



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 809 T2** 2005.06.16

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 672 752 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/82**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 809.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP94/01442**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 925 611.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/006722**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.09.1994**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **09.03.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.09.1995**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.06.2005**

(30) Unionspriorität:

24397593 **03.09.1993** **JP**

2732094 **31.01.1994** **JP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Japan Tobacco Inc., Tokio/Tokyo, JP

(72) Erfinder:

SAITO, Hideaki, Shizuoka 438, JP; ISHIDA, Yuji, Shizuoka 438, JP; HIEI, Yukoh, Shinagawa-ku, Tokyo 140, JP; KOMARI, Toshihiko, Shinagawa-ku, Tokyo 140, JP

(74) Vertreter:

PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR, 80801 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR TRANSFORMATION VON MONOCOTYLEDONEN MITTELS DES SCHILDES VON UNREIFEN EMBRYONEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Verfahren zum Transformieren von Monocotyledonen unter Verwendung des Scutellums unreifer Embryos.

Technisches Gebiet

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Transformieren von Monocotyledonen.

Stand der Technik

[0003] Herkömmliche Verfahren zum Transformieren von Monocotyledonen schließen Elektroporationsverfahren, das Polyethylenglycolverfahren (PEG-Verfahren), das Particle-Gun-Verfahren bzw. Teilchenbeschussverfahren usw. ein.

[0004] Das Elektroporationsverfahren ist ein Verfahren, bei dem Protoplasten und die erwünschte DNA vermischt werden und Löcher in den Zellmembranen durch elektrischen Impuls geformt werden, um die DNA in die Zellen einzubringen, wodurch die Zellen transformiert werden. Verschiedene Gene wurden in Monocotyledonen, insbesondere in Reispflanzen, durch dieses Verfahren eingebracht (Toriyama K. et al., 1988; Biotech. 6: 1072 bis 1074, Shimamoto K. et al., 1989; Nature 338: 274 bis 276, Rhodes C.A. et al., 1988; Science 240 : 204 bis 207). Jedoch weist dieses Verfahren dahingehend Probleme auf, als es 1) nur auf die Pflanzenspezies angewendet werden kann, für die das System zum Regenerieren von Pflanzen von Protoplasten etabliert wurde, 2) weil es mehrere Monate in Anspruch nimmt, Pflanzen aus den Protoplasten zu regenerieren, ist eine lange Zeitspanne erforderlich, um Transformanten zu gewinnen, und 3) weil die Kulturperiode lang ist, ist die Häufigkeit des Auftretens von Mutanten während der Kultur entsprechend hoch, sodass die Häufigkeit der Gewinnung normaler Transformanten gesenkt ist.

[0005] Das PEG-Verfahren ist ein Verfahren, bei dem das erwünschte Gen und Protoplasten vermischt werden und das Gemisch mit PEG behandelt wird, wodurch das Gen in die Protoplasten eingeführt wird. Dieses Verfahren ist vom Elektroporationsverfahren dahingehend verschieden, dass PEG anstelle des elektrischen Impulses verwendet wird. Die Effizienz der Einbringung des Gens durch dieses Verfahren ist ein wenig geringer als diejenige durch das Elektroporationsverfahren. Obwohl einige Berichte existieren, die erwähnen, dass Transformanten durch dieses Verfahren erzielt wurden, wird dieses Verfahren nicht im breiten Umfang verwendet. Wie bei der Verwendung von Protoplasten, weist dieses Verfahren die selben Probleme wie beim Elektroporationsverfahren auf (Zhang W. et al., 1988; Theor. Appl. Genet. 76: 835 bis 840, Datta S.K. et al., 1990; Biotech. 8: 736 bis 740).

[0006] Kürzlich wurde von einem Verfahren zum Einbringen eines Gens in unreife Embryos berichtet, die schwach mit einem Enzym zum Abbau der Zellwand behandelt wurden, und von Maiskalli, der durch elektrischen Impuls behandelt wurde (D'Halluin K. et al., 1992; Plant Cell 4: 1495 bis 1505). Die Existenz des eingebrachten Gens wurde ebenfalls in den regenerierten Pflanzen bestätigt. Jedoch wurde lediglich ein Bericht erstellt, der einen Erfolg bei der Transformation offenbart hat.

[0007] Die Particle-Gun-Methode ist ein Verfahren, bei dem das erwünschte Gen an feine Metallteilchen befestigt wird, und die Metallteilchen in die Zellen oder Gewebe in einer hohen Geschwindigkeit geschossen werden, wodurch die Transformation durchgeführt wird. Somit kann gemäß dieses Prinzips eine Transformation mit allen Geweben durchgeführt werden. Es wird deswegen behauptet, dass dieses Verfahren beim Transformieren der Pflanzenspezies, für die Systeme zum Generieren von Pflanzen aus Protoplasten noch nicht etabliert wurden, wirksam bzw. effektiv ist.

[0008] Es existieren einige Berichte über die Gewinnung von Transformanten aus Mais mit normaler Fertilität durch Transformieren von Typ II Maiskallus (Armstrong C.L. und Green C.E., 1985; Planta 164: 207 bis 214) durch das Teilchenbeschussverfahren (Gordon-Kamm W.J. et al., 1990; Plant Cell 2: 603 bis 618, Fromm M.E. et al., 1990; Biotech. 8: 833 bis 839, Walters D.A. et al., 1992; Plant Mol. Biol. 18: 189 bis 200, Vain P. et al., 1993; Plant Cell Rep. 12: 84 bis 88). Jedoch verwendeten beinahe alle diese Berichte einfach kultivierbare Varietäten bzw.

[0009] Sorten als Ausgangsmaterialien, und die dort offenbarten Techniken konnten nicht auf alle unbeschränkten Varietäten angewandt werden.

[0010] Vasil et al. erzielte Basta-resistente Kalli und regenerierte Pflanzen durch Einbringen eines Bar-Gens (Thompson C.J. et al., 1987; EMBO J. 6: 2519 bis 2523), erhältlich durch das Acetylieren von Phosphinothricin, das der Hauptbestandteil in Herbiziden, wie beispielsweise Basta, Bialaphos etc., ist und von GUS-Gen in embryogene Weizenkalli, durch Verwendung eines Teilchenbeschusses. Sie identifizierten die Aktivität des Enzyms, das ein Produkt aus den eingebrachten Genen in diesen Kalli und regenerierten Pflanzen ist, und identifizierten ebenfalls das Bar-Gen in diesen Kalli durch Southern-Blot-Analyse (Vasil V. et al., 1992; Biotech. 10: 667 bis 674).

[0011] Li et al. erzielten Hygromycin-resistente, regenerierte Pflanzen durch Einbringen eines Hygromycin-Resistenzgenes in unreife Embryos und embryogene Kalli von Reis durch Verwendung eines Teilchenbeschusses, gefolgt von einer Selektion der Transformanten. Sie identifizierten das Hygromycin-Resistenzgen in den Pflanzen durch Southern-Blot-Analyse. Sie zeigten, dass das Segregationsverhältnis der Hygromycin-resistenten und Hygromycinempfindlichen Pflanzen in der R_1 -Nachkommenschaft der Pflanzen 3:1 betrug (Li L. et al., 1993; Plant Cell Rep. 12: 250 bis 255).

[0012] Christou et al. erzielten Pflanzen, die gegenüber Hygromycin oder Bialaphos resistent sind und die eine GUS-Aktivität aufweisen, durch Einbringen eines Bar-Genes, eines Hygromycin-Resistenzgenes und eines GUS-Genes in unreife Reisembryos durch Verwendung einer Particle-Gun bzw. Teilchenkanone, und sie identifizierten die eingebrachten Gene in den Pflanzen durch Southern-Blot-Analyse (Christou P. et al., 1991; Biotech 9: 957 bis 962).

[0013] Koziel et al. erzielten Phosphinothricin-resistente Pflanzen durch Einbringen eines Bar-Genes und eines Bt-Toxin-erzeugenden Genes in unreife Embryos von Mais durch Verwendung einer Teilchenkanone. Sie identifizierten die Produktion eines Proteins von Bt-Toxin in diesen Pflanzen und ebenfalls die eingebrachten Gene hierin durch Southern-Blot-Analyse (Koziel M.G. et al., 1993; Biotech. 11: 194 bis 200).

[0014] Weitere Verfahren schließen folgendes ein: 1) Das Kultivieren bzw. Züchten von Samen oder Embryos mit DNA (Topfer R. et al., 1989; Plant Cell 1: 133 bis 139; Ledoux L. et al., 1974; Nature 249: 17 bis 21), 2) eine Behandlung von Pollenröhrchen (Luo und Wu, 1988; Plant Mol. Biol. Rep. 6: 165 bis 174) und 3) das Liposomenverfahren (Caboche M., 1990; Physiol. Plant. 79: 173 bis 176, Neuhaus G. et al., 1987; Theor. Appl. Genet. 75: 30 bis 36). Jedoch weisen diese Verfahren Effizienzprobleme bei der Transformation, Reproduzierbarkeit und Anwendbarkeit auf, sodass diese Verfahren nicht populär sind.

[0015] Andererseits wird ein Verfahren zum Einbringen eines Genes unter Verwendung des Ti-Plasmides von Bakterien, die zum Genus *Agrobacterium* gehören, als Vektor zum Transformieren von Dicotyledonen, wie beispielsweise Tabak, Petunie, Raps und dergleichen, weiterhin verwendet. Es wird jedoch angenommen, dass die Wirte für die Bakterien, die zum Genus *Agrobacterium* gehören, nur auf Dicotyledonen beschränkt sind und dass Monocotyledonen von *Agrobacterium* nicht infiziert werden (De Cleene M., 1976; Bot. Rev. 42: 389 bis 466).

[0016] Wie bei der Transformation von Monocotyledonen durch *Agrobacterium*, obwohl eine Transformation von Spargel (Bytebier B. et al., 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 5345 bis 5349) und von *Dioscorea bulbifera* (Schäfer et al., 1987; Nature 327: 529 bis 532) berichtet wurde, wird angenommen, dass dieses Verfahren nicht auf andere Monocotyledonen angewendet werden kann, insbesondere auf die Pflanzen, die zur Familie der Gramineae gehören (Potrykus I., 1990; Biotechnology 8: 535 bis 543).

[0017] Grimsley et al. berichteten, dass T-DNA von *Agrobacterium*, in das die DNA des Mais-Streak-Virus eingebracht wurde, in die Apicalmeristeme von Maispflanzen inokuliert bzw. beimpft wurde und eine Infektion der Pflanzen durch Mais-Streak-Virus bestätigt wurde. Weil die Infektionssymptome nicht beobachtet wurden, wenn lediglich die DNA von Mais-Streak-Virus hierin beimpft wurde, interpretierten diese das oben erwähnte Ergebnis als einen Beweis, der zeigt, dass *Agrobacterium* die DNA in Mais einbringen kann (Grimsley et al., 1987; Nature 325: 177 bis 179). Weil es jedoch möglich ist, dass Viren sich sogar dann replizieren, wenn diese nicht in das Kerngenom eingebaut sind, zeigt das Ergebnis nicht, dass die T-DNA in den Kern eingebaut wurde. Sie berichteten anschließend, dass die Infektionseffizienz am höchsten ist, wenn das *Agrobacterium* in die Apicalmeristeme in die Sprossspitze von Mais eingeimpft wurde (Grimsley et al., 1988; Biotech. 6: 185 bis 189) und dass das *virC*-Gen im Plasmid von *Agrobacterium* für die Infektion unverzichtbar ist (Grimsley et al., 1989; Mol. Gen. Genet. 217: 309 bis 316).

[0018] Gould et al. beimpften die Apicalmeristeme bzw. Scheitmeristeme von Mais mit supervirulentem *Agrobacterium* EHA1 mit einem Kanamycinresistenzgen und GUS-Gen, nachdem diese mit einer Nadel ver-

letzt wurden und selektierten die so behandelten Apicalmeristeme auf Grundlage ihrer Resistenz gegen Kanamycin. Als Folge wurden Pflanzen mit einer Resistenz gegenüber Kanamycin erhalten. Sie bestätigten durch Southern-Blot-Analyse, dass einige der Samen der anschließenden Generationen der so selektierten Pflanzen die eingebrachten Gene aufwiesen (Gould J. et al., 1991; Plant Physiol. 95: 426 bis 434). Dies bedeutet, dass die aus den Agrobacterium-behandelten Apicalmeristemen gezüchteten Pflanzen, die auf Basis ihrer Resistenz gegen Kanamycin selektiert wurden, sowohl die transformierten Zellen als auch die nicht transformierten Zellen aufweisen (Chimären-Phänomen).

[0019] Mooney et al. versuchten, ein Kanamycin-Resistenzgen in Weizenembryos unter Verwendung von Agrobacterium einzubringen. Die Embryos wurden mit einem Enzym behandelt, um ihre Zellwände zu verletzen und darauf wurden Agrobacterium-Zellen eingepflegt. Unter den behandelten Kalli wuchs eine sehr kleine Menge an Kalli, von denen angenommen wurde, dass sie eine Kanamycinresistenz aufwiesen, jedoch konnten Pflanzen aus diesen Kalli nicht regeneriert werden. Die Existenz des Kanamycin-Resistenzgenes in diesen wurde durch Southern-Blot-Analyse überprüft. Als Ergebnis wurde in allen resistenten Kalli die Veränderung der Struktur des eingebrachten Genes beobachtet (Mooney P.A. et al., 1991; Plant Cell, Tissue, Organ Culture, 25: 209 bis 218).

[0020] Raineri et al. beimpften 8 Varietäten von Reis mit supervirulentem Agrobacterium A281 (pTiBo542) nachdem die Scutella der Reispflanzen verletzt wurden. Als Ergebnis wurde das Wachstum tumorartiger Gewebe in 2 Varietäten, Nipponbare und Fujisaka 5, beobachtet. Weiterhin wurden Agrobacteriumzellen, die ein Plasmid mit einer T-DNA enthielten, aus dem ein Hormon-Synthesegen entfernt wurde und statt dessen ein Kanamycin-Resistenzgen und ein GUS-Gen eingefügt wurden, in die Reisembryos eingepflegt. Als Folge wurde das Wachstum von Kanamycin-Resistenz-Kalli beobachtet. Obwohl die Expression des GUS-Genes in diesen Resistenz-Kalli beobachtet wurde, konnten transformierte Pflanzen aus den Kalli nicht erzielt werden. Sie folgerten aus diesen Ergebnissen, dass die T-DNA von Agrobacterium in die Reiszellen eingebracht wurde (Raineri et al., 1990; Biotech. 8: 33 bis 38).

[0021] Somit wurde von experimentellen Ergebnissen berichtet, die nahe legen, dass die Einbringung von Genen in Pflanzen, die zur Familie der Gramineae gehören, wie beispielsweise Reis, Mais und Weizen, durch Verwendung von Agrobacterium erreicht werden kann. Jedoch weisen diese alle ein Problem bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit auf und gaben keine überzeugenden Ergebnisse, weil sie die eingeführten Gene nicht vollständig identifizierten (Potrykus I. 1990; Biotech. 8: 535 bis 543).

[0022] Chan et al. verletzten unreife Reisembryos, die für 2 Tage in Gegenwart von 2,4-D kultiviert wurden und beimpften diese darauf mit Agrobacteriumzellen, die das nptII-Gen und das GUS-Gen in einem Medium aufwies, das kartoffelsuspensionskultivierte Zellen enthielt. Sie kultivierten die so beimpften unreifen Embryos auf einem G418 zugesetzten Medium, um regenerierte Pflanzen aus den induzierten Kalli zu erzielen. Sie untersuchten die Existenz des GUS-Gens in regenerierten Pflanzen und deren Nachkommenschaft durch Southern-Blot-Analyse und fanden die Existenz des eingebrachten Genes sowohl in den R_0 - als auch R_1 -Generationen heraus (Chan M.T. et al., 1993; Plant Mol. Biol., 22: 491 bis 506). Diese Ergebnisse stützen die Transformation von Reis mit Agrobacterium, jedoch war die Häufigkeit der Transformation nur 1,6%. Zusätzlich wurde nur eine regenerierte Pflanze, die normal gewachsen war, aus den 250 unreifen Embryos, die getestet wurden, gewonnen. Die Abtrennung unreifer Embryos aus Reispflanzen bedarf viel Arbeit. Deswegen befindet sich eine solche niedrige Transformationsleistung nicht auf einem praktischen Niveau.

Offenbarung der Erfindung

[0023] Wie oben erwähnt, wird die Einbringung von Genen in die Pflanzen, die zur Familie Gramineae gehören, nunmehr überwiegend durch das Elektroporationsverfahren und das Teilchenkanonen-Verfahren bzw. Teilchenbeschuss-Verfahren durchgeführt. Im Elektroporationsverfahren, worin jedoch Protoplasten verwendet werden, sind eine lange Zeitspanne und viel Arbeit erforderlich, um regenerierte Pflanzen zu erzielen. Weiterhin existiert die Gefahr, dass Mutanten sich in einer hohen Frequenz aufgrund einer sehr langen Kulturperiode entwickeln können. Noch weiter kann dieses Verfahren nicht auf Pflanzen, wie beispielsweise Mais, angewandt werden, für die das System zum Regenerieren von Pflanzen aus Protoplasten nicht etabliert wurde. Es wurde von einem Verfahren berichtet, bei dem die Gene durch elektrischen Impuls in unreife Embryos eingebracht werden, die mit einem Enzym in einem solchen Umfang behandelt wurden, dass die Zellen darin nicht zu Protoplasten gemacht wurden (D'Halluin K. et al., 1992). Jedoch ist nur ein Erfolg in diesem Verfahren bis jetzt bekannt geworden. Es ist deswegen schwer zu sagen, dass das Verfahren populär bzw. weit verbreitet ist. Unter Vorgabe der Situationen wurden die oben erwähnten Teilchenbeschussverfahren auf Mais unter Verwendung von Typ II Kalli oder unreifen Embryos angewandt. Das Teilchenbeschussverfahren ergibt eine hohe

Wahrscheinlichkeit der Gewinnung der beabsichtigten Transformanten, benötigt jedoch eine spezielle Vorrichtung, nämlich eine Teilchenkanone. Ohne die Vorrichtung kann das Teilchenbeschussverfahren nicht durchgeführt werden. Zusätzlich weist das Teilchenbeschussverfahren ein weiteres Problem dahingehend auf, als feine Metallteilchen oftmals gestreut werden, die die Experimentatoren einem Risiko aussetzen.

[0024] Wie beim Mais, wurde ein Verfahren zum Infizieren von Apicalmeristemen mit Zellen von *Agrobacterium* ausprobiert (Gould J. et al., 1991). Es ist jedoch viel Arbeit erforderlich, um Wachstumspunkte aus Mais zu isolieren und es ist nicht immer einfach, eine große Menge von diesen präparieren. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung versuchten Transformanten aus Mais durch dieses Verfahren zu erzeugen, jedoch erfolglos (siehe Tabelle I, unten).

[0025] Es ist demgemäß die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Transformieren von Monocotyledonen bereitzustellen, mit dem die zur Gewinnung regenerierter Pflanzen durch die Transformationszeit erforderliche Zeit kürzer ist als diejenige bei den konventionellen Verfahren, das im allgemeinen sogar auf Pflanzen angewandt werden kann, für die die Systeme zum Regenerieren von Pflanzen aus Protoplasten bis jetzt noch nicht etabliert werden konnten, ohne irgendwelche Spezialvorrichtungen zu erfordern und bei dem die Herstellung der darin zu verwendenden Materialien einfach ist.

[0026] Die Erfinder haben die Einflüsse der Monocotyledonenpflanzengewebe, die mit *Agrobacterium* behandelt werden sollen, die Behandlungsbedingungen mit *Agrobacterium*, den Aufbau der binären Vektoren etc. auf die Einbringeeffizienz von Genen in Monocotyledonen intensiv studiert und haben als Folge entdeckt, dass unreife Embryos von Monocotyledonen mit denen eine Dedifferentierungsbehandlung nicht durchgeführt wurde, mit Bakterien, die zur Gattung *Agrobacterium* gehören, mit drastisch erhöhter Leistungsfähigkeit transformiert werden können, dass das Transformationsverfahren reproduzierbar ist und dass die oben erwähnte Aufgabe durch dieses Verfahren gelöst werden kann, wodurch die vorliegende Erfindung abgeschlossen ist.

[0027] Die vorliegende Erfindung stellt insbesondere ein Verfahren zum Transformieren von Monocotyledonen bereit, das das Transformieren von Scutellum eines unreifen Embryos eines Monocotyledonen mit einem Bakterium umfasst, das zur Gattung *Agrobacterium* gehört und das ein erwünschtes Gen enthält, wobei der unreife Embryo keiner Dedifferentierungsbehandlung unterworfen wurde, um eine Transformante zu erzielen.

[0028] Die vorliegende Erfindung ist die erste, die es möglich gemacht hat, ein erwünschtes Fremdgen in Monocotyledonen reproduzierbar einzubringen, beispielsweise Pflanzen der Familie Gramineae, wie beispielsweise Reis, Mais, Weizen, Hirse etc. Verfahren zum Transformieren von Monocotyledon mit Zellen von *Agrobacterium* waren bereits bisher bekannt. Wie oben erwähnt, ist es jedoch schwierig zu sagen, dass die bekannten Verfahren etabliert sind. Gemäß der vorliegenden Erfindung werden im Gegensatz zu diesen die unreifen Embryos von Monocotyledonen, die keiner Dedifferenzierungsbehandlung unterworfen wurden, die nicht im Stand der Technik verwendet wurden, mit Zellen von *Agrobacterium* durch das verbesserte Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung beimpft, wodurch ein erwünschtes Gen darin einfach eingebracht werden kann. Weil das Verfahren der vorliegenden Erfindung unreife Embryos verwendet, die einfach hergestellt werden können, können die Materialien für das Verfahren einfacher gewonnen werden als solche für die Verfahren im Stand der Technik, die die Apicalmeristeme von Pflanzen verwenden. Weil zusätzlich die Transformation auf den Scutella unreifer Embryos gemäß des Verfahrens der vorliegenden Erfindung bewirkt wird, kann die zum Regenerieren von Pflanzen aus den sich ergebenden Transformanten benötigte Zeit im Vergleich mit der Transformation von Protoplasten verkürzt werden und zusätzlich wird die Häufigkeit von Mutationen gesenkt. Wenn ein binärer Super-Vektor bzw. Super-Binär-Vektor bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist es möglich, ein erwünschtes Gen in Varietäten einzubringen, die schwierig zu kultivieren sind, beispielsweise Mais oder einige Varietäten von Reis mit einer höheren Effizienz.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0029] [Fig. 1](#) zeigt die Struktur von pTOK162, das ein Beispiel für das Plasmid ist, das in den Bakterien der Art *Agrobacterium* enthalten ist, verwendbar in der vorliegenden Erfindung und die Konstruktion von Plasmid pTOK232, verwendet im Beispiel der vorliegenden Erfindung.

[0030] [Fig. 2](#) zeigt die Struktur von pSB1 und die Konstruktion von Plasmid pSB131, wie [Fig. 1](#).

Beste Art und Weise die Erfindung auszuführen

[0031] Monocotyledonen, die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung transformiert werden können,

sind nicht beschränkt. Die vorliegende Erfindung kann auf alle Monocotyledonen angewendet werden, beispielsweise auf Reis, Mais, Weizen, Hirse, Spargel etc. Bevorzugt sind Pflanzen, die zur Familie der Gramineae gehören, einschließlich Reis, Mais, Hirse, Weizen etc. Mais ist am meisten bevorzugt.

[0032] Der Begriff „unreifer Embryo“ bedeutet hierin den Embryo eines unreifen Samens, der sich im Stadium der Reifung nach der Befruchtung befindet. Das Reifungsstadium der unreifen Embryos, die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung behandelt werden sollen, sind nicht beschränkt und die gesammelten Embryos können nach der Befruchtung in jedem Zustand vorliegen. Bevorzugte Embryos sind solche, die nach nicht weniger als 2 Tagen nach ihrer Befruchtung gesammelt wurden. Ebenfalls bevorzugt sind Scutella unreifer Embryos, die dazu in der Lage sind, dedifferenzierte Kalli zu induzieren, die eine Fähigkeit zum Regenerieren normaler Pflanzen aufweisen, nachdem sie durch das unten erwähnte Verfahren transformiert wurden. Die unreifen Embryos können vorzugsweise Inzuchtformen sein, F1 zwischen Inzuchtformen, F1 zwischen Inzucht und einer natürlich befruchteten Varietät und kommerzielle F1-Varietäten.

[0033] „Dedifferenzierungsbehandlung“ bedeutet einen Prozess der Gewinnung von Zellclustern, beispielsweise Kallus, die ein unorganisiertes Wachstum zeigen, durch Kultivieren differenzierter Zellen von Pflanzengewebe auf einem Dedifferenzierungsmedium.

[0034] Als für die Transformation zu verwendendes Agrobacterium kann ein Agrobacterium verwendet werden, das das Ti-Plasmid oder Ri-Plasmid aufweist und das bis jetzt zur Transformation von Dicotyledonen verwendet wurde. Viele dieser Agrobakterien enthalten einen Vektor, der eine DNA-Region aufweist, die von der Virulenz-Region (Vir-Region) des Ti-Plasmides stammen, die von *Agrobacterium tumefaciens* abstammt. Das Gen, das die Eigenschaft codiert, die an die Pflanze übertragen werden soll, wird in diesen Vektor eingebracht oder liegt auf einem separaten Plasmid vor und wird in das Ti-Plasmid in vivo durch homologe Rekombination oder dergleichen eingebracht. Komari et al. entwickelten einen Vektor, der eine DNA-Region enthält, die aus der Virulenzregion (Vir-Region) eines Ti-Plasmides pTiBo542 stammt, enthalten in einem hoch virulenten *Agrobacterium tumefaciens* A281 mit einer extrem hohen Transformationsleistung (Hood, E.E. et al., 1984; Biotech. 2: 702 bis 709, Hood, E.E. et al., 1986; J. Bacteriol. 168: 1283 bis 1290, Komari, T. et al., 1986; J. Bacteriol. 166: 88 bis 94; Jin, S. et al., 1987; J. Bacteriol. 169: 4417 bis 4425, Komari, T., 1989; Plant Science, 60: 223 bis 229, ATCC 37349) (japanische Offenlegungsschrift (Kokai) Nr. 4-222 527). In dieser Beschreibung wird dieser Vektor als „binärer Super-Vektor“ bezeichnet. Ein solcher binärer Super-Vektor kann vorzugsweise in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0035] Ein Beispiel für einen solchen binären Super-Vektor ist pTOK162 (japanische Offenlegungsschrift (Kokai) Nr. 4-222 527). Seine Struktur ist in [Fig. 1](#) dargestellt. Dieses Plasmid umfasst ein Plasmid, das pTOK154 genannt wird, das sich sowohl im *Escherichia coli* als auch in *Agrobacterium tumefaciens* replizieren kann (pTOK154 ist ein Plasmid, das eine T-Region enthält, die durch das unten beschriebene Verfahren aus einem bekannten Plasmid pGA472 konstruiert wurde, abgeleitet aus dem Ti-Plasmid und einem bekannten Plasmid, das ein breites Wirtsspektrum aufweist, bezeichnet als pVCK101), in das ein KpnI-Fragment (enthaltend virB-, virG- und VirC-Gene) mit einer Größe von 15,2 kb, die aus der Virulenz-Region von pTiBo542 stammen, eingefügt wurde, wobei das KpnI-Fragment kloniert wurde. In pTOK154 wird zwischen zwei Rand- bzw. Grenzsequenzen der T-Region ein Kanamycin-Resistenzgen als in Monocotyledonen einzubringendes Gen eingefügt. Dies ist eine Ausführungsform, wobei das in Monocotyledonen einzubringende Gen in einem Plasmid angeordnet wird, das das klonierte DNA-Fragment aufweist, das aus der Virulenz-Region von pTiBo542 stammt.

[0036] Das Gen, von dem erwünscht ist, dass es in Monocotyledonen eingebracht wird, kann in eine Restriktionsstelle in der T-DNA-Region des oben beschriebenen Plasmids eingefügt werden und das erwünschte rekombinante Plasmid kann abhängig von einem geeigneten Selektionsmarker, beispielsweise einer Arzneistoffresistenz und dergleichen, die das Plasmid aufweist, ausgewählt werden. Wenn jedoch der Vektor, wie beispielsweise pTOK162 dargestellt in [Fig. 1](#), groß ist und mehrere Restriktionsorte aufweist, ist es nicht immer einfach, die erwünschte DNA in die T-Region des Vektors durch konventionelle Sub-Klonierungsverfahren einzubringen. In einem solchen Fall kann die erwünschte DNA in pTOK162 eingebracht werden, indem eine homologe Rekombination in vivo in den Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* angewandt wird (Herrera-Estrella L. et al., 1983; EMBO J. 2: 987 bis 995, Horsch R.H. et al., 1984; Science 223: 496 bis 498). D.h., beispielsweise wird pTOK162 zunächst in *Agrobacterium tumefaciens* eingebracht, und das Plasmid pBR322 (oder ein ähnliches Plasmid), das die erwünschte DNA enthalten wird, wird weiterhin darin eingebracht. Weil die DNA von pTOK162 eine Region aufweist, die mit derjenigen von pBR322 homolog ist, muss das pBR322-Derivat, das das erwünschte Gen enthält, in pTOK162 durch genetische Rekombination über die homologen Regionen eingebracht werden. Anders als bei pTOK162 kann sich pBR322 nicht selbst in *Agrobacterium tumefaciens* replizieren. Deswegen kann pBR322 in *Agrobacterium tumefaciens* nur in der in pTOK162 eingefügten Form

lebend vorliegen (das rekombinierte pTOK162 und pBR322 werden nachstehend als „pTOK162::pBR322-Derivat“ bezeichnet). Durch Auswählen der Transformanten auf Grundlage des Selektionsmarkers (beispielsweise Arzneistoffresistenz), die jeweils für pTOK162 und pBR322-Derivate spezifisch sind, können *Agrobacterium tumefaciens*-Transformanten erzielt werden, die pTOK162::pBR322-Derivate enthalten. Die Erfinder haben eine Studie durchgeführt, indem sie verschiedene Plasmide in *Agrobacterium tumefaciens* einbrachten, das pTOK162 enthielt, um zu entdecken, dass das Spectinomycin-Resistenzgen (SP), das aus dem Transposon Tn7 stammt (De Greve, H.H. et al., 1981; Plasmid 6: 235 bis 248) als Selektionsmarker des pBR322-Derivates ausgezeichnet ist. Somit kann in Fällen, in denen das erwünschte Gen bereits in pBR322 kloniert wurde, indem das SP-Gen in das Plasmid eingeführt wurde, das erwünschte Gen in die T-Region von pTOK162 durch homologe Rekombination in vivo in *Agrobacterium tumefaciens* eingebracht werden. Alternativ wird ein Plasmid, das eine DNA enthält, die aus pBR322 und dem SP-Gen stammt, zuerst bereitgestellt und das erwünschte Gen kann in dieses Plasmid eingebracht werden. In diesem Falle ist es durch Verwendung der Grenzsequenzen der T-Region möglich, letztendlich das Kanamycin-Resistenzgen und das erwünschte Gen in separaten 7-Regionen in pTOK162 anzuordnen. Wenn Pflanzen unter Verwendung der Resistenz gegenüber Kanamycin als Marker transformiert werden, besteht eine beträchtliche Wahrscheinlichkeit, dass beide T-Regionen eingeführt werden und die Einführung des erwünschten Genes kann in ausreichender Weise erreicht werden. Weiterhin kann es in diesem Fall, weil beide T-Regionen in unterschiedliche Chromosomen eingefügt wurden, möglich sein, anschließend das erwünschte Gen aus dem Kanamycin-Resistenzgen abzutrennen.

[0037] Als Wirtsbakterien können vorzugsweise Bakterien, die zur Gattung *Agrobacterium* gehören, wie z.B. *Agrobacterium tumefaciens*, verwendet werden, obwohl sie nicht hierauf beschränkt sind.

[0038] Die Einbringung eines Plasmids in die Bakterien, die zur Gattung *Agrobacterium* gehören, wie beispielsweise *Agrobacterium tumefaciens*, kann durch ein konventionelles Verfahren, wie beispielsweise das Dreifachkreuzungsverfahren von Bakterien durchgeführt werden (Ditta G. et al., 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 7347 bis 7351).

[0039] Weil das, wie oben erwähnt, hergestellte *Agrobacterium* hoch effiziente Virulenz-Gene aufweist, die aus pTOK162 stammen, kann die Transformation von Monocotyledonen mit einer hohen Effizienz erreicht werden.

[0040] Es sollte erwähnt werden, dass im Verfahren der vorliegenden Erfindung das Gen, von dem erwünscht ist, dass es in die Monocotyledonen eingebracht wird, zwischen Grenzsequenzen der T-Region, wie im Stand der Technik, angeordnet werden und das erwünschte Gen kann im Ti-Plasmid oder in einem anderen Plasmid im *Agrobacterium* angeordnet werden.

[0041] Die Transformation der unreifen Monocotyledonenembryos durch das *Agrobacterium* kann durch lediglich In-Berührung-Bringen der unreifen Embryos mit dem *Agrobacterium* durchgeführt werden. Beispielsweise wird eine Zellsuspension des *Agrobacteriums* mit einer Populationsdichte von ungefähr 10^6 bis 10^{11} Zellen/ml hergestellt und die unreifen Embryos werden in diese Suspension für ungefähr 3 bis 10 min eingetaucht. Die sich ergebenden unreifen Embryos werden dann auf einem festen Medium für mehrere Tage zusammen mit dem *Agrobacterium* kultiviert. Die unreifen Embryos, die transformiert werden sollen, werden einer Transformation direkt unterworfen, ohne sie einer Dedifferenzierungsbehandlung zu unterwerfen, beispielsweise durch Kultivieren von diesen in Gegenwart von 2,4-D. Die herkömmliche Transformation von Pflanzen mit dem *Agrobacterium* ist derart, dass die unreifen Embryos, die damit transformiert werden sollen, durch Kultivieren von diesen in Gegenwart von 2,4-D dedifferenziert werden, bevor sie mit dem *Agrobacterium* in Berührung gebracht werden. Die Erfinder haben herausgefunden, dass die Dedifferenzierung gemäß der vorliegenden Erfindung nicht notwendig ist. Deswegen ist das Verfahren der vorliegenden Erfindung dem herkömmlichen Verfahren dahingehend überlegen, dass das erstere einfacher als das letztere ist. Einige Pflanzen, insbesondere Mais, haben oftmals eine gesenkte Transformationseffizienz, wenn sie der Dedifferenzierungsbehandlung vor der Transformation unterworfen werden. Deswegen kann die Transformationseffizienz solcher Pflanzen gemäß des Verfahrens der vorliegenden Erfindung erhöht werden, bei dem die Vorbehandlung nicht durchgeführt wurde. Zusätzlich verwendet die herkömmliche Transformation von Pflanzen mit dem *Agrobacterium* einen Schritt, die Pflanzen zu verletzen oder einen Schritt, diese mit einem Enzym zu behandeln, um die Zellwände zu verdauen, wodurch die Infektionseffizienz erhöht wird, vor ihrer Transformation mit dem *Agrobacterium*. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann eine solche Vorbehandlung aufweisen, jedoch haben die Erfinder herausgefunden, dass eine effiziente Transformation durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung sogar in Abwesenheit einer solchen Vorbehandlung erreicht werden kann. Insbesondere hat ein Verletzen der Maispflanzen die Abnahme der Rate der Induktion von Kalli nach der Transformation zur Folge. Aus diesem Grunde ist eine solche Vorbehandlung für Mais nicht vorteilhaft.

[0042] Es wird bevorzugt, dass die so transformierten unreifen Embryos danach durch ein bekanntes Verfahren dedifferenziert werden (Green, C.E. und Phillips, R.L., 1975; Crop Science 15: 417 bis 421, Duncan, D.R. et al., 1985; Planta 165: 322 bis 332) und die so dedifferenzierten transformierten Zellen selektiert und gezüchtet werden. Die Selektion kann auf Grundlage der Expression des oben erwähnten erwünschten Genes bewirkt werden. Die dedifferenzierten Zellen sollen in Form von Kalli vorliegen, die die Fähigkeit haben, normale Pflanzen zu produzieren. Die Regeneration von Pflanzen aus den transformierten Zellen kann durch bekannte Verfahren bewirkt werden (Luppotto, E. und Lusardi, H.C., 1988; Maydica XXXIII: 163 bis 177). Auf diese Weise können Pflanzen, die die erwünschte Eigenschaft durch die Transformation erworben haben, vorzugsweise transformierte Pflanzen, die die erwünschte Eigenschaft erworben haben und eine normale Fertilität aufweisen, regeneriert werden. Diese Schritte werden konkret in den nachfolgenden Beispielen veranschaulicht.

Beispiele

[0043] Die vorliegende Erfindung wird nunmehr ausführlich unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele erklärt werden. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass die vorliegende Erfindung nicht auf die Beispiele beschränkt ist.

(1) Herstellung von Probegewebe

(i) Maisvarietäten

[0044] Die Maisvarietäten – bzw. sorten P3732, A188, H84, B37Ht, Mo17Ht, W117Ht, Oh43, H99, W64A Harohm, F1 (A188 × Black Mexican Sweet), F1 (A188 × B73Ht), F1 (B73Ht × A188), F1 (H84 × A188), F1 (Mo17Ht × A188) und F1 (C103 × A188) wurden als Proben ausgewählt. Die Varietät P3732 wurde von IWATA RAKUNO KYODOKUMIAI bezogen. Die Inzuchtformen und die Sorte Black Mexican Sweet wurden vom National Institute of Agrobiological Resources, Ministry of Agriculture, Forestry & Fisheries bezogen.

(ii) Reisvarietät

[0045] Die Reisvarietät – bzw. -sorte Tsukinohikari wurde als Probe ausgewählt.

(iii) Herstellung von Sprossspitzengewebe von Mais

[0046] Maissamen wurden in 70% Ethanol 1 min lang eingetaucht und darauf in 1 % Natriumhypochlorit für 5 min und dreimal jeweils mit sterilisiertem Wasser gewaschen. Nach dem Waschen wurden diese auf festem LS-Medium angeordnet (LS-Hauptsalze und LS-Nebensalze (Linsmaier E. und Skoog F., 1965; Physiol. Plant. 18: 100 bis 127), 0,5 mg/ml Nicotinsäure, 0,5 mg/l Pyridoxinhydrochlorid, 1 mg/l Thiaminhydrochlorid, 100 mg/l myo-Inositol, 100 mg/l Casaminoäure, 700 mg/l Prolin, 20 g/l Saccharose und 2,3 g/l Gelrite) und wurden bei 25°C unter Beleuchtung kultiviert. Nach ungefähr 4 Tagen wurden Gewebe mit einer Länge von ungefähr 0,1 mm × 0,3 mm, die die Scheitelteilgewebe enthielten, aus den gezüchteten jungen Sämlingen ausgeschnitten und als Proben verwendet.

(iv) Herstellung von unreifen Maisembryos

[0047] Ungefähr 14 Tage nach der Befruchtung wurden unreife Embryos mit einer Länge von 1 bis 2 mm aseptisch aus weiblichen Ähren isoliert.

(v) Herstellung von unreifen Reisembryos

[0048] Die unreifen Samen wurden bei 7 bis 12 Tagen nach dem Blühen gesammelt und wurden durch Eintauchen von diesen in 70% Ethanol für 30 sec und darauf in 1% Natriumhypochlorit für 10 min nach Entfernung der Spelzen sterilisiert. Die unreifen Embryos wurden aus diesen isoliert und als Proben verwendet.

(2) Ti-Plasmid

[0049] Das Hygromycin-Resistenzgen (HPT), das Phosphinothricin-(PPT)-Resistenzgen (bar) und das GUS-Gen wurden in die T-DNA-Region des Ti-Plasmides eingebracht, um die nachfolgenden Plasmide zu gewinnen:

(i) pIG121Hm:

[0050] Ein Plasmid, in das das GUS-Gen, enthaltend das erste Intron des Katalase-Gens von Castorbohnen enthielt und ein Hygromycin-Resistenzgen wurden ligiert (Nakamura et al., 1991; Plant Biotechnology II (Nakamura et al., Extra Issue of GENDAI KAGAKU, Seiten 123 bis 132), präsentiert von Dr. Nakamura in der Nagoya University).

(ii) pTOK232:

(a) Einbringen des Introns GUS und Hygromycin-Resistenzgens in den Zwischenvektor pTOK229

[0051] Das ClaI-Fragment (2,5 kb), das das Spectinomycin-Resistenzgen enthielt, das aus Tn7 stammte, wurde mit einem Klenow-Fragment behandelt, um seine Enden abzustumpfen. Das sich ergebende Fragment wurde in den SmaI-Ort von pUC19 eingefügt, um das Plasmid pTOK107 (5,2 kb) zu erzielen, das Ampicillin-Resistenzgene und Spectinomycin-Resistenzgene aufwies.

[0052] Das so erzielte pTOK107 wurde mit EcoRI und HindIII behandelt und das sich ergebende 2,5 kb-Fragment, das das Spectinomycin-Resistenzgen enthielt, wurde an das EcoRI-HindIII-Fragment (2,7 kb) von pGA482 ligiert, um pTOK170 (5,2 kb) zu erzielen, das das Spectinomycin-Resistenzgen enthielt und das HindIII- und HpaI-Orte aufwies.

[0053] Der Vektor pIG221, in dem das erste Intron der Katalase der Castor- bzw. Rizinusbohne und des GUS-Gens an den 35S-Promotor ligiert wurde (Ohta et al., 1990; präsentiert von Dr. Nakamura in der Nagoya Universität) wurde mit EcoRI digeriert und das Ergebnis mit einem Klenow-Fragment behandelt, um seine Enden abzustumpfen. Im Ergebnis wurde ein HindIII-Linker (pCAAGCTTG; Code 4660P, im Handel erhältlich von TAKARA SHUZO) eingeführt. Ein Fragment, das den 35S-Promotor und das Intron GUS enthielt, wurde durch Digerieren bzw. Verdauen des sich ergebenden Vektors mit HindIII ausgeschnitten und das Fragment wurde in den HindIII-Ort eines Plasmids pGL2 (Paszowski, bezogen vom Friedrich Miescher Institute) eingebracht, das ein Hygromycin-Resistenzgen ligiert an dem 35S-Promotor enthielt, um pGL2-IG zu erhalten (7,6 kb). Das oben erwähnte Plasmid pGL2 wurde durch Einbringen eines Hygromycin-Resistenzgens (Gritz L. und Davis J., 1983; Gene 25: 179 bis 188) in pDH51 (Pietrazak et al., 1986; Nucleic Acids Research 14: 5857 bis 5868) gewonnen. Das durch Behandlung von pTOK170 mit HpaI gewonnene Fragment wurde an ein PvuII-Fragment (5,2 kb) von pGL2-IG ligiert, und pTOK229 (10,1 kb) zu gewinnen.

(b) Einfügen in den binären Super-Vektor pTOK162

[0054] Die Einfügung der erwünschten Gene (Hygromycin-Resistenzgen und Intron-GUS-Gen) in den binären Super-Vektor pTOK162, erzielt durch Einfügen von virB-, virC- und virG-Genen, die aus dem supervirulenten Agrobacterium A281 stammten, in den binären Super-Vektor, wurde durch homologe Rekombination durchgeführt. D.h., weil beide Vektoren einen Bereich enthalten, der aus einem E. coli-Plasmid pBR322 stammt, ist in den Bakterienzellen, die durch Resistenz gegenüber Spectinomycin und Kanamycin ausgewählt wurden, nur das Plasmid enthalten, das durch Rekombination beider Plasmide erzeugt wurde. Das Plasmid, das den binären Super-Vektor umfasst, in dem das Hygromycin-Resistenzgen und das Intron-GUS eingefügt sind, wird als pTOK232 bezeichnet (siehe [Fig. 1](#)).

[0055] In [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) unten erwähnt bedeutet „SP“ Spectinomycin-Resistenzgen, „HPT“ bedeutet Hygromycin-Resistenzgen, „NPT“ bedeutet Kanamycin-Resistenzgen, „TC“ bedeutet Tetracyclin-Resistenzgen, „BAR“ bedeutet Phosphinothricin-Resistenzgen, „IG“ bedeutet Intron-GUS-Gen, „BR“ bedeutet rechte Grenzsequenz der T-DNA, „BL“ bedeutet linke Grenzsequenz der T-DNA, „virB“, „virC“ und „virG“ bedeutet vir-Regionen, die aus supervirulentem Agrobacterium A281 stammten, „ORI“ bedeutet den Replikationsursprung von ColE1, „COS“ bedeutet die COS-Region eines lambda-Phagen, „K“ bedeutet den Restriktionsenzym KpnI-Ort und „H“ bedeutet den Restriktionsenzym HindIII-Ort.

(iii) pSB131:

(a) Konstruktion von pSB131

[0056] pTOK170 wurde mit BamHI und BglII digeriert und darauf zirkularisiert, um pYS138 zu ergeben. Dieses pYS138 wurde mit EcoRI und Asp7181 digeriert und darauf mit T4 DNA-Polymerase behandelt. In diese wurde Sall-Liner eingebracht (5'-GGTCGACC-3') und das Ergebnis wurde zirkularisiert, um pYS151 zu ergeben.

ben. Dieses pYS151 wurde mit Sall digeriert und ein Sall-Fragment (4,7 kb) mit der T-DNA von pGA643 (An et al., Plant Molecular Biology Manual A3: 1 bis 19, Kluwer Academic, Dordrecht, 1988) wurde in die Spaltstelle eingefügt, um pTOK235 zu ergeben. Dieses pTOK235 wurde an seinem SacII-Ort gespalten, seine Enden wurden mit T4 DNA-Polymerase abgestumpft, ein HindIII-Linker (5'-CAAGCTTG-3') wurde hier eingefügt und das Ergebnis wurde zirkularisiert. Das so gewonnene Plasmid wurde als pTOK246 bezeichnet. Dieses pTOK246 wurde mit HindIII und EcoRI digeriert, um den größten Teil der T-DNA zu entfernen und ein HindIII-EcoRI-Fragment (2,2 kb) mit einem Gen, das durch Ligieren eines Phosphinothricin-Acetyltransferase-Gens (japanisches Patent Kohyo Koho Hei-1-503 434) an 35S-Promotor hergestellt wurde (Bar-Gen mit der Fähigkeit, Pflanzen eine Phosphinothricin-Resistenz zu verleihen), wurde hierin eingefügt, um pSB25 zu gewinnen. Weiter wurde dieses pSB25 mit HindIII digeriert und ein HindIII-Fragment (3,1 kb) aus pIG221 isoliert und ein 35S-Promoter und Intron-GUS wurden darin eingebracht, um pSB31 zu konstruieren. D.h., dieses pSB31 ist ein Zwischenvektor, der das Intron-GUS-Gen und das Phosphinothricin-Resistenzgen (Bar) aufweist, die beide in Pflanzen exprimiert werden.

(b) Konstruktion von pNB1

[0057] pVCK101 (Knauf et al., Plasmid 8: 45 bis 54, 1982) wurde mit EcoRI digeriert, mit T4 DNA-Polymerase behandelt und zirkularisiert, wodurch dessen EcoRI-Ort deletiert wurde. Dies wurde weiter mit BglII digeriert und darauf zirkularisiert, wodurch sein BglII-Ort – bzw. –Stelle deletiert wurde. Das sich ergebende Plasmid wurde pVCK101Q genannt. Dieses pVCK101Q wurde mit HindIII und XhoI digeriert und an pUC18 ligiert, das mit HindIII und Sall digeriert wurde, um pTOK150 zu ergeben. Dieses pTOK150 wurde mit HindIII digeriert und mit T4 DNA-Polymerase behandelt. Ein EcoRI-Linker (5'-CCGAATTCGG-3') wurde in die Spaltstelle eingebracht und das Ergebnis wurde dann zirkularisiert, um pTOK239 zu ergeben, das eine EcoRI-Stelle anstelle der HindIII-Stelle aufwies. pGA482 wurde mit HpaI digeriert und ein XhoI-Linker (5'-CCTCGAGG-3') wurde hierin eingefügt, und das Ergebnis wurde zirkularisiert, um pTOK236 zu ergeben. Dieses pTOK236 wurde mit XbaI und EcoRI digeriert, um ein 2,6 kb-Fragment zu isolieren. pTOK239 wurde mit EcoRI und XbaI digeriert, um ein 2,7 kb-Fragment hiervon zu entfernen. Das 2,7 kb XbaI-EcoRI-Fragment von pTOK236 wurde in dieses eingefügt und das Ergebnis wurde zirkularisiert, um pNB1 zu ergeben. Dieses pNB1 ist eine An eines Akzeptorvektors und enthält weder von T-DNA noch von Virulenz-Region abstammende DNAs.

(c) Konstruktion von pSB1

[0058] pNB1 wurde mit KpnI digeriert und ein 15,2 kb-KpnI-Fragment mit virB- und virG-Genen in der Virulenz-Region von pTiBo542 (American Type Culture Collection Zugangs-Nr. 37349) wurde hierin eingefügt. Das Ergebnis wurde zirkularisiert, um pSB1 zu ergeben. Dieses pSB1 ist ein Akzeptorvektor. Wenn ein Zwischenvektor mit T-DNA in dieses eingefügt wird, um einen Hybridvektor zu ergeben, kann der sich ergebende Hybridvektor mit einem Helferplasmid kombiniert werden, um einen binären Super-Vektor zu konstruieren.

(d) Einfügung von pSB31 in pSB1

[0059] Wie im Fall von pTOK232, wurde pSB31 in pSB1 durch homologe Rekombination eingefügt, um pSB131 zu konstruieren (siehe [Fig. 2](#)).

(3) Wirts-Agrobacterium

[0060] Die Stämme LBA4404 und EHA101, von denen eine T-DNA-Region deletiert wurde, wurden als Wirtsbakterien verwendet. Stamm LBA4404 weist ein Helferplasmid PAL4404 auf (das eine komplette vir-Region aufweist) und ist von American Type Culture Collection (ATCC 37349) erhältlich. Stamm EHA101 war ein Helferplasmid, das die vir-Region aufwies, die von einem super-virulenten Agrobacterium A281 stammte, und ist von Hood E.E. et al., 1986 (oben erwähnt) erhältlich.

[0061] Die verschiedenen in (2) beschriebenen binären Vektoren wurden in diese beiden Stämme von Agrobacterium eingebracht und die unten beschriebenen Stämme wurden zum Einbringen der Gene verwendet. Die Plasmide wurden in die Agrobacteriumstämme durch Dreifachkreuzung (Ditta G. et al., 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 7347 bis 7351) eingebracht.

LBA4404 (pTOK232)

LBA4404 (pSB131)

EHA101 (pIG121Hm)

(4) Herstellung einer Zellsuspension von Agrobacterium

[0062] Kolonien, die durch Kultivieren der Agrobacteriumstämme auf AB-Medium gewonnen wurden (Drlica K.A. und Kado C.I., 1974; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 3677 bis 3681), wurden 3 bis 10 Tage mit einer Platinschleife gesammelt und in LS-Medium zur Zellsuspension suspendiert (die LS-Hauptsalze, LS-Nebensalze, 0,5 mg/ml Nicotinsäure, 0,5 mg/l Pyridoxinhydrochlorid, 1 mg/l Thiaminhydrochlorid, 100 mg/l myo-Inositol, 1,5 mg/l 2,4-D, 1 g/l Casamino-säure, 100 µM Acetosyringon, 0,2 M Saccharose und 0,2 M Glucose umfasste), zur Beimpfung in Maispflanzen, jedoch in modifiziertem AA-Medium (das AA-anorganische Hauptsalze, AA-Aminosäuren und AA-Vitamine umfasst (Toriyama K. und Hinata K., 1985; Plant Sci. 41: 179 bis 183), MS-Nebensalze (Murashige T. und Skoog F., 1962; Physiol. Plant., 15: 473 bis 497), 1,0 g/l Casamino-säure, 100 µM Acetosyringon, 0,2 M Saccharose und 0,2 M Glucose umfasste)) zur Beimpfung in Reis-pflanzen. Die Zellpopulation jedes Mediums wurde auf 3×10^9 bis 5×10^9 Zellen/ml eingestellt. Die Suspensionen wurden zur Beimpfung von Pflanzen verwendet.

(5) Bedingungen zur Beimpfung und Kultur

[0063] Die Gewebeproben wurden mit sterilisiertem Wasser gewaschen und in die oben beschriebenen Suspensionen aus Agrobacteriumstämmen für 3 bis 10 min eingetaucht, nachdem die Sprossspitzenproben mit einer Glasnadel (selbst gemacht) durchstochen wurden, wohingegen die unreifen Embryos unverändert blieben. Nach dem Eintauchen wurden die Sprossspitzen bzw. -spitzenproben auf modifiziertes LS-Medium transplantiert (umfassend LS-Hauptsalze, LS-Nebensalze, 0,5 mg/ml Nicotinsäure, 0,5 mg/l Pyridoxinhydrochlorid, 1 mg/l Thiaminhydrochlorid, 100 mg/l myo-Inositol, 0,1 mg/l Kinetin, 1,0 mg/l Casamino-säure und 2,3 g/l Gelrite), das 100 µM Acetosyringon, 20 g/l Saccharose und 10 g/l Glucose enthielt und darauf bei 25°C unter Beleuchtung für 2 bis 3 Tage kultiviert. Danach wurden diese mit sterilisiertem Wasser gewaschen, das 250 mg/l Cefotaxim enthielt und danach auf dem LS-Medium kultiviert wurde, das die selbe Konzentration an Cefotaxim aufwies. Nach dem Eintauchen wurden die unreifen Maisembryos auf LSD1,5-Medium transplantiert (umfassend LS-Hauptsalze, LS-Nebensalze, 0,5 mg/ml Nicotinsäure, 0,5 mg/ml Pyridoxinhydrochlorid, 1 mg/ml Thiaminhydrochlorid, 100 mg/ml myo-Inositol, 1,5 mg/l 2,4-D, 700 mg/l Prolin, 500 mg/l MES und 8 g/l Agar), das 100 µM Acetosyringon, 20 g/l Saccharose und 10 g/l Glucose enthielt und bei 25°C in Dunkelheit für 1 bis 5 Tage kultiviert. Darauf wurden die so infizierten unreifen Embryos ohne Waschen (weil die Regenerationsrate transformierter Pflanzen niedrig wird, wenn sie gewaschen werden) auf LSD 1,5 Kallus-Wachstumsmedium weiterkultiviert (das dieselbe Zusammensetzung wie das oben erwähnte LSD1,5-Medium aufwies, außer dass es Glucose und Acetosyringon nicht enthielt), das 250 mg/l Cefotaxim enthielt. Andererseits wurden die eingetauchten unreifen Reisembryos auf das feste Medium 2N6 transplantiert (das anorganische Salze N6 und Vitamine (Chu C.C., 1978; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, Seiten 43 bis 50), 1 g/l Casamino-säure, 2 mg/l 2,4-D und 2 g/l Gelrite) umfasste), das die selben Konzentrationen an Acetosyringon, Saccharose und Glucose, wie oben erwähnt, enthielt und wurde bei 25°C in Dunkelheit für 2,5 Tage kultiviert. Danach wurden die so infizierten unreifen Embryos mit sterilisiertem Wasser gewaschen, das 250 mg/l Cefotaxim enthielt und wurden auf festem Medium 2N6, das die selbe Cefotaximkonzentration aufwies, für 3 Tage bis zu 1 Woche kultiviert.

(6) Verfahren zur Überprüfung der GUS-Aktivität

[0064] Unmittelbar nach der oben erwähnten Kultur in Gegenwart von Agrobacteriumstämmen wurden die Gewebe in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8), der 0,1 % Triton X-100 enthielt, bei 37°C für 1 h eingetaucht. Nach dem Wegwaschen der Agrobacteriumstämme mit dem Phosphatpuffer wurde Phosphatpuffer, der 1,0 mM 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure (X-gluc) und 20% Methanol enthielt, den Geweben zugesetzt. Nach Inkubation bei 37°C für 24 h wurde die Anzahl blau gefärbter Gewebe unter einem Mikroskop gezählt und der Prozentsatz hiervon auf Grundlage der Anzahl der getesteten Proben wurde beschrieben. Bei der Beurteilung der GUS-Aktivitäten der Hygromycin-resistenten Kalli und Phosphinothricin-resistenten Kalli, von denen angenommen wurde, dass sie nach Selektion transformierte Zellen waren, ebenso wie bei der Beurteilung der GUS-Aktivitäten der transformierten Pflanzen, wurden Teile der resistenten Kalli oder Pflanzen aus diesen ausgeschnitten und dem selben GUS-Färben unterworfen.

(7) Auswahl transformierter Zellen und Regeneration von Pflanzen

[0065] Die unreifen Agrobacterium-infizierten Embryos von Mais wurden auf LSD1,5 Kallus-Wachstumsmedium gezüchtet, das 250 mg/l Cefotaxim und von 0 bis 100 mg/l Hygromycin oder von 0 bis 20 mg/l PPT enthielt, für ungefähr 8 Wochen, um resistente Kalli auszuwählen. Diese resistenten Kalli wurden auf LSZ-Medium angeordnet (das die selbe Zusammensetzung wie das LSD1,5 Kallus-Wachstumsmedium aufwies, außer dass

es 2,4-D nicht enthielt, jedoch 50 mg/l Zeatin enthielt) und bei 25°C unter Beleuchtung kultiviert, wodurch die Kalli regeneriert wurden.

[0066] Die unreifen Reisembryos wurden auf festem Medium 2N6, das 250 mg/l Cefotaxim und 50 mg/l Hygromycin enthielt, für 3 bis 4 Wochen kultiviert, und resistente Kalli wurden ausgewählt. Weiterhin wurden die resistenten Kalli in N6-7 Medium (das anorganische Salze N6, Vitamine N6, 2 g/l Casaminoäure, 1 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l 6BA, 30 g/l Sorbitol, 20 g/l Saccharose und 2 g/l Gelrite umfasste), das 100 mg/l Hygromycin enthielt, für 2 bis 3 Wochen kultiviert, und darauf auf N6S3 Medium zur Regeneration von Pflanzen transplantiert (umfassend 1/2 Konzentrationen von N6 anorganischen Hauptsalzen, N6 anorganischen Nebensalzen, N6 Vitaminen, 1 g/l Casaminoäure, 0,2 mg/l NAA, 1 mg/l Kinetin und 3 g/l Gelrite), das 50 mg/l Hygromycin enthielt. Alle verwendeten Medien enthielten 250 mg/l Cefotaxim.

(8) Expression eingebrachter Gene in Maistransformanten der zweiten Generation

[0067] Die transformierten Pflanzen der ersten Generation, die durch Beimpfung von LBA4404 (pSB131) und Selektion durch PPT erzielt wurden, wurden selbst befruchtet, um Samen der zweiten Generation zu gewinnen. Die Samen wurden ausgesät und Blattstücke wurden von jungen Sämlingen ungefähr 2 Wochen nach dem Aussäen gesammelt. Die Expression des GUS-Gens wurde überprüft. Zusätzlich wurde zu einem Teil der Blätter dieser jungen Sämlinge 500fach verdünntes Basta (ein Herbizid, das PPT als Hauptbestandteil enthält, im Handel erhältlich von HOECHST) aufgebracht und die Resistenz gegenüber PPT wurde 2 Wochen nach der Basta-Aufbringung überprüft. Zusätzlich wurden die transformierten Pflanzen der ersten Generation mit Nicht-Transformanten (Varietät: A188) gekreuzt und unreife Embryos wurden ungefähr 2 Wochen nach dem Kreuzen gesammelt und die gesammelten unreifen Embryos wurden auf LSD1,5-Medium zur Kallus-Induktion angeordnet, das 10 mg/l PPT enthielt. Die unreifen Embryos wurden bei 25°C für 3 Wochen in der Dunkelheit kultiviert und die Resistenz gegenüber PPT wurde auf Grundlage dessen ausgewertet, ob Kalli durch die Kultur gebildet wurden oder nicht. Die transformierten Pflanzen, die durch Beimpfung mit LBA4404 (pTOK233) und Selektion durch Hygromycin erzielt wurden, wurden mit Nicht-Transformanten (Varietät: A188) gekreuzt und die Expression des GUS-Gens in jungen Sämlingen der Pflanzen der zweiten Generation wurde überprüft.

(9) Analyse der eingebrachten Gene durch das Southern-Blot-Verfahren

[0068] Aus den jungen Sämlingen der Maistransformanten der ersten Generation, die durch PPT-Selektion nach Infektion mit dem Stamm LBA4404 (pSB131) gewonnen wurden, und aus den Pflanzen der zweiten Generation wurden DNAs durch das Verfahren von Komari et al. (Komari et al., 1989; Theor. Appl. Genet. 77: 547 bis 552) extrahiert. Die so extrahierten DNAs wurden mit einem Restriktionsenzym BamHI digeriert. Die sich ergebenden Fragmente wurden einer Detektion der eingebrachten Gene durch Southern-Blot-Analyse unter Verwendung des GUS-Gens und des Bar-Gens als Sonden unterworfen. Die Länge der DNA-Region aus dem BamHI-Ort in der T-DNA-Region beim Terminus der L-Grenzsequenz war ungefähr 2,3 kb für das GUS-Gen und ungefähr 2,7 kb für das Bar-Gen (siehe [Fig. 2](#)). Die Southern-Blot-Analyse wurde gemäß der Beschreibung in Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt.

(10) Einbringung eines Gens in Sprossscheitelgewebe von Mais

[0069] Um zu bestätigen, dass die Transformation, die Wachstumspunktgewebe (Sprossscheitelgewebe) verwendet, von denen von Gould et al. berichtet wurde (Gould J. et al., 1991; Plant Physiol. 95: 426 bis 434) erreicht werden kann, wurden isolierte Sprossscheitelgewebe von Mais mit dem oben beschriebenen Agrobacteriumstamm EHA101 (pIG121Hm) behandelt und die GUS-Aktivität der gezüchteten Pflanzen wurde bestimmt. Während eine Expression des GUS-Gens in den Geweben nicht beobachtet wurde, die mit dem Agrobacteriumstamm nicht behandelt wurden, wurde die Expression des GUS-Gens in den Flecken, die mit der Nadel in den Geweben eingestochen wurden, die mit dem Agrobacteriumstamm behandelt wurden, beobachtet. Die durch Kultivieren der Gewebe erzielten Pflanzen wurden bezüglich ihrer GUS-Aktivität getestet. Jedoch zeigte keine Pflanze die GUS-Aktivität. Die Umgebung des Wachstumspunktes ist ein sehr feines Gewebe, so dass es nicht leicht ist, die Nadel in das sehr feine Gewebe einzusteichen, um das Gewebe mit Agrobacterium zu infizieren. Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass die Transformation durch Infizieren der Nachbarschaft des Wachstumspunktes mit Agrobacterium große Fähigkeiten beim Ausschneiden und Durchstechen des Wachstumspunktes etc. erfordern.

Tabelle 1

Einbringung eines Gens in Mais-Sprossscheitelgewebe

Anzahl an Probengeweben	Anzahl an Pflanzen, die gezüchtet wurden	Anzahl an gewonnenen Pflanzen	Anzahl an GUS+ Pflanzen
24	9	2	0
26	8	6	0
17	13	5	0
14	1	0	0
45	14	7	0
32	14	8	0
30	7	1	0

[0070] Die Probenvarietät war in allen Experimenten P3732.

(11) Beimpfung unreifer Maisembryos

[0071] Unreife Embryos verschiedener Varietäten von Mais wurden mit dem Agrobacteriumstamm behandelt. Das GUS-Gen wurde in einem hohen Verhältnis in allen Varietäten von Mais, die getestet wurden, exprimiert. Die Größe des GUS-Gen-exprimierten Ortes in jeder Probe, die getestet wurde, war derart, dass sie visuell klar zu beobachten war. Somit wurde das GUS-Gen in einem breiten Bereich von Zellen exprimiert. Kein Unterschied wurde in der Genexpressionsrate zwischen den Stämmen LBA4404 (pTOK232) und LBA4404 (pSB131) beobachtet. Aus den Ergebnissen wurde geurteilt, dass unreife Maisembryos als mit Agrobacterium mit hoher Effizienz zu infizierende und zu transformierende Materialien geeignet sind.

Tabelle 2

Einbringungseffizienz des GUS-Gens in unreife Maisembryos

Varietät	Stamm	Anzahl an GUS+ Geweben/Anzahl an Probengeweben
----------	-------	--

A188	1	32/32(100)
A188xB73Ht	1	32/32(100)
B73HtxA188	1	76/77(99)
BMSxA188	1	63/63(100)
A188	2	65/66(98)
H84	2	26/30(84)
B37Ht	2	20/20(100)
Mo17Ht	2	24/25(96)
W117Ht	2	15/15(100)
Oh43	2	17/20(85)
H99	2	25/25(100)
W64A Ht rhm	2	10/10(100)
A188xB73Ht	2	34/34(100)
B73HtxA188	2	49/49(100)
BMSxA188	2	59/59(100)
A188	3	15/16(94)
H84xA188	3	20/20(100)
Mo17Ht x A188	3	8/10(80)
Cl03xA188	3	11/11(100)

BMS: Black Mexican Sweet

Stamm 1: EHA101 (pIG121Hm), 2: LBA4404 (pTOK232), 3: LBA4404 (pSB131)

(12) Beimpfung von vorkultivierten unreifen Maisembryos (Vergleichsbeispiel)

[0072] Chan et al. verwendeten unreife Reisembryopflanzen, die für 2 Tage (Dedifferenzierungsbehandlung) auf N₆RD-Medium (umfassend anorganische N₆-Salze, N₆-Vitamine, 30 g/l Saccharose, 2 mg/l 2,4-D, 8 g/l Agarose) vorkultiviert wurden, als die mit Agrobacterium zu transformierenden Materialien (Chan M.T. et al., 1993; Plant Mol. Biol. 22: 491 bis 506). Um zu bestätigen, ob das Verfahren nach Chan et al. effektiv ist oder nicht, wurden auch im Fall der Verwendung unreifer Embryos von Maispflanzen unreife Maisembryos (Varietät: A188), die auf LSD1,5-Medium zur Kallus-Induktion für 2 Tage vorkultiviert wurden, versuchsweise mit Agrobacterium transformiert. Die Beimpfung und die Kultur in Gegenwart von Agrobacterium wurde in der selben Weise, wie oben erwähnt, durchgeführt. Der Agrobacteriumstamm, der verwendet wurde, war LAB4404 (pSB131). Als Kontrolle wurden unreife Embryos der selben Maisvarietät dem selben Test unmittelbar nach der Sammlung unterworfen. Bei 3 Tagen nach der Cokultivierung mit Agrobacterium wurden die unreifen Embryos der beiden Testgruppen einer GUS-Färbung unterworfen. Als Ergebnis wurden fast alle unreifen Embryos, die getestet wurden, unmittelbar nachdem sie gesammelt wurden, gefärbt, wohingegen keiner der unreifen Embryos, der getestet wurde, nach der Vorkultur gefärbt war (siehe Tabelle 3). Diese Ergebnisse zeigen klar, dass eine Transformation von Mais nicht erreicht werden kann, wenn vorkultivierte unreife Maisembryos verwendet werden.

Tabelle 3

Einbringungseffizienz des GUS-Gens in vorkultivierte unreife Maisembryos

Unreife Embryos	Anzahl Probengewebe	Anzahl von GUS+ Geweben
Vorkultiviert für 2 Tage	21	0
Unmittelbar nach Sammlung	20	19

(13) Identifizierung transformierter Maiszellen

[0073] Kalli, die auf einem Medium selektiert wurden, das 30 mg/l oder 50 mg/l Hygromycin enthielt, und von denen auf einem Medium, das 75 mg/l Hygromycin enthielt, verifiziert wurde, dass sie eine Hygromycin-Resistenz aufwiesen, wurden einem GUS-Färben mit dem Ergebnis unterworfen, dass alle Kalli das GUS-Gen exprimierten. Die DNA, die aus diesen Kalli gemäß des Verfahrens von Komari et al. extrahiert wurden (Komari et al., 1989; Theor. Appl. Genet. 77: 547 bis 552), wurden als Matrize verwendet, um eine Polymerase-Kettenreaktion durchzuführen (PCR), unter Verwendung von Primern, die dazu in der Lage waren das GUS-Gen (5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAAC-3', 5'-ATGGTGCGCCAGGAGAGTTG-3') zu amplifizieren. Die Reaktion wurde unter Verwendung von 1 µl der DNA-Lösung. Eines Gemisches der beiden Primer von jeweils 5 pM, jeweils 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, eines PCR-Puffers (im Handel erhältlich von TAKARA SHUZO) und 2,5 U Amplitaq DNA-Polymerase (im Handel erhältlich von TAKARA SHUZO) durchgeführt, wobei das Gesamtvolumen des Gemisches 100 µl betrug. 30 Umläufe der Reaktion wurden gemäß des folgenden Temperaturprofils für einen Umlauf wiederholt: d.h., das Temperaturprofil für einen Zyklus der Reaktion umfasste 94°C für 1 min, 55°C für 2 min und dann 72°C für 3 min, alle in einem DNA-THERMOCYCLER (im Handel erhältlich von PARKIN ELMER CETUS CORP.). Das PCR-Produkt wurde durch Elektrophorese auf einem 0,7% Agarosegel abgetrennt. Wenn die aus den Kalli extrahierte, nicht mit dem Agrobacterium infizierte DNA als Matrize verwendet wurde, wurden keine amplifizierten DNA-Fragmente nachgewiesen; wohingegen, wenn die aus LBA4404 (pTOK232) extrahierte DNA oder die aus den Kalli mit der Hygromycin-Resistenz extrahierte DNA als Matrize verwendet wurde, ein amplifiziertes Fragment von 1,8 kbp, gefärbt mit Ethidiumbromid, durch Elektrophorese nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde eine PCR durch Verwendung von Primern durchgeführt, die zum Amplifizieren der 795 pb-Region mit dem VirG-Startcodon des Agrobacteriums (5'-GACGTT-TATGAAGTAGGCGAGA-3', 5'-TAAAAACGCGAGGAGAAGATTG-3') zu amplifizieren. Wenn LBA4404 (pTOK232) als Matrize verwendet wurde, wurde ein amplifiziertes Fragment von 0,8 kbp nachgewiesen; wohingegen, wenn die DNA aus den resistenten Kalli extrahiert wurde und die DNA, die aus den Kalli extrahiert wurden, die nicht mit dem Agrobacterium infiziert waren, als Matrizen verwendet wurden, keine amplifizierten Fragmente nachgewiesen wurden. Es wird aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung gezogen, dass die Expression des GUS-Gens in allen Kalli mit der Hygromycin-Resistenz sich nicht aus dem Agrobacterium ergab, das an die Kalli anhaftete, sondern sich aus dem eingebrachten GUS-Gen ergab und dass die kompakten und nodalen Kalli, die den Medien gezüchtet wurden; schrittweise erhöhte Konzentrationen an Hygromycin aufwiesen, Transformanten waren.

(14) Selektion transformierter Maispflanzen

[0074] Nach Cokultivierung mit dem Agrobacterium wurden Hygromycin-resistente oder PPT-resistente Kalli auf Medien selektiert, die von 30 bis 100 mg/l Hygromycin oder von 5 bis 20 mg/l PPT enthielten. In der ersten Hygromycin-Selektion wurden Hygromycin-resistente Kalli aus 11 bis 27% der unreifen Embryos gewonnen; wohingegen in der letzteren PPT-Selektion PPT-resistente Kalli aus 35 bis 64% der unreifen Embryos gewonnen wurden (siehe Tabellen 4 und 6). Diese Kalli wurden auf Regenerationsmedium angeordnet, das Hygromycin oder PPT enthielt, wonach die Pflanzen in einer hohen Frequenz regeneriert wurden. Die Blätter der regenerierten Pflanzen wurden durch GUS-Färbung gefärbt, was eine Expression des GUS-Gens in vielen der Pflanzen zur Folge hatte (siehe Tabelle 5 und 6).

[0075] Diese Daten zeigen, dass diese Pflanzen transformierte Pflanzen waren. Die Häufigkeit der transformierten Pflanzen war insbesondere bei der Selektion mit PPT hoch und es existierte eine geringe Differenz zwischen den Experimenten, wobei sich immer unabhängige transformierte Pflanzen aus 10% oder mehr der getesteten unreifen Embryos ergaben (siehe Tabelle 6). Die Ergebnisse legen nahe, dass das Verfahren, das in diesen Experimenten verwendet wird, ein stabiles Transformationsverfahren ist, das zur Erzeugung von Transformanten in einer hohen Frequenz in der Lage ist. Als nächstes wurden PPT-resistente Kalli, die unter den selben Bedingungen von der Beimpfung bis zur Vermehrung der Kalli kultiviert und selektiert wurden, auf

Regenerationsmedium angeordnet, das eine hohe Konzentration (20 mg/l) von PPT enthielt, und auf einem Regenerationsmedium, das PPT nicht enthielt, um die GUS-Expression zu überprüfen. In den Pflanzen, die auf dem Medium regeneriert wurden, das PPT enthielt, war die Anzahl chimärer Pflanzen und von Ausreißern (GUS-) klein. Dies verifiziert den Selektionseffekt, der durch den Zusatz von PPT während der Regeneration erzielt wurde (siehe Tabelle 7).

Tabelle 4

Transformationsleistung unreifer Maisembryos durch Hygromycin-Selektion

Experiment	Verfahren der Hygromycin-Selektion (mg/l)	Anzahl Hygromycin-resistenter Kalli/ Anzahl unreifer Probenembryos (%)
1	0-30 - 50	5/22(23)
2	0-30 - 50	6/22(27)
3	0-30 - 100	2/19(11)

[0076] Für die Hygromycin-Selektion wurden die Kalli mit dem Agrobacterium kokultiviert und daraufhin weiter in Gegenwart von Hygromycin jeweils für 2 bis 3 Wochen kultiviert, das die angegebenen Konzentrationen aufwies.

Tabelle 5

Selektionseffizienz von Transformanten in der Hygromycin-Selektion

Experiment	Anzahl von Hygromycin-resistenter Kalli	Anzahl regenerierter Kalli	Anzahl von GUS + Pflanzen
1	64	11	5
2	15	8	7
3	20	3	2

Tabelle 6

Transformationsleistung durch PPT-Selektion

Experiment	Anzahl an unreifen Probenembryos	Anzahl an gewachsenen unreifen Embryos	Anzahl an regenerierten unreifen Embryos	Anzahl an GUS+ Pflanzen (%)
1	364	200 (55)	71 (20)	44 (12)
2	121	42 (35)	31 (26)	20 (17)
3	68	28 (41)	17 (25)	9 (13)
4	44	28 (64)	9 (20)	6 (14)

[0077] Die Anzahl der unreifen Embryos und die Anzahl der Pflanzen in dieser Tabelle sind solche, die Klonen nicht einschließen.

Tabelle 7

Einfluss von PPT, zugesetzt zum Regenerationsmedium, auf die Frequenz der Regeneration und Transformation

Zugesetztes PPT	Anzahl an Proben-Kalli	Anzahl an regenerierten Kalli	Frequenz von GUS-gefärbten Pflanzen in regenerierten Pflanzen		
			GUS+	Chimären	GUS-
+	714	335(47)	74	17	9
-	350	184(53)	40	33	27

[0078] Konzentration an zugesetztem PPT + : 20 mg/l, – : 0 mg/l

(15) Southern-Blot-Analyse eingebrachter Gene in Maistransformaten der ersten Generation

[0079] Gesamt-DNA, extrahiert aus der Transformante, wurde mit BamHI verdaut, um DNA-Fragmente zu gewinnen. Diese DNA-Fragmente wurden einer Southern-Blot-Analyse unter Verwendung eines Bar-Gens oder GUS-Gens als einer Sonde unterworfen, um das eingebrachte Gen in den Transformaten der ersten Generation nachzuweisen. Als Ergebnis wurde die Existenz des eingebrachten Gens in allen getesteten Transformaten beobachtet, wenn jedes der Gene als Sonde verwendet wurde. Die Zahl der Kopien der eingebrachten Gene war eine oder mehrere. Das BamHI-Fragment, das das Bar-Gen im Plasmid pSB131 aufwies, wies 2,7 kb auf und das BamHI-Fragment, das das GUS-Gen im Plasmid pSB131 aufwies, wies 2,3 kb auf, wohingegen alle getesteten Transformaten jeweils eine Bande zeigten, die ungefähr 3 kb oder mehr war. Diese Ergebnisse unterstützen die Einbringung eines Bar-Gens und eines GUS-Gens in die Pflanzenchromosomen. Weiterhin variierte die Länge der nachgewiesenen DNA-Fragmente abhängig von ihrem Ursprung. Dies zeigt an, dass die Gene in unterschiedlichen Regionen in die Maischromosomen eingefügt wurden. Es wurde deswegen bestätigt, dass die nachgewiesenen DNA-Fragmente nicht aus den Bakterien stammten, die in den Pflanzen zurückblieben.

Tabelle 8

Anzahl der Kopien eingebrachter Gene in Transformanten der ersten Generation, bestimmt durch Southern-Blot-Analyse

Transformante (erste Generation)	Anzahl der Kopien der eingebrachten Gene	
	Bar	GUS
Kontrolle	-	-
Transformante 1	2	2
2a	2	1
2b	2	1
3	2	1
4a	2	1
4b	2	1
5	2	2
6	3	1
7	2	1
8	2	2
9a	1	1
9b	1	1
10	1	1

(16) Expression eines eingebrachten Genes in Maistransformanten der zweiten Generation, in die pTOK233 eingebracht wurde

[0080] Blätter von Pflanzen der zweiten Generation, die durch Kreuzen der durch Hygromycin-Selektion mit Nicht-Transformanten gewonnenen Transformanten erzielt wurden, wurden GUS gefärbt. Das Verhältnis von GUS-positiven Pflanzen zu GUS-negativen Pflanzen betrug ungefähr 1:1 wie erwartet (Tabelle 9).

Tabelle 9

Expression eingebrachter Gene in Maistransformanten der zweiten Generation, erzielt durch Hygromycin-Selektion

Transformante	Anzahl an Pflanzen der zweiten Generation	
	Expression von GUS	
	Positiv	Negativ
Kontrolle	0	5
Transformante 11	4	5
Transformante 12	5	6

(17) Expression eingebrachter Gene in Maispflanzen der zweiten Generation, in die pSB131 eingebracht wurde

[0081] Blätter nicht transformierter Pflanzen wurden GUS-gefärbt und alle von diesen waren negativ, wohingegen alle Blätter der Transformanten der zweiten Generation, die durch Selbstbefruchtung der Transformanten erzielt wurden, außer einer Transformante GUS-positiv waren. Weiterhin wurde Basta auf die Blätter eingebracht. Als Ergebnis starben alle Blätter nicht transformierter Pflanzen ungefähr in 2 Wochen, wohingegen die Blätter der Transformanten gesund waren, außer die GUS-negative Pflanze (Tabelle 10). Sowohl die Expression des GUS-Gens als auch die Resistenz gegenüber PPT zeigte eine genetische Segregation gemäß einer Zwei-Faktor-Segregation. Weiterhin wurden unreife Embryos, gesammelt aus den nicht transformierten Pflanzen, auf einem PPT-enthaltenden Medium kultiviert. Als Resultat wurde das Wachstum der Embryos gehemmt und keine Kalli wurden induziert. Im Gegensatz hierzu wurden bei den unreifen Embryos beider Linien, gesammelt aus den R₀-Pflanzen, die durch Kreuzen der Transformanten und der Nicht-Transformanten gewonnen wurden, Kalli aus ungefähr 5% der unreifen Embryos induziert, die angeordnet wurden, und die Kalli wuchsen gut auf dem selben Medium (Tabelle 11). Die gewachsenen Kalli waren GUS-gefärbt. Als Folge wurde in allen Kalli der gesamte Kallus blau gefärbt.

Tabelle 10

Expression eingebrachter Gene in Maistransformanten der zweiten Generation, erzielt durch PPT-Selektion (getestet an jungen Sämlingen)

Transformante	Anzahl der Kopien		Anzahl Pflanzen der zweiten Generation			
			Resistenz gegenüber PPT		GUS	
	Bar	GUS	Resistent	Empfindlich	Positiv	Negativ
Kontrolle	-	-	0	50	0	50
Transformant 21	2	2	49	1	49	1

Tabelle 11

Expression von in Maistransformanten der zweiten Generation eingebrachten Genen, die durch PPT-Selektion erzielt wurden (getestet an unreifen Embryos)

Transformante	Anzahl an unreifen Embryos der zweiten Generation	
	Resistenz gegenüber PPT	
	Resistent	Empfindlich
Kontrolle	0	76
Transformante 31	29	32
Transformante 32	22	25

(18) Southern-Blot-Analyse eingebrachter Gene in Mais der zweiten Generation, in den pSB131 eingebracht wurde

[0082] DNAs wurden aus Pflanzen der zweiten Generation extrahiert, die durch Selbstbefruchtung der Transformante Nummer 21, dargestellt in Tabelle 10, gewonnen wurden, und der Nachweis der eingebrachten Gene wurde durch Southern-Blot-Analyse in der selben Weise, wie oben erwähnt, versucht. In allen Pflanzen, außer der Pflanze, die GUS-negativ und PPT-empfindlich war, wurden die eingebrachten Gene nachgewiesen, wenn jedes der Gene als Sonde verwendet wurde (Tabelle 12). Die Anzahl der Kopien des Bar-Gens und des GUS-Gens in den Pflanzen, in denen die Existenz des eingebrachten Gens bestätigt wurde, waren identisch und die Länge jeder Bande war mit derjenigen identisch, die in der Pflanze der ersten Generation nachgewiesen wurde. Aus diesen Ergebnissen wurde bestätigt, dass die in Mais durch Anwendung von Agrobacterium eingebrachten Gene gemäß des Verfahrens der vorliegenden Erfindung in die Kerne der Pflanzen eingebracht

und stabil gemäß den Mendel'schen Gesetzen an die nächste Generation weitervererbt wird.

Tabelle 12

Anzahl an Kopien eingebrachter Gene in Transformanten der zweiten Generation, bestimmt durch Southern-Blot-Analyse

Transformante (zweite Generation)	Anzahl an Kopien eingebrachter Gene	
	Bar	GUS
Kontrolle	-	-
21-1	1	1
-2	2	2
-3	1	1
-4	1	1
-5	0	0
-6	1	1
-7	1	1
-8	2	2
-9	1	1
-10	2	2
-11	1	1

(19) Beimpfung von unreifen Reisembryos mit Agrobacterium

[0083] Eine Expression des GUS-Gens in hoher Rate wurde ebenfalls in unreifen Reisembryos beobachtet, in die das GUS-Gen eingebracht wurde, wie in den unreifen Maisembryos, die das GUS-Gen aufwiesen. Insbesondere wurde die Expression des GUS-Gens in einer hohen Effizienz beobachtet, wenn der Stamm LBA4404 (pSB131), der den binären Super-Vektor aufwies, verwendet wurde (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13

Effizienz der Einbringung des GUS-Gens in unreife Reisembryos

Stamm	Anzahl GUS+ Gewebe/Anzahl behandelter Gewebe (%)
Nicht-Behandlung	0/ 50 (0)
EHA101 (pIG121Hm)	66/198 (33)
LBA4404 (pTOK232)	52/ 52 (100)

[0084] Die in diesem Experiment verwendeten binären Vektoren verursachten keine Expression des GUS-Gens in den Zellen des Agrobacteriums. Auf Grundlage des GUS-Gens in den unreifen Reisembryos, die mit dem Agrobacterium als Index cokultiviert wurden, wurde verifiziert, dass die Agrobacteriumzellen zum Einbringen des Gens in Zellen von Mais und Reis von Nutzen sind.

(20) Selektion transformierter Reispflanzen

[0085] Unreife Reisembryos, die mit dem Agrobacterium infiziert wurden, wurden einer Selektion Hygromy-

cin-resistenter Kalli in einem Medium ausgesetzt, dass 50 mg/l Hygromycin enthielt. Als Folge wurden die resistenten Kalli in einer hohen Rate gewonnen, wenn der Stamm, der einen binären Super-Vektor aufwies, verwendet wurde (siehe Tabelle 14). Die so selektierten Kalli erzeugten regenerierte Pflanzen einfach, nachdem sie auf ein Pflanzenregenerierendes Medium transferiert wurden, das den Selektionsmarker enthielt (siehe Tabelle 14). Die Blätter der regenerierten Pflanzen wurden bezüglich der GUS-Expression darin überprüft mit dem Ergebnis, dass das GUS-Gen in allen regenerierten Pflanzen exprimiert wurde. Diese Daten zeigten, dass die regenerierten Pflanzen transformierte Pflanzen waren. Der Agrobacteriumstamm EHA101 (pIG121Hm) wies eine Virulenz-Region von supervirulenten pTiBo542 auf, wies jedoch keinen binären Super-Vektor auf. Die von Chan et al. verwendeten Stämme waren von der selben Art. Deswegen erzielten sie, wie die Ergebnisse dieses Beispiels, eine extrem geringe Transformationseffizienz (Chan M.T. et al., 1993; Plant Mol. Biol., 22: 491 bis 506). Das vorliegende Beispiel hat klargestellt, dass die Verwendung der Stämme mit einem binären Super-Vektor die Produktion der transformierten Pflanzen aus den unreifen Reisembryos in einer drastisch erhöhten Effizienz zur Folge hat.

Tabelle 14

Ergebnisse der Selektion von Transformanten auf unreifen Reisembryos

Stamm	Anzahl an Geweben (%)			Arzneistoff, der zur Selektion verwendet wurde
	Probe des unreifen Embryos	Resistente Kalli	Kalli, aus denen Pflanzen regeneriert wurden	
Nicht-Behandlung	40	0 (0)	0 (0)	HYG
EHA101 (pIG121Hm)	71	3 (4)	1 (1)	HYG
LBA4404 (pTOK232)	77	23 (30)	17 (22)	HYG

HYG: Hygromycin

(21) Identifikation eines Gens, das in transformierte Reispflanzen eingebracht wurde

[0086] Um das Vorliegen des eingebrachten Gens zu untersuchen, wurden 3 zufällige und unabhängig transformierte Pflanzen, die durch Behandlung unreifer Reisembryos mit dem Stamm LBA4404 (pTOK232) gewonnen wurden, einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unterworfen. Die beiden Enden ihrer strukturellen Regionen wurden als Primer für das GUS-Gen und das HPT-Gen verwendet. Die DNA der Nicht-Transformante und eine Plasmid-DNA, die jeweils die GUS- und HPT-Gene aufwies, wurden als Kontrolle verwendet. Als Folge ergaben die 3 Transformanten, die durch die Behandlung mit LBA4404 (pTOK232) gewonnen wurden, ein amplifiziertes Fragment von 1,1 kb des HPT-Gens, wie solche aus dem Kontrollplasmid. Alle Transformanten, die das GUS-Gen aufwiesen, ergaben ebenfalls ein amplifiziertes Fragment aus 1,8 kb, wie solche aus dem Kontrollplasmid. Jedoch ergaben Nicht-Transformanten diese Fragmente nicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle Probenpflanzen, die in diesem Experiment getestet wurden, transformierte Pflanzen sind, bei denen das Gen durch das Agrobacterium eingebracht wurde.

Industrielle Anwendbarkeit

[0087] Wie oben erwähnt, ist das Verfahren der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zum Transformieren von Monocotyledonen, mit dem die für die Transformation bis zur Regeneration von Pflanzen erforderliche Zeitspanne verkürzt wird, die im allgemeinen auf die Pflanzen angewendet wird, bei denen kein Verfahren zur Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten existiert, das keiner speziellen Vorrichtungen bedarf und bei dem die Herstellung des Materials, das verwendet werden muss, einfach ist. Deswegen kann die vorliegende Erfindung auf die Züchtung von Monocotyledonen-Pflanzen angewendet werden, die die erwünschten Eigenschaften aufweisen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Transformieren von Monocotyledonen, umfassend das Transformieren des Scutellums

eines unreifen Embryos eines Monocotyledonen mit einem Bakterium der Gattung *Agrobacterium*, welches ein gewünschtes Gen enthält, wobei der unreife Embryo keiner Dedifferenzierungsbehandlung unterzogen wurde, um eine Transformante zu erhalten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Monocotyledone eine Pflanze der Familie der Gramineae ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die zur Familie der Gramineae gehörende Pflanze Mais ist.
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die zur Familie der Gramineae gehörende Pflanze Reis ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der unreife Embryo der Transformation ohne Vorbehandlung, in welcher der unreife Embryo mit einem Enzym behandelt oder verletzt wird, unterzogen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Monocotyledone Mais ist und der unreife Embryo einer Transformation ohne Vorbehandlung, in welcher der unreife Embryo mit einem Enzym behandelt oder verletzt wird, unterzogen wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Scutellum des unreifen Embryos nach der Transformation dedifferenziert wird und die transformierten Zellen ausgewählt werden und wachsen, während sie im dedifferenzierten Status sind.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei Transformanten mit normaler Fertilität regeneriert werden aus den transformierten Zellen, die ausgewählt wurden und wachsen, während sie im undifferenzierten Zustand sind.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Bakterium zur Gattung *Agrobacterium* gehört, welches ein Ti-Plasmid oder Ri-Plasmid enthält und es ein Plasmid mit einem DNA-Fragment, welches aus der Virulenz-Region eines Ti-Plasmids pTiBo542 von *Agrobacterium tumefaciens*, aufweist.
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 9, wobei das zur Gattung *Agrobacterium* gehörende Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das zur Gattung *Agrobacterium* gehörende und zur Transformation eingesetzte Bakterium eine Zellpopulation von 10^6 bis 10^{11} Zellen / ml besitzt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der unreife Embryo sich im Zustand von nicht weniger als zwei Tagen nach der Pollination befindet.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Scutellum des unreifen Embryos in der Lage ist, einen Callus mit der Fähigkeit zu induzieren, eine normale Pflanze zu regenerieren.
14. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei das kultivierte Gewebe, welches aus dem unreifen Embryo zur Selektion, zum Wachsen und zur Dedifferenzierung dedifferenziert wurde, ein Callus ist, der aus dem Scutellum eines unreifen Embryos stammt.
15. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der unreife Embryo aus einer Inzucht, aus der F1 zwischen Inzuchten, aus der F1 zwischen einer Inzucht- und natürlich bestäubten Sorte, oder aus kommerziell erhältlichen F1-Sorten stammt.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

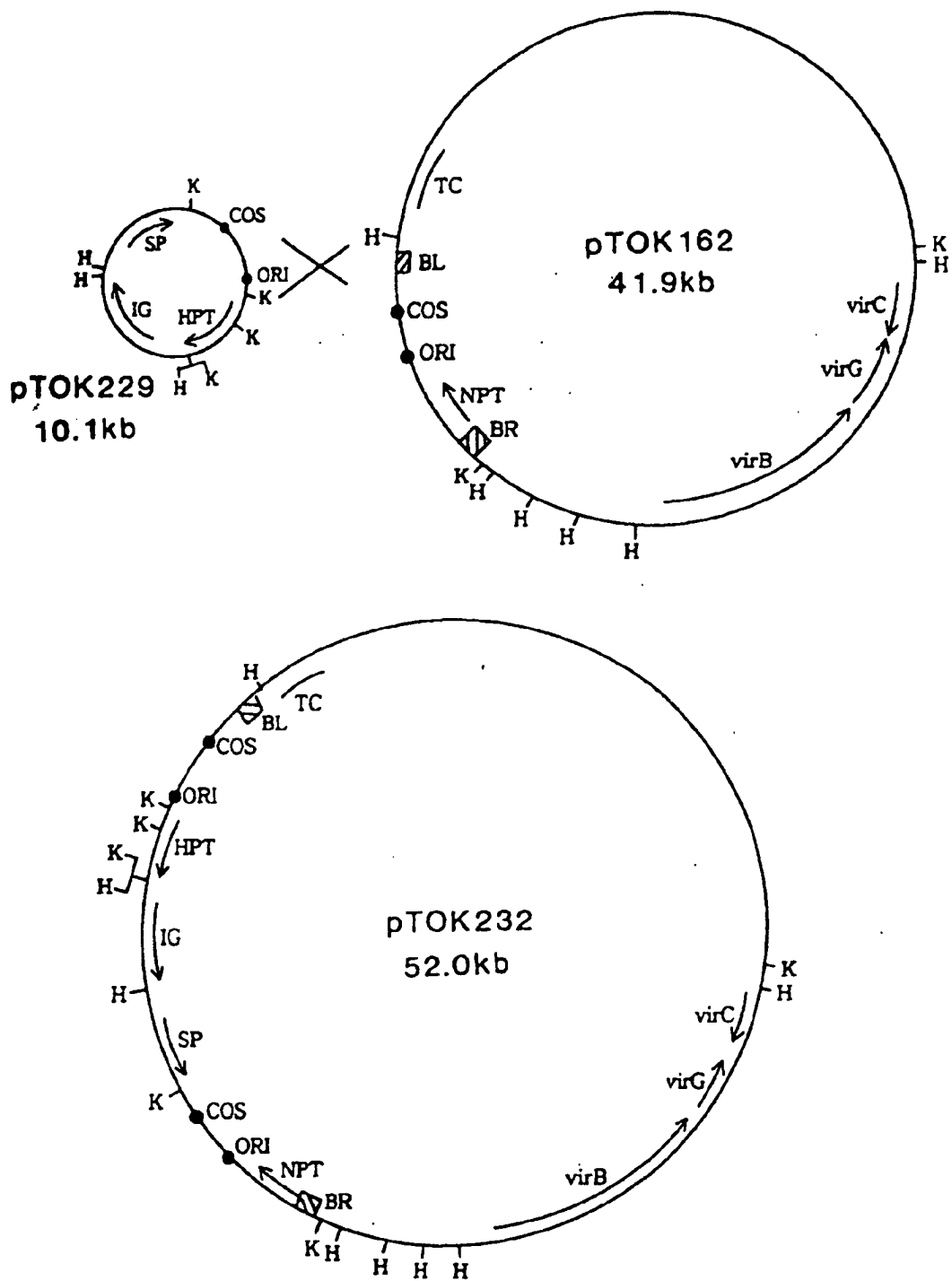


Fig. 1

