

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 5 月 14 日 (14.05.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/093997 A1

- (51) 国际专利分类号:
A01H 1/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/115675
- (22) 国际申请日: 2019 年 11 月 5 日 (05.11.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201811313891.0 2018年11月6日 (06.11.2018) CN
- (71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。
- (72) 发明人: 沈志成(SHEN, Zhicheng); 中国浙江省杭州西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。张先文(ZHANG, Xianwen); 中国浙江省杭州西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。王东芳(WANG, Dongfang); 中国浙江省杭州西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。赵宇(ZHAO, Yu); 中国浙江省杭州西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。
- (74) 代理人: 杭州天正专利事务所有限公司(TIANZHENG PATENT ATTORNEYS); 中国浙江省杭州上城区庆春路 9 号长堤明苑 22 层 B 座王兵, Zhejiang 310009 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

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

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

本国际公布:

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

(54) Title: TRANSGENIC MAIZE NUCLEAR MALE STERILITY MAINTAINER LINE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种转基因玉米核雄性不育保持系及应用

(57) Abstract: Disclosed by the present invention are a transgenic maize nuclear male-sterile maintainer line and an application thereof. The maintainer line is constructed by introducing an exogenous T-DNA vector into a maize genome. Other than a fertility restoring gene having genic male sterility, the introduced exogenous T-DNA also contains at least two of the following three functional fragments: 1) an expression frame for expressing fluorescent protein in seed endosperms; 2) a DNA fragment capable of inhibiting the expression of corn herbicide resistance gene CYP81A9; and 3) a DNA fragment capable of inhibiting the expression of cell wall converting enzyme InCW2 specifically expressed in maize endosperm. The present invention simultaneously utilizes at least two of the three methods for discriminating transgenic and non-transgenic, thereby further reducing errors that may be caused by relying only on one discrimination (or selection) method.

(57) 摘要: 本发明公开了一种转基因玉米核雄性不育保持系及应用, 所述保持系是将外源T-DNA载体导入玉米基因组构建而成, 导入的外源T-DNA中除了雄性核不育的育性恢复基因以外, 还包含如下3种功能片段中至少2个功能片段: 1)在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框; 2)一种可以抑制玉米抗除草剂基因CYP81A9表达的DNA片段; 3)一种可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶InCW2表达的DNA片段。本发明同时利用上述三种区分转基因与非转基因方法中至少2种方法, 进一步降低仅仅依靠一种区分(或选择)方法可能导致的错误。

WO 2020/093997 A1

一种转基因玉米核雄性不育保持系及应用

(一) 技术领域

本发明涉及一种转基因玉米核雄性不育保持系及其应用。

(二) 背景技术

杂交优势的利用给粮食的增产最重要的技术之一。玉米生产中通常通过 2 个自交系杂交制备杂交种子。杂交种子比较自交种子在生产上更加具有产量、抗性等方面的优势。在生产上目前大部分的杂交种子的生产仍然通过人工或者机械去雄的方法，成本高，工作量大。而且在生产杂交种的过程中由于环境的变化可能导致去雄完成后植株又雄穗化，或去雄不完全，从而导致母本自交授粉，影响杂交种子纯度。

雄性不育系统提供了简单高效的制备杂交玉米种子的手段。比较成熟的杂交技术体系是基于核-质互作雄性不育(CMS)自交系的三系杂交制种体系。该技术包括 3 个主要材料：1) 不育系：雄性不育材料；2) 保持系：可以为不育系提供花粉，使不育系的后代仍为不育系；3) 恢复系：可以恢复不育系的育性。不育系与恢复系杂交产生 F1，即用于农业生产的杂交种。更具体的说，核-质互作不育型，表现为核-质互作遗传。不但需要细胞质有不育基因 S，而且需要细胞核里有纯合的不育基因(rf/rf)，二者同时存在，方能使植株表现为雄性不育。CMS 三系杂交制种体系存在恢复系比较难找、技术体系复杂等缺陷，在玉米制种上推广面积仍然比较小。

利用核基因隐性不育基因是玉米杂交制种的另外一个可能的技术路线。控制雄性不育的核基因隐性纯合(ms/ms)植株才会表现为雄性不育，由于雄性不育植株无法自交，因此只能通过杂合植株(Ms/ms)与其杂交，才会得到雄性不育植株(ms/ms)。但是在同一果穗上雄性不育籽粒(ms/ms)与可育的杂合籽粒(Ms/ms)同时存在，无法简单通过物理方法分辨。

目前一种利用隐性核不育基因制备杂交玉米种子的新方法已经报道 (Wu et al., Plant Biotechnology, 14:1046-1054; An et al., Molecular Plant 12, 343-359; Wu et al., Shukla et al., Molecular Biotechnology 59, 445-457; 美国专利 7,612,251)。这种方法利用转基因的不育保持系制备非转基因的核雄性不育玉米种子。这个方法的技术要点是：转基因玉米保持系是在一个隐性核不育纯合系(如 ms45/ms45)中导入了包含如下表达框的外源 DNA：1) 一个正常野生型的雄性育性基因(例如，Ms45)，其功能是互补导致雄性核不育基因(如 ms45)从而挽救育性；2) 一个种子颜色的标记基因(荧光蛋白质基因)；3) 一个在花粉中表达的 α -淀粉酶基因，导致转基因花粉因为没有淀粉而不能萌发。这个技术体系中纯合隐性不育基因(如 ms45/ms45)被转基因导入的野生型基因(如 MS45)互补而表现为雄性可育。同时由于转基因的花粉因其表达的 α -淀粉酶而不能萌发，因此外源基因是不能纯合的。不带外源 DNA 的 50%花粉(非转基因)能够成功授粉于纯合的核性不育(如 ms45/ms45)的雌配子，从而获得雄性不育玉米种子。这些种子可以作为玉米杂交制种的母本。由于导入的外源 DNA 包含一个在胚乳中表达的荧光蛋白质基因，包含有外源

DNA 并且可育的种子因此可以与不包含外源 DNA 的雄性不育种子可以利用荧光特征而区分。这种技术可以简化玉米杂交制种的程序，降低成本。

中国发明专利 CN102960234B 披露了另外一种利用转基因的不育保持系制备非转基因的核不育玉米的方法。该方法的特点是利用种子大小而不是种子荧光蛋白质的荧光区分雄性不育种子和雄性可育种子。其技术方案是构建了干扰玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 (endosperm-specific cell wall invertase, InCW2) 基因 (Cheng et al. Plant Cell 8: 971-983) 的干扰表达框，将该基因沉默。InCW2 沉默后玉米籽粒变小。这种技术区别雄性不育种子和雄性可育种子的方法非常简单。

但是无论是利用表达荧光蛋白质还是利用玉米籽粒大小作为区分雄性不育和雄性可育的种子方法仍然可能在一定程度存在不足。区分雄性不育和可育种子的错误都可以导致杂交种子的纯度降低，并且将转基因玉米传播到食物链（雄性不育玉米是非转基因玉米）。为了提高制种纯度，本发明提供了同时利用 2 种选择性状，通过 2 次筛选以获得纯度更高的雄性不育种子的技术路线。本发明的方法比现有的方法更加能够提高雄性不育系玉米的纯度并且防止转基因恢复系进入大田生产体系。特别是，本发明创造性地将转基因玉米的选择性杀灭技术应用于提高雄性不育系玉米的纯度。在玉米中通过 RNA 干扰抑制耐除草剂基因 CYP81A9 的表达可以导致转基因玉米对烟嘧磺隆等除草剂敏感。这些转基因玉米可以被烟嘧磺隆等除草剂选择性杀灭 (Li, Jing, et al., 2013, Plos One 8(12):e81645)。

（三） 发明内容

本发明的目的是提供一种转基因玉米核雄性不育保持系的构建与应用。这种转基因保持系的种子的特点是利用 2 种或多种与雄性不育系种子区别的标记，能够进一步降低和防止转基因保持系种子混入商业杂交种的风险。本发明综合利用了包括种子荧光颜色标记、种子形状大小标记技术以及除草剂敏感性标记（转基因玉米可以被选择性杀灭），而以前的技术仅仅利用一个标记，如荧光蛋白质标记 (Wu et al., Plant Biotechnology, 14:1046-1054; 美国专利 7,612,251)，或者控制种子大小的标记（中国专利 CN102960234B）。

本发明需要利用雄性核不育玉米材料，表 1 例举了部分目前已经报道的雄性核不育玉米材料，它们控制的基因已经被克隆或可以被克隆。已知不育基因的雄性不育材料也可以通过基因编辑的方法获得核雄性不育的玉米材料。例如，通过基因编辑的方法可以获得 ms45 和 ms26 的雄性不育突变体 (Svitashev et al., Nature Communications 7, 13274)。本发明以表 1 中的一个雄性不育突变体 ms45 为例，提供一种利用隐性核不育玉米制备杂交种子的方法。下文通过说明和阐述提供了更为详细的描述，但这并非意欲对本发明的范围加以限制。

本发明采用的技术方案是：

本发明提供一种转基因玉米核雄性不育保持系，所述转基因玉米保持系是将外源 T-DNA 载体导入玉米基因组构建而成，所述外源 T-DNA 载体中除了雄性核不育的育性恢复基因 Ms45 表达框（即不育系育性恢复表达框）以外，还包含如下 3 种功能片段中至少 2 个：1) 在种子胚乳中表

达荧光蛋白的表达框（即使得保持系种子与不育系种子相比具有肉眼可见的颜色上的显著差异的表达框）；2）一种可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 (nsf1)表达的功能片段（即植物内源抗除草剂基因的沉默或敲除表达框），3）一种可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 (endosperm-specific cell wall invertase/InCW2)表达的功能片段（即使得保持系种子与不育系种子相比具有肉眼可见的形状上的显著差异的表达框）。

进一步，优选所述外源 T-DNA 载体中除了雄性核不育的育性恢复基因以外，还包含如下 2 个表达框：1）在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框；2）一种可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的功能片段。

进一步，优选所述外源 T-DNA 载体中除了雄性核不育的育性恢复基因以外，还包含至少如下 2 个表达框：1）在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框；2）一种可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶(InCW2)的功能片段。

进一步，优选所述外源 T-DNA 载体中除了雄性核不育的育性恢复基因以外，还包含至少如下 2 个表达框：1）一种可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的功能片段；2）一种可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶(InCW2)的功能片段。

本发明所述雄性核不育的育性恢复基因表达框由启动子、育性恢复基因、终止子功能性连接组成，该表达框所表达的功能蛋白质回补了核不育玉米中突变失去的雄性育性功能基因，从而可以恢复核不育玉米的雄性育性。本发明优选能够恢复 ms45 核不育玉米 (ms45/ms45) 育性的基因表达框，即 Ms45 基因表达框。Ms45 基因需要与能够启动其适当表达的启动子和终止子功能性连接，这些启动子和终止子可以有多重选择，比较优先的选择是这些基因的天然启动子和终止子。能够驱动在植物中适当表达的启动子和终止子已经有大量文献资料。根据需要可以选择表达水平和表达时空合适的启动子。例如，美国专利 5,689,049 披露的启动子 5126 可以驱动花药 (anther) 特异表达，是启动 Ms45 基因的优选启动子之一。

表 1：由核基因引起的雄性不育突变体

突变体	所在染色体号	参考文献
ms1	6	SINGLETON and JONES (1930); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms2	9	EYSTER (1931); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms3	3	EYSTER (1931)
ms4(pol)		BEADLE (1932)
ms5	5	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms6(pol)		BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms7	7	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms8	8	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms9	1	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms10	10	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms11	10	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms12	1	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms13	5	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms14	1	BEADLE (1932); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms15		BEADLE (1932)

ms16		BEADLE (1932)
ms17	1	EMERSON (1932a); ALBERTSEN and PHILLIPS (1981)
ms18	1	EYSTER (1934)
ms19	9	EYSTER (1934)
ms20		EYSTER (1934)
ms21	6	SCHWARTZ (1951)
ms22(msc1)	7	WEST and ALBERTSEN (1985) ; TRIMNELL et al. (2001); CHAUBAL et al. (2003)
ms23		WEST and ALBERTSEN (1985); CHAUBAL et al. (2000)
ms24	10	WEST and ALBERTSEN (1985); FOX et al. (2002)
ms25	9	LOUKIDES et al. (1995)
ms26	1	LOUKIDES et al. (1995)
ms27		ALBERTSEN (1996);
ms28	1	GOLUBOVSKAYA and SITNOKOVA (1980)
ms29	10	TRIMNELL et al. (1998a)
ms30(msx)	4	TRIMNELL et al. (1998b)
ms31	2	TRIMNELL et al. (1998b)
ms32	2	CHAUBAL et al. (2000)
ms33	2	TRIMNELL et al. (1999d)
ms34	7	TRIMNELL et al. (1999b)
ms35(ms23)		TRIMNELL et al. (1999c,2002a);
ms36	9	TRIMNELL et al. (1999c)
ms37	3	TRIMNELL et al. (1999a)
ms38	2	TRIMNELL et al. (1998a); ALBERTSEN et al (1999)
Ms41	4	NEUFFER (1987)
Ms42	5	ALBERTSEN et al (1993b)
ms43	8	GOLUBOVSKAYA (1979)
Ms44	4	ALBERTSEN and SELLNER (1988); ALBERTSEN and NEUFFER (1990)
ms45	9	ALBERTSEN et al (1993a)
ms47	10	TRIMNELL et al. (2002b)
ms48	9	TRIMNELL et al. (2002c)
ms49	10	TRIMNELL et al. (2002d)
ms50	6	TRIMNELL et al. (2002e)

本发明所述在种子胚乳中表达荧光蛋白质的表达框是由启动子、荧光蛋白质基因和终止子功能性连接而成。这个表达框的荧光蛋白质基因可以是红色荧光蛋白质 (red fluorescent gene)、青色荧光蛋白 (cyan fluorescent protein gene)、黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein gene)、绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein gene)、花青素 p1 基因 (anthocyanin p1 gene) 等。这些荧光蛋白基因在胚乳中的表达, 使获得的转基因种子可以通过简单的物理方法与没有表达这些基因的种子区分开来。这个表达框的启动子是能够驱动在玉米胚乳中高表达的启动子。优选的启动子是玉米或水稻的胚乳储存蛋白质的启动子。例如水稻的 GluA-1、GluA-2、GluA-3、GluB-3、GluB-5 和 GluC 启动子 (Qu et al., J Exp Bot. 59: 2417–2424; Xu et al., Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 128:125–132), 玉米的 α -zein 启动子 (Joshi et al., Physiol Mol Biol Plants 21: 35–42) 等。一些组成型启动子也可以启动基因在胚乳中较高地表达。水稻或者玉米的胚乳储存蛋白质的信号肽可以用来与这些荧光蛋白质融合, 使这些蛋白质表达以后能够适当存储和积累。这些启动子、编码带有信号肽的荧光蛋白质的核苷酸序列以及终止子的核苷酸序列, 通过功能性连接而形成完整

的荧光蛋白质的表达框。用于构建表达框的终止子可以是 CaMV 的 35S 终止子，也可以是其它在玉米中具有功能的终止子。例如，SEQ ID No. 5 的序列是一个能够在胚乳中表达红色荧光蛋白质的表达框。

本发明所述抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶(endosperm-specific cell wall invertase, InCW2)基因表达的功能片段可以通过不同的原理构建。本发明优选以双链 RNA 干扰 InCW2 表达的方法。抑制表达框的具体构建方法如下：1) 构建一个 DNA 片段，其二端是分别来自 InCW2 的一个 DNA 片段以及这个片段的反向重复序列片段。在这二个 DNA 片段中间加入一个其他任何 DNA 片段，优选是 InCW2 基因的部分内含子序列。由于这个片段中存在 2 个反向重复 InCW2 基因序列片段，转录这个 DNA 片段获得的 RNA 就可以形成发夹结构的双链 RNA (dsRNA)。这个反向重复序列片段的 5' 端与一个启动子功能性连接，3' 端与一个终止子功能性连接，形成一个 DNA 功能片段。这个功能片段的启动子可以是能够启动组成型表达的启动子或者启动胚乳中特异性表达的启动子，优选启动子是 InCW2 基因的天然启动子；终止子可以是在玉米中具有终止子功能的不同种类的终止子，包括 InCW2 基因的天然终止子。构建这个抑制表达片段使用的 DNA 序列来自 InCW2 (SEQ ID NO:8)，其长度和位置可以不同，抑制效果可以通过实验测定，选择抑制效率比较高的构建片段。SEQ ID No. 6 (其中第 7 bp-950 bp 为 InCW2 启动子；第 977 bp-1930 bp 为能够形成靶向 InCW2 基因的双链 RNA 功能片段；第 1931 bp-2150 bp 为 CaMV 的 35S 终止子) 提供了一种能够干扰 InCW2 表达的功能片段的核苷酸序列，这个功能片段能够导致玉米种子变小。

基因沉默技术是一个成熟的技术 (Agrawal et al., Microbiol Mol Biol Rev. 67: 657-685)，抑制 InCW2 基因表达的方法还有：1) 反义 RNA 方法，这个方法是让转基因植物产生一个靶标基因的反义 RNA 以抑制对应基因的表达；2) 人工 miRNA 方法，这个方法设计一个能够抑制靶标基因表达的人工 miRNA (Schwab et al. Plant Cell 18, 1121-1133)。

本发明所述抑制玉米抗除草剂基因 CYP78A9 表达的功能片段可以通过不同的原理构建。以双链 RNA 干扰 CYP78A9 表达的方法为例，通过沉默植物内源耐除草剂基因来实现，由“组成型启动子-发夹 RNA-终止子”构成。CYP81A9 基因 RNA 干扰功能片段具体构建方法如下：1) 构建一个 DNA 片段，其二端是分别来自 CYP78A9 的一个 DNA 片段以及这个片段的反向重复序列片段。在这二个 DNA 片段中间加入一个其他任何 DNA 片段，优选是来自 CYP78A9 基因的内含子序列。由于这个片段中存在 2 个反向重复 CYP78A9 基因序列片段，转录这个 DNA 片段获得的 RNA 就可以形成发夹结构的双链 RNA (dsRNA)。这个反向重复序列片段的 5' 端与一个启动子功能性连接，3' 端与一个终止子功能性连接，形成一个 DNA 功能片段。这个功能片段的启动子可以是能够启动组成型表达的启动子，如 CaMV 的 35S 启动子；终止子可以是在玉米中转基因研究中常用的终止子，如 CaMV 的 35S 终止子。构建这个抑制表达片段使用的 CYP78A9 基因序列来自 SEQ ID NO: 9。这个片段转录获得的 dsRNA 的长度和序列可以不同，其抑制效果可以通过实验进行测定，选择抑制效率比较高的构建片段。

抑制玉米抗除草剂基因 CYP78A9 表达的方法还可以：1) 反义 RNA 方法，这个方法是让转基因植物产生靶标基因 CYP78A9 的反义 RNA 以抑制 CYP78A9 基因的表达；2) 人工 miRNA 方法 (Schwab et al. Plant Cell 18, 1121-1133)。利用这个方法可以设计一个能够抑制靶标基因 CYP78A9 表达的人工 miRNA 功能片段。

转基因玉米中包含抑制玉米抗除草剂基因 CYP78A9 表达的功能片段可以导致转基因玉米对除草剂烟嘧磺隆、苯达松等除草剂敏感，从而这些转基因玉米可以被除草剂选择性地杀灭。

本发明所述转基因玉米核雄性不育保持系的外源 T-DNA 质粒中还可以同时包括以下的表达框：

1) 在花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框 (即导致含有上述表达框的花粉不育的表达框)。通过导入一个使花粉失活的基因来实现，由“启动子- α -淀粉酶-终止子”构成，优选表达框核苷酸序列为 SEQ ID.NO: 4 (其中第 13 bp-2053 bp 为 pPg47 启动子；第 2054 bp-2278 bp 为 BRITTLE1 (BT1) 基因的淀粉体的信号肽序列；第 2279 bp-3838 bp 为淀粉酶基因编码区；第 3839 bp-4039 bp 为终止子) 所示。这个表达框的启动子可以是 PG47 和 ZM13 启动子 (Hamilton et al., Plant Mol. Biol. 38:663-669)。这个表达框的 α -淀粉酶可以是 *Bacillus stearothermophilus* 的 α -淀粉酶 (gb: A24549)，或者玉米的淀粉酶基因 (gb: ADH43281.1)，也可以是其它来源的 α -淀粉酶。将 α -淀粉酶的信号肽切除，然后用来自 BRITTLE1 (BT1) 基因的淀粉体的信号肽 (Sullivan et al., Plant Cell 3: 1337-1348) 替换。这个表达框所表达的产物可以导致玉米花粉缺乏淀粉而不能萌发，进而导致雄性不育。这样就可以实现转基因玉米的外源 DNA 保持是杂合状态，而不是纯合状态。

2) 选择标记表达框 (即除草剂抗性基因表达框)。赋予保持系一种或多种除草剂抗性，通过导入一个耐除草剂基因来实现，由“启动子-抗除草剂基因-终止子”构成。优选除草剂抗性基因表达框为草铵膦耐受基因 bar 表达框，序列如 SEQ ID No. 2 (其中第 1 bp-2002 bp 为 pUbi 启动子；第 2052 bp-2600 bp 为 bar 基因编码区；第 2610 bp-2947 bp 为 rbcS 终止子) 所示。抗草甘膦基因表达框或者抗草铵膦表达框是常用的选择标记表达框。例如利用草甘膦作为筛选化合物的方法已有详细描述 (Howe et al., Molecular Breeding 10:153-164; Zhou et al., Plant Cell Reports 15, 159-163)。采用的启动子优选 组成型启动子，如花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子 p35S (Odell, Joan T., Ferenc Nagy, and Nam-Hai Chua, 1985, Nature, 810-812)、水稻的 Actin1 启动子 pAct1 (McElroy D, Zhang W, Cao J, et al., 1990, The Plant Cell, 2: 163-171.)、玉米 Ubiquitin 启动子 pUbi (Christensen A H, Sharrock R A, Quail P H, 1992, Plant molecular biology, 18: 675-689) 及其具有类似表达模式的启动子；抗除草剂基因可以是抗草甘膦基因 CP4-EPSPS (孟山都公司)、G10 (中国专利: 2011100093290)，抗草铵膦基因 bar (Thompson C J, Movva N R, Tizard R, et al, 1987, The EMBO journal, 6(9): 2519.) 及其具有类似功能的基因。

进一步，本发明所述外源 T-DNA 载体包含如下表达框：1) Ms45 表达框；2) 红色荧光蛋白质表达框；3) CYP78A9 基因抑制表达功能片段；4) 花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框；5) 选择标记表达框。

另一种 T-DNA 可以是包含如下表达框：1) Ms45 表达框；2) InCW2 抑制表达功能片段；3) CYP78A9 基因抑制表达功能片段；4) 花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框；5) 选择标记表达框。

还有一种 T-DNA 可以是包含如下表达框：1) Ms45 表达框；2) 红色荧光蛋白质表达框；3) InCW2 抑制表达功能片段；4) 花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框；5) 抗草铵膦基因表达框。

能够实现本发明目的的包含这些表达框和功能片段的其它 T-DNA 同样可以通过一般分子生物学方法构建。并且，这些表达框和功能片段的方向和次序的不同并不能影响实现本发明的目的。

本发明还提供一种含所述转基因玉米核雄性不育保持系中 T-DNA 载体的植物细胞。

将包含上述几个表达框的 DNA 构建体通过农杆菌介导的方法或者其它方法导入到玉米。玉米的遗传转化是成熟的技术，这个领域的一般技术人员就可以实现。相关转化方法已经多次公开发表，例如 Yadava et al., Front. Plant Sci. 7:1949。转化获得的转化体需要进一步选择以获得实现本发明目的所需要的转化体。

导入了本发明提供的外源基因的玉米转化体可以通过回交转育将外源基因整合到核雄性不育的玉米基因组中。利用雄性不育杂合基因型 Ms45/ms45 植株与筛选获得的转化体植株进行多次回交，从而将包含外源 MS45 恢复基因导入到雄性纯合不育突变体 ms45 中，获得基因型 Ms45/-, ms45/ms45 的植株。由于导入的外源基因中野生型 MS45 基因的存在，转基因植株(Ms45/-, ms45/ms45)表现为可育。

当转基因杂合体植株(基因型 Ms45/-, ms45/ms45)自交时，会产生两种后代，一种为不含有外源转基因序列的雄性不育籽粒 (ms45/ms45)，该不育籽粒可以被任意一种野生型植株(Ms45/Ms45)恢复育性，在制种过程中可作为不育系（母本）；另一种为籽粒雄性育性被恢复（Ms45/-, ms45/ms45），可以作为恢复系制备下一季不育系种子。

本发明的主要技术目的是确保雄性不育玉米 (ms45/ms45)中没有混杂包含外源基因的雄性育性被恢复的转基因玉米 (Ms45/-, ms45/ms45)。而本发明的关键技术措施是采用了至少二种清除转基因玉米的方法，大幅度降低雄性不育玉米中混杂雄性育性被恢复的转基因玉米 (Ms45/-, ms45/ms45) 的可能性。

本发明提供一种所述转基因玉米核雄性不育保持系在制备非转基因核不育种子中的应用，所述应用的方法为：将转基因玉米核雄性不育保持系与纯合隐性不育系间隔种植，通过下列方法之一筛选非转基因核不育种子：

(1) 当导入的外源基因包含荧光蛋白质和抑制 CYP78A9 表达功能片段的转基因玉米时：通过荧光识别去除绝大部分的转基因雄性可育籽粒，获得的雄性不育种子在制种过程中，在雄性不育母本生长到 2-8 叶时期进一步喷洒足够剂量的烟嘧磺隆和/或苯达松杀灭混杂的转基因玉米。这样就进一步排除了转基因雄性可育的玉米株，进一步提高杂交玉米的纯度。

(2) 当导入的外源基因包含荧光蛋白质和抑制 InCW2 表达功能片段的转基因玉米时：通过荧光识别就可以去除绝大部分的转基因雄性可育籽粒，获得的雄性不育种子进一步去除籽粒比较小（如，至少比平均重量小 30%以上）的种子。可能混杂的转基因种子(雄性可育)就可以被进一步

步去除。这样通过 2 个性状的选择，进一步排除了雄性可育的玉米株，提高杂交玉米的纯度。

(3) 当导入的外源基因包含抑制 CYP78A9 表达功能片段和抑制 InCW2 表达功能片段的转基因玉米时：通过去除小种子（至少比平均重量小 30% 以上）排除绝大部分的转基因雄性可育籽粒，获得的雄性不育种子在制种过程中，在雄性不育母本生长到 2-8 叶时期进一步喷洒足够剂量的烟嘧磺隆和/或苯达松杀灭混杂的转基因玉米。

与现有的技术相比，本发明的优点要体现在：本发明同时利用上述三种区分转基因与非转基因方法中至少 2 种方法，进一步降低仅仅依靠一种区分（或选择）方法可能导致的错误。

(四) 附图说明

图 1. 含有雄性生育力恢复基因 Ms45 及籽粒选择基因的三种 T-DNA 结构示意图（TWS-HC, TWS-HS 和 TWS-CS）。LB: T-DNA 左边界；RB: T-DNA 右边界；pPg47-Amy: 在花粉中表达的 α -淀粉酶基因表达框；p5126-MS45: Ms45（野生型）基因表达框；pGtl-red: 在胚乳中特异性表达的红色荧光蛋白质表达框；CYP81A9-RNAi: 产生 dsRNA 抑制 CYP81A9 基因表达的功能片段；InCW2-RNAi: 产生 dsRNA 抑制 InCW2 基因的表的功能片段；pUbi-Bar: 抗草铵膦基因表达框；bar: 抗草铵膦基因编码序列。抗草铵膦基因作为玉米转化的选择基因。p35S: CaMV 的 35S 启动子；35sT: CaMV 的 35S 终止子。箭头方向是 5' 到 3'，即启动子、基因和终止子的顺序。

(五) 具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述，但本发明的保护范围并不仅限于此：

在不背离本发明的精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所做的修改或替换均属于本发明的范围。本文使用的 DNA 及其载体的构建方法是分子生物学一般的方法。大部分 DNA 片段可以根据提供的核苷酸序列人工合成，简化构建过程。

实施例 1、T-DNA 载体构建

1、为了构建转化玉米的 T-DNA 载体，分别合成或者构建以下 DNA 片段：

(1) 合成包含来自 CYP81A9 (nsf1) 的反向重复 DNA 序列片段（核苷酸序列如 SEQ ID No. 1）。该片段转录为 RNA 时能够形成双链 RNA (dsRNA)，能够干扰 CYP81A9 的表达。序列两边都设置了限制性内切酶位点 XhoI。这个片段的 3' 端与 CaMV 的 35S 启动子连接，5' 端与 CaMV 的 35S 终止子连接，形成一个可以抑制抗除草剂基因 CYP81A9 表达的功能片段，核苷酸序列如 SEQ ID No: 10 所示（其中第 1 bp-781 bp 为 CaMV 的 35S 启动子；第 788 bp-2428 bp 为能够形成靶向 CYP81A9 基因的双链 RNA 功能片段；第 2436 bp-2619 bp 为 CaMV 的 35S 终止子），命名为 nsf1-RNAi (p35S-CYP81A9-RNAi-35sT)。

(2) 合成抗草铵膦基因编码序列，序列如 SEQ ID No. 7 所示，命名 bar，序列两端分别设置 XhoI 限制性酶切位点。

(3) 合成草铵膦耐受基因 bar 表达框（即除草剂抗性基因表达框）DNA 片段。核苷酸序列如 SEQ ID No. 2 所示，命名为 pUbi-Bar，包含了启动子，bar 基因和终止子（其中第 1 bp-2002 bp

为 pUbi 启动子；第 2052 bp-2600 bp 为 bar 基因编码区；第 2610 bp-2947 bp 为 rbcS 终止子）。序列 5'端依次设置 EcoRI 和 HpaI 限制性酶切位点，3'端设置 EcoRI 限制性酶切位点。

(3) 育性恢复基因 Ms45 的表达框（即不育系育性恢复表达框），序列如 SEQ ID No. 3 所示（其中第 7 bp-511 bp 为 p5126 启动子；第 512 bp-2059 bp 为 Ms45 基因编码区；第 2060 bp-2462 bp 为 Ms45 终止子），命名 p5126-Ms45。这个序列包括了启动子、Ms45 编码序列和终止子，序列两端分别设置 HpaI 限制性酶切位点。序列 5'端设置 HpaI 限制性酶切位点，3'端依次设置 KpnI 和 HpaI 限制性酶切位点。

(4) 花粉中特异表达的淀粉酶表达框（即导致含有上述表达框的花粉不育的表达框），序列如 SEQ ID No. 4 所示，命名 pPg47-Amy，包括了启动子、淀粉酶蛋白质编码序列和终止子（其中第 13 bp-2053 bp 为 pPg47 启动子；第 2054 bp-2278 bp 为 BRITTLE1 (BT1) 基因的淀粉体的信号肽序列；第 2279 bp-3838 bp 为淀粉酶基因编码区；第 3839 bp-4039 bp 为终止子）。序列 5'端依次设置 KpnI 和 HpaI 限制性酶切位点，3'端设置 HindIII 限制性酶切位点。

(5) 玉米种子特异表达的红色荧光蛋白基因表达框（即使保持系种子与不育系种子相比具有物理性状显著差异的表达框）。序列如 SEQ ID No. 5（其中第 7 bp-845 bp 为 Gt1 启动子；第 846 bp-917 bp 为 Gt1 蛋白信号肽；第 918 bp-1622 bp 为红色荧光蛋白基因编码区；第 1639 bp-1825 bp 为终止子）所示，命名 pGt1-Red，包括了启动子、蛋白质编码序列和终止子。序列两端分别设置 HindIII 限制性酶切位点。

(6) 抑制 InCW2 基因表达的 RNA 干扰功能片段（即使得保持系种子与不育系种子相比具有肉眼可见的显著差异的功能片段）。序列如 SEQ ID No. 6 所示，命名为 InCW2-RNAi，序列两端分别设置 HindIII 位点。

2、构建包含 pGt1-Red 和 nsf1-RNAi 功能片段的 T-DNA 载体

以二元载体 pCambia1300 为基础，利用 XhoI 酶切位点，把 pCambia1300 载体中自带的抗潮霉素基因 hptII 置换为 CYP81A9 基因 RNAi 片段（SEQ ID No.1），获得载体 pCambia1300-nsf1-RNAi。然后利用酶切位点 EcoRI 把人工合成的 pUbi-Bar（SEQ ID No.2）克隆到 pCambia1300-nsf1-RNAi 中，获得载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar。再利用酶切位点 HpaI 把 p5126-Ms45 片段（SEQ ID No.3）连入载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar 中，获得载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar-p5126-Ms45。然后，利用 KpnI 和 HindIII，把 pPg47-Amy 片段（SEQ ID No.4）连入载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar-p5126-Ms45 中，获得载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar-p5126-Ms45-pPg47-Amy 载体。最后，通过 HindIII，把人工合成的 pGt1-red（SEQ ID No.5）连入载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar-p5126-Ms45-pPg47-Amy 中，获得载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar-p5126-Ms45-pPg47-Amy-pGt1-red，这个载体命名为：TWS-HC，该载体中的 T-DNA 序列的结构如图 1 所示。

3、构建包含 nsf1-RNAi 和 InCW2-RNAi 功能片段的 T-DNA 载体

将载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar-p5126-Ms45-pPg47-Amy-pGt1-red 中的 pGt1-red 片

段替换成人工合成的 InCW2-RNAi 片段 (SEQ ID No.6) 即可。最终获得载体 pCambia1300-nsf1-RNAi-pUbi-bar-p5126-Ms45-pPg47-Amy-InCW2-RNAi, 这个载体命名为 TWS-HS, 该载体中的 T-DNA 序列的结构如图 1 所示。

4、构建包含 InCW2 RNAi 和 pGt1-Red 功能片段的 T-DNA 载体

以二元载体 pCambia1300 为基础, 利用 XhoI 酶切位点, 把其中自带的抗潮霉素基因 hptII 置换为 bar 基因 (SEQ ID No.7) 片段, 获得 pCambia1300-p35S-bar 的载体。利用 KpnI 和 HindIII, 把 pPg47-Amy 片段 (SEQ ID No.4) 连入载体 pCambia1300-p35S-bar, 获得 pCambia1300-p35S-bar-pPg47-Amy 载体。然后, 再利用酶切位点 HpaI 把 p5126-Ms45 片段 (SEQ ID No.3) 连入载体 pCambia1300-p35S-bar-pPg47-Amy 中, 获得载体 pCambia1300-p35S-bar-p5126-Ms45-pPg47-Amy。最后, 通过 HindIII, 把人工合成的 pGt1-red (SEQ ID No.5) 和 InCW2-RNAi (SEQ ID No.6) 连入载体 pCambia1300-p35S-bar-pPg47-Amy-p5126-Ms45 中, 获得载体 pCambia1300-p35S-bar-pPg47-Amy-p5126-Ms45-pGt1-red-InCW2-RNAi, 这个载体命名为: TWS-CS, 该载体中的 T-DNA 序列的结构如图 1 所示。

最后, 通过电转的方法把上述 T-DNA 质粒转入农杆菌 LB4404 中, 通过含有 15 $\mu\text{g/ml}$ 四环素和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素的 YEP 固体培养基筛选出阳性克隆, 并保菌, 用于接下来的植物转化。

实施例 2、玉米转化

玉米的转化方法已经比较成熟, 例如 Frame 等描述了利用农杆菌转化玉米的方法(Frame et al., (2002) Plant Physiol, 129: 13-22)或 (Yadava et al., Front. Plant Sci. 7:1949)。分别取含载体 TWS-HC、TWS-HS 和 TWS-CS 的农杆菌 (即含 T-DNA 载体的农杆菌) 划线, 挑单菌落接种, 准备转化用农杆菌。玉米转化中所用受体为自交系 HiIIA 和 HiIIB 的杂交 F1 代。取授粉后 8-12 天的玉米穗。收集所有的未成熟胚 (大小为 1.0-1.5 mm)。将含有 T-DNA 载体的农杆菌与未成熟胚共培养 2-3 天 (22 $^{\circ}\text{C}$)。转移未成熟胚到愈伤诱导培养基上 (培养基中含有 200 mg/L 的 Timentin, 用于杀灭农杆菌), 28 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 10-14 天。将所有的愈伤转到带有终浓度 2 mM 草铵膦的筛选培养基上 (Frame et al., (2002) Plant Physiol, 129: 13-22), 28 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 2-3 周。转移所有的组织到新鲜含终浓度 2 mM 草铵膦的筛选培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 2-3 周。然后, 转移所有筛选后成活的胚性组织到再生培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 10-14 天, 每皿一个株系。转移胚性组织到新鲜的再生培养基上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养 10-14 天。转移所有发育完全的植株到生根培养基上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养直到根发育完全, 然后移植到温室中单株培养, 检测转基因玉米的抗除草剂能力。用稀释 200 倍的拜耳的 18% 的草铵膦水剂喷洒, 7 天后叶片发黄, 枯死的为阴性; 和喷清水对照长势一样的为阳性植株, 分别获得用载体 TWS-HC、TWS-HS 和 TWS-CS 转化获得的转基因玉米品系。

实施例 3 转化体选择

对来自实施例 2 的转基因植株进行评估, 选择同时满足如下 3 个条件的转化体: 1) 能够挽救

纯合不育背景下 ($ms45/ms45$) 玉米的育性; 2) 目的基因控制的种子荧光、大小或除草剂敏感性等性状显著; 3) 转基因的花粉不能萌发。

首先, 选择的转化体都必须在纯合的 $ms45$ 不育背景下 ($ms45/ms45$) 表现为雄性可育, 即转化体具有雄性不育的恢复能力。方法是: 将雄性不育杂合子 ($ms45/Ms45$, 表现为可育) 的花粉受到转基因植株的玉米棒子上, 在后代中选择背景是 $Ms45/ms45$ 的转基因玉米 ($Ms45$ (外源) /-, $ms45/Ms45$), 自交。从自交后代中选择背景是 $ms45/ms45$ 的转基因玉米 ($Ms45$ (外源) /-, $ms45/ms45$), 检测花粉的活性。如果花粉的活性正常, 说明该转化体基因能够恢复雄性的育性能力。选择转基因玉米可以通过喷洒草甘膦 (1 倍大田建议剂量) 实现, 只有转基因玉米株才能成活。选择 $ms45$ 的基因型可以通过分子标记技术实现。

其次, 根据转化的 T-DNA 特征选择性状优良的转化体。

利用载体 TWS-HC 获得的转化体, 选择的主要依据是同时满足: 1) 转基因种子具有明显的红色荧光; 2) 该转基因玉米可以被大田使用剂量 1 倍的烟嘧磺隆杀灭。

利用载体 TWS-CS 获得的转化体, 选择的主要依据是同时满足: 1) 转基因种子具有明显的红色荧光; 2) 转基因玉米籽粒比同样遗传背景的不含有外源基因的籽粒显著小。优选小 50% 或以上的转化体。

利用载体 TWS-HS 获得的转化体, 选择的主要依据是同时满足: 1) 转基因玉米籽粒比同样遗传背景的不含有外源基因的籽粒显著小, 并优选小 50% 或以上的转化体; 2) 该转基因玉米可以被大田使用剂量 1 倍的烟嘧磺隆杀灭。

最后, 通过花粉管萌发试验, 选择大约 50% 的花粉管萌发困难的转化体。

实施例 4 将野生型自交系 ($Ms45Ms45$) 转变为纯合隐性自交系 ($ms45/ms45$)

以 $ms45$ 纯合隐性突变体为母本, 与不同的优良自交系, 如郑 58, 杂交。获得的 F1 继续与郑 58 回交, 对获得的 BC1 群体进行基因型分析, 鉴定 $Ms45$ 位点为杂合的植株继续与郑 58 回交。如此回交 5 代后, 利用分子标记筛选 $Ms45$ 位点为杂合, 其他位点均为郑 58 的单株进行自交, 从而获得 $ms45$ 纯合隐性自交系郑 58 ($ms45/ms45$), 该自交系即可作为不育系。

实施例 5 将外源基因导入 $ms45$ 纯合隐性自交系

将实施例 4 中的回交 5 次的后代郑 58 (杂合子 $ms45/Ms45$) 与实施例 3 中选择获得的转基因植株杂交, 选择带有隐性 $ms45$ 和外源基因的后代, 然后再以实施例 4 中回交 5 次的郑 58 后代 (杂合子 $ms45/Ms45$) 作为轮回亲本进行 5 代回交, 选择遗传背景与郑 58 相似、带有隐性 $ms45$ 和外源基因的单株。如此 5 代回交以后, 选择选择遗传背景与郑 58 高度相似、带有隐性 $ms45$ 和外源基因的单株进行自交, 并从自交后代中选择含 $ms45$ 隐性纯合基因的转基因自交系 ($Ms45/-$, $ms45/ms45$)。

实施例 6 提高雄性不育种子的纯度

利用载体 TWS-HC 获得的转基因雄性不育保持系制备的不育母本，通过荧光识别就可以去除绝大部分的转基因雄性可育籽粒，在雄性不育母本生长到 2-8 叶时期，进一步喷洒 1 倍的烟嘧磺隆大田建议使用剂量，可能混杂的转基因植株（雄性可育）就可以被杀灭而去除。这样就进一步排除了雄性可育的玉米株，进一步提高杂交玉米的纯度。

利用载体 TWS-CS 获得的转基因雄性不育保持系制备的不育母本，通过荧光识别就可以去除绝大部分的转基因雄性可育籽粒。获得的雄性不育种子进一步去除籽粒比较小（比雄性不育种子平均重量小 30%以上）的种子。可能混杂的转基因种子(雄性可育)就可以被进一步去除。这样就进一步排除了雄性可育的玉米株，进一步提高杂交玉米的纯度。

利用载体TWS-HS获得的转基因雄性不育保持系制备的不育母本，通过去除小种子（至少比雄性不育种子平均重量小30%以上）排除绝大部分的转基因雄性可育籽粒。获得的雄性不育种子在制种过程中，在不育母本生长到2-8叶时期进一步喷洒1倍的大田建议烟嘧磺隆使用剂量。可能混杂的转基因植株(雄性可育)就可以被杀灭而去除。这样就进一步排除了雄性可育的转基因玉米株，进一步提高杂交玉米的纯度。

实施例 7 利用雄性不育保持系大规模扩繁雄性不育自交系（ms45/ms45）

以郑 58 自交系为例，将实施例 5 中的雄性不育保持系郑 58 (Ms45/-, ms45/ms45)与雄性不育系郑 58 (ms45/ms45) 间隔种植，每一行雄性不育保持系郑 58 (Ms45/-, ms45/ms45)，种 5 行雄性不育系郑 58 (ms45/ms45)。由于提供花粉的雄性不育保持系郑 58 产生的活性花粉都是非转基因花粉（转基因花粉不能够萌发），从获得雄性不育系郑 58 (ms45/ms45) 植株上获得的种子仍然都是非转基因的雄性不育种子。

权利要求书

1、一种转基因玉米核雄性不育保持系，其特征在于所述保持系是将外源 T-DNA 载体导入玉米基因组构建而成，导入的外源 T-DNA 中除了雄性核不育的育性恢复基因以外，还包含如下 3 种功能片段中至少 2 个功能片段：1) 在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框；2) 一种可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的 DNA 片段；3) 一种可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 InCW2 表达的 DNA 片段。

2、如权利要求 1 所述转基因玉米核雄性不育保持系，其特征在于外源 T-DNA 中除了雄性核不育的育性恢复基因以外，还包含如下 2 个 DNA 功能片段：1) 在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框；2) 一种可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的 DNA 片段。

3、如权利要求 1 所述转基因玉米核雄性不育保持系，其特征在于外源 T-DNA 中除了雄性核不育的育性恢复基因以外，还包含至少如下 2 个 DNA 功能片段：1) 在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框；2) 一种可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 InCW2 的 DNA 片段。

4、如权利要求 1 所述转基因玉米核雄性不育保持系，其特征在于外源 T-DNA 中除了雄性核不育的育性恢复基因以外，还包含至少如下 2 个 DNA 功能片段：1) 一种可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的 DNA 片段；2) 一种可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 InCW2 的 DNA 片段。

5、如权利要求 1 所述转基因玉米核雄性不育保持系，其特征在于雄性核不育的育性恢复基因核苷酸序列为 SEQ ID NO.3 所示，在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框核苷酸序列为 SEQ ID NO.5 所示；所述可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的 DNA 片段核苷酸序列为 SEQ ID NO.10 所示；所述可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 InCW2 表达的 DNA 片段核苷酸序列为 SEQ ID NO.6 所示。

6、如权利要求 1 所述转基因玉米核雄性不育保持系，其特征在于所述保持系还包含选择标记表达框和/或在花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框，所述选择标记表达框为草铵膦耐受基因表达框。

7、如权利要求 6 所述转基因玉米核雄性不育保持系，其特征在于在花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框核苷酸序列如 SEQ ID No. 4 所示，所述草铵膦耐受基因的核苷酸序列如 SEQ ID No. 7 示。

8、如权利要求 6 所述转基因玉米核雄性不育保持系，其特征在于外源 T-DNA 载体由下列之一表达框构成：（1）抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的 DNA 片段、草铵膦耐受基因表达框、雄性核不育的育性恢复基因表达框、在花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框、在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框；（2）抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的 DNA 片段、草铵膦耐受基因表达框、雄性核不育的育性恢复基因表达框、在花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框、抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 InCW2 表达的 DNA 片段；（3）雄性核不育的育性恢复基因表达框、在花粉中表达的 α -淀粉酶的表达框、在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框、抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 InCW2 表达的 DNA 片段、草铵膦耐受基因表达框。

9、一种含权利要求 1 或 6 所述转基因玉米核雄性不育保持系中 T-DNA 载体的植物细胞。

10、一种权利要求 1 所述转基因玉米核雄性不育保持系在制备非转基因核不育种子中的应用，其特征在于所述应用的方法为：将转基因玉米核雄性不育保持系与纯合隐性不育系间隔种植，通过下列方法之一筛选非转基因核不育种子：（1）当保持系 T-DNA 载体包含在种子胚乳中表达一种荧光蛋白

质的表达框和可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的 DNA 片段时，首先利用荧光识别方法去除荧光种子，然后在出苗以后喷洒烟磺隆和/或苯达松进一步杀灭仍然混杂的转基因苗；（2）当保持系 T-DNA 载体包含在种子胚乳中表达一种荧光蛋白质的表达框和可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 InCW2 的 DNA 片段时，同时采用荧光和籽粒显著小的特征清除转基因种子；（3）当保持系 T-DNA 载体包含可以抑制玉米抗除草剂基因 CYP81A9 表达的 DNA 片段和可以抑制玉米胚乳特异表达的细胞壁转化酶 InCW2 的 DNA 片段时，首先清除籽粒显著小的种子，然后在出苗以后喷洒烟磺隆和/或苯达松进一步杀灭仍然混杂的转基因苗。

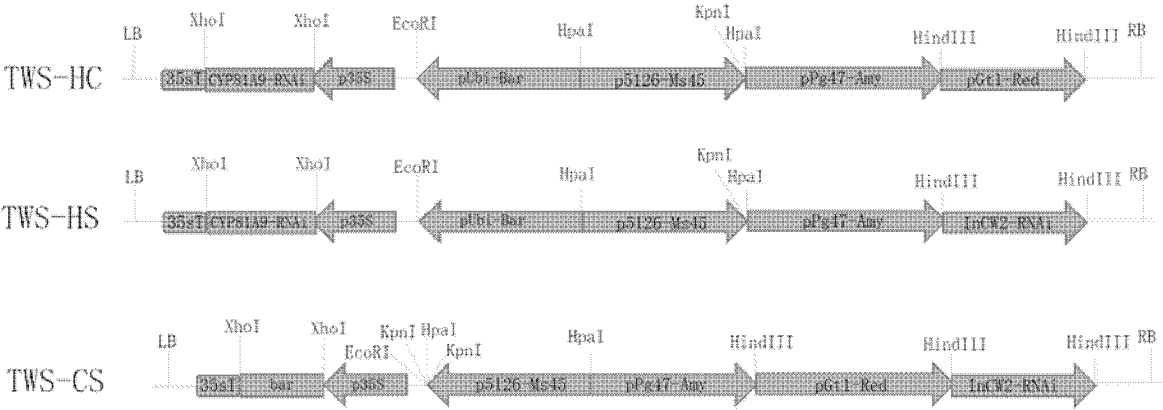


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/115675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 1/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H

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

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

CNABS, CNTXT, CNKI, DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISL Web of Science: 雄性不育, male sterile, 胚乳, endosperm, 隐性, recessive, 纯合, homozygous, 保持系, maintainer line, 荧光, fluorescent, InCW2, endosperm-specific cell wall invertase, 大小, size, 形状, shape, 颜色, color, 性状, trait, character, 等; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 3-7和10; China Patents Biological Sequence Search System and searched sequences: SEQ ID NO: 3-7 and 10

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105018475 A (BEIJING BIO-CHINA TECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 04 November 2015 (2015-11-04) abstract, and claims 1-25	1-10
A	CN 106350536 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 25 January 2017 (2017-01-25) claim 1	1-10
A	CN 102960234 A (CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) 13 March 2013 (2013-03-13) abstract, and claims 1-5	1-10
A	US 7612251 B2 (PIONEER HI BRED INT) 03 November 2009 (2009-11-03) abstract and claims 1-10	1-10
PX	CN 109566396 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 05 April 2019 (2019-04-05) abstract and claims 1-10	1-10

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

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2020

Date of mailing of the international search report

06 February 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/115675

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105018475	A	04 November 2015	CN	105018475	B	22 February 2017
CN	106350536	A	25 January 2017	None			
CN	102960234	A	13 March 2013	CN	102960234	B	20 August 2014
US	7612251	B2	03 November 2009	US	2012005792	A1	05 January 2012
				US	2010287655	A1	11 November 2010
				US	2010313292	A1	09 December 2010
				US	8614367	B2	24 December 2013
				US	7759543	B2	20 July 2010
				US	2010313293	A1	09 December 2010
				US	7759544	B2	20 July 2010
				US	2009183284	A1	16 July 2009
				US	2010313294	A1	09 December 2010
				US	2014215652	A1	31 July 2014
				US	7875764	B2	25 January 2011
				US	2006288440	A1	21 December 2006
				US	7888550	B2	15 February 2011
				US	2011107460	A1	05 May 2011
				US	7888551	B2	15 February 2011
				US	2012227136	A1	06 September 2012
				US	2010017905	A1	21 January 2010
				US	7863500	B2	04 January 2011
				US	7893317	B2	22 February 2011
				US	2010017906	A1	21 January 2010
				US	2014123338	A1	01 May 2014
				US	7893318	B2	22 February 2011
				US	2010017907	A1	21 January 2010
				US	8013218	B2	06 September 2011
				US	2011173725	A1	14 July 2011
				US	7893319	B2	22 February 2011
				US	8178750	B2	15 May 2012
				US	2010287656	A1	11 November 2010
CN	109566396	A	05 April 2019	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/115675

A. 主题的分类 A01H 1/02 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) A01H 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNABS, CNTXT, CNKI, DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI Web of Science 和关键词: 雄性不育, male sterile, 胚乳, endosperm, 隐性, recessive, 纯合, homozygous, 保持系, maintainer line, 荧光, fluorescent, InCW2, endosperm-specific cell wall invertase, 大小, size, 形状, shape, 颜色, color, 性状, trait, character, 等; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 3-7 和 10																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 105018475 A (北京普华博奥生物科技有限公司等) 2015年 11月 4日 (2015 - 11 - 04) 摘要, 权利要求1-25</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106350536 A (浙江大学) 2017年 1月 25日 (2017 - 01 - 25) 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102960234 A (中国农业大学) 2013年 3月 13日 (2013 - 03 - 13) 摘要, 权利要求1-5</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 7612251 B2 (PIONEER HI BRED INT) 2009年 11月 3日 (2009 - 11 - 03) 摘要, 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109566396 A (浙江大学) 2019年 4月 5日 (2019 - 04 - 05) 摘要, 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 105018475 A (北京普华博奥生物科技有限公司等) 2015年 11月 4日 (2015 - 11 - 04) 摘要, 权利要求1-25	1-10	A	CN 106350536 A (浙江大学) 2017年 1月 25日 (2017 - 01 - 25) 权利要求1	1-10	A	CN 102960234 A (中国农业大学) 2013年 3月 13日 (2013 - 03 - 13) 摘要, 权利要求1-5	1-10	A	US 7612251 B2 (PIONEER HI BRED INT) 2009年 11月 3日 (2009 - 11 - 03) 摘要, 权利要求1-10	1-10	PX	CN 109566396 A (浙江大学) 2019年 4月 5日 (2019 - 04 - 05) 摘要, 权利要求1-10	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 105018475 A (北京普华博奥生物科技有限公司等) 2015年 11月 4日 (2015 - 11 - 04) 摘要, 权利要求1-25	1-10																		
A	CN 106350536 A (浙江大学) 2017年 1月 25日 (2017 - 01 - 25) 权利要求1	1-10																		
A	CN 102960234 A (中国农业大学) 2013年 3月 13日 (2013 - 03 - 13) 摘要, 权利要求1-5	1-10																		
A	US 7612251 B2 (PIONEER HI BRED INT) 2009年 11月 3日 (2009 - 11 - 03) 摘要, 权利要求1-10	1-10																		
PX	CN 109566396 A (浙江大学) 2019年 4月 5日 (2019 - 04 - 05) 摘要, 权利要求1-10	1-10																		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 </td> <td> “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件 </td> </tr> </table>			* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																			
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																		
2020年 1月 22日		2020年 2月 6日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员																		
中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		杨振宇 电话号码 86-(10)-62412204																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/115675

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	105018475	A	2015年 11月 4日	CN 105018475 B	2017年 2月 22日
CN	106350536	A	2017年 1月 25日	无	
CN	102960234	A	2013年 3月 13日	CN 102960234 B	2014年 8月 20日
US	7612251	B2	2009年 11月 3日	US 2012005792 A1	2012年 1月 5日
				US 2010287655 A1	2010年 11月 11日
				US 2010313292 A1	2010年 12月 9日
				US 8614367 B2	2013年 12月 24日
				US 7759543 B2	2010年 7月 20日
				US 2010313293 A1	2010年 12月 9日
				US 7759544 B2	2010年 7月 20日
				US 2009183284 A1	2009年 7月 16日
				US 2010313294 A1	2010年 12月 9日
				US 2014215652 A1	2014年 7月 31日
				US 7875764 B2	2011年 1月 25日
				US 2006288440 A1	2006年 12月 21日
				US 7888550 B2	2011年 2月 15日
				US 2011107460 A1	2011年 5月 5日
				US 7888551 B2	2011年 2月 15日
				US 2012227136 A1	2012年 9月 6日
				US 2010017905 A1	2010年 1月 21日
				US 7863500 B2	2011年 1月 4日
				US 7893317 B2	2011年 2月 22日
				US 2010017906 A1	2010年 1月 21日
				US 2014123338 A1	2014年 5月 1日
				US 7893318 B2	2011年 2月 22日
				US 2010017907 A1	2010年 1月 21日
				US 8013218 B2	2011年 9月 6日
				US 2011173725 A1	2011年 7月 14日
				US 7893319 B2	2011年 2月 22日
				US 8178750 B2	2012年 5月 15日
				US 2010287656 A1	2010年 11月 11日
CN	109566396	A	2019年 4月 5日	无	