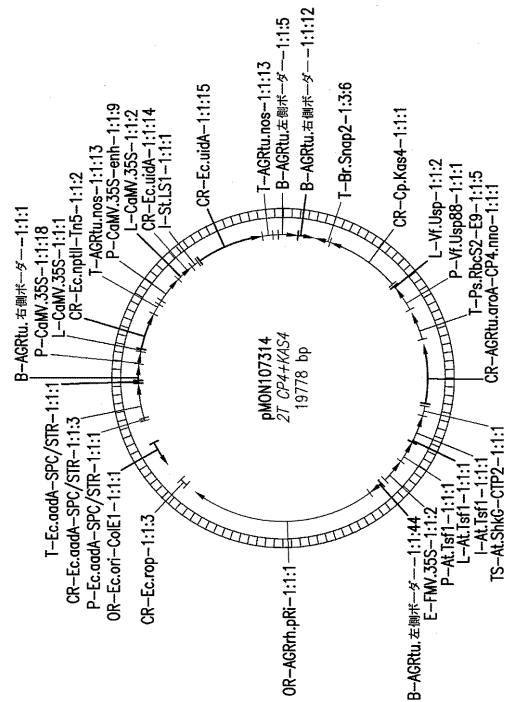
【図 16】



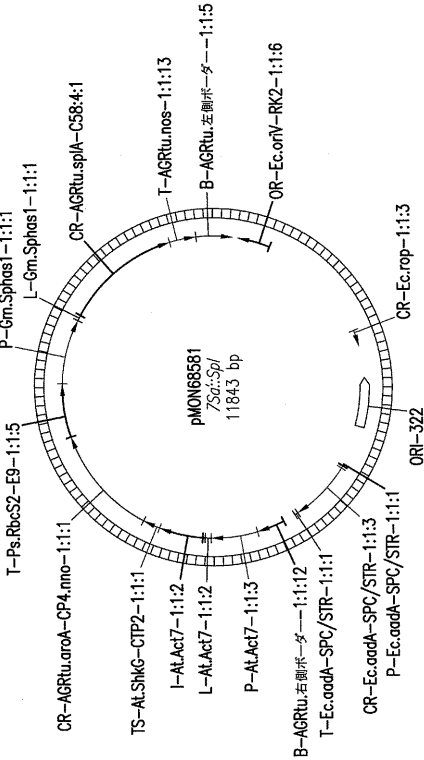
【図 17】



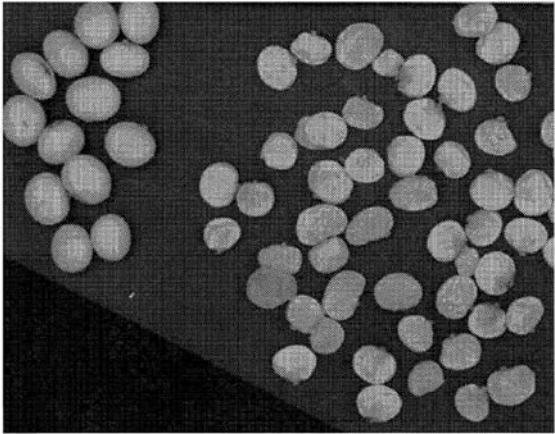
【図 18】



【図 19】

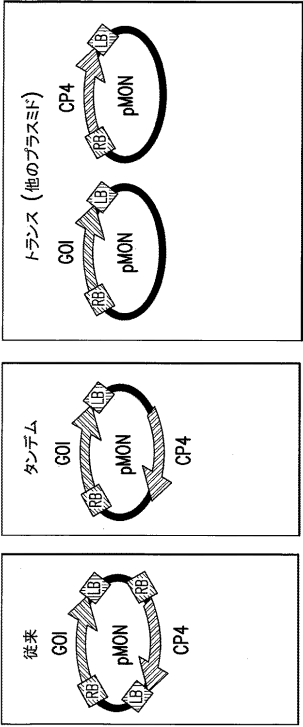


【図 20】



【図 21】

2 T-DNA ベクター様式



【配列表】

2020171330000001.app

【誤訳訂正書】

【提出日】 令和2年8月20日 (2020.8.20)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】 特許請求の範囲

【訂正対象項目名】 全文

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2、配列番号：3または配列番号：2もしくは配列番号：3に対して少なくとも71%の同一性を有する配列を含み、かつフィトエンシターゼ活性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸配列。

【請求項 2】

植物中で機能的な異種プロモーターに作動可能に連結した請求項1記載の核酸配列を含む組換えDNA構築物。

【請求項 3】

請求項1記載の核酸配列を含む宿主細胞。

【請求項 4】

宿主細胞が細菌細胞または植物細胞である請求項3記載の宿主細胞。

【請求項 5】

請求項1記載の核酸配列を含むトランスジェニック植物または種子。

【手続補正書】

【提出日】 令和2年8月17日 (2020.8.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2、配列番号：3または配列番号：2もしくは配列番号：3に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、かつフィトエンシターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含む2 T-DNAベクター。

【請求項 2】

請求項1記載の核酸が植物中で機能的な異種プロモーターに作動可能に連結している、請求項1記載のベクター。

【請求項 3】

請求項1記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4】

宿主細胞が細菌細胞または植物細胞である請求項3記載の宿主細胞。

【請求項 5】

請求項1記載のベクターを含むトランスジェニック植物または種子。

【手続補正書】

【提出日】 令和2年8月25日 (2020.8.25)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2、配列番号：3または配列番号：2もしくは配列番号：3に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、かつフィトエンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含む 2 T-DNA ベクター。

【請求項 2】

請求項 1 記載の核酸が植物中で機能的な異種プロモーターに作動可能に連結している、
請求項 1 記載のベクター。

【請求項 3】

請求項 1 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4】

宿主細胞が細菌細胞または植物細胞である請求項 3 記載の宿主細胞。

【請求項 5】

請求項 1 記載のベクターを含むトランスジェニック植物または種子。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 0 1 H 5/00 (2018.01) A 0 1 H 5/00 A

(72)発明者 マイケル・ダブリュー・ピーターセン
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番

(72)発明者 フアン・シーシェー
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番

(72)発明者 ポール・エス・チョメット
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番

(72)発明者 デイビッド・ウォルタース
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番

(72)発明者 スーザン・ジョンソン
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番

(72)発明者 ラリー・ギルバートソン
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード 8 0 0
番

Fターム(参考) 2B030 AA02 AA03 AD20 CA11 CB02
4B065 AA01X AA88X AB01 BA02 CA53

【外国語明細書】

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

DESCRIPTION**METHODS AND COMPOSITIONS FOR OBTAINING MARKER-FREE
TRANSGENIC PLANTS**

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

This application claims the priority of United States Provisional Application Ser. No. 60/799,875, filed May 12, 2006, the entire disclosure of which is incorporated herein by reference.

1. Field of the Invention

10 The invention generally relates to transgenic plants. More specifically, the invention relates to identification and removal of unwanted or unnecessary DNA in transformed plants.

2. Description of Related Art

15 The identification of unnecessary or unwanted transgenic DNA in transformed plants has been the subject of numerous investigations and many different methods have been examined in efforts to eliminate these transgenic sequences from such plants (*e.g.* Hanson *et al.*, 1999; Dale *et al.*, 1991; Ebinuma *et al.*, 1997; Yoder *et al.*, 1994; Kononov *et al.*, 1997; Hare and Chua, 2002; Scutt *et al.*, 2002; Puchta, 2003; de Vetten *et al.*, 2003; Halpin, 2005; U.S. Published Appln. 20030110532; U.S. 20 Published Appln. 20040237142; U.S. Patent 6,458,594). In general, it is beneficial to identify plants that do not include transgenic DNA not contributing to an agronomically useful trait of the transgenic plant.

Many methods for introducing transgenes in plants by *Agrobacterium*-mediated transformation utilize a T-DNA (transferred DNA) that incorporates a 25 transgene and associated genetic elements, and transfers these into the genome of a plant. Generally, the transgene(s) is bordered by a right border DNA molecule (RB) and a left border DNA molecule (LB), and is transferred into the plant genome, integrating at one or more loci. It has been observed that when a DNA construct contains more than one T-DNA, these T-DNAs and the transgenes contained within 30 may be integrated into the plant genome at separate loci (Framond *et al.*, 1986). This is referred to as co-transformation.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

The process of co-transformation can be achieved by delivery of the T-DNAs with a mixture of *Agrobacterium* strains transformed with plasmids carrying the separate T-DNAs. Co-transformation can also be achieved by transforming one *Agrobacterium* strain with two or more DNA constructs, each containing one T-DNA.

5 An additional method employs two T-DNAs on a single DNA vector and identifying transgenic cells or plants that have integrated the T-DNAs at different loci. In a non-*Agrobacterium*-mediated transformation system, such as a physical method for introducing DNA including bombardment with microprojectiles, two DNA molecules could be integrated independently into the target genome, and then segregate independently in a subsequent generation. Use of 2 T-DNA constructs allowing for independent insertion of sequences and their genetic segregation, has also been described (e.g. U.S. Patent 5,731,179; Zhou *et al.*, 2003; Breitler *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004). While the foregoing has furthered the understanding in the art, there remains a need for improved methods and compositions for obtaining marker free plants to make product development more efficient. Previously described screening processes have been highly labor intensive, for instance requiring Southern blot or PCR™ analysis following growth of R0 and/or R1 plant material.

U.S. Publication 20060041956 describes use of a visual marker gene in conjunction with *Agrobacterium*-mediated transformation. However, the publication does not describe any method where such markers are linked to a selectable or screenable marker gene and unlinked to a gene of interest. Thus, there remains a great need in the art for methods and compositions that would improve the ease and efficiency with which plants lacking marker sequences and/or other transgenic DNA which is not agronomically useful can be identified and eliminated.

25

SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the invention provides a method of preparing marker-free seeds from a transgenic plant comprising the steps of: a) obtaining seeds of a transgenic plant transformed with a first DNA segment comprising a nucleic acid of interest and a second DNA segment comprising a plant marker gene physically and/or genetically linked to a DNA cassette that is operably linked to a promoter functional in the seed, wherein the DNA cassette confers a detectable phenotype to seeds that comprise the DNA cassette; b) screening the seeds for the absence of the detectable phenotype; and

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

c) selecting at least a first seed that lacks the detectable phenotype to obtain a seed that is free of the marker gene. In one embodiment, step c) further comprises assaying the seed for the presence of the nucleic acid of interest and selecting a seed that comprises the nucleic acid of interest and lacks the selectable marker gene. In
5 certain embodiments, the marker gene is a selectable or screenable marker gene.

In certain embodiments, the DNA cassette may be translationally or transcriptionally fused to the selectable marker gene; that is, it may encode an RNA that is translationally or transcriptionally fused to the selectable marker gene. In a further embodiment the DNA cassette comprises an antisense or sense DNA fragment
10 with at least 19 or 21 bp of homology to an endogenous gene, for instance wherein the antisense or sense DNA fragment is operably linked to a promoter functional in a seed. In yet another embodiment, the DNA cassette comprises a pair of inverted repeats of a DNA fragment, wherein each fragment is at least 19 or 21 bp in size, and wherein the DNA fragment is homologous to an endogenous gene, operably linked to
15 a promoter functional in the seed. The inverted DNA fragment repeat homologous to an endogenous gene may also be embedded in an intron within the selectable marker gene. In certain embodiments, the DNA cassette encodes a sense or antisense RNA comprising at least 19 or 21 nucleotides wherein the DNA fragment is homologous to an endogenous gene.

20 In a method of preparing marker-free seeds according to the invention, seed selected may lack a screenable or screenable gene and DNA cassette. Obtaining seeds of a transgenic plant may comprise transforming or co-transforming the transgenic plant or a progenitor thereof of any previous generation with first and second DNA segments on separate DNA constructs. Obtaining seeds of a transgenic plant may also
25 comprise transforming the transgenic plant or a progenitor thereof of any previous generation with a single DNA construct comprising the first and second DNA segments. First and second DNA segments may be bounded by different T-DNA border sequences. In a method of the invention, a transgenic plant may be produced by transforming the plant or a progenitor thereof of any previous generation with a
30 DNA construct comprising (i) the first DNA segment flanked by left and right T-DNA borders, and (ii) the second DNA segment flanked by a second set of left and right T-DNA borders, wherein the second DNA segment further comprises a selectable marker gene operably linked to a promoter functional in the transgenic

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

plant. The first and second DNA segments may or may not be genetically linked in the transgenic plant.

Transgenic plants used according to the invention may be produced by introducing first and second DNA segments into the plant or a progenitor thereof of any previous generation by transformation mediated by a bacterial strain selected from the genus *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, or *Sinorhizobium*. The transgenic plants may also be produced, for example, by microprojectile bombardment.

A selectable marker used with the invention may encode a product selected from the group consisting of CP4 EPSPS, *bar*, DMO, NptII, glyphosate acetyl transferase, mutant acetolactate synthase, methotrexate resistant DHFR, dalapon dehalogenase, PMI, Protox, hygromycin phosphotransferase and 5-methyl tryptophan resistant anthranilate synthase. A DNA cassette sequence for use with the invention may be selected, for example, from the group consisting of *crtB*, *gus*, *gfp*, *sacB*, *lux*, an anthocyanin synthesis gene, *DefH9-iaaM*, *rolB*, *OsCDPK2*, *AP2*, *ARF2*, *ANT* transcription factor, *LEC2*, *Snf-1*, *cobA*, *KAS4*, *splA*, zein inverted repeats, B-peru, and yeast *ATP-PFK*. The cassette may be operably linked to a promoter functional in a tissue selected from an embryo, seed endosperm, cotyledon, aleurone, and seed coat. The promoter may be, for example, selected from the group consisting of a napin promoter, a beta-phaseolin promoter, a beta-conglycinin subunit promoter, a zein promoter, an Osgt-1 promoter, an oleosin promoter, a starch synthase promoter, a globulin I promoter, a barley LTP2 promoter, an alpha-amylase promoter, a chitinase promoter, a beta-glucanase promoter, a cysteine proteinase promoter, a glutaredoxin promoter, a HVA1 promoter, a serine carboxypeptidase II promoter, a catalase promoter, an alpha-glucosidase promoter, a beta-amylase promoter, a VP1 promoter, a USP promoter, USP88 promoter, USP99 promoter, Lectin, and a bronze2 promoter. The detectable phenotype may be assayed by detection of a catalytic activity. The detectable phenotype may be selected from the group consisting of seed color, seed opacity, seed germinability, seed size, seed viability, seed shape, seed texture, and a defective or aborted seed. Screening of seeds may be done by an automated seed sorting machine.

In another aspect, the invention provides a DNA construct comprising (a) a first DNA segment comprising left and right T-DNA borders flanking a gene of interest operably linked to a promoter functional in plants, and (b) a second DNA

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

segment comprising a second set of left and right T-DNA borders flanking a promoter functional in a seed operably linked to a DNA cassette that confers a detectable phenotype in seeds comprising the DNA cassette and a selectable marker gene operably linked to a promoter functional in plants. The gene of interest may confer a

5 trait selected from the group consisting of herbicide tolerance, insect or pest resistance, disease resistance, increased biomass, modified fatty acid metabolism, modified carbohydrate metabolism, and modified nutritional quality. In the construct, the DNA cassette and selectable marker gene may be operably linked to the same promoter. In one embodiment, the DNA cassette and the selectable marker gene are

10 operably linked to different promoters. In specific embodiments, the selectable marker gene encodes a product selected from the group consisting of CP4 EPSPS, phosphinothricin acetyltransferase, DMO, NptII, glyphosate acetyl transferase, mutant acetolactate synthase, methotrexate resistant DHFR, dalapon dehalogenase, PMI, Protox, hygromycin phosphotransferase and 5-methyl tryptophan resistant

15 anthranilate synthase. In another embodiments, the DNA cassette is selected from the group consisting of *crtB*, *gus*, *gfp*, *sacB*, *lux*, an anthocyanin synthesis gene, *DefH9-iaaM*, *rolB*, *OsCDPK2*, *AP2*, *ARF2*, *ANT* transcription factor, *LEC2*, *Snf-1*, *cobA*, *KAS4*, *splA*, zein inverted repeats, B-peru, and yeast *ATP-PFK*. The DNA cassette may be operably linked to a promoter functional in a tissue selected from the group

20 consisting of an embryo, seed endosperm, cotyledon, aleurone, and seed coat. In one embodiment, the DNA cassette is operably linked to a promoter selected from the group consisting of a napin promoter, a beta-phaseolin promoter, a beta-conglycinin subunit promoter, a zein promoter, an Osgt-1 promoter, an oleosin promoter, a starch synthase promoter, a globulin 1 promoter, a barley LTP2 promoter, an alpha-amylase

25 promoter, a chitinase promoter, a beta-glucanase promoter, a cysteine proteinase promoter, a glutaredoxin promoter, a HVA1 promoter, a serine carboxypeptidase II promoter, a catalase promoter, an alpha-glucosidase promoter, a beta-amylase promoter, a VPI promoter, a USP88 or USP99 promoter, and a bronze2 promoter.

In yet another aspect, the invention provides transgenic cells and plants

30 transformed with a construct provided herein. In one embodiment, a transgenic plant is provided that is co-transformed with a DNA construct containing a first DNA segment comprising left and right T-DNA borders flanking a gene of interest operably linked to a promoter functional in plants and a second DNA construct containing a second DNA segment comprising a second set of left and right T-DNA borders

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

flanking a promoter functional in a seed operably linked to a DNA cassette that confers a detectable phenotype in seeds comprising the DNA cassette and a selectable marker gene operably linked to a promoter functional in plants. Cells of such a plant are also provided.

5 In still yet another aspect, the invention provides a DNA construct comprising right and left T-DNA borders, wherein a first DNA segment comprising a gene of interest operably linked to a promoter functional in plants is located after the right border and a second DNA segment comprising a DNA cassette that confers a detectable phenotype to plant seeds that comprise the DNA cassette and a marker
10 gene, such as a selectable marker gene, operably linked to a promoter functional in plants is located after the left border.

In still yet another aspect, the invention provides a DNA construct comprising right and left T-DNA borders, wherein a first DNA segment comprising a DNA cassette that confers a detectable phenotype to plant seeds that comprise the DNA
15 cassette and a selectable marker gene operably linked to a promoter functional in plants is located after the right border and a second DNA segment comprising a gene of interest operably linked to a promoter functional in plants is located after the left border.

In still yet another aspect, the invention provides a DNA construct containing
20 two right T-DNA borders, wherein a first DNA segment comprising a gene of interest operably linked to a promoter functional in plants is located after one right border and a second DNA segment comprising a DNA cassette that confers a detectable phenotype to plant seeds that comprise the DNA cassette and a selectable marker gene operably linked to a promoter functional in plants located after the other right border.

25 In yet another aspect, the invention provides an isolated nucleic acid sequence comprising SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, or a sequence with at least 70%, 75%, 85%, or 95% identity to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, and encoding a polypeptide with phytoene synthase activity. In one embodiment, the invention also provides a recombinant DNA construct comprising a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:2 or
30 SEQ ID NO:3, or a recombinant DNA construct comprising a sequence with at least 71%, 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, and encoding a polypeptide with phytoene synthase activity, operably linked to a heterologous promoter functional in a plant. A host cell comprising such a sequence, wherein the cell is a bacterial cell or a plant cell is another embodiment of the

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

invention. In another embodiment, the invention provides a transgenic plant or seed comprising SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, or a sequence with at least 71%, 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, and encoding a polypeptide with phytoene synthase activity.

5

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawings are part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to the drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

10 **FIG. 1.** Schematic diagrams of: (A) pMON10338; (B) pMON10339; and (C) pMON67465.

FIG. 2. CrtB expression in soybean tissues transformed with pMON67465.

FIG. 3. CrtB expression in seed from event A33908.

FIG. 4. Expression of *crtB*, *gus*, and CP4/EPSPS in immature R1 seed.

15 **FIG. 5.** Expression of *crtB* in mature R1 seed.

FIG. 6. GUS staining of pMON67465 seed.

FIG. 7. CP4 & CrtB PCR on GUS positive seeds.

FIG. 8. Comparison of linkage-Southern and screenable-marker approaches for screening transgenic events.

20 **FIG. 9.** Schematic summary of DNA sequences transferred by use of construct comprising a screenable gene linked to CP4 selectable marker genes for marker-free seeds. A) GOI located in one T-DNA flanked with a RB and LB and physically linked to a second T-DNA containing a screenable gene linked to a CP4 selectable marker gene in one construct used for *Agrobacterium*-mediated
25 transformation; B) One vector containing two borders, the GOI is placed after a RB while the screenable and selectable marker genes are placed after the second RB or after a LB together with backbone; C) The GOI and screenable genes –DNAs are separated in two vectors and transformed in either one *Agrobacterium* cell or separate *Agrobacterium* cells; D) Possible linkage of two DNA segments from the GOI and
30 screenable and selectable marker genes. Only the GOI alone will show normal seed

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

appearance, while cells containing the screenable gene show a visible phenotype; E) Two separate DNA segments contain either the GOI or screenable and selectable marker genes used for non-bacterial mediated transformation.

FIG. 10. pMON67420 represents a GOI construct for co-transformation.

5 **FIG. 11.** Plasmid pMON99575 containing *Schizosaccharomyces pombe* ATP dependent phosphofructokinase driven by the seed-specific zein promoter.

FIG. 12. Corn ear expressing seed-specific yeast ATP dependent phosphofructokinase abolished normal kernel development.

10 **FIG. 13.** Schematic diagram of dsRNA-encoding constructs used to demonstrate that inverted repeats placed within an intron of a marker gene result in a visible phenotype.

FIG. 14. Inverted repeats embedded in an intron give rise to a visible phenotype.

FIG. 15. Silencing of α -zeins in corn kernels leads to a visible phenotype.

15 **FIG. 16.** Schematic diagram of pMON83530 containing *KAS4*.

FIG. 17. Progeny of soybean seeds transformed with pMON83530. Seeds on the left are shrunk due to expression of *KAS4* and indicate the presence of selectable marker, while seeds on the right are normal and marker-free.

20 **FIG. 18.** Schematic diagram of pMON107314 containing *KAS4* useful as an identification sequence in a 2T DNA construct.

FIG. 19. Schematic diagram of pMON68581 containing a *splA* gene useful as an identification gene.

25 **FIG. 20.** Progeny soybean seeds transformed with pMON68581. Seeds on the right are shrunk due to the expression of *splA* and indicate the presence of the screenable or selectable marker, while seeds on the left are normal and marker-free.

FIG. 21. 2 T-DNA vector formats- schematic diagram.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The following is a detailed description of the invention provided to aid those skilled in the art in practicing the present invention. Those of ordinary skill in the art

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

may make modifications and variations in the embodiments described herein without departing from the spirit or scope of the present invention.

The invention overcomes deficiencies in the prior art by providing constructs and methods allowing for efficiently distinguishing seeds lacking an identification sequence and marker-gene sequence, but including a gene or genes of interest (GOI), from seeds that contain an identification gene sequence and marker-gene sequence, based on a phenotype conferred by a seed-expressed identification gene, sequence, or cassette. In particular, the present invention provides, in one embodiment, transformation constructs and methods for transformation of plant cells which include: (i) a gene of interest; and (ii) an identification sequence expressed in seed and physically linked to a selectable or screenable marker gene that may be expressed in various plant tissues, wherein the construct and/or transformation method is designed so that the genetic elements of (i) and (ii) can integrate independently into the plant genome, and thus genetically segregate from each other.

The expression or lack thereof of the identification sequence in seed tissues allows for direct identification of seeds and plants that lack the seed-expressed identification sequence and the physically linked selectable or screenable marker gene, while allowing for choice of seed and plants still containing the transgene of interest. Choosing seed including the gene of interest and lacking marker-gene sequences at the seed level represents a significant advance in that it avoids the need for previously utilized screening methods that are comparatively cost and labor intensive. Additionally, time may be saved as screening can be done prior to or during germination without requiring growth of the next generation of plants to a size permitting tissue harvest, as needed for linkage-Southern analysis, for example.

In one embodiment, transformation of plant tissue is performed by an *Agrobacterium* or other *Rhizobia*-mediated method (See *e.g.*, U.S. Provisional Patent Application Ser. No. 60/800,872, filed May 16, 2006, entitled "Use of Non-*Agrobacterium* Bacterial Species for Plant Transformation" and assigned attorney docket No. MONS:100USP1, the entire disclosure of which is specifically incorporated herein by reference), and the DNA sequences including the identification sequence expressed in seed and the physically linked selectable or screenable marker gene are present together on a T-DNA or other sequence (*e.g.*, vector backbone) that is transferred into a plant cell (*e.g.* flanked by T-DNA RB and/or LB sequences or without a border sequence). The identification sequence and marker gene may be

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

transferred to the plant physically linked, while the gene of interest is present on a separate T-DNA flanked by its own RB and LB sequences, or other sequence transferred into a plant cell, and can be integrated at an independent locus (*e.g.* FIG. 21). The selectable and/or screenable marker permits identification of transformed
5 plant tissues. Fertile plants can be obtained and selfed or crossed in a breeding scheme in order to follow segregation of phenotypes in the next generation. Strategies for performing such breeding are well known in the art, and may vary in details between different plants. Seed expression, or lack of expression, of the identification sequence permits facile identification of seed with respect to the
10 presence of marker and identification sequences. The gene of interest, for example, may contain at least one plant expression cassette encoding a trait selected from the group consisting of herbicide tolerance, antibiotic resistance, insect resistance, disease resistance, stress resistance (*e.g.* drought and cold), enhanced nutrient use efficiency, enhanced nutritive content (*e.g.*, amino acid, protein, sugars, carbohydrates, fatty
15 acids, and/or oil), sterility systems, industrial enzymes (*e.g.*, pharmaceuticals and processing enzymes for bio-fuels) and enhanced yield.

The sequences that may be transferred into a plant cell (*e.g.* T-DNAs) may be present on one transformation vector in a bacterial strain being utilized for transformation. In another embodiment, the sequences including the identification
20 sequence and plant selectable marker, and the sequence(s) comprising the gene(s) of interest may be present on separate transformation vectors in the bacterial strain. In yet another embodiment, the T-DNA including the identification sequence and plant selectable marker and the T-DNA comprising the gene of interest may be found in separate bacterial cells or strains used together for transformation.

25 In still another embodiment, DNA sequences including the (i) gene of interest; and (ii) identification sequence expressed in seed and physically linked to a selectable or screenable marker gene may be introduced into a plant cell by a physical method such as microprojectile bombardment. In such an embodiment, the DNA sequences of (i) and (ii) can be located on separate DNA fragments that may be mixed together
30 prior to or during the coating of microprojectiles with DNA. The DNA sequences may be present on a single microprojectile, or they may be present on separate microprojectiles that are mixed together prior to bombardment.

The phenotype conveyed by the identification sequence can be achieved by ectopic overexpression of a heterogenous or endogenous gene linked to a constitutive

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

or seed-specific promoter, or by downregulation of an endogenous gene using antisense RNA, RNA interference or co-suppression technology. Examples of the endogenous gene may include, but are not limited to, genes involved in sugar/starch metabolism, protein metabolism, and fatty acid metabolism.

5 In one embodiment, seed expression of the identification sequence results in a detectable phenotype in seed of a transgenic plant containing an identification sequence. In some embodiments the phenotype may be detected by visual inspection, and may include a change in seed color, opacity (or translucence), fluorescence, texture, size, shape, germinability, viability, or generally any component or property
10 that is physically or biochemically assayable and different from that found in the nontransgenic recipient genotype. In certain embodiments, the identification sequence includes a *gusA*, *gfp* (Pang *et al.*, 1996), phytoene synthase, or phytoene desaturase encoding gene, or an anthocyanin gene (Pl, Lc, B-Peru, C1, R, Rc, *mybA* or *myb1* (*e.g.* Selinger *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1989; Himi *et al.*, 2005; Kobayashi
15 *et al.*, 2002)). In a particular embodiment, the identification gene comprises a *crtB* gene encoding a phytoene synthase (U.S. Patent Nos. 5,429,939; US 6,429,356; U.S. Patent 5,545,816), including a gene comprising a *crtB* sequence codon-optimized for expression in a monocot plant, such a corn plant. Another example of gene that could be used in this regard is a gene involved in production of seed pigment.

20 In other embodiments, the phenotype is assayable by detection of a catalytic activity. In yet other embodiments, the phenotype is a tissue ablation phenotype, for instance a blockage in the formation of pollen, egg, or seed tissue. Compositions and methods that silence genes required for the production or viability of gametes, reducing or preventing fertilizations that include the marker gene, are also envisioned.
25 For example, sequences could be used that result in the silencing of genes required for pollen development and viability. The pollen that are derived from meiotic segregants carrying the marker gene would not develop or would be inviable, thus preventing the transmission of the marker gene to the progeny through the pollen. In outcross pollinations, all progeny would be marker free. Use of sequences that result
30 in silencing of other endogenous genes (*e.g.* RNAi technologies including miRNA) to result in a seed phenotype is also envisioned. Such genes include, but are not limited to: genes encoding or modifying expression of seed storage proteins such as zeins, Opaque2, *Waxy*, and other genes encoding proteins involved in carbohydrate, protein, and/or lipid accumulation in seeds.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

Expression of an identification sequence that confers a phenotype of nonviable pollen is also desirable because only the pollen grains without the identification sequence will be capable of fertilizing eggs thus increasing the yield of seeds free of the identification sequence and the marker sequence when the transgenic line carrying the identification sequence under the control of a pollen-specific promoter is used as a male pollinator. The identification sequence can produce a protein that is lethal to the pollen or inhibitory to pollen germination. Alternatively, expression of a pair of inverted repeats homologous to an essential endogenous pollen gene can be used to silence the gene rendering the pollen nonviable. Examples of pollen specific genes and promoters are known to those skilled in the art and include for instance LAT52 and LAT59 genes and promoters of tomato as described (Eyal *et al.*, 1995).

In another embodiment, the identification sequence can be expressed in both the seed and the pollen for further enhancing the selection of seeds with the gene of interest and eliminating the seeds with the identification sequence and the marker gene. This can be achieved by using an identification sequence comprised of two transgenes; the one of which expresses in the seed and the other expresses in the pollen. Alternatively, a promoter that can express the same identification sequence in the pollen and seed can also result in a detectable phenotype in both the pollen and the seed. Examples of promoters that express in pollen and seed are the promoters from the maize Waxy gene (zmGBS; Shure *et al.*, 1983), and the rice small subunit ADP-glucose pyrophosphorylase gene (osAGP; Anderson *et al.*, 1991). Pollen and seed expression patterns are also described in Russell and Fromm, 1997.

The identification sequence may alternatively alter carbohydrate, protein, lipid, or other products of cell or seed metabolism so as to yield a detectable phenotype. In one embodiment, the identification sequence allows for endosperm-specific expression of a *sacB* gene encoding a levansucrase or a yeast ATP-dependent phosphofructokinase (ATP-PFK) which abolishes starch accumulation in seeds containing the identification sequence and marker gene (Caimi *et al.*, 1996; FIG. 12). The identification sequence can be a gene. The identification sequence can further encode a transcriptional or translational fusion (*e.g.* U.S. 6,307,123; U.S. Patent Publication 20060064772).

U.S. Patent 6,307,123 relates to the construction of a translational fusion between a selectable marker gene (*nptII*) and a screenable marker gene (*gfp*). The

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

method can be applied to produce a fusion between an identification sequence described herein and a selectable or a screenable marker described herein.

Another method that can be used to make a polypeptide fusion is based on the Ubiquitin (Ub) processing pathway. This method can be used to cleave a long polypeptide comprising two protein domains into two separate active proteins. In this method, a single gene cassette can encode two ORFs, where the two ORFs, *e.g.*, for *crtB* and EPSPS-CP4 are separated by the 14 C-terminal amino acids of Ub, followed by a full-length Ub sequence. After translation *in vivo*, endogenous de-ubiquitinating enzymes (DUBs) cleaves the polypeptide into three separate units: 1) the N-terminal protein, which comprises the identification sequence *crtB* terminating in the 14 C-terminal amino acids of Ub; 2) a Ub monomer; and 3) the C-terminal polypeptide, which encodes a selectable marker EPSPS-CP4. Such methods are known to those skilled in the art (*e.g.* Walker *et al.*, 2007).

A transcriptional fusion between an identification sequence and a selectable or a screenable marker can be made by using internal ribosome entry sites (IRES). For example, a transcript could be made that encodes the ORF of *crtB* followed by the ORF of EPSPS-CP4 with a functional IRES element positioned between them. Several IRES are known to those skilled in the art (see *e.g.*, Dinkova *et al.*, 2005 and references therein; and U.S. Patent 7,119,187, incorporated herein by reference).

The phenotype of the identification sequence in seed tissue may also be detected by methods including visual, biochemical, immunological and nucleic-acid based (*e.g.* PCR-based) methods, among others. The identification sequence may confer a detectable phenotype in seed tissue that may be distinguished from the phenotype of the marker gene. The phenotype conferred by the identification sequence can include altered seed germination. The identification sequence may be expressed in one or more portions of a seed (kernel), including the embryo, endosperm, cotyledon(s), and seed coat (testa), such that a phenotype may be discerned.

The identification sequence may also cause a seedless phenotype. To accomplish tissue ablation, in one embodiment, the identification sequence directs ovule-specific expression of *defH9-iaaM* or *rolB* in plants (*e.g.* Rotino *et al.* 1997, Carmi *et al.* 2003, GenBank AM422760, X64255, AE009418), which abolishes ovule development and results in a seedless phenotype in marker and identification sequence-containing ovaries. In yet another embodiment, the identification sequence

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

directs over expression of OsCDPK2 in cereal crops disrupting seed development (Morello *et al.* 2000; *e.g.*, GenBank Y13658).

Genetic elements may also be designed to suppress the expression of an endogenous gene, resulting in the production of a seed phenotype that permits
5 distinguishing of seeds that contain the marker gene from those that do not. The genetic elements of this identification sequence are physically linked to the marker gene, *e.g.* embedded within the marker DNA cassette, such that the seed phenotype is linked to the presence of the marker, allowing for the rapid identification of marker containing seeds.

10 RNAi may be used to silence one or more genes resulting in an easily scored, preferably visible, seed phenotype. The DNA sequences required for an RNAi-mediated seed phenotype are positioned on the same T-DNA as the marker gene. Any progeny seed that contains the marker gene would also display the seed phenotype and would be easily identified. Such seeds would not need to be grown
15 and screened for the presence of the marker gene. Thus, only seeds without the phenotype conferred by the identification sequence are grown and/or screened for the presence of the GOI. Depending on whether the seeds are from self-pollination or outcrossing, this method reduces the number of seeds that need to be planted and screened by at least 3X for selfing plant species or 1X for outcrossing plant species.

20 A wide variety of compositions are known to those skilled in the art that can be used to silence a target gene using RNAi related pathways. One embodiment is to assemble a DNA cassette that will transcribe an inverted repeat of sequences, to produce a double-stranded RNA (dsRNA), typically at least about 19-21 bp in length and corresponding to a portion of one or more genes targeted for silencing. The
25 dsRNA can be about 19-21 bp in length and corresponding to a portion of one or more genes targeted for silencing. This DNA cassette including an identification sequence is positioned within the same T-DNA as the selectable marker gene. Other methods to silence a gene known to those skilled in the art include, but are not limited to: cosuppression, antisense, expression of miRNAs (natural or engineered), expression
30 of trans-acting siRNAs, and expression of ribozymes. Any of these methods may be used if the sequences required for the gene silencing effect are positioned in the same T-DNA as the marker gene.

The identification sequence may increase or decrease seed size. In one embodiment, the identification sequence confers down regulation of *AP2* gene (*e.g.*,

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

GenBank U12546) by antisense RNA or RNA interference or cosuppression technology (Jofuku *et al.*, 2005), which results in larger seeds containing the identification sequence and selectable marker genes. The larger seed size may also be achieved by ectopic expression of an *ARF2* gene (Schruff *et al.*, 2006; *e.g.*, GenBank
5 Accessions NM_203251; NM_180913), or *ANT* transcription factor (Mizukami and Fisher, 2000; *e.g.*, GenBank NM_202701, NM_119937, NM_180024, NM_101474, NM_202110). In another embodiment, the identification sequence conveys down regulation of a *LEC2* (*e.g.*, GenBank AF400123) or a *Snf-1* (GenBank AB101657, AB101656, AB101655) gene by antisense RNA or RNAi or cosuppression
10 technology, which leads to decreased seed size (Mendoza *et al.*, 2005; Radchuk *et al.*, 2006). The changed seed size can be easily sorted by weight, shape or sieving by manual and/or mechanical means.

It is specifically contemplated that automated screening techniques may be implemented with the current invention for the identification of seeds having a
15 particular detectable phenotype. In this manner large numbers of seeds can be efficiently screened and seeds lacking an identification sequence may be collected. Automated techniques may be faster, less expensive and more accurate than reliance upon human technicians. Such seed sorting machines which could be used in this manner have been described. For example, U.S. Patent No. 4,946,046 describes an
20 apparatus for sorting seeds according to color. In this machine, seeds are sorted according to color by placing the seeds in uniform rows of indentations in a rotating drum and passing the seeds beneath a digital imaging camera and a light source. Images are read by the camera and are fed to a computer, which also receives information from a drum speed sensor. The computer generates a signal which causes
25 a blast of air to blow through an opening in the bottom of an indentation containing a colored seed to collect such seed. Collected seeds are fed into a collection hopper, and the non-colored seeds into a separate hopper.

By varying the wavelength of the light source used for detection of colored seeds, as well as barrier filters placed between the colored seed and the detection
30 camera, potentially any identification marker could be detected with this technique. For example, to detect seeds expressing GFP, the excitation wavelength is in the blue light UV spectrum, typically at about 395 nm. Suitable light sources for UV emission are well known to those of skill in the art, and include xenon or mercury lamps. Suitable filter sets also are well known to those of skill in the art, and include, for

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

example, a BP450-490 exciter filter, an FT510 chromatic beam splitter, and a BP515-565 barrier filter (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY). Such filter sets and emission wavelengths are discussed in more detail in Heim and Tsien, 1996, the disclosure of which is specifically incorporated herein by reference in its entirety.

5 By use of constructs including one or more identification sequence(s), the selective power can be extended to multiple selectable and/or screenable genes and genes of interest. Therefore, large numbers of transgenic seeds, representing a variety of different transformation events, can be efficiently screened and only those seeds having (or lacking) a desired set of identification sequences may be selected.

10 A recombinant DNA vector may, for example, be a linear DNA segment or a closed circular plasmid. The vector system may be a single vector or plasmid or two or more vectors or plasmids that together contain the total DNA to be introduced into the plant genome. Nucleic acid molecules as set forth herein can, for example, be suitably inserted into a vector under the control of a suitable promoter that functions
15 in a plant cell to drive expression of a linked coding sequence or other DNA sequence. Many vectors are available for this purpose, and selection of the appropriate vector will depend mainly on the size of the nucleic acid to be inserted into the vector and the particular host cell to be transformed with the vector. Each vector contains various components depending on its function and the particular
20 vector and plant cell with which it is used or is compatible.

A number of vectors suitable for stable transformation of plant cells or for the establishment of transgenic plants are well known, *e.g.*, Gelvin *et al.* (1990). Typically, plant expression vectors include, but are not limited to, one or more gene of interest transcription units, each of which includes: a 5' untranslated region, which
25 includes sequences that control transcription (*e.g.*, cis-acting promoter sequences such as enhancers, the transcription initiation start site, *etc.*) and translation (*e.g.*, a ribosome binding site) of an operably linked protein-coding sequence ("open reading frame", ORF); a 3' untranslated region that includes additional regulatory regions from the 3' end of plant genes (Thornburg *et al.*, 1987); An *et al.*, 1989), *e.g.*, a 3'
30 terminator region to increase mRNA stability. Alternatively a plant expression vector may be designed for expression of an mRNA molecule that may, for instance, alter plant gene expression by an RNAi-mediated approach. In addition, such constructs commonly include a selectable and/or screenable marker transcription unit and

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

optionally an origin of replication or other sequences required for replication of the vector in a bacterial host cell.

The constructs may also contain the plasmid backbone DNA segments that provide replication function and antibiotic selection in bacterial cells, for example, an *Escherichia coli* origin of replication such as *ori322*, a broad host range origin of replication such as *oriV* or *oriRi*, and a coding region for a selectable marker such as Spec/Strp that encodes for Tn7 aminoglycoside adenylyltransferase (*aadA*) conferring resistance to spectinomycin or streptomycin, or a gentamicin (Gm, Gent) selectable marker gene. For plant transformation, the host bacterial strain is often *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58, LBA4404, EHA101, or EHA105 carrying a plasmid having a transfer function for the expression unit. Other strains known to those skilled in the art of plant transformation can function in the present invention.

Plant expression vectors optionally include RNA processing signals, *e.g.*, introns, which may be positioned upstream or downstream of a polypeptide-encoding sequence in the transgene. In addition, the expression vectors may also include additional regulatory sequences from the 3'-untranslated region of plant genes. These 3' untranslated regions contain mRNA transcription termination signals. Other movable elements contained in plant expression vectors may include 5' leader sequences, transit signal sequences, and coding sequences.

Expression and cloning vectors may contain a selection gene, also referred to as a plant selectable marker. This gene encodes a protein necessary for the survival or growth of transformed plant cells grown in a selective culture regimen. Typical selection genes encode proteins that confer resistance to selective agents such as antibiotics including herbicides, or other toxins, *e.g.*, neomycin, methotrexate, dicamba, glufosinate, or glyphosate. Those cells that are successfully transformed with a heterologous protein or fragment thereof produce a protein conferring, *e.g.* drug resistance and thus survive the selection regimen. Examples of various selectable/screenable/scorable markers and genes encoding them are disclosed in Miki and McHugh, 2004.

An expression vector for producing a mRNA can also contain an inducible or tissue specific promoter that is recognized in the host plant cell and is operably linked to the nucleic acid encoding, the nucleic acid molecule, or fragment thereof, of interest. Plant promoters are discussed below.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

In one embodiment, the plant transformation vector that is utilized includes an isolated and purified DNA molecule including a heterologous seed-specific promoter operatively linked to one or more nucleotide sequences of the present invention. In another embodiment, the promoter is seed-expressed, but not seed-specific. A plant transformation vector may contain sequences from one or more genes, thus allowing production of more than mRNA in a plant cell. One skilled in the art will readily appreciate that segments of DNA can be combined into a single composite DNA segment for expression in a transgenic plant.

Suitable methods for transformation of host cells for use with the current invention are believed to include virtually any method by which DNA can be introduced into a cell (see, for example, Miki *et al.*, 1993), such as by transformation of protoplasts (U.S. Patent No. 5,508,184; Omirullich *et al.*, 1993), by desiccation/inhibition-mediated DNA uptake (Potrykus *et al.*, 1985), by electroporation (U.S. Patent No. 5,384,253), by agitation with silicon carbide fibers (Kacppler *et al.*, 1990; U.S. Patent No. 5,302,523; and U.S. Patent No. 5,464,765), by *Agrobacterium*-mediated transformation (U.S. Patent Nos. 5,563,055; 5,591,616; 5,693,512; 5,824,877; 5,981,840; 6,384,301) and by acceleration of DNA coated particles (U.S. Patent Nos. 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861; 6,403,865; Padgett *et al.* 1995), etc. Through the application of techniques such as these, the cells of virtually any species may be stably transformed. In the case of multicellular species, the transgenic cells may be regenerated into transgenic organisms.

The most widely utilized method for introducing an expression vector into plants is based on the natural transformation system of *Agrobacterium* (for example, Horsch *et al.*, 1985). The Ti and Ri plasmids of *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*, respectively, carry genes responsible for genetic transformation of the plant. Descriptions of *Agrobacterium* vector systems and methods for *Agrobacterium*-mediated gene transfer are provided by numerous references, including Gruber *et al.*, 1993; Miki *et al.*, 1993, Moloney *et al.*, 1989, and U.S. Patent Nos. 4,940,838 and 5,464,763. Other bacteria such as *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, and *Mesorhizobium* that interact with plants naturally can be modified to mediate gene transfer to a number of diverse plants (Broothaerts *et al.*, 2005). These plant-associated symbiotic bacteria can be made competent for gene transfer by acquisition of both a disarmed Ti plasmid and a suitable binary vector. DNA sequences to be transferred via an

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

Agrobacterium-mediated transformation method include one or more "border" sequences, such as right border (RB) and left border (LB) sequences that usually define the extent of the transferred DNA (T-DNA) containing one or more genes to be expressed in a plant cell, and may further include an enhancer sequence such as an overdrive sequence (Toro *et al.*, 1989) or a plurality of overdrive sequences as disclosed in U.S. Provisional Patent Application No. 60/831,814, incorporated herein by reference.

Techniques that may be particularly useful in the context of cotton transformation are disclosed in U.S. Patent Nos. 5,846,797, 5,159,135, 5,004,863, and 6,624,344. Techniques for transforming *Brassica* plants in particular are disclosed, for example, in U.S. Patent 5,750,871; and techniques for transforming soybean are disclosed in, for example, Zhang *et al.*, 1999, US Patent 6,384,301, and US 7,002,058. Techniques for transforming corn are disclosed in WO9506722. Some non-limiting examples of plants that may find use with the invention include alfalfa, barley, beans, beet, broccoli, cabbage, carrot, canola, cauliflower, celery, Chinese cabbage, corn, cotton, cucumber, dry bean, eggplant, fennel, garden beans, gourd, leek, lettuce, melon, oat, okra, onion, pea, pepper, pumpkin, peanut, potato, pumpkin, radish, rice, sorghum, soybean, spinach, squash, sweet corn, sugarbeet, sunflower, tomato, watermelon, and wheat.

A vector or construct may also include various regulatory elements. The 5' non-translated leader sequence can be derived from the promoter selected to express the heterologous gene sequence of the DNA molecule of the present invention, and can be specifically modified if desired so as to increase translation of mRNA. The 5' non-translated regions can also be obtained from plant viral RNAs (*e.g.* Tobacco mosaic virus, Tobacco etch virus, Maize dwarf mosaic virus, Alfalfa mosaic virus) from suitable eukaryotic genes, plant genes (wheat and maize chlorophyll a/b binding protein gene leader), or from a synthetic gene sequence. The leader sequence could also be derived from an unrelated promoter or coding sequence. Leader sequences useful in context of the present invention include the maize Hsp70 leader (U.S. Patent No. 5,362,865 and U.S. Patent No. 5,859,347, herein incorporated by reference in their entirety.), and the TMV omega element (Gallic *et al.*, 1989). Examples of translation leader sequences include maize and petunia heat shock protein leaders (U.S. Patent No. 5,362,865), plant virus coat protein leaders, plant rubisco leaders,

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

GmHsp (U.S. Patent 5,659,122), PhDnaK (U.S. Patent 5,362,865), AtAnt1, TEV (Carrington and Freed, 1990), AGRtunos (GenBank Accession V00087; Bevan *et al.*, 1983), OsAct1 (US patent 5641876), OsTPI (US Patent No. 7,132,528), and OsAct15 (US Publication No. 20060162010), among others.

5 Intron sequences are known in the art to aid in the expression of transgenes in monocot plant cells. Examples of introns include the corn actin intron (US Patent 5,641,876), the corn HSP70 intron (ZmHSP70; US Patent 5,859,347; US Patent 5,424,412), and rice TPI intron (OsTPI; US Patent No. 7,132,528), and are of benefit in practicing this invention.

10 A vector may also include a transit peptide nucleic acid sequence. Many chloroplast-localized proteins, including those involved in carotenoid synthesis, are expressed from nuclear genes as precursors and are targeted to the chloroplast by a chloroplast transit peptide (CTP) that is removed after the import steps. Examples of other such chloroplast proteins include the small subunit (SSU) of Ribulose-1,5-
15 bisphosphate carboxylase, and the light-harvesting complex protein I and protein II. It has been demonstrated *in vivo* and *in vitro* that non-chloroplast proteins may be targeted to the chloroplast by use of protein fusions with a CTP and that a CTP sequence is sufficient to target a protein to the chloroplast. Incorporation of a suitable chloroplast transit peptide, such as the *Arabidopsis thaliana* (At) EPSPS CTP (Klee *et al.*,
20 1987), and the *Petunia hybrida* (Ph.) EPSPS CTP (della-Cioppa *et al.*, 1986) has been shown to target heterologous protein sequences to chloroplasts in transgenic plants. Those skilled in the art will recognize that various chimeric constructs can be made, if needed, that utilize the functionality of a particular CTP to import a given gene product into a chloroplast. Other CTPs that may be useful in practicing the
25 present invention include PsRbcS-derived CTPs (*Pisum sativum* Rubisco small subunit CTP; Coruzzi *et al.*, 1984); AtRbcS CTP (*Arabidopsis thaliana* Rubisco small subunit 1A CTP; CTP1; U.S. Patent 5,728,925); AtShkG CTP (CTP2; Klee *et al.*, 1987); AtShkGZm CTP (CTP2synthetic; codon optimized for monocot expression; SEQ ID NO:14 of WO04009761); PhShkG CTP (*Petunia hybrida* EPSPS; CTP4;
30 codon optimized for monocot expression; Gasser *et al.*, 1988); TaWaxy CTP (*Triticum aestivum* granule-bound starch synthase CTPsynthetic, codon optimized for corn expression; Clark *et al.*, 1991); OsWaxy CTP (*Oryza sativa* starch synthase CTP; Okagaki, 1992); NtRbcS CTP (*Nicotiana tabacum* ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit chloroplast transit peptide; Mazur, *et al.*, 1985); ZmAS

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

CTP (*Zea mays* anthranilate synthase alpha 2 subunit gene CTP; Gardiner *et al.*, 2004); and RgAS CTP (*Ruta graveolens* anthranilate synthase CTP; Bohlmann, *et al.*, 1995). Other transit peptides that may be useful include maize cab-m7 signal sequence (PCT WO 97/41228) and the pea (*Pisum sativum*) glutathione reductase
5 signal sequence (PCT WO 97/41228).

Termination of transcription may be accomplished by a 3' non-translated DNA sequence operably linked to a recombinant transgene (e.g. the gene of interest, the identification sequence including a screenable gene, or the plant selectable marker gene). The 3' non-translated region of a recombinant DNA molecule contains a
10 polyadenylation signal that functions in plants to cause the addition of adenylate nucleotides to the 3' end of the RNA. The 3' non-translated region can be obtained from various genes that are expressed in plant cells. The nopaline synthase 3' untranslated region (Fraley *et al.*, 1983), is commonly used in this capacity. Polyadenylation molecules from a *Pisum sativum* RbcS2 gene (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi
15 *et al.*, 1984), AGRtu.nos (Genbank Accession E01312), E6 (Accession # U30508), rice glutelin (Okita *et al.*, 1989), and TaHsp17 (wheat low molecular weight heat shock protein gene; Accession # X13431) in particular may be of benefit for use with the invention.

For embodiments of the invention in which the use of a constitutive promoter
20 is desirable, any well-known constitutive plant promoter may be used. Constitutive plant promoters include, for example, the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, which confers constitutive, high-level expression in most plant tissues (see, e.g., Odell *et al.*, 1985), including monocots (see, e.g., Dekeyser *et al.*, 1990); Terada *et al.*, 1990); the nopaline synthase promoter (An *et al.*, 1988), the octopine synthase
25 promoter (Fromm *et al.*, 1989), cauliflower mosaic virus 19S promoter, figwort mosaic virus 35S promoter, rice actin 1 promoter, mannopine synthase promoter, and a histone promoter.

For other embodiments of the invention, well-known plant gene promoters that are regulated in response to environmental, hormonal, chemical, and/or
30 developmental signals may be used, including promoters regulated by (1) heat (Callis *et al.*, 1988), (2) light (e.g., pea rbcS-3A promoter, Kuhlmeier *et al.*, 1989; maize rbcS promoter, Schaffner and Sheen, 1991; or chlorophyll a/b-binding protein promoter, Simpson *et al.*, 1985), (3) hormones, such as abscisic acid (Marcotte *et al.*,

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

1989), (4) wounding (e.g., wunl, Siebertz *et al.*, 1989); or (5) chemicals such as methyl jasmonate, salicylic acid, *etc.* It may also be advantageous to employ (6) organ-specific promoters (e.g., Roshal *et al.*, 1987; Scherthaner *et al.*, 1988; Bustos *et al.*, 1989).

5 There are a wide variety of plant promoter sequences which may be used to drive tissue-specific expression of polynucleotides in transgenic plants. Indeed, in particular embodiments of the invention, the promoter used is a seed specific promoter. The promoter for β -conglycinin (Chen *et al.*, 1989) or other seed-specific promoters such as the napin promoter, which are regulated during plant seed
10 maturation (Kridl *et al.*, 1991; Kohno-Murase *et al.*, 1994), barley Hv.Perl (Stacey *et al.*, 1996), phascolin (Bustos *et al.*, 1989), soybean trypsin inhibitor (Riggs *et al.*, 1989), ACP (Baerson *et al.*, 1993), stearyl-ACP desaturase (Slocombe *et al.*, 1994), soybean α' subunit of β -conglycinin (P-Gm7S, see for example, Chen *et al.*, 1986), *Vicia faba* USP (P-Vf.Usp, see for example, SEQ ID NO: 1, 2, and 3, U.S. Appl.
15 Pub. 20030229918), the globulin promoter (see for example Belanger and Kriz, 1991), soybean alpha subunit of β -conglycinin (7S alpha; U.S. Patent 6,825,398, incorporated by reference) and *Zea mays* L3 oleosin promoter (P-Zm.L3, see, for example, Hong *et al.*, 1997; see also U.S. Patent No. 6,433,252, the disclosure of which is specifically incorporated herein by reference).

20 The zeins are a group of storage proteins found in *Zea mays* endosperm. Genomic clones for zein genes have been isolated (Pedersen *et al.*, 1982; U. S. Patent 6,326,527), and the promoters from these clones, including the 15 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 22 kDa, 27 kDa, and gamma genes, could also be used. Other promoters known to function, for example, in *Zea mays* include the promoters for the following genes:
25 waxy (Russell and Fromm, 1997; Shure *et al.*, 1983), Brittle (Giroux *et al.*, 1994), Shrunk 2, Branching enzymes I and II, starch synthases, debranching enzymes, oleosins, glutelins, and sucrose synthases. Another promoter for *Zea mays* endosperm expression is the promoter for the glutelin gene from rice, more particularly the Osgt-1 promoter (Zheng *et al.*, 1993). Examples of such promoters in rice include those
30 promoters for the ADPGPP subunits, the granule bound and other starch synthase, the branching enzymes, the debranching enzymes, sucrose synthases (Yang *et al.*, 1990), and Bet11 (basal endosperm transfer layer) and globulin1.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

Examples of other promoters that may be useful with the present invention are described in the U.S. Patent 6,437,217 (maize RS81 promoter), U.S. Patent 5,641,876 (rice actin promoter; OsAct1), U.S. Patent 6,426,446 (maize RS324 promoter), U.S. Patent 6,429,362 (maize PR-1 promoter), U.S. Patent 6,232,526 (maize A3 promoter),

5 U.S. Patent 6,177,611 (constitutive maize promoters), U.S. Patents 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142 and 5,530,196 (35S promoter), U.S. Patent 6,433,252 (maize L3 oleosin promoter), U.S. Patent 6,429,357 (rice actin 2 promoter as well as a rice actin 2 intron), U.S. Patent 5,837,848 (root specific promoter), U.S. Patent 6,294,714 (light inducible promoters), U.S. Patent 6,140,078 (salt inducible promoters), U.S. Patent

10 6,252,138 (pathogen inducible promoters), U.S. Patent 6,175,060 (phosphorus deficiency inducible promoters), U.S. Patent 6,635,806 (gamma-coixin promoter), and U.S. Patent 7,151,204 (maize chloroplast aldolase promoter). Additional promoters that may find use are a nopaline synthase (NOS) promoter (Ebert *et al.*, 1987), the octopine synthase (OCS) promoter (which is carried on tumor-inducing plasmids of

15 *Agrobacterium tumefaciens*), the caulimovirus promoters such as the cauliflower mosaic virus (CaMV) 19S promoter (Lawton *et al.*, 1987), the CaMV 35S promoter (Odell *et al.*, 1985), the figwort mosaic virus 35S-promoter (Walker *et al.*, 1987), the sucrose synthase promoter (Yang *et al.*, 1990), the R gene complex promoter (Chandler *et al.*, 1989), and the chlorophyll a/b binding protein gene promoter, *etc.* In

20 the present invention, CaMV35S with enhancer sequences (e35S; U.S. Patent Nos. 5,322,938; 5,352,605; 5,359,142; and 5,530,196), FMV35S (U.S. Patents 6,051,753; 5,378,619), peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV; US Patent 5,850,019), At.Act 7 (Accession # U27811), At.ANT1 (US Patent Application Publication 20060236420), FMV.35S-EF1a (U.S. Patent Application Publication 20050022261),

25 eIF4A10 (Accession # X79008) and AGRtu.nos (GenBank Accession V00087; Depicker *et al.* 1982; Bevan *et al.*, 1983), rice cytosolic triose phosphate isomerase (OsTPI; US Patent No. 7,132,528), and rice actin 15 gene (OsAct15; U.S. Patent Application Publication 20060162010) promoters may be of particular benefit. In some instances, *e.g.*, OsTPI and OsAct 15, a promoter may include a 5'UTR and/or a

30 first intron. Other promoters useful in the practice of the invention that are known by one of skill in the art are also contemplated by the invention.

A plant expression vector may also include a screenable or scorable marker gene cassette that may be used in the present invention to monitor segregating cells or

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

progeny for (loss of) expression. Exemplary markers are known and include β -glucuronidase (GUS) that encodes an enzyme for various chromogenic substrates (Jefferson *et al.*, 1987a; Jefferson *et al.*, 1987b); an R-locus gene, that encodes a product that regulates the production of anthocyanin pigments (red color) in plant tissues (Dellaporta *et al.*, 1988); a β -lactamase gene (Sutcliffe *et al.*, 1978); a gene that encodes an enzyme for that various chromogenic substrates are known (*e.g.*, PADAC, a chromogenic cephalosporin); a luciferase gene (Ow *et al.*, 1986); a *xyIE* gene (Zukowsky *et al.*, 1983) that encodes a catechol dioxygenase that can convert chromogenic catechols; an α -amylase gene (Ikata *et al.*, 1990); a tyrosinase gene (Katz *et al.*, 1983) that encodes an enzyme capable of oxidizing tyrosine to DOPA and dopaquinone that in turn condenses to melanin; green fluorescence protein (Elliot *et al.*, 1999) and an α -galactosidase. A screenable or scorable marker gene may encode the same gene product as an identification sequence including a screenable or scorable gene, or a different gene product. However, the identification sequence is expressed in egg, pollen or seed tissues, while the screenable or scorable marker gene is expressed during the process of identifying transformed plant cells. The identification sequence may also be expressed constitutively, but only convey a phenotype in egg, pollen, or seed tissues.

Transgenic plants may be regenerated from a transformed plant cell by methods well known in the field of plant cell culture. A transgenic plant formed using *Agrobacterium* transformation methods typically contains a single simple recombinant DNA sequence inserted into one chromosome and is referred to as a transgenic event. Such transgenic plants can be referred to as being heterozygous for the inserted exogenous sequence. A transgenic plant homozygous with respect to a transgene can be obtained by sexually mating (selfing) an independent segregant transgenic plant that contains a single exogenous gene sequence to itself, for example an F0 plant, to produce F1 seed. One fourth of the F1 seed produced will be homozygous with respect to the transgene. Germinating F1 seed results in plants that can be tested for zygosity, typically using a SNP assay or a thermal amplification assay that allows for the distinction between heterozygotes and homozygotes (*i.e.*, a zygosity assay).

A number of identification sequences may be used, for instance genes whose expression may result in a visible phenotype, including use of *gus*, *gfp*, and *luc* (see,

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

e.g., Ow *et al.*, 1986; WO 97/41228 and U.S. Patent 6,583,338; e.g., M26194; M15077). A levansucrase gene, *sacB* (Caimi *et al.*, 1996; e.g., X02730) leading to a “shrunk” seed phenotype, or a pyrophosphatase gene (Hajirezaei *et al.*, 1999) leading to inhibition of germination, may also be employed. Genes encoding
 5 phytoene synthase (*crtB*) are known in the art, including those from *Erwinia uredovora* (e.g. Misawa *et al.*, 1990; Sandmann and Misawa, 1992; U.S. Patents 5,429,939; 6,429,356), and *Pantoea/Enterobacter agglomerans* (e.g. GenBank M38423; M87280), among others. Seed-specific expression of *crtB* that results in orange coloration has been described (Shewmaker *et al.*, 1999; U.S. Patent
 10 6,429,356).

Most transgenes producing pleiotropic seed phenotypes may be used as a visible label gene linked to a selectable marker to identify marker-free gene of interest positive seeds. The visible phenotype may be produced by ectopic overexpression of a transgene or result from down regulation of endogenous metabolic pathway genes
 15 by antisense RNA, RNA interference or co-suppression technology.

The following definitions and methods are provided to better define the present invention and to guide those of ordinary skill in the art in the practice of the present invention. Unless otherwise noted, terms are to be understood according to conventional usage by those of ordinary skill in the relevant art. Definitions of
 20 common terms in molecular biology may also be found in Rieger *et al.* (1991); and Lewin (1994). The nomenclature for DNA bases as set forth at 37 CFR § 1.822 is used.

“CP4”, “*aroA*:CP4”, “AGRTU.*aroA*:CP4”, “CP4 EPSPS” and “EPSPS CP4” refer to the EPSP synthase gene or protein purified from *Agrobacterium tumefaciens* (AGRTU) strain CP4 that when expressed in plants confers tolerance to glyphosate and glyphosate containing herbicide formulations (U.S. Patent No. 5,633,435, herein incorporated by reference in its entirety). The gene sequence may be native or modified for enhanced expression in plants.
 25

A DNA “segment” refers to a region of DNA sequence of a DNA construct. A DNA segment may be within, between, or flanking the T-DNA molecules found in a construct used for *Agrobacterium*-mediated plant cell transformation. For instance, a DNA segment may contain genetic elements for replication of plasmids in bacteria or other various elements and expression cassettes of the DNA construct designed for
 30

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

use in plant cell transformation. Thus, a "DNA cassette" may comprise a DNA segment, including element(s) for expression of the DNA sequence in a cell.

A "fusion protein" refers to a translational fusion expressed as a single unit, yet producing a gene product conferring the phenotypes of the protein encoded by the non-fused starting gene sequences.

An "isolated" nucleic acid is substantially separated or purified away from other nucleic acid sequences in the cell of the organism in which the nucleic acid naturally occurs, *i.e.*, other chromosomal and extrachromosomal DNA and RNA, by conventional nucleic acid-purification methods. The term also embraces recombinant nucleic acids and chemically synthesized nucleic acids.

The term "glyphosate resistance gene" refers to any gene that, when expressed as a transgene in a plant, confers the ability to tolerate levels of the herbicide glyphosate that would otherwise damage or kill the plant. Any glyphosate tolerance gene known to the skilled individual are suitable for use in the practice of the present invention. Glyphosate (including any herbicidally active form of N-phosphonomethylglycine and any salt thereof) inhibits the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). A variety of native and variant EPSPS enzymes have been expressed in transgenic plants in order to confer glyphosate tolerance, any of which can be used in the invention. Examples of some of these EPSPSs include those described and/or isolated in accordance with U.S. Patent No. 4,940,835, U.S. Patent No. 4,971,908, U.S. Patent No. 5,145,783, U.S. Patent No. 5,188,642, U.S. Patent No. 5,310,667, and U.S. Patent No. 6,803,501. They can also be derived from a structurally distinct class of non-homologous EPSPS genes, such as the class II EPSPS genes isolated from *Agrobacterium* sp. strain CP4 (AGRTU.aroA:CP4).

The term "identification sequence" refers to a nucleic acid that encodes a product conferring a detectable phenotype such as a change in seed or gamete color, opacity or translucence, fluorescence, texture, size, shape, germinability, or viability, or other product of cell or seed metabolism. The identification sequence may include a nucleotide sequence (*e.g.* a gene fragment) that may confer a phenotype via down regulation of the expression of another gene, such as via an RNAi-mediated process. In certain embodiments, the identification sequence includes a screenable gene such as a *gusA*, *gfp*, or *crtB* gene. In a particular embodiment, the identification sequence includes a *crtB* gene encoding a phytoene synthase from *Erwinia herbicola* (*Pantoea*

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

agglomerans; GenBank M38423, incorporated herein by reference; and U.S. Patent Nos. 5,429,939, 6,429,356). The identification sequence is physically linked to a plant selectable, screenable, and/or scorable marker gene, such as one encoding antibiotic resistance or herbicide tolerance. The identification sequence can confer a
5 detectable (*e.g.* screenable or selectable) phenotype in seed.

A first nucleic-acid sequence is “operably” connected or “linked” with a second nucleic acid sequence when the first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with the second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a protein-coding sequence if the promoter affects the
10 transcription or expression of the coding sequence. Generally, operably linked DNA sequences are contiguous and, where necessary to join two protein-coding regions, are in the same reading frame.

The term “plant” encompasses any higher plant and progeny thereof, including monocots (*e.g.*, lily, corn, rice, wheat, barley, *etc.*), dicots (*e.g.*, soybean, cotton,
15 tomato, canola, potato, *Arabidopsis*, tobacco, *etc.*), gymnosperms (pines, firs, cedars, *etc.*) and includes parts of plants, including reproductive units of a plant (*e.g.*, seeds, bulbs, tubers, or other parts or tissues from that the plant can be reproduced), fruit, flowers, *etc.*

A “recombinant” nucleic acid is made by an artificial combination of two
20 otherwise separated segments of sequence, *e.g.*, by chemical synthesis or by the manipulation of isolated segments of nucleic acids by genetic engineering techniques.

The terms “DNA construct” or “DNA vector” refers to any plasmid, cosmid, virus, autonomously replicating sequence, phage, or other circular single-stranded or double-stranded DNA or RNA derived from any source that includes one or more
25 DNA sequences, such as promoters, protein-coding sequences, 3' untranslated regions, *etc.*, that have been linked in a functionally operative manner by recombinant DNA techniques. Recombinant DNA vectors for plant transformation are commonly double-stranded circular plasmids capable of replication in a bacterial cell. Conventional compositions and methods for making and using recombinant nucleic
30 acid constructs are well known, *e.g.* Sambrook *et al.*, 1989; and Ausubel *et al.*, 1992 (with periodic updates), and Clark *et al.* (1997), among others.

The term “promoter” or “promoter region” refers to a nucleic acid sequence, usually found upstream (5') to a coding sequence that controls expression of the

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

coding sequence by controlling production of messenger RNA (mRNA) by providing the recognition site for RNA polymerase and/or other factors necessary for start of transcription at the correct site. As contemplated herein, a promoter or promoter region includes variations of promoters derived by means of ligation to various regulatory sequences, random or controlled mutagenesis, and addition or duplication of enhancer sequences. A promoter region is responsible for driving the transcription of coding sequences under their control when introduced into a host as part of a suitable recombinant vector, as demonstrated by its ability to produce mRNA.

“Regeneration” refers to the process of growing a plant from a plant cell (e.g., plant protoplast or explant).

“Selectable marker” refers to a nucleic acid sequence whose expression confers a phenotype facilitating identification of cells containing the nucleic acid sequence. Selectable markers include those that confer resistance to toxic chemicals (e.g. antibiotic resistance), or impart a visually distinguishing characteristic (e.g. color changes or fluorescence).

Useful dominant plant selectable marker genes include genes encoding antibiotic resistance genes (e.g. resistance to hygromycin, imidazolinone, kanamycin, bleomycin, G418, streptomycin or spectinomycin); and herbicide resistance genes (e.g. phosphinothricin acetyltransferase, modified ALS, BAR, modified class I EPSPSs, class II EPSPSs, DMOs), among others.

Included within the terms “scorable marker genes” or “screenable marker genes” are genes that encode a secretable marker whose secretion can be detected as a means of identifying or selecting for transformed cells. Examples include markers that encode a secretable antigen that can be identified by antibody interaction, or even secretable enzymes that can be detected catalytically. Secretable proteins fall into a number of classes, including small, diffusible proteins that are detectable, (e.g., by ELISA), small active enzymes that are detectable in extracellular solution (e.g. α -amylase, β -lactamase, phosphinothricin acetyltransferase), or proteins that are inserted or trapped in the cell wall (such as proteins that include a leader sequence such as that found in the expression unit of extension or tobacco PR-S). Other possible selectable and/or screenable marker genes will be apparent to those of skill in the art.

“T-DNA” refers to a DNA molecule that integrates into a plant genome via an *Agrobacterium* or other Rhizobia-mediated transformation method. At least one end

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

of the T-DNA molecule is flanked by at least one border region of the T-DNA from an *Agrobacterium* Ti or Ri plasmid. These border regions are generally referred to as the Right border (RB) and Left border (LB) regions and exist as variations in nucleotide sequence and length depending on their source (*e.g.* nopaline or octopine producing strains of *Agrobacterium*). The border regions commonly used in DNA constructs designed for transferring transgenes into plants are often several hundred polynucleotides in length and include a nick site where virD2 endonuclease derived from Ti or Ri helper plasmid digests the DNA and covalently attaches to the 5' end after T-strand formation to guide the T-strand integration into the genome of a plant.

10 The T-DNA molecule(s) generally contain one or more plant expression cassettes.

The term "transgene" refers to any nucleic acid sequence nonnative to a cell or organism transformed into said cell or organism. "Transgene" may also refer to any endogenous sequence which is ectopically expressed by modifying coding sequence or regulatory sequences. "Transgene" also encompasses the component parts of a native plant gene modified by insertion of a nonnative or native nucleic acid sequence by directed recombination.

15

EXAMPLES

Those of skill in the art will appreciate the many advantages of the methods and compositions provided by the present invention. The following examples are included to demonstrate the preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples that follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments that are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention. All references cited herein are incorporated herein by reference to the extent that they supplement, explain, provide a background for, or teach methodology, techniques, or compositions employed herein.

20

25

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

EXAMPLE 1**Preparation of 2T-DNA Vectors With an Identification Sequence and Marker Gene, and a Gene-of-Interest**

Two T-DNA plant expression vectors, pMON67465, pMON101338 and
5 pMON101339 (FIG. 1), were constructed according to standard molecular cloning
procedure (Sambrook *et al.*, 1989). One T-DNA includes a CaMV 35S promoter
operably linked to an *nptII* gene encoding resistance to kanamycin and a CaMV 35S
promoter operably linked to a GUS reporter gene. The other T-DNA comprises a
napin:ctp-*crtB*: napin 3' cassette and a 35S:ctp:CP4 EPSPS cassette, that confers
10 glyphosate resistance. The *crtB* in pMON67465 with oriV replication origin was
driven by a 1.8 kb seed-specific napin promoter and 1 kb napin terminator from
Brassica napus. The *crtB* in pMON101338 with oriV replicon and in pMON101339
with pRi replication origin was driven by a shorter version of napin promoter (1 kb)
and terminator (0.3 kb). The *crtB* gene, encoding a phytoene synthase from *Erwinia*
15 sp. confers orange color to soybean seed without affecting transformation frequency
(FIG. 3).

EXAMPLE 2**Transformation and Regeneration of Soy Explants with pMON67465**

Soybean (cv. A3244) tissues were transformed with pMON67465 (FIG. 1) via
20 an *Agrobacterium*-mediated method, essentially as previously described (U.S. Patent
6,384,301, herein incorporated by reference). Briefly, hand excised soy meristem
explants were co-cultivated with *Agrobacterium* for 2-4 days at 23°C, transferred onto
WPM solid medium with 75 µM glyphosate selection in a PLANTCON and cultured
at 28°C under 16/8 light/dark period. After two weeks, the explants were transferred
25 to fresh WPM medium and cultured until shoot harvest. After 2 months, shoots with
true trifolia were cut and cultured onto BRM rooting medium for 2-4 weeks. The
rooted plantlets were grown in greenhouse for seed maturation. Among 40 events
analyzed, 72.5% displayed co-transformation with both T-DNAs. 45% of the 40
events contained both *nptII* and *gus* genes. Event A33908, containing T-DNAs from
30 pMON67465, was further analyzed.

Additional events with plasmid pMON67465 were obtained by re-
transformation of the plasmid into the same cultivar A3244 and 13 transgenic lines
were obtained with transformation frequency of 0.22%. Seven out of 13 lines are

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

gene of interest-positive and marker free after analyzing normal appearance seeds via PCR for presence or absence of a *gus* or *CP4* marker gene (FIG. 6). The orange seeds from R0 plants were also analyzed by PCR for the presence of the *crtB* gene and *CP4* marker gene. All orange seeds but three were found to be positive for both
 5 *crtB* and *CP4* (FIG. 7), whereas none of normal appearance seeds (FIG. 7, white cells) contained *CP4* or *crtB* genes, which indicated the *crtB* phenotype is tightly linked to the *CP4* selectable marker gene.

Thus, use of a 2 T-DNA construct with an identification sequence including a screenable gene linked to a selectable marker gene allows for more efficient screening
 10 and selection of transgenic events containing a gene of interest while lacking sequences encoding a selectable marker. An exemplary comparison between a linkage-Southern based approach ("Standard 2T") and a label-based (*i.e.*, identification sequence based) screen for identifying progeny seed in which a gene of interest and a selectable marker have independently segregated is found in FIG. 8.
 15 Use of the identification sequence approach allows for screening more transgenic events and more progeny of each event in order to identify progeny useful for further analysis.

EXAMPLE 3

CrtB/GUS/CP4 Expression in Soy Event A33908 and R1 Progeny Seed

20 Visual inspection of tissues from event A33908 (FIG. 2) indicated that stems and young unfolded leaves displayed an orange cast. Leaf and root tissue was otherwise phenotypically normal in CrtB-expressing plants. Seed coats from seed of the R0 plant (*i.e.* the R1 generation) displayed slight CrtB expression, while the cotyledons of A33908-derived seed displayed a distinct orange color and some with a
 25 wrinkled phenotype (FIG. 3).

Twelve immature R1 seeds from event A33908 were dissected from the seed coat and subjected to CP4-EPSPS ELISA, and CrtB and GUS-visual analyses (FIG. 4). Segregation of the CrtB, GUS, and CP4-EPSPS phenotypes was evident. 9/12 seed were positive in all three assays. 1/12 seed was CrtB and CP4-EPSPS positive,
 30 but GUS negative, showing segregation of the two T-DNAs of pMON67465, with loss of the *gus* gene. 2/12 seed were CP4-EPSPS ELISA negative. Both of these seed were CrtB negative and GUS positive, thus demonstrating linkage between the identification sequence (*crtB*) and the selectable marker CP4-EPSPS gene, and

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

segregation of these transgenic loci from the *gus* locus. The phenotypic ratio in segregating seed was consistent with Mendelian segregation of two dominant loci.

EXAMPLE 4

R1 Seed Visual Analysis

- 5 Mature seed from A33908 were visually analyzed for color, size, and shape (FIG. 5). A mixture of (i) marker-free normal (e.g. yellow and smooth); (ii) orange and smooth; and (iii) orange and shrunken seed was seen.

EXAMPLE 5

PCR Analysis on GUS Positive Seed

- 10 INVADER PCR (e.g. Mein *et al.*, 2000) was used to follow segregation of the CP4-EPSPS, *crtB*, and *gus* genes delivered by pMON67465 in seed of transgenic soybean plants. Event A33908 was determined to contain a single copy of the CP4-EPSPS marker gene and a single copy of the NPTII gene. Segregation of orange:normal seed followed an expected 3:1 ratio in event A33908 (Table 1).

15 **Table 1: Phenotype and genotype of progeny of transgenic plants**

Pedigree	Invader CP4	Invader NPT II	Orange/Normal seed count	Expect. 3:1 orange/normal seed count	Chi square
GM	1	1	86/26	84/28	0.19
GM	2	1	98/56	115.5/38.5	10.61
GM	1	1	130/72	151.5/50.5	12.20
GM	1	2	134/56	142.5/47.5	2.03
GM	2	0	62/30	69/23	2.84
GM	1	2	77/25	76.5/25.5	
GM A339	2	2	79/40	89.25/29.75	4.71
GM A339	2	4	57/18	56.25/18.75	0.04

EXAMPLE 6

Use of ATP PFK as an Identification Sequence

- 20 For starch-rich cereal grains including corn, manipulation of sugar/starch metabolism resulting in a phenotype of shrunken or abolished seed development may be utilized. Seed-specific expression of *sacB* (Caimi *et al.* 1996), or seed-specific expression of yeast ATP dependent phosphofructokinase (ATP PFK; e.g. GenBank Accession NC_003423, bases 2297466..2300294) in corn ears results in abolished kernel development (FIG. 12). The construct pMON99575 containing the CP4
25 selectable marker and ATP-PFK may be directly used for co-transformation with a

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

one T-DNA construct containing a gene of interest by mixing cells of two *Agrobacterium* strains each including one of these constructs and transforming a plant cell with the mixed bacterial culture. Alternatively, the seed-specific expressing *ATP-PFK* cassette may be subcloned into a 2T-DNA construct as an identification sequence, for efficient identification of marker free seeds. Kernels containing this gene are extremely shrunken and do not germinate. Only the identification sequence-free and marker gene free kernels show normal appearance.

EXAMPLE 7

Use of Genes Involved in Porphyrin Synthesis as Identification Sequences

S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III (uro'gen) methyl transferases (SUMT) produce bright red fluorescent porphyrinoid compounds when overexpressed in *E. coli*, yeast, and CHO cells. This property has enabled visual selection of transformed *E. coli* colonies (Rossner & Scott 1995) and automated sorting of transformed yeast and CHO cells (Wildt & Deuschle 1999). This fluorescence is the result of intracellular accumulation of di- and tri- methylated uro'gen (dihydrosirohydrochlorin and trimethylpyrrocorphin), both of which are compounds found in porphyrin synthesis pathways (*i.e.*, chlorophyll and cobalamin).

Cells transformed with *cobA* encoding SUMT from *Propionibacterium freudenreichii* (GenBank accession U13043; incorporated herein by reference) yield a fluorescent signal with absorbance peaks at 384 nm and 500 nm along with an emission band at 605 nm. The fluorescent porphyrinoids generated by the *cobA* uro'gen methyl transferase have a good spectral signature for marking plant material. Excitation at either 384 or 500 nm avoids strong chlorophyll absorbance and the resulting red emission is readily detected as it has a substantial Stokes shift (from the 500 nm absorbance origin), but does not overlap with chlorophyll autofluorescence in the far red (Haseloff, 1999).

The carboxy terminus of the maize SUMT (GenBank D83391), *Arabidopsis* Upm1 (GenBank L47479), and *E. coli* CysG (GenBank X14202) proteins are significantly similar to proteins encoded by genes of *P. freudenreichii* (*cobA*), *Pseudomonas denitrificans* (*cobA*; GenBank M59236), and of *Synechocystis* sp. (formerly *Anacystis nidulans*; GenBank X70966), each incorporated herein by reference (Sakakibara *et al.* 1996), and may be used similarly.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

A construct including a promoter with kernel expression and a gene encoding CobA, or a similar protein with SUMT activity, allows the use of such a gene as an identification sequence by screening for (lack of) visible red fluorescence in corn seed, for instance. Plant siroheme synthases have been reported to be localized in the chloroplast (Lcustek *et al.*, 1997). Thus use of a porphyrin biosynthesis gene as an identification sequence may include use of a chloroplast transit peptide to direct the gene product to the chloroplast. The construct can be directly used as an identification sequence, and a T-DNA comprising such an identification sequence and a selectable marker may, for instance, be co-transformed with a second construct comprising a T-DNA containing a gene of interest by mixing two *Agrobacterium* strains each containing one of these constructs, and transforming a plant cell with the mixed bacterial culture. An SUMT expression cassette can also be readily subcloned into other 2 T-DNA vectors, or into a vector designed for use in microprojectile-mediated transformation, and used as an identification sequence by a person of skill in the art.

EXAMPLE 8

Use of Gene Silencing to Produce a Detectable Seed Phenotype

An inverted repeat positioned within an intron of the marker gene cassette can lead to efficient gene silencing in plant cells. This is disclosed in detail in U.S. Application Publication No. 2006/0200878 (*e.g.*, Figs 7, 8, 9, incorporated herein by reference). To test if a dsRNA encoded by inverted repeats placed within an intron was capable of eliciting gene silencing, inverted repeats of a ~400 bp segment of the luciferase gene (SEQ ID NO:1) were placed into the intron of the rice Actin1 promoter in a EPSPS-CP4 gene cassette (pMON73874) and the ability of the construct to suppress the luciferase gene in a transient transformation of corn leaf protoplasts was tested. As a control, a similar plasmid was tested, except that the control plasmid had inverted repeats of a segment of the GUS gene instead of the luciferase gene (pMON73875). Finally, as an additional control, pMON25492, which was identical except that it has no inverted repeats, was also employed (FIG. 13).

When these three plasmids were tested in a corn leaf protoplast transient gene silencing system testing for the suppression of firefly luciferase and normalizing to the expression of a RENILLA luciferase (Promega Corp., Madison, WI) internal control, it was observed that plasmid with dsRNA encoding inverted repeats within

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

the intron (pMON73874) was able to suppress luciferase relative to the controls pMON73875 and pMON25492 (FIG. 14). The experiment was repeated a second time with similar results.

To test if a corn kernel phenotype may be generated via a gene silencing approach, constructs designed to suppress the Waxy gene were made. pMON81990 contains inverted repeats of part of the Waxy gene. Transgenic corn plants containing pMON81990 displayed silencing of the Waxy gene in at least 65% of the independent R0 plants, as determined by staining pollen and kernels with iodine for starch production. In comparison, plants containing pMON81993, which expresses a sense fragment of Waxy, do not display efficient silencing of the Waxy gene.

Silencing of genes that encode zeins (seed storage proteins), leading to a visible phenotype was also demonstrated. pMON73567 contains inverted repeats of sequences of genes that encode α -zeins in corn kernels. Transcription of the inverted repeats results in silencing of these genes, reducing the levels of the 19kD and 22kD α -zeins in 26 out of 29 R0 plants tested. FIG. 15 demonstrates that kernels resulting from cells transformed with this dsRNA-encoding sequence have an obvious visual phenotype, wherein kernels with reduced zeins are less translucent than wild-type kernels.

Thus, a dsRNA-encoding sequence embedded in the intron of a marker gene may be used as an identification sequence according to the present invention. Constructs containing, for instance, a glyphosate resistance gene such as CP4 EPSPS as a selectable marker and such a dsRNA-encoding sequence in an intron of the selectable marker gene may be directly used for co-transformation with a one T-DNA construct containing a gene of interest by mixing cells of two *Agrobacterium* strains each comprising one of these constructs and transforming a plant cell with the mixed bacterial culture. Alternatively, the dsRNA-encoding cassette may be subcloned into a 2T-DNA construct as an identification sequence, for efficient identification of marker free seeds. One of skill in the art could also design analogous constructs for use in microprojectile bombardment-mediated plant cell transformation.

30

EXAMPLE 9

Use of *KAS4* as an Identification Sequence

Binary vector pMON83530 (FIG. 16) contains a *KAS4* (α -keto-acetyl-ACT synthase; GenBank accession AF060518) driven by a soybean USP88 promoter (e.g.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

U.S. Patent 7,078,588) with a CP4 plant expressible cassette as a selectable marker on the same T-DNA. The seed-specific expression of the *KAS4* gene results in shrunken seeds which are easily distinguishable from the normal seeds which do not contain the gene (FIG. 17). The construct can be directly used as an identification sequence, and
5 a T-DNA comprising such an identification sequence and a selectable marker may be co-transformed with a second construct comprising a T-DNA containing a gene of interest by mixing two *Agrobacterium* strains each containing one of these constructs and transforming a plant cell with the mixed bacterial culture.

The *KAS4* expression cassette is also present in a 2 T-DNA plasmid as shown
10 in pMON107314 (FIG. 18) wherein one T-DNA comprises a *splA* gene (Sucrose phosphorylase from *Agrobacterium tumefaciens*; GenBank Accession AE009432) as an identification sequence and a marker gene and the other T-DNA may comprise a gene of interest as constructed by routine cloning methods known to those skilled in the art. The 2 T-DNA plasmid can then be used, for instance, for soybean
15 transformation. The identification gene is used for selecting seeds without marker gene based on phenotype provided by the identification gene.

EXAMPLE 10

Use of an *splA* gene as an Identification Sequence

Binary vector pMON68581 (FIG. 19) contains the *splA* (Sucrose
20 phosphorylase from *Agrobacterium tumefaciens*; GenBank Accession AE009432) driven by a soybean 7S alpha promoter (e.g. GenBank M13759; Doyle *et al.*, 1986) with a CP4 plant expressible cassette as a selectable marker on the same T-DNA. The seed-specific expression of the *splA* gene results in shrunken seeds which are easily distinguishable from the normal seeds which do not contain the gene (FIG. 20). The
25 construct can be directly used as an identification sequence, and a T-DNA comprising such an identification sequence and a selectable marker may be co-transformed with a second construct comprising a T-DNA containing a gene of interest by mixing two *Agrobacterium* strains each containing one of these constructs and transforming a plant cell with the mixed bacterial culture. The *splA* expression cassette can also be
30 readily sub-cloned into 2 T-DNA vectors wherein one T-DNA comprises *splA* gene as an identification sequence and a marker gene and the other T-DNA comprises a gene of interest by routine cloning methods known to those skilled in the art. The 2 T-DNA plasmid can then be used, for instance, for soybean transformation. The

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

identification sequence is used for selecting seeds without a selectable or screenable marker gene based on the phenotype provided by the identification sequence.

EXAMPLE 11

5 Use of Several Identification Sequences in Producing Marker-Free Corn Seed

Multiple 2 T-DNA plant expression vectors were constructed. In each construct, the first T-DNA segment comprised a plant expressible *uidA* transgene as an example of a nucleic acid of interest and the second T-DNA segment comprised of a plant expressible CP4 EPSPS transgene as a selectable marker and an identification sequence as shown in the table below. Sequences of *crtB* designed for expression in monocots were prepared by methods known in the art (e.g. by codon-optimization as found in SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3). pMON68412 comprises SEQ ID NO:3. The first T-DNA is flanked by right and left borders while the second T-DNA is located in the vector backbone, a 2 T-DNA format commonly known as tandem format (Huang *et al.*, 2005). Corn tissues were transformed separately with each of the constructs by methods known in the art. The expected phenotype with each identification gene is indicated in Table 2 below. Alternative promoters for expression of the identification sequences in endosperm include glutelin1 promoter from rice, the waxy promoter from corn, and the brittle2 promoter from corn.

20 **Table 2: Exemplary phenotypes expected with given identification sequences.**

Identification Sequence Cassette				
Promoter	Identification sequence	Terminator	Construct	Phenotype of seeds carrying the identification gene and the selectable marker gene
Maize 27 kD zein	<i>crtB</i>	Rice Glutelin1	pMON68412	carotenoid pigment in endosperm; defective kernel development
Maize 27 kD zein	19 & 22 kD zein inverted repeats (US 20060200878)	Rice Glutelin1	pMON68413	opaque endosperm
Maize 27 kD zein	Phosphofructokinase (pfk)	Rice Glutelin1	pMON68414	shrunken endosperm
Maize 27 kD	B peru	Rice Glutelin1	pMON68415	anthocyanin

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

zein				pigment in endosperm
None	None	None	pMON97371	none

* * *

All of the compositions and methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure.

- 5 While the compositions and methods of this invention have been described in terms of the foregoing embodiments and illustrative examples, it will be apparent to those of skill in the art that variations, changes, modifications, and alterations can be applied to the composition, methods, and in the steps or in the sequence of steps of the methods described herein, without departing from the concept, spirit, and scope of the
- 10 invention. More specifically, it will be apparent that certain agents that are both chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope, and concept of the invention as defined by the appended
- 15 claims.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

REFERENCES

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

- U.S. Patent 4,940,835; U.S. Patent 4,940,838; U.S. Patent 4,946,046; U.S. Patent 4,971,908; U.S. Patent 5,015,580; U.S. Patent 5,145,783; U.S. Patent 5,188,642; U.S. Patent 5,302,523; U.S. Patent 5,310,667; U.S. Patent 5,362,865; U.S. Patent 5,384,253; U.S. Patent 5,429,939; U.S. Patent 5,464,763; U.S. Patent 5,464,765; U.S. Patent 5,508,184; U.S. Patent 5,538,880; U.S. Patent 5,545,816; U.S. Patent 5,550,318; U.S. Patent 5,563,055; U.S. Patent 5,591,616; U.S. Patent 5,633,435; U.S. Patent 5,693,512; U.S. Patent 5,731,179; U.S. Patent 5,824,877; U.S. Patent 5,859,347; U.S. Patent 5,981,840; U.S. Patent 6,160,208; U.S. Patent 6,307,123; U.S. Patent 6,326,527; U.S. Patent 6,384,301; U.S. Patent 6,399,861; U.S. Patent 6,403,865; U.S. Patent 6,429,356; U.S. Patent 6,433,252; U.S. Patent 6,458,594; U.S. Patent 6,583,338; U.S. Patent 6,803,501; U.S. Patent 6,825,398; U.S. Patent 7,078,588; U.S. Patent 7,119,187; U.S. Patent 7,151,204.
- U.S. Pub. 20030110532; U.S. Pub. 20030229918; U.S. Pub. 20040237142; U.S. Pub. 20060041956; U.S. Pub. 20060064772; U.S. Pub. 20060200878
- PCT Appln. WO 00/018939
- PCT Appln. WO 97/41228
- An *et al.*, *Plant Physiol.*, 88:547, 1988.
- An *et al.*, *The Plant Cell*, 1:115, 1989.
- Anderson *et al.*, *Gene* 97:199-205, 1991.
- Ausubel *et al.*, *In: Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1992.
- Baerson *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 22(2):255-267, 1993.
- Belanger and Kriz, *Genet.*, 129:863-872, 1991.
- Bohlmann *et al.*, *Plant J.*, 7 (3): 491-501, 1995.
- Breitler *et al.*, *Transgenic Res.*, 13:271-287, 2004.
- Broothaerts *et al.*, *Nature* 433:629-633, 2005.
- Bustos *et al.*, *Plant Cell*, 1:839-853, 1989.
- Caimi *et al.*, *Pl. Physiol.* 110:355-363, 1996
- Callis *et al.*, *Plant Physiol.*, 88:965, 1988.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

- Carmi *et al.*, *Planta*, 217:726-735, 2003.
- Chen *et al.*, *Dev. Genet.*, 10:112-122, 1989.
- Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8560-8564, 1986.
- Clark *et al.*, In: *Plant Molecular Biology*, A Laboratory Manual, Springer, NY, 1997.
- Clark *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 16 (6): 1099-1101, 1991.
- Coruzzi *et al.*, *EMBO J.*, 3:1671-1679, 1984.
- Dale *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10558-10562, 1991.
- Dalcy *et al.*, *Plant Cell Reports*, 17:489-496, 1998.
- De Neve *et al.*, *Plant J.*, 11:15-29, 1997.
- de Vetten *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 21:439-442, 2003.
- DeBlock *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 82:257-263, 1991.
- Dekeyser *et al.*, *Plant Cell*, 2(7):591-602, 1990.
- della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:6873-6877, 1986.
- Dellaporta *et al.*, *Stadler Symposium*, 11:263-282, 1988.
- Depicker *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 201:477-484, 1985.
- Dinkova *et al.*, *Plant J.* 41:722-31, 2005.
- Doyle *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261:9228-9238, 1986.
- Ebinuma *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2117-2121, 1997.
- Elliot *et al.*, *Plant cell Rep.*, 18:707-714, 1999.
- Eyal *et al.*, *Plant Cell*, 7:373-84, 1995.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4803-4807, 1983.
- Framond *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 202:125-131, 1986.
- Fromm *et al.*, *Plant Cell*, 1(10):977-84, 1989.
- Gallie *et al.*, *The Plant Cell*, 1:301-311, 1989.
- Gardiner *et al.*, *Plant Physiol.*, 134: 1317-1326, 2004.
- Gasser *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263: 4280-4287, 1988.
- Gelvin *et al.*, In: *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990.
- Giroux *et al.*, *Plant Physiol.*, 106:713-722, 1994.
- Gordon-Kamm, *et al.*, *Plant Cell* 2:603-618, 1990.
- Gruber *et al.*, In: *Vectors for Plant Transformation*, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick and Thompson (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, 89-119, 1993.
- Hajirezaie *et al.*, *Potato Res.* 42:353-372, 1999.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

- Halpin, *Pl. Biotechnol. J.* 3:141-155, 2005.
- Hanson *et al.*, *Plant J.* 19:727-734, 1999.
- Hare and Chua, *Nature Biotechnol.* 20:575-580, 2002.
- Haseloff, *Methods in Cell Biology*, V58:139-151, 1999.
- Heim and Tsien, *Curr. Biol.*, 6(2):178-182, 1996.
- Himi *et al.* *Genome* 48:747-754, 2005.
- Hong *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 34(3):549-555, 1997.
- Horsch *et al.*, *Science*, 227:1229, 1985.
- Huang *et al.*, *Transgenic Research*, 13: 451, 2004.
- Ikatu *et al.*, *Bio/Technol.*, 8:241-242, 1990.
- Jefferson *et al.*, *EMBO J.*, 6:3901-3907, 1987b.
- Jefferson *et al.*, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5:387-405, 1987a.
- Jofuku *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102:3117-3122, 2005
- Kaeppeler *et al.*, *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Katz *et al.*, *J. Gen. Microbiol.*, 129:2703-2714, 1983.
- Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 210:437-442, 1987.
- Kobayashi *et al.* *Planta*, 215:924-933, 2002
- Kohno-Murase *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 26:1115-1124, 1994.
- Komari *et al.*, *Plant J.*, 10:165-174, 1996.
- Kononov *et al.*, *Plant J.* 11:945-957, 1997.
- Kridl *et al.*, *Seed Sci. Res.*, 1:209-219, 1991
- Kuhlemeier *et al.*, *Plant Cell*, 1:471, 1989.
- Leustek *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:2744-2752, 1997.
- Lewin, In: *Genes V*, Oxford University Press, NY, 1994.
- Ludwig *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:7092, 1989.
- Marcotte *et al.*, *Plant Cell*, 1:969, 1989.
- Mazur, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 13:2373-2386, 1985.
- McKnight *et al.*, *Plant Mol Biol.*, 8:439-445, 1987.
- Mein *et al.*, *Genome Res*, 10:330-343, 2000.
- Mendoza *et al.* *FEBS Letters*, 579:4666-4670, 2005.
- Miki *et al.*, In: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick and Thompson (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993.
- Miki and McHugh, *J. Biotechnol.*, 107:193, 2004.
- Misawa *et al.*, *J. Bacteriol.*, 172:6704-6712, 1990.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

- Mizukami and Fisher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:942-947, 2000.
- Moloney *et al.*, *Plant Cell Reports*, 8:238, 1989.
- Morello *et al.*, *Transgenic Res.* 9:453-462, 2000.
- Odell *et al.*, *Nature*, 313:810-812, 1985.
- Okagaki, *Plant Mol. Biol.*, 19: 513-516, 1992.
- Okita *et al.*, *J Biol Chem.* 264:12573 1989.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21:415-28, 1993.
- Ow *et al.*, *Science*, 234:856-859, 1986.
- Pang *et al.*, *Plant Physiol.*, 112: 893-900, 1996.
- Padgett, *et al.*, *Crop Sci.* 35: 1451-1461, 1995.
- Pedersen *et al.*, *Cell*, 29:1015-1026, 1982.
- Petit *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 202:388-393, 1986.
- Poirier *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 100:487-493, 2000.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Puchta, *Pl. Cell Tiss. Org. Cult.* 74:123-143, 2003.
- Radchuk *et al.*, *Plant Physiol.*, 140:263-278, 2006.
- Rieger *et al.*, In: *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th Ed., Springer-Verlag, NY, 1991.
- Riggs *et al.*, *Plant Cell*, 1(6):609-621, 1989.
- Roshal *et al.*, *EMBO J.*, 6:1155, 1987.
- Rossner and Scott, *BioTechniques*, V19(5):760-764, 1995.
- Rotino *et al.* *Nat. Biotechnol.* 15:1398-141, 1997.
- Russell and Fromm, *Transgenic Res.*, 6:157-68, 1997.
- Sakakibara *et al.*, *Plant J.*, V10(5):883-892, 1996.
- Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sandmann and Misawa, *FEMS Microbiol Lett.*, 69(3):253-257, 1992.
- Sato *et al.*, *Crop Sci.* 44:646-652, 2004.
- Schaffner and Sheen, *Plant Cell*, 3:997, 1991.
- Schellmann *et al.*, *EMBO J.* 21,5036 -5046, 2002.
- Scherthaner *et al.*, *EMBO J.*, 7:1249, 1988.
- Schruff *et al.* *Development*, 133:251:261, 2006.
- Scutt *et al.*, *Biochimie* 84: 1119-1126, 2002.
- Selinger *et al.* *Genetics*, 149:1125-1148, 1998.

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

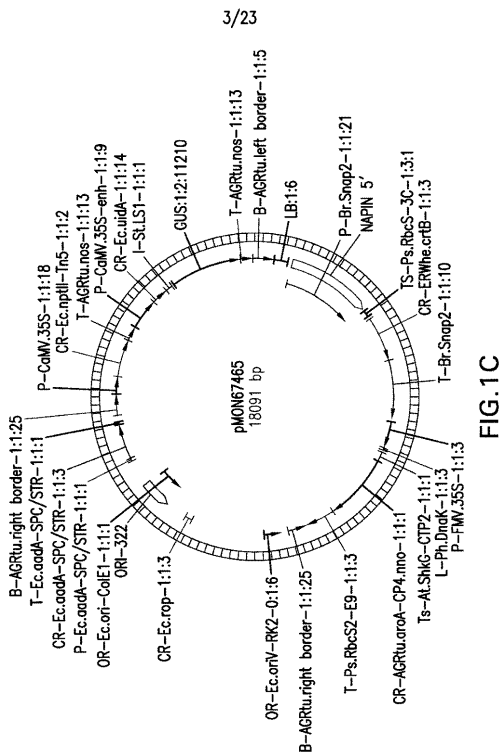
- Shewmaker *et al.*, *Plant J.*, 20(4):401-412, 1999.
- Shure *et al.*, *Cell* 35:225-233, 1983.
- Siebertz *et al.*, *Plant Cell*, 1:961, 1989.
- Simpson *et al.*, *EMBO J.*, 4:2723, 1985.
- Slocumbe *et al.*, *Plant Physiol.*, 104(4):167-176, 1994.
- Stacey *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 31:1205-1216, 1996.
- Sutcliffe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3737-3741, 1978.
- Terada *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 220:389-392, 1990.
- Thornburg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 744-748, 1987.
- Toro *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8558-8562, 1989.
- Walker *et al.*, *Plant Biotechnol J.* 5:413-21, 2007.
- Wildt and Deuschle, *Nature Biotechnology*, V17:1175-1178, 1999.
- Xing *et al.*, *In Vitro Cell Devel. Biol. Plant* 36:456-463, 2000.
- Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
- Yoder *et al.*, *Bio/Technology* 12:263-268, 1994.
- Zheng *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 13:5829-5842, 1993.
- Zhou *et al.*, *Acta Botanica Sinica* 45:1103-1108, 2003.
- Zukowsky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1101-1105, 1983.

FIG. 1A

FIG. 1B

WO 2007/134234

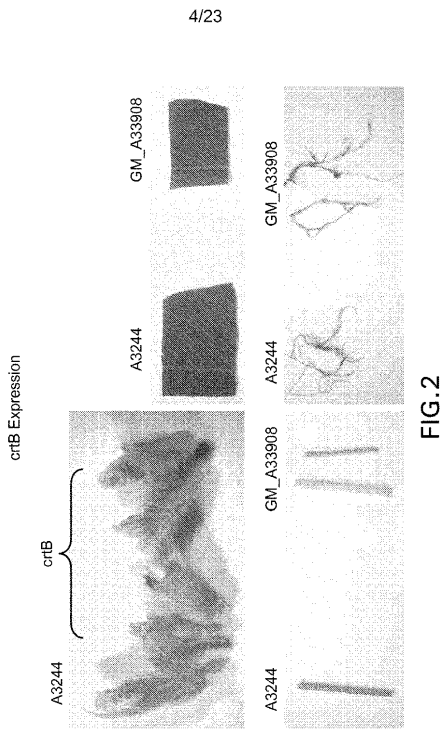
PCT/US2007/068781



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

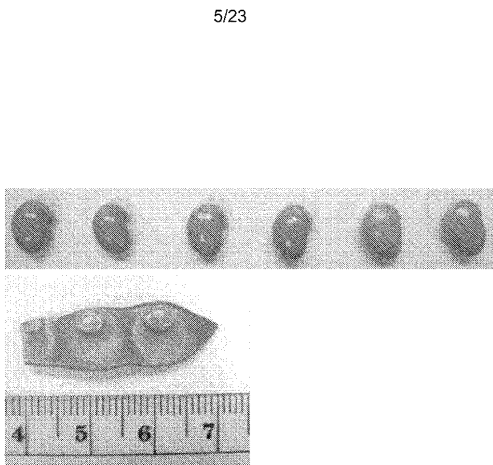
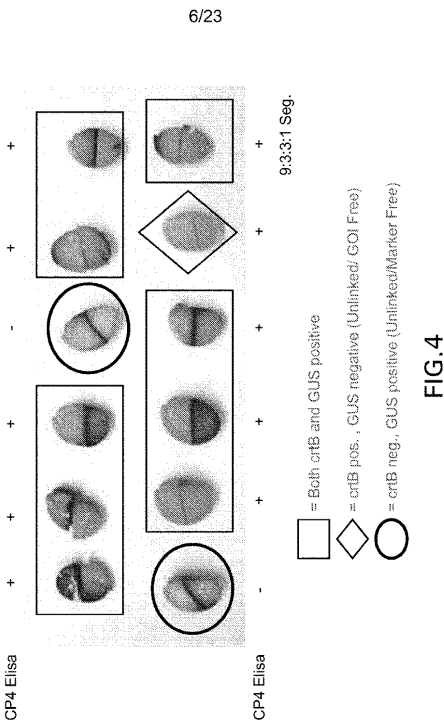


FIG. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

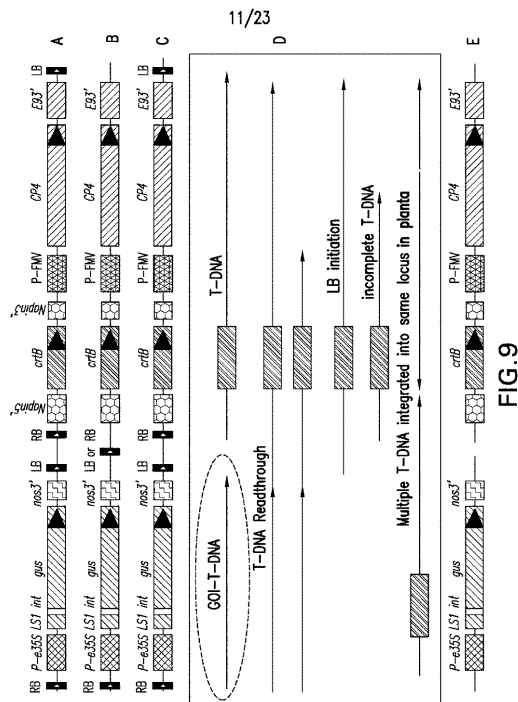


FIG. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

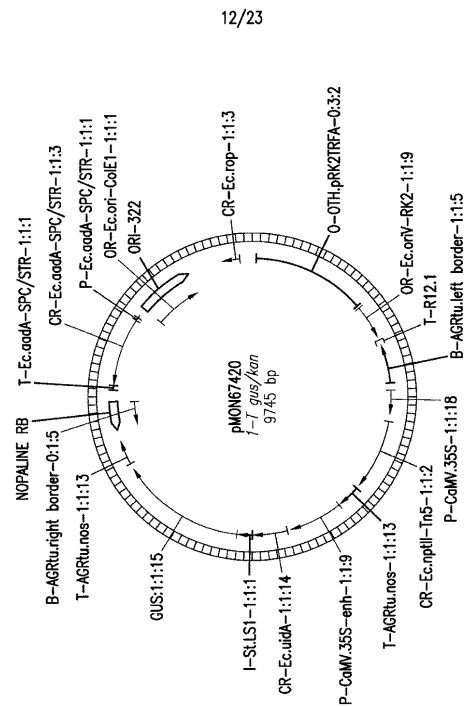


FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

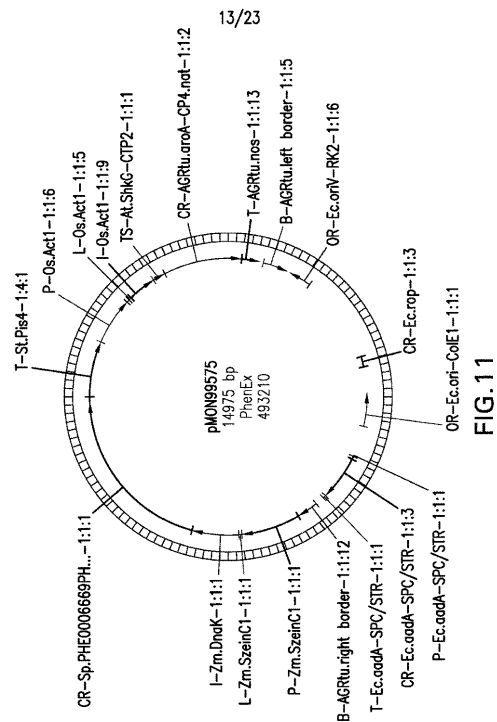


FIG. 11

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

14/23

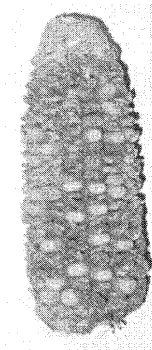


FIG.12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

15/23

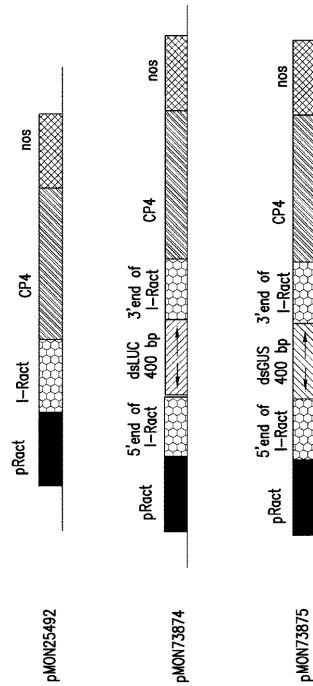


FIG. 13

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

16/23

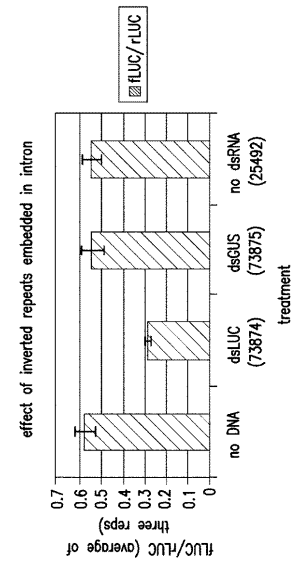


FIG. 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

17/23

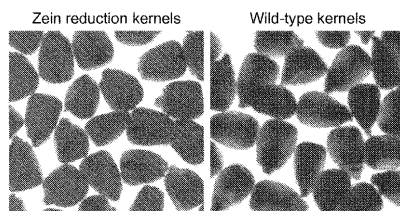


FIG. 15

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

18/23

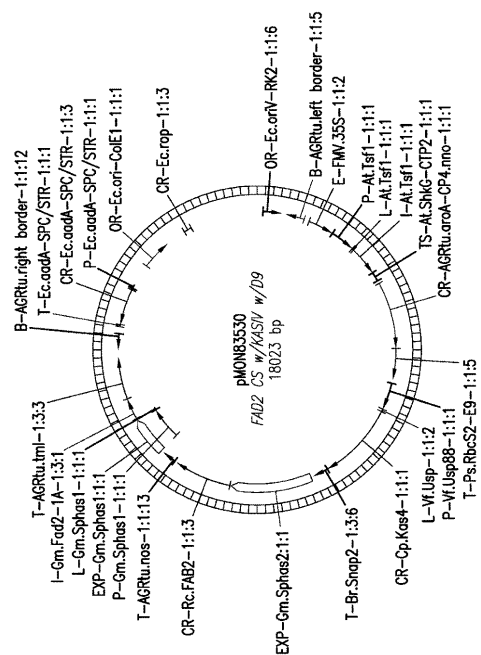


FIG. 16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

19/23

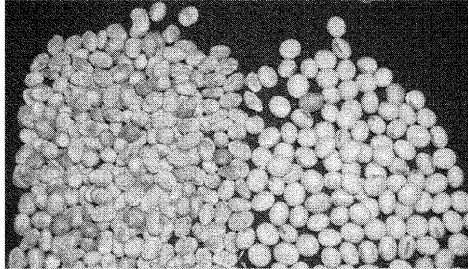


FIG. 17

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

20/23

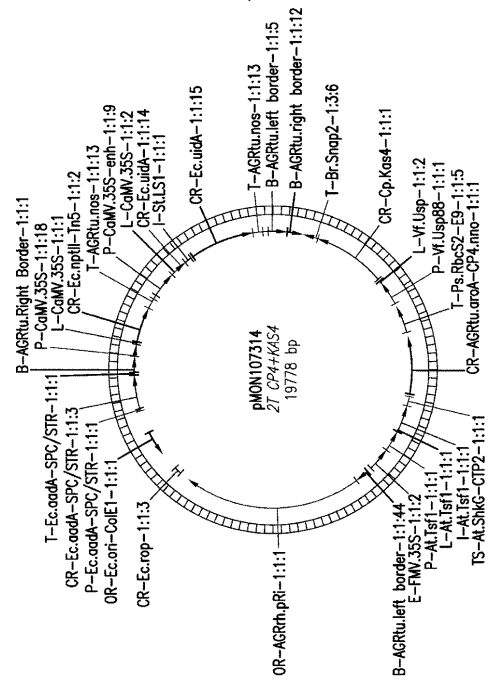


FIG. 18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

21/23

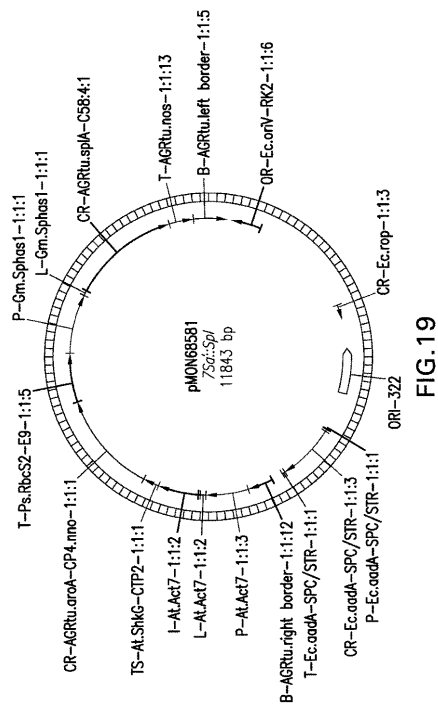


FIG. 19

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

22/23

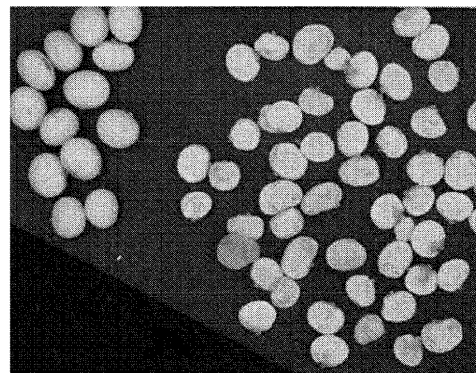


FIG. 20

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2007/134234

PCT/US2007/068781

23/23

2 T-DNA Vector Formats

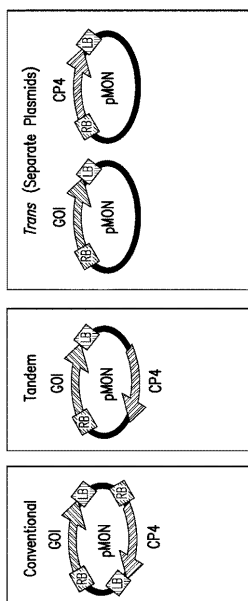


FIG.21

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【配列表】
2020171330000002.app