

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成22年9月30日(2010.9.30)

【公表番号】特表2010-502196(P2010-502196A)

【公表日】平成22年1月28日(2010.1.28)

【年通号数】公開・登録公報2010-004

【出願番号】特願2009-526930(P2009-526930)

【国際特許分類】

A 0 1 H 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 0 1 H 1/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年8月13日(2010.8.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トランスジェニック単子葉植物を作製する方法であって、

(a) 少なくとも第 1 の選択された DNA で外植体を形質転換し；

(b) 根および / または苗条の形成ができる再生可能構造体の発育を促進するために、有効な比率でサイトカイニンおよびオーキシンを含む第 1 の培養培地中で、前記外植体を培養し；次いで、

(c) 少なくとも、根および苗条組織の同時成長を支持する第 2 および / または第 3 の培養培地中で前記外植体を培養して、再生トランスジェニック単子葉植物を作製することを特徴とし、

ここに、前記再生形質転換単子葉植物は、前記外植体を形質転換する 4 ~ 8 週間以内で作製される、方法。

【請求項 2】

前記再生トランスジェニック単子葉植物を植物生育培地へ移すことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記生育培地は非滅菌マトリクスである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記非滅菌マトリクスはプラグに含まれる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

再生可能構造体は、前記外植体を形質転換する 6 ~ 14 日間以内で作製される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ (b) は、前記外植体を形質転換する 6 ~ 14 日以内に完了する、請求項 1 に

記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (a) および (b) は、カルスを増殖させることなく、10 日間から 2 週間行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

第 1 の培養培地は殺菌性化合物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

第 2 および / または第 3 の培養培地は、第 1 の培養培地に見出されるよりも高い濃度にて、スクロースを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

第 1 の培養培地はLynx 1947を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ (c) は、根および苗条組織の同時成長を支持する植物成長調節物質フリーの液体培養培地中で前記外植体を培養して、再生トランスジェニック単子葉植物を作製する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

根および苗条組織の同時成長を支持する前記培養培地はLynx 2067を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ (b) は、6 から 12 日間の長さで行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ (c) は、前記外植体を形質転換する 4 ~ 8 週間以内に開始される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

第 1 の培養培地中のオーキシンに対するサイトカイニンの比は、0.005 から 0.03 (w/w) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

第 1 の培養培地中のオーキシンに対するサイトカイニンの比は、モル換算で 0.005 から 0.03 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記サイトカイニンは、BAP、ゼアチン (zeatin)、カイネチン (kinetin)、およびTDZよりなる群から選択され；オーキシンは、IAA、2,4-D、NAA、IBA、およびジカンバ (dicamba)よりなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ (c) は、第 1 の培地と比較して、オーキシンに対する比が増大した苗条形成成長調節物質を含む第 2 の培養培地中で前記外植体を培養して、根および苗条の発育を同時に促進することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

ステップ (c) の培地はLynx 2068および / または Lynx 2202である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

添加植物成長調節物質を欠如する第 2 および / または第 3 の培養培地中で前記外植体を培養することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

第 2 の培地中のオーキシンに対する苗条形成成長調節物質の比は、0.02 から 0.06 (w/w) である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 22】

第 2 の培地はLynx 2202またはLynx 2068である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 23】

ステップ (c) の開始後、新鮮な生育培地は添加されない、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 24】

第1の培養培地は、0.001 mg/L から 10 mg/L のサイトカイニンおよび 0.1 mg から 15 mg/L のオーキシンを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 25】

前記外植体は、第1および第2の培地上での培養の間に第4の培地上でさらに培養され、ここに、前記第4の培地は、有効量のオーキシンおよびサイトカイニンを含み、カルス増殖を促進する、請求項1に記載の方法。

【請求項 26】

第4の培地はLynx 2063である、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

前記外植体は、第2および第3の培地上での培養の間に第5の培地上でさらに培養され、ここに、前記第5の培地は、苗条生長を促進するのに有効な量のサイトカイニンを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項 28】

第5の培地はLynx 2066である、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記外植体を形質転換することが細菌媒介形質転換を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 30】

前記バクテリア媒介形質転換は、アグロバクテリウム種 (*Agrobacterium* sp.)、リゾビウム種 (*Rhizobium* sp.)、シノリゾビウム種 (*Sinorhizobium* sp.)、メゾリゾビウム種 (*Mesorhizobium* sp.)、およびブラディリゾビウム種 (*Bradyrhizobium* sp.)よりなる群から選択されるバクテリアを用いて行われる、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

第2および/または第3の培養培地は、第1の培地中の量と比較して低減された量のオーキシン、サイトカイニン、アブシジン酸、またはその組合せを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 32】

第2および/または第3の培養培地は、第1の培地の半分未満のオーキシンまたはオーキシン様植物成長調節物質活性を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

第1の培養培地ならびに、根および苗条組織の同時成長を支持する培養培地は、液体培地である、請求項1に記載の方法。

【請求項 34】

第1の培養培地は半固体培地である、請求項1に記載の方法。

【請求項 35】

第1の培養培地の後に用いる各培地は液体培地である、請求項1に記載の方法。

【請求項 36】

ステップ(b)および(c)は、単一の容器の中で行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 37】

前記単子葉植物は、トウモロコシ、コメ、ソルガム (*sorghum*)、コムギ、ライムギ、アワ、サトウキビ、オーツムギ、ライコムギ (*triticales*)、スイッチグラス (*switchgrass*)、またはシバ (*turfgrass*) 植物である、請求項1に記載の方法。

【請求項 38】

前記単子葉はトウモロコシ植物である、請求項1に記載の方法。

【請求項 39】

トランスジェニック植物を作製するための優先開発ウィンドウを拡張するシステムであって、

(a) 少なくともある程度、第1のフィールドテストで収集されたデータに基づいて、トランスジェニック植物を作製するための対象の候補DNAセグメントを選択し；

(b) 請求項1に記載の方法によって、前記DNAセグメントを含むトランスジェニ

ック単子葉植物を調製し；ついで、

(c) 少なくとも、第1のフィールドテストが実行される時期に引き続く生育時期に実行される第2のフィールドテストにおける所望の発現型および／または遺伝子型について、前記トランスジェニック植物をアッセイすることを特徴とする、システム。

【請求項40】

第1のフィールドテストまたは第2のフィールドテストのうち一方または双方をアメリカ合衆国中西部で行う、請求項39に記載のシステム。

【請求項41】

前記トランスジェニック植物のアッセイは農業形質の測定を含む、請求項39に記載のシステム。

【請求項42】

第2のフィールドテストはハイブリッド収率テストであるである、請求項39に記載のシステム。

【請求項43】

第2のフィールドテストは第1のフィールドテスト後の2つの生育時期に行われる、請求項39に記載のシステム。

【請求項44】

形質転換可能性について穀物植物系統の細胞をスクリーニングする方法であって、

(a) 苗条始原体の作製を支持する生育培地上で、穀物植物の外植体を1～2週間以内培養し；

(b) 苗条伸張を支持する条件下、少なくともさらに1週間、暗闇中で前記苗条始原体を培養して、生育中の苗条組織および／または小植物を獲得し；ついで、

(c) 少なくともさらに1週間、植物育生培地上で、ステップ(b)の組織または小植物を培養して、苗条芽および／または植物を得、

ここに、ステップ(c)の後に、苗条始原体が苗条芽および／または植物を作製する能力によって、前記細胞の形質転換可能性を測定する、方法。