



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96197409.5

[43]公开日 1998年11月11日

[11] 公开号 CN 1198655A

[22]申请日 96.10.4

[30]优先权

[32]95.10.4 [33]US[31]08 / 539,176

[86]国际申请 PCT / US96 / 16017 96.10.4

[87]国际公布 WO97 / 12512 英 97.4.10

[85]进入国家阶段日期 98.4.3

[71]申请人 卡尔金公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 史蒂文·G·斯特里克兰

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

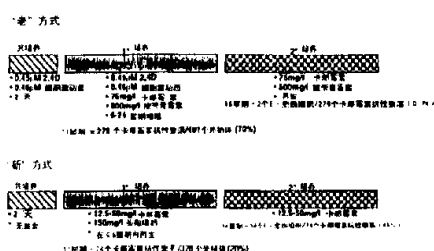
代理人 林晓红

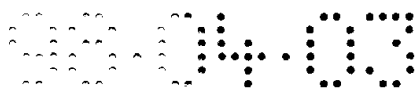
权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 棉花植株的转化

[57]摘要

提供了从外植体组织再生棉花植株的方法。使用该改善的方法可以从棉花组织外植体再生胚发生愈伤组织,其中外植体没有在含有外源植物激素的棉花起始培养基上培养。通过切割棉花组织以形成外植体,将棉花外植体组织与包括所需DNA序列的农杆菌共培养,并且在含有选择剂但是没有外源性植物激素的棉花起始培养基上培养该共培养的外植体,可将该方法用于棉花植株的转化。在该方式中,在没有激素的选择性培养基上将转化的细胞进行诱导以产生胚发生愈伤组织。





权 利 要 求 书

1. 用于从外植体组织再生棉花植株的方法，改进之处在于从棉花组织外植体产生胚发生愈伤组织，所述的外植体不是在补加了外源性植物激素的棉花起始培养基上培养的。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述外植体组织选自下胚轴，叶，根，叶柄组织和棉花胚。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述的外植体组织是从已经在黑暗中生长的幼苗切下的下胚轴组织。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中在不含激素的培养基上再生之前，将所述的外植体组织与农杆菌共培养。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述农杆菌包含所需的 DNA 序列。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述 DNA 序列包括一个选择性标记物。

7. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述外植体组织是通过用包被了所需的 DNA 序列的颗粒轰击所述外植体转化的。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所需的 DNA 序列包含一个选择性标记物。

9. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述外植体包括叶组织。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中进一步包括培养所述胚发生愈伤组织以形成体细胞胚。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述外植体包括根组织。

12. 用于转化棉花植株的方法，所述方法包括下列步骤：



说明书

棉花植株的转化

发明领域

本申请涉及植物遗传学领域，特别是涉及棉花的转化。

发明背景

棉花是具有巨大商业价值的植物。除了棉花纤维在生产纺织品中的应用，棉花的其它用途包括用棉籽油制备食品和从棉花粗粉和种子外壳衍生动物饲料。

尽管棉花具有作物的重要性，但是由于没有能够从棉花外植体快速或高频率地再生有器官的组织，例如整个植株或幼芽的可靠的组织培养方法，棉花的育种和遗传工程进展速度非常缓慢。当育种者能够以从非常高比例的外植体快速产生整个植株或其部分的方式在组织培养中生长植物细胞，则可以更容易和快速地获得改善的作物。

从外植体再生整个植株包括几个生长阶段。通常，将已经从成年植株或正在繁殖的幼苗切下的组织外植体，在无菌条件下置于化学定义的培养基。通过在所述受控条件下生长外植体一段时间，可以形成称作为愈伤组织即初级愈伤组织的未分化的细胞群。

通过在合适的条件下例如营养液，光照，温度，湿度培养该初级愈伤组织，和通过提供合适结合和浓度的植物生长调节剂，已经将一些植物种类的愈伤组织进行诱导产生了胚发生愈伤组织，依次可以以已知用于形成胚胎的方法诱导形成体细胞胚胎。

体细胞胚胎是有器官的组织群，它类似于种子的胚。通过体细胞

胚胎发生形成的胚和种子中的胚两者都具有发育为整个植株的能力。由体细胞胚胎发生形成的胚是二极性的，在根和幼苗顶点含有分生组织。因此，通过体细胞胚胎的繁殖，获得小植株。

植物组织培养文献描述了用于产生棉花愈伤组织的几种技术，包括胚发生的和非胚发生的，并且从棉花愈伤组织产生胚组织。通常这些早期的实验使用了来自于棉花幼苗下胚轴和子叶的外植体，并且逐级转移到含有愈伤组织起始培养基的平板上。

现存的棉花体细胞胚胎发生技术有几种缺点。在外植体中出现胚胎发生的频率通常是低的。另外，该技术仅在非常有限量的棉花栽培品种中有效。此外，用于棉花体细胞胚胎发生的大多数现存的技术在体细胞胚胎发生之前，需要较长的生长时期，即通常高于 4 个月。

若能够直接和急速地从置于愈伤组织起始培养基上的棉花外植体诱导胚胎发生(和从而启动形成整个植株的过程)，则可产生几个优点。这些优点包括降低借助于克隆繁殖再生植株所需的时间，这允许通过体细胞克隆变异快速产生遗传的多样性，允许生产没有病原体的原种，和使稀有的或难于再生的棉花品种进行繁殖。

相关文献

Price 和 Smith(1983)在植物细胞培养手册, 第 487 - 510 页提供了用于获得棉花愈伤组织的技术的综述。

Davidonis 和 Hamilton , 在植物科学信函(1983), 32 : 89 - 93 中报道了棉花的体细胞胚胎发生。在愈伤组织于含有萘乙酸(NAA)和细胞分裂素的培养基上生长 2 年以后发育形成胚。外植体来自于陆地棉的子叶。

美国专利 4, 672, 035 描述了从陆地棉愈伤组织再生棉花的方法，



所述愈伤组织首先在含有萘乙酸(NAA)和细胞分裂素的培养基上培养,随后转移到没有 NAA 和细胞分裂素的第二种培养基上。

Shoemaker 等人, 在植物细胞报道, (1986)3: 178 - 181 描述了由来源于陆地棉的幼苗下胚轴外植体的愈伤组织进行棉花体细胞胚胎发生, 所述外植体在含有 NAA 和细胞分裂素, 和腺嘌呤的培养基上生长。

Firoozabady 等人, 在植物分子生物学, (1987)10: 105 - 116 描述了由根癌农杆菌进行的陆地棉幼苗子叶的转化。从来源于转化的子叶的愈伤组织获得了体细胞的胚胎发生。

美国专利 5, 004, 863 和 5, 159, 135 描述了通过与根癌农杆菌在含有激素, 植物生长激素和细胞激动素的培养基上共培养而转化陆地棉幼苗下胚轴的方法。

Trolinder 和 Goodin, 在植物细胞报道, (1987)6: 231 - 234 描述了在从幼苗下胚轴启动的愈伤组织诱导体细胞胚胎发生。所使用的生长培养基含有植物生长激素和细胞激动素。

Trolinder 和 Goodin , 植物细胞, 组织和器官培养(1988)12 : 31 - 42 描述了由来源于从成熟的陆地棉产生的种子的整个胚胎轴制备的外植体的愈伤组织进行的体细胞胚胎发生。所使用的培养基含有植物生长激素和细胞激动素。

Finer 在植物细胞报道, (1988)7: 399 - 402 描述了从愈伤组织悬浮液培养物生产胚, 其中愈伤组织已经由陆地棉的幼苗子叶衍生。愈伤组织培养物是在含有合成植物生长激素的培养基中建立的。

发明概述

本发明提供了借助于从连续地保持于培育培养基上的外植体的体

细胞胚胎发生而再生棉花植株的原理，所述培育培养基不含有生长调节激素。当具有棉花组织的外植体的培育培养基中含有激素时，如在现有技术中使用的，棉花的体细胞胚胎发生受到抑制或阻止，未分化的初级愈伤组织形成。

通过在没有激素的培养基上连续培养，并且与在含有激素的培养基上的培养不同，可以更快速地生产胚，并且获得更高百分数的体细胞胚(每个外植体)。另外，本发明不仅能用在 Coker 类型的棉花栽培品种中，而且能在由 Coker 类型遗传的栽培品种中应用。本发明也能够用现存的方法不能再生的其它(非 Coker)栽培品种进行体细胞胚胎发生，所述现存的方法包括在置于激素的条件下起始愈伤组织的形成。

在没有激素的组织培育培养基上的体细胞胚胎发生可以提供几个其它的优点，包括从 Coker，Coker 衍生的栽培品种更有效地生产转基因植物，以及从更大量的棉花栽培品种生产转基因植物。在一个优选的实施方案中，对由传统技术难于再生的棉花栽培品种进行诱导以在没有激素的培养基上产生体细胞胚胎。本发明提供了 Stoneville 84 - 828 品种的可再生的棉花株。

本发明也提供了可以将难于用传统方法再生的组织进行诱导以产生体细胞胚胎的原理。在一个优选的实施方案中，能够用叶组织产生胚发生愈伤组织和体细胞胚胎。

本发明的另一个优点是降低了劳动成本。劳动成本的降低来源于生产转基因棉花所需的时间框架降低，从而降低了在组织培养中生产转基因棉花的栽培品种的开发成本。

本发明还有的优点是以更加简单的方法用于筛选可再生的棉花栽

培品种，不需要在起始之后多次转移组织。根据本发明方法可在 12 星期或不到 12 星期获得最终结果。在利用有激素的培养基的以前的方案中，这样的筛选至少需要将初级愈伤组织向再生条件进行一次另外的转移，完成筛选需要长达 24 个星期。相对再生性指示了用何种棉花栽培品种可以有效地产生转基因植物，以及需要多少外植体以获得靶数量的再生的转基因植物。

通过利用没有激素的培育以获得难操作(recalcitrant)的栽培品种的胚发生组织，然后借助于轰击转化胚发生组织，本发明提供了另一种转化手段以生产难操作栽培品种的转化的植株。以前由于其它栽培品种不能在标准方案(农杆菌的转化，随后在含有激素的选择性培养基上培养转基因组织，在含有激素或具有类似于激素的作用的物质(例如羧苄青霉素)的培养基上再生植株)的条件下再生，仅 Coker，类似于 Coker 的栽培品种，和以前再生(R1S1)的栽培品种系已经被有效地转化。

在由本发明方法再生之前，可以实现转化。可以利用几种植物细胞转化技术，包括与根癌农杆菌共培养，微粒轰击等等。对于共培养的情况，优选的是制备没有植物激素的共培养培养基。

附图简述

图 1 图解描述了现有技术的利用激素的再生方法，和获得本发明的体细胞胚胎发生的没有激素的方法。

图 2 显示了含有激素的愈伤组织起始培养基的接触时间对棉花再生的作用的资料。

特定实施方案的描述

本发明的主要特征是利用没有激素的培养基以从转化的棉花外植



而等待胚发生愈伤组织的出现。

另一个优点是从相对高百分数的外植体产生胚发生愈伤组织，和更快速形成胚发生愈伤组织。目前公开的体细胞胚胎发生方法可以用于各种各样的棉花栽培品种，包括至今不适应诱导体细胞胚胎发生计划的栽培品种。

没有激素的培养基更易进行胚胎发生，其中用传统手段再生率非常低或不可能再生的某些品种的再生目前是可能的。因此，本发明的系统将某些品种加入到能够被转化和再生为植株的棉花名单中。用于本发明的外植体可以从除 Coker，类似于 Coker 的栽培品种以外的棉花栽培品种衍生获得。

已经从一种难操作的品种，Stoneville 84 - 828 品种获得了体细胞胚胎，表明该方法也可以应用到各种各样棉花栽培品种，包括难操作的栽培品种。难操作的棉花栽培品种是指至今不能进行体细胞胚胎发生的品种，即除了 Coker 类型品种以外的栽培品种。

由于能够转化除 Coker 类型以外的栽培品种，通过降低繁殖得到的转化植物成所需的品种所必要的回交次数，可以降低用于研制有商用价值的转基因棉花的劳动和时间。由于在扩大的栽培品种范围内（包括非 Coker 栽培品种）能获得体细胞胚胎发生，优选的是将‘R1S1’（再生一次，自交一次）方案用于转化难操作的栽培品种。R1S1 方案需要更广范围内的可再生性，和更高的再生频率，以便对于给定的栽培品种可以获得许多自交的再生的植株的后代。体细胞胚胎发生的增加能够从以前具有抑制性的低再生频率的栽培品种获得转基因植物。

无激素再生的可操作特性也指现在可利用通常不用于再生的棉花

植株组织产生体细胞胚胎。叶组织是至今没有被用于体细胞胚胎再生的棉花组织的一个例子。因此该方法适用于许多种棉花组织的外植体，包括下胚轴，叶，根，柄组织和棉花胚。外植体组织通常是在无菌条件下被切下以避免将细菌或真菌导入到植物培育培养基。

在优选的实施例中，从展平的叶或幼苗下胚轴组织获得用于本发明的外植体。用作为外植体的其它的优选的组织包括任何棉花植株组织，包括分生组织细胞，例如根组织的和叶柄组织的切片。下胚轴，叶和根组织含有维管系统形成层的分生组织细胞。

对于叶和下胚轴组织，已经观察到愈伤组织的形成显示主要在维管的形成层位点发生。也观察到在没有激素的培养基上再生愈伤组织趋向于主要在下胚轴组织的一个末端形成，在下胚轴切片的基部末端(朝向根)形成 80 % - 90 % 的愈伤组织。

对于去除顶端分生组织，过夜，然后切除外植体的试验，几乎没有或完全没有观察到再生。另一方面，当将顶端分生组织保留于下胚轴外植体时，外植体具有在切割末端，而不是在胚发生愈伤组织形成根的趋势。因此，优选的是将用于在没有激素的培养基上胚发生愈伤组织形成的下胚轴外植体去掉顶端分生组织区域。

由于植株的顶端分生组织产生吲哚乙酸(IAA)，也称作为植物生长激素，并且 IAA 在植株中向下迁移，对于在没有激素的培养基上棉花植株的胚胎发生可能是外源性 IAA 起作用。植株在黑暗中比在光照下也产生更多的 IAA。对于在切割下胚轴外植体之前，将幼苗在黑暗和在光照条件下生长的试验，从生长于光照条件下植株获得的那些外植体以更低的频率再生体细胞胚胎。在优选的实施方案中，切下外植体之前在黑暗中培养棉花植株或幼苗并且保持一段时间。

在从棉花植株切下外植体之后，将外植体转移到固体植物组织培育培养基，所述培养基适用于形成胚发生愈伤组织。通常可以使用用于植物组织培养的许多基础盐/微量元素溶液用于培养来源于未成熟棉花胚胎的外植体。以前已经证明支持棉花愈伤组织生长的基础盐溶液是优选的。可获得的文献，例如 D. Evans, R. Sharp, P. Ammirato, 和 Y. Yamata, 植物细胞培养手册(六卷系列) Macmillian 出版公司: 第 1 卷(1983), 第 2 卷(1984), 第 3 卷(1984), 第 4 卷(1986); McGraw Hill 出版公司, 第 5 卷(1990)和第 6 卷(1990); 和 T. Thorpe, 植物组织培养方法和在农业上的应用, Academic 出版公司(1981), 公开了适用于棉花愈伤组织体外生长的基础盐和微量元素溶液。优选的基础盐/微量元素溶液包括 Murashige 和 Skoog 培养基, Linsmaier 和 Skoog 培养基, Schenk 和 Hildebrandt 培养基, 和 Beasley 和 Ting 培养基。用作为基础盐溶液的特别优选的是 TRM 培养基, 即具有双倍硝酸钾浓度的 Murashige 和 Skoog 培养基。

转移外植体用的组织培育培养基不含有任何植物生长调节剂。本发明实质上不同于用于棉花体细胞胚胎发生的早期的技术, 所述技术在培育培养基中没有所述的生长调节剂。以前已经证明的用于获得棉花体细胞胚胎发生的技术要求在生长培养基中包含激素, 特别是细胞激动素和植物生长激素。用于本发明的培养基不需要使用激素, 不论是天然的或合成的。通过将没有激素的培养基用作为初级培养基, 与将激素例如 IAA(IAA), 激动素或 2,4 D 掺入到该培养基中相比, 更快速地形成胚发生愈伤组织。

在现有技术中, 通常将细胞激动素例如 6 - 苯基氨基嘌呤(BAP), 2 - 异戊基腺嘌呤(2 - ip), 激动素, 2 - ip 核糖核苷和玉米素用于

掺入到该培养基中。通常特异于棉花组织培育培养基的植物生长激素包括合成的和天然的植物生长激素,例如 IAA, NAA, 2,4 D 等等。

用于从外植体产生胚发生愈伤组织的培育培养基含有胶凝剂以使培养基固化。通常用于植物组织培养的胶凝剂可用于本发明使用的培育培养基。优选的胶凝剂包括琼脂替代物例如 Phytigel™(Sigma), 和 GelRite®(麦克公司)。

在最优选的实施方案中, 将 GelRite®(Scott Laboratories 公司)用作再生培养基中的固化物质, 而不是使用琼脂。在许多现有技术的再生方法中, 需在含有激素的培养基上将未分化的愈伤组织生长一段时间, 以从外植体成功地生长初级愈伤组织, 这部分是由于认为外植体组织的受伤应答产生一定量的抑制胚胎发生的苯酚类化合物。当使用 GelRite®时, 观察到在外植体的切口末端的棕色褪去, 表明苯酚类化合物降低。

用各种各样的核酸遗传构建体转化本发明的外植体, 所述核酸遗传构建体用于从遗传上修饰植物细胞。有用的转化技术包括例如用根癌农杆菌共培养, 微粒轰击和碳化硅纤维介导的转化。转化方式对本发明不是关键的。

用于转化的 DNA 序列通常含有融合到调节序列(启动子)上的所需核酸序列, 所述调节序列能够在植物细胞中转录或转录和转译。用于转录和转译(表达)的序列通常编码所需的多肽, 所需多肽可以是天然状态下不存在于棉花细胞的多肽或天然存在于棉花细胞的多肽。当编码天然存在于棉花中的多肽的序列存在于所需的构建体时, 与所述序列相连的启动子可以是天然情况下不与所需基因连接的启动子。所需的多肽包括储存蛋白, 介导除草剂抗性的或色素产生的酶, 杀虫剂蛋

白，哺乳动物调节蛋白，植物调节蛋白和细胞壁蛋白质。通过加入合适的信号序列，也可以将表达的多肽进行修饰以便将其导向到细胞器例如叶绿体和线粒体。所需的序列也可以包括编码反义 RNA 的核酸序列，反义 RNA 的应用包括降低基因的表达和使病原体感染减毒。

所需的启动子可以是组成型的或诱导型的，启动子以在整个植物中或以组织特异性的方式表达。

另外，优选的是用于转化的遗传构建体含有能够在转化的靶细胞和其后代中表达的选择性标记物。选择性标记物允许含有具有选择性标记物的构建体的细胞在抑制失去选择性标记物的细胞生长和复制的条件下生长并发生分裂。已知有各种各样的选择性标记物在植物细胞中起作用，这些标记物可以用于转化棉花细胞。所需的遗传标记物包括对 G418，卡那霉素，溴苯腈，潮霉素，氨甲喋呤，庆大霉素(庆大霉素甲基转移酶)，甘草膦(EPSP 合成酶)，和 chlorsulfuron 的抗性。本领域内技术人员应该明白，在某些情况下所需的多肽也能够作为选择性标记物的起作用。所需的 DNA 序列也含有与使用的特定转化技术相关的载体和/或允许载体或其部分在转化的细胞内保持稳定的核苷酸序列。

通过将根癌农杆菌和陆地棉子叶共培养而转化棉花的技术已经由 Firoozabady 等人，植物分子生物学(1987)10： 105 - 116 和 Umbeck 等人，Bio/Technology (1987)5： 263 - 266 描述。由 Firoozabady 等人，和 Umbeck 等人描述的转化技术可以与本发明的未成熟胚外植体一起使用。

当通过根癌农杆菌共培养导入遗传构建体时，优选的是所需的 DNA 序列含有 T - DNA 序列，优选的是去除延伸端的 T - DNA 序

列，以促进该载体整合到棉花基因组。特别是，优选的是使用至少一个右 T - DNA 边界区和优选的是右和左 T - DNA 边界区。

通过用由所需的遗传构建体包被的微粒轰击也可以转化棉花外植体，通常可以从文献获得关于由微粒轰击转化植物细胞的详细描述，例如 Klein 等人，自然学(1988)327： 70 - 73。通过使用基本上相同的用于转化其它植物细胞的轰击技术，可以转化选定用于本发明再生的棉花外植体细胞。

根据其形状可以快速地将胚发生愈伤组织与非胚发生愈伤组织即初级愈伤组织区分。胚发生愈伤组织通常是小的，乳黄色和分化为胚或原胚结构，而初级愈伤组织主要是绿色或白色的和没有分化的大的液泡化细胞。

可以从初级愈伤组织上切下生长出的胚发生愈伤组织，随后通过使用本领域内技术人员通常已知的组织培养技术，在固体组织培养或在悬浮组织培养一段更长的时间进行繁殖。当需要时，可将胚转化即萌发，并形成整个植株。

为了再生整个植株，从胚发生愈伤组织可以切下体细胞胚，并且随后转移到组织生长培育培养基，采用本领域内技术人员已知的方法，所述培养基的配制有助于形成根。如果需要，随后将形成根的幼芽转移到土壤中生长。

当在再生之前用含有选择性标记物的转化构建体转化外植体时，在存在于遗传构建体的标记物的选择性压力下，或不在选择性压力下将外植体于培养基中培养。在某些情况下所需的序列能够用作为选择性标记物。选择性压力是指将培养物中的细胞与有助于表达选择性标记物的细胞生长和/或生存的通常是化学药剂的环境因子接触。选择

性压力的水平可以随从外植体产生胚的过程期间的不同阶段而变化。例如，可以在转化之后立即将含有新霉素磷酸转移酶的载体转化的外植体置于含有 5 - 75 毫克/毫升卡那霉素的低水平选择培养基，并且随后在胚发生愈伤组织芽已经形成之后，转移到含有 75 - 200 毫克/毫升卡那霉素的高水平选择培养基。

通过改变应用于组织培养的选择性压力的时间和水平，能够控制获得的愈伤组织中存在的转化细胞的比例。通常，在组织培养过程越早应用选择性压力，应用的选择性压力越大，愈伤组织中存在的转化细胞的百分率越大。可以在植物生长的一个或多个阶段应用选择性压力。

当将适用于胚发生愈伤组织的发育的外植体在形成胚发生愈伤组织的条件下生长时，优选的是选择性压力是连续的，另一种可选的方法是，一旦细胞已经被转化，也可以在胚发生愈伤组织已经形成之前或之后应用选择性压力。当将胚发生愈伤组织转移到新鲜培养基时可以应用选择性压力。类似地，也可以在将胚转移到胚胎脉冲培养基或萌发培养基之后应用选择性压力。当体细胞胚胎生根时，和在胚胎已经形成整个植株之后也可以应用选择性压力。

当进行本发明共培养时，将外植体置于“饲养平板”也不是必要的。饲养平板是含有具有细胞激动素的起始培养基和一层烟草饲养细胞的培养皿。对于本发明，简单地将无菌滤纸 Whatman#1 置于愈伤组织起始培养基的表面即可，所述滤纸的功能在于保持农杆菌的生长处于最小程度。

已经描述了本发明，提供下面的实施例是为了进一步阐明本发明，不是为了限制本发明。



实施例 1：外植体的制备

通过置于 50 % Clorox®(2.5 % 次氯酸钠溶液)中 20 分钟，在无菌蒸馏水中清洗 3 次对 Coker315 种子表面消毒。在表面灭菌之后，将种子在含有 25 毫升 $1/2 \times$ MS 盐： $1/2 \times$ B5 维生素： 1.5 % 葡萄糖： 0.3 % GelRite 的 25 × 150 无菌试管中萌发。在 28 °C，将幼苗萌发 7 天。从 8 天龄的幼苗切除下胚轴，切成 0.5 – 0.7 厘米的切片，置于含有无激素愈伤组织起始培养基(CIM)的培养皿平板上的无菌滤纸上。表 1 中提供了 CIM 的成份。

表 1

浓度	化合物	来源
1 ×	Murashige 和 Skoog 盐	Gibco
30 克/升	葡萄糖	Mallinckrodt
100 毫克/升	肌醇	Sigma
1 毫克/升	烟酸	Sigma
1 毫克/升	盐酸吡哆醇	Sigma
10 毫克/升	盐酸硫胺素	J. T. Baker
1.87 克/升	氯化镁	Sigma
1.90 克/升	硝酸钾	Sigma
4 克/升	GelRite®	Scott Lab.公司

含有激素的培养基(‘ CIM - 3 ’)与上表提供的相同，只是它含有下列水平的激素： 0.45 μ M 2, 4D 和 0.46 μ M 细胞激动素。

实验 2：在没有激素的培养基上胚胎发生

如实施例 1 所述制备外植体组织并且在 28 + 2 °C， 30uE 16 小时： 8 小时光照：黑暗时期培养。各种外植体培养于没有激素的培养基上，或通过起始阶段于 CIM - 3 上培养，随后转移到没有激素

的培养基上培养结合进行。

在 5, 7 和 9 个星期时, 鉴别胚发生愈伤组织。图 2 描述了与在含有激素的培养基(CIM - 3)接触任意长时间的情况比较, 在没有激素的培养基(‘0’)上连续培养之后, 胚胎发生的百分率得到提高。

除了在 9 星期时再生(胚发生愈伤组织)百分率增加外, 胚发生愈伤组织形成的速度也提高: 直到在 5 个星期时第一次观察为止, 连续地在没有激素的培养基上培养的 10 % (10/100)的外植体已经形成了胚发生愈伤组织, 而这时与含有激素的培养基接触任意长时间的外植体没有形成胚发生愈伤组织。在 9 个星期之后, 连续地与含有激素的培养基接触的外植体仅 2.5 % (3/116)已经发育为胚发生愈伤组织, 而连续地在没有激素的培养基上培养的外植体有 46 % (46/100)发育了胚发生愈伤组织。

实验 3: 从 Stoneville 506 回收胚发生愈伤组织

Stoneville 506 是难操作的栽培品种, 在含有激素的条件下它几乎不进行体细胞的胚胎发生。但是, 在没有激素的培养基上连续培养 14 个星期之后, 从 ST506 的 53 个下胚轴外植体回收到 2 个胚发生愈伤组织集落(各个外植体来源于不同的幼苗)。从该难操作栽培品种回收胚发生愈伤组织是基于没有激素的培养方式, 其由下列事实阐明: 在低至 1 天, 高达 14 个星期时, 在已经与含有激素的培养基接触的 420 个外植体中没有观察到胚发生愈伤组织。

实验 4: 再生的栽培品种的扩展

对 8 个棉花栽培品种进行再生性筛选。在 24 个月时, 与连续地在含有激素的培养基上培养形成的愈伤组织相比, 能够在含有激素的培养基上进行体细胞胚胎发生的栽培品种 C130, C320 和 Georgia King

在没有激素的培养基上具有相对的再生性,以形成的 E - 愈伤组织的百分数表示为 71 % , 81 % 和 58 % 。在从含有激素的培养基上转移到没有激素的培养基上 6 个星期之后,培养物中出现最低的再生性。在给定的培养方式和栽培品种内,从不同的幼苗获得各个外植体。

结果显示于表 2 。以 E - 愈伤组织/外植体的数量(%)表示结果。

表 2

<u>栽培品种</u>	<u>连续的激素</u>	激素起始, <u>转移到没有激素</u>	连续无激素
C130	38/90(42 %)	22/120(18 %)	36/120(30%)
C320	25/90(28%)	23/120(19%)	27/120(23%)
GA King	13/91(14%)	7/118(5.9%)	10/120(8.3%)
9358	2/88(2.3%)	1/119(0.8%)	3/120(2.5%)
84-828	0/91	0/115	2/120(1.7%)
KC311	0/89	0/119	0/119
ST132	0/90	0/120	0/120
LA887	0/90	0/120	0/115

在 4 个星期之后,以该方式产生的外植体转移到相同组分的新鲜培养基上一次,此时从每个平板 4 个集落减少到每个平板 2 个集落。

称之为“激素启动,转移到没有激素”的方式包括在 MS 盐, 3 % 葡萄糖, 0.45 μM 2, 4D 和 0.46 μM 细胞激动素上培养 6 个星期,随后在余下的时间内在经过加入 1.9 克/升硝酸钾, 3 % 葡萄糖和没有激素修饰的 MS 盐上培养。集落是从“连续的激素”方式获得的愈伤组织的继代培养物,在起始的 6 星期之后以每个平板 2 个的量进行接种。

称之为“连续无激素”的方式包括加入 1.9 克/升硝酸钾, 3 % 葡萄

糖和没有激素修饰的 MS 盐。该方式的外植体以每个平板 4 个集落的量保留于起始培养基上，从不转移到新鲜培养基上。

这些结果证明了在没有激素的培养基上再生难操作棉花品种的能力得以增加。84 - 828 栽培品种仅在连续的没有激素的方式时形成胚发生愈伤组织。

实验 5：降低的再生时间

通过在没有激素的培养基上连续培养降低了从起始直到 E - 愈伤组织形成所经过的时间。表 3 提供了在 12 个星期时在含有激素的培养基上获取的资料的汇总。

表 3

	连续的激素	激素(6 个星期), 然后没有激素	连续无激素
<u>栽培品种</u>			
Coker 320	1/90	3/120	18/120
Coker 130	4/90	7/120	33/120
Georgia King	0/91	3/120	8/120
9358	0/90	0/120	2/120
84-828	0/90	0/120	1/120

所有在说明书中提到的出版物和专利申请是为了显示本发明相关的本领域技术人员的水平。如果单个出版物或专利申请被特定和单个地说明作为参考文献，那么本文中引入的所有出版物和专利申请以相同的程度作为参考。

实验 6：胚胎发生的增加

表 4 总结了来源于两个独立的试验的证据，通过不与外源性激素接触的方式培养改善了转化的棉花组织的胚发生愈伤组织的再生。

表 4

试验 A			
转化方案*	起始的外植体的数目	16 星期时能忍受卡那霉素的 E - 愈伤组织的数目	20 星期时能忍受卡那霉素的 E - 愈伤组织的数目
有激素	860	24(1.3%)	65(7.5%)
没有激素	855	108(12.6%)	109(12.7%)

试验 B			
转化方案*	起始的外植体的数目	16 个星期时能忍受卡那霉素的 E - 愈伤组织的数目	18 个星期时能忍受卡那霉素的 E - 愈伤组织的数目
有激素	540	0	22(4.0%)
没有激素	525	48(9.1%)	58(11.0%)

在上述表中,方案“有激素”包括在具有 $0.45\mu\text{M}$ 2, 4D 和 $0.46\mu\text{M}$ 细胞激动素的愈伤组织起始培养基上培养外植体 6 - 10 个星期。方案“没有激素”是指在不含激素的再生培养基上连续培养外植体。两个方案均使用了借助于根癌农杆菌共培养进行的转化和在含有卡那霉素的培养基上的选择。

虽然已经借助说明书和为了阐明目的的实施例对前面的发明进行了详细的描述,但是对其进行改变和修饰仍在所附的权利要求书的范围内是显而易见的。

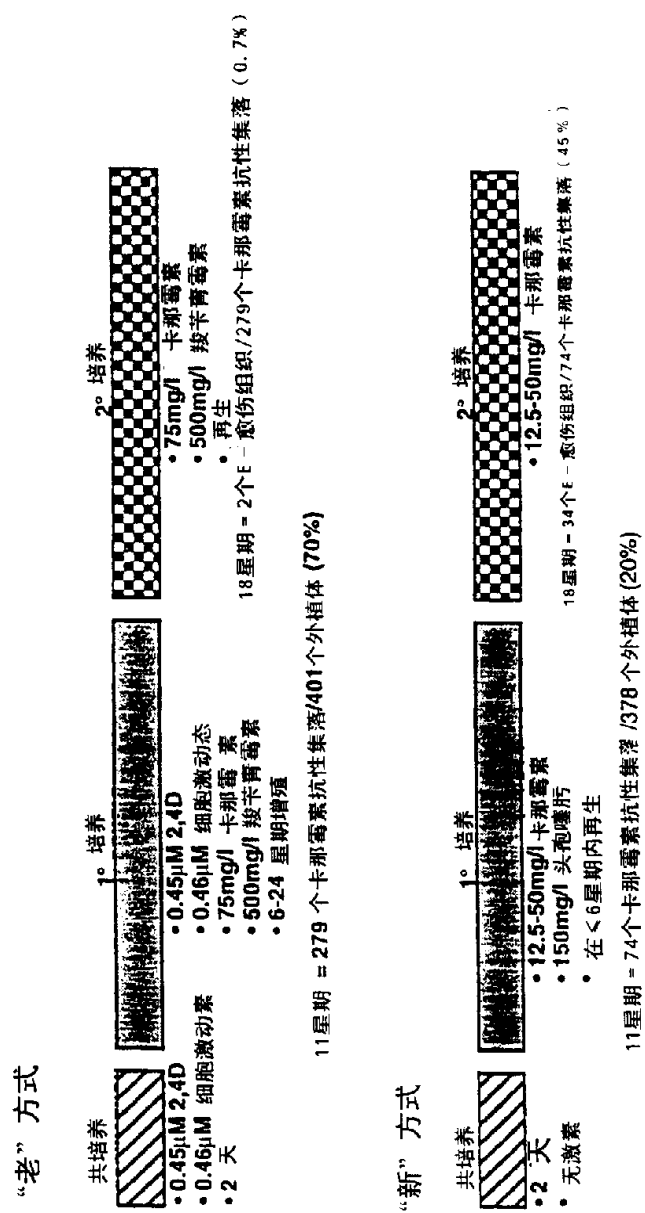


图1

接触 CIM-3 对再生的作用

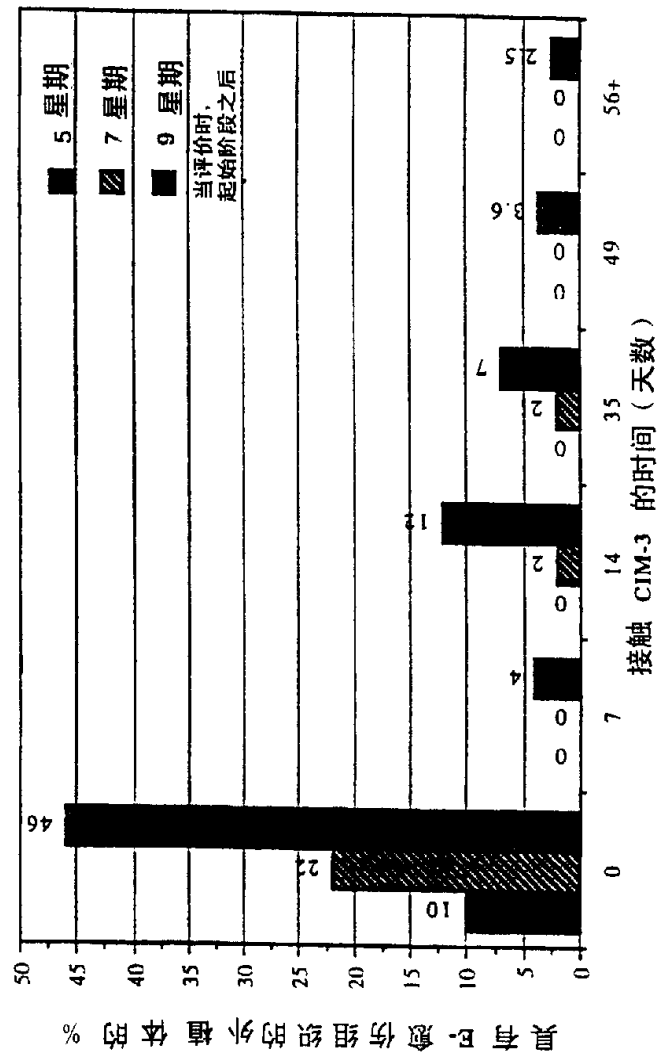


图2