PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

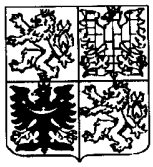
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

867-98

(19)

ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20. 06. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.06.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/667188**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 03. 99**
(Věstník č. 3/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/10621**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/48814**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:
C 12 N 15/82
A 01 H 5/00

(71) Přihlášovatel:
MONSANTO COMPANY, St. Louis, MO, US;

(72) Původce:
Cheng Ming, St. Louis, MO, US;
Fry Joyce E., St. Louis, MO, US;
Wan Yuechun, Chesterfield, MO, US;

(74) Zástupce:
Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Fertilní transgenní rostlina pšenice, způsob její přípravy, buňky a semena této rostliny

(57) Anotace:
Jsou popsány postupy pro produkci stabilně transformované fertilní pšenice systémem transformujícím pšenici pomocí Agrobacterium. Vynález umožňuje transformaci různých explantátů, jako jsou čerstvě izolované nebo pre-kultivované nezralé zárodky, zárodečný kalus a suspenze buněk. Také jsou popsány způsoby pro získání transgenních rostlin po transformaci během krátké doby, pokud jsou explantáty regenerovatelné v době transformace. Proto je frekvence somaklonálních variací spojených s dlouhodobou kultivací in vitro významně snížena. Frekvence transformace při použití tohoto systému je srovnatelná nebo vyšší než u publikovaných způsobů využívajících jiných systémů, jako je ostřelování mikročásticemi.

CZ 867-98 A3

08.10.98
PV 867-98
48699

Fertilní transgenní rostlina pšenice, způsob její přípravy a semena této rostliny

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká oblasti molekulární biologie. Přesněji, týka se způsobů pro inkorporaci cizorodé DNA do genomu jednoděložných rostlin, a zejména pšenice. Jsou zde poskytnuty reprodukovatelné systemy pro genetickou transformaci pšenice, způsoby pro selekci stabilních genetických transformantů ze suspenze transformovaných buněk a způsoby pro produkci fertilních rostlin z transformovaných buněk. Příkladné způsoby obsahují použití Agrobacterium-zprostředkované transformace pro zavedení nukleových kyselin do buněk, a selektovatelného a/vyšetřitelného markerového systemu, například genů, které udělují resistenci (například na antibiotika, herbicidy atd.) nebo které obsahují jiný fenotypicky pozorovatelný znak. V jiném aspektu se vynález týká produkce stabilně transformovaných a fertilních rostlin pšenice, gamet a potomstva těchto rostlin.

Dosavadní stav techniky

Celý text US patentové přihlášky (USSN) 08/329742 podané 26.10.1994 je zde uveden jako odkaz ve své úplnosti. V průběhu poslední dekády se stal přenos genů z široké škály organismů do plodin možný za použití rekombinantní DNA technologie. Tato výhoda poskytla nesmírné možnosti pro zlepšení resistence rostlin vůči škůdcům, nemocem a herbicidům, a možnosti pro zlepšení biosyntetických procesů

pro změnu kvality produktů rostlin (Knutson a kol., 1992; Piorer a kol., 1992; Vasil a kol., 1992). Nicméně, dostupnost účinných metod transformace pro zavedení cizorodé DNA byla významnou barierou pro většinu jednoděložných druhů, včetně kukuřice, rýže, ovsu, ječmene a zejména pšenice.

Dostupné metody pro transformaci jednoděložných rostlin

Bylo zkoušeno mnoho metod pro transformaci jednoděložných rostlin, ale pouze několik metod vedlo ke stabilní transformaci. Pro většinu transgenních studií u jednoděložných rostlin jsou v současnosti využívány dvě metody: přímý přenos DNA do izolovaných protoplastů a přenos DNA za použití mikroprojektilů (Shimamoto a kol., 1989; Fromm a kol., 1990). Nověji byly také vyvinuty další metody pro použití u jednoděložných rostlin. Následuje podrobný popis metod, které vedly ke stabilně transformovaným a fertilním jednoděložným rostlinám, které jsou schopny přenosu svých genů na potomstvo podle Mendelovské dědičnosti.

Biolistika

"Biolistika" je nejčastěji používanou transformační metodou pro jednoděložné rostliny. V "biolistické" metodě jsou mikroprojektilové částice potaženy DNA a akcelerovány s použitím mechanického zařízení na rychlost dostatečnou pro penetraci stěny rostlinné buňky a jádra (mezinárodní patentová přihláška publikační č. WO 91/02071). Cizorodá DNA se inkorporuje do hostitelské DNA, což vede ke vzniku transformované buňky. Existuje mnoho variací "biolistické" metody (Sanford, 1990; Fromm a kol., 1990; Christou a kol.,

1988); Sauterr a kol., 1991). Tato metoda byla úspěšně použita pro produkci stabilně transformovaných jednoděložných rostlin včetně rýže, kukuřice, pšenice, ječmene a ovsu (Christou a kol., 1991; Gordon-Kamm a kol., 1990; Vasil a kol., 1992, 1993; Wan a kol., 1993; Sommers a kol., 1992).

Mikroprojektilová metoda přenosu DNA může využívat jako cílové tkáně kalů odvozených od nezralého zárodku nebo nezralých zárodků. Transgenní rostliny byly získány metodou ostřelování mikroprojektily u rýže, ovsu, ječmene a pšenice (Gordon-Kamm a kol.. 1990); Sommers a kol., 1992; Wan a kol., 1994; Vasil a kol.. 1992).

Metoda ostřelování mikročásticemi obyčejně vyžaduje 10 až 15 měsíců pro získání transgenních rostlin (Gordon-Kamm a kol., 1990; Vasil a kol., 1992). I novější vylepšení transformačních metod za použití nezralých zárodků jako cílové tkáně stále vyžadují 4 až 6 měsíců pro získání transgenních rostlin (Weeks a kol., 1993; Vasil a kol., 1992; Becker a kol., 1994). Frekvence transformace za použití těchto metod se pohybuje v rozsahu od jedné transformace na 100 až 1000 ostřelovaných zárodků.

Elektroporace

Protoplastové metody byly ve velkém rozsahu použity u rýže, kde byla DNA dopravena do protoplastů pomocí liposomů, PEG a elektroporace. Ačkoliv byl v několika labotatořích získán velký počet transgenních rostlin (Shimamoto a kol., 1989; Datta a kol., 1990), vyžaduje protoplastová metoda ustanovení dlouhodobých embryogenních

suspenzních kultur. Některé regeneranty z protoplastů jsou infertilní a fenotypicky abnormální, což je způsobeno dlouhodobou suspenzní kultivací (Davey a kol., 1991; Rhodes a kol., 1988). Tyto postupy byly zejména užitečné pro rýži a některé obilniny.

Transformace elektroporací vyžaduje aplikaci krátkodobých, vysokonapěťových elektrických polí pro vytvoření "pórů" v buněčné membráně, kterými je DNA vychytávána. Tato metoda byla použita pro produkci stabilně transformovaných jednoděložných rostlin (Pasazkowski a kol., 1985; Shillito a kol., 1985; Fromm a kol., 1986), zejména u rýže (Shimamoto a kol., 1992; Datta a kol., 1990, 1992; Hayakawa a kol., 1992).

Chemické ošetření protoplastů

Polyethylenglykolová (PEG) metoda je jednoduše chemické ošetření za přítomnosti protoplastů a DNA (Shillito a kol., 1985; Rhodes a kol., 1988). PEG usnadňuje vychytávání DNA.

Další metody

Pro transformaci jednoděložných rostlin bylo popsáno mnoho dalších metod. Metody popsané pro produkci fertilních transgenních jednoděložných rostlin zahrnují "metodu pylové láčky" (mezinárodní patentová přihláška publ. č. WO 93/18168; Zahir , 1993, Luo a Wu, 1988) a makro injekci DNA do květních odnoží (Du a kol., 1989; Picard a kol., 1988; De la Pena a kol., 1987) a tkáňovou inkubaci semen v roztocích

DNA (Tofer a kol., 1989). Přímá injekce exogenní DNA do endospermu fertilizovaného rostlinného vajíčka při nástupu embryogenese byla popsána v mezinárodní patentové přihlášce publ. č. WO 94/00583. Kromě protoplastové a biolistické metody transformace nejsou další metody reprodukovatelné nebo předpověditelné. Obvykle je zde důkaz exprese, ale zřídkakdy je DNA přenesena na potomstvo.

Nedostatky v dosavadního stavu

Jednou významnou oblastí, kde byl v oboru učiněn malý pokrok, je adaptace bakteriemi zprostředkovaných metod transformace na jednoděložné rostliny. Ačkoli je široce využíván u dvojděložných rostlin, byl Agrobacterium-zprostředkovaný genový přenos při adaptaci na jednoděložné rostliny zklamáním. V literatuře existuje několik zpráv nárokujících Agrobacterium-transformaci u jednoděložných rostlin, jak tomu je například v mezinárodní patentové přihlášce publ. č. WO 94/0077. Konkrétně jsou to metody, které popsal Gould a kol., 1991; Mooney a kol., 1991; a Raineri a kol., 1990, které nárokují Agrobacerium zprostředkovanou transformaci kukuřice, rýže a pšenice. Existují určité důkazy genového přenosu u těchto metod, ale postrádají přesvědčivé důkazy pro účinnost přenosu, reprodukovatelnost a potvrzení genového přenosu (Potrykus, 1990) a chybí jim přenos na potomstvo, pokud jsou rostliny produkovány. V práci Goulda, kde byl presentován důkaz transformovaných rostlin, nebyla Mendelovská dědičnost genů.

De LaFonteyne a kol., (mezinárodní patentová přihláška

publ. č. WO 92/06205) popisuje proces pro transformaci buněk kukuřice za použití kmenů A. tumefaciens v kombinaci s transposonem-zprostředkovanou metodou integrace, ale úspěšnost takových metod u jiných druhů nebyla prokázána.

Mooney a kol. (1991) produkoval transformované buňky ze zárodků pšenice kultivovaných společně s A. tumefaciens, ale frekvence transformace byla velmi nízká a často nereprodukovatelná. Chan a kol., (1993), se následně pokusil o produkci rotlin transgenní rýže za použití A. tumefaciens, ale jeho metoda nebyla obecně přijata, vzhledem k nedostatku dostatečných molekulárních a genetických důkazů pro produkci transgenních rostlin.

Novější pokusy provedené Hiei a kol., (1994) naznačily, že rostliny transgenní rýže mohou být získány po transformaci A. tumefaciens, ale že určité použité bakteriální kmeny a volba bakteriálních vektorů mohou být kritické pro úspěšné získání transgenů. Nedávná zpráva od Ishida a kol., (1996), naznačuje, že vysoce účinná transformace kukuřice byla možná společnou kultivací nezralých zárodků a A. tumefaciens. V obou zprávách týkajících se jak transformace rýže, tak kukuřice, byl pro dosažení vysoce účinné transformace použit super binární vektor pTOK233 obsahující virB, virC a virG geny. Nedávná zpráva od Saito a kol. (mezinárodní patentová přihláška publ. č. WO 95/06722) popisuje metodu pro transformaci jednoděložných rostlin za použití štítku nediferencovaných nezralých zárodků a s použitím A. tumefaciens.

I přes skutečnost, že pšenice je nejrozšířenější

užitkovou obilovinou na světě, neexistují na neštěstí žádné přesvědčivé zprávy o použití metod transformace za použití Agrobacterium v přípravě rostlin stabilní, fertilní transgenní pšenice. Obdobně, nebyly vyvinuty žádné metody využívající nezralých zárodečných tkání nebo tkání kalu pro stabilní, vysokofrekvenční transformaci pšenice. Proto, v dosavadním stavu techniky chybí Agrobacterium-zprostředkovaná metoda pro přípravu fertilní, transgenní pšenice.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se snaží překonat tyto a jiné nedostatky dosavadního oboru tím, že poskytuje nové způsoby pro stabilní transformaci jednoděložných rostlin, zejména pšenice, za použití Agrobacterium-zprostředkovaných metod.

Proto zvláštní předmět tohoto vynálezu poskytuje techniky, které umožní přípravu transgenní, fertilní pšenice, která bude preferovaně diploidní a která bude stabilně transformovaná díky zavedení jednoho nebo více požadovaných genů do genomu těchto druhů.

Předkládaný vynález se proto obecně týká způsobů pro produkci rostlin transgenní pšenice. Jak je zde použit, znamená termín "transgenní rostliny" rostliny, které inkorporovaly exogenní geny nebo DNA sekvence, včetně, ale bez omezení, genů nebo DNA sekvencí, které nejsou normálně přítomné, genů, které nejsou normálně transkribované a translatované ("exprimované") v daném typu buněk, nebo jakýchkoliv jiných genů nebo DNA sekvencí, které je žádoucí

zavést do netransformovaných rostlin, jako jsou geny, které mohou být normálně přítomny v netransformované rostlině, ale u kterých je žádoucí alterovaná exprese.

Předkládaný vynález může být použit na jakékoliv rostlinné druhy. Zejména je použitelný pro jednoděložné druhy. Konkrétně, je užitečný pro rostlinné druhy, které nemohou po dlouhou dobu zůstávat ve stadiu kalu bez ztráty schopnosti regenerace. Jedním z hlavních druhů použitelných v předkládaném vynálezu je pšenice. Preferované druhy zahrnují pšenici Triticum aestivum, T. turgidum a T. monococum, kdy zejména preferována je T. aestivum. Předkládaný vynález má, při aplikaci na pšenici, tu výhodu, že je nezávislý na genotypu. To znamená, že může být použit na jakýkoliv typ pšenice, včetně ozimné a jarní pšenice. Může být použit pro produkci rostlin transgenní pšenice z jarních kultivarů, jako je například, Bobwhite a Marshall PAVOT1. UC702 a Panewawa, stejně jako z ozimých kultivarů, jako je například HY368, Neeley, FL302, RH91, R332, R1269 a R585.

Předkládaný vynález je použit pro zavedení cizorodé DNA do regenerovatelné rostlinné tkáně. Jakýkoliv typ cizorodé DNA může být insertován do rostlinných druhů za použití metody podle předkládaného vynálezu. Obecně, "cizorodá DNA" může být definována tak, aby zahrnovala jakýkoliv typ DNA, která je insertována do rostlinné buňky z vnějšku rostlinné buňky. Způsoby pro inserci klonované DNA do vhodných plasmidových konstruktů a manipulace se vhodnými přenosovými kmeny Agrobacterium jsou obecně dobře známy.

Typ DNA obsažené v cizorodé DNA může zahrnovat DNA,

které je již přítomná v rostlinné buňce, DNA z jiné rostliny, DNA z odlišného organismu nebo DNA vyrobenou externě, jako je například DNA obsahující sekvenci antimediátorové zprávy rostlinného genu, DNA sekvence kodující syntetické verze genu, ve které byla modifikována sekvence nukleotidů.

Ve výhodném provedení je použit Agrobacterium tumefaciens C58, anopaliní kmen, pro zprostředkování přenosu DNA do buňky pšenice. Další výhodné kmeny pro použití při provedení vynálezu zahrnují oktopiní kmeny, LBA4404 nebo agropiní kmeny, například EHA101 nebo EHA105.

Ve výhodných provedeních obsahuje cizorodá DNA DNA sekvence, které mohou být funkční v regenerovatelné rostlinné tkáni jako prostředek selekce. Taková DNA může zahrnovat gen, který bude funkční v regenerovatelné rostlinné tkáni a povede k produkci sloučeniny, která bude udělovat rostlinné tkáni resistenci na jinak toxické sloučeniny. Tyto geny jsou v oboru dobře známé a mohou udělovat resistenci na sloučeniny jako jsou antibiotika podobná kanamycinu (Dekeyser a kol., 1989) a herbicidy podobné glyfosatu (Della-Cioppa a kol., 1987) a bialafosu (Vasil a kol., 1992). V rozsahu předkládaného vynálezu mohou být použity jiné prostředky pro selekci. Takové geny zahrnují geny pro CP4, BAR, hygromycin, fosfotransferasy (NPT) a dihydrofolat reduktasu (dhfr).

V jednom provedení je popsán způsob pro produkci transgenní pšenice. Způsob obsahuje, obecně, ustanovení kultury z rostliny pšenice, která má být transformována, transformaci kultury za pomoci přípravku z Agrobacterium obsahujícího DNA, který obsahuje genetickou složku, která má

být zavedena do genomu pšenice, identifikaci nebo selekci transformované buněčné linie a z ní regeneraci transgenní pšenice.

V jiném významném provedení poskytuje vynález způsob pro produkci fertilní transgenní pšenice. Proces vyžaduje ustanovení regenerovatelné kultury z rostlin pšenice, která má být transformována, zavedení DNA přípravku obsahujícího genetickou složku, která má být zavedena do genomu uvedené pšenice, za pomoci Agrobacterium transformace, identifikaci nebo selekci transformované buněčné linie; a regeneraci fertilní rostliny transgenní pšenice z transformované buněčné linie. DNA je přenesena úplným pohlavním cyklem z transgenní rostliny na její potomstvo a potomstvo obsahuje stabilní, chromosomálně integrovanou kopii selektovatelného nebo vyšetřitelného značkovacího genu, který byl do rodiče transformován pomocí Agrobacterium-transformace.

V těchto provedeních zahrnuje DNA přípravek plasmid, konkrétně rekombinantní plasmid jako je pMON18365, který obsahuje nptII gen. Jiné uvažované geny zahrnují selektovatelné nebo vyšetřitelné značkovací geny, jako je například kterýkoliv ze zde popsaných, včetně GUS, zeleného fluorescentního proteinu (GFP) luciferasy (LUC), CP4 a nptII genů. Příklady transposonů a asociovaných genů resistence na antibiotika zahrnují transposony Tns (bla), Tn5 (nptII), Tn7 (dhfr), peniciliny, kanamycin (a neomycin, G418, bleomycin); methotrexat (a trimetoprim); chloramfenikol; kanamycin a tetracyklin.

Charakteristiky užitečné pro selektovatelné markery

v rostlinách byly uvedeny ve zprávě o použití mikroorganismů (Advisory Committee on Novel Foods and Processes, červenec 1994). Tyto obsahují: i) přísnou selekci s minimálním množstvím netransformované tkáně; ii) velký počet nezávislých transformací bez signifikantní interference s regenerací; iii) použitelnost na velkém množství druhů; a iv) dostupnost testu pro vyšetřování tkání na přítomnost markeru. Jak bylo uvedeno výše, několik markerů antibiotické resistence splňuje tato kriteria, včetně resistence na kanamycin (nptII), hygromycin B (aphIV) a gentamycin (aacC3 a aacC4). Úplnější popis a seznam je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1

Typ	Příklady
Aminoglykosidová antibiotika	
1) fosfotransferasové enzymy (APH)	APH(3')II
	APHIV
2) adenyltransferasové enzymy (AAD)	ADD(3'')
3) acetyltransferasy (AAC)	AAC(3)-I
	AAC(3)-III
	AAC(3)-IV
Chloramfenikol	
chloramfenikol acetyl transferasa (CAT)	
β-laktamová antibiotika	
β-laktamasa	TEM-1-β-laktamasa
2,4-diaminopteridon dihydrofolat reduktasa	
Glykopeptidy	TN5-bleomycin
Pyridonkarboxylové kyseliny	resistence na kyselinu nalidixovou
DNA gyrasa	
Rifamyciny	resistence na rifamycin
resistentní RNA polymerasa	
Makrolidy	resistence na erytromycin
methylace 50S podjednotky	
Tetracykliny	exkrece antibiotik z buňky
vazba na S4 a S18 proteiny 70S podjednotky ribosomu	

Pro rostliny byly vyvinuty alternativy k markerům

antibiotické resistence (Advisory Committee on Novel Foods and Processes, červenec 1994). Tyto zahrnují markery tolerance kovů, kompletační systemy s auxotrofickými markery, markery katabolismu cukrů, markery resistence na L-kanavanin a merkery pro resistenci na lysin a threonin a S-aminoethyl L-cystein. Příklady a další popis je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2

Marker	Příklad
Resistence na herbicidy	resistence na herbicidy může být použita jako selektovatelný marker u rostlin, např. tolerance na glyfosat a bromoynil
Tolerance kovů	tolerance kovů, díky inserci savčího genu pro metalothionein
Resistence na lysin a threonin a na s-aminoethyl L-cystein	dva z enzymů biosyntetické dráhy aspartátové rodiny, která je regulována několika zpětnovazebnými smyčkami, byly vyvinuty jako selektovatelné markery; aktivita aspartat-kinasy (AK) je inhibována milimolárními koncentracemi lysinu a threoninu (LT); aktivita dihydrodipikolin syntasy (DHPS) je inhibována lysinem a vede k sensitivitě na toxický analog lysinu, S-aminoethyl L-cystein (AEC); transgenní rostliny obsahující E.coli geny pro expresi AK a DHPS mohou být kultivovány na mediu obsahujícím LT a AEC.

Vyšetřovatelné markery mohou být také použity u rostlin jako alternativy k markerům antibiotické resistence. Takové markery jsou použity pro detekci přítomnosti nebo pro měření úrovně exprese přeneseného genu. Použití vyšetřovatelných markerů u rostlin pro identifikaci nebo sledování geneticky modifkovaných buněk dobře funguje pouze tehdy, pokud je účinnost modifikace buněk vysoká. Některé z často používaných vyšetřovatelných markerů zahrnují β-glukuronidasu (GUS), jejíž exprese je detekována modrým zabarvením při inkubaci tkáně s 5-brom-4-chlor-3-indolyl-1--glukuronidem; bakteriální luciferasu (LUX), jejíž exprese je detekována emisí světla; světluškovou luciferasu (LUC), jejíž exprese je detekována emisí světla po inkubaci s luciferinem; a β-galaktosidasu, jejíž exprese je detekována světle modrým zabarvením po barvení tkáně 5-brom-4-chlor-3-indolyl--β-D-galaktopyranosidem.

Preferované buňky pro provádění těchto metod zahrnují nezralé zárodky, tkáně kalu, nebo suspenze buněk, a preferovaným kmenem Agrobacterium pro transformaci je A. tumefaciens, kdy zejména jsou preferovány kmeny jako je C58 LBA4404 a EHA101.

Zárodky, které mají být transformovány, mohou být buď čerstvě izolovány z nezralých obilek, nebo mohou být izolovány z nezralých obilek a potom předošetřeny. Izolace nezralých zárodků z nezralých obilek může proběhnout ve stejný den jako inokulace, nebo alternativně, jeden, dva, pět nebo více dní před inokulací. Obdobně, tkáň kalu může být izolována z nezralého zárodku nebo z nezárodečných

rostlinných buněk. Zárodek může být poškozen před transformací. Zárodek nebo obilka může být takový, který je 2 nebo více dní po vývoji od květních orgánů a pokud je použita suspenze buněk, pak to mohou být kultury individuálních buněk nebo, alternativně, shluků buněk.

DNA, která má být transformována, je výhodně rekombinantní plasmid, jak je zde popsáno, a může obsahovat jeden nebo více promotorů a/nebo 3' a/nebo 5' regionů operativně navázaných na jednotlivé genetické složky, které mají být transformovány. Zejména jsou preferovány promotory jako je CaMV 35 FMV, ubiquitin, rýžový aktin nebo zesílený CaMV 35S promotor.

Pokud je to žádoucí, může být rostlina odvozená ze transformace kultivována a může být získáno potomstvo. Toto potomstvo může být použito pro přípravu transgenních semen, nebo alternativně, může být kříženo s druhou rostlinou transgenní pšenice pro přípravu fertilní, transgenní pšenice, která obsahuje jeden nebo více požadovaných transgenů. Semena získaná z takového potomstva mohou být klíčena, kultivována a použita pro přípravu dalších generací transgenního potomstva, které budou obsahovat transgeny originálně transformované v rodičovské linii.

V jednom provedení předkládaného vynálezu je nezralý zárodek z rostliny použit jako výchozí materiál. Nezralé zárodky mohou být produkovány za použití známých metod popsaných v oboru. Například, produkce nezralých zárodků pšenice popsal Weeks a kol., (1993) a Vasil a kol., (1993).

V jiném výhodném provedení předkládaného vynálezu je regenerovatelnou rostlinou tkání kalus. Preferovaný kalus je embryogenní kalus. Embryogenní kalus je produkován z nezralého zárodku. Tento kalus může být produkován izolací a kultivací nezralého zárodku v živném mediu s uhlohydráty a regulátory rostlinného růstu. Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu není při produkci embryogenního kalu z pšenice nezbytná eliminace osy zárodku, jak to popisuje Nehra a kol., (1994).

Medium produkující kalus je v oboru dobře známo a může být použito jakékoliv kultivační medium nebo způsob přípravy. Ve výhodném provedení, při přípravě pšeničného kalu, je nezralý zárodek pšenice kultivován po dobu 1 dne až 1 měsíce, výhodně po dobu 4 až 7 dní, v modifikovaném MS mediu obsahujícím okolo 40 g/l maltosy a okolo 2 mg/l 2,4-D. V jiném provedení může být 2,4-D nahrazen kombinací 0,5 mg/l 2,4-D a 2,2 mg/l pichloramu (Chemservice). Medium je zahuštěno 2 g/l Gelrite^{R} (Sigma Chemical, St. Louis, MO) nebo 4 g/l agarosou s nízkou teplotou tání.

Po transformaci je regenerovatelná rostlinná tkáň umístěna do media, které je schopné produkovat výhonky z regenerovatelné rostlinné tkáně, kde medium dále obsahuje sloučeniny použité pro selekci regenerovatelné rostlinné tkáně obsahující selektovatelné DNA sekvence. Toto kontrastuje s předchozí praxí v oboru, kdy je regenerovatelná rostlinná tkáň obecně podrobena nejprve prodloužené době selekce před vystavením regenerovatelné tkáně mediu schopnému vyvolat tvorbu výhonků.

Mediem použitým v tomto kroku může být jakékoliv medium, které umožňuje tvorbu výhonků z regenerovatelné tkáně. V jednom provedení je sloučenina tvořící výhonky přidána do media. Tyto sloučeniny tvořící výhonky jsou dobře známy v oboru (Mursahige a Skoog, 1962; Kasha a kol., 1990). Takové sloučeniny zahrnují slabé regulátory rostlinného růstu a patří sem IAA, IBA a BA v nízkých koncentracích (Becker a kol., 1994; Vasil a kol., 1992). V jiném provedení vynálezu může být pro indukci tvorby výhonků použito medium bez regulátorů rostlinného růstu (Weeks a kol., 1993).

Ve výhodném provedení, když má být regenerován zárodečný kalus pšenice, obsahuje medium modifikované MS medium s 0,2 mg/l 2,4-D (Murashige a Skoog, 1962; Wan a Lemaux, 1994).

Regenerovatelná rostlinná tkáň je obyčejně umístěna do media podle předkládaného vynálezu po transformaci tak rychle, jak je to možné. Obecně může být tato doba v rozmezí od zhruba 1 dne asi do tří týdnů, ale výhodně je asi od 1 dne do asi 2 týdnů, lépe od asi dvou do přibližně tří týdnů. Nejvýhodnější je přenesení tkáně do tohoto media za asi jeden až asi dva týdny po transformaci. Ve většině případů proběhne přenos mezi asi 5 a přibližně 11 dnem.

Sloučeninou použitou pro selekci regenerovatelné rostlinné tkáně obsahující selektovatelné DNA sekvence může být jakákoliv z mnoha známých selekčních sloučenin, jako jsou antibiotika a herbicidy. Mezi výhodné sloučeniny patří geneticin (G-418) (aminoglykosid) (Nehra a kol., 1994); glyfosat (Della-Cioppa a kol., 1987) a bialafos (Vasil

a kol., 1992; Weeks a kol., 1993).

Dostupnost alternativních selekčních činidel je významným požadavkem pro komerční aplikace zemědělské biotechnologie. Použití kanamycinu bylo méně úspěšné pro obilniny vzhledem k vysoké endogenní hladině tolerance (Dekeyser a kol., 1989). Bialafos byl hojně používán jako selekční činidlo při transformaci užitkových obilovin (Weeks a kol., 1993; Vasil a kol., 1993; Becker a kol., 1994; Nehra a kol., 1994; Wan a Lemaux, 1994). Nicméně, potenciálně může být výlučné používání genů kodujících resistenci na bialafos jako selektovatelných markerů ve všech studiích transformace katastrofální. Jsou potřeba jiné selektovatelné markery a výsledky ukazují, že je zde popsán rychlý regenerační system dobře fungující s různými selekčními činidly.

Po vytvoření výhonků jsou výhonky přeneseny do druhého media schopného vyvolat tvorbu kořenů z uvedených výhonků. Toto medium může dále obsahovat sloučeniny použité pro selekci regenerovatelné tkáně obsahující selektovatelné DNA sekvence. Přenos do tohoto media proběhne tehdy, když se vyvinou dostatečné výhonky, což je v oboru obecně známo. U pšenice toto proběhne během 25 až 40 dnů po transformaci.

Medium schopné vyvolat tvorbu kořenů může být jakékoliv medium produkující kořeny. Tato media jsou v oboru dobře známa (Weeks a kol., 1993; Vasil a kol., 1992). Jedním z výhodných medií produkujících kořeny je modifikované MS medium bez jakéhokoliv regulátoru rostlinného růstu (Murashige a Skoog, 1962; Zhou a kol., 1992).

Po vytvoření kořenů mohou být rostliny přeneseny do půdy a kultivovány pro produkci semen podle metod v oboru známých.

Předkládaný vynález popisuje reprodukovatelnou účinnou metodu používající Agrobacterium pro transformaci jednoděložných rostlin, zejména pšenice a kukuřice, za využití běžného binárního vektoru používaného pro transformaci dvouděložných rostlin. Vynález poskytuje rychlý a účinný transformační a regenerační system využívající Agrobacterium, který je zejména použitelný pro transformaci pšenice a kukuřice. Rostliny regenerované z tohoto systemu jsou fenotypově normální a plně fertilní. Transgeny jsou přeneseny do R1 potomstva podle Mendelovské dědičnosti.

Ve výhodném provedení poskytuje vynález rychlý a účinný transformační system pro pšenici, který využívá čerstvě izolovaných nezralých zárodků, předem kultivovaných zárodků a proliferujících kalů z nezralých zárodků. Nový transformační system vyžaduje pro získání transgenních rostlin dobu okolo 3 měsíců a frekvence transformace ve zde popsaných nových způsobech jsou reprodukovatelně 0,3 až 4,3%.

V obecném smyslu poskytuje předkládaný vynález způsob pro produkci transformovaných jednoděložných rostlin, které obsahují exogenní DNA. Takový způsob obecně vyžaduje izolaci regenerovatelné rostlinné tkáně z rostliny, přenos cizorodé DNA do regenerovatelné rostlinné tkáně 1- až 3-hodinovou inokulací regenerovatelné tkáně Agrobacteriem a společnou kultivaci rostlinné tkáně s Agrobacterium po dobu 2 až 3 dní. Typicky obsahuje cizorodá DNA, která má být insertována do

rostlinného genomu, DNA sekvenci selektovatelného markeru, kde tato sekvence může působit v regenerovatelné tkáni jako prostředek selekce. Buňky jsou potom kultivovány po dobu asi 2 až přibližně 5 dní v medium pro kalus obsahujícím antibiotika pro usmrcení Agrobacterium a asi o 1 až 2 týdny později je regenerovatelná tkáň umístěna do media schopného vyvolat tvorbu výhonků ze tkáně. Toto medium dále obsahuje sloučeninu použitou pro selekci regenerovatelné tkáně obsahující selektovatelné DNA sekvence; a po vytvoření alespoň jednoho výhonku je výhonek obvykle přenesen do druhého media schopného vyvolat tvorbu kořenů u výhonku.

Exogenní geny

Jeden aspekt vynálezu se obecně týká transgenních rostlin, které exprivují jeden nebo více exogenních genů transformovaných pomocí A. tumefaciens. Jak je zde použit, označuje termín "transgenní rostliny" rostliny, které inkorporovaly DNA sekvence, včetně, ale bez omezení, genů, které pravděpodobně nejsou za normálního stavu přítomny, DNA sekvencí, které nejsou normálně transkribovány do RNA nebo translatovány na protein ("exprivovány") nebo jakýchkoliv jiných genů nebo DNA sekvencí, které mají být zavedeny do netransformovaných rostlin, jako jsou geny, které mohou být normálně přítomny v netransformovaných rostlinách, ale které mají být geneticky zpracované nebo mají mít pozměněnou expresi. Předpokládá se, že v některých případech bude genom transgenních rostlin podle předkládaného vynálezu zvětšen díky stabilnímu vložení transgenu. Nicméně, v jiných případech bude vložený gen nahrazovat endogenní sekvenci.

Příklady genů, které mohou být vloženy, zahrnují například DNA sekvence nebo geny z jiných druhů, nebo rovněž geny nebo sekvence, které pocházejí ze stejného druhu nebo jsou přítomny ve stejném druhu, ale jsou do přijímajících buněk vloženy metodami genetického inženýrství, a ne technikami klasické reprodukce nebo křížení. Nicméně, termín "exogenní" je také míněn tak, aby označoval geny, které nejsou normálně přítomné v buňkách, které mají být transformovány, nebo jednoduše asi nejsou přítomny ve formě, struktuře atd., ve které se nalézají ve transformujícím DNA segmentu nebo genu, nebo geny, které jsou stále normálně přítomny ve větším množství, než je žádoucí, např. které jsou nadměrně exprivovány. Proto termín "exogenní" gen nebo DNA označuje jakýkoliv gen nebo DNA segment, který je vložen do recipientní buňky, bez ohledu na to, že podobný gen může již být v takové buňce přítomen.

Počátečním krokem v produkci fertilních trnsgenních rostlin je získání DNA přípravku, např. vektorů, plasmidů, lineárních fragmentů DNA a podobně, jejichž složka má být přenesena do recipientních buněk jednoděložné rostliny. DNA segmenty pro použití při transformaci takových buněk budou, samozřejmě, obecně obsahovat gen nebo geny, které mají být vloženy do buněk. Tyto geny mohou dále obsahovat struktury jako jsou promotory, enhancery, polylinkery nebo i regulační geny, jak je to žádoucí.

Vektory, plasmidy, kosmidy, YAC (kvasinkové arteficiální chromosomy) a DNA segmenty pro použití při transformaci takových buněk budou, amozřejmě, obecně obsahovat cDNA, gen nebo genovou sekvenci, která má být

transformována do jednoděložných rostlin. Tyto DNA konstrukty mohou dále obsahovat struktury jako jsou promotory, enhancery, polylinkery nebo i regulační geny, pokud je to žádoucí. DNA segment nebo gen může kodovat buď nativní nebo modifikovaný protein nebo polypeptid, který bude exprivován ve výsledných rekombinantních buňkách, a/nebo který bude způsobovat vylepšený fenotyp regenerované rostliny.

Pro zlepšení schopnosti identifikace transformantů může být žádoucí použití selektovatelného nebo vyšetřovatelného markerového genu spolu s požadovaným exprivovatelným genem. Markerové geny kodují fenotyp, který umožňuje odlišení buněk, které exprivují markerový gen od buněk, které nemají marker. Takové geny mohou kodovat buď selektovatelný nebo vyšetřitelný marker, v závislosti na tom, zda marker uděluje rys, který je možno selektovat chemickými prostředky, t.j. použitím selektivního činidla (například herbicidu, antibiotika a podobně). V oboru je známo mnoho příkladů vhodných markerových genů a mohou být využity při provádění předkládaného vynálezu.

Selektovatelné markery, které mohou být použity v předkládaném vynálezu, zahrnují, ale nejsou omezeny na, nptII gen; bar gen, který koduje resistenci na bialafos; mutantní gen pro EPSP syntasu, který koduje resistenci na glyfosat; gen pro nitrilasu, který udílí resistenci na bromoxynil; mutantní gen pro acetolaktat syntasu (ALS), který udílí resistenci na imidazolinon nebo na sulfonylmočovinu; nebo DHFR gen pro resistenci na methotrexat.

Příklady vyšetřovatelných markerů zahrnují β-glukoro-

nidasu nebo uidA gen (GUS), který koduje enzym, pro který jsou známé různé chromogenní substráty; gen pro β-laktamasu, gen pro luciferasu, xylE gen, gen pro α-amylasu; gen pro tyrosinasu, α-galaktosidasu, nebo jakýkoliv jiný vhodný vyšetřovatelný marker, který je odborníkovi v oboru znám.

Ve světle tohoto zjištění bude odborníkovi v oboru zřejmé, že může být použito mnoha jiných možných selektovatelných a/nebo vyšetřitelných markerových genů. Proto je předešlá diskuse pouze ilustrativní a ne vyčerpávající. Ačkoliv je předkládané zjištění podrobně doložen v příkladech za použití nptII a GUS genů, spadají použitelné techniky pro tvorbu a použití jakýchkoliv jiných vyšetřitelných nebo selektovatelných markerových genů z hlediska předkládaného vynálezu do praxe v oboru známé.

Volba jednotlivých DNA segmentů, které mají být přeneseny do buněk příjemce, bude záviset na účelu transformace. Jedním z hlavních cílů transformace plodin je přidání nějakých komerčně žádoucích, agronomický významných rysů rostlině. Takové rysy zahrnují, ale nejsou omezeny na, resistenci na herbicidy, zvýšený výnos, resistenci vůči hmyzu a nemocem, fyzikální podobu, obsah a vzhled potravy, atd. Například, může být žádoucí inkorporace jednoho nebo více genů kodujících insekticidní geny, kde tyto geny zahrnují gen pro krystalický toxin Bacillus thuringiensis, který způsobuje resistenci na hmyz řádu Lepidopteran a Coleopteran. Takové geny jsou odborníkům v oboru dobře známé a předpokládá se, že budou užitečné v provádění způsobů transformace zde popsaných pro jednoděložné rostliny jako je pšenice.

Transgenní rostliny

Významným aspektem předkládaného vynálezu jsou přípravky obsahující rostliny fertilní kultivované transgenní pšenice. U těchto rostlin byl genom zvětšen vložením předem vybrané genetické složky do genomu, za vzniku transgenní rostliny. Transgen obyčejně obsahuje genetickou složku, která obsahuje jeden nebo více exogenních genů umístěných pod kontrolou jednoho nebo více předem vybraných genetických kontrolních elementů nebo promotorů. Takovou rostlinu je možné připravit za použití procesů zde popsaných, které zahrnují přípravu DNA přípravku in vitro, kde tento přípravek obsahuje genetickou složku, která má být vložena do genomu pšenice a potom vložení DNA do buňky pšenice za použití transformace využívající Agrobacterium. Genetická složka obvykle obsahuje jeden nebo více selektovatelných nebo vyšetřitelných genů popsaných výše. Po transformaci jsou z buněk, které dostaly exogenní gen(y), regenerovány rostliny pšenice a mohou být získány vzniklé fertilní, transgenní rostliny, které mají zvětšené genomy díky stabilnímu vložení genetické složky.

V tomto procesu mohou být buňky, které jsou transformovány dediferencovány, nebo mohou být dále dediferencovány a kultivovány v dediferencovaném stavu až do doby, než proběhne diferenciace a dozrání rostlinek. Ve výhodných provedeních zahrnují tyto recipientové buňky nezralé zárodky embrya, tkáně kalu, nebo alternativně, suspenze buněk. Zárodky mohou být čerstvě izolovány z nezralých obilek nebo, alternativně, izolovány z nezralých obilek a potom ošetřena před inokulací. Nezralý zárodek může být izolován z nezralých

obilek v den inokulace nebo, alternativně, jeden nebo dva, nebo 5 nebo 10 i více dní před inokulací. Zárodkem může být zárodek, který je 1 nebo 2 nebo více dní po vývoji z květních orgánů nebo, alternativně, obilka může být 1 nebo 2 nebo i více dní po vývoji z květních orgánů.

Pokud je tkáň kalu použita jako recipientová buňka, tak může být kalus izolován buď z nezralého zárodku, nebo z neembryonálních buněk. V jistých aspektech může být žádoucí poškození zárodku před transformací, což může navodit účinnost transformace.

Také jsou zde popsány rostliny fertilní, transgenní pšenice, jejíž genetická výbava byla pozměněna přidáním DNA přípravku obsahujícího předem vybraný funkční genetický element, který obsahuje transgen vybraný ze skupiny skládající se z nptII genu, bla genu, nptI, dhfr, aphIV, aacC3, aacC4 genu a GUS genu. Zejména výhodné jsou geny kodující resistenci na glyfosat nebo přijatelný markerový gen jako je nptII gen.

Recipientové buňky mohou být zároveň transformovány více než jedním exogenním genem a za takových okoloností mohou být exogenní geny umístěny na jediném DNA segmentu nebo, alternativně, na jednom nebo více plasmidech, každý pod kontrolou jiného kontrolního elementu.

Zejména výhodnými plasmidy jsou rekombinantní plasmidy jako je pMON18365, pMON32614, pMON30053, pMON25457, pMON30052 a pMON19450. Geny mohou být umístěny pod kontrolou promotoru jako je CaMV 35S, ubiquitin, rýžový aktin nebo

posílený CaMV 35S promotor. Pokud je to žádoucí, mohou DNA segmenty, které mají být transformovány, obsahovat další 5' a/nebo 3' regiony operativně navázané na geny.

Transgenní potomstvo, semena a odvozené buněčné linie

Další důležité aspekty vynálezu zahrnují potomstvo transgenních rostlin připravených popsanými metodami, stejně jako buňky připravené z takového potomstva a semena získaná z takového potomstva.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázky tvoří část tohoto popisu a jsou zde uvedeny pro další demonstraci jistých aspektů předkládaného vynálezu. Vynález může být lépe pochopen odkazem na tyto obrázky spolu s podrobným popisem specifických provedení zde uvedeným.

Obrázek 1 znázorňuje strukturu pMON18365, který je příkladem plasmidu neseného v Agrobacterium, který byl použit v tomto vynálezu. V T-DNA regionu jsou GUS i nptII geny řízeny posíleným 35S promotorem a intronovým kukuřičným HSP70 intronem. GUS gen také obsahuje dva introny.

Obrázek 2 znázorňuje strukturu pMON18364, který byl použit při konstrukci pMON18365.

Obrázek 3 znázorňuje strukturu pMON18342, který byl použit při konstrukci pMON18365.

Obrázek 4 znázorňuje strukturu pMON19476, který byl

použit při konstrukci pMON18365.

Obrázek 5 znázorňuje strukturu pMON18361, který byl použit při konstrukci pMON18365.

Obrázek 6 znázorňuje strukturu pMON32614.

Obrázek 7 znázorňuje strukturu pMON25457.

Obrázek 8 znázorňuje strukturu pMON30053.

Obrázek 9 znázorňuje strukturu pMON30052.

Obrázek 10 znázorňuje strukturu pMON19450.

Obrázek 11 znázorňuje obecný protokol pro transformaci nezralých zárodků za použití metod zde popsaných.

Na obrázku 11 i na dalších místech popisu d znamená den, t znamená týden.

Obrázek 12 znázorňuje obecný protokol pro transformaci suspenze buněk za použití metod zde popsaných.

Dále se popisují ilustrativní provedení vynálezu.

Některé výhody vynálezu

Odborník v oboru ocení mnoho výhod způsobů a přípravků poskytnutých v předkládaném vynálezu. Několik takových výhod může být shrnuto následovně:

Dosažení účinné transformace za použití běžného binárního vektoru

Běžný binární vektor pMON18365 byl použit ve všech pokusech v tomto vynálezu. Ve většině pokusů byla dosažena účinná transformace. Tato skutečnost naznačuje, že super binární vektor nemusí být nezbytný, ačkoliv bylo ukázáno, že je zásadní pro dosažení vysokého stupně transformace kukuřice (Ishida a kol., 1996).

Transformace za použití různých explantátů

Různé typy explantátů - nezralé zárodky, embryogenní kalus a suspenze buněk - byly použity jako explantáty pro infekci Agrobacterium v tomto vynálezu. Stabilní transformanty (kolonie ze suspenze buněk a rostliny z embryí a embryogenního kalu) byly generovány ze všech těchto explantátů, což činí tento vynález lepším než jsou jiné publikované transformační systemy využívající Agrobacterium, jako je system pro kukuřici (Ishida a kol., 1996), ve kterém mohou být pro produkci transgenních rostlin použita pouze čerstvě izolované nezralé zárodky.

Účinná a rychlá produkce stabilních transformantů

Vysoce účinná exprese GUS genu byla pozorována u explantátů krátce po infekci Agrobacterium jak je ilustrováno v tabulkách 4 a 7. V případě, že byla inokulována suspenze buněk, mohlo být získáno přibližně 200 stabilních transformantů (kolonií) z 1 ml buněk po 40 až 60 dnech

selekce na mediu obsahujících selektivní činidlo, jako je G418. Transformované rostlinky mohly být vyvinuty z nezralých zárodků a částí kalu v mediu obsahujícím G-418 několik týdnů po inokulaci. Pouze 3 měsíce od infekce Agrobacterium byly nutné pro zasazení rostlin do půdy. V pokusech, které generovaly transgenní rostliny, byla účinnost stabilní transformace v rozmezí od 0,3 do 4,3 % (počet trangenních dějů/počet inokulovaných explantátů) (tabulka 5), což je srovnatelné nebo vyšší, než je účinnost publikovaná za použití jiných transfromačních systémů (Vasil a kol., 1992, 1993; Weeks a kol., 1993; Nehra a kol., 1994; Becker a kol., 1994; Zhou a kol., 1995). Transgenní rostliny měly normální morfologii a byly plně fertilní.

Mendelovská segregace transgenu v potomstvu

Exprese transgenu byla studována v potomstvu (R_1 generaci) 4 primárně transformovaných rostlin ze 2 pokusů. GUS aktivita byla pozorována přibližně u 3/4 jedinců (semena a rostliny) R_1 generace (tabulka 6), což ukazuje, že gen byl přenesen na potomky podle Mendelovské dědičnosti. U rostlin nebyly pozorovány žádné abnormality.

Produkce regenerovatelných transgenních rostlin

Z 5 studií bylo identifikováno celkem 9 případů (7 různých ošetření) (tabulka 3). Na 5 rostlinách ze 3 dějů z ExpAG2 a AG13 byla provedena Southern analýza. Výsledky ukazují, že všech 5 rostlin mělo transgeny integrovány do genomu. Rostliny ze 6 dalších dějů (z ExpAG22, AG25 a AG30) byly identifikovány GUS histochemickým testem a jsou buď

v půdě, nebo v Sundae nádobkách. Všechny měly vysokou až střední aktivitu GUS. Účinnosti transformace ze dvou studií byly 2,7 a 2,1 %.

Všechny případy byly generovány z inokulované embryogenní tkáně kalu nebo z předkultivovaných nezralých zárodků (IEs) (tabulka 4). Způsob inokulace a podmínky se mezi těmito studiemi lišily. Výsledky ukazují, že transformace pšenice zprostředkovaná Agrobacterium je opakovatelná a že embryogenní tkáň kalu a předkultivovaná IEs jsou vhodnými explantáty pro infekci Agrobacterium.

Segregace 3:1 aktivity GUS v R_1 potomstvu

R_1 rostliny ze tří transgenních rostlin z ExpAG13 (tabulka 3) byly produkovány klíčením R_1 nezralých embryí in vitro. Rostliny byly přeneseny do půdy a GUS aktivita byla měřena v R_1 potomstvu a nezralá semena s odstraněnými zárodky byla rozříznuta na dvě poloviny podélně a byla použita pro histochemický test na GUS. Tkáň štítku byla také odebrána na GUS test z některých klíčících zárodků. Mateřská tkáň, perikarp, každého semene byla GUS pozitivní, jak bylo očekáváno. Nicméně, aleuronová vrstva semen a tkáň štítku zárodků se segregovala na GUS pozitivní a GUS negativní. Poměr GUS-pozitivních a GUS-negativních rostlin se významně nelišil od 3:1 podle kappa2 testu (tabulka 2), což ukazuje, že transgen byl s největší pravděpodobností insertován do jediného lokusu.

Tabulka 3

Transgenní případy generované transformací zprostředkovanou Agrobacterium

Pokus-ošetření	Explantát	počet kusů	inokulace (%)[2]	č. děje (rostlina)[1]	TE
AG2-05	3-t kalus	73(velkých)	3h, vakuová infiltrace	2 (2)	2,7
AG13-03	2-t kalus	47(velkých)	vakuová inokulace	1 (3)	2,1
AG22-05	10-d kalus	239(malých)	3h, namočení	1	NA
AG22-06	25-d kalus	308(malých)	3h, namočení	1	NA
AG25-24	6-d IEs	40	3h, namočení	1	NA
AG30-02	3-d IEs	98	3h, namočení	1	NA
AG30-05	3-d IEs	104	3h, namočení	2	NA

Tabulka 4

Aktivita GUS v aleuronové vrstvě nebo ve štítku v potomstvu ze semen R_0 rostlin

R_0 rostlina	počet test. R_1 semen	počet GUS pozitivních semen	počet GUS negativních semen	chi-square hodnota[1]
AG13-03-02-01	31	22	9	0,27
AG13-03-02-02	28	22	6	0,19
AG13-03-02-03	124	96	28	0,387

[1] Tato hodnota byla vypočítána na základě hypotesy segregace 3:1. Kritická hodnota při $\alpha = 0,05$ a df = 1 byla 3,84, vyšší než jakákoliv z chi-square hodnot v tabulce. Proto, žádný ze segregačních poměrů nebyl signifikantně odlišný od hypoteticky předpovězeného poměru 3:1.

Metody obsahující selektovatelné markery schválené EPA a FDA

Ačkoliv většina z popsaných metod pro příbuzné obilniny spočívá v použití hygromycin fosfotransferasy (HPT) jako selektovatelného markeru, překonává předkládaný vynález toto omezení využitím nptII jako selektovatelného markeru.

nptII gen (který koduje neomycin fosfotransferasu) je nejčastěji akceptovaným selektovatelným markerem v oboru a byl schválen Enviromental Protection Agency jako pesticidně

inertní. Podobně, jeho schválení Food and Drug Administration jako nepřímý potravní doplněk činí tento marker lepším než jsou markery jako je hygromycin, který nebyl podobně schválen těmito úřady.

Rozdíly od systémů vyvinutých pro rýži a pro kukuřici

Předkládaný vynález se významně liší od metod popsaných v poslední době pro jiné obilniny. Oproti dřívějším metodám použitým pro transformaci rýže, nevyžadují předkládané metody pro inokulaci ošetření ve vysoce osmotickém prostředí. Podobně, předkládaný vynález se liší od metod popsaných pro transformaci kukuřice v tom, že není omezen na použití pouze čerstvě izolovaných nezralých zárodků jako explantátů. Předkládaný vynález je také dobře účinný pro předkultivované nezralé zárodky nebo tkáň kalu a není omezen na čerstvě izolovanou zárodečnou tkáň.

Jiným významným rozdílem vůči dříve popsaným metodám je to, že metody podle předkládaného vynálezu jsou aplikovatelné za použití standartních binárních plasmidů, které jsou dobře známé v oboru, a není nutná konstrukce a použití "super" binárních plasmidů, jak je to popsáno ve dřívějších pracích. Binární plasmid je nejběžnějším typem používaným pro většinu metod pro transformaci dvojděložných rostlin a odborníkovi v oboru jsou binární plasmidy snadno dostupné pro použití při metodách zde popsaných.

Následující příklady jsou zde uvedeny pro demonstraci výhodných provedení vynálezu. Odborníkovi v oboru by mělo být jasné, že techniky popsané v příkladech, které následují,

představují techniky objevené původcem dobře fungující při provádění vynálezu, a proto mohou být považovány za výhodné způsoby pro jeho provádění. Nicméně ve světle podaného popisu by odborníkovi v oboru mělo být zřejmé, že může být provedeno mnoho změn ve specifických provedeních, která jsou popsána, a stále budou získány podobné výsledky bez odchýlení se od rozsahu a duchu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 - Transformace za použití nezralých zárodků

1. Příprava explantátu

V této studii byla použita jarní pšenice Triticum aestivum kultivar Bobwhite. Zásobní rostliny byly kultivovány v růstové komůrce s kontrolovaným prostředím s 16-hodinovou fotoperiodou při 800 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ dodávaným vysoce intenzivním ozářením světlem (HID) Sylvania (GTE Products Corp., Manchester, NH). Denní/noční teplota byla 18/16 ^0C. Nezralé obilky byly z rostlin odebrány 14 dní po vývoji z květních orgánů. Nezralé zárodky (IEs) byly asepticky vyříznuty a byly kultivovány na následujícím pre-kultivačním mediu před inokulací:

1) semisolidní kalus-indukující medium CM4 nebo CM4C (tabulka 5) po dobu 1 - 6 dnů;
2) kapalné CM4C doplněném 0,25 M rafinosou a manitolem po dobu 1 dne;
3) kapalném CM4 mediu s 1/10 ředěním MS solí a doplněném 10 g/l glukosou, 3,9 g/l MES po dobu 1 až 3 hodin.

Všechny kultivace byly prováděny při teplotě 23 až 25 ^0C.

Tabulka 5

Doplňkové složky v základním mediu[1]

Složka	CM4	CM4C	MMS.2C	MMS0C	MS1WSM[4]	MS2WCM[4]
2,4-D (mg/l)	0,5	0,5	0,2	--	1,0	2,0
Pichloram (mg/l)[2]	2,2	2,2	--	--	--	--
Maltosa (g/l)	40	40	40	40	--	--
Sacharosa (g/l)	--	--	--	--	20	20
Glutamin (g/l)	0,5	0,5	--	--	--	--
Chlorid hořečnatý (g/l)	0,75	0,75	--	--	0,75	0,75
Hydrolyzát kaseinu (g/l)	0,1	0,1	--	--	--	--
MES (g/l)	--	1,95	1,95	1,95	--	--
Kyselina askorbová (mg/l)[2]	--	100	100	100	--	--
I-asparagin (g/l)	--	--	--	--	0,15	0,15
Thiamin HCl (mg/l)	--	--	--	--	0,5	0,5
Želatinizující činidlo (g/l)[3]	2(P)	2(P)	2(G)	2(G)	--	2(P)

[1] Všechna media obsahovala základní soli (MS základní soli) a vitaminy (MS vitaminy) z Murashige a Skoog (1962) media, pokud není uvedeno jinak. pH každého media bylo upraveno na 5,8.

[2] Sterilizované filtrem a přidané do media po autoklavování.

[3] Phytagel^{TM} (P) a Gelrite^{R} (G)

[4] V mediu nebyly přítomné žádné MS vitaminy.

2. Kultura Agrobacterium

Oslabený kmen Agrobacterium tumefaciens C58 (ABI) nesoucí binární vektor pMON18365 (obrázek 1) byl použit ve všech studiích. pMON18365 obsahuje GUS (uidA) gen s intronem a s nptII genem jako selektovatelným markerem v T-DNA (přenosová DNA) regionu. Oba geny jsou pod kontrolou posíleného CaMV 35S promotoru. Kultury Agrobacterium byly iniciovány ze zásob v glycerolu a byly kultivovány přes noc při 25 až 26 ^{0}C na rotační třepačce (frekvence otáčení 150 za minutu) v kapalném LB mediu (Miller, 1972) obsahujícím 50 mg/l kanamycinu, streptomycinu i spektinomycinu, 25 mg/l chloramfenikolu a 200 µM acetosyringonu, do střední log fáze (OD_{660} = 1 - 1,5). Buňky Agrobacterium byly odebrány centrifugací a byly resuspendovány v inokulačním mediu, CM4 nebo CM4C (tabulka 9) s 1/10 ředěním MS solí a doplněném 10 g/l glukosy a 200 µM acetosyringonu. Hustota buněk Agrobacterium byla upravena pro inokulaci na OD_{660} = 2.

3. Inokulace a současná kultivace

IEs přechodně uchovávané v kapalném pre-kultivačním mediu 3 byly přeneseny do suspenze buněk Agrobacterium v Petriho miskách (25 x 100 mm). Poměr mezi Agrobacterium a IEs byl přibližně 30 ml: 200 IEs. Do inokulačního media byl přidán surfaktant, Silwet^{R} (Monsanto, St. Louis, MO), v koncentraci 0,01 až 0,75 %. Inokulace byla prováděna při 23 až 25 ^{0}C po dobu 3 hodin ve tmě. Po inokulaci byla Agrobacteria odstraněna vakuem nebo použitím přenosové pipety a IEs byly umístěny do media pro současnou kultivaci, CM4

nebo CM4/C s 1/10 ředěním MS solí a 1,5 mg/l extra 2,4-D a doplněném 10 g/l glukosou a 200 μM acetosyringonu. Zárodky byly umístěny stranou štítku nahoru a byly současně kultivovány s Agrobacterium po dobu 2 až 3 dnů při 25 ^{0}C ve tmě. Pre-kultivované nezralé zárodky (kultivované na mediu po dobu 1 až 6 dnů) byly inokulovány Agrobacteriem podle jednoho z následujících způsobů: 1) ponořením do suspenze buněk Agrobacterium na dobu 1 až 3 hodin. 2) IEs byly ponořeny do suspenze buněk Agrobacterium v Petriho miskách nebo v klastrech pro buněčné kultury, které byly potom umístěny v sušící nádobě a byly vakuovány po dobu 3 hodin za použití vakuového systemu. V některých studiích byl do inokulačního media přidán Silwet^{R} v koncentraci 0,01 %. Po inokulaci byly nezralé zárodky naneseny na sterilní papírové filtry a potom byly přeneseny do jednoho z následujících medií pro současnou kultivaci: 1) semisolidního CM4 nebo CM4C media (tabulka 5) doplněného 10 g/l glukosy a 200 μM acetosyringonu; 2) kapalného nebo semisolidního CM4C media s 1/10 ředěním MS solí a doplněného 10 g/l glukosy a 200 μM acetosyringonu. Filtrační papír (Whatman č. 1) byl v některých studiích položen na medium; 3) kapalného CM4 nebo CM4C s 1/10 ředěním MS solí a 3,9 g/l MES a doplněného 10 g/l glukosy a 200 μM acetosyringonu. Nezralé zárodky byly umístěny na medium nebo na filtrační papír stranou štítku nahoru. Pro kultivaci zárodků v kapalném mediu byla každá kultivační plotna připravena přidáním 8 ml kapalného media do Petriho misky (15 mm x 100 mm) obsahující 6 kusů filtračního papíru Whatman č.1 (8,5 cm). Explantáty byly současně kultivovány s Agrobacterium při 24 ^{0}C ve tmě po dobu 2 až 3 dnů. Po současné kultivaci byly nezralé zárodky vypláchnuty kapalným CM4 nebo CM4C mediem doplněným 500 mg/l karbencilinu

(zpožďující medium). Infikované nezralé zárodky byly kultivovány v solidním zpožďujícím mediu po dobu 2 až 5 dnů. Obecný protokol pro tuto transformaci je uveden na obrázku 6.

Účinnost přenosu T-DNA

Účinnost přenosu T-DNA byla měřena testem přechodné exprese GUS s 2 až 3 denním odstupem od selekce. Ve většině studií byly pozorovány vysoké hladiny přechodné GUS exprese, což naznačuje, že přenos T-DNA byl velmi účinný. Účinek Silwet^{R} na přenos T-DNA byl intenzivně studován na různých explantátech. Jak ukazuje tabulka 6, Silwet^{R} v koncentraci 0,05 - 0,1 % signifikantně zvyšoval přechodnou GUS expresi v čerstvě izolovaných IEs. Podobné výsledky byly také pozorovány pro pre-kultivované IEs a zárodečný kalus jako explantáty pro inokulaci. Pro nezralé zárodky pre-kultivované po dobu 1 až 2 dnů byly GUS skvrny lokalizovány nejvíce podél okraje štítku, ze kterého se vyvíjí menší množství zárodečného kalusu. GUS skvrny byly, nicméně, nacházeny v kalus tvořících oblastech zárodků pre-kultivovaných 3 dny nebo déle.

Tabulka 6

Účinek surfaktantu na expresi GUS, pokud je přítomen v inokulačním mediu[1]

Silwet (%)	GUS pozitivní skvrny/explantát	Počet explantátů t/GUS pozitivní skvrny/celkový počet explantátů (%)
0,00	7,8	11/34 (32)
0,01	17,6	15/19 (79)
0,05	149	13/13 (100)
0,1	111	8/8 (100)
0,5	1	1/1 (100)

[1] Explantáty byly IEs izolované několik hodin před inokulací.

5. Selekce a regenerace rostlin

Po 2 až 5 dnech ve zpožďovacím mediu byly Agrobacteriem infikované nezralé zárodky přeneseny do kalus-indukčního media, CM4 nebo CM4C (tabulka 5) media s 25 mg/l G418 a 25 mg/l karbencilinu. Nezralé zárodky byly kultivovány po dobu 2 až 3 týdnů pro indukci kalu před tím, než byly přeneseny do prvního regeneračního media, MMS.2C (tabulka 5) s 25 mg/l G418 a 250 mg/l karbencilinu. Při přenosu do regeneračního media byl každý kus kalu rozdělen na několik menších kousků (≈ 2 mm). Po dvou týdnech kultivace na prvním regeneračním mediu byly mladé výhonky a živá tkáň kalu přeneseny do druhého regeneračního media, MMS0C (tabulka 5) se stejnými koncentracemi G418 a karbencilinu. Rostlinky,

u kterých bylo později potvrzeno, že jsou správnými transformanty, rostly v tomto mediu rychle a tvořily silné kořenové systemy. Nicméně, v tomto stadiu zde byly některé rostlinky vykazující určitou resistenci na G418. Mohly růst dobře a mohly tvořit jeden nebo více kořenů, ačkoliv nerostly tak rychle jako řádné transformanty. Když byly rostlinky 3 cm nebo vyšší, byly přeneseny do Sundae nádobek (Sweetheart Cup Company, Chicago, IL) obsahujících druhé regenerační medium jak bylo uvedeno výše pro další kultivaci a selekci.
Z některých rostlin byly v tomto stadiu odebrány vzorky listů pro histochemický test na GUS. Nicméně, rostlinky, které byly resistentní a nevykazovaly GUS aktivitu v tomto stadiu nebyly eliminovány. Během růstu v nádobkách většina s non-transformantů uhynula nebo vykazovala známky citlivosti na G418. Rostliny vysoce resistentní na G418 (mohutně rostoucí se silným kořenovým systémem) byly přeneseny do půdy před tím, než dosáhly vrcholu nádobek. Všechny rostliny pocházející ze stejného zárodku byly považovány za potomstvo ze stejného děje.

6. Potvrzení transgenního charakteru rostlin

Rostliny byly kultivovány v kultivační komůrce s kontrolovaným prostředím za stejných růstových podmínek, jaké jsou popsány výše. Vzhledem k tomu, že od inokulace do přenosu většiny rostlin do půdy uběhly pouze asi 3 měsíce, nebyly u těchto rostlin pozorovány žádné viditelné abnormality, které jsou obvykle asociovány s rostlinami dlouhodobě kultivovanými in vitro. Rostliny byly zcela fertilní. Každá rostlina byla vyšetřována alespoň jednou z následujících metod:

1) Histochemický test na GUS (Jefferson, 1987) za použití různých částí rostlin.

2) Biologický test (test blednutí listů). Před hlavatěním byly vzorky listů (délky asi 5 až 7 mm) odebrány z nejmladších plně rozvinutých listů a byly umístěny do jamek 24-jamkové buněčné kultivační plotny (Costar Corporation, Cambridge, MA). Každá jamka byla naplněna 0,5 ml vodného roztoku složeného z 300 mg/l paromomycinu (Sigma) a 100 mg/l Benlatu (fungicid vyráběný DuPont) nebo 100 mg/l Benlatu samotného. Tři vzorky listů ze stejného listu každé rostliny byly umístěny ve dvou jamkách obsahujících paromomycin a Benlat a v jedné jamce obsahující Benlat samotný. Vzorky listů z netransformovaných rostlin Bobwhite byly použity jako negativní kontroly. Vzorky byly vakuově infiltrovány v sušící nádobě za použití vakuového systemu po dobu 5 minut a potom byla plotna důkladně potažena Parafilm^{R} před umístěním na světlo (140 μmol. $m^{-2}.s^{-1}$). Výsledky byly určeny o 60 hodin později. Vzorky listů, které byly vysoce resistentní na paromomycin zůstávaly na většině plochy zelené s výjimkou dvou okrajů (šířky <1 mm), což ukazuje, že rostliny měly funkční nptII gen. Vzorky listů od rostlin bez genu nebo s nefunkčním genem zcela vybledly působením paromomycinu stejně jako negativní kontroly, nebo měly pouze malé zelené plošky.

3) Analýza Southern hybridizací (Southern, 1975). Genomová DNA byla izolována ze tkáně listů rostlin podle metody, kterou popsal Shure a kol., (1983). 15 μg genomové DNA bylo tráveno restrikční endonukleasou BamHI a bylo

frakcionováno na 0,8% agarosovém gelu. DNA byla přenesena do Hybond N membrán (Amersham, Arlington Heights, IL) podle standartních postupů (Sambrook a kol., 1989). Sonda pro detekci nptII genu byla připravena gelovým přečištěním 977 bp NcoI fragmentu z plasmidu pMON18365 (obrázek 1). Fragment byl značen ^{32}P dCTP kitu pro náhodné značení primerů (Prime-It II^{R} od Stratagene^{R}, La Jolla, CA), na specifickou aktivitu 2,6 x 10^{9} cpm/µg. Membrána byla hybridizována po dobu 14 hodin při 42 ^{0}C v roztoku obsahujícím 50% formamid, 5x SSC, 5x Denhart, 0,5% SDS, 100 µg/ml tRNA. Podmínky pro konečné promytí byly 0,1% SSC a 0,1% SDS při 60 ^{0}C po dobu 15 minut.

7. Účinnost stabilní transformace

Počet transgenních dějů v každé studii byl určen po testování rostlin jak bylo popsáno výše. Účinnost transformace (počet dějů/počet nezralých zárodků) se lišila mezi jednotlivými studiemi a podle různých podmínek ošetření, které generovalo transgenní rostliny (tabulka 7). Nicméně, účinnost byla srovnatelná nebo vyšší, než jsou jakékoliv publikované účinnosti transformace pšenice (Vasil a kol., 1992, 1993; Weeks a kol., 1993; Nehra a kol., 1994; Becker a kol., 1994; Zhou a kol., 1995).

Tabulka 7

Účinosti stabilní transformace při produkci transgenní pšenice

Pokus-ošetření	Explantát	Počet IEs nebo kusů kalu (A)	Počet transgenních dějů (B)[1]	Účinnost (B/A%)
AG2-05	21-d kalus, intaktní	73	2	2,7
AG13	14-d kalus, intaktní	47	1	2,1
AG22-05	10-d kalus, asi 2 mm	239	1	0,4
AG22-06	25-d kalus, asi 2 mm	308	1	0,3
AG22-11	10-d kalus, asi 2 mm	232	1	0,4
AG25-24	6-d IEs	40	1	2,5
AG27-15	1-d IEs	23	1	4,3
AG29-04	5-d IEs	97	1	1,0
AG30-02	3-d IEs	98	1	1,0
AG30-05	3-d IEs	104	2	1,9
AG30-08	3-d IEs	36	1	2,8
9528	0-d IEs	160	1	0,6
9531	17-d kalus, intaktní	50	1	2,0
9602	0-d IEs	250	3	1,2
9604	0-d IEs	700	1	0,14
9608	0-d IEs	124	1	0,8
9609	0-d IEs	140	2	1,4
9614	0-d IEs	38	1	2,6
9620	15-d kalus, intaktní	100	3	2,7

[1] Každý transgenní děj proběhl u jedné nebo více rostlin.

8. Analýza potomstva transgenních rostlin

Nezralé obilky byly získány z primárních transgenních rostlin (R_0 generace) s nptII i GUS aktivitou přibližně 20 dní po vývoji z květních orgánů. Nezralé zárodky byly izolovány a kultivovány na MMSOC mediu (tabulka 5) pro klíčení rostlin (asi jeden týden v Petriho miskách a další týden v Sundae nádobkách se stejným mediem). Každá z nezralých obilek s odstraněnými zárodky byla rozříznuta na dvě poloviny podélně a byla přenesena do 96-jamkových kultivačních ploten (Costar Corp. Cambridge, MA) pro histochemický test na GUS jak byl popsán výše. Obě poloviny obilek byly vyšetřovány pod mikroskopem pro určení GUS aktivity v různých oblastech. Část tkáně štítku byla také odebrána z každého klíčícího zárodku pro test na GUS. Po přenesení rostlin (R_1 generace) do půdy přibližně 2 týdny po klíčení byla GUS aktivita v rostlinách určována histochemickým testem na GUS za použití tkáně listů a květů.

Jak bylo očekáváno, mateřská tkáň, perikarp, každé nezralé obilky, vykazovala aktivitu GUS. Nicméně, aleuronová vrstva většiny obilek vykazovala GUS aktivitu, ostatní nikoliv. Poměr obilek s GUS pozitivní aleuronovou vrstvou k obilkám s GUS negativní aleuronovou vrstvou se signifikantně nelišil od 3:1 podle chi square testu (tabulka 8). Data GUS testu provedeného na obilkách dobře odpovídala datům testu provedeného na tkáni štítku a dalším GUS testům provedeným na tkáních listu a květu, ačkoliv GUS aktivita v aleuronové vrstvě a štítku byla mnohem silnější než ve tkáních listu a květu.

Tabulka 8

Segregace GUS aktivity v R_1 semenech a rostlinách

R_0 rostliny	Počet R_1 testovaných semen (rostlin)	Počet GUS pozitivních	Počet GUS negativních	chi-square hodnota[1]
16612	31	22	9	0,27
16613	28	22	6	0,19
16614	124	96	28	0,387
16953	128	103	25	2,04

[1] Tato hodnota byla vypočítána na základě předpokladu segregace 3:1. Kritická hodnota při $\alpha = 0,05$ a df = 1 byla 3,84, vyšší než jakákoliv z chi-square hodnot v tabulce. Proto žádný ze segregačních poměrů nebyl signifikantně odlišný od hypoteticky předpovězeného poměru 3:1.

Příklad 2 - Transformace za použití zárodečného kalu

1. Příprava explantátů

Nezralé zárodky pšenice (Triticum aestivum L.) kultivar Bobwhite byly izolovány z nezralé obilky 14 dní po vývoji z květních orgánů a byly kultivovány v mediu indukujícím kalus CM4 nebo CM4C (tabulka 9) stranou štítku

nahoru. Po 10 dnech nebo déle se nezralé zárodky vyvíjely do zárodečného kalu. Každý kalus byl velikosti přibližně 5 mm nebo větší. Kaly byly inokulovány Agrobacterium bez narušení (intaktní), nebo byly vybrány řezy pouze většiny zárodečných kalů a byly rozděleny na malé kousky (asi 2 mm) za použití jemných kleštiček pro inokulaci.

2. Inokulace a současná kultivace

Kousky kalu byly inokulovány buněčnou suspenzí Agrobacterium připravenou jak je popsáno výše, za použití jedné z následujících metod.

1) Ponoření kousků kalu do buněčné suspenze Agrobacterium na dobu 3 hodin.

2) Ponoření kousků kalu do buněčné suspenze Agrobacterium s vakuovou infiltrací po dobu 3 hodin.

3) Intaktní kousky kalu byly umístěny na kousek sterilního filtračního papíru nasycený kapalným inokulačním mediem. Kousky kalu byly inokulovány v intaktním stavu, nebo byly před inokulací stlačeny za použití sterilní špachtle do "koláčů". Každý kousek filtračního papíru nesoucí kousek kalu byl přenesen do 150-ml filtračního systemu (Corning, Inc., Corning, NY) spojeného s vakuovým systemem, nebo do Büchnerovy nálevky spojené s vakuovým systémem přes filtrační baňku. Ve vakuovém systemu byla buněčná suspenze Agrobacterium pomalu nakapána na kousky kalu (>1 ml na 6 kousků kalu). Po nakapání buněčné suspenze Agrobacterium bylo po dobu dalších 10 minut aplikováno vakuum. Kousky kalu

inokulované jakoukoliv z těchto metod byly přeneseny do Petriho misek (100 x 15 mm), které každá obsahovaly 6 kusů Whatmanova filtračního papíru (č. 1, 8,5 cm) nasyceného 8 ml media pro současnou kultivaci (CM4 nebo CM4C s 1/10 ředěním MS solí a doplněném 10 g/l glukosy a 200 μM acetosyringonu). Plotny byly důkladně potaženy Parafilmem^{R}. Po současné kultivaci s Agrobacterium po dobu 3 dnů byly kousky kalu promyty v kapalném zpožďovacím mediu (CM4 nebo CM4C doplněné 500 mg/l karbencilinu) a byly naneseny na kousky sterilního filtračního papíru pro odstranění nadbytku kapaliny. Kousky kalu byly kultivovány v semisolidním zpožďovacím mediu po dobu 3 dnů před přenosem do selektivního kalus-indukujícího media.

3. Účinnost přenosu T-DNA

Po současné kultivaci s Agrobacterium nebo po stadiu zpoždění byly náhodně odebrány vzorky kalu pro histochemický test na GUS (Jefferson, 1987). Jak je ukázáno v tabulce 11, většina testovaných kousků kalu měla GUS pozitivní skvrny. V některých studiích (jako je pokus AG13) měly všechny testované kousky kalu GUS pozitivní skvrny. Počet GUS pozitivních skvrn v každém kousku kalu se lišil od několika do asi 100. V pokusu AG13 byl proveden další histochemický test na GUS dva týdny po inokulaci. Všech 16 testovaných kousků kalu mělo nějaké GUS pozitivní skvrny a z nich 7 kousků (44%) mělo rostoucí GUS pozitivní sektory, což naznačuje, že transformované buňky byly proliferující.

Tabulka 9

Účinnost přenosu T-DNA jako je ukázána histochemickým testem na GUS na kouscích kalu po současné kultivaci

Pokus-ošetření	Explantát	Počet IE t/ GS pozit. skvrny (celkový počet z testovaných IEs)	Počet skvrn na každém GUS-pozit. IE
AG2-5	21-d kalus, intaktní	1/19	1 - 5
AG13	14-d kalus, intaktní	25/25	několik - ≈ 50
AG22-5	10-d kalus, asi 2 mm	6/15	několik
AG22-6	25-d kalus, asi 2 mm	7/10	málo - ≈ 100
AG22-11	10-d kalus, asi 2 mm	12/20	málo - 12

4. Selekce a regenerace rostlin

Kousky kalu, které byly intaktní během inokulace, byly kultivovány na selektivním kalus indukujícím mediu (CM4C doplněné 25 mg/l G418 a 250 mg/l karbencilinu) v intaktním stavu, nebo byly rozděleny na několik malých kousků (≈ 2 mm) při přenosu do media. Inokulované malé kousky kalu zůstaly intaktiní a byly kultivovány v mediu. Po 2 až 3 týdnech byly kousky kalu přeneseny do regeneračního media. Postup regenerace byl stejný jak je popsán v příkladu 1.

5. Účinnost transformace

Regenerované rostliny nevykazovaly žádné viditelné abnormality a byly zcela fertilní. Všechny rostliny byly testovány v biologickém testu, histochemickém testu na GUS a/nebo v testu Southern hybridizace, jak jsou popsány v příkladu 1. Bylo generováno celkem 10 transgenních dějů ze 7 experimentálních ošetření za použití zárodečného kalu různého stáří (tabulka 9). Účinnost transformace (počet dějů/počet kousků kalu) byla v rozmezí od 0,3 do 2,7 %.

6. Analýza potomstva transgenních rostlin

R_1 rostliny byly analyzovány stejně jako v příkladu 1.

Příklad 3 - Transformace buněčné suspenze

1. Příprava explantátu

Suspenze buněk pšenice v. Mustang byly kultivovány v kapalném MS1WSM (tabulka 9) při 28 ^{0}C ve tmě na rotační třepačce (frekvence otáčení 250 za minutu). Buňky sklízené po 3 dnech subkultivace byly použity pro inokulaci Agrobacteriem. Obecný protokol pro transformaci buněčné suspenze je uveden na obrázku 7.

2. Kultura Agrobacterium a přenos T-DNA

Metoda pro kultivaci Agrobacterium je v podstatě stejné, jako je metoda popsaná v příkladu 1. Hustota Agrobacterium buněk v inokulačním mediu (CM4 medium s 1/10 ředěním MS solí a 3,9 g/l MES a doplněné 10 g/l glukosy

a 200 μM acetosyringonu) byla upravena na OD_{660} 0,5 až 1. Kapalné medium bylo odstraněno ze suspenze kultury pšenice vakuem. Každý ml buněk pšenice byl smísen se 3 ml buněčné suspenze Agrobacterium v Petriho misce (100 x 25 mm). Inokulace byla prováděna při 23 až 25 ^{0}C po dobu 30 minut až 4 hodin. Po inokulaci byly Agrobacteriem infikované buňky pšenice umístěny na kousku sterilního Whatmanova filtračního papíru v Petriho misce (100 x 15 mm). Filtrační papír byl zvlhčen kapalným mediem jak bylo popsáno výše. Plotny pro současnou kultivaci byly umístěny ve tmě při 23 až 25 ^{0}C po dobu 2 až 3 dnů.

3. Získání transformovaných kolonií

Po současné kultivaci byly inokulované buňky přeneseny do kapalného MS2WCM (tabulka 9) s 500 mg/l karbencilinu a byly kultivovány v nádobkách po dobu 1 dne za mírného třepání a potom byly umístěny na kousku filtračního papíru na solidním MS2WCM mediu doplněném buď 25 mg/l G418, nebo 50 mg/l paromomycinu a 250 mg/l karbencilinu pro selekci. Resistentní kolonie mohly být získány po 40 až 60 dnech selekce. Transformace byla vysoce účinná podle počtu získaných transformovaných kolonií. Rutině bylo získáváno asi 200 nezávisle transformovaných kolonií z 1 ml inokulovaných buněk.

4. Faktory ovlivňující účinnost transformace

Bylo zjištěno, že tři faktory účastnící se procesů inokulace a současné kultivace, mají signifikantní vliv na účinnost transformace suspenze buněk. Těmito faktory byla

teplota inokulace a současné kultivace, doba inokulace a současné kultivace a hustota buněk Agrobacterium pro inokulaci. Jak ukazuje tabulka 10, nejlepší teplota pro inokulaci a současnou kultivaci je 23 až 25 ^{0}C a účinnost transformace je signifikantně redukována při teplotě 19 ^{0}C nebo 28 ^{0}C. Nejlepší doba inokulace je 30 minut (tabulka 11) a nejvyšší účinnost transformace může být dosažena při 2- nebo 3-denní současné kultivaci. Doba současné kultivace 1 den nebo kratší signifikantně redukuje účinnost transformace. Nejlepší hustota buněk Agrobacterium pro inokulaci je OD_{660} 0,5 (tabulka 12). Hustota Agrobacterium vyšší nebo nižší než je tato hodnota redukuje účinnost transformace.

Tabulka 10

Účinek teploty v průběhu inokulace a současné kultivace na stabilní transformaci suspenze buněk

Teplota (^{0}C)	Počet GUS-pozitivních kolonií/ml inokulovaných buněk
19	52,5 ± 19,36
23	290 ± 70,83
25	273 ± 65,43
28	132,5 ± 22,6

Tabulka 11

Účinek doby inokulace a současné kultivace na transformaci suspenze buněk

Stadium	Doba (h)	Počet GUS-pozitivních kolonií/ml inokulovaných buněk
Inokulace	0,5	351,25 ± 29,23
	1	178,5 ± 23,1
	2	186,75 ± 23,10
	3	202 ± 51,37
	4	152,25 ± 29,68
	14	4 ± 0,82
Současná kultivace	24	53 ± 4,24
	48	232,5 ± 26,29
	72	258,5 ± 15,26

Tabulka 12

Účinek hustoty buněk Agrobacterium na transformaci suspenze buněk

Hustota buněk Agrobacterium (OD_{660})	Počet GUS-pozitivních kolonií/ml inokulovaných buněk
0,10	79 ± 4,97
0,25	174 ± 53,67
0,50	260,25 ± 45,33
1,00	172 ± 51,04
2,00	159 ± 70,06

5. Potvrzení transformovaných kolonií

Transformace byla potvrzena histochemickým testem na GUS jak byl popsán. Vzorky z 51 G418 resistentních kolonií byly testovány na aktivitu GUS. 49 z 51 kolonií vykazovalo GUS pozitivitu. Z těchto bylo 15 podrobeno Southern blot analýze. Všechny vzorky vykazovaly silný hybridizační signál s nptII sondou. Tyto výsledky naznačují, že frekvence společné exprese se blížila 100%.

Příklad 4 - Transformace suspenze buněk

1. Agrobacterium konstrukty

Pro použití u pšenice byly konstruovány rostlinné transformační vektory podobné těm, které jsou odvozeny od Ti plasmidu Agrobacterium tumefaciens, například jsko jsou ty, které popsal Herrera - Estrella a kol., (1983), Bevan a kol., (1983), Klee a kol., (1985) a EPO přihláška 120 516 (Schilperoort a kol.). Agrobacterium binární vektor pro pšenici, pMON18364 (obrázek 2) byl konstruován odstraněním P-nos/nptII/nos 3' z pMON18342 (obrázek 3), trávením pMON18342 NotI a HindIII restrikčními enzymy pro tvorbu a izolaci fragmentu o 5,7 kb. Tento výsledný 5,7kb skeletový fragment vektoru obsahuje ori-322 zdroj replikace pro replikaci v E. coli a ori-V region pro replikaci v Agrobacterium, markery bakteriální resistence pro spektinomycinovou a streptomycinovou selekci. P-e35S/hsp70 intron/kan/nos 3' chimerický fragment byl izolován z pMON19476 (obrázek 4) trávením NotI a HindIII restrikčními enzymy až do dokončení a izolací vzniklého 2,7kb insertu na gelu. Binární vektor pMON18364 byl konstruován ligací 2,7kb NotI, HindIII P-e35S/hsp70 intron/kan/nos 3' fragmentu a NotI, HindIII 5,7kb fragmentu vektorového skeletu za použití T4 DNA ligasy. Produkty ligace byly transformovány do Novablue buněk a byly selektovány na resistenci na spektinomycin. Transformované kolonie z tohoto nepřímého klonování byly kultivovány v kapalné kultuře a DNA byla analyzována na přítomnost P-e35S/kan/nos 3' chimerického genu restrikčním trávením HindIII a EcoRV. Pro reporterové genové konstrukty byl Agrobacterium binární vektor obsahující gen pro β-glukuronidasu (GUS) konstruován trávením pMON18361 (obrázek 5) HindIII a izolací 3,8kb fragmentu obsahujícího p-e35S/hsp70 intron/GUS/nos 3' chimerický fragment a ligací tohoto fragmentu do pMON18364 tráveného HindIII. Analýza

výsledných transformovaných kolonií byla provedena HindIII a orientace byla potvrzena trávením BglII a XbaI. Výsledný konstrukt je pMON18365 (obrázek 6): RB > P/e35S/hsp70 intron/GUS:ST-LS1 intron/nos 3'; P-e35S/HSP70 intron/nptII/nos > LB, kde LB a RB jsou levá a pravá hranice přenosu Ti plasmidu Agrobacteria, v příslušném pořadí.

Do pšenice mohou být vloženy další geny: například, obalový protein viru mozaiky pšenice (WSMV) a replikasa z Barley Yellow Dwarf Viru (BYVD) udělující resistenci na rostlinné viry. Vhodným rostlinným expresním vektorem je pMON18365 nebo deriváty podobných binárních vektorů. Gen kodující obalový protein (CP) z WSMV může být podobně insertován do pMON18364 nebo do pMON18365 za použití standartních technik. Rekombinantní vektor obsahující WSMV CP gen by měl po přenosu do pšenice metodou Agrobacteriem zprostředkované transformace způsobovat resistenci rostlin pšenice na infekci WSMV. Podobně, gen kodující kompletní replikasu BYVD může být vložen do stejných nebo do podobných Agrobacterium vektorových kazet. Rekombinantní vektor obsahující kompletní gen pro BYVD replikasu by měl po přenosu do pšenice metodou Agrobacteriem zprostředkované transformace způsobovat resistenci pšenice na infekci BYDV.

Geny kodující resistenci vůči houbám mohou být také vloženy do Agrobacterium binárních vektorů jako je pMON18364 a pMON32614 (obrázek 6). Geny pro antimykotické proteiny jako jsou ty, které kodují Alfalfa nebo Alyssum antimykotické proteiny insertované do pMON18364 nebo do pMON18365, jak byly popsány výše, umožní zapracování resistence na houby do pšenice transformací zprostředkovanou Agrobacteriem za

produkce transgenních rostlin. Vzniklé rostliny by měly být resistentní na Fusarium nebo na jiné houbové nebo bakteriální patogeny.

Geny, které ovlivňují kvalitu dějů ovlivňujících kvantitu a složení uhlohydrátů v zrnu jako je ADP glukosopyrofosforylasa (ADPGPP) exprivovaná pod kontrolou jaderného silného promotoru nebo silných promotorů jiných tkání mohou být insertovány do binárního vektoru jako je pMON18365 nebo jeho deriváty. Agrobacteriem zprostředkovaná transformace tohoto genu do rostlin pšenice by měla změnit množství nebo kvalitu uhlohydrátů v zrnu nebo v jiných tkáních za vzniku změn složení hmoty.

Je také možné vložit geny ovlivňující takové rysy pšenice, jako je tolerance na herbicidy pro vyvolání resistence na herbicidy, tolerance na sucho a vysokou salinitu a tolerance na chladový a tepelný stres. Geny zvyšující výnos pšenice, geny použité pro samčí sterilitu pro produkci hybridní pšenice a geny ovlivňující klíčení mohou být také vloženy do binárních rostlinných transformačních vektorů pro Agrobacteriem zprostředkovanou transformaci produkující rostliny pšenice vykazující rysy požadovaného fenotypu. Příklady plasmidů použitelných pro inserci genů zahrnují pMON25457 (obrázek 7), pMON30053 (obrázek 8), pMON30052 (obrázek 9) a pMON19450 (obrázek 10).

Literární odkazy

Literární odkazy vyjmenované dále a všechny odkazy zde citované jsou zde uvedeny jako odkaz v rozsahu, ve kterém doplňují, vysvětlují, objasňují podklady pro vynález nebo uvádějí metody, techniky a/nebo přípravky zde použité.

US patent č. 5 179 022.
Mezinárodní patentová přihláška publ. č. WO 91/02071.
Mezinárodní patentová přihláška publ. č. WO 92/06205.
Mezinárodní patentová přihláška publ. č. WO 93/18168.
Mezinárodní patentová přihláška publ. č. WO 94/0077.
Mezinárodní patentová přihláška publ. č. WO 94/00583.
Mezinárodní patentová přihláška publ. č. WO 95/06722.
Barcelo a kol., Plant J., 5, 583-592, 1994.
Becker a kol., Plant,l., 5, 299-307, 1994.
Bevan a kol., Nature, 303, 209, 1983.
Chan a kol., Plant Cell Physiol., 33(5), 577-583, 1992.
Chan a kol., Plant Mol. Biol., 22(3), 491-506, 1993.
Chan a kol., Plant Physiol., (Rockville) 108 (2 Suppl.) 115, Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Charlotte, NC, 1995.
Chen and Dale, Transgenic Res., 1(2), 93-100, 1992.
Chilton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(8), 3119-3120, 1993.
Christou a kol., Plant Physiol., 87, 671-674, 1988.
Christou a kol., Bio/Technology, 9, 957-962, 1991.
Conger a kol., Plant Cell Rep., 6, 345-347, 1987.
Conner and Dommisse, Int. J. Plant Sci., 153, 550-555, 1992.
Creissen a kol., Plant Cell Rep., 8(11), 680-683, 1990.
Datta a kol., Bio/Technology, 8, 736-740, 1990.
Davey a kol., J. Exp. Bot., 42, 1129-1169, 1991.

De la Pena a kol., Nature, 325, 274-276, 1987.
Dekeyser a kol., Plant Physiol., 90, 217-223, 1989.
Delbreil a kol., Plant Cell Rep., 12(3), 129-132, 1993.
Della-Cioppa a kol., Bio/Technology, 5, 579-584, 1987.
Deng a kol., Sci. China Ser B Chem. Life Sci. Earth Sci., 33(1), 27-34, 1990.
Du a kol., Genet. Manip. Plants, 5, 8-12, 1989.
Fromm a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 5824-5828, 1985.
Fromm a kol., Nature, 319, 791-793, 1986.
Fromm a kol., Bio/Technology, 8, 833-839, 1990.
Godwin and Chikwamba, xiii-174, Plenum Press, New York, NY.
Gordon-Kamm a kol., Plant Cell, 2, 603-618, 1990.
Gould a kol., Plant Physiol., 95(2), 426-434, 1991.
Graves and Goldman, Plant Mol Biol., 7(1), 43-50, 1986.
Grimsley a kol., Nature, 325, 177-179, 1987.
Hayakawa a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9865-9869, 1992.
Herrera-Estrella a kol., Nature, 303, 209, 1983.
Hess a kol., Plant Sci., 72(2), 233-244, 1990.
Hiei Y., Plant. J., 6(2), 271-282, 1994.
Hood a kol., Plant Physiol., 105(1 Suppl.), 114, 1994.
Ishida a kol., Plant Physiol., (Rockville) 108 (2 Suppl.) 114, Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Plant Physiol., Charlotte, NC, 1995.
Ishida Y., a kol., Nature Biotech., 745-750, 1996.
Jaehne a kol., Euphytica, 85, 1-3, 35-44, 1995.
Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep., 5, 387-405, 1987.
Jefferson a kol., EMBO J., 6, 3901-3907, 1987.
Kasha a kol., Gene Manip. Plant Improv. II, 213-239, 1990.
Klee a kol., Bio/Technology, 3, 637, 1985.

Knutson a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 2624-2628, 1992.

Kornienko a kol., Pushchino, 20-22, noyabrya, Tezisy dokladov, 20, 21, 128-129, 1991.

Langridge a kol., Plant J., 2(4), 631-638, 1992.

Li a kol., Sci. China Ser B Chem. Life Sci. Earth Sci., 34(1), 54-63, 1991.

Liu a kol., Plant Mol. BIoI., 20(6), 1071-1087, 1992.

Luo a Wu, Plant Mol. Biol. Rep., 6, 165-174, 1988.

Mahalakshmi a Khurana, J. Plant Biochem. Biotech., 4(2), 55-59, 1995.

May a kol., Bio/Technology, 13, 486-452, 1995.

McElroy a kol., Mol. Gen. Genet., 231, 150-160, 1991.

Miljus-Djukic a kol., Plant Cell Tissue Organ Culture, 29(2), 106-108, 1992.

Miller, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972.

Mooney a Doodwin, Plant Cell Tissue Organ Culture, 25, 209-218, 1991.

Mursahige a Skoog, Physiol. Plant, 15, 473-497, 1962.

Nehra a kol., Plant J., 5, 285-297, 1994.

Paszkowski a kol., EMBO J., 3, 2717-2722, 1984.

Paszkowski a kol., Plant Mol. BioI., 6, 303-312, 1986.

Picard a kol., VIIth International Wheat Genetics Symposium, University of Cambridge, 779:781, 1988.

Piorer a kol., Science, 256, 520-523, 1992.

Potrykus I., Bio/Technology, 8, 535-543, 1990.

Raineri a kol., Bio/Technology, 8, 33, 1990.

Raineri a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(8), 3549-3553, 1993.

"Report on the Use of Antibiotic Resistance Markers in

Genetically Modified Food Organisms," Advisory Committee on Novel Foods and Processes, červenec 1994.

Rhodes a kol., Science, 240, 204-207, 1988.

Ritchie a kol., Transgenic Res., 2(5), 252-265, 1993.

Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanford, Trends Biotechnology, 6, 299-302, 1988.

Sanford J. C., Physiologia Plantarium, 79, 206-209, 1990.

Sautter a kol., Bio/Technology, 9, 1080-1085, 1991.

Schlappi a Hohn, Plant Cell, 4(1), 7-16, 1992.

Schledzewski a Mendel, Transgenetic Research, 3, 249-255, 1992.

Schrott M., v Gene Transfer in Plants, Springer, Verlay, New York, 1995, str. 325-331.

Seiichi a kol., Plant Physiol., 100, 1503-1507, 1992.

Shen and Hohn, Plant. J., 2(1), 35-42, 1992.

Shen a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(4), 1488-1492, 1993.

Shen a kol., Meth. Mol. Biol., 44, Xiv-417, 1995.

Shillito a kol., Bio/Technology, 3, 1099-1103, 1985.

Shimamoto a kol., Nature, 338, 274-276, 1989.

Shure a kol., Cell, 35, 225-233, 1983.

Smith a kol., v In Vitro Cell. Develop. Biol., 30A (3 Part 2), 1994.

Smith a Hood, Crop Sci., 35, 301-309, 1995.

Somers a kol., Bio/Technology, 10, 1589-1594, 1992.

Southern, J. Mol. Biol., 98, 503-517, 1975.

Topfer a kol., Plant Cell, 1, 133-139, 1989.

Vasil a kol., Bio/Technology, 10, 667-674, 1992.

Vasil a kol., Bio/Technology, 11, 1 153-1158, 1993.

Vijayachandra a kol., Plant Mol. Biol., 29(1), 125-133, 1995.

Wan a Lemaux, Plant Physiol., 104, 37-48, 1994.
Weeks a kol., Plant Physiol., 102, 1077-1084, 1993.
Wilmink a kol., Plant Cell Rep., 11, 76-80, 1992.
Xu a kol., Chin J. Bot., 2(2), 81-87, 1990.
Zaghmout and Trolinder, Nucl. Acids Res., 21(4), 1048, 1993.
Zaghmout, Theoret. Appl. Genet., 89(5), 577-582, 1994.
Zhou a Konzak, Crop Sci., 29, 817-821, 1989.
Zhou a kol., Plant Cell Tissue Organ Culture, 30, 78-83, 1992.
Zhou a kol., Plant Cell Rep., 15, 159-163, 1995.
Ziauddin a kol., Plant Cell Rep., 11, 489-493, 1992.

Všechny přípravky a způsoby zde popsané a nárokované mohou vyrobeny a prováděny bez zbytečného experimetování podle předkládaného vynálezu. Ačkoliv byly přípravky a způsoby podle tohoto vynálezu popsány ve smyslu jeho výhodných provedení, bude odborníkovi v oboru jasné, že mohou být použity variace přípravků, způsobů a a variace v krocích a sekvencích kroků způsobů zde popsaných bez odchýlení se od konceptu, duchu a rozsahu vynálezu. Přesněji, je jasné, že určitá činidla, která jsou chemicky nebo fyziologicky příbuzná, mohou nahradit činidla zde popsaná za dosažení stejných nebo podobných výsledků. Všechny takové podobné náhrady a modifikace, které jsou odborníkovi v oboru jasné, spadají do ducha, rozsahu a koncepce vynálezu, jak je definován v připojených patentových nárocích.

08.10.98
PV 867-98
78699

Patentové nároky

1. Rostlina fertilní, transgenní pšenice, jejíž genom byl pozměněn vložením předem vybrané genetické složky do genomu, kde uvedená složka obsahuje exogenní gen umístěný pod kontrolou jednoho nebo více předem vybraných genetických kontrolních elementů, kde tato rostlina je připravitelná způsobem zahrnujícím:

(a) přípravu DNA přípravku in vitro, kde tento přípravek obsahuje genetickou složku, která má být vložena do genomu pšenice;

(b) vložení uvedeného DNA přípravku do buněk pšenice transformací zprostředkovanou Agrobacteriem;

(c) regeneraci rostlin pšenice z uvedených buněk, které dostaly uvedenou genetickou složku; a

(d) identifikaci rostliny fertilní, transgenní pšenice, jejíž genom byl pozměněn stabilním vložením uvedené genetické složky.

2. Rostlina fertilní, transgenní pšenice podle nároku 1, kde genetická složka kroku (a) obsahuje selektovatelný nebo vyšetřitelný gen.

3. Rostlina fertilní, transgenní pšenice podle nároku 1, kde uvedené buňky pšenice zahrnují nezralý zárodek, tkáň

kalu nebo suspenzi buněk.

4. Rostlina fertilní, transgenní pšenice podle nároku 3, kde uvedený zárodek je izolován z nezralé obilky nebo je izolován z nezralé obilky a potom pre-kultivován před inokulací.

5. Rostlina fertilní, transgenní pšenice podle nároku 4, kde je uvedený nezralý zárodek izolován z uvedené nezralé obilky během asi 24 hodin až přibližně 10 nebo více dnů před inokulací.

6. Rostlina fertilní, transgenní pšenice podle nároku 3, kde je uvedená tkáň kalu izolována z nezralého zárodku nebo je vyvíjena ze zárodečných buněk.

7. Rostlina fertilní, transgenní pšenice podle nároku 3, kde uvedený nezralý zárodek zahrnuje zárodek 2 nebo více dní po vývoji z květních orgánů nebo uvedená nezralá obilka zahrnuje obilku 2 nebo více dnů po vývoji z květních orgánů.

8. Rostlina fertilní, transgenní pšenice, jejíž genetická výbava byla změněna přidáním DNA přípravku obsahujícího předem vybraný funkční genetický element, který obsahuje transgeny vybrané ze skupiny skládající se z nptII genu, bla genu, nptI genu, dhfr genu, aphIV genu, aacC3 genu, aacC4 genu a GUS genu, kde uvedený funkční genetický element způsobuje u uvedené rostliny pšenice fenotypový rys, který se nenachází na rodičích uvedené rostliny.

9. Rostlina fertilní, transgenní pšenice podle nároku

1 nebo podle nároku 8, kde uvedený gen zahrnuje nptII gen.

10. Transgenní pšenice podle nároku 1 nebo 8, kde jsou alespoň dva exogenní geny umístěny na stejném DNA segmentu a kde jsou uvedené buňky transformovány uvedeným segmentem.

11. Potomstvo rostlin podle nároku 1 nebo 8.

12. Buňky získané z rostlin podle nároku 1 nebo 8.

13. Semena získaná z rostlin podle nároku 11.

14. Způsob pro produkci rostliny fertilní, transgenní pšenice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

(a) ustanovení regenerovatelné kultury z rostliny pšenice, která má být transformována;

(b) zavedení DNA přípravku obsahujícího genetickou složku, která má být vložena do genomu uvedené rostliny pšenice, transformací zprostředkovanou Agrobacteriem;

(c) identifikaci a selekci transformované buněčné linie a

(d) regeneraci rostliny fertilní transgenní pšenice z této linie, kde uvedená DNA je přenesena úplným pohlavním cyklem uvedené transgenní rostliny na její potomstvo, kde uvedené potomstvo obsahuje selektovatelný nebo vyšetřitelný markerový gen a kde je uvedený markerový gen chromosomálně integrován.

15. Způsob podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň dva exogenní geny jsou umístěny na stejném DNA segmentu a že uvedená regenerovatelná kultura je transformována uvedeným segmentem.

16. Způsob podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že Agrobacterium je A. tumefaciens C58.

17. Způsob podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená kultura obsahuje nezralý zárodek, tkáň kalu nebo suspenzi buněk.

18. Způsob pro produkci transgenní pšenice v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

(a) ustanovení kultury z pšenice, která má být transformována;

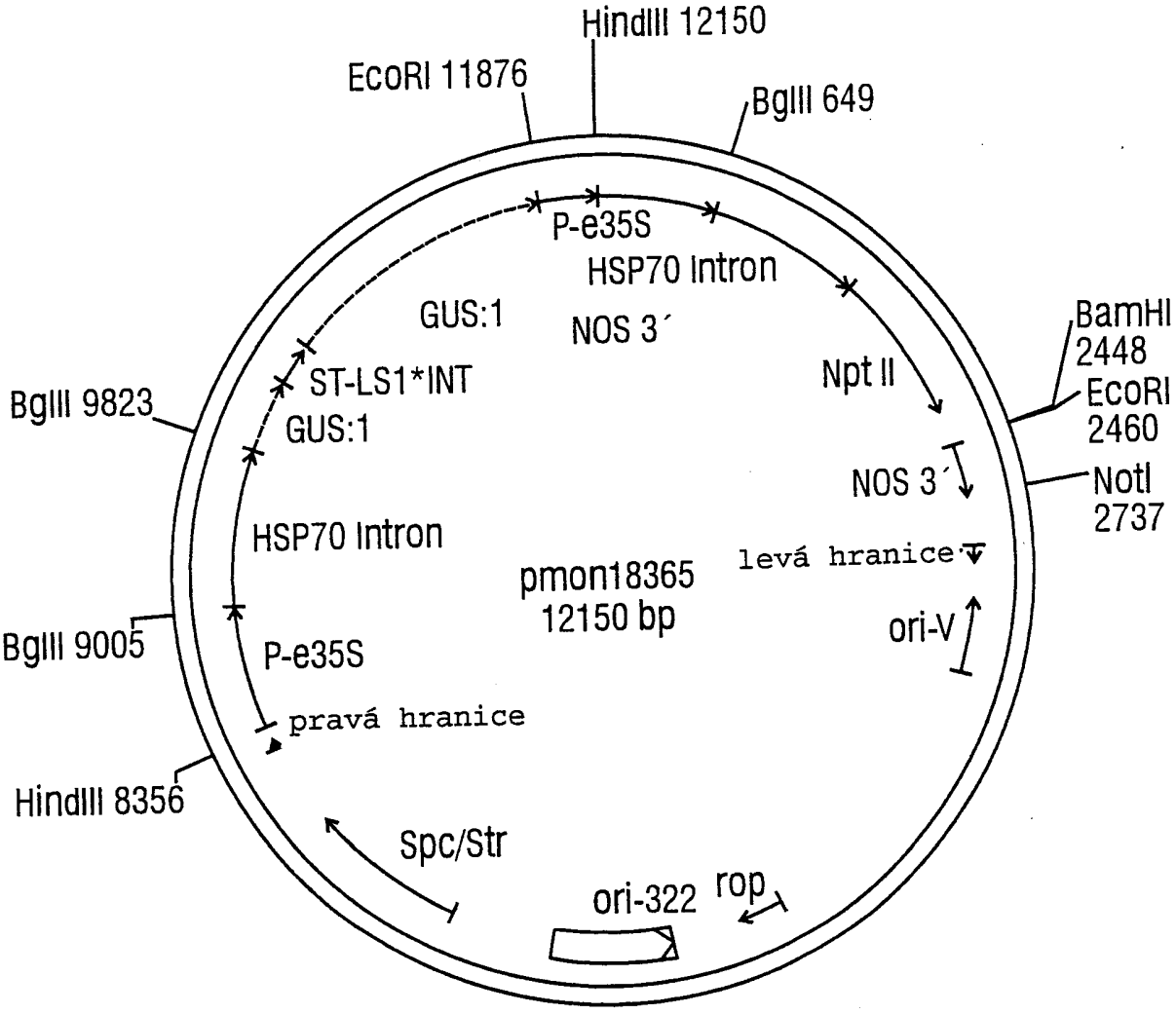
(b) transformování uvedené kultury Agrobacteriem obsahujícím DNA přípravek obsahující genetickou složku, která má být vložena do genomu uvedené pšenice;

(c) identifikaci nebo selekci transformované buněčné linie a

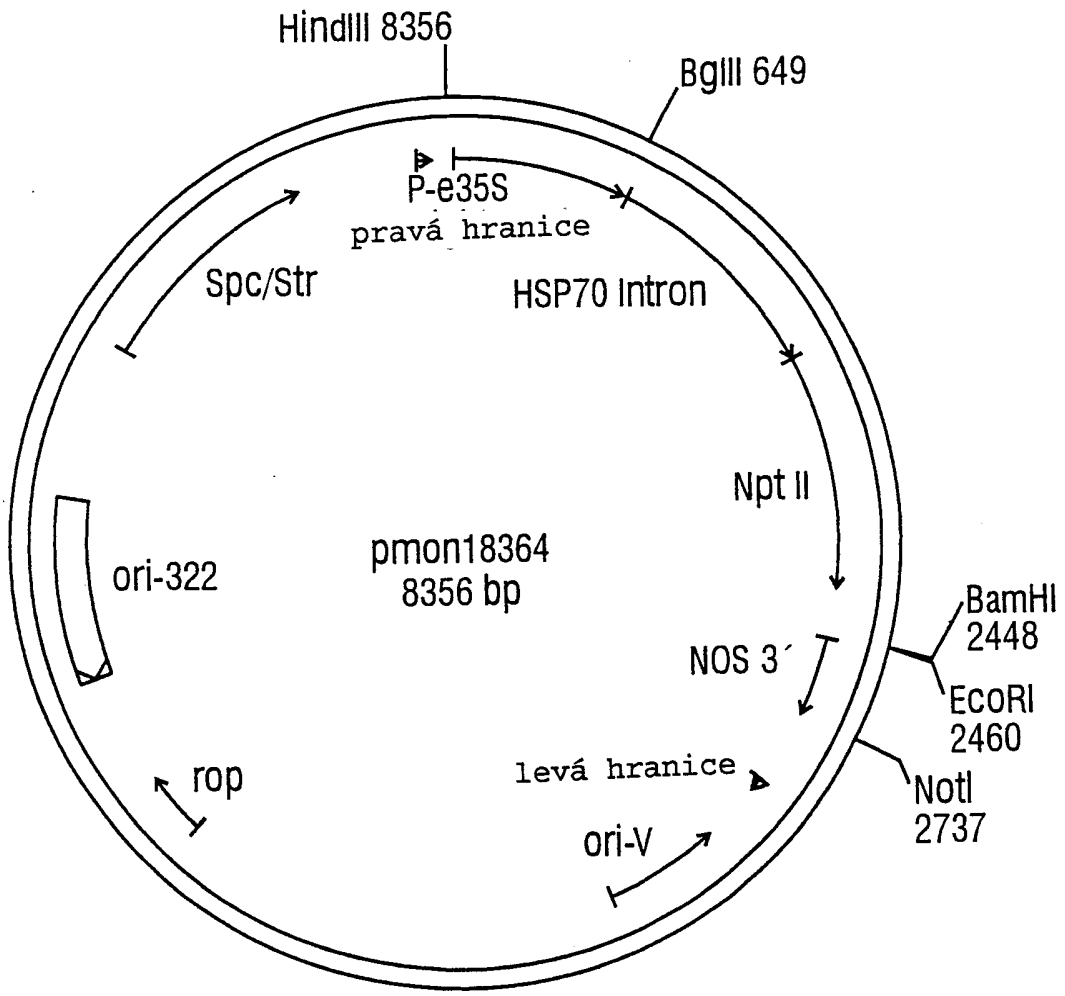
(d) regeneraci rostliny fertilní transgenní pšenice z této linie.

19. Způsob podle nároku 14 nebo 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená DNA obsahuje nptII gen.

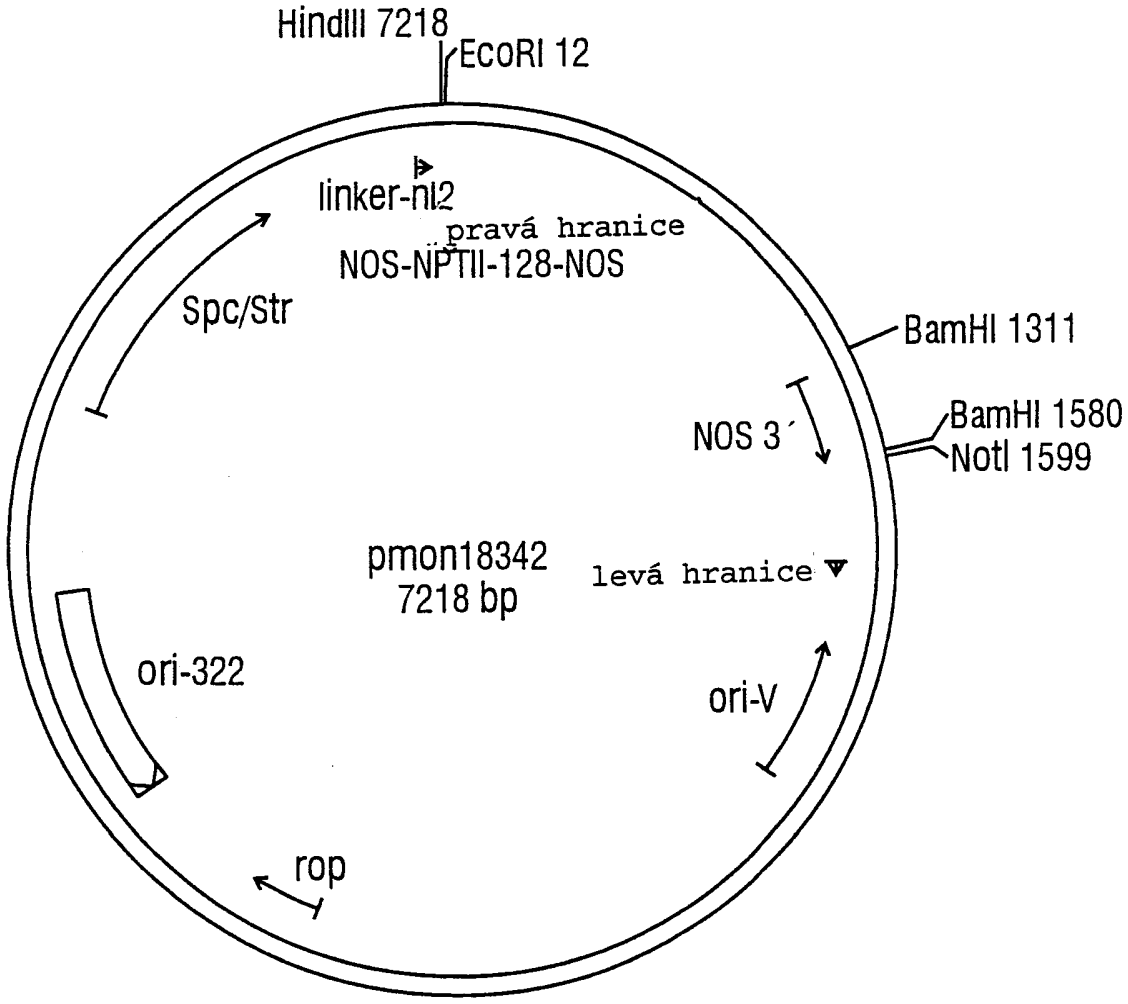
20. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že Agrobacterium je A. tumefaciens C58.


HindIII 12150
EcoRI 11876
BglII 649
P-e35S
HSP70 Intron
GUS:1
NOS 3´
BamHI
2448
EcoRI
2460
NotI
2737
Npt II
NOS 3´
levá hranice
ori-V
pmon18365
12150 bp
HSP70 Intron
GUS:1
ST-LS1*INT
BglII 9823
BglII 9005
P-e35S
pravá hranice
HindIII 8356
Spc/Str
ori-322
rop

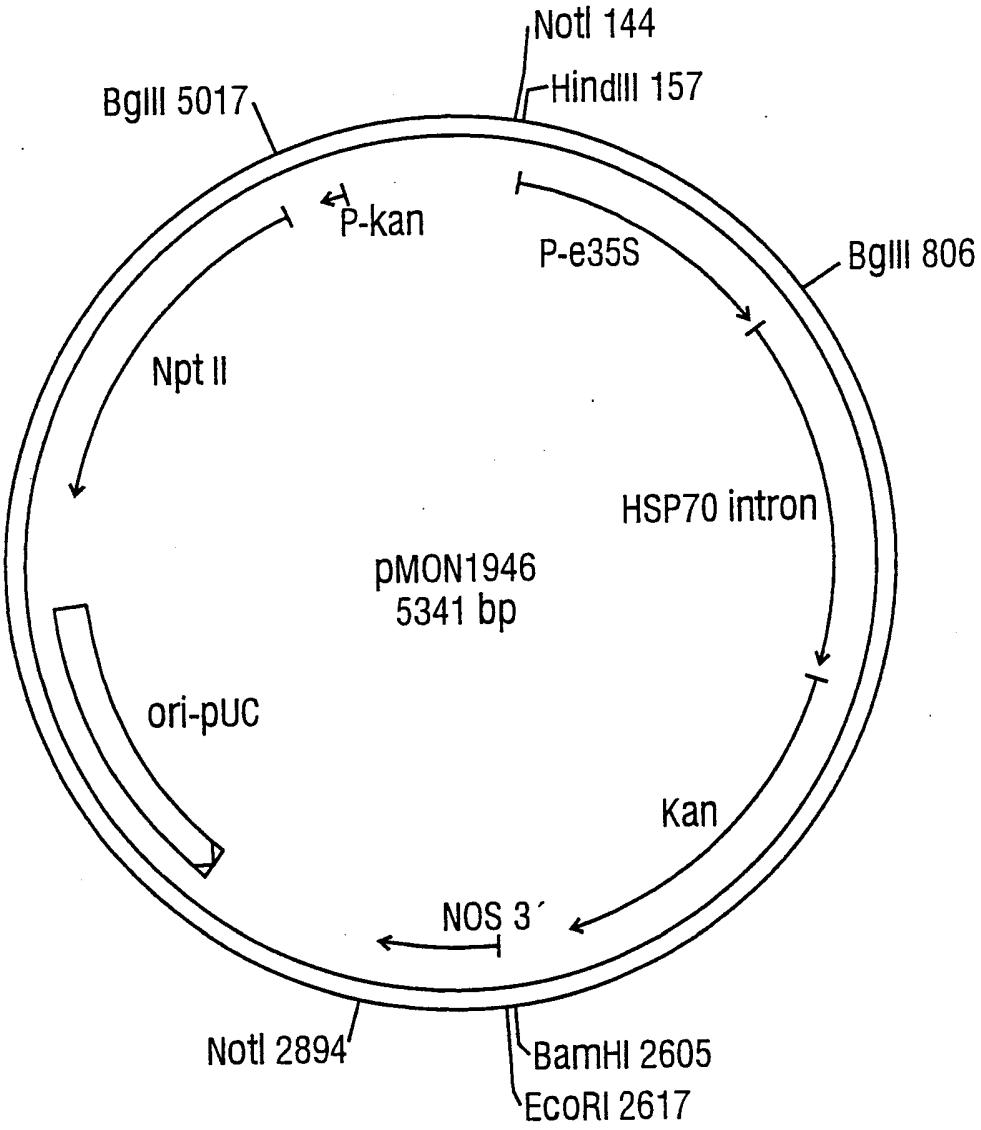
obr. 1


HindIII 8356
BglII 649
P-e35S
pravá hranice
Spc/Str
HSP70 Intron
Npt II
ori-322
pmon18364
8356 bp
BamHI
2448
NOS 3´
EcoRI
2460
rop
levá hranice
NotI
2737
ori-V

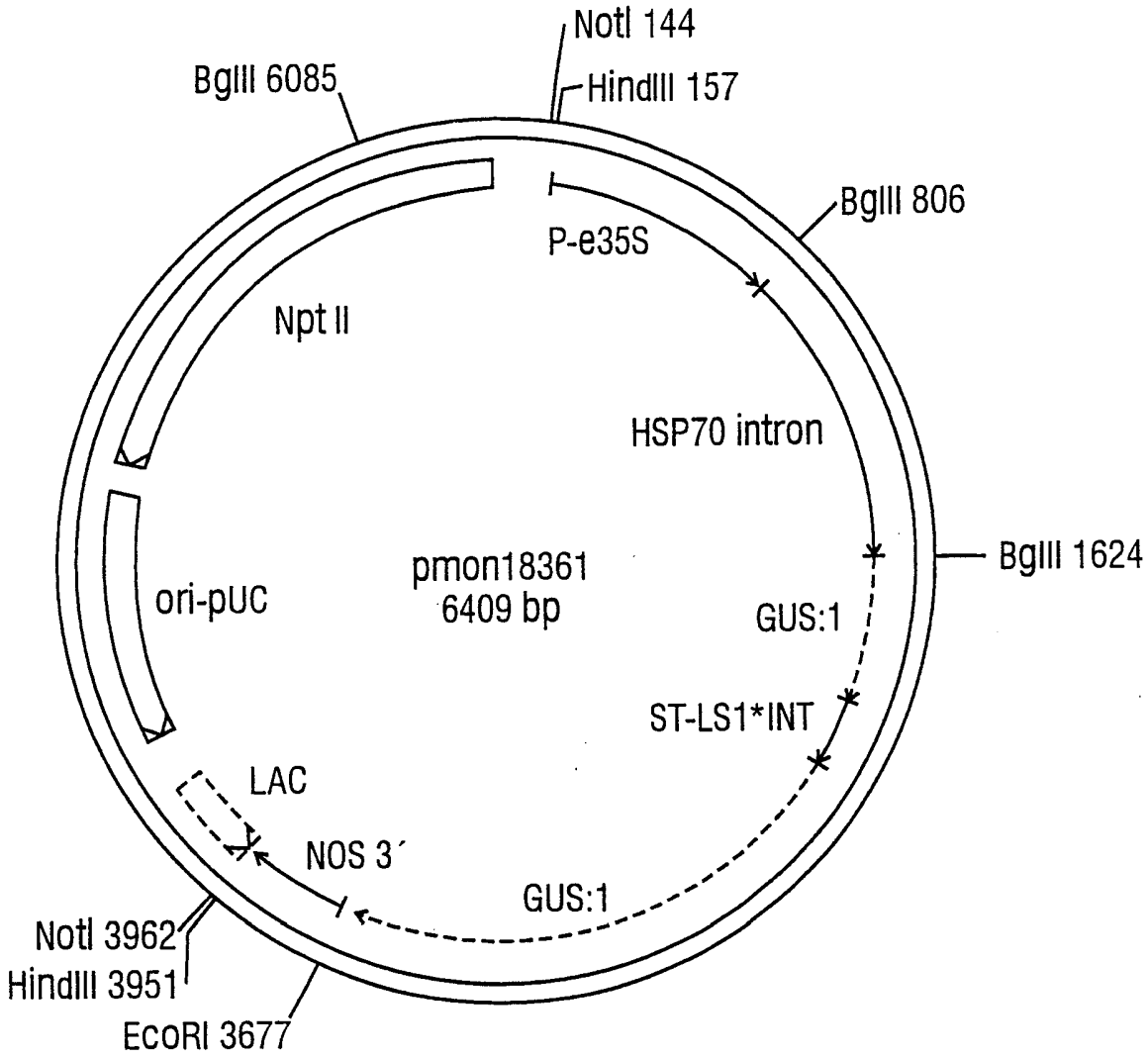
Obr. 2


HindIII 7218
EcoRI 12
linker-nl2
pravá hranice
NOS-NPTII-128-NOS
Spc/Str
BamHI 1311
NOS 3´
BamHI 1580
NotI 1599
pmon18342
7218 bp
levá hranice
ori-322
ori-V
rop

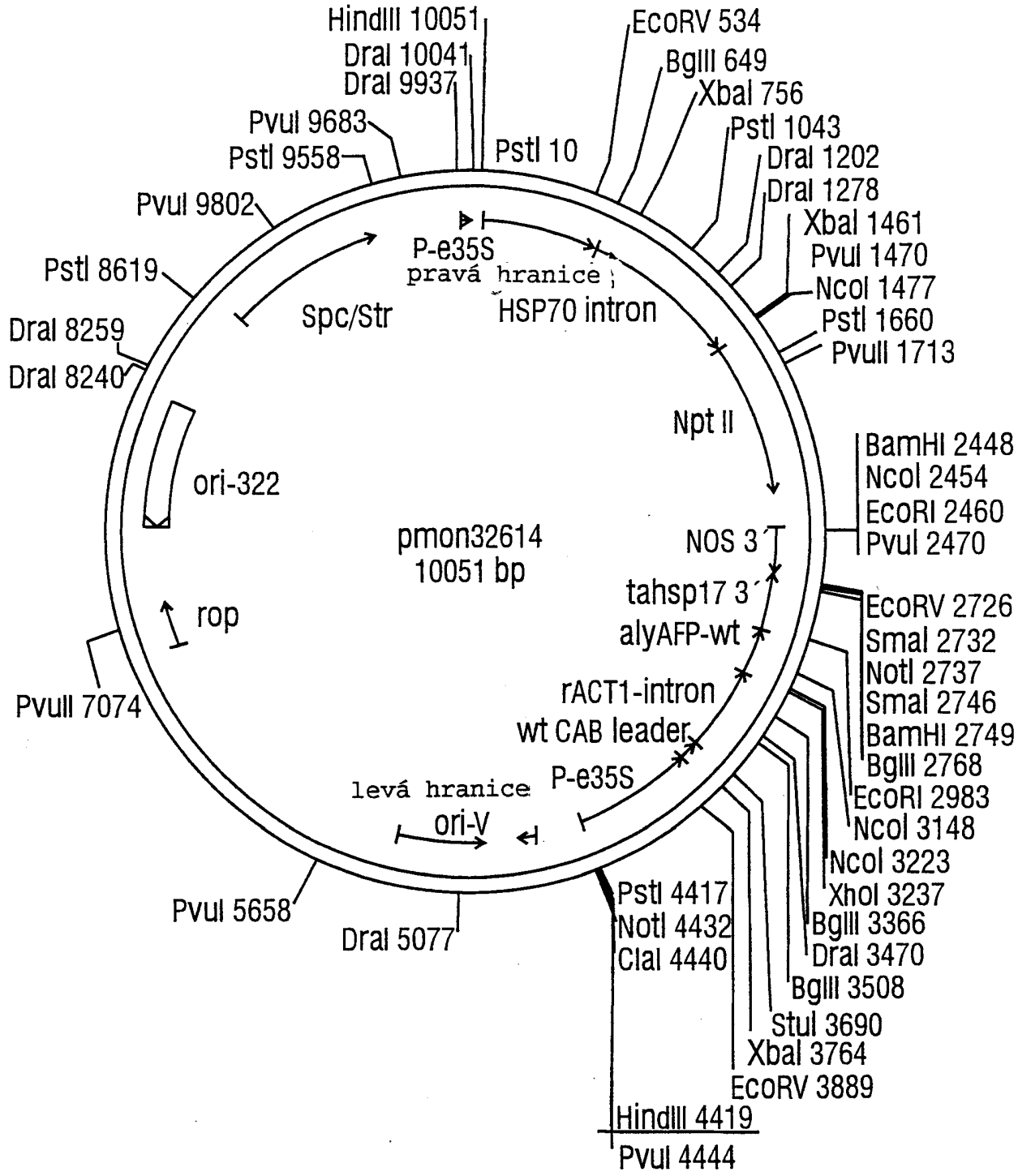
obr. 3


NotI 144
HindIII 157
BglII 5017
P-kan
P-e35S
BglII 806
Npt II
HSP70 intron
pMON1946
5341 bp
ori-pUC
Kan
NOS 3´
NotI 2894
BamHI 2605
EcoRI 2617

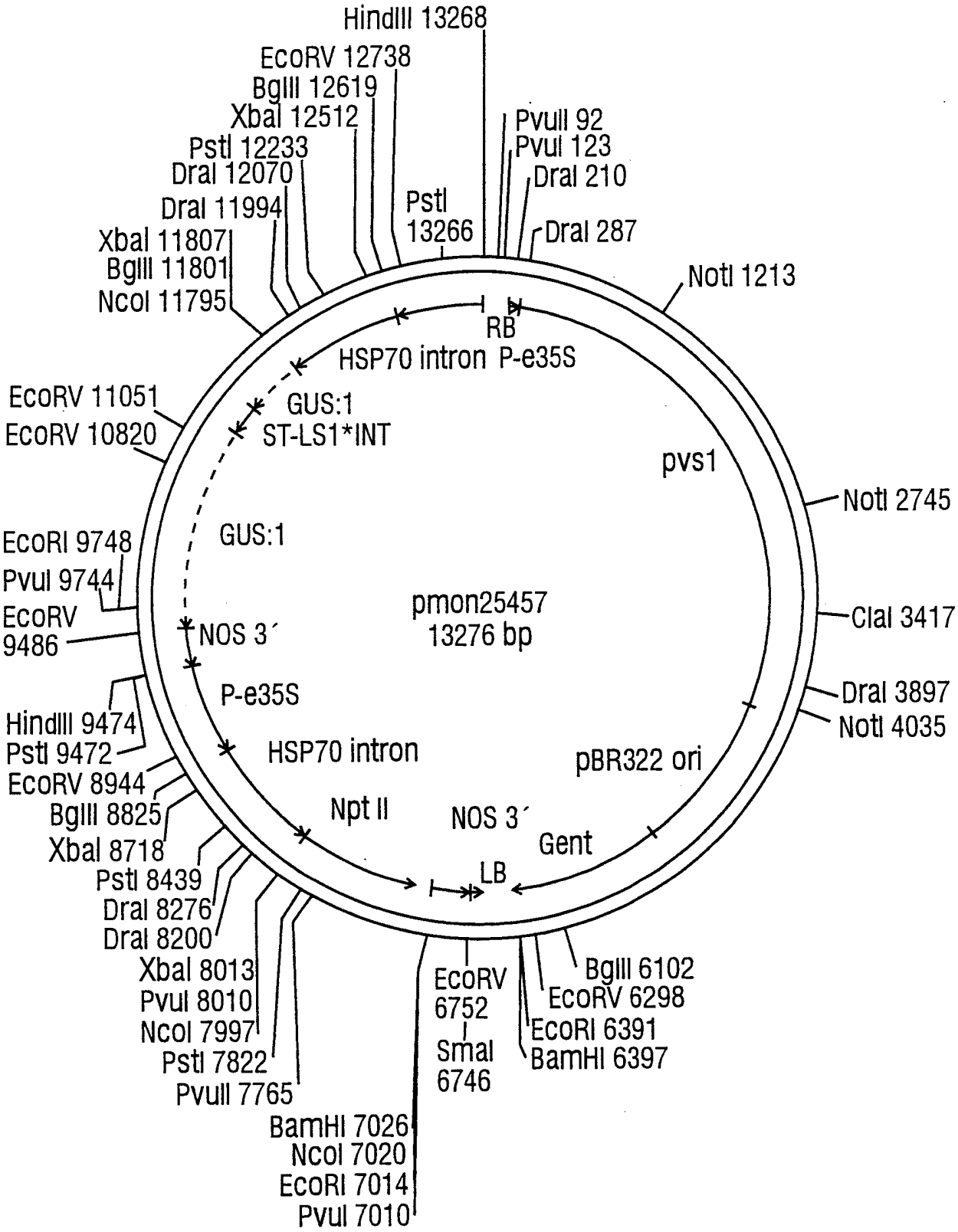
Obr. 4


NotI 144
BglII 6085
HindIII 157
BglII 806
P-e35S
Npt II
HSP70 intron
BglII 1624
pmon18361
6409 bp
ori-pUC
GUS:1
ST-LS1*INT
LAC
NOS 3´
GUS:1
NotI 3962
HindIII 3951
EcoRI 3677

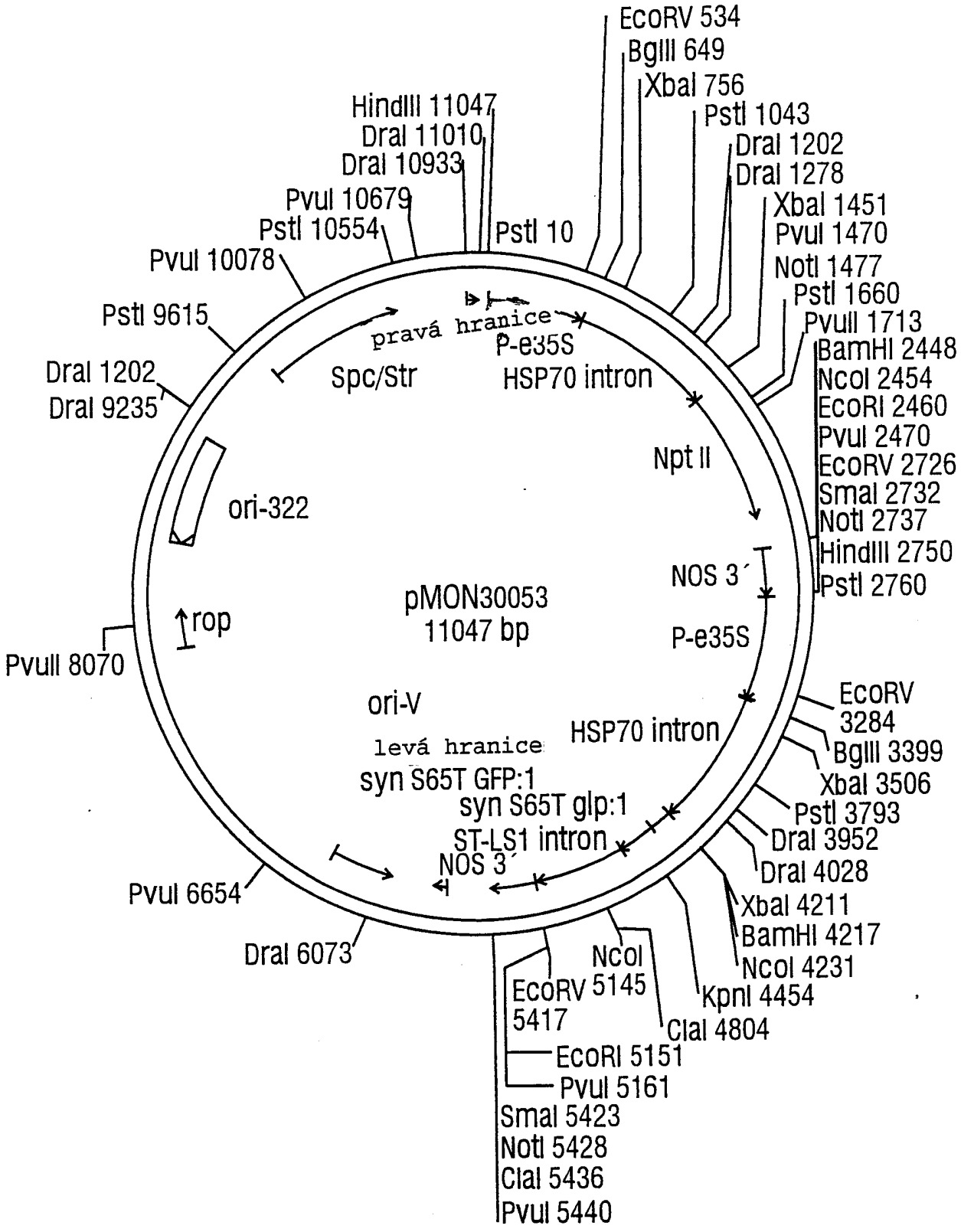
Obr. 5


HindIII 10051
DraI 10041
DraI 9937
PvuI 9683
PstI 9558
PstI 10
EcoRV 534
BglII 649
XbaI 756
PstI 1043
DraI 1202
DraI 1278
XbaI 1461
PvuI 1470
NcoI 1477
PstI 1660
PvuII 1713
PvuI 9802
PstI 8619
DraI 8259
DraI 8240
P-e35S
pravá hranice
Spc/Str
HSP70 intron
Npt II
BamHI 2448
NcoI 2454
EcoRI 2460
PvuI 2470
ori-322
pmon32614
10051 bp
NOS 3´
tahsp17 3´
alyAFP-wt
rACT1-intron
wt CAB leader
P-e35S
EcoRV 2726
SmaI 2732
NotI 2737
SmaI 2746
BamHI 2749
BglII 2768
EcoRI 2983
NcoI 3148
NcoI 3223
XhoI 3237
BglII 3366
DraI 3470
BglII 3508
StuI 3690
XbaI 3764
EcoRV 3889
HindIII 4419
PvuI 4444
rop
PvuII 7074
levá hranice
ori-V
PvuI 5658
DraI 5077
PstI 4417
NotI 4432
ClaI 4440

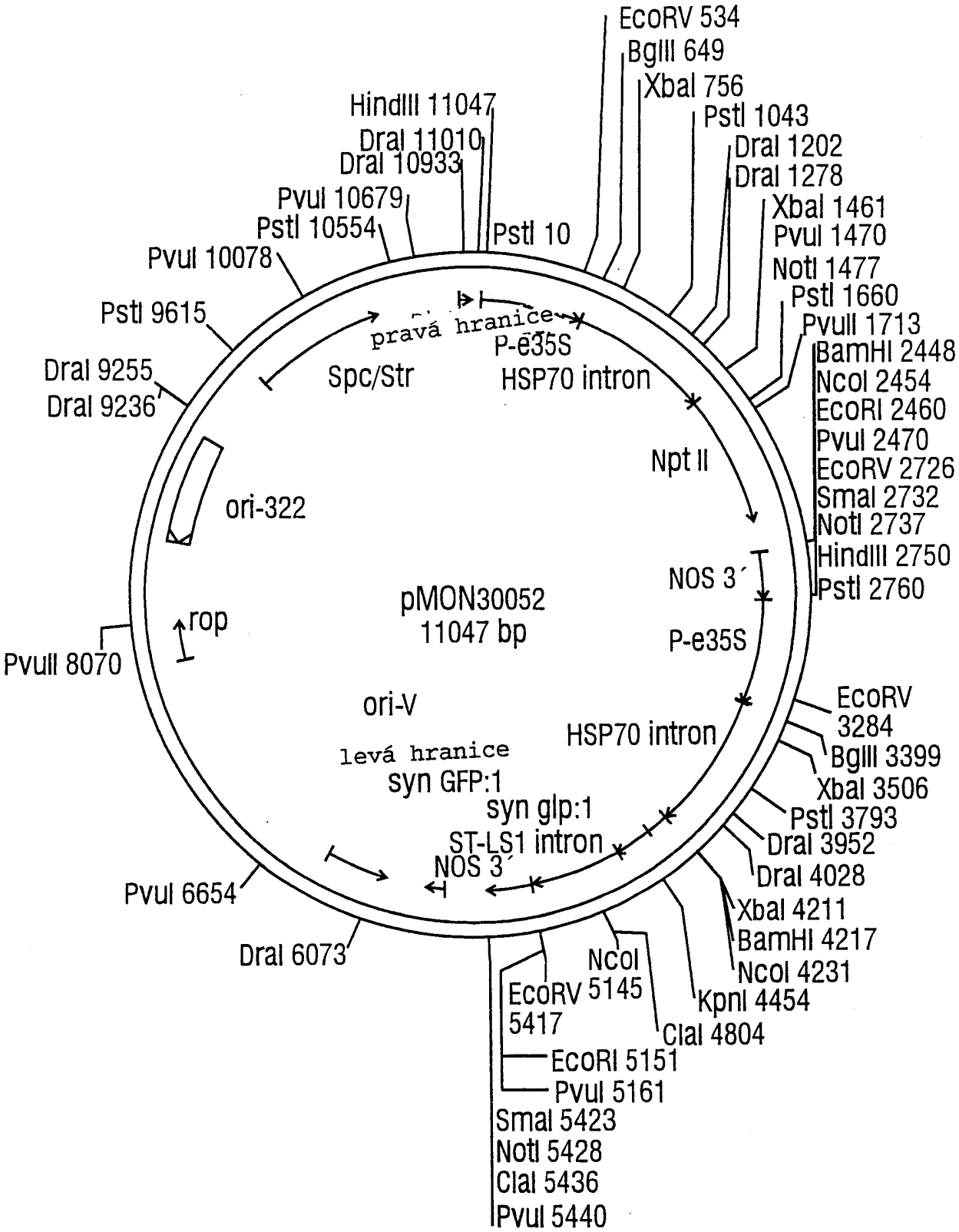
Obr. 6


HindIII 13268
EcoRV 12738
BglII 12619
XbaI 12512
PstI 12233
DraI 12070
DraI 11994
XbaI 11807
BglII 11801
NcoI 11795
PvuII 92
PvuI 123
DraI 210
PstI 13266
DraI 287
NotI 1213
RB
HSP70 intron
P-e35S
EcoRV 11051
EcoRV 10820
GUS:1
ST-LS1*INT
pvs1
NotI 2745
EcoRI 9748
PvuI 9744
EcoRV 9486
GUS:1
pmon25457
13276 bp
ClaI 3417
NOS 3´
P-e35S
DraI 3897
NotI 4035
HindIII 9474
PstI 9472
EcoRV 8944
BglII 8825
XbaI 8718
PstI 8439
DraI 8276
DraI 8200
HSP70 intron
pBR322 ori
Npt II
NOS 3´
Gent
LB
XbaI 8013
PvuI 8010
NcoI 7997
PstI 7822
PvuII 7765
EcoRV 6752
SmaI 6746
BglII 6102
EcoRV 6298
EcoRI 6391
BamHI 6397
BamHI 7026
NcoI 7020
EcoRI 7014
PvuI 7010

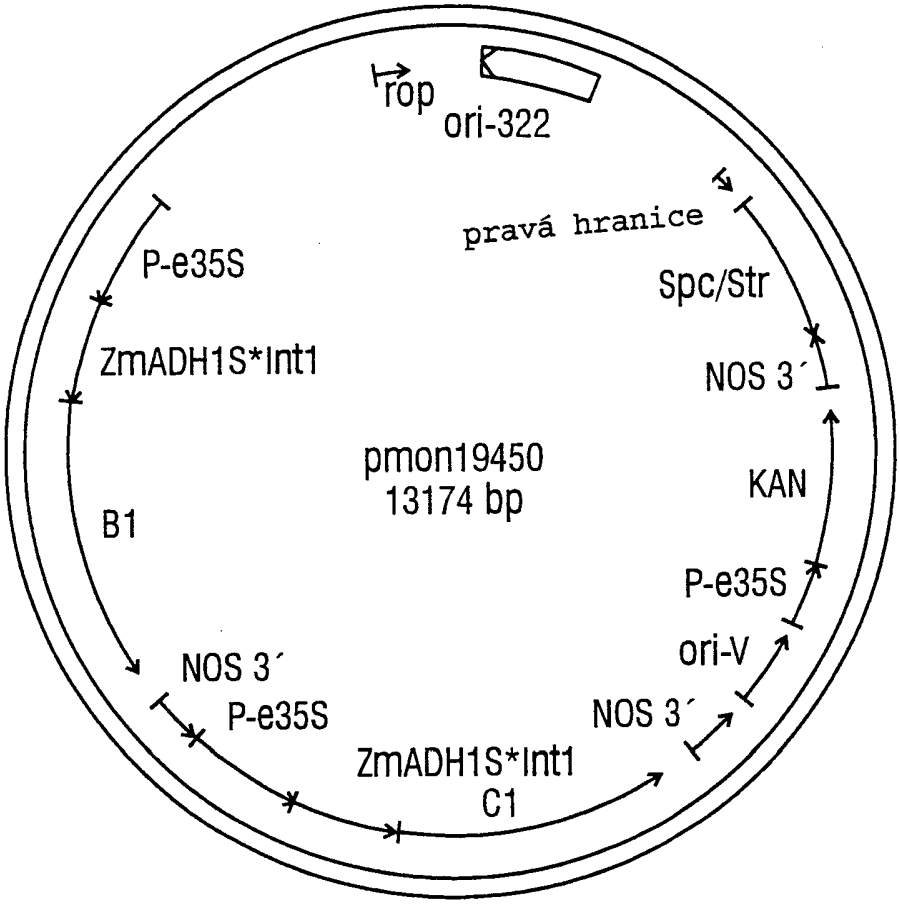
obr. 7


EcoRV 534
BglII 649
XbaI 756
PstI 1043
DraI 1202
DraI 1278
XbaI 1451
PvuI 1470
NotI 1477
PstI 1660
PvuII 1713
BamHI 2448
NcoI 2454
EcoRI 2460
PvuI 2470
EcoRV 2726
SmaI 2732
NotI 2737
HindIII 2750
PstI 2760
HindIII 11047
DraI 11010
DraI 10933
PvuI 10679
PstI 10554
PstI 10
PvuI 10078
PstI 9615
DraI 1202
DraI 9235
pravá hranice
P-e35S
Spc/Str
HSP70 intron
Npt II
ori-322
NOS 3´
pMON30053
11047 bp
rop
P-e35S
PvuII 8070
ori-V
HSP70 intron
levá hranice
EcoRV
3284
BglII 3399
XbaI 3506
syn S65T GFP:1
PstI 3793
syn S65T glp:1
DraI 3952
ST-LS1 intron
DraI 4028
NOS 3´
XbaI 4211
PvuI 6654
BamHI 4217
NcoI 4231
DraI 6073
NcoI
EcoRV 5145
KpnI 4454
5417
ClaI 4804
EcoRI 5151
PvuI 5161
SmaI 5423
NotI 5428
ClaI 5436
PvuI 5440

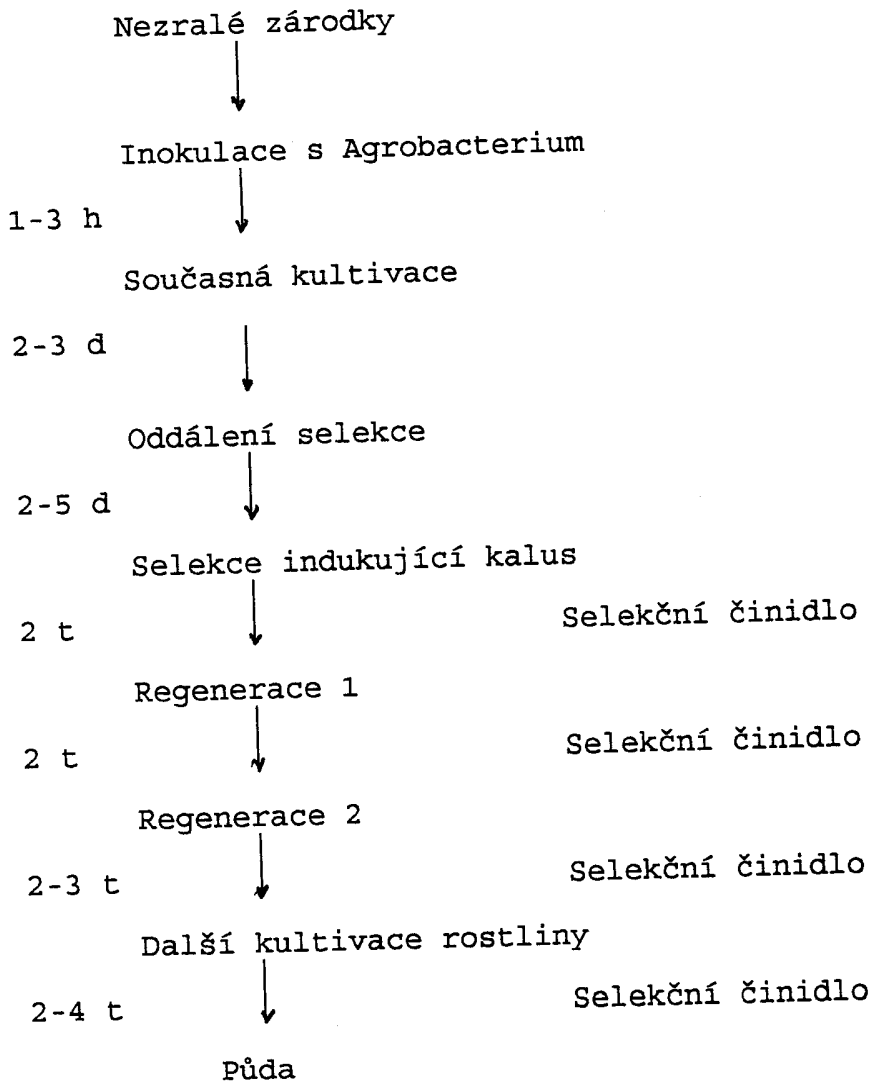
Obr. 8


EcoRV 534
BglII 649
XbaI 756
PstI 1043
DraI 1202
DraI 1278
XbaI 1461
PvuI 1470
NotI 1477
PstI 1660
PvuII 1713
BamHI 2448
NcoI 2454
EcoRI 2460
PvuI 2470
EcoRV 2726
SmaI 2732
NotI 2737
HindIII 2750
PstI 2760
HindIII 11047
DraI 11010
DraI 10933
PvuI 10679
PstI 10554
PstI 10
PvuI 10078
PstI 9615
DraI 9255
DraI 9236
pravá hranice
P-e35S
Spc/Str
HSP70 intron
Npt II
ori-322
NOS 3´
pMON30052
11047 bp
P-e35S
rop
PvuII 8070
ori-V
HSP70 intron
levá hranice
syn GFP:1
syn glp:1
ST-LS1 intron
NOS 3´
EcoRV
3284
BglII 3399
XbaI 3506
PstI 3793
DraI 3952
DraI 4028
XbaI 4211
BamHI 4217
NcoI 4231
KpnI 4454
ClaI 4804
NcoI
EcoRV 5145
5417
EcoRI 5151
PvuI 5161
SmaI 5423
NotI 5428
ClaI 5436
PvuI 5440
PvuI 6654
DraI 6073

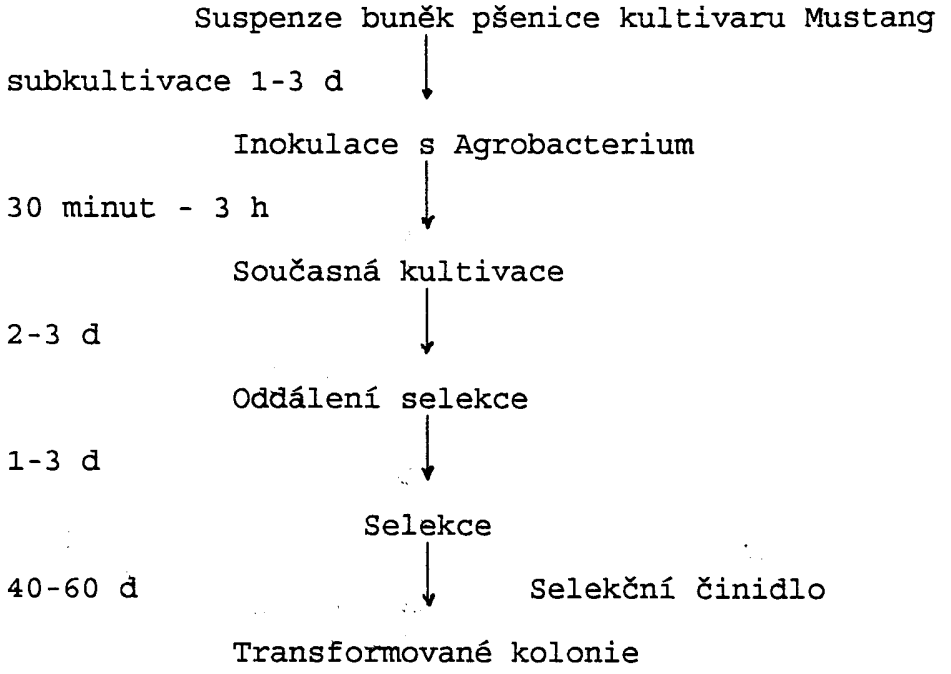
obr. 9


rop
ori-322
pravá hranice
Spc/Str
NOS 3´
KAN
P-e35S
ori-V
NOS 3´
ZmADH1S*Int1
C1
NOS 3´
P-e35S
ZmADH1S*Int1
B1
pmon19450
13174 bp

Obr. 10


Nezralé zárodky
Inokulace s Agrobacterium
1-3 h
Současná kultivace
2-3 d
Oddálení selekce
2-5 d
Selekce indukující kalus
2 t
Selekční činidlo
Regenerace 1
2 t
Selekční činidlo
Regenerace 2
2-3 t
Selekční činidlo
Další kultivace rostliny
2-4 t
Selekční činidlo
Půda

Obr. 11


Suspenze buněk pšenice kultivaru Mustang
subkultivace 1-3 d
Inokulace s Agrobacterium
30 minut - 3 h
Současná kultivace
2-3 d
Oddálení selekce
1-3 d
Selekce
40-60 d
Selekční činidlo
Transformované kolonie

Obr. 12