

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880010908.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月17日

[11] 公开号 CN 101652481A

[22] 申请日 2008.1.31

[21] 申请号 200880010908.3

[30] 优先权

[32] 2007.2.2 [33] US [31] 60/887,828

[86] 国际申请 PCT/US2008/052563 2008.1.31

[87] 国际公布 WO2008/097791 英 2008.8.14

[85] 进入国家阶段日期 2009.9.29

[71] 申请人 先锋高级育种国际公司

地址 美国依阿华州

共同申请人 纳幕尔杜邦公司

[72] 发明人 M·E·威廉斯

W·J·戈登一卡姆

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 权陆军 付磊

权利要求书2页 说明书37页

[54] 发明名称

二倍体胚的选择性切除

[57] 摘要

公开了选择单倍体胚的方法。提供了在植物上产生单倍体胚和不能生活的二倍体胚的方法。提供了用于选择由单倍体诱导玉蜀黍系产生的单倍体胚的方法。公开了用于产生改良的玉蜀黍单倍体诱导系的方法。公开了包含引起切除或异常的二倍体胚的转基因的玉蜀黍单倍体诱导系。

1. 一种就单倍体胚进行选择的方法，其包括：

a) 用来自玉蜀黍单倍体诱导系的花粉给第一种玉蜀黍植物授粉，以产生胚，其中所述玉蜀黍单倍体诱导系包含胚表达的致死多核苷酸、非传播花粉多核苷酸、和阻止所述胚表达的致死多核苷酸的致死性的胚表达的抑制剂多核苷酸；

b) 产生单倍体胚和不能生活的二倍体胚；和

c) 选择单倍体玉蜀黍胚。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述胚表达的致死多核苷酸是芽孢杆菌 RNA 酶，且所述胚表达的抑制剂多核苷酸是芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述胚表达的抑制剂多核苷酸抑制所述胚表达的致死多核苷酸的转录。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述胚表达的抑制剂基因是 tet 阻遏物多核苷酸，且所述胚表达的致死多核苷酸具有所述 tet 阻遏物与之结合的启动子。

5. 一种开发转化的玉蜀黍单倍体诱导系的方法，其包括下述步骤：

a) 通过用第一个和第二个表达盒转化来自玉蜀黍诱导系的细胞而获得转化的细胞，其中所述第一个表达盒包含胚表达的致死多核苷酸，且其中所述第二个表达盒包含非传播花粉多核苷酸和阻止所述胚表达的致死多核苷酸的致死性的胚表达的抑制剂多核苷酸；

b) 由所述转化的细胞再生转化的植物；

c) 使所述转化的植物自交，以获得转化的玉蜀黍单倍体诱导系。

6. 权利要求 5 的玉蜀黍单倍体诱导系。

7. 一种转基因玉蜀黍单倍体诱导系，其包含第一个和第二个表达盒，其中所述第一个表达盒包含对于胚致死的多核苷酸，且其中所述第二个表达盒不通过花粉传递，且包含抑制对于胚致死的所述多核苷酸的致死性的多核苷酸。

8. 权利要求 7 的转基因玉蜀黍单倍体诱导系，其中对于胚致死的所述多核苷酸是芽孢杆菌 RNA 酶多核苷酸，且抑制对于胚致死的所述多核苷酸的致死性的所述多核苷酸是芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂多核苷酸。

9. 权利要求 7 的转基因玉蜀黍单倍体诱导系，其中对于胚致死的所述多核苷酸包含 *lec1* 启动子。

10. 权利要求 7 的转基因玉蜀黍单倍体诱导系, 其中所述第二个盒包含抑制花粉传播的  $\alpha$ -淀粉酶多核苷酸。

11. 权利要求 10 的转基因玉蜀黍单倍体诱导系, 其中所述  $\alpha$ -淀粉酶多核苷酸包含 PG47 启动子。

12. 权利要求 7 的转基因玉蜀黍单倍体诱导系, 其中所述第一个表达盒包含操纵子, 且所述第二个表达盒包含阻遏物多核苷酸。

13. 权利要求 12 的转基因玉蜀黍单倍体诱导系, 其中所述操纵子是 tet 操纵子, 且所述阻遏物多核苷酸是 tet 阻遏物。

14. 一种在植物上产生单倍体胚和不能生活的二倍体胚的方法。

15. 权利要求 14 的方法, 其中在所述植物上的单倍体胚的百分比是至少 3%。

16. 一种选择单倍体胚的方法, 其包括用诱导玉蜀黍系给玉蜀黍植物授粉, 和产生单倍体胚和不能生活的二倍体胚, 其中单倍体胚的选择在包含所述胚的种子成熟时发生。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述单倍体胚的选择直至授粉后约 21 天发生。

18. 权利要求 16 的方法, 其中所述单倍体胚的选择在授粉后约 7 天到授粉后约 15 天发生。

19. 一种转基因玉蜀黍单倍体诱导系, 其包含第一个和第二个表达盒, 其中; 所述第一个表达盒包含芽孢杆菌 RNA 酶多核苷酸, 其与 *lec1* 启动子可操作地连接且对于胚是致死的, 且其中; 所述第二个表达盒包含芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂多核苷酸, 其抑制对于胚致死的所述多核苷酸的致死性, 且其中, 所述第二个表达盒还包含与 PG47 启动子可操作地连接的  $\alpha$ -淀粉酶多核苷酸, 其中与 PG47 启动子可操作地连接的所述  $\alpha$ -淀粉酶多核苷酸的表达不允许花粉传播。

## 二倍体胚的选择性切除

### 发明

本发明涉及植物育种和植物生物技术领域。

### 发明背景

纯合植物对于植物的产品开发和商业化是基础的。为了获得纯合植物，需要几代自花传粉和分离分析。这是劳动力和时间的无效使用。因此开发一种方法是有用的，以减少获得纯合植物通常所需的人工授粉步骤，且减少获得植物的纯合群体所需的时间量。无需多代自花传粉而获得纯合植物的一种方法是产生单倍体，且然后使染色体加倍以形成双单倍体（doubled haploid）。帮助选择单倍体胚且消除二倍体胚的方法将增加双单倍体产生的效率。

### 发明概述

提供了通过阻止二倍体胚的生长用于鉴定单倍体的方法。提供了用于鉴定单倍体植物、种子、胚和植物细胞的方法。提供了用于产生单倍体诱导系（inducer line）的方法和单倍体诱导系。

### 发明详述

单倍体植物具有单组（基因组）染色体，并且单倍体植物中减少的染色体数目（ $n$ ）等于配子中的那种。

二倍体植物具有2组（基因组）染色体，并且染色体数目（ $2n$ ）等于合子中的那种。

单倍体细胞是具有单个基因组的细胞，雄性或雌性。

双单倍体或双单倍体植物或细胞是通过单倍体染色体组加倍发展的那种。得自自交任何代数的双单倍体植物的植物或种子仍可以鉴定为双单倍体植物。双单倍体植物视为纯合植物。如果植物是能育的，那么它视为双单倍体的，即使植物的整个营养部分并非由具有双染色体组的细胞组成。例如，如果植物包含有生活力的配子，那么它将视为双单倍体植物，即使它是嵌合的。

“单倍体胚”定义为在来自花粉粒的一个精核与胚囊中的极核融合以产生三倍体(3N)胚乳后形成的胚,并且胚无需雄性基因组的贡献而形成。

“未成熟的单倍体胚”定义为在来自花粉粒的一个精核与胚囊中的极核融合以产生三倍体(3N)胚乳后以及干透(dry down)前形成的胚。并且胚无需雄性基因组的贡献而形成。

“双单倍体胚”是具有包含2组纯合染色体的一个或多个细胞的胚。

“愈伤组织”指去分化的增殖细胞或组织团块。

短语“接触”、“与……接触”或“置于与……接触”可以用于意指“直接接触”或“间接接触”。例如,包含加倍试剂的介质可以与单倍体细胞直接接触,或包含加倍试剂的介质可以通过滤纸、植物组织或其他细胞与单倍体细胞分开,因此加倍试剂通过滤纸或细胞转移给单倍体细胞。

术语“介质”包括以液态、气态或固态的化合物。

如本文所使用的,术语“植物”包括提及全植物、植物器官(例如,叶、茎、根等)、种子和植物细胞及其后代。如本文所使用的,“植物细胞”包括但不限于,种子、悬浮培养物、胚、分生组织区域、愈伤组织、叶、根、枝条、配子体、孢子体、花粉和小孢子。

单倍体诱导系包含;1)花粉致死性多核苷酸或非传播花粉多核苷酸,2)胚致死性多核苷酸,和3)胚致死性阻遏物。

花粉致死性多核苷酸或非传播花粉多核苷酸指阻止花粉完成受精的任何多核苷酸。花粉非传播最有效,如果它在减数分裂后或配子体阶段时发生的话。非传播花粉多核苷酸可以通过各种机制发挥作用。它可以例如通过表达毒性化合物来阻止花粉有生活力。

胚致死性多核苷酸是阻止胚的正确发育或促使胚不能生活的任何多核苷酸。胚致死性多核苷酸可以减缓胚的生长,从而使得人们可能将携带胚致死性多核苷酸的胚与不携带胚致死性多核苷酸的胚区分开。

胚致死性阻遏物是当表达时,促使胚致死性多核苷酸无效且允许有生活力的胚发育的任何多核苷酸。这可以通过各种机制来达到。例如胚致死性阻遏物可以使由胚致死性多核苷酸表达的分子去毒。可以表达例如通过蛋白质-蛋白质相互作用抑制另一种蛋白质的致死性的胚阻遏物蛋白。胚阻遏物可以发挥作用的另一个途径是制止或阻止胚致死性多核苷酸的表达,例如通过表达与致死性多核苷酸的启动子结合且阻断一些

或全部表达的分子。可以在系统中使用的另一个例子是基因沉默。例如，胚阻遏物可以通过基因沉默阻止胚致死多核苷酸起作用的多核苷酸。

胚致死性多核苷酸和胚致死性阻遏物多核苷酸不限于仅在胚中表达。基因可以在其他组织中表达。如果胚致死性多核苷酸不在胚乳中表达，从而使得单倍体种子可以正常发育，那么这更有效。关于该方法最佳发挥作用的另一个考虑是胚致死性多核苷酸表达应由胚致死性阻遏物多核苷酸的表达匹配。在多核苷酸一起遗传的任何时候，胚致死性阻遏物多核苷酸都应以制止胚致死性多核苷酸的负面效应的水平表达。

一般地，非传播花粉多核苷酸和胚致死性阻遏物在发育的诱导系中连锁。它们可以紧密连锁。最方便的是非传播花粉多核苷酸和胚致死性阻遏物应彼此邻近，例如在相同构建体上。为了有效结果，非传播花粉多核苷酸和胚致死性阻遏物将一起分离。再一般地，非传播花粉多核苷酸和致死性阻遏物连锁，但在与胚致死性多核苷酸不同的位置处。为了有效结果，胚致死性多核苷酸将与非传播花粉多核苷酸和胚致死性阻遏物分离。为了最大效率，胚致死性多核苷酸不与非传播花粉多核苷酸和胚致死性阻遏物连锁。

发育的诱导系可以包含或不包含选择标记。它可以或不使用其为选择标记的转基因进行发育。

下文描述了用于产生诱导系的一般组分。构建体 A 包含非传播花粉多核苷酸和胚致死性阻遏物、以及选择标记基因。构建体 B 包含选择标记基因和胚致死性基因。为了促进在授粉后的分离，2 种构建体可以位于基因组的 2 个不同位置处。为了进一步的效率，构建体 A 和构建体 B 应不连锁。

构建体 A 和 B 可以共转化到诱导系内，或转化过程可以顺次完成，最方便的是构建体 A 首先和构建体 B 其次。起始  $T_0$  诱导植物将是对于 2 种构建体——A 和 B 是杂合的。这种植物的自花传粉的预期结果在表 1 中给出。

将构建体引入诱导系内的另一个途径是使它们杂交或育种到诱导系内。例如，构建体 A 和 B 可以共转化到植物内，然后育种到诱导系内。为了系统在植物中是最有效的，胚致死阻遏物需要与胚致死多核苷酸一起呈现。因此，人们可以用包含胚致死阻遏物多核苷酸的构建体转化，以获得稳定转化的细胞，且然后用包含胚致死多核苷酸的构建体转化。

表 1。在 2 个分离基因座处共转化的  $T_0$  植物的自花传粉（基因型  $(A-B-)$ ）。 $T_0$  植物产生是可能的，因为胚致死和胚致死阻遏物在体细胞胚和胚发生愈伤组织中表达。包含构建体 A 的花粉是不能生活或无法传播的。包含构建体 B 但无构建体 A 的胚是不能生活的，这是由于胚致死基因而无胚致死阻遏物基因的表达。 $A-BB$  基因型将具有 2 个剂量的胚致死基因和 1 个剂量的胚阻遏物基因。因此为了最大效率，单个阻遏物多核苷酸的表达应处于将阻止 2 个剂量的胚致死多核苷酸的致死性的水平。

构建体 A = 非传播花粉 + 胚致死阻遏物 + 选择标记基因“a”

构建体 B = 胚致死 + 选择标记“b”

		雄配子			
雌配子		AB	A-	-B	--
	AB	花粉的不传播	花粉的不传播	A-BB 存活胚	A-B-存活胚
	A-	花粉的不传播	花粉的不传播	A-B-存活胚	A---存活胚但对选择标记试剂 b 敏感
	-B	花粉的不传播	花粉的不传播	--BB 胚致死	--B-胚致死
	--	非传播花粉	非传播花粉	--B-胚致死	----存活胚但对选择标记 (a 和 b) 试剂敏感

因为将存在不含 2 个构建体的存活胚，所以不包含 2 个构建体的胚或来自不包含 2 个构建体的胚的植物可以通过使组织与选择剂接触而针对其进行选择。如果选择标记是视觉标记或一些其他类型的标记，那么这也可以观察到，并且可以针对不包含 2 种标记的组织进行选择。可以使用任何类型的选择标记。其余植物将对于 2 种构建体是杂合的  $(A-B-)$ ，或对于构建体 A 是杂合的和对于构建体 B 是纯合的  $(A-BB)$ 。 $A-B-$  基因型自交的结果将导致如先前表 1 可见的后代。 $A-BB$  基因型自交的结果将产生仅对于构建体 B 纯合的基因型。因此所有后代将具有选择标记

b. 这是所需基因型 A-BB。对于 2 种构建体杂合的植物将产生不包含选择标记 b 的一些后代。由 A-BB 基因型自交所产生的后代在表 2 中描述。

表 2。具有 A-BB 基因型的 T<sub>1</sub> 植物的自花传粉。来自自交 A-BB 植物的所有存活后代将是 A-BB 植物。

		雄配子	
		AB	-B
雌配子	AB	花粉的不传播	A-BB 存活胚
	-B	花粉的不传播	--BB 胚致死

所需基因型 A-BB 产生唯一一种存活花粉基因型 -B。当这种转基因诱导系作为雄性与野生型雌性杂交时，这将导致所有二倍体胚的切除，表 3。然而，母源单倍体胚不遗传来自父本的胚致死并且因此是存活的。母源单倍体不包含来自构建体 A 或构建体 B 的转基因。

即使母源单倍体胚不遗传来自父本的 DNA，但携带胚致死基因的花粉将具有一个精核，所述精核与胚囊中的极核融合，以产生三倍体 (3N) 胚乳。因此胚致死基因无法在胚乳或糊粉中表达；或如果它在这些细胞中表达，那么它将不杀死单倍体胚。

表 3。具有基因型 A-BB 的单倍体诱导系与野生型雌性系 ---- 的杂交。包含构建体 A 的花粉和包含构建体 B 的胚是不能生活的，这是由于胚致死而无胚致死阻遏物的表达。二倍体遗传来自雄性的构建体 B 且是不能生活的。母源单倍体不遗传构建体 B 且是存活的。正常发育的任何母源胚将是单倍体的。

		雄配子 (诱导系)		
		AB	-B	无雄性贡献
雌配子 (野生型)	--	花粉的不传播	胚致死	--母源单倍体

无需任何选择标记也可以产生诱导系的发育。它还可以使用在任一构建体上的唯一一种选择标记或用在 2 种构建体上的相同选择标记来产生。人们可以使用本领域技术人员已知的任何数目的技术来追踪转基因且就转基因进行育种。例如后代测试、PCR、分子标记或 ELISA 可以用

于追踪转基因。还可以使用技术的任何组合。例如，如果第一种构建体 = 花粉不传播 + 胚致死阻遏物，和第二种构建体 = 胚致死性，那么定量 PCR 可以用于测定何种后代包含何种构建体且以何种剂量，纯合状态或杂合状态。

本发明的另一种方法包括用在一种构建体上的花粉不传播和胚致死阻遏物基因以及在第二种构建体上的选择标记基因共转化。在获得转化的组织后，第二次共转化可以用胚致死和第二种选择标记来进行。在转基因植物发育后，选择标记可以与其他转基因分离开。

可以利用以化学应用或接触充当胚致死阻遏物的另一种方法。如果化学制品可以用于阻遏胚致死多核苷酸，那么人们可能获得仅具有构建体 B 的植物。例如，人们可以将构建体转化到 2 种不同植物内，然后使 2 种构建体育种到诱导系内。阻遏胚致死性的化学制品将必须用于用构建体 B 转化的植物，直至 2 种构建体都包含在相同植物中。人们随后就包含 2 种分离构建体 A 和 B 的诱导系进行选择。通过回交的性状整合是本领域众所周知的。

单倍体诱导系统已开发用于各种植物，以产生单倍体组织、植物和种子。单倍体诱导系统通过使所选择的系（作为雌性）与诱导系杂交可以由任何基因型产生单倍体植物。用于玉蜀黍的此种诱导系包括但不限于，Stock 6 和 Stock 6 衍生物 (Coe, 1959, *Am. Nat.* 93: 381-382; Sarkar 和 Coe, 1966, *Genetics* 54: 453-464; Sarkar 等人, 1972, *Development of maternal-haploidy-inducer lines in maize (Zea mays L.)* *Indian J. Agric. Sci.* 42: 781-786; Lashermes 和 Beckert, 1988, *Genetic control of maternal haploidy in maize (Zea mays L.) and selection of haploid inducing lines.* *Theor. Appl. Genet.* 76: 405-410; Chalyk, S.T. 1994, *Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding.* *Euphytica* 79; 13-18; Bordes, J.R. 等人, 1997, *Haploidization of maize (Zea mays L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding.* *Agronomie* 17: 291-297; Eder J. 和 S. Chalyk, 2002, *In vivo haploid induction in maize.* *Theor. Appl. Genet.* 104: 703-708) RWS (Rober, Gordillo 和 Geiger, 2005, *Maydica* 50 (2005) 275-283), KEMS (Deimling, Roeber 和 Geiger, 1997, *Vortr. Pflanzenzuchtg* 38: 203-224), 或 KMS 和 ZMS (Chalyk, Bylich & Chebotar, 1994, *MNL* 68:

47; Chalyk & Chebotar, 2000, Plant Breeding 119: 363-364), 和不定配子体 (ig) 成熟 (Kermicle 1969 Science 166: 1422-1424)。所述参考文献的公开内容引入本文作为参考。

远缘杂交也可以用于产生单倍体。在大麦中, 这种方法有时称为 *bulbosum* 法 (Kasha 和 Kao, 1970, Nature 225: 874-876)。这种单倍体产生方法由于来自授粉亲本的染色体的消除而发生。

当诱导系用于给二倍体植物授粉时, 获得单倍体胚。来自花粉的一个精核与胚囊中的极核融合, 以产生三倍体 (3N) 胚乳。三倍体胚乳将包含来自雌性的 2 组染色体和来自雄性的 1 组染色体, 所述雄性在这种情况下是诱导系。单倍体胚包含单组染色体, 其衍生自雌性植物。

在单倍体玉蜀黍的开发中, *Rnj* 是用于成熟种子的单倍体/二倍体筛选的常用等位基因 (Nanda 和 Chase, 1966. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L). Crop Sci. 6: 213-215; Greenblatt 和 Bock, 1967. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. J. Hered. 58: 9-13)。R-nj 表达水平已显示与仁成熟参数相关 (Alexander 和 Cross, 1983, Grain fill characteristics of early maize (*Zea mays* L) strains selected for variable R-nj expression, Euphytica 32: 839-844.)。最近, 也已使用 *R-scm2* (Kato A., 2002, Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. Plant breeding 121: 370-377; 和 Kato A., 2003, Chromosome doubling method, U.S. Publication 2003/0005479)。

用于在成熟种子阶段时区分单倍体和二倍体的 R-nj 花青苷标记基因直至胚发育晚期才表达。为了鉴定在较早阶段时的单倍体组织, 单倍体胚可以使用转基因标记 *lec1-GFP* 进行鉴定, 其存在于诱导系中。*lec1-GFP* 的使用是有价值的, 因为该基因允许人们在胚发育早期时鉴定非单倍体胚 (美国申请 09/718,754, 美国专利 6,486,382)。GFP 标记表达的不存在用于鉴定单倍体胚。尽管单倍体胚可以在早期阶段时进行鉴定, 但 GFP 系统需要劳动力密集的筛选方法, 以确定何种胚表达 GFP 标记以及何种胚不表达 GFP 标记。致死标记在诱导系中的使用将仅允许单倍体胚形成且因此消除关于较不有效的筛选方法的需要。这种系统将增加双单倍体方法的效率。

各种类型的系统可以在诱导系中使用, 以增加双单倍体方法的效

率：1) 毒性/解毒剂系统，2) 转录调节物系统；3) 基因沉默系统。

可以利用的毒性/解毒剂系统的例子是芽孢杆菌 RNA 酶 (Barnase) /芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂 (Barstar) 系统。芽孢杆菌 RNA 酶是由解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 产生的细胞外核糖核酸酶的名称。芽孢杆菌 RNA 酶的抑制剂称为芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂，并且由分泌芽孢杆菌 RNA 酶的共同生物细胞内产生。芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂的功能是保护解淀粉芽孢杆菌不受细胞内芽孢杆菌 RNA 酶的毒性作用，从而使得它无活性 (Hartley, R.W. (1989) Barnase and barstar: Two small proteins to fit and fold together. Trends Biochem. Sci. 14: 450-454)。这两种基因已得到克隆且测序 (Hartley, R.W. (1988) Barnase and barstar: Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. J. Mol. Biol. 202: 913-915)。已显示芽孢杆菌 RNA 酶表达对于植物细胞是致死的，并且芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂可以保护植物细胞不受芽孢杆菌 RNA 酶的作用 (Mariani 等人, (1990) Induction of male-sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. Nature 347: 737-741; Mariani 等人 (1992) A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature 357: 384-387; Beals, T.P.和 Goldberg, R.B.(1997) A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. Plant Cell 9: 1527-1545; Williams 等人,(1997) Male sterility through recombinant DNA technology. In Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement, K.R. Shivanna 和 V.K. Sawhney, 编辑 (Cambridge, UK: Cambridge University Press) 第 237-257 页)。转基因通过花粉的传递可以通过使转基因与花粉致死性基因连接得到阻止，所述花粉致死性基因由在花粉特异性 (配子体) 启动子控制下的细胞毒性基因组 (Twell (1995) Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. Protoplasma 187: 144-154; Williams 等人, (1997) Male sterility through recombinant DNA technology. In Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement, K.R. Shivanna 和 V.K. Sawhney, 编辑 (Cambridge, UK: Cambridge University Press) 第 237-257 页)。这种类型的构建体可以得到维持，因为它通过雌性传递。许多花粉特异性启动子已得到鉴定。本发明的其他实施方案包括将制止花药生存力的构建

体和将阻止存活花粉传播的任何构建体。芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂抑制芽孢杆菌 RNA 酶蛋白质在单倍体诱导系中的功能 (RNA 酶)。二倍体胚被切除, 因为芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂 PTU (植物转录单位) 与花粉不传播 PTU 连锁, 并且因此不存在于二倍体胚中以抑制芽孢杆菌 RNA 酶。芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂系统可以通过使芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂基因的编码区最优化得到改善。人们还可以通过增加芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂对于芽孢杆菌 RNA 酶的亲和力来最优化该系统。改善该系统的其他方法包括使芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂的表达增加超过芽孢杆菌 RNA 酶的表达水平, 从而使得表达水平是例如芽孢杆菌 RNA 酶表达水平的约 1.5X、2X、或至少 3X。人们可以使芽孢杆菌 RNA 酶由胚优选启动子例如 *lec1* 调节, 并且可以使芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂由组成型启动子例如 *Ubi* 调节。人们还可以添加内含子, 例如 *Adh* 内含子, 或添加增强子, 例如 35S 增强子, 以增加表达。在表达毒性产物的多核苷酸中可能需要内含子以用于阻止毒性产物在土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 中的表达的目的。

存在可以利用的转录调节系统的许多例子 (Ramos 等人 “The tetr family of transcriptional repressors” (2005) *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 第 69 卷 (2): 326-356)。调节物家族的一些例子在表 4 中指出。

表 4. 调节物家族

家族	作用	调节的功能的例子	DNA 结合基序	位置
LysR	激活物/阻遏物	碳和氮代谢	螺旋-转角-螺旋	N 末端
AraC/XylS	激活物	碳代谢, 应激应答和发病机理	螺旋-转角-螺旋	C 末端
TetR	阻遏物	抗生素的生物合成, 流出泵, 渗透胁迫等	螺旋-转角-螺旋	C 末端
LuxR	激活物	细胞密度感受, 生物合成和代谢等	螺旋-转角-螺旋	C 末端
LacI	阻遏物	碳源利用	螺旋-转角-螺旋	N 末端
ArsR	阻遏物	金属抗性	螺旋-转角-螺旋	中央
IcIR	阻遏物/激活物	碳代谢, 流出泵	螺旋-转角-螺旋	N 末端
MerR	阻遏物	抗性和解毒作用	螺旋-转角-螺旋	N 末端
AsnC	激活物/阻遏物	氨基酸生物合成	螺旋-转角-螺旋	N 末端
MarR	激活物/阻遏物	多重抗生素抗性	螺旋-转角-螺旋	中央
NtrC (EBP)	激活物	氮同化作用, 芳族氨基酸合成, 鞭毛, 分解代谢途径, 噬菌体应答等	螺旋-转角-螺旋	C 末端
OmpR	激活物	重金属和毒力	翼状螺旋	C 末端
DeoR	阻遏物	糖代谢	螺旋-转角-螺旋	N 末端
冷激	激活物	低温抗性	RNA 结合结构域 (CSD)	可变的
GntR	阻遏物	一般代谢	螺旋-转角-螺旋	N 末端
Crp	激活物/阻遏物	全局应答, 分解代谢阻遏和无氧生活	螺旋-转角-螺旋	C 末端

可以用于在发育早期鉴定单倍体的充分研究的调节物系统是 tet 阻遏物系统。四环素操纵子系统包含阻遏物和操纵基因元件。操纵子系统受四环素的存在控制,并且自我调节 *tetA* 和 *tetR* 基因的表达水平。*tetA* 的产物从细胞中去除四环素。*tetR* 的产物是这样的阻遏蛋白,其在不存在四环素的情况下以约 10 pM 的  $K_d$  与操纵基因元件结合,从而阻断 *tetA* 和 *tetR* 的表达。TET 阻遏物可以就玉蜀黍进行最优化,并且用于终止胚发育的启动子可以用 TET 操纵基因序列进行修饰。

可以用于在发育早期鉴定单倍体的系统的另一个例子利用 lac 阻遏物系统 (Ulmasov 等人 (1997) *Plant Mol Biol* 35-417-424; Wilde 等人 (1992) *EMBO J* 11: 1251-1259)。这种基于阻遏物/操纵基因的系统衍生自原核操纵子,大肠杆菌 (*E. coli*) 乳糖操纵子。这种系统通过将操纵基因序列置于基因的转录起始位点附近来控制启动子的活性,从而使来自操纵子的基因表达在阻遏蛋白与其关联操纵基因序列结合后得到抑制。然而,在诱导剂的存在,阻遏物与其操纵基因的结合得到抑制,从而激活启动子且使得基因能够表达。在 lac 系统中,异丙基-B-D-硫代吡喃型半乳糖苷 (IPTG) 是常用的诱导剂,而四环素和/或多西环素 (doxycyline) 是用于 tet 系统的常用诱导剂。lac 阻遏物已得到广泛表征。lac 阻遏物具有关于其操纵基因的高结合常数,并且 IPTG 使阻遏物对于操纵基因的亲和力减少 300 倍 (Barkley & Bourgeois (1980) *The Operon*, Miller & Reznikoff, 编辑, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 第 177-220 页), 使用乳糖阻遏物已报告了仅 30 倍的阻遏 (Ulmasov 等人 (1997) *Plant Mol Biol* 35-417-424)。lac 阻遏物可以是玉蜀黍最优化的,并且用于终止胚发育的启动子可以用 lac 操纵基因序列进行修饰。

基因沉默也可以在二倍体胚系统的选择性切除中使用。胚致死性的阻遏可以在 RNA 或蛋白质阶段时,例如反义 RNA、发夹和用于基因沉默的其他机制。例如,人们可以具有由强启动子例如 UBI 驱动的芽孢杆菌 RNA 酶发夹多核苷酸。这种包含发夹的构建体可以与不允许花粉受精的构建体连接。另一种构建体可以包含由 *lec1* 启动子驱动的芽孢杆菌 RNA 酶多核苷酸。这将有效关闭芽孢杆菌 RNA 酶直至发夹基因座分离。阻止胚的正常发育的任何多核苷酸连同相应的基因沉默构建体可以在该系统中使用。

在本发明中可以由花粉启动子驱动且用于阻止能育花粉的基因的例子包括 DAM (GenBank J01600, *Nucleic Acids Res.* 11: 837-851 (1983));  $\alpha$ -淀粉酶 (GenBank L25805, *Plant Physiol.* 105 (2): 759-760 (1994)); D8 (*Physiol. Plant* 100 (3): 550-560 (1997)); SacB (*Plant Physiol.* 110 (2): 355-363 (1996)), 脂肪酶和核糖核酸酶; tasselseed2 (ts2) (Calderon-Urrea M. 和 S.L. Dellaporta (1999) *Development* 126: 435-441); 白喉毒素 A (DTA) (Greenfield 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 6853 (1983); Palmiter 等人, *Cell* 50: 435 (1987))。

可以使用的花粉特异性启动子的例子包括但不限于 PG47 (Rogers 等人 (1991), *Pollen specific cDNA clones from Zea mays*, *Biochem. Biophys. Acta* 1089, 411-413.; Allen, R.L. 和 Lonsdale, D.M. (1992) *Sequence analysis of three members of the maize polygalacturonase gene family expressed during pollen development*, *Plant Mol. Biol.* 20, 343-345, Allen, R.L. 和 Lonsdale, D.M. (1993), *Molecular characterization of one of the maize polygalacturonase gene family members which are expressed during late pollen development*. *The Plant Journal* 3, 261-271, 美国专利 5,412,085 和美国专利 5,545,546); 玉蜀黍花粉特异性基因 Zm13 (Hamilton 等人 (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 211-218; Guerrero 等人 (1993) *Mol. Gen. Genet.* 224: 161-168); 小孢子特异性启动子例如 apg 基因启动子 (Twell 等人, *Sex. Plant Reprod.* 6: 217-224 (1993)); 进一步包括向日葵花粉表达的基因 SF3 (Baltz 等人 (1992) *The Plant Journal* 2: 713-721), 欧洲油菜 (*B. napus*) 花粉特异性基因 (Arnoldo 等人 (1992) *J. Cell. Biochem*, Abstract No. Y101204)。此种启动子是本领域已知的或可以通过已知技术发现; 参见例如, Bhalla 和 Singh (1999) *Molecular control of male fertility in Brassica* *Proc. 10<sup>th</sup> Annual Rapeseed Congress*, Canberra, Australia; van Tunen 等人 (1990) *Pollen-specific chi promoters from petunia: tandem promoter regulation of the chiA gene*, *Plant Cell* 2: 393-40; Jeon 等人 (1999); 和 Twell 等人 (1993) *Activation and developmental regulation of an Arabidopsis anther-specific promoter in microspores and pollen of Nicotiana tabacum*, *Sex. Plant Reprod.* 6: 217-224。

花粉启动子和可以与它们一起用于阻止存活花粉的多核苷酸的许

多例子可以在美国专利 6,743,968 和美国公开 2005/0246796 (美国申请号 11/014,071) 中发现。

其启动子与早期种子和胚发育相关的谷类基因包括 *lec1* (美国专利 7,122,658)、稻谷蛋白 ("GluA-3," Yoshihara 和 Takaiwa, 1996, *Plant Cell Physiol* 37: 107-11; "GluB-1," Takaiwa 等人, 1996, *Plant Mol Biol* 30: 1207-21; Washida 等人, 1999, *Plant Mol Biol* 40: 1-12; "Gt3," Leisy 等人, 1990, *Plant Mol Biol* 14: 41-50)、稻谷醇溶蛋白 (*prolamin*) (Zhou & Fan, 1993, *Transgenic Res* 2: 141-6)、小麦谷醇溶蛋白 (Hammond- Kosack 等人, 1993, *EMBO J* 12: 545-54)、玉蜀黍玉米醇溶蛋白 (Z4, Matzke 等人, 1990, *Plant Mol Biol* 14: 323-32)、和大麦 B-hordeiis (Entwistle 等人, 1991, *Plant Mol Biol* 17: 1217-31)。“种子优选的”启动子包括“种子特异性”启动子 (在种子发育过程中有活性的那些启动子, 例如种子贮藏蛋白的启动子) 以及“种子萌发”启动子 (在种子萌发过程中有活性的那些启动子)。参见 Thompson 等人 (1989) *BioEssays* 10: 108。此种种子优选的启动子包括但不限于, *Cim1* (细胞分裂素诱导的信使)、*cZ19B1* (玉蜀黍 19 kDa 玉米醇溶蛋白)、*mi1ps* (肌醇-1-磷酸合酶); 参见 WO 00/11177 和美国专利号 6,225,529。 $\gamma$ -玉米醇溶蛋白是胚乳特异性启动子。球蛋白-1 (*Glob-1*) 是代表性胚特异性启动子。玉蜀黍 *Glb1* 基因编码球蛋白-1, 主要胚贮藏蛋白。(Kriz, A. L., 等人 (1986) *Plant Physiol.* 82: 1069-1075) *Glb1* 在胚发育过程中在发育中的玉蜀黍种子中表达。(Belanger, F. C., 等人 (1989) *Plant Physiol.* 91: 636-643) *Glb1* 的启动子区已得到鉴定、克隆且通过土壤杆菌属介导的转化引入烟草植物内。(Liu, S., 等人 (1996) *Plant Cell Reports* 16: 158-162) 转化植物证实 *Glb1* 启动子具有所需时间和组织特异性。*Glb1* 启动子由脱落酸 (ABA) 正调节。(Kriz, A. L., 等人 (1990) *Plant Physiol.* 92: 538-542; Paiva, R., 等人, (1994) *Planta* 192: 332-339) 植物激素 ABA 的水平已知在冷或脱水的条件下波动。(Himmelbach, A., 等人 (1998) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 353: 1439- 1444) 因此, *Glb1* 启动子的活性可以差别地受影响。来自双子叶植物的种子特异性启动子包括但不限于, 豆  $\beta$ -菜豆蛋白、油菜籽蛋白、 $\beta$ -伴大豆球蛋白 ( $\beta$ -conglycinin)、大豆凝集素、十字花科蛋白 (*cruciferin*) 等。来自单子叶植物的种子特异性启动子的更多例子包括但不限于, 玉蜀黍 15

kDa 玉米醇溶蛋白; 22 kDa 玉米醇溶蛋白; 27 kDa 玉米醇溶蛋白 (Boronat, A., Martinez, M.C., Reina, M., Puigdomenech, P.和 Palau, J r.; Isolation and sequencing of a 28 kD glutelin-2 gene from maize: Common elements in the 5' flanking regions among zein and glutelin genes; *Plant Sci.* 47: 95-102 (1986) );  $\gamma$ -玉米醇溶蛋白; waxy (Kloesgen, R.B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z.S.和 Saedler, H., Molecular analysis of the waxy locus of *Zea mays*, *Mol. Gen. Genet.* 203: 237-244(1986) ); shrunken 1; shrunken 2 (Shaw 等人, *Plant Phys* 98: 1214-1216, 1992; Zhong Chen 等人, *PNAS USA* 100: 3525- 3530, 2003) ); 球蛋白 1; mZE40-2, 也称为 Zm-40, 美国专利 6,403,862; ltp2 启动子 (Kalla, 等人, *Plant Journal* 6: 849-860 (1994) ); 美国专利号 5,525,716) 、 cim1 启动子 (参见美国专利号 6,225,529) ; nuc1c (美国专利号 6,407,315) ; 等。还参见 WO 00/12733 和美国专利号 6,528,704, 其中公开了来自 end1 和 end2 基因的种子优选的启动子。另外的胚特异性启动子公开于 Sato 等人 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8117-8122 (稻同源异形框, OSH1) ; 和 Postma-Haarsma 等人 (1999) *Plant Mol. Biol.* 39: 257-71 (稻 KNOX 基因) 中。另外的胚乳特异性启动子公开于 Albani 等人 (1984) *EMBO* 3: 1405-15; Albani 等人 (1999) *Theor. Appl. Gen.* 98: 1253-62; Albani 等人 (1993) *Plant J.* 4: 343-55; Mena 等人 (1998) *The Plant Journal* 116: 53-62 (大麦 DOF) ; Opsahl-Ferstad 等人 (1997) *Plant J* 12: 235-46 (玉蜀黍 ESR) ; 和 Wu 等人 (1998) *Plant Cell Physiology* 39: 885-889 (稻 GluA-3、GluB-1、NRP33、RAG-1) 中。

组成型启动子的例子包括根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的 1'-或 2'-启动子 (参见例如 O'Grady (1995) *Plant Mol. Biol.* 29: 99-108) 。其他植物启动子包括核酮糖-1,3-二磷酸羧化酶小亚基启动子、菜豆蛋白启动子、醇脱氢酶 (Adh) 基因启动子 (参见例如, Millar (1996) *Plant Mol. Biol.* 31: 897-904) 、蔗糖合酶启动子、 $\alpha$ -微管蛋白启动子、肌动蛋白启动子, 例如鼠耳芥属 (*Arabidopsis*) 肌动蛋白基因启动子 (参见例如, Huang (1997) *Plant Mol. Biol.* 1997 33: 125-139) 、cab、PEPCase、R 基因复合体、来自鼠耳芥属的 ACT11 (Huang 等人 *Plant Mol. Biol.* 33: 125-139 (1996) ) 、来自鼠耳芥属的 Cat3 (Zhong 等人, *Mol. Gen. Genet.* 251: 196-203 (1996) ) 、编码来自欧洲油菜 (*Brassica*

*napus*) 的硬脂酰-酰基载体蛋白质去饱和酶的基因 (Solocombe 等人 (1994) *Plant Physiol.* 104: 1167-1176)、来自玉蜀黍的 GPC1 (Martinez 等人 (1989) *J. Mol. Biol.* 208: 551-565)、来自玉蜀黍的 Gpc2 (Manjunath 等人 (1997), *Plant Mol. Biol.* 33: 97-112)、和本领域技术人员已知的来自各种植物基因的其他转录起始区。还参见 Holtorf (1995) "Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*," *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646。还可以使用来自 E8 基因 (参见 Deikman 和 Fischer (1988) *EMBO J* 7: 3315) 和其他基因的启动子序列, 连同对于单子叶物种特异的启动子 (例如, McElroy D., 等人 (1994.) *Foreign gene expression in transgenic cereals*, *Trends Biotech.* 12: 62-68)。其他组成型启动子包括例如, Rsyn7 启动子的核心启动子以及 WO 99/43838 和美国专利号 6,072,050 中公开的其他组成型启动子; 核心 CaMV 35S 启动子 (Odell 等人 (1985) *Nature* 313: 810-812); 稻肌动蛋白 (McElroy 等人 (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); 泛蛋白 (Christensen 等人 (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 和 Christensen 等人 (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last 等人 (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten 等人 (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730); ALS 启动子 (美国专利号 5,659,026) 等。此外, 其他组成型启动子包括例如, 美国专利号 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; 5,608,142; 和 6,177,611。

除本文指出的启动子外, 在植物中发挥作用的细菌起源的启动子也可以在本发明中使用。它们包括例如章鱼碱合酶启动子、胭脂碱合酶启动子和衍生自 Ti 质粒的其他启动子。参见, Herrera-Estrella 等人 (1983) *Nature* 303: 209。还可以使用病毒启动子。病毒启动子的例子包括花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35S 和 19S RNA 启动子。参见, Odell 等人, (1985) *Nature* 313: 810; 和 Dagless (1997) *Arch. Virol.* 142: 183-191。来自感染植物的病毒的组成型启动子的其他例子包括烟草花叶病毒的启动子; 花椰菜花叶病毒 (CaMV) 19S 和 35S 启动子或玄参花叶病毒的启动子, 例如玄参花叶病毒 35S 启动子 (参见例如, Maiti (1997) *Transgenic Res.* 6: 143-156) 等。可替代地, 具有有用特征的新启动子可以通过本领域已知的方法包括序列分析、增强子或启动子捕获等由任何病毒、细菌或

植物来源进行鉴定。

组织优选的(组织特异性)启动子和增强子可以用于在特定植物组织内靶向增强的基因表达。组织优选的(组织特异性)启动子包括例如,下述参考文献中描述的那些: Yamamoto 等人(1997) *Plant J.* 12(2): 255-265; Kawamata 等人(1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7): 792-803; Hansen 等人(1997) *Mol. Gen Genet.* 254(3): 337-343; Russell 等人(1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehart 等人(1996) *Plant Physiol.* 112(3): 1331-1341; Van Camp 等人(1996) *Plant Physiol.* 112(2): 525-535; Canevascini 等人(1996) *Plant Physiol.* 112(2): 513-524; Yamamoto 等人(1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5): 773-778; Lam(1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181-196; Orozco 等人(1993) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka 等人(1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20): 9586-9590; 和 Guevara-Garcia 等人(1993) *Plant J.* 4(3): 495-505。若需要,此种启动子可以进行修饰,以用于更弱的表达或更强的表达。组织特异性启动子可以驱动可操作地连接的序列在除靶组织外的组织中表达。因此,如本文所使用的,组织特异性启动子是驱动优先在靶组织中的表达,但也可以导致在其他组织中的一定表达的启动子。

在某些实施方案中,可以使用叶特异性启动子,例如来自 C4 植物(玉蜀黍)的丙酮酸、正磷酸二激酶(PPDK)启动子,来自玉蜀黍的 cab-m1 Ca<sup>2+</sup> 启动子,鼠耳芥(*Arabidopsis thaliana*) myb 相关基因启动子(Atmyb5),核酮糖二磷酸羧化酶(RBCS)启动子(例如,番茄 RBCS1、RBCS2 和 RBCS3A 基因,其可以在叶和光生长的幼苗中表达,而 RBCS1 和 RBCS2 在发育中的番茄果实中表达,和/或核酮糖二磷酸羧化酶启动子,其几乎专一地在叶片和叶鞘中在叶肉细胞中以高水平表达等等)。参见例如, Matsuoka 等人,(1993) *Tissue-specific light-regulated expression directed by the promoter of a C4 gene, maize pyruvate, orthophosphate dikinase, in a C3 plant, rice, PNAS USA* 90(20): 9586-90; (2000) *Plant Cell Physiol.* 41(1): 42-48; (2001) *Plant Mol. Biol.* 45(1): 1-15; Shiina, T. 等人,(1997) *Identification of Promoter Elements involved in the cytosolic Ca<sup>2+</sup> mediated photoregulation of maize cab- m1 expression, Plant Physiol.* 115: 477-483; Casal(1998) *Plant Physiol.* 116:

1533-1538; Li (1996) *FEBS Lett.* 379: 117-121; Busk (1997) *Plant J.* 11: 1285-1295; 和 Meier (1997) *FEBS Lett.* 415: 91-95; 和 Matsuoka (1994) *Plant J.* 6: 311-319。其他叶特异性启动子包括, 例如, Yamamoto 等人 (1997) *Plant J.* 12(2): 255-265; Kwon 等人 (1994) *Plant Physiol.* 105: 357-67; Yamamoto 等人 (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5): 773-778; Gotor 等人 (1993) *Plant J.* 3: 509-18; Orozco 等人 (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6): 1129-1138; 和 Matsuoka 等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20): 9586-9590。

在某些实施方案中, 可以使用衰老特异性启动子 (例如, 在果实成熟、叶衰老和脱落过程中有活性的番茄启动子, 编码半胱氨酸蛋白酶的基因的玉蜀黍启动子, 等)。参见例如, Blume (1997) *Plant J.* 12: 731-746; Griffiths 等人, (1997) *Sequencing, expression pattern and RFLP mapping of a senescence-enhanced cDNA from Zea Mays with high homology to oryzain gamma and aleurain, Plant Mol. Biol.* 34(5): 815-21; *Zea mays partial see1 gene for cysteine protease, promoter region and 5' coding region*, Genbank AJ494982; Kleber-Janke, T. 和 Krupinska, K. (1997) *Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions, Planta* 203(3): 332-40; 和 Lee, R H 等人, (2001) *Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes, J. Exp. Bot.* 52(358): 1117-21。

根优选的启动子是已知的, 并且可以选自根据参考文献的可用的许多启动子或从各种相容物种中从头分离。参见例如, Hire 等人 (1992) *Plant Mol. Biol.* 20(2): 207-218 (大豆根特异性谷氨酰胺合成酶基因); Keller 和 Baumgartner (1991) *Plant Cell* 3(10): 1051-1061 (在菜豆的 GRP 1.8 基因中的根特异性控制元件); Sanger 等人 (1990) *Plant Mol. Biol.* 14(3): 433-443 (根癌土壤杆菌的甘露碱合酶 (MAS) 基因的根特异性启动子); 和 Miao 等人 (1991) *Plant Cell* 3(1): 11-22 (编码胞质谷氨酰胺合成酶 (GS) 的全长 cDNA 克隆, 其在大豆的根和根瘤中表达)。还参见 Bogusz 等人 (1990) *Plant Cell* 2(7): 633-641, 其中描述了从血红蛋白基因中分离的 2 种根特异性启动子, 所述血红蛋白基因来自固氮非豆科植物 *Parasponia andersonii* 和相关非固氮非豆科植物

山黄麻 (*Trema tomentosa*)。这些基因的启动子与  $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶报道基因连接, 并且引入非豆科植物烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的和豆科植物百脉根 (*Lotus corniculatus*) 内, 并且在 2 种情况下, 根特异性启动子活性得到保留。Leach 和 Aoyagi (1991) 描述了他们的发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 的高度表达的 rolC 和 rolD 根诱导基因的启动子分析 (参见 *Plant Science* (Limerick) 79 (1): 69-76)。他们得出如下结论, 增强子和组织优选的 DNA 决定子在这些启动子中解离。Teeri 等人 (1989) 使用与 lacZ 的基因融合, 以显示编码章鱼碱合酶的土壤杆菌属 T-DNA 基因在根尖的表皮中尤其有活性, 并且 TR2' 基因在完整植物中是根特异性的, 并且受叶组织中的创伤刺激 (参见例如, *EMBO J.* 8 (2): 343-350)。与 nptII (新霉素磷酸转移酶 II) 融合的 TR1' 基因显示相似特征。另外的根优选的启动子包括 VtENOD-GRP3 基因启动子 (Kuster 等人 (1995) *Plant Mol. Biol.* 29 (4): 759-772); 和 rolB 启动子 (Capana 等人 (1994) *Plant Mol. Biol.* 25 (4): 681-691)。还参见, 美国专利号 5,837,876; 5,750,386; 5,633,363; 5,459,252; 5,401,836; 5,110,732; 和 5,023,179。

本发明也预期时间作用的启动子的使用。例如, 可以选择在授粉后 0-25 天 (DAP)、4-21、4-12 或 8-12 DAP 发挥作用的启动子, 例如启动子, 例如 cim1 和 ltp2。还可以使用在授粉后 0-14 天发挥作用的启动子, 例如 SAG12 (参见 WO 96/29858, Richard M. Amasino, published 3 Oct. 1996) 和 ZAG1 或 ZAG2 (参见 R. J. Schmidt, 等人, *Identification and Molecular Characterization of ZAG1, the Maize Homolog of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene AGAMOUS*, *Plant-Cell* 5 (7): 729-37 (1993 年 7 月))。其他有用的启动子包括玉蜀黍 zag2. 1, Zap (也称为 ZmMADS; 美国专利申请系列号 10/387,937; WO 03/078590); 和玉蜀黍 tb1 启动子 (还参见 Hubbarda 等人, *Genetics* 162: 1927-1935, 2002)。

枝条优选的启动子包括, 枝条分生组织优选的启动子, 例如 Weigal 等人 (1992) *Cell* 69: 853-859; 登记号 AJ131822; 登记号 Z71981; 登记号 AF059870 中公开的启动子、ZAP 启动子 (美国专利申请系列号 10/387,937)、玉蜀黍启动子 (Wang 等人 (1999) *Nature* 398: 236-239、和 McAvoy 等人 (2003) *Acta Hort. (ISHS)* 625: 379-385 中公开的枝条优选的启动子。

诱导型启动子是响应诱导物能够直接或间接激活一种或多种 DNA 序列或基因转录的启动子。在不存在诱导物的情况下, DNA 序列或基因将不转录, 或将以低于诱导状态的水平转录。诱导物可以是化学试剂, 例如代谢物、生长调节物、除草剂或酚类化合物, 或直接强加于植物的生理应激, 例如冷、干旱、热、盐、毒素。可以使用在暴露于植物激素例如生长素后可诱导的植物启动子。例如, 本发明可以使用来自大豆(大豆 (*Glycine max* L.)) 的生长素应答元件 E1 启动子序列 (AuxREs) (Liu (1997) *Plant Physiol.* 115: 397-407); 生长素应答性鼠耳芥属 GST6 启动子(也响应水杨酸和过氧化氢) (Chen (1996) *Plant J.* 10: 955-966); 来自烟草的生长素诱导型 parC 启动子; 植物生物素应答元件 (Streit (1997) *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 933-937); 和响应应激激素脱落酸的启动子 (Sheen (1996) *Science* 274: 1900-1902)。在暴露于可以应用于植物的化学试剂例如除草剂或抗生素后可诱导的植物启动子也可以用于表达多核苷酸。启动子可以是化学制品诱导型启动子, 其中化学制品的应用诱导基因表达, 或化学制品阻遏型启动子, 其中化学制品的应用阻遏基因表达。例如, 可以使用由苯磺酰胺除草剂安全剂激活的玉蜀黍 In2-2 启动子 (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38: 568-577); 不同除草剂安全剂的应用诱导不同的基因表达模式, 包括在根、排水器和茎端分生组织中的表达。ACC 合酶编码序列或 RNA 构型也可以在例如四环素诱导型和四环素阻遏型启动子的控制下 (参见例如, Gatz 等人 (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 229- 237; 美国专利号 5,814,618 和 5,789,156; 和 Masgrau (1997) *Plant J.* 11: 465-473 (描述包含燕麦 (*Avena sativa* L.) (燕麦) 精氨酸脱羧酶基因与四环素诱导型启动子的转基因烟草植物); 或水杨酸应答元件 (Stange (1997) *Plant J.* 11: 1315-1324。其他化学制品诱导型启动子是本领域已知的, 并且包括但不限于, 玉蜀黍 GST 启动子, 其通过用作突出物前 (pre-emergent) 除草剂的疏水亲电子化合物激活, 和烟草 PR-1a 启动子, 其由水杨酸激活。感兴趣的其他化学制品调节的启动子包括类固醇应答启动子 (参见例如, Schena 等人 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10421-10425 和 McNellis 等人 (1998) *Plant J.* 14 (2): 247-257 中的糖皮质激素诱导型启动子)。

诱导型调节元件的例子包括金属硫蛋白调节元件、铜诱导型调节元

件、或四环素诱导型调节元件，来自其的转录可以分别响应二价金属离子、铜或四环素而实现（Furst 等人，Cell 55: 705-717, 1988; Mett 等人，Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90: 4567-4571, 1993; Gatz 等人，Plant J. 2: 397-404, 1992; Roder 等人，Mol. Gen. Genet. 243: 32-38, 1994）。诱导型调节元件还包括蜕皮激素调节元件或糖皮质激素调节元件，来自其的转录可以响应蜕皮激素或其他类固醇而实现（Christopherson 等人，Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 6314-6318, 1992; Schena 等人，Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88: 10421-10425, 1991; 美国专利号 6,504,082）；冷响应调节元件或热激调节元件，其的转录可以分别响应暴露于冷或热而实现（Takahashi 等人，Plant Physiol. 99: 383-390, 1992）；可通过缺氧情况诱导的醇脱氢酶基因的启动子（Gerlach 等人，PNAS USA 79: 2981-2985 (1982)；Walker 等人，PNAS 84 (19): 6624-6628 (1987)）；以及衍生自豌豆 *rbcS* 基因或豌豆 *psaDb* 基因的光诱导型启动子（Yamamoto 等人 (1997) Plant J. 12 (2): 255-265）；光诱导型调节元件（Feinbaum 等人，Mol. Gen. Genet. 226: 449, 1991; Lam 和 Chua, Science 248: 471, 1990; Matsuoka 等人 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (20): 9586-9590; Orozco 等人 (1993) Plant Mol. Biol. 23 (6): 1129-1138），植物激素诱导型调节元件（Yamaguchi-Shinozaki 等人，Plant Mol. Biol. 15: 905, 1990; Kares 等人，Plant Mol. Biol. 15: 225, 1990)等。诱导型调节元件还可以是玉蜀黍 *In2-1* 或 *In2-2* 基因的启动子，其响应苯磺酰胺除草剂安全剂（Hershey 等人，Mol. Gen. Gene 227: 229-237, 1991; Gatz 等人，Mol. Gen. Genet. 243: 32-38, 1994），和转座子 *Tn10* 的 Tet 阻遏物（Gatz 等人，Mol. Gen. Genet. 227: 229-237, 1991）。应激诱导型启动子包括盐/水应激诱导型启动子，例如 *P5CS*（Zang 等人 (1997) Plant Sciences 129: 81-89）；冷诱导型启动子，例如 *cor15a*（Hajela 等人 (1990) Plant Physiol. 93: 1246-1252）、*cor15b*（Wlihelm 等人 (1993) Plant Mol Biol 23: 1073-1077）、*wsc120*（Ouellet 等人 (1998) FEBS Lett. 423-324-328）、*ci7*（Kirch 等人 (1997) Plant Mol Biol. 33: 897-909）、*ci21A*（Schneider 等人 (1997) Plant Physiol. 113: 335-45）；干旱诱导型启动子，例如 *Trg-31*（Chaudhary 等人 (1996) Plant Mol. Biol. 30: 1247-57）、*rd29*（Kasuga 等人 (1999) Nature Biotechnology 18: 287-291）；渗透诱导型启动子，例如 *Rab17*（Vilardell 等人 (1991) Plant

Mol. Biol. 17: 985-93) 和渗透蛋白 (Raghothama 等人 (1993) Plant Mol Biol 23: 1117-28); 以及热诱导型启动子, 例如热激蛋白 (Barros 等人 (1992) Plant Mol. 19: 665-75; Marrs 等人 (1993) Dev. Genet. 14: 2741)、smHSP (Waters 等人 (1996) J. Experimental Botany 47: 325-338)、和来自欧芹泛蛋白启动子的热激诱导型元件 (WO 03/102198)。其他应激诱导型启动子包括 rip2 (美国专利号 5,332,808 和美国公开号 2003/0217393) 和 rd29a (Yamaguchi-Shinozaki 等人 (1993) Mol. Gen. Genetics 236: 331-340)。某些启动子可通过创伤诱导, 包括土壤杆菌属 pmas 启动子 (Guevara-Garcia 等人 (1993) Plant J. 4 (3): 495-505) 和土壤杆菌属 ORF13 启动子 (Hansen 等人, (1997) Mol. Gen. Genet. 254 (3): 337-343)。

在本发明中使用的表达盒可以包括在目的异源核苷酸序列 3'末端处的、在植物中起作用的转录和翻译终止区。终止区可以对于本发明的启动子核苷酸序列是天然的, 可以对于目的 DNA 序列是天然的, 或可以衍生自另一个来源。方便的终止区可从根癌土壤杆菌的 Ti 质粒获得, 例如章鱼碱合酶和胭脂碱合酶终止区。可以使用 *pinII* - (马铃薯蛋白酶抑制剂) 的 3'末端。参见 Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duan 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498。关于其他 3'末端序列, 还参见 Guerineau 等人 (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64: 671-674; Sanfacon 等人 (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen 等人 (1990) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroe 等人 (1990) *Gene* 91: 151-158; Ballas 等人 (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891-7903; Joshi 等人 (1987) *Nucleic Acid Res.* 15: 9627-9639。

表达盒可以另外包括 5'前导序列。此种前导序列可以作用于增强翻译。翻译前导区是本领域已知的, 并且包括: 小 RNA 病毒前导区, 例如 EMCV 前导区 (脑心肌炎 5'非编码区), Elroy-Stein 等人 (1989) *Proc. Nat Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130; 马铃薯 Y 病毒前导区, 例如 TEV 前导区 (烟草蚀纹病毒), Allison 等人 (1986); MDMV 前导区 (玉米矮花叶病毒), *Virology* 154: 9-20; 人免疫球蛋白重链结合蛋白质 (BiP), Macejak 等人 (1991) *Nature* 353: 90-94; 来自苜蓿花叶病毒的外壳蛋白质 mRNA (AMV RNA 4) 的非翻译前导区, Jobling 等人 (1987) *Nature* 325: 622-625; 烟草花叶病毒前导区 (TMV), Gallie 等人 (1989)

*Molecular Biology of RNA*, 第 237- 256 页; 和玉米褪绿斑驳病毒前导区 (MCMV) Lommel 等人 (1991) *Virology* 81: 382-385。还参见 Della-Cioppa 等人 (1987) *Plant Physiology* 84: 965-968。该盒还可以包含增强翻译和/或 mRNA 稳定性的序列, 例如内含子。

任何类型的转化都可以用于获得选择性切除诱导系。转化规程以及用于将核苷酸序列引入植物内的规程可以依靶向用于转化的植物或植物细胞类型, 即单子叶植物或双子叶植物而变。将核苷酸序列引入植物细胞内和随后插入植物基因组内的合适方法包括显微注射 (Crossway 等人 (1986) *Biotechniques* 4: 320-334)、电穿孔 (Riggs 等人 (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606、土壤杆菌属介导的转化 (Townsend 等人, 美国专利号 5,563,055)、直接基因转移 (Paszkowski 等人 (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722)、和冲击粒子加速 (ballistic particle acceleration) (参见例如, Sanford 等人, 美国专利号 4,945,050; Tomes 等人 (1995) “Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment,” in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, 编辑 Gamborg 和 Phillips (Springer-Verlag, Berlin); 和 McCabe 等人 (1988) *Biotechnology* 6: 923-926)。还参见 Weissinger 等人 (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford 等人 (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (洋葱); Christou 等人 (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (大豆); McCabe 等人 (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (大豆); Finer 和 McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 175-182 (大豆); Singh 等人 (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (大豆); Datta 等人 (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (稻); Klein 等人 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (玉蜀黍); Klein 等人 (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (玉蜀黍); Tomes, 美国专利号 5,240,855; Buising 等人, 美国专利号 5,322,783 和 5,324,646; Tomes 等人 (1995) “Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment,” in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, 编辑 Gamborg (Springer-Verlag, Berlin) (玉蜀黍); Klein 等人 (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (玉蜀黍); Fromm 等人 (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (玉蜀黍); Hooykaas-Van Slogteren 等人 (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; Bowen 等人, 美国专利

号 5,736,369(谷类); Bytebier 等人(1987)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349(百合科); De Wet 等人(1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, 编辑 Chapman 等人(Longman, New York), 第 197-209 页(花粉); Kaeppler 等人(1990)*Plant Cell Reports* 9: 415-418 和 Kaeppler 等人(1992)*Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566(颈须介导的转化); D'Halluin 等人(1992)*Plant Cell* 4: 1495-1505(电穿孔); Li 等人(1993)*Plant Cell Reports* 12: 250-255 以及 Christou 和 Ford(1995)*Annals of Botany* 75: 407-413(稻); Ishida 等人(1996)*Nature Biotechnology* 14: 745-750; US 5,731,179; US 5,591,616; US 5,641,664; 和美国专利 5,981,840(经由根癌土壤杆菌的玉蜀黍); 所述参考文献的公开内容引入本文作为参考。

在植物中的土壤杆菌属转化公开于下述参考文献中: Bechtold, N., J. Ellis, G. Pelletier(1993)*C. R., Acad Sci Paris Life Sci* 316: 1194-1199; Bechtold, N., B.等人(2000)*Genetics* 155: 1875-1887; Bechtold, N. 和 G. Pelletier(1998)*Methods Mol Biol.* 82: 259-266; Chowrira, G. M., V. Akella 和 P. F. Lurquin(1995)*Mol. Biotechnol.* 3: 17-23; Clough, S. J. 和 A. F. Bent(1998)*Plant J.* 16: 735-743; Desfeux, C., S. J. Clough 和 A. F. Bent.(2000)*Plant Physiol.* 123: 895-904; Feldmann, K. A. 和 M. D. Marks(1987)*Mol. Gen. Genet.* 208: 1-9; Hu C.-Y. 和 L. Wang.(1999)*In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 35: 417-420; Katavic, V. G. W. Haughn, D. Reed, M. Martin, L. Kunst(1994)*Mol. Gen. Genet.* 245: 363-370; Liu, F., 等人(1998)*Acta Hort* 467: 187-192; Mysore, K. S., C. T. Kumar 和 S. B. Gelvin(2000)*Plant J.* 21: 9-16; Touraev, A., E. Stoger, V. Voronin 和 E. Heberle-Bors(1997)*Plant J.* 12: 949-956; Trieu, A. T. 等人(2000)*Plant J.* 22: 531-541; Ye, G. N. 等人(1999)*Plant J.* 19: 249-257; Zhang, JU. 等人(2000)*Chem Biol.* 7: 611-621。上述的公开内容引入本文作为参考。

各种类型的植物组织可以用于转化, 例如胚细胞, 分生细胞, 叶细胞, 或衍生自胚、叶或分生细胞的愈伤组织细胞。然而, 可以使用任何转化感受态细胞或组织。还可以采用用于增加转化频率的各种方法。此种方法公开于 WO 99/61619; WO 00/17364; WO 00/28058; WO 00/37645; 美国系列号 09/496,444; WO 00/50614; US 01/44038; 和 WO 02/04649

中。上述的公开内容引入本文作为参考。

玉蜀黍的转化可以遵循用于将 DNA 引入未成熟的玉蜀黍胚的盾片内的充分确定的轰击转化规程（参见例如，Tomes 等人，Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment. 第 197-213 页 in Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods. 编辑 O. L. Gamborg 和 G. C. Phillips. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1995.）。通过在包含 N6 盐、Eriksson's 维生素、0.69 g/l 脯氨酸、2 mg/l 2,4-D 和 3% 蔗糖的培养基上培养玉蜀黍未成熟胚（长度约 1-1.5mm）来转化细胞。在黑暗中在 28°C 下温育 4-5 天后，从第一种培养基中取出胚，并且在包含 12% 蔗糖的相似培养基上培养。在转化前允许胚适应这种培养基 3 小时。使用粒子轰击来靶向未成熟胚的盾片表面。胚使用来自 Bio-Rad 的 PDS-1000 Helium Gun 以一次射击/样品进行转化，其中使用 650PSI 破裂盘。每次射击递送的 DNA 平均为 0.1667 $\mu$ g。轰击后，所有胚在标准玉蜀黍培养基（N6 盐、Eriksson's 维生素、0.69 g/l 脯氨酸、2 mg/l 2,4-D、3% 蔗糖）上维持 2-3 天，然后转移到包含选择剂的基于 N6 的培养基。板在 28°C 下在黑暗中维持，并且就集落回收进行观察，伴随每 2-3 周转移至新鲜培养基。回收的集落和植物基于由引入的一种或多种标记基因赋予的可选择或可筛选的表型（即除草剂抗性、荧光或花青苷产生），并且经由 PCR 和 DNA 印迹分析通过分子表征进行评分。

玉蜀黍的转化还可以使用土壤杆菌属介导的 DNA 递送法来完成，如由美国专利号 5,981,840 描述的，伴随下述修饰。土壤杆菌在包含 100 $\mu$ M 壮观霉素的液体基本 A 培养基中生长至对数期。将胚浸入调整的土壤杆菌的对数期悬浮液中，以获得 5 x 10<sup>8</sup> cfu/ml 的有效浓度。胚感染 5 分钟，然后在包含乙酰丁香酮的培养基上在 20°C 下在黑暗中共培养 7 天。7 天后，将胚转移至具有选择剂的标准培养基（含 N6 常量营养物的 MS 盐、1mg/L 2,4-D、1mg/L 麦草畏、20g/L 蔗糖、0.6g/L 葡萄糖、1mg/L 硝酸银和 100mg/L 羧苄青霉素）。板在 28°C 下在黑暗中维持，并且就集落回收进行观察，伴随每 2-3 周转移至新鲜培养基。回收的集落和植物基于由引入的一种或多种标记基因赋予的可选择或可筛选的表型（即除草剂抗性、荧光或花青苷产生），并且经由 PCR 和 DNA 印迹分析通过分子表征进行评分。

选择标记可以在转化细胞的回收中利用。标记基因包括编码抗生素抗性的基因，例如编码新霉素磷酸转移酶 II (NEO) 和潮霉素磷酸转移酶 (HPT) 的那些，以及赋予针对除草剂化合物的抗性的基因，所述除草剂化合物例如草铵膦 (BASTA™ 中的活性成分)、溴苯腈、咪唑啉酮类和 2,4-滴 (2,4-D)。例如，编码草甘膦 N-乙酰转移酶 (GAT) 的除草剂抗性多核苷酸可以与选择剂草甘膦一起使用。参见 PCT 公开 WO02/36782 和美国申请系列号 10/427,692。PAT( 膦丝菌素乙酰转移酶) 多核苷酸可以用于针对膦丝菌素的抗性 ( DeBlock 等人, 1987, Engineering herbicide resistance in plant by expression of a detoxifying enzyme, *EMBO J.* 6: 2513-2518)。另一个例子是关于针对咪唑啉的抗性的 ALS ( 乙酰乳酸合酶) 多核苷酸 ( Sathasivan 等人, 1990, Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var, Columbia, *Nucleic Acids Res.* 18: 2188)。另外的选择标记包括表型标记，例如  $\beta$ -半乳糖苷酶和荧光蛋白质，例如绿色荧光蛋白 (GFP) ( Su 等人 (2004) *Biotechnol Bioeng* 85: 610-9 和 Fetter 等人 (2004) *Plant Cell* 16: 215-28)，青色荧光蛋白 (cyan florescent protein) (CYP) ( Bolte 等人 (2004) *J. Cell Science* 117: 943-54 和 Kato 等人 (2002) *Plant Physiol* 129: 913-42) 和黄色荧光蛋白 (来自 Evrogen 的 PhiYFP™, 参见, Bolte 等人 (2004) *J. Cell Science* 117: 943-54)。关于另外的选择标记，一般参见, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3: 506-511; Christopherson 等人 (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6314-6318; Yao 等人 (1992) *Cell* 71: 63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 2419-2422; Barkley 等人 (1980) in *The Operon*, 第 177-220 页; Hu 等人 (1987) *Cell* 48: 555-566; Brown 等人 (1987) *Cell* 49: 603-612; Figge 等人 (1988) *Cell* 52: 713-722; Deuschle 等人 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5400-5404; Fuerst 等人 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2549-2553; Deuschle 等人 (1990) *Science* 248: 480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines 等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1917-1921; Labow 等人 (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 3343-3356; Zambretti 等人 (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3952-3956; Baim 等人 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5072-5076; Wyborski 等人 (1991) *Nucleic*

*Acids Res.* 19: 4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10: 143-162; Degenkolb 等人 (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1591-1595; Kleinschmidt 等人 (1988) *Biochemistry* 27: 1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen 等人 (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551; Oliva 等人 (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 913-919; Hlavka 等人 (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, 第 78 卷 (Springer-Verlag, Berlin); Gill 等人 (1988) *Nature* 334: 721-724。此种公开内容引入本文作为参考。上述选择标记基因列表不意味着是限制性的。任何选择标记基因都可以在本发明中使用。

一旦已鉴定了单倍体胚，就可以用染色体加倍试剂处理单倍体细胞、单倍体胚、单倍体种子、单倍体幼苗或单倍体植物。通过使单倍体细胞例如单倍体胚细胞与染色体加倍试剂接触可以由单倍体细胞再生纯合植物。单倍体细胞可以在授粉时、授粉后任何时间（一般为授粉后 6 小时-21 天、授粉后 6 小时-15 天）、在成熟种子阶段时、在幼苗阶段时或在植物阶段时与加倍试剂接触。当来自花粉粒的一个精核与胚囊中的极核融合以产生三倍体 (3N) 胚乳时（当形成单倍体胚时），授粉后任何时间（一般为授粉后 6 小时-21 天、授粉后 6 小时-15 天）、或在成熟种子阶段时，单倍体胚可以与加倍试剂接触。可以分离单倍体胚。它可以包含在仁、胚珠或种子内。在玉米的情况下它还可以在谷穗上，或在其他谷物例如小麦的情况下在穗状花序上。包含单倍体胚的谷穗可以在植物上或从植物中分离。谷穗还可以切开。在染色体加倍后，双单倍体胚将包含母源获得的染色体的 2 个拷贝。关于从单倍体胚获得双单倍体植物的过程的效率可以大于 10%、20%、30%、50%、60%、70%、80% 或 90%。

染色体加倍的方法公开于 Antoine-Michard, S. 等人, *Plant cell, tissue organ cult.*, Cordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1997, 48 (3): 203-207; Kato, A., *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 1997, 36-37; 和 Wan, Y. 等人, *TAG*, 1989, 77: 889-892. Wan, Y. 等人, *TAG*, 1991, 81: 205-211 中。所述参考文献的公开内容引入本文作为参考。一般方法涉及使细胞与秋水仙碱、抗微管试剂或抗微管除草剂、拿草特 (pronamide)、一氧化二氮或任何有

丝分裂抑制剂接触，以产生纯合的双单倍体细胞。在培养基中使用的秋水仙碱量一般是 0.01% - 0.2% 或约 0.05% 或 APM (5 - 225  $\mu\text{M}$ )。培养基中的拿草特量是约 0.5 - 20  $\mu\text{M}$ 。已知有丝分裂抑制剂的例子包括但不限于表 5 中指出的那些。其他试剂可以与有丝分裂抑制剂一起使用以改善加倍效率。此种试剂可以是二甲基亚砷 (DMSO)、佐剂、表面活性剂等。

表 5

通用名/商品名	CAS	IUPAC
秋水仙碱和秋水仙碱衍生物		
秋水仙碱/乙酰三甲基秋水仙酸		(S)-N-(5,6,7,9-四氢-1,2,3,10-四甲氧基-9-氧代苯并(a)庚搭烯-7-基)乙酰胺
秋水仙碱衍生物		
氨基甲酸酯		
长杀草	苯氨基甲酸(R)-1-(乙基氨基甲酰基)乙酯	(2R)-N-乙基-2-[(苯氨基)羰基]氧]丙酰胺
氯苯胺灵		
苯胺灵		
苯甲酰胺		
拿草特/戊炔草胺(propyzamide)	3,5-二氯-N-(1,1-二甲基丙炔基)苯甲酰胺	3,5-二氯-N-(1,1-二甲基-2-丙炔基)苯甲酰胺
牧草胺(tebutam)		
苯甲酸		
敌草索(DCPA), 麦草畏/麦草畏(dianat)/氯茴香酸酯(甲麦草畏)(BANVEL, CLARITY)	3,6-二氯-邻-大茴香酸	3,6-二氯-2-甲氧基苯甲酸
二硝基苯胺染色体加倍试剂		

氟草胺 (benfluralin) / 氟草胺/ (BALAN)	N-丁基-N-乙基- $\alpha,\alpha,\alpha$ -三氟 -2,6-二硝基-对-甲苯胺	N-丁基-N-乙基-2,6-二硝基-4-(三 氟甲基)苯胺
地乐胺	(RS)-N-仲丁基-4-叔丁基 -2,6-二硝基苯胺	4-(1,1-二甲基乙基)-N-(1-甲基 丙基)-2,6-二硝基苯胺
chloralin		
敌乐胺	N1,N1-二乙基-2,6-二硝基 -4-三氟甲基-间-苯二胺	N3,N3-二乙基-2,4-二硝基-6-(三氟 甲基)-1,3-苯二胺
丁氟消草 (Sonalan)	N-乙基- $\alpha,\alpha,\alpha$ -三氟-N-(2- 甲基烯丙基)-2,6-二硝基- 对-甲苯胺	N-乙基-N-(2-甲基-2-丙烯基)-2,6- 二硝基-4-(三氟甲基)苯胺
氟消草	N-(2-氯乙基)-2,6-二硝基-N- 丙基-4-(三氟甲基)苯胺 或 N-(2-氯乙基)- $\alpha,\alpha,\alpha$ -三氟 -2,6-二硝基-N-丙基-对-甲 苯胺	N-(2-氯乙基)-2,6-二硝基-N-丙基 -4-(三氟甲基)苯胺
异乐灵	4-异丙基-2,6-二硝基-N,N- 二丙基苯胺	4-(1-甲基乙基)-2,6-二硝基-N,N- 二丙基苯胺
氟烯硝草	$\alpha,\alpha,\alpha$ -三氟-N-(2-甲基烯丙 基)-2,6-二硝基-N-丙基-对- 甲苯胺	N-(2-甲基-2-丙烯基)-2,6-二硝基 -N-丙基-4-(三氟甲基)苯胺
磺乐灵	4-甲基磺酰基-2,6-二硝基 -N,N-二丙基苯胺	4-(甲基磺酰基)-2,6-二硝基-N,N- 二丙基苯胺
黄草消 (SURFLAN)	3,5-二硝基-N4,N4-二丙基 磺胺	4-(二丙基氨基)-3,5-二硝基苯磺 酰胺
胺硝草 (PROWL)	N-(1-乙基丙基)-2,6-二硝 基-3,4-二甲代苯胺	N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基-2,6- 二硝基苯胺
氨基丙氟灵	5-二丙基氨基- $\alpha,\alpha,\alpha$ -三氟 -4,6-二硝基-邻-甲苯胺 或 2,6-二硝基-N1,N1-二丙基 -4-三氟甲基-间-苯二胺	2,4-二硝基-N3,N3-二丙基-6-(三氟 甲基)-1,3-苯二胺

卡乐施	N-环丙基甲基- $\alpha,\alpha,\alpha$ -三氟-2,6-二硝基-N-丙基-对-甲苯胺 或 N-环丙基甲基-2,6-二硝基-N-丙基-4-三氟甲基苯胺	N-(环丙基甲基)-2,6-二硝基-N-丙基-4-(三氟甲基)苯胺
氟乐灵 (TREFLAN, TRIFIC, TRILLIN)	$\alpha,\alpha,\alpha$ -三氟-2,6-二硝基-N,N-二丙基-对-甲苯胺	2,6-二硝基-N,N-二丙基-4-(三氟甲基)苯胺
氨基磷酸酯		
APM(甲基胺草磷); 甲基胺草磷 (amiprofos-methyl)		
草胺磷	O-乙基 O-6-硝基-间-甲苯基 (RS)-仲丁基硫代磷酸胺	O-乙基 O-(5-甲基-2-硝基苯基)(1-甲基丙基)硫代磷酸胺
吡啶		
氟硫草定		
噻氟吡草	2-二氟甲基-5-(4,5-二氢-1,3-噻唑-2-yl)-4-异丁基-6-三氟甲基烟酸甲酯	2-(二氟甲基)-5-(4,5-二氢-2-噻唑基)-4-(2-甲基丙基)-6-(三氟甲基)-3-吡啶羧酸甲酯

染色体加倍试剂可以在各种时间与胚接触。如果胚是分离的，那么加倍试剂可以紧在分离后和在萌发前接触。如果胚包含在种子内，那么它可以在授粉后和干透前的任何时间与加倍试剂接触。无论胚是否是分离的，它都可以在授粉后 6 小时到授粉后 21 天之间的任何时间与加倍试剂接触。染色体加倍试剂之间的接触持续时间可以有变化。接触可以为小于 24 小时至约 1 周。接触持续时间一般为约 24 小时到 2 天。

所提供的方法可以经历或不经历愈伤组织形成阶段。单倍体胚可以置于“非愈伤组织”促进培养基上。术语“非愈伤组织促进培养基”指不支持去分化的细胞或组织团块增殖的培养基。优选的“非愈伤组织促进培养基”用于胚拯救，包含本领域众所周知的一般的盐和和维生素制剂。此种胚拯救或胚培养，培养基包含很少的生长素或不包含生长素[关于综述

参见 Raghaven, V., 1966. Biol. Rev. 41: 1-58]。胚成熟培养基还代表另一种优选的“非愈伤组织促进培养基”。胚成熟培养基用于促进体外培养胚的发育，阻止过早的萌发，并且一般包含标准盐/维生素制剂（依赖物种）、增加的糖水平和/或外源添加的脱落酸，具有很少的生长素或无生长素。另一种类型的培养基用于枝条培养或多重枝条增殖。这种多重枝条培养基可以再次包含很少或减少的生长素，但相反包含升高水平的促进分生组织增殖和生长的细胞分裂素。

生长素定义为内源植物激素，例如吲哚乙酸（IAA），IAA 的衍生物，例如吲哚-3-丁酸，以及具有生长素样活性的化合物，例如 2,4-D；毒莠定；麦草畏；3,4-D；2,4,5-T 和萘乙酸（NAA）。

细胞分裂素定义为天然存在的植物激素，例如 2-异戊烯基腺嘌呤（2-isopentenyl adenine）（2iP）、玉米素和二氢玉米素，或具有细胞分裂素样活性的合成化合物，例如激动素和 BAP（苄氨基嘌呤（benzylaminopurine））。

来自胚、种子、植物等的单倍体细胞可以通过几种方法进行鉴定，例如通过染色体计数、测量保卫细胞的长度、或通过使用流式细胞仪。

分子标记或定量 PCR 可以用于确定组织或植物是由双单倍体细胞构成还是由二倍体细胞构成（通过正常授粉获得的细胞）。

通过任何上述技术获得的单倍体胚可以进行培养，以再生全植物。此种技术称为胚拯救。胚拯救培养基可以包含某些植物激素和能源或仅能源。生长培养基还可以包含选择剂，例如杀生物剂和/或除草剂。这种选择剂可以用于指示已通过转化方法引入的标记。关于玉蜀黍的转化和再生，参见 Gordon-Kamm 等人，The Plant Cell 2: 603-618（1990）。

所提供的方法可以用任何植物进行实践。此种植物包括但不限于玉蜀黍（*Zea mays*）（也鉴定为玉米或玉蜀黍）、大豆、油料种子芸苔属（*Brassica*）、苜蓿、稻、黑麦、高粱、向日葵、烟草、马铃薯、花生、棉花、甘薯、木薯、甜菜、番茄、燕麦、大麦和小麦。

胚生成植物是本领域众所周知的。胚拯救技术可以用于使未成熟的双单倍体胚生成植物（Recent Research Developments in Genetics & Breeding, 第 1 卷，部分 II, 287-308 2004）。所述参考文献的公开内容引入本文作为参考。

在其下可以执行方法的温度可以有变化。所提供的方法可以在不杀

死植物细胞或植物的任何温度下，或在约 16 摄氏度到 32 摄氏度下进行实践。

提供了对于玉蜀黍植物产生单倍体胚和不能生活的二倍体胚的方法。该方法包括但不限于产生约 3% 或更多、约 5% 或更多、或约 10% 或更多的存活单倍体胚。为了计算百分比，通过将单倍体胚数目与未正确发育的胚数目相加来确定胚总数目。不能生活的二倍体胚可以针对授粉后任何时间进行选择。该方法包括但不限于在 7-15 天、10-21 天时，或在单倍体种子完全成熟时例如在干透过程中或干透后选择。

提供了通过用来自诱导玉蜀黍系的花粉给玉蜀黍谷穗授粉就单倍体玉蜀黍胚进行选择的方法。诱导系具有在胚中表达且可以是致死的基因。在基因组中的另一个位置处，诱导玉蜀黍系具有阻止花粉传播的基因。阻止花粉传播的基因与这样的基因紧密连锁，所述基因当在胚中表达时，抑制第一个位置处的基因的致死性。因此，当玉蜀黍谷穗由这种诱导系授粉时，不存在包含这样的基因的花粉的传播，所述基因阻止致死基因的致死效应。仅具有对于胚发育致死的基因的花粉传播。当使用这种花粉且正常受精发生从而导致二倍体胚时，由于致死基因的传递，胚将不发育。当使用这种花粉且不规则受精发生时，这导致单倍体胚。这种单倍体胚将继续发育。由于二倍体胚的切除，在发育早期阶段时将容易地选择单倍体胚。在基因组的不同位置处具有致死基因和抑制剂基因，例如具有未连锁的基因，允许基因分离，从而使得产生足够量的包含致死基因的花粉。阻止花粉传播的基因与抑制胚切除的基因紧密连锁或邻近。

提供的另一种方法是称为选择性切除诱导系的改良诱导系的开发。玉蜀黍诱导系可以用 2 个不同的表达盒进行转化。第一个表达盒包括这样的多核苷酸，当所述多核苷酸在胚中表达时，对于胚是致死的或阻止胚正常发育。第二个表达盒包括阻止存活或可传播花粉发育的多核苷酸，和当在胚中表达时，阻止死亡或异常生长的多核苷酸，所述死亡或异常生长可由在第一个表达盒上的多核苷酸引起。转化过程可以通过各种方法，例如粒子轰击或土壤杆菌属感染。用 2 个盒的转化过程可以同时或顺次进行，其中包含阻止胚致死性的多核苷酸的盒首先渐渗入植物细胞内。表达盒需要在配子中分离，因此优选 2 个表达盒不紧密连锁。作为该方法的部分，任何玉蜀黍系都可以用第一个、或第一个和第二个

表达盒进行转化。第一个和/或第二个表达盒可以用于转化一种或两种玉蜀黍植物。表达盒随后可以通过杂交同时或顺次转移到玉蜀黍诱导系内。该方法可以包括使一种或所有转基因回交到玉蜀黍诱导系内。阻遏物可以被替换且分离出去。

在所公开的任何方法中，所描述的抑制可以通过各种机制。例如，致死多核苷酸的转录可以被阻止。这种类型的抑制可以通过使用 tet 阻遏物多核苷酸来达到，所述多核苷酸表达与致死基因结合且抑制表达的蛋白质。其他类型的致死性阻止可以在 RNA 或蛋白质阶段时，例如反义 RNA、发夹和用于基因沉默的其他机制。

在任何这些方法和产物中，阻止花粉传播的基因可以是具有花粉特异性启动子的致死基因。例如基因可以表达  $\alpha$ -淀粉酶 (Gene Bank L25805), *Plant Physiology* 105 (2): 759-760 (1994)), 并且它可以用 PG47 启动子加以控制 (美国专利 5,412,085; 美国专利 5,545,546; *Plant J.* 3 (2): 261-271 (1993))。在任何这些方法和产物中，引起切除的多核苷酸和抑制切除的多核苷酸的表达可以通过各种类型的启动子加以控制。例如启动子可以是组成型启动子、诱导型启动子、或组织优选的启动子，例如胚优选的启动子。如果驱动引起胚切除的多核苷酸的启动子不在胚乳中表达，那么这将是最高效的。或如果启动子在胚乳中表达，那么表达将足够低，从而使得人们仍可以确定二倍体种子 (正常受精) 和单倍体种子之间的生长中的差异。胚优选的启动子的例子是 *lec1*。

本发明包括如所述的包含 2 个表达盒的玉蜀黍诱导系。

本说明书中提及的所有出版物和专利申请都引入本文作为参考，其程度与每个个别出版物或专利申请特别且个别指出引入作为参考相同。

提供下述实施例用于举例说明而不是限制。

#### 实施例

*gat*- 编码草甘膦 N-乙酰转移酶 (GAT) 的基因。参见 PCT 公开 WO02/36782 和美国申请系列号 10/427,692。

*lec1*-指示多叶子叶 1 转录激活因子多核苷酸。参见美国专利申请 09/435,054。 *lec1* 启动子在美国专利 7,122,658 中表征。

*moCah*- 是编码疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*) 氨脲水合酶蛋白质 [CAH] 的玉蜀黍最优化的基因，所述蛋白质可以使氨脲水合成无

毒的尿素。

*pinII* -指示马铃薯蛋白酶抑制剂。参见 Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duan 等人 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498。

Pro- 指示启动子序列。

Term-指示终止序列。

Ubi Pro-指示泛蛋白启动子。参见 Christensen 等人 (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 和 Christensen 等人 (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689 )  
Ubi1ZM Pro-指示泛蛋白玉蜀黍启动子。

#### 实施例 1:

种植来自单倍体诱导系例如 Stock 6、RWS、KEMS、KMS 或 ZMS 的种子，并且在开花时进行自花传粉或近缘授粉。谷穗在 30% Clorox 漂白剂加 0.5% Micro 去污剂中表面灭菌 20 分钟，并且用无菌水漂洗 2 次。

对于土壤杆菌属介导的玉蜀黍转化，利用基本上如美国专利号 5,981,840 中所述的 Zhao 的方法，所述专利的内容在此引入作为参考。从玉蜀黍植物中分离胚（一般在授粉后约 7-14 天），并且使胚与土壤杆菌属的悬浮液接触，其中细菌能够将目的核苷酸序列转移给至少一个胚的至少一个细胞。土壤杆菌属包含下述表达盒。

#### 构建体 C:

ZM-*lec1* 启动子: UB1ZMintron: 芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂: *pinII* 3' 终止子 -- ZM-PG47 启动子: ZM-BT1 转运肽: ZM- $\alpha$ -淀粉酶 1: ZM-IN2-1 3' 终止子—UB1ZM 启动子: 5'UTR 内含子: GAT: PINII 3'终止子。

在这个步骤中，胚一般浸入土壤杆菌属悬浮液中用于起始接种。优选地，土壤杆菌属悬浮液包含 100  $\mu$ M 乙酰丁香酮。胚与土壤杆菌属共培养一段时间。

一般地胚在感染步骤后在固体培养基上进行培养。在这个共培养时间段后，预期持续 6-7 天的任选的“静止”步骤。在这个静止步骤中，胚在已知抑制土壤杆菌属生长的至少一种抗生素的存在下进行温育，无需添加关于植物转化体的选择剂。接下来，接种胚在包含关于 GAT 的选

择剂的固体培养基上进行培养，所述选择剂是除草剂草甘膦（GAT- 编码草甘膦 N-乙酰转移酶（GAT）的基因。参见 PCT 公开 WO02/36782 和美国申请系列号 10/427,692）。

放置在选择培养基上后，生长中的转化的愈伤组织用第二个盒——构建体 D 进行转化。这次使用粒子轰击。

#### 构建体 D:

ZM-lec1 启动子: 马铃薯 LS 内含子: 芽孢杆菌 RNA 酶: pinII 3' 终止子 -- UB1ZM 启动子: 5'UTR 内含子: moPAT: PINII 3' 终止子。

使用如下的 CaCl<sub>2</sub> 沉淀程序将这种质粒 DNA 沉淀到 1.1 μm（平均直径）钨沉淀上: 100 μl 在水中制备的钨粒、在 TrisEDTA 缓冲液中的 10 μl（1 μg）DNA（总共 1 μg）、100 μl 2.5 M CaCl<sub>2</sub>、10 μl 0.1 M 亚精胺。

将每种试剂顺次加入钨粒悬浮液中，同时维持在多管涡旋器（vortexer）上。最后的混合物进行短暂超声处理，并且允许在恒定涡旋下温育 10 分钟。在沉淀时间段后，管进行短暂离心，取出液体，用 500 μl 100% 乙醇洗涤，并且离心 30 秒。再次取出液体，并且将 105 μl 100% 乙醇加入最终的钨粒沉淀中。对于粒子枪轰击，钨/DNA 颗粒进行短暂超声处理，并且将 10 μl 点样到每个巨载体的中心上，并且在轰击前允许干燥约 2 分钟。样品板在水平#4 下在粒子枪#HE34-1 或#HE34-2 中进行轰击。所有样品接受以 650 PSI 的单次射击，使用取自每管制备的粒子/DNA 的总共 10 个等分试样。

轰击后，使愈伤组织在 560Y 培养基上维持 2 天，然后转移至包含关于 PAT 基因的选择剂双丙氨酰膦（bialophos）的选择培养基，并且每 2 周进行传代培养。

选择约 10 周后，将选择抗性愈伤组织克隆转移至再生培养基以起始植物。体细胞胚成熟（2-4 周）后，将发育良好的体细胞胚转移至用于萌发的培养基，并且转移至照亮的培养室。约 7-10 天后，将发育中的小植物转移至在管中的无激素培养基 7-10 天，直至小植物良好确立。随后将植物转移至在包含盆栽土壤的平地中的嵌入物（等于 2.5" 罐），并且在生长室中生长 1 周，然后在温室中生长另外 1-2 周，然后转移至常规 600 罐（1.6 加仑），并且生长至成熟。植物就目的基因型和/或表型

进行监控且评分。

轰击培养基包含 4.0 g/l N6 基础盐 (SIGMA C-1416)、1.0 ml/l Eriksson's Vitamin Mix (1000X SIGMA-1511)、0.5 mg/l 盐酸硫胺素、120.0 g/l 蔗糖、1.0 mg/l 2,4-D 和 2.88 g/l L-脯氨酸 (在用 KOH 调整至 pH 5.8 后用 D-I H<sub>2</sub>O 达到体积); 2.0 g/l Gelrite (在用 D-I H<sub>2</sub>O 达到体积后加入); 和 8.5 mg/l 硝酸银 (在使培养基灭菌且冷却至室温后加入)。选择培养基 (560R) 包含 4.0 g/l N6 基础盐 (SIGMA C-1416)、1.0 ml/l Eriksson's Vitamin Mix (1000X SIGMA-1511)、0.5 mg/l 盐酸硫胺素、30.0 g/l 蔗糖和 2.0 mg/l 2,4-D (在用 KOH 调整至 pH 5.8 后用 D-I H<sub>2</sub>O 达到体积); 3.0 g/l Gelrite (在用 D-I H<sub>2</sub>O 达到体积后加入); 和 0.85 mg/l 硝酸银和选择剂 (两者在使培养基灭菌且冷却至室温后加入)。

#### 实施例 2: 单倍体胚的产生

在切除后, 如实施例 1 中所示产生单倍体诱导系。诱导系可以用于产生单倍体胚。这可以通过 F1 玉米种子的生长来达到。例如, 希望产生具有来自良种近交系 A 和良种近交系 B 的最佳特征的优良近交的玉米育种者使 2 个近交杂交, 以形成 F1 杂交种子。这种 F1 种子连同切除诱导系一起生长。种植的时间选择是这样的, 使得切除诱导系的花粉在 F1 杂交种子抽丝时准备就绪。F1 植物的穗丝用切除诱导系花粉进行授粉。这可以通过种植 F1 和诱导系的交替行以及其各种组合来达到, 其中 F1 或雌性植物在授粉前去雄花穗 (detassel)。杂交也可以通过枝条装袋和通过人工授粉控制授粉来完成。

在种子已成熟后, 可以收获种子并且唯一存活的种子将是单倍体种子。单倍体种子随后进行种植, 并且经历使用染色体加倍试剂例如拿草特的染色体加倍。

#### 实施例 3: 转基因诱导玉蜀黍植物的转化和再生

种植 Hi-II 玉蜀黍种子。在授粉后 9-12 天时收获谷穗, 在 30% Clorox 漂白剂加 0.5% Micro 去污剂中表面灭菌 20 分钟, 并且用无菌水漂洗 2 次。使用手术刀从谷穗中分离胚。使胚与土壤杆菌属的悬浮液接触, 其中细菌能够将目的核苷酸序列转移给至少一个胚的至少一个细胞。在这个实施例中, 胚用 2 种土壤杆菌进行共转化。

一种土壤杆菌包含下述表达盒。

构建体 E:

ZM-lec1 启动子: UB1ZM 内含子: 芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂: pinII 3' 终止子-- ZM-PG47 启动子: ZM-BT1 转运肽: ZM- $\alpha$ -淀粉酶 1: ZM-IN2-1 3'终止子—UB1ZM 启动子: 5'UTR 内含子: GAT: PINII 3'终止子。

第二种土壤杆菌包含下述表达盒。

构建体 F:

ZM-lec1 启动子: 马铃薯 LS 内含子: 芽孢杆菌 RNA 酶: pinII 3'终止子-- UB1ZM 启动子: 5'UTR 内含子: moPAT: PINII 3'终止子。

芽孢杆菌 RNA 酶基因包括用于阻止芽孢杆菌 RNA 酶在土壤杆菌属中表达的目的的内含子。

组织培养基和方法与上文描述的相同, 使用选择剂双丙氨酰磷。仅包含构建体 E 的愈伤组织将使用双丙氨酰磷针对其进行选择。仅包含构建体 F 的愈伤组织将不再生, 因为芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂构建体无法阻止芽孢杆菌 RNA 酶的毒性。

包含构建体 E 和 F 的植物将再生。这些植物将用于使 2 种构建体回交到玉蜀黍单倍体诱导系内。在回交过程中, 共转化的系将进行评估, 以确定构建体之间的连锁。构建体连锁得越紧密, 芽孢杆菌 RNA 酶多核苷酸通过花粉的传递将越不可能发生, 因为它将与在花粉中表达的  $\alpha$ -淀粉酶多核苷酸分离, 从而使得花粉不能生活。

当用未连锁的构建体进行杂交时, 二倍体胚被消除, 因为含芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂的构建体不通过花粉传递, 并且它们仅遗传芽孢杆菌 RNA 酶。

芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂和芽孢杆菌 RNA 酶都在早期胚发生中在分离的、未连锁的转基因上在单倍体诱导系中表达。因此, 单倍体诱导系可以得到维持。

实施例 4: 使用包含 2 种 T-DNA 构建体的土壤杆菌属的转基因诱导玉蜀黍植物的转化和再生。

一种土壤杆菌包含下述 2 种表达盒。

RB: ZM-lec1 启动子: UB1ZM 内含子: 芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂: pinII 3'终止子-- ZM-PG47 启动子: ZM-BT1 转运肽: ZM- $\alpha$ -淀粉酶 1:

ZM-IN2-1 3'终止子—UB1ZM 启动子: 5'UTR 内含子: GAT: PINII 3'终止子: LB

RB: ZM-lec1 启动子: 马铃薯 LS 内含子: 芽孢杆菌 RNA 酶: pinII 3'终止子-- UB1ZM 启动子: 5'UTR 内含子: moPAT: PINII 3'终止子: LB

用包含盒的土壤杆菌属的转化可以增加产生稳定转化的植物的效率, 所述植物包含在基因组中未连锁的位置处的 2 个盒 (Miller 等人 Transgenic Research 11: 381-396, 2002. High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system.)

除载体外, 获得玉蜀黍切除单倍体诱导系的方法可以与实施例 3 中所示相同。