



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103597079 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201280024266. 9

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22) 申请日 2012. 03. 13

代理人 陈文平 徐志明

(30) 优先权数据

61/469, 118 2011. 03. 30 US

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/028949 2012. 03. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/134808 EN 2012. 10. 04

(83) 生物保藏信息

PTA-11754 2011. 03. 17

(71) 申请人 孟山都技术公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 R·J·布林克尔 W·C·伯恩斯

P·C·C·冯 J·A·肯迪格

S·莱克勒尔 J·L·卢特克

M·玛尔文

权利要求书3页 说明书22页

序列表9页 附图7页

(54) 发明名称

棉花转基因事件 MON88701 及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供棉花事件 MON88701 以及包含事件 MON88701 的植物、植物细胞、种子、植物部分和商品。本发明还提供事件 MON88701 特异性的多核苷酸以及包含事件 MON88701 特异性多核苷酸的植物、植物细胞、种子、植物部分和商品。本发明还提供与事件 MON88701 相关的方法。

1. 一种重组 DNA 分子,其包含选自 SEQ ID NO :1-10 的核苷酸序列及其互补序列。
2. 权利要求 1 的重组 DNA 分子,其通过将异源核酸分子插入到棉花植物或细胞的基因组 DNA 中来形成。
3. 权利要求 1 的重组 DNA 分子,其中所述 DNA 分子源自于包含事件 MON88701 的转基因棉花植物,包含棉花事件 MON88701 的种子的代表性样品已以 ATCC 登记号 PTA-11754 保藏。
4. 权利要求 1 的重组 DNA 分子,其中所述 DNA 分子在棉花植物、植物细胞、种子、植物部分或商品中。
5. 权利要求 1 的重组 DNA 分子,其中所述 DNA 分子是诊断源自于事件 MON88701 的 DNA 的存在的扩增子。
6. 一种 DNA 探针,其包含 SEQ ID NO :10 的足够长的连续核苷酸的核苷酸序列或其互补序列,以起到在严格杂交条件下与包含选自 SEQ ID NO :1—10 的核苷酸序列的 DNA 分子杂交,并且在严格杂交条件下与不包含选自 SEQ ID NO :1—10 的核苷酸序列的 DNA 分子不杂交的 DNA 探针的作用。
7. 一对 DNA 分子,其包含第一 DNA 分子和与所述第一 DNA 分子不同的第二 DNA 分子,其中所述第一和第二 DNA 分子各自包含 SEQ ID NO :10 的足够长的连续核苷酸的核苷酸序列或其互补序列,以在与源自于事件 MON88701 的 DNA 一起在扩增反应中使用起 DNA 引物的作用,以产生诊断样品中的棉花事件 MON88701DNA 的扩增子。
8. 一种检测样品中源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的 DNA 分子的存在的的方法,所述方法包括:
 - a) 将所述样品与权利要求 6 的 DNA 探针相接触;
 - b) 使所述样品和所述 DNA 探针经受严格杂交条件;以及
 - c) 检测所述 DNA 探针与所述样品中的 DNA 分子的杂交,其中所述 DNA 探针与所述 DNA 分子杂交表明所述样品中存在源自于棉花事件 MON88701 的 DNA 分子。
9. 一种检测样品中源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的 DNA 分子的存在的的方法,所述方法包括:
 - a) 将所述样品与权利要求 7 的 DNA 分子对相接触;
 - b) 进行足以产生包含选自 SEQ ID NO :1—10 的序列及其互补序列的 DNA 扩增子的扩增反应;以及
 - c) 检测所述反应中所述 DNA 扩增子的存在,其中在所述反应中存在所述 DNA 扩增子表明所述样品中存在源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的 DNA 分子。
10. 一种 DNA 检测试剂盒,其包含至少一个 DNA 分子,所述 DNA 分子包含 SEQ ID NO :10 的足够长的连续核苷酸的核苷酸序列及其互补序列,以起到特异性检测源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的 DNA 的存在的 DNA 引物或探针的作用,其中所述 DNA 的检测对样品中事件 MON88701DNA 的存在具有诊断作用。
11. 一种重组棉花植物、种子、细胞或其植物部分,其包含权利要求 1 的重组 DNA 分子。
12. 权利要求 11 的重组棉花植物、种子、细胞或其植物部分,其中所述棉花植物、种子、细胞或其植物部分对麦草畏和草铵膦除草剂的处理具有耐受性。
13. 权利要求 11 的重组棉花植物、种子、细胞或其植物部分,当在 DNA 扩增方法中测试时,其基因组产生包含选自 SEQ ID NO :1—10 及其互补序列的 DNA 分子的扩增子。

14. 一种包含事件 MON88701 的棉花植物、种子、细胞或其部分, 包含事件 MON88701 的种子的代表性样品已以 ATCC 登记号 PTA-11754 保藏。

15. 权利要求 14 的棉花植物、种子、细胞或其部分, 其中所述棉花植物或种子是具有至少一个包含棉花事件 MON88701 的亲本的杂体。

16. 一种无生命植物材料, 其包含权利要求 1 的重组 DNA 分子。

17. 一种微生物, 其包含权利要求 1 的重组 DNA 分子。

18. 权利要求 17 的微生物, 其中所述微生物是植物细胞。

19. 一种商品, 其包含权利要求 1 的重组 DNA 分子。

20. 一种控制田间杂草的方法, 所述方法包括将包含事件 MON88701 的棉花植物种植在田间, 并施用有效剂量的麦草畏或者草铵膦或者麦草畏和草铵膦除草剂以控制所述田间的杂草而不损伤所述包含事件 MON88701 的棉花植物。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述有效剂量的麦草畏除草剂是在生长季内总共约 0.005 磅每英亩至约 16 磅每英亩的麦草畏除草剂。

22. 权利要求 20 的方法, 其中所述有效剂量的麦草畏除草剂是在生长季内总共约 0.5 磅每英亩至约 2 磅每英亩的麦草畏除草剂。

23. 权利要求 20 的方法, 其中所述有效剂量的草铵膦除草剂是在生长季内总共约 0.005 磅每英亩至约 16 磅每英亩的草铵膦除草剂。

24. 权利要求 20 的方法, 其中所述有效剂量的草铵膦除草剂是在生长季内总共约 0.5 磅每英亩至约 1.59 磅每英亩的草铵膦除草剂。

25. 一种控制田间杂草的方法, 所述方法包括施用有效剂量的麦草畏或者草铵膦或者麦草畏和草铵膦除草剂以控制田间杂草, 且然后将包含事件 MON88701 的棉花植物种植在所述田地中。

26. 权利要求 25 的方法, 其中所述有效剂量的麦草畏除草剂为约 0.005 磅至约 16 磅每英亩, 并且所述种植包含事件 MON88701 的棉花植物是在所述施用有效剂量的麦草畏除草剂的 14 天之内。

27. 一种用于生产基本上不含杂草种子的棉花种子或棉绒的方法, 所述方法包括:

a) 将包含棉花事件 MON88701 的种子种植在田地中;

b) 向所述田地施用有效剂量的麦草畏或者草铵膦或者麦草畏和草铵膦除草剂以杀死所述田地中的杂草而不伤害包含事件 MON88701 的棉花植物; 以及

c) 从所述田地收获棉花种子或棉绒。

28. 一种生产耐受麦草畏和草铵膦除草剂施用的棉花植物的方法, 所述方法包括:

a) 将包含事件 MON88701 的包含具有选自 SEQ ID NO:1—8 的核苷酸序列及其互补序列的核苷酸分子的转基因棉花植物与第二棉花植物进行有性杂交;

b) 收集从所述杂交产生的种子;

c) 生长所述种子以产生多个后代植物;

d) 用麦草畏或者草铵膦或者麦草畏和草铵膦处理所述多个后代植物; 以及

e) 选择耐受麦草畏和草铵膦的后代植物。

29. 一种生产耐受麦草畏和草铵膦除草剂施用的棉花植物的方法, 所述方法包括:

a) 将包含事件 MON88701 的包含具有选自 SEQ ID NO:1—8 的核苷酸序列及其互补序

列的核苷酸分子的转基因棉花植物进行自交；

- b) 收集从所述自交产生的种子；
- c) 生长所述种子以产生多个后代植物；
- d) 用麦草畏或者草铵膦或者麦草畏和草铵膦处理所述多个后代植物；以及
- e) 选择耐受麦草畏和草铵膦的后代植物。

30. 一种确定包含事件 MON88701 的棉花植物或种子的接合性的方法,所述方法包括：

- a) 将包含棉花 DNA 的样品与引物组和探针组相接触,所述引物组和探针组
 - i) 当在核酸扩增反应中与事件 MON88701DNA 一起使用时,产生诊断事件 MON88701 的第一扩增子；并且
 - ii) 当在核酸扩增反应中与事件 MON88701DNA 之外的其他棉花基因组 DNA 一起使用时,产生诊断事件 MON88701 之外的其他天然棉花基因组 DNA 的第二扩增子；
 - b) 使用所述样品、引物组和探针组进行核酸扩增反应；
 - c) 在所述核酸扩增反应中检测诊断事件 MON88701 的第一荧光信号,以及与所述第一荧光信号不同的且诊断对应于事件 MON88701 转基因的插入位置的天然棉花基因组 DNA 的第二荧光信号；并且
 - d) 分析所述核酸扩增反应中所述第一荧光信号和所述第二荧光信号的存在或不存在,其中两种荧光信号的存在表明所述样品对事件 MON88701 是杂合的,且只有所述第一荧光信号存在表明所述样品对事件 MON88701 是纯合的。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述引物组包含 SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :14。

32. 权利要求 30 的方法,其中所述探针组包含 SEQ ID NO :13 和 SEQ ID NO :15。

33. 一个棉花单体型区域,其包含事件 MON88701 并定位于染色体 A08 上 19.3cM 的图位处,并且左侧以 18.6cM 图位处的 NG0207927 为边界和右侧以 20.0cM 图位处的 NG0207529 为边界。

棉花转基因事件 MON88701 及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 3 月 30 日提交的美国临时申请号 61 / 469, 118 的利益, 将其全文通过引用并入本文。

[0003] 序列列表并入

[0004] 在名称为“MONS302W0. txt”的文件中包含的序列列表通过电子提交与本文一起提交并通过引用并入本文, 所述文件为 21 千字节 (在 Microsoft **Windows**® 中测量的大小) 并在 2012 年 3 月 9 日产生。

发明领域

[0005] 本发明涉及转基因棉花 (*Gossypium hirsutum*) 事件 MON88701。所述事件表现出对麦草畏和草铵膦除草剂的耐受性。本发明还涉及与事件 MON88701 相关的植物、植物部分、植物种子、植物细胞、农产品和方法, 并提供了所述事件独有的并与转基因 DNA 插入棉花植物的基因组中相关联而产生的核苷酸分子。

[0006] 发明背景

[0007] 棉花 (陆地棉) 在世界上许多地区是重要的作物, 并且为了生产具有所需性状的棉花, 已将生物技术方法应用于这种作物。一种这样的所需性状是除草剂耐受性。除草剂耐受性转基因在植物中的表达能够赋予植物所需的除草剂耐受性状, 但是转基因的表达可能受到转基因插入的染色体位置和基因组结果的影响。例如, 已经在植物中观察到, 在转基因的染色体插入位点方面不同但在其他方面都相同的单个事件之间, 通常存在着转基因表达水平和模式的变异。在事件之间还可能存在着不想要的和 / 或想要的表型或农学差异。因此, 为了选择具有所需性状和使其适合于商业化目的所需的最适表型和农业特性两者的事件, 通常需要产生并分析大量单个植物转化事件。这样的选择通常需要经过多年、在多个地点并在多种不同条件下对许多事件进行温室和田间试验, 以便可以收集到大量农艺学、表型和分子数据。然后必须由科学家和农学家对得到的数据和观察进行分析, 其目的是选择商业上适合的事件。这样的事件一旦被选择, 随后可能用于使用植物育种方法将所需性状渗入到其他遗传背景中, 并由此产生含有所需性状并适当地适应于特定当地生长条件的大量不同作物品种。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了包含事件 MON88701 的转基因棉花植物, 其对麦草畏和草铵膦除草剂的施用表现出可接受的耐受性, 并且代表性种子样品已在专利保藏名 PTA-11754 下保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (**ATCC**®)。本发明还提供了与棉花事件 MON88701 相关的新的 DNA 分子以及使用这些分子的方法。本发明还提供了包含事件 MON88701 的棉花植物的种子、后代、植物部分、细胞和商品。本发明还提供了使用棉花事件 MON88701 的方法以及生产对麦草畏和草铵膦除草剂两者耐受的棉花的方法。

[0010] 本发明提供了与棉花事件 MON88701 相关的重组 DNA 分子。这些重组 DNA 分子可

能包含具有代表了转基因插入侧翼的基因组 DNA 的区域,和 / 或转基因插入的区域,和 / 或任何这些区域的连续序列(例如棉花事件 MON88701 的转基因插入片段与侧翼基因组 DNA 之间的连接区域)的核苷酸序列的核苷酸分子。本发明还提供了可用作诊断棉花事件 MON88701 的引物和探针的 DNA 分子以及诊断棉花事件 MON88701 的存在的扩增子。还公开了包含这些分子的棉花植物、植物细胞、植物部分、商品、后代和种子。

[0011] 本发明提供了可用于检测源自于棉花事件 MON88701 的 DNA 的存在和 / 或不存在,并因此可用于检测所述事件的存在和 / 或不存在的的方法、组合物和试剂盒。本发明提供了一种用于通过将包含 DNA 的样品与当与来自于包含事件 MON88701 的棉花植物或种子的基因组 DNA 一起在核酸扩增反应中使用产生可用于诊断棉花事件 MON88701 的扩增 DNA 的引物组相接触,进行核酸扩增反应由此产生所述扩增 DNA,以及检测所述扩增 DNA 的存在和 / 或不存在而检测 MON88701 的方法。本发明还提供了一种用于通过将包含 DNA 的样品与当与来自于棉花事件 MON88701 的 DNA 一起在杂交反应中使用与棉花事件 MON88701 特有的 DNA 分子杂交的探针相接触,从而进行杂交反应,以及检测所述探针与所述 DNA 分子的杂交而检测 MON88701 的方法。还提供了可用于检测源自于棉花事件 MON88701 的 DNA 的存在的包含本发明的方法和组合物的试剂盒。

[0012] 本发明提供了源自于包含棉花事件 MON88701 的植物、植物细胞或种子的棉花植物、种子、植物细胞、后代植物、植物部分或商品。本发明还提供包含重组 DNA 分子的棉花植物、种子、植物细胞、后代植物、植物部分或商品,所述重组 DNA 分子具有选自 SEQ ID NO: 1—10 及其互补序列和片段的核苷酸序列。本发明还提供了源自于包含棉花事件 MON88701 并包含重组 DNA 分子的植物或种子的棉花植物、种子、植物细胞、后代植物、植物部分或商品,所述重组 DNA 分子在 DNA 扩增方法中产生包含选自 SEQ ID NO: 1—10 的序列的扩增的 DNA 分子。

[0013] 本发明提供了用于控制田间杂草的方法,所述方法包括种植包含事件 MON88701 的棉花植物,然后施用能够控制杂草而不伤害含有棉花事件 MON88701 的植物的有效剂量的麦草畏、草铵膦或麦草畏和草铵膦除草剂两者。本发明还提供了用于控制田间杂草的方法,所述方法包括施用有效剂量的至少麦草畏、草铵膦或麦草畏和草铵膦除草剂以控制田间杂草,然后将包含事件 MON88701 的棉花植物种植在田地中。本发明还提供了用于生产基本上不含杂草种子的棉花种子或棉绒的方法,所述方法包括将包含 MON88701 的麦草畏和草铵膦耐受棉花植物的种子种植在田地中,向所述田地施用足以杀死杂草物种的萌发后有效剂量的至少麦草畏、草铵膦或麦草畏和草铵膦除草剂,以及从所述田地收获种子或棉绒。

[0014] 本发明提供了用于生产耐受麦草畏和草铵膦除草剂施用的棉花植物和 / 或种子的方法,所述方法包括将含有棉花事件 MON88701 的包含选自 SEQ ID NO: 1—10 的序列的植物与第二棉花植物进行有性杂交,由此产生种子,生长所述种子以产生后代植物,用麦草畏和 / 或草铵膦处理所述后代植物,以及选择对麦草畏和草铵膦两者耐受的后代植物。该方法还可以包括将所选择的后代植物自交以产生多个第二代后代植物,并从其中选择麦草畏和草铵膦耐受植物。所述方法还可以包括将所选择的后代植物与另一种棉花植物进行有性杂交以产生种子,生长所述种子以产生第二代后代植物,用麦草畏和 / 或草铵膦处理所述第二代后代植物,以及选择耐受麦草畏和草铵膦的第二代后代植物。本发明提供了生产耐受麦草畏和草铵膦除草剂施用的棉花植物和 / 或种子的方法,所述方法包括对包含事

件 MON88701 的含有选自 SEQ ID NO :1—10 的序列的麦草畏和草铵膦耐受棉花植物进行自交,由此产生种子,生长所述种子以产生后代植物,用麦草畏和 / 或草铵膦处理所述后代植物,以及选择耐受麦草畏和草铵膦的后代植物。本发明提供了确定含有棉花事件 MON88701 的植物或种子的接合性的方法,所述方法包括将棉花 DNA 样品与包含 SEQ ID NO :11、12 和 14 的引物组及包含 SEQ ID NO :13 和 15 的探针组相接触;然后进行所述样品、引物组和探针组的核酸扩增反应;然后在所述核酸扩增反应中检测诊断事件 MON88701 的第一荧光信号以及与所述第一荧光信号不同而诊断对应于事件 MON88701 转基因的插入位置的天然棉花基因组 DNA 的第二荧光信号;以及分析所述核酸扩增反应中所述第一荧光信号和所述第二荧光信号的存在和 / 或不存在,其中两种荧光信号的存在表明所述样品对事件 MON88701 是杂合的,且仅有所述第一荧光信号存在表明所述样品对事件 MON88701 是纯合的。本发明还提供了包含麦草畏和草铵膦耐受性基因的棉花植物、种子、植物细胞或植物部分及其使用方法,所述麦草畏和草铵膦耐受性基因被定位于染色体 A08 上 19.3cM 的图位处,并且在左侧以 18.6cM 图位处的 NG0207927 为界和在右侧以 20.0cM 的图位处的 NG0207529 为界。从下面的详细说明,本发明的上述和其他方面将变得更加明显。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 示出了转基因插入片段在包含事件 MON88701 的棉花植物的基因组中的结构。[A] 对应于 SEQ ID NO :1 的相对位置;[A'] 对应于 SEQ ID NO :3 的相对位置;[A''] 对应于 SEQ ID NO :5 的相对位置;[B] 对应于 SEQ ID NO :2 的相对位置;[B'] 对应于 SEQ ID NO :4 的相对位置;[B''] 对应于 SEQ ID NO :6 的相对位置;[C] 对应于 SEQ ID NO :7 的相对位置;[D] 对应于 SEQ ID NO :8 的相对位置;[E] 对应于 SEQ ID NO :9 的相对位置;[F] 对应于 SEQ ID NO :10 的相对位置;SQ21654 和 SQ23205 对应于用于鉴定棉花事件 MON88701 的引物的相对位置。

[0017] 图 2 示出了以每英亩籽棉磅数报告的两年农学产量田间试验数据。

[0018] 图 3 示出了以每英亩籽棉磅数报告的第一年产量田间试验数据。

[0019] 图 4 示出了以每英亩籽棉磅数报告的第二年产量田间试验数据,其使用增加量的麦草畏 (4. A.) 或草铵膦 (4. B.) 除草剂。

[0020] 图 5 示出了使用增加量的麦草畏 (5. A.) 或草铵膦 (5. B.) 除草剂时出现的坏死斑点的百分率。

[0021] 图 6 示出了用于事件 MON88701 的喷洒方案的以每英亩籽棉磅数计的产量田间试验数据。

[0022] 图 7 显示了田间用麦草畏和草铵膦喷洒的包含事件 MON88701 的植物与非转基因 Coker130 植物。除草剂施用是事先施用 11b 麦草畏 (2X), 2 叶时施用 11b 草铵膦 (2X), 5 叶时施用 11b 麦草畏, 以及 8 叶时施用 11b 草铵膦。

[0023] 序列简述

[0024] SEQ ID NO :1 是 20 个核苷酸的序列,其表示棉花基因组 DNA 与整合的转基因表达盒的 5' 连接区域。SEQ ID NO :1 位于 SEQ ID NO :10 中 1117—1136 核苷酸位置处。

[0025] SEQ ID NO :2 是 20 个核苷酸的序列,其表示棉花基因组 DNA 与整合的转基因表达盒的 3' 连接区域。SEQ ID NO :2 位于 SEQ ID NO :10 中 5222—5241 核苷酸位置处。

[0026] SEQ ID NO :3 是 60 个核苷酸的序列,其表示棉花基因组 DNA 与整合的转基因表达

盒的 5' 连接区域。

[0027] SEQ ID NO :4 是 60 个核苷酸的序列,其表示棉花基因组 DNA 与整合的转基因表达盒的 3' 连接区域。

[0028] SEQ ID NO :5 是 100 个核苷酸的序列,其表示棉花基因组 DNA 与整合的转基因表达盒的 5' 连接区域。

[0029] SEQ ID NO :6 是 100 个核苷酸的序列,其表示棉花基因组 DNA 与整合的转基因表达盒的 3' 连接区域。

[0030] SEQ ID NO :7 是侧邻 MON88701 的插入 DNA 直到并包括一部分整合的转基因表达盒的 5' 序列。

[0031] SEQ ID NO :8 是侧邻 MON88701 的插入 DNA 直到并包括一部分整合的转基因表达盒的 3' 序列。

[0032] SEQ ID NO :9 是整合的转基因表达盒的序列。

[0033] SEQ ID NO :10 是侧邻插入 DNA 的 5' 序列 (SEQ ID NO :7)、整合的转基因表达盒 (SEQ ID NO :9) 和侧邻插入 DNA 的 3' 序列 (SEQ ID NO :8) 的连续核苷酸序列。SEQ ID NO :10 包含 SEQ ID NO :1—9。

[0034] SEQ ID NO :11 是被称为引物 SQ21654 并用于鉴定棉花事件 MON88701 的引物的序列。它在接近 3' 转基因插入边界的区域处与插入的表达盒互补。使用引物 SQ21654 和 SQ23205 (SEQ ID NO :12) 的组合从 **TAQMAN®** (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 分析产生的 PCR 扩增子是存在事件 MON88701 的阳性结果。该引物组也可用于在接合性分析中鉴定 MON88701 事件。

[0035] SEQ ID NO :12 是被称为引物 SQ23205 并用于鉴定棉花事件 MON88701 的引物的序列。它与侧邻插入的表达盒的 3' 区域互补并靠近转基因插入边界。使用引物 SQ21654 (SEQ ID NO :11) 和 SQ23205 的组合从 **TAQMAN®** (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 分析产生的 PCR 扩增子是存在事件 MON88701 的阳性结果。它也是用于在接合性分析中鉴定 MON88701 事件和野生型的引物。

[0036] SEQ ID NO :13 是被称为探针 PB10280 并用于鉴定棉花事件 MON88701 的探针的序列。它与插入的表达盒的区域互补并邻近基因组 DNA 的 3' 接合部。该探针是 6-FAM™ 标记的合成寡核苷酸。在使用引物 SQ21654 和 SQ23205 (SEQ ID NO :11—12) 与 6-FAM™ 标记的探针 PB10280 结合的扩增反应中荧光信号的释放在 **TAQMAN®** 分析中诊断事件 MON88701。PB10280 也是在接合性分析中用于鉴定 MON88701 事件的探针。

[0037] SEQ ID NO :14 是被称为引物 SQ23901 并用于在 MON88701 接合性分析中鉴定棉花野生型等位基因的引物的序列。

[0038] SEQ ID NO :15 是被称为探针 PB10631 并用于在 MON88701 接合性分析中鉴定棉花野生型等位基因的 VIC™ 标记的探针的序列。

[0039] 详细描述

[0040] 提供下面的定义和方法是为了更好地定义本发明并在本发明的实施中指导本领域的普通技术人员。除非另有指明,否则术语应该由相关领域的普通技术人员根据惯常用法来理解。

[0041] 本发明提供了转基因棉花事件 MON88701,其对麦草畏和草铵膦除草剂的施用表现

出商业上可接受的耐受性。所述事件包含转基因 DNA 在棉花种质的染色体 / 基因组中的单一插入。“事件”通过下述步骤产生：(i) 用包括目标转基因的核酸构建物转化植物细胞，(ii) 再生由转基因在植物基因组中的插入获得的植物群体；以及 (iii) 选择以转基因插入到植物基因组中的特定位置为特征的特定植物。

[0042] 术语“事件”是指包含插入的 DNA 和紧邻插入的 DNA 的任一侧的侧翼棉花基因组 DNA 的 DNA 分子。该 DNA 分子通过将转基因 DNA 插入到棉花植物的基因组中的行动、即转化行动来产生。因此，该 DNA 分子包含对所述事件特异性的，并且对于其中插入有转基因 DNA 的棉花植物基因组来说独有的核苷酸序列，因为该核苷酸序列含有棉花基因组 DNA 的特定区域和转基因 DNA 插入片段两者的序列。因此，在棉花事件 MON88701 中插入的 DNA 相对于周围棉花植物的基因组 DNA 的排列方式对于棉花事件 MON88701 来说是特异性的和独有的。该 DNA 分子也是包含事件 MON88701 的植物的棉花染色体的整体组成部分，因此在植物中是静态的并且可以传递给植物的后代。

[0043] 本发明还提供了包括插入到植物基因组的特定位置中的转基因的原始转化体，以及所述转化体的包括插入到植物基因组的特定位置中的转基因的后代。这样的后代可以通过转化体或其后代与另一植物之间的有性异交来产生。这样的其他植物可以是包含相同或不同转基因的转基因植物和 / 或非转基因植物，例如来自于不同品种的植物。即使在与轮回亲本重复回交后，来自于被转化亲本的插入 DNA 和侧翼 DNA 也存在于杂交后代中的相同基因组位置处。

[0044] 当在本文中使用时，术语“棉花”是指陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)，并包括可以与棉花育种的所有植物品种，包括野生棉物种和属于棉属 (*Gossypium*) 的允许种间繁育的植物。

[0045] 事件 MON88701 包含整合的转基因表达盒，其赋予棉花植物对麦草畏和草铵膦除草剂施用的耐受性。“麦草畏”是指 3,6-二氯-2-甲氧基苯甲酸。麦草畏是可用于控制阔叶杂草的合成的茁长素除草剂。用来自于嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 的编码麦草畏单加氧酶 (DMO) 的基因 (*dmo*) 转化棉花植物。DMO 是催化经 O-去甲基化反应将麦草畏灭活成非除草性化合物 3,5-二氯水杨酸的酶。“草铵膦”是指 2-氨基-4-(羟甲基膦)丁酸。草铵膦是可用于控制广谱的一年生和多年生禾草和阔叶杂草的有机磷除草剂。用来自于吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的编码草丁膦乙酰转移酶 (PAT) 的双丙氨膦抗性基因 (*bar*) 转化棉花植物。PAT 是催化草铵膦的乙酰化并因此使其失活的酶。

[0046] 当在本文中使用时，术语“重组的”是指通常不存在于自然界中并且因此通过人类干预而产生的 DNA 和 / 或蛋白质和 / 或生物体形式。这样的人类干预可以产生重组 DNA 分子和 / 或重组植物。当于本文中使用时，“重组 DNA 分子”是包含在自然界中不一起出现而由于人类干预而产生的 DNA 分子组合的 DNA 分子，例如包含彼此异源的至少两个 DNA 分子的组合的 DNA 分子，和 / 或由人工合成并包含与自然界中正常存在的多核苷酸序列有偏差的多核苷酸序列的 DNA 分子，和 / 或包含人工整合到宿主细胞的基因组 DNA 中的转基因和宿主细胞基因组的相关侧翼 DNA 的 DNA 分子。重组 DNA 分子的实例是本文中描述的通过将转基因插入到棉花基因组 DNA 中而得到的 DNA 分子，其可能最终导致重组 RNA 和 / 或蛋白质分子在该生物体中表达。当在本文中使用时，“重组植物”是通常在自然界中不存在，是人

类干预的结果的植物,并且含有整合到其基因组中的转基因和 / 或异源 DNA 分子。作为这样的基因组改变的结果,重组植物与相关的野生型植物明显不同。重组植物的实例是本文中描述的包含事件 MON88701 的棉花植物。

[0047] 当在本文中使用时,术语“转基因”是指人工整合到宿主细胞基因组中的核苷酸分子。这样的转基因对于所述宿主细胞可能是异源的。术语“转基因植物”是指包含这样的转基因的植物。

[0048] 当在本文中使用时,术语“异源的”是指在自然界中第一分子通常不与第二分子组合存在。例如,一个分子可能源自于第一物种并被插入到第二物种的基因组中。因此,所述分子对于所述宿主来说是异源的,并人工整合到宿主细胞的基因组中。

[0049] 当在本文中使用时,术语“嵌合的”是指通过将第一 DNA 分子与第二 DNA 分子融合而产生的单一 DNA 分子,其中第一和第二 DNA 分子通常都不以该构造(即彼此融合)存在。因此,嵌合的 DNA 分子是通常不存在于自然界中的新的 DNA 分子。

[0050] 本发明提供了 DNA 分子及其相应的核苷酸序列。当在本文中使用时,术语“DNA”、“DNA 分子”、“核苷酸分子”是指基因组或合成来源的 DNA 分子,即脱氧核糖核苷酸碱基的聚合物或多核苷酸分子,其从 5' (上游) 末端向 3' (下游) 末端阅读。当在本文中使用时,术语“DNA 序列”、“核苷酸序列”或“多核苷酸序列”是指 DNA 分子的核苷酸序列。在本文中使用的命名法是美国联邦法规编码 (United States Code of Federal Regulations) § 1.822 的第 37 条所规定的、并在 WIPO Standard ST.25 (1998) 附录 2 的表 1 和 3 中列出的命名法。按照惯例,作为 SEQ ID NO :1—10 提供的本发明的核苷酸序列及其片段仅针对两条互补核苷酸序列链中的一条链来公开。这暗示了互补序列(即互补链的序列)(在本技术领域中也称为反向互补序列)在本发明的范围之内,并且明确地打算在所要求保护的的主题的范围之内。

[0051] 与插入的转基因 DNA 和所述插入的转基因 DNA 任一末端侧翼的棉花基因组 DNA 的实质片段的完整核苷酸序列对应的核苷酸序列在本文中以 SEQ ID NO :10 提供。它的子区段是以 SEQ ID NO :9 提供的插入的转基因 DNA。通过磷酸二酯键物理连接于插入的转基因 DNA 并因此邻接于其 5' 末端的棉花基因组 DNA 的核苷酸序列如图 1 中所示,并以 SEQ ID NO :1、3、5 和 7 提供。通过磷酸二酯键物理连接于插入的转基因 DNA 并因此邻接于其 3' 末端的棉花基因组 DNA 的核苷酸序列如图 1 中所示,并以 SEQ ID NO :2、4、6 和 8 提供。

[0052] 棉花事件 MON88701 还包含两个区域,一个区域跨越转基因 DNA 插入到基因组 DNA 中的 5' 位置,另一个区域跨越 3' 位置,在本文中分别被称为 5' 和 3' 接合部。“接合部序列”或“接合部区域”是指跨越插入的转基因 DNA 和相邻的侧翼基因组 DNA 的 DNA 序列和 / 或相应的 DNA 分子。接合部序列可以任意地用以 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 提供的核苷酸序列来表示,所述序列各表示与插入 DNA 的 10 个核苷酸相邻并毗连的侧翼基因组 DNA 的 10 个核苷酸。或者,接合部序列可以任意地用被以 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 提供的两个 60 个核苷酸的序列来表示,所述序列各表示与插入 DNA 的 30 个核苷酸相邻并毗连的侧翼基因组 DNA 的 30 个核苷酸。或者,接合部序列可以任意地用以 SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6 提供的两个 100 个核苷酸的序列来表示,所述序列各表示与插入 DNA 的 50 个核苷酸相邻并毗连的侧翼基因组 DNA 的 50 个核苷酸。这些核苷酸通过磷酸二酯键相连,并且在棉花事件 MON88701 中作为基因组的部分存在。在源自于棉花植物、种子或植物部分的样品

中 SEQ ID NO :1—10 中的一个或多个的鉴定能够确定所述 DNA 是从棉花事件 MON88701 获得,并且能够诊断样品中来自于棉花事件 MON88701 的 DNA 的存在。因此,本发明提供了含有至少一个以 SEQ ID NO :1—10 提供的核苷酸序列的 DNA 分子。足以包含至少一个以 SEQ ID NO :1—10 提供的序列的源自于转基因棉花事件 MON88701 的任何 DNA 片段在本发明的范围之内。此外,包含与本段落中描述的任何序列互补的序列的任何多核苷酸在本发明的范围之内。图 1 示出了 SEQ ID NO :1—9 从 5' 向 3' 排列的相对于 SEQ ID NO :10 的物理排列。

[0053] 本发明提供了可以用作诊断样品中源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的 DNA 的存在的引物或探针的示例性 DNA 分子。这样的引物或探针对于目标核酸序列是特异性的,且因此可用于通过本文中描述的本发明的方法鉴定棉花事件 MON88701 的核酸序列。

[0054] “引物”通常是高度纯化的分离的多核苷酸,其被设计用于涉及热扩增的特异性退火或杂交方法中。一对引物可以与模板 DNA 例如棉花基因组 DNA 样品一起使用在热扩增例如聚合酶链反应 (PCR) 中,以产生扩增子,其中从这样的反应产生的扩增子具有与位于引物杂交到模板处的两个位点之间的模板 DNA 的序列相对应的 DNA 序列。当在本文中使用时,“扩增子”是使用扩增技术合成的 DNA 碎片或片段。本发明的扩增子包含至少一个以 SEQ ID NO :1—10 提供的序列。引物通常被设计成与互补的靶 DNA 链杂交以在引物与靶 DNA 链之间形成杂交体,并且引物的存在是聚合酶使用靶 DNA 链作为模板开始引物延伸(即另外的核苷酸聚合到伸长的核苷酸分子中)的识别位点。当在本发明中使用时,引物对意图指使用结合双链核苷酸片段的相反链的两个引物以通常在热扩增反应或其他常规核酸扩增方法中实现线性扩增由引物对的单个成员的结合所靶定的位置之间的多核苷酸片段的的目的。可用作引物的示例性 DNA 分子以 SEQ ID NO :11—12 提供。以 SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 提供的引物对可用作第一 DNA 分子和与所述第一 DNA 分子不同的第二 DNA 分子,并且两者各具有 SEQ ID NO :10 的足够长度的连续核苷酸以起到当在热扩增反应中与源自于棉花事件 MON88701 的模板 DNA 一起使用时,产生诊断样品中棉花事件 MON88701 DNA 的扩增子的 DNA 引物的作用。

[0055] “探针”是与靶核酸链互补的分离的核酸。根据本发明的探针不但包括脱氧核糖核酸或核糖核酸,而且包括聚酰胺和特异性结合于靶 DNA 序列的其他探针材料,并且这种结合的检测可用于诊断、辨别、确定或证实靶 DNA 序列在特定样品中的存在。探针可以连接于常规的可检测标记或报告分子,例如放射性同位素、配体、化学发光剂或酶。可用作探针的示例性 DNA 分子以 SEQ ID NO :13 提供。

[0056] 根据本发明的探针和引物可以与靶序列具有完全的序列同一性,尽管可以通过常规方法来设计保持与靶序列优先杂交的能力的而与靶序列不同的引物和探针。为了使核酸分子起到引物或探针的作用,只需要在序列中足够互补以便能够在所使用的特定溶剂和盐浓度下形成稳定的双链结构。可以使用任何常规的核酸杂交或扩增方法来鉴定样品中来自于棉花事件 MON88701 的转基因 DNA 的存在。探针和引物的长度一般为至少约 11 个核苷酸、至少约 18 个核苷酸、至少约 24 个核苷酸或至少约 30 个核苷酸或更长。这样的探针和引物在严格杂交条件下与靶 DNA 序列特异性杂交。常规的严格性条件描述在 Sambrook 等,1989 和 Haymes 等, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985) 中。当在本文中使用时,如果两个核酸分子能够形成反向平行的双链

核酸结构,则这两个分子能够彼此特异性杂交。如果两个核酸分子表现出完全互补性,则一个核酸分子是另一个核酸分子的“互补体”。当在本文中使用时,如果两个分子在比对时,第一分子的每个核苷酸与第二分子的每个核苷酸互补,则这两个分子表现出“完全互补性”。如果两个分子可以以足够的稳定性彼此杂交以允许它们在至少常规的“低严格性”条件下保持彼此退火,则这两个分子是“最低互补的”。同样地,如果分子能够以足够的稳定性彼此杂交以允许它们在常规的“高严格性”条件下保持彼此退火,则它们是“互补的”。因此,偏离完全互补性是容许的,只要这样的偏离不完全排除分子形成双链结构的能力即可。

[0057] 当在本文中使用时,术语“分离的”是指分子至少部分地与在天源或自然状态下通常与其相伴的其他分子分离。在一种实施方式中,术语“分离的”是指 DNA 分子与在天源或自然状态下通常邻接所述 DNA 分子的核酸至少部分地分离。因此,例如作为重组技术的结果,与正常情况下不与其相关的调节或编码序列融合的 DNA 分子在本文中被认为是分离的。即使在整合到宿主细胞的染色体中或与其他 DNA 分子一起存在于核酸溶液中时,这样的分子也被认为是分离的。

[0058] 可以使用本领域技术人员公知的大量方法来分离和操作本发明中公开的 DNA 分子或其片段。例如,可以使用 PCR(聚合酶链反应)技术来扩增特定的起始 DNA 分子和/或产生原始分子的变体。DNA 分子或其片段也可以通过其他技术来获得,例如通过使用化学手段直接合成所述片段,正如通常通过使用自动化寡核苷酸合成仪所实现的。

[0059] 因此,本文中提供的 DNA 分子和相应的核苷酸序列除了其他用途之外,可用于鉴定棉花事件 MON88701、选择包含棉花事件 MON88701 的植物品种或杂种、检测样品中源自于转基因棉花事件 MON88701 的 DNA 的存在以及监测样品中棉花事件 MON88701 或源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的植物部分的存在和/或不存在的。

[0060] 本发明提供了棉花植物、后代、种子、植物细胞、植物部分(例如花粉、胚珠、莢、花组织、根组织、茎组织和叶组织)和商品。这些植物、后代、种子、植物细胞、植物部分和商品含有可检测量的本发明的多核苷酸,即例如具有以 SEQ ID NO:1—10 提供的至少一个序列的多核苷酸。本发明的植物、后代、种子、植物细胞和植物部分也可以含有一个或多个其他的转基因。这样的转基因可以是编码赋予所需性状的蛋白质或 RNA 分子的任何核苷酸序列,所述性状包括但不限于提高的抗虫性、提高的水利用效率、提高的产量性能、提高的抗旱性、提高的种子品质、性状的营养品质和/或提高的除草剂耐受性,其中所述所需性状相对于缺少这样的其他转基因的棉花植物测定。

[0061] 本发明提供了源自于包含事件 MON88701 的转基因棉花植物的棉花植物、后代、种子、植物细胞和植物部分例如花粉、胚珠、莢、花、根或茎组织和叶。包含事件 MON88701 的棉花种子的代表性样品已按照布达佩斯公约(Budapest Treaty)保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC®)。ATCC 保藏机构已将专利保藏号 PTA-11754 指派给包含事件 MON88701 的种子。

[0062] 本发明提供了包含存在于基因组中的具有选自 SEQ ID NO:1—10 的至少一个序列的 DNA 分子的微生物。这样的微生物的实例是转基因植物细胞。微生物,例如本发明的植物细胞,可用于许多工业应用中,包括但不限于:(i) 用作科学探索或工业研究的研究工具;(ii) 用于培养以产生内源或重组的糖、脂质、核酸或蛋白质产物或小分子,其可用于随后的科学研究或作为工业产品;以及(iii) 用于现代植物组织培养技术以产生随后可用于

农业研究或生产的转基因植物或植物组织培养物。微生物例如转基因植物细胞的产生和使用利用了现代微生物学技术和人类干预来生产人造的独特的微生物。在这一过程中,将重组 DNA 插入到植物细胞的基因组中以产生与天然存在的植物细胞分离的和独特的转基因植物细胞。这种转基因植物细胞随后可以使用现代微生物学技术以更类似于细菌和酵母细胞的方式培养,并且可以以未分化的单细胞状态存在。新植物细胞的遗传组成和表型是由异源 DNA 整合到细胞基因组中所产生的技术效果。本发明的另一方面是本发明微生物的使用方法。使用本发明的微生物例如转基因植物细胞的方法包括 (i) 通过将重组 DNA 整合到细胞的基因组中,然后使用该细胞衍生具有相同异源 DNA 的其他细胞生产转基因细胞的方法;(ii) 使用现代微生物学技术培养含有重组 DNA 的细胞的方法;(iii) 生产和纯化来自于培养细胞的内源或重组糖、脂质、核酸或蛋白质产物的方法;以及 (iv) 使用现代植物组织培养技术使用转基因植物细胞生产转基因植物或转基因植物组织培养物的方法。

[0063] 本发明的植物可以将事件 DNA (包括转基因) 传递给后代。当在本文中使用时,“后代”包括包含源自于祖先植物的事件 DNA 和 / 或包含具有选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子的任何植物、种子、植物细胞和 / 或可再生植物部分。植物、后代和种子对于所述转基因可以是纯合的或杂合的。可以从由含有棉花事件 MON88701 的植物产生的种子和 / 或从用来自于含有棉花事件 MON88701 的植物的花粉授粉的植物所产生的种子来生长后代。

[0064] 后代植物可以自花授粉 (也称为“自交”) 以产生植物的纯育品系,即对转基因纯合的植物。适宜的后代的自交可以产生对两种添加的外源基因纯合的植物。

[0065] 或者,后代植物可以异交,例如与另一种无亲缘关系的植物杂交,以产生变种或杂种种子或植物。所述另外的无亲缘关系的植物可以是转基因的或非转基因的。因此,本发明的变种或杂种种子或植物可以通过将缺少棉花事件 MON88701 的特异性和独特的 DNA 的第一亲本与包含棉花事件 MON88701 的第二亲本杂交来产生,从而产生包含棉花事件 MON88701 的特异性的和独特的 DNA 的杂种。各个亲本可以是杂种或近交系 / 变种,只要杂交或育种产生本发明的植物或种子,即具有含有棉花事件 MON88701 的 DNA 的至少一个等位基因和 / 或具有选自 SEQ ID NO :1-10 的至少一个序列的 DNA 分子的种子。因此,可以将两种不同的转基因植物杂交以产生含有两个独立地分离的添加的外源基因的杂种后代。例如,含有 MON88701 的麦草畏和草铵膦耐受性棉花可以与其他转基因棉花植物杂交以产生具有两种转基因亲本的特征的植物。其一个实例是含有 MON88701 的麦草畏和草铵膦耐受棉花与具有一种或多种另外的性状例如除草剂耐受性 (例如棉花事件 MON1445 或棉花事件 MON88913) 和 / 或昆虫防治 (例如棉花事件 MON15985、MON757 或 MON531) 的植物杂交,从而产生对麦草畏和草铵膦耐受的并具有至少一种或多种另外的性状的后代植物或种子。还设想了与亲本植物的回交和与非转基因植物的异交,以及无性繁殖。通常用于不同性状和作物的其他育种方法的描述可以在几篇参考文献之一中找到,例如 Fehr, *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. 主编, American Society of Agronomy, Madison WI (1987)。

[0066] 本发明提供了源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的植物部分。当在本文中使用时,“植物部分”是指由源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的材料构成的植物的任何部分。植物部分包括但不限于花粉、胚珠、荚、花、根或茎组织、纤维和叶。植物部分可以是有

可存活的、非存活的、可再生的和 / 或不可再生的。

[0067] 本发明提供了源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的商品。当在本文中使用时，“商品”是指由源自于含有棉花事件 MON88701 的植物、种子、植物细胞或植物部分的材料构成的任何组合物或产品。商品可以销售给消费者，并且可以是存活的或非存活的。非存活的商品包括但不限于非存活的种子，加工的种子、种子部分和植物部分，棉绒，用于饲料和食品、油、纤维、纸、生物质和燃料产品的加工的种子和植物部分。存活的商品包括但不限于种子、植物和植物细胞。因此，包含事件 MON88701 的棉花植物可用于制造通常从棉花获得的任何商品。任何这样的源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的商品可能含有至少可检测量的对应于棉花事件 MON88701 的特异性和独特的 DNA，并且具体来说可能含有可检测量的包含具有选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子的多核苷酸。可以使用检测核苷酸分子的任何标准方法，包括本文公开的检测方法。如果在商品中存在任何可检测量的具有选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子，则所述商品在本发明的范围之内。

[0068] 因此，本发明的植物、后代、种子、植物细胞、植物部分（例如花粉、胚珠、荚、花、根或茎组织和叶）和商品，除了其他用途之外，可用于生长植物，其目的在于生产包含棉花事件 MON88701 的种子和 / 或植物部分以实现农业目的，生产包含棉花事件 MON88701 的后代用于植物育种和研究目的，采用微生物学技术以用于工业和研究应用，以及销售给消费者。

[0069] 本发明提供了用于控制杂草的方法和使用麦草畏和草铵膦除草剂和棉花事件 MON88701 生产植物的方法。提供了一种用于控制田间杂草的方法，其由下述步骤构成：将含有棉花事件 MON88701 的变种或杂种植物种植在田地中，并且向所述田地施用除草有效剂量的麦草畏或草铵膦或麦草畏和草铵膦以实现控制田间杂草而不损伤含有 MON88701 的植物的目的。麦草畏或草铵膦或麦草畏和草铵膦除草剂的这种施用可以是在出土前，即在含 MON88701 的种子种植之后和在含有 MON88701 的植物萌发之前的任何时间，或者是在出土后，即在含有 MON88701 的植物萌发之后的任何时间。还提供了用于控制田间杂草的另一种方法，其由下述步骤构成：施用有效剂量的麦草畏或草铵膦或麦草畏和草铵膦除草剂以控制田间杂草，然后将包含事件 MON88701 的棉花植物种植在田地中。麦草畏或草铵膦或麦草畏和草铵膦除草剂的这种施用是种植前的，即在含有 MON88701 的种子种植之前，并且可以在种植之前的任何时间进行，包括但不限于种植之前约 14 天至种植之前约 1 天。本发明还提供了用于生产基本上不含杂草种子的棉花种子或棉绒的方法，所述方法包括将包含 MON88701 的麦草畏和草铵膦耐受性棉花植物的种子种植在田地中，向所述田地施加足以杀死杂草的出土后有效剂量的麦草畏或草铵膦或麦草畏和草铵膦除草剂，以及从所述田地收获种子或棉绒。在田地中使用的除草有效剂量的麦草畏应该由在生长季内约 0.005 磅每英亩至约 16 磅每英亩麦草畏的范围构成。在一种实施方式中，在生长季中施用总共约 0.5 磅每英亩至约 2 磅每英亩的麦草畏。可以在生长季内采用麦草畏的多次施用，例如两次施用（例如种植前施用和出土后施用，或出土前施用和出土后施用）或三次施用（例如种植后施用、出土前施用和出土后施用）。在田地中使用的除草有效剂量的草铵膦应该由生长季内约 0.005 磅每英亩至约 16 磅每英亩草铵膦的范围构成。在一种实施方式中，在生长季内施用总共约 0.5 磅每英亩至约 1.59 磅每英亩的草铵膦。可以在生长季内采用草铵膦的多次施用，例如两次施用（例如种植前施用和出土后施用，或出土前施用和出土后施用）或三次施

用（例如种植后施用、出土前施用和出土后施用，或三次出土后施用）。

[0070] 提供了用于生产包含对于本发明的事件 MON88701 来说特异性的且独特的 DNA 序列的除草剂耐受性棉花植物的方法。在这些方法中使用的转基因植物对于所述转基因来说可以是纯合的或杂合的。通过这些方法产生的后代植物可以是变种或杂种植物，可以从由含有棉花事件 MON88701 的植物产生的种子和 / 或从来自于含有棉花事件 MON88701 的植物的花粉授粉的植物所产生的种子生长，并且对于所述转基因来说可以是纯合的或杂合的。后代植物随后可以自花授粉以产生植物的纯育品系，即对转基因纯合的植物，或者可以异交，例如与另一种无亲缘关系的植物育种，以产生变种或杂种种子或植物。

[0071] 对麦草畏和草铵膦除草剂的应用耐受的棉花植物可以通过将包含具有选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子的含有事件 MON88701 的植物与另一种棉花植物进行有性杂交并由此产生种子，然后将所述种子生长成后代植物来生产。然后可以用麦草畏和 / 或草铵膦除草剂处理这些后代植物以选择对麦草畏和草铵膦除草剂耐受的植物。或者，可以使用诊断方法来分析这些后代植物以选择含有事件 MON88701DNA 的后代植物。在杂交中使用的另一种植物可以耐受或者不耐受麦草畏和草铵膦除草剂，并且可以是或者不是转基因的。产生的后代植物和 / 或种子可以是变种或杂种种子。在这种方法的实施中，将一种植物与另一种植物有性杂交（即异花授粉）的步骤可以通过人为干预来实现或促进，例如：通过人手收集一种植物的花粉，并将该花粉与第二植物的花柱或柱头相接触；通过人手和 / 或行动来移除、破坏或覆盖植物的雄蕊或花药（例如通过去雄或通过施用化学杀配子剂）以使得天然的自花授粉被阻止，因而为了发生受精必须进行异花授粉；通过在用于“定向授粉”的位置中人工放置授粉昆虫（例如通过在果园或田地中放置蜂巢或将植物与授粉昆虫笼养在一起）；通过人工打开或移除花的允许在花柱或柱头上放置或接触外来花粉的部分（例如在天然具有阻碍或防止异花授粉的花而使它们在没有人干预时成为天然地专性自花授粉者的大豆中）；通过植物的选择性放置（例如将植物故意种植在授粉距离内）；和 / 或通过施用化学物质以促使开花或促进（柱头对花粉的）感受性。

[0072] 耐受麦草畏和草铵膦除草剂施用的棉花植物可以通过将包含具有选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子的含有事件 MON88701 的植物自交并由此产生种子，然后将所述种子生长成后代植物来生产。随后将这些后代植物用麦草畏和草铵膦除草剂处理以选择对麦草畏和草铵膦除草剂耐受的植物。或者，可以使用诊断方法来分析这些后代植物以选择含有事件 MON88701DNA 的后代植物。在这种方法的实施中，将一种植物与自身有性杂交（即自花授粉）的步骤可以通过人为干预来实现或促进，例如：通过人手收集植物的花粉并将该花粉与同一植物的花柱或柱头相接触，然后任选地防止所述植物的进一步受精；通过人手和 / 或行动来移除、破坏或覆盖附近其他植物的雄蕊或花药（例如通过去雄或通过施用化学杀配子剂）以使得天然的异花授粉被阻止，因而为了发生受精必须进行自花授粉；通过在用于“定向授粉”的位置中人工放置授粉昆虫（例如通过将植物单独地与授粉昆虫笼养在一起）；通过花或其部分的人工操作以允许自花授粉；通过植物的选择性放置（例如将植物故意种植在授粉距离之外）；和 / 或通过施用化学物质以促使开花或促进（柱头对花粉的）感受性。

[0073] 这些方法所涵盖的和通过使用这些方法生产的后代棉花植物和种子与其他棉花植物不同，这是由于例如所述后代棉花植物和种子：是重组的并且因此通过人为干预产生；

是麦草畏和草铵膦除草剂耐受的；含有至少一个由本发明的转基因 DNA 构成的等位基因；和 / 或含有可检测量的包含选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子。可以从单个后代植物选择种子，并且只要所述种子包含具有选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子，它将在本发明的范围之内。

[0074] 在本发明的实施中，可以将两种不同的转基因植物杂交以产生含有两个独立分离的异源基因的杂种后代。适合的后代的自交可以产生对两个基因纯合的植物。还设想了与亲本植物的回交和与非转基因植物的异交，以及无性繁殖。通常用于不同性状和作物的其他方法的描述可以在几篇文献之一中找到，例如 Feh, *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. 主编, American Society of Agronomy, Madison WI (1987)。

[0075] 在本文公开的方法中使用的植物和种子也可以含有一个或多个另外的转基因。这样的转基因可以是编码赋予所需性状的蛋白质或 RNA 分子的任何核苷酸序列，所述性状包括但不限于提高的抗虫性、提高的水利用效率、提高的产量性能、提高的抗旱性、提高的种子品质、提高的营养品质和 / 或提高的除草剂耐受性，其中所述所需性状相对于缺少这样的另外的转基因的棉花植物测定。

[0076] 因此，本发明的方法除了其他用途之外，可用于控制田间杂草而同时生长植物（其目的在于生产包含棉花事件 MON88701 的种子和 / 或植物部分用于农业或研究目的），选择包含棉花事件 MON88701 的后代用于植物育种或研究目的，以及生产含有棉花事件 MON88701 的后代植物和种子。

[0077] 本发明的植物、后代、种子、植物细胞、植物部分（例如花粉、胚珠、荚、花、根或茎组织和叶）和商品可评估其 DNA 组成、基因表达和 / 或蛋白质表达。这样的评估可以通过使用任何标准方法来进行，例如 PCR、northern 印迹、southern 分析、western 印迹、免疫沉淀和 ELISA，或使用本文中提供的检测方法和 / 或检测试剂盒。

[0078] 提供了检测样品中源自于包含棉花事件 MON88701 的棉花细胞、组织、种子或植物的 DNA 的存在的方法。一种方法由下述步骤构成：(i) 从至少一个棉花细胞、组织、种子或植物提取 DNA 样品，(ii) 将所述 DNA 样品与能够在适合于 DNA 测序的条件下产生事件 MON88701DNA 特异性的 DNA 序列的至少一个引物相接触，(iii) 进行 DNA 测序反应，然后 (iv) 证实所述核苷酸序列包含事件 MON88701 特异性的核苷酸序列，例如选自 SEQ ID NO :1—10 的一个核苷酸序列。另一种方法由下述步骤构成：(i) 从至少一个棉花细胞、组织、种子或植物提取 DNA 样品，(ii) 将所述 DNA 样品与能够在适合于 DNA 扩增的条件下产生事件 MON88701DNA 的扩增子的引物对相接触，(iii) 进行 DNA 扩增反应，然后 (iv) 检测所述扩增子分子和 / 或证实所述扩增子的核苷酸序列包含事件 MON88701 特异性的核苷酸序列，例如选自 SEQ ID NO :1—10 的一个核苷酸序列。扩增子应该是对事件 MON88701 特异性的扩增子，例如包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的扩增子。扩增子中对事件 MON88701 特异性的核苷酸序列的检测对于样品中棉花事件 MON88701 特异性 DNA 的存在是确定性的和 / 或诊断性的。能够在适合于 DNA 扩增的条件下产生事件 MON88701DNA 的扩增子的引物对的实例以 SEQ ID NO :11—12 提供。其他引物对可以由本领域技术人员容易地设计，并且应该包含 SEQ ID NO :10 的至少一个片段。检测样品中源自于包含棉花事件 MON88701 的棉花细胞、组织、种子或植物的 DNA 的存在的另一种方法由下述步骤构成：(i) 从至少一个棉花细胞、组织、种子或植物提取 DNA 样品，(ii) 将所述 DNA 样品与对事件 MON88701DNA 特

异性的 DNA 探针相接触, (iii) 允许所述探针和 DNA 样品在严格杂交条件下杂交, 然后 (iv) 检测所述探针与靶 DNA 样品之间的杂交。对事件 MON88701 DNA 特异性的 DNA 探针的序列的实例以 SEQ ID NO :13 提供。其他探针可以由本领域技术人员容易地设计, 并且将包含 SEQ ID NO :10 的至少一个片段。检测到探针与 DNA 样品的杂交对样品中棉花事件 MON88701 特异性 DNA 的存在是诊断性的。或者, 不存在杂交对样品中棉花事件 MON88701 特异性 DNA 的不存在是诊断性的。

[0079] 提供了 DNA 检测试剂盒, 其可用于鉴定样品中的棉花事件 MON88701 DNA, 并且也可以应用于含有适宜的事件 DNA 的棉花植物的育种方法。这样的试剂盒含有包含 SEQ ID NO : 1—10 的片段的 DNA 引物和 / 或探针。这样的试剂盒的一个实例包含具有 SEQ ID NO :10 的足够长度的连续核苷酸的至少一个 DNA 分子, 以起到可用于检测样品中源自于包含事件 MON88701 的转基因棉花植物的 DNA 的存在和 / 或不存在的 DNA 探针的作用。所述源自于包含事件 MON88701 的转基因棉花植物的 DNA 包含具有选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子。提供了足以用作 DNA 探针的 DNA 分子, 其可用于确定、检测或诊断样品中棉花事件 MON88701 DNA 的存在和 / 或不存在的, 并以 SEQ ID NO :13 提供。其他探针可以由本领域技术人员容易地设计, 并且应该包含 SEQ ID NO :10 的至少 15 个连续核苷酸和对于棉花事件 MON88701 DNA 足够独特, 以便鉴定源自于所述事件的 DNA。另一种类型的试剂盒包含可用于产生扩增子的引物对, 所述扩增子可用于检测样品中源自于转基因棉花事件 MON88701 的 DNA 的存在和 / 或不存在的。这样的试剂盒将利用包含下列步骤的方法: 将靶 DNA 样品与本文中所描述的引物对接触, 然后进行足以产生包含具有选自 SEQ ID NO :1—10 的至少一个序列的 DNA 分子的扩增子的核酸扩增反应, 然后检测所述扩增子的存在和 / 或不存在的。这样的方法还可以包括对扩增子或其片段进行测序, 其对靶 DNA 样品中棉花事件 MON88701 特异性 DNA 的存在是确定性的, 即诊断靶 DNA 样品中棉花事件 MON88701 特异性 DNA 的存在。其他引物对可以由本领域技术人员容易地设计, 并且应该包含 SEQ ID NO :10 的至少 15 个连续核苷酸和对棉花事件 MON88701 DNA 足够独特以便鉴定源自于所述事件的 DNA。

[0080] 核酸扩增可以通过本领域已知的各种核酸扩增方法中的任一种来进行, 包括热扩增方法。在本领域中已知许多用于对通过这些方法产生的扩增子进行检测、定量和 / 或测序的技术。可用于实施本发明的一种示例性技术是 **TAQMAN®** (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)。

[0081] 本发明的试剂盒和检测方法除了其他方面之外, 可用于鉴定棉花事件 MON88701, 选择包含棉花事件 MON88701 的植物品种或杂种, 检测样品中源自于包含事件 MON88701 的转基因棉花植物的 DNA 的存在, 以及监测样品中包含事件 MON88701 的棉花植物或源自于包含事件 MON88701 的棉花植物的植物部分的存在和 / 或不存在的。

[0082] 来自于棉花事件 MON88701 的异源 DNA 插入片段的序列、接合序列或侧翼序列可以通过使用源自于本文提供的序列的引物扩增这样的来自于事件的序列, 然后对扩增子或克隆的 DNA 进行标准 DNA 测序来验证 (以及如果需要的话进行校正)。

[0083] 当在本文中使用时, 术语“包含”意味着“包括但不限于”。

[0084] 包含了下面的实施例以阐明本发明的某些优选实施方式的实例。本领域技术人员应该认识到, 在后面的实施例中公开的技术代表了本发明人发现在本发明的实施中表现良好且因此可以被认为构成其优选实施方式的实例的方式。然而, 根据本公开, 本领域技术人

员应该认识到,可以在所公开的特定实施方式中做出许多改变并仍获得类似或相似结果而不背离本发明的精神和范围。

实施例

[0085] 实施例 1 :棉花的转化和 MON88701 事件选择

[0086] 本实施例描述了事件 MON88701 的产生、分析和选择。概括来说,在许多年间,通过最终选择商品化事件(即 MON88701 事件)所需的严格的分子、表型和田间试验,产生并分析了数千个单个植物。

[0087] 耐受麦草畏和草铵膦的转基因棉花事件 MON88701 利用包含图 1 中示出的表达盒的植物转化载体,通过土壤杆菌介导的棉花下胚轴组织的转化来产生。用于转化棉花的方法在本领域中是已知的。为了产生 MON88701 事件,将 Coker130 棉花材料(Asgrow, St Louis, MO)用于植物转化。将棉花细胞转化并再生成完整棉花植物。选择具有正常表型特征的生根植物,并将其转移至土壤进行生长和进一步评估。

[0088] 将 R0 植物转移至土壤,并以麦草畏和草铵膦两者 1X 或 2X 的田间施用率(即 0.5 或 1.01b / 英亩的活性成分)进行除草剂筛选。随后,鉴定并选择仅含单一 T-DNA 表达盒的 R0 植物。T-DNA 表达盒含有带有重复增强子区域的花生褪绿条纹病毒(PCISV)启动子(P-PCISV.FLt-enh);其可操作地与源自于烟草蚀纹病毒的 RNA 转录本的 DNA 前导序列(L-TEV)连接;可操作地与编码来自于拟南芥的 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)的叶绿体转运肽的 N-端叶绿体转运肽的 DNA 分子(TS-CTP2)连接;可操作地与编码来自于嗜麦芽窄食单胞菌的麦草畏单加氧酶的 DNA 分子(DMO)连接;可操作地与源自于海岛棉的纤维蛋白 E6 基因的 3' UTR DNA 分子(T-Gb.E6-3b)连接;可操作地与来自于花椰菜花叶病毒的增强 35S RNA 转录本(具有重复的增强子区域)的启动子(P-CaMV.35S-enh)连接;可操作地与源自于矮牵牛(Petunia hybrid)热休克蛋白 70(HSP70)基因的 5' 非翻译区的 DNA 前导序列(L-Ph.DnaK)连接;可操作地与编码草丁膦乙酰转移酶(PAT)的来自吸水链霉菌的双丙氨酸抗性(bar)基因(CR-Sh.bar)连接;可操作地与来自于根癌土壤杆菌(Agrobacterium tumefaciens)胭脂氨酸合酶(NOS)基因(其指导 mRNA 的多腺苷化)的 3' 非翻译区(T-AGRtu.nos)连接。

[0089] 根据表型特征(包括对麦草畏和草铵膦除草剂两者的商用水平的耐受性)、分子特征(使用全面的分子谱分析来确定)和单倍型相关性的优越组合从约 151 个单个转基因事件中选择 MON88701 事件。从原始的 151 个转基因事件中选择 MON88701 事件是耗时多年的过程,其每一步都需要数据分析。进行两波转化事件以允许从更大量的事件中选择最终的商业化事件。表 1 提供了每种类型的分析的概述以及事件筛选的每一步所选择和推进至下一步的事件数量。第 2 波的波多黎各田间试验效能筛选在第一次美国田间试验之前进行。

[0090] 表 1

[0091]

| 事件筛选分析步骤 | 第 1 波 | 第 2 波 |
|------------|-------|-------|
| RO- 转化质量分析 | 48 | 103 |

| | | |
|--------------|----|-------|
| RO- 除草剂效力分析 | 26 | 57 |
| R1- 农学种子生产 | 9 | 26 |
| R1- 除草剂效力分析 | 9 | 23 |
| 第一次美国田间试验 | 8 | 10 |
| 初步分子分析 | 4 | 19 |
| 波多黎各田间试验效能筛选 | 3 | 17 |
| 第二次美国田间试验 | 2 | n / d |
| 详细分子分析 | 1 | 6 |

[0092]

[0093] 使用分析技术（转化质量分析，包括 TaqMan 和 / 或 PCR 分析）和 RO 除草剂效力分析（除草剂喷洒）的组合对原始的 151 个转基因 RO 事件进行分析。然后将选出的含有 RO 事件的植物自花授粉以产生 R1 种子，然后将 32 个事件推进到下一步进行 R1 除草剂效力分析。

[0094] 在通过农学和效能田间试验的事件上完成详细分子分析。使用 Northern 印迹证实从测试事件的种子制备的样品中存在 dmo 和 bar 信使 RNA 转录本。进行 Western 印迹来证实从测试事件的叶组织制备的样品中存在单一 DMO 和 PAT 蛋白质条带。分离、纯化的 PAT 蛋白的 N- 端测序显示 PAT 蛋白 N- 端的预期氨基酸序列。分离、纯化的 DMO 蛋白的 N- 端测序显示在 DMO 蛋白的 N- 端存在的来自于 CTP (TS—CTP2) 的 9 个氨基酸。

[0095] 农学田间试验包括将配对的阳性等同系 (isoline) 和阴性等同系事件（分别含有转基因盒和不含转基因盒）与每块地两行野生型（非转基因）Coker130 并排种植。在试验期间，使用常规控制程序维持样地无杂草和昆虫。收集的数据包括种植日期、植物群丛计数、植物高度、节数、农学 / 表型总体差异、棉铃样品、收获日期和产量。每块地的植物群丛计数在种植后 10 天 (DAP) 获取，并在 20DAP 时再次获取。完全脱离土壤的子叶被认为是“萌发的”。记录在植物密度方面的任何差异，即由硬结、冲刷等造成的漏过、萌发不良、损失。最终的植物群丛平均每米具有 10 株植物。在第一次开花加两周 (FF2) 时进行植物高度测量。记录每块地 5 株植物的植物高度平均测量值 (cm)。在用于植物高度测量的相同植物上对节数进行计数（子叶为节 0）。记录任何总体农学差异，例如叶形态、分枝习性、叶颜色、开花时间、结果模式等。从来自于植物中间 (8—12 节) 的 50 个第一位棉铃（仅仅籽棉）随机收获棉铃样品。使用棉铃样品来计算棉绒分数和纤维质量。对于产量测定，在收获前对地块进行去叶并使用棉铃开棉剂（使用乙烯磷，即 PREP）。对地块进行收获并记录为每块地磅数的籽棉，并表示成每英亩的籽棉磅数。对于两年的农田试验来说，在阳性等同系事件、配对的阴性等同系事件和野生型 Coker130 棉花之间没有显著的产量差异（图 2）。

[0096] 在第 1 年中，与非转基因野生型 Coker130 相比，使用 8 个事件进行效能测试。对于该测试来说，将成对的地块用麦草畏（Clarity®，BASF, Research Triangle Park, NC）

和单铵磷 (**Ignite®**, Bayer CropScience, Research Triangle Park, NC) 喷洒或保持不喷洒。在试验期间使用常规控制程序维持地块无杂草和昆虫。所有除草剂处理表示成每英亩的活性成分磅数 (lb / A)。对于喷洒过的地块, 进行下面的施用: 出土前以 11b / A 施用麦草畏, 然后在 2 节阶段以 1.091b / A 施用草铵磷, 然后在 5 节阶段以 11b / A 施用麦草畏, 然后在 8 节阶段以 1.091b / A 施用草铵磷, 然后在 12 节阶段以 11b / A 施用麦草畏。麦草畏或草铵磷都不与表面活性剂、肥料添加剂或其他助剂一起施用。在下述阶段 (其在即将进行下一指定的除草剂施用之前) 获取损伤评级: 在 2- 节棉花阶段, 对偏上性 (麦草畏损害) 百分率和总损伤百分率进行评级行动, 重点在于偏上性; 在 5- 节阶段, 对偏上性百分率、灼伤或坏死 (草铵磷损伤) 百分率和总损伤百分率进行评级行动, 重点在于坏死; 在 8- 节阶段, 对偏上性百分率、灼伤或坏死百分率和总损伤百分率进行评级行动, 重点在于偏上性; 在 12- 节阶段, 对偏上性百分率、灼伤或坏死百分率和总损伤百分率进行评级行动, 重点在于坏死; 在开花中期, 对偏上性百分率、灼伤或坏死百分率和总损伤百分率进行评级行动, 重点在于偏上性; 并且对于开花后期, 对偏上性百分率、灼伤或坏死百分率和总损伤百分率进行评级行动。在这些效能田间试验中收集的其他农学数据包括: 种植日期, 植物群丛计数 (在 7 和 14DAP 时获取), 农学 / 表型总体差异, 收获日期和产量。损伤评级使用标准的杂草科学百分量表, 其中 0% 等于没有作物损伤, 100% 等于作物完全死亡。对麦草畏损伤进行的评级被称为偏上性, 并表现为扭曲、生长畸形。对草铵磷损伤进行的评级被称为灼伤或坏死, 并表现为褪绿或坏死。对于产量测定来说, 在收获前对地块去叶并使用棉铃开棉剂 (使用乙烯磷, 即 PREP)。对地块进行收获并且产量记录为每地块的籽棉磅数, 并表示成籽棉的 lb / 英亩。农学 / 表型差异被记录为结果情况正常或不正常。与未喷洒的野生型 Coker130 相比, 在成对的喷洒和未喷洒事件之间不存在籽棉产量的显著差异 (图 3)。野生型 Coker130 在所述喷洒方案下不能存活 (图 7)。

[0097] 在第 2 年中, 与非转基因野生型 Coker130 相比, 使用 12 个事件进行效能测试。对于该测试来说, 成对的地块进行喷洒或不喷洒。在试验期间使用常规控制程序维持地块无杂草和昆虫。对于喷洒过的地块, 进行下面的处理施用: (1) 在 PRE、早 POST、中 POST 和晚 POST 施用 0.51b / A 麦草畏; (2) 在 PRE、早 POST、中 POST 和晚 POST 施用 11b / A 麦草畏; (3) 在 PRE、早 POST、中 POST 和晚 POST 施用 21b / A 麦草畏; (4) 在早 POST、中 POST 和晚 POST 施用 0.51b / A 草铵磷; (5) 在早 POST、中 POST 和晚 POST 施用 11b / A 草铵磷; (6) 在早 POST、中 POST 和晚 POST 施用 21b / A 草铵磷; 以及 (7) 对照 (未喷洒)。出土前 (PRE) 被定义为在棉花种植后立刻 (24 小时内); 早 POST 被定义为 2- 节棉; 中 POST 被定义为 8- 节棉; 并且晚 POST 被定义为 14 节棉。对于这些效能田间试验来说, 存在完全由野生型棉花 (Coker130) 构成的 3 个地块。在每个出土后时间点 (早、中、晚), 将地块的一半以 1X 比率 (0.51b / A) 的麦草畏喷洒, 将同一地块的另一半用 1X 比率 (0.51b / A) 的草铵磷喷洒。3 个地块各自在出土后定时喷洒施用 (早、中、晚) 之一时接受麦草畏和草铵磷喷洒。

[0098] 喷洒方案包括以每英亩 10 加仑的水量, 使用下述喷雾器设置来施用除草剂 (其在用于大多数杂草科学研究的标准之内)。使用具有 80° 喷射角的 XR **TeeJet®** 广范围扁平喷头 (TeeJet Technologies, Wheaton, IL)。每行存在 2 个喷嘴 (喷嘴间距对于 30” 的行来说为 15”, 对于 38” 的行来说为 19”, 和对于 40” 的行来说为 20”)。喷嘴尺寸取决于喷雾

器速度和喷嘴间隔 ;然而,将喷嘴尺寸选择成产生 25 至 35PSI 的喷洒压力。调整动臂高度以允许 50%的喷洒重叠(其在高于作物顶部约 30”时发生)。

[0099] 在每次评级时间点时,记录下列观察:1) 受影响最大的叶的坏死或烧灼百分率;2) 整株植物的坏死或烧灼百分率;3) 偏上性;以及 4) 观察到的任何其它相关损伤。评级在每次施用后 4 天并在即将进行后续施用之前进行。评级计划时间和目的如下:1) 出土后 4—7 天进行,并在即将 2- 节喷洒之前再次进行,以检测麦草畏喷洒的出土前效果;2) 2- 节喷洒后 4 天进行,并在即将 8- 节喷洒之前再次进行,以确定 2- 节喷洒的评级;3) 8- 节喷洒后 4 天进行,并在即将 14- 节喷洒之前再次进行,以确定 8- 节喷洒的评级;4) 14- 节喷洒后 4 天进行,并在 14- 节喷洒后 10 天再次进行,以确定 14- 节喷洒的评级;以及 5) 在截止时进行,以确定所有喷洒的净效应的晚期季评级。损伤评级使用标准的杂草科学百分量表,其中 0%等于没有作物损伤,100%等于作物完全死亡。对麦草畏损伤进行的评级被称为偏上性,并表现为扭曲、生长畸形。对草铵膦损伤进行的评级被称为灼伤或坏死,并表现为褪绿或坏死。对于产量测定来说,在收获前对地块去叶并使用棉铃开棉剂(使用乙烯磷,即 PREP)。对地块进行收获并记录为每地块磅数的籽棉,并表示成 lb / 英亩的籽棉。野生型 Coker130 植物不能在除草剂喷洒下存活,因此没有记录 Coker130 地块的产量。正如在图 4. A 中看到的,对于包含 MON88701 事件并具有增加的麦草畏除草剂施用比率的植物来说,产量几乎是等同的。正如在图 4. B 中看到的,对于包含 MON88701 事件并具有增加的草铵膦除草剂施用比率的植物来说,产量几乎是等同的。对于损伤评级来说,图 5. A 显示出随着麦草畏施用比率的增加,对包含 MON88701 事件的植物的损伤百分率增加。图 5. B 显示出随着草铵膦施用比率的增加,对包含 MON88701 事件的植物的损伤百分率增加。

[0100] 在第 3 年中,进行事件 MON88701 的效能田间测试以研究麦草畏和 / 或草铵膦施用的比率和时机。在试验期间,使用常规控制程序维持地块无杂草和昆虫。处理和施用时机详述在表 2 中。麦草畏或草铵膦都不与表面活性剂、肥料添加剂或其他助剂一起施用。喷雾器方案如对第 2 年效能田间试验所描述的。植物群丛评定、可视损伤评级(偏上性百分率、坏死百分率)、植物高度和节数、50 个棉铃采样和产量的确定如以上对农学和效能田间试验所述。

[0101] 表 2

[0102]

| 处 理 | 比率 (lb ai/A) | 施用时间安排 | | | |
|--------|-----------------|---------|---------|-----------|-----------|
| | | 1 至 3 节 | 5 至 7 节 | 10 至 12 节 | 15 至 18 节 |
| 1 | 0.5 | 麦草畏 | 草铵膦 | 麦草畏 | 草铵膦 |
| 2 | 1 | 麦草畏 | 草铵膦 | 麦草畏 | 草铵膦 |
| 3 | 0.5 | 草铵膦 | 麦草畏 | 草铵膦 | 麦草畏 |
| 4 | 1 | 草铵膦 | 麦草畏 | 草铵膦 | 麦草畏 |
| 5 | 0.25* | 罐混合物 | 罐混合物 | 罐混合物 | 罐混合物 |
| 6 | 0.5* | 罐混合物 | 罐混合物 | 罐混合物 | 罐混合物 |
| 7 | 1* | 罐混合物 | 罐混合物 | 罐混合物 | 罐混合物 |
| 8 | 0.5 | 麦草畏 | 麦草畏 | 麦草畏 | 麦草畏 |
| 9 | 1 | 麦草畏 | 麦草畏 | 麦草畏 | 麦草畏 |
| 10 | 0.5 | 草铵膦 | 草铵膦 | 草铵膦 | 草铵膦 |
| 11 | 1 | 草铵膦 | 草铵膦 | 草铵膦 | 草铵膦 |
| 12 | - | 对照 | - | - | - |

*使用罐混合物时, 所示比率是单个除草剂所使用的比率: 0.25 = 0.25 lb/A 麦草畏 + 0.25 lb /A 草铵膦。

[0103] 当将麦草畏和草铵膦进行罐混并在生长季中以每次 11b / 英亩的量施用 4 次时, 产量略微下降 (图 6)。对于所有其他处理方案来说, 当用麦草畏、草铵膦或麦草畏和草铵膦喷洒时, 包含 MON88701 事件的植物没有产量损失 (图 6)。

[0104] 实施例 2 :MON88701DNA 序列的表征

[0105] 本实施例描述了 MON88701 事件的分子表征。通过详细的分子分析对插入到包含 MON88701 的棉花植物的基因组中的 DNA 和该插入片段侧翼的基因组序列进行表征。这些分析包括: 掺入片段序列、插入数目 (棉花基因组内整合位点的数量)、拷贝数 (一个基因座内转基因 DNA 的拷贝数)、插入的基因盒的完整性、侧翼序列以及插入与棉花基因组的单倍型区域的关联性。

[0106] 使用包括植物表达盒的完整编码区及其相应的调控元件、启动子、内含子和多腺苷化序列的分子 DNA 探针。分析显示, MON88701 含有单一转基因 DNA 插入, 其具有表达盒的一个拷贝。进行反向 PCR 和 DNA 序列分析以确定插入片段 - 植物基因组的 5' 和 3' 接合部, 证实插入片段内元件的组织 (图 1), 并确定包含事件 MON88701 的棉花植物中插入片段的完整 DNA 序列 (在本文中提供为 SEQ ID NO :9)。在基因组中包含图 1 中示出的连接的转基因遗传元件并且对麦草畏和草铵膦除草剂抗性的棉花植物是本发明的一个方面。

[0107] 使用如 Ochman 等 1990 (PCR Protocols :A guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc.) 中所描述的反向 PCR 和 / 或基因组步移技术来测定 MON88701 中转基因 DNA 插入侧翼的序列。从 Coker130 和转基因棉花株系两者, 从在标准温室条件下生长

的组织分离植物基因组 DNA。将约 0.2 克幼叶组织冻干,并通过加入几颗小钢珠然后剧烈搅拌将其粉化。将组织用 5mL100% 甲醇洗涤两次,然后用 5mL50% 甲醇洗涤一次以除去干扰性酚化合物。通过加入 7mL CTAB 提取缓冲液(100mM Tris pH8.0,1.4M NaCl,20mM EDTA,2% w / v 十六基三甲基溴化铵,1% w / v 聚乙烯基吡咯烷酮,1% w / v 聚(乙烯基吡咯烷酮),0.07% β -巯基乙醇,1mM DTT)来提取 DNA。将样品在 65°C 温育 45min 以完全裂解细胞,然后以 3000g 离心 5min 以除去不溶性碎片。将上清液用 7mL 氯仿异戊醇 24:1 萃取,以 3000g 离心 5min 以分离两相,并在新试管中通过加入 6mL 异丙醇从水相提取 DNA。将 DNA 沉淀物用 6mL70% 乙醇洗涤以除去任何盐类,并将沉淀物风干。将 DNA 沉淀物重悬浮在含有 0.5ug / mL 无 DNase 的 RNase 的 10mM Tris pH8.0 中,并在 37°C 温育 1 小时。在处理,使用 Quant-iT™ **PicoGreen®** (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) 来定量 DNA。本领域技术人员可以对这种方法进行改进以从棉花的任何组织提取 DNA。将 DNA 的等分试样用根据转入基因 DNA 的限制性分析所选择的限制性内切核酸酶消化。在限制性片段自连接后,使用从转基因 DNA 序列设计的引物进行 PCR,其将扩增从转基因 DNA 的 5' 和 3' 末端向外延伸的序列。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离,并使用 QIAGEN 凝胶纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 来纯化。随后使用标准的 DNA 测序方案对 DNA 产物进行直接测序。延伸到表达盒转基因 DNA 的右侧边界序列中的 5' 侧翼序列被显示为 SEQ ID NO :7 ([C], 参见图 1)。延伸到表达盒转基因 DNA 的左侧边界序列中的 3' 侧翼序列被显示为 SEQ ID NO :8 ([D], 参见图 1)。完全整合到 Coker 基因组 DNA 中的表达盒 DNA 部分显示为 SEQ ID NO :9 ([E], 参见图 1)。

[0108] 将分离的 DNA 分子序列与转基因 DNA 序列进行比较以确定侧翼序列和共分离的转基因 DNA 片段。表达盒存在的证实通过使用根据推演的侧翼序列数据和已知的转基因 DNA 序列设计的引物进行 PCR 来实现。使用从 MON88701 中的侧翼序列设计的引物分离与在被转化株系中转基因 DNA 整合于其中的同一区域相对应的野生型序列。PCR 反应使用 **Phusion®** 高保真 PCR Master Mix 和 HF 缓冲液 (New England Biolabs, Ipswich, MA) 来进行。将 MON88701 中的侧翼 DNA 序列和 Coker 野生型序列针对多个核苷酸和蛋白质数据库进行分析。使用这一信息来检验转基因与植物基因组的关系并寻找插入位点完整性。使用侧翼序列和野生型序列来设计用于鉴定事件的 **TAQMAN®** 终点分析的引物。使用这一信息来开发接合性分析方法。

[0109] 在包含事件 MON88701 的棉花植物中,麦草畏和草铵膦耐受性转基因盒被定位于染色体 A08 上 19.3cM 的图位处,左侧以 18.6cM 图位处的 NG0207927 为界和右侧以 20.0cM 图位处的 NG0207529 为界。

[0110] 实施例 3:事件特异性终点 **TAQMAN®** 测定法

[0111] 本实施例描述了被开发用于在样品中鉴定事件 MON88701 的事件特异性终点 **TAQMAN®** 热扩增方法。可用于事件 MON88701 特异性终点 **TAQMAN®** 方法的条件的实例如下:第 1 步:用 18 兆欧姆的水调整以获得 10 μ l 的终体积。第 2 步:5.0 μ l 的 2X Universal Master Mix (dNTP、酶、缓冲液) 至 1X 终浓度。第 3 步:0.5 μ l 事件引物 -1 (SQ21654) 和事件引物 -2 (SQ23205)。混合(重悬浮在 18 兆欧姆的水中至每种引物的浓度为 20uM) 至 1.0 μ M 终浓度(例如在微量离心管中,应该加入下列物质以获得终浓度

20 μ M 的 500 μ l :100 μ l 浓度 100 μ M 的引物 SQ21654 ;100 μ l 浓度 100 μ M 的引物 SQ23205 ; 300 μ l 18 兆欧姆的水)。第 4 步 :0.2 μ l 事件 6-FAMTMMGB 探针 PB10280 (重悬浮在 18 兆欧姆的水中至浓度为 10 μ M), 至终浓度为 0.2 μ M。第 5 步 :0.5 μ l 内部对照引物 -1 和内部对照引物 -2 混合物 (重悬浮在 18 兆欧姆的水中至各引物的浓度为 20 μ M) 至终浓度为 1.0 μ M。第 6 步 :0.2 μ l 内部对照 VICTM 探针至 0.2 μ M 终浓度 (重悬浮在 18 兆欧姆的水中至浓度为 10 μ M)。第 7 步 :对于各样品 3.0 μ l 提取的 DNA (模板), 所述样品包括下列样品各一 :1. 待分析的叶样品 ;2. 阴性对照 (非转基因 DNA) ;3. 阴性水对照 (无模板) ;4. 阳性对照 MON88701DNA。第 8 步 :热循环仪条件如下 :50 $^{\circ}$ C 下 2 分钟, 一个循环 ;95 $^{\circ}$ C 下 10 分钟, 一个循环 ;95 $^{\circ}$ C 下 15 秒然后 64 $^{\circ}$ C 下 1 分钟并且 -1 $^{\circ}$ C / 循环, 共 10 个循环 ;95 $^{\circ}$ C 下 15 秒然后 54 $^{\circ}$ C 下 1 分钟, 共 30 个循环, 任选地另外 10 至 20 个循环 (95 $^{\circ}$ C 下 15 秒然后 64 $^{\circ}$ C 下 1 分钟 (-1 $^{\circ}$ C / 循环) 可能在终点 TaqMan[®] 分析期间提供更明显的群体分离) ;10 $^{\circ}$ C 的最终循环。

[0112] 在终点分析中使用的 DNA 引物是引物 SQ21654 (SEQ ID NO :11)、SQ23205 (SEQ ID NO :12) 和 6-FAMTM 标记的探针 PB10280 (SEQ ID NO :13)。6-FAMTM 是连接于 DNA 探针的 Applied Biosystems (Foster City, CA) 的荧光染料产品。对于 TAQMAN[®] MGBTM 探针来说, Taq DNA 聚合酶的 5' 外切核酸酶活性在荧光团与淬灭剂之间从 5' - 末端切除探针。当杂交于靶 DNA 链时, 淬灭剂和荧光团足够地分开以产生荧光信号, 从而释放荧光。SQ21654 (SEQ ID NO :11) 和 SQ23205 (SEQ ID NO :12) 当与 PB10280 (SEQ ID NO :13) 一起用于这些反应方法时, 产生诊断事件 MON88701DNA 的 DNA 扩增子。这种分析的对照包括来自于含有事件 MON88701DNA 的棉花的阳性对照、来自于非转基因棉花的阴性对照和不含模板 DNA 的阴性对照。此外, 用于 PCR 反应的对照包括对棉属基因组中的单拷贝基因特异性的内部对照引物和内部对照探针。本领域技术人员将知道如何设计对棉属基因组中的单拷贝基因特异性的引物。对这些分析方法进行优化以用于 Applied Biosystems GeneAmp[®] PCR System9700 (以最大速度运行) 或 MJ Research DNA Engine PTC-225 热循环仪。本领域技术人员已知的产生鉴定事件 MON88701DNA 的扩增子的其他方法和装置在本领域的技术范围之内。

[0113] 显示出存在表达盒的 R0 植物允许发育成完全成熟的植物并从中收获种子。使用基于表达盒的序列的探针, 使用 Southern 分析和终点 TAQMAN[®] 的组合来确定 R1 植物中转基因表达盒的拷贝数。

[0114] 接合性分析可用于确定包含事件的植物对事件 DNA 是纯合的 (也就是说在染色体对各条染色体的相同位置中包含该外源 DNA), 对事件 DNA 是杂合的 (也就是说只在染色体对的一条染色体上包含外源 DNA) ;还是对事件 DNA 是空的 (即野生型)。还使用终点 TAQMAN[®] 热扩增方法来开发用于事件 MON88701 的接合性分析。本实施例描述了被开发用于确定样品中事件 MON88701 的接合性的事件特异性终点 TAQMAN[®] 热扩增方法。对于这种分析来说, 使用三引物测定法, 其中引物 SQ21654 杂交插入的外源 DNA 和基因组 DNA 的 3' 接合部并从其特异性延伸, 引物 SQ23205 杂交插入的外源 DNA 的 3' 侧的侧翼 DNA 并从其特异性延伸, 且引物 SQ23901 杂交其中整合有插入的外源 DNA 的基因组 DNA 并从其特异性延伸。这三种引物用于诊断事件。在本实施例中, 当存在插入的外源 DNA 的拷

贝时,引物 SQ21654 和引物 SQ23205 及 6-FAMTM 标记的寡核苷酸探针 PB10280 是诊断性的。在本实施例中,当在基因组 DNA 中不存在插入的外源 DNA 的拷贝(即野生型)时,SQ23205 和引物 SQ23901 及 VICTM 标记的寡核苷酸探针 PB10631 是诊断性的。当三种引物和两种探针在 PCR 反应中与从对事件 MON88701 纯合的植物提取的 DNA 混合在一起时,只存在来自于 6-FAMTM 标记的寡核苷酸探针 PB10280 的荧光信号,其指示并诊断对事件 MON88701 纯合的植物。当三种引物和两种探针在 PCR 反应中与从对事件 MON88701 杂合的植物提取的 DNA 混合在一起时,存在来自于 6-FAMTM 标记的寡核苷酸探针 PB10280 和 VICTM 标记的寡核苷酸探针 PB10631 两者的荧光信号,其指示并诊断对事件 MON88701 杂合的植物。当三种引物和两种探针在 PCR 反应中与从对事件 MON88701 为空的(即野生型)的植物提取的 DNA 混合在一起时,只存在来自于 VICTM 标记的寡核苷酸探针 PB10631 的荧光信号,其指示并诊断对事件 MON88701 为空的植物,即野生型。可用于这种方法的条件的实例如下。步骤 1:使用 18 兆欧姆的水调整至 10 μ l 的终体积。步骤 2:加入 5.0 μ l 2X Universal Master Mix (Applied Biosystems 目录号 4304437; dNTP、酶、缓冲液)至 1X 终浓度。步骤 3:加入 0.5 μ l 接合性引物 SQ21654、SQ23205 和 SQ23901(各种引物重悬浮在 18 兆欧姆水中至浓度为 20 μ M)至终浓度为 1.0 μ M。步骤 4:加入 0.2 μ l 6-FAMTM 探针 PB10280(重悬浮在 18 兆欧姆水中至浓度为 10 μ M)至 0.2 μ M 终浓度。步骤 5:加入 0.2 μ l VICTM 探针 PB10631(重悬浮在 18 兆欧姆水中至浓度为 10 μ M)至 0.2 μ M 终浓度。步骤 6:对于各样品 3.0 μ l 提取的 DNA(模板),所述样品具有下列各一:1. 待分析的叶样品(4—5ng / μ l 的在水中稀释的基因组 DNA);2. 阴性对照(非转基因棉花 DNA;在水中稀释至 5ng / μ l);3. 阴性水对照(无模板;用于重悬浮 DNA 的溶液);4. 来自于已知杂合样品的阳性对照 MON88701 基因组 DNA(在水中稀释至 5ng / μ l);5. 来自于已知纯合样品的阳性对照 MON88701 基因组 DNA(在水中稀释至 5ng / μ l)。步骤 7:轻柔混合。步骤 8:当使用 Applied Biosystems **GeneAmp**[®] PCR System9700(以最大速度运行)或 MJ Research DNA Engine PTC-225 热循环仪时,热循环仪条件如下:50 $^{\circ}$ C 下 2 分钟,一个循环;95 $^{\circ}$ C 下 10 分钟,一个循环;95 $^{\circ}$ C 下 15 秒然后 64 $^{\circ}$ C 下 1 分钟(-1 $^{\circ}$ C / 循环),共 10 个循环;95 $^{\circ}$ C 下 15 秒然后 54 $^{\circ}$ C 下 1 分钟,共 30 个循环;任选地另外 10 至 20 个循环(95 $^{\circ}$ C 下 15 秒然后 64 $^{\circ}$ C 下 1 分钟(-1 $^{\circ}$ C / 循环)),可能在终点 **TaqMan**[®] 分析期间提供更明显的群体分离;保持在 10 $^{\circ}$ C 下一个循环。

[0115] 实施例 4:在任何棉花育种活动中鉴定事件 MON88701

[0116] 本实施例描述了人们如何可以在任何棉花育种活动的后代中鉴定 MON88701 事件。使用 DNA 事件引物对来产生可用于诊断棉花事件 MON88701 的扩增子。可用于诊断 MON88701 的扩增子包含至少一个以 SEQ ID NO:1—10 提供的序列。产生用于 MON88701 的诊断扩增子的事件引物对包括基于侧翼序列和插入的表达盒的引物对。例如,为了产生其中存在 SEQ ID NO:1 的诊断性扩增子,人们将根据 SEQ ID NO:7 的基因组侧翼序列部分设计正向引物,并根据插入的表达盒 DNA 序列设计反向引物,使得具有足够长度的连续核苷酸的引物特异性杂交于事件 DNA。为了产生其中存在有 SEQ ID NO:2 的诊断扩增子,人们将根据插入的表达盒 DNA 序列设计正向引物,并根据 SEQ ID NO:8 的基因组侧翼序列部分设计反向引物,使得具有足够长度的连续核苷酸的引物特异性杂交于事件 DNA。出于实用目的,人们应该设计产生具有有限尺寸范围例如 100 至 1000 碱基之间的扩增子的引物。一般来说,尺寸更小(更短的多核苷酸长度)的扩增子在 PCR 反应中更可靠地产生,允许更短的循

环时间,并且可以更容易地分离和在琼脂糖凝胶上可视化或适合用于终点TAQMAN®样分析中。较小的扩增子可以通过DNA扩增子检测领域中已知的方法来产生和检测。此外,使用引物对产生的扩增子可以被克隆到载体中、增殖、分离并测序,或者可以使用本领域中确立的方法直接测序。可用在DNA扩增方法中以产生诊断MON88701或包含MON88701的植物或其后代的扩增子的任何引物对是本发明的一个方面。用于这种分析的扩增条件的实例示出在实施例3中。

[0117] 含有事件MON88701的植物组织样品的分析应该包括来自于包含事件MON88701的植物的阳性组织对照、来自于不含事件MON88701的棉花植物(例如但不限于Coker)的阴性对照以及不含棉花基因组DNA的阴性对照。扩增内源性棉花DNA分子的引物对将起到DNA扩增条件的内部对照的作用。DNA扩增方法领域的技术人员可以从SEQ ID NO:10选择另外的引物序列,并且被选择用于通过实施例3中示出的方法产生扩增子的条件可以改变,但是仍产生可用于事件MON88701DNA诊断的扩增子。本发明的一个方面是DNA检测试剂盒,其含有至少一个源自于SEQ ID NO:10的足够长度的连续核苷酸的DNA引物,所述引物在DNA扩增方法中使用产生MON88701的诊断扩增子。

[0118] 包含事件MON88701的棉花种子的代表性样品,已根据布达佩斯公约(Budapest Treaty)保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),其地址为10801University Boulevard,Manassas,Virginia USA,Zip Code20110。包含事件MON88701的种子的ATCC专利保藏物号(登记号)为PTA-11754,保藏日期为2011年3月17日。在申请待决期间,专利和商标事务专员和由事务专员确定的有资格的人在提出请求后可以取用所述保藏物。所述保藏物将在保藏中心维持30年、或最后请求后5年或专利的有效期限,以三者中最长的时间为准,并且在此时期内根据需要进行替换。

[0119] 在已经图示说明并描述了本发明的原理后,对于本领域技术人员来说,显然可以在不背离这些原理的情况下在设置和细节方面进行修改。我们要求保护在随附的权利要求书的精神和范围之内所有修改。

[0001]

序列表

- <110> 孟山都技术公司
Brinker, Ronald J
Burns, Wen C
Feng, Paul C.C.
Kendig, John A
LeClere, Sherry
Lutke, Jennifer Lynn
Malven, Marianne
- <120> 棉花转基因事件MON 88701及其使用方法
- <130> MONS:302WO
- <140> 未知
- <141> 2011-03-13
- <150> 61/469,118
- <151> 2011 03-30
- <160> 15
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列
- <400> 1
taggacatat tctcttaagg 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列
- <400> 2
acatgaagcc ttaattcaat 20
- <210> 3
- <211> 60
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列
- <400> 3
aaccttattt atataaaaat taggacatat tctcttaagg tagccaaagc ccgggcttaa 60
- <210> 4
- <211> 60
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列
- <400> 4
gatccatgta galltcccg acaigaagcc ttaattcaat attggetcta gaacataact 60
- <210> 5
- <211> 100
- <212> DNA

[0002]

| | |
|--|------|
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列 | |
| <400> 5 | |
| gttacaagaa catccttgat aaccttattt atataaaaat taggacatat tctcttaagg | 60 |
| tagccaaagc cgggcttaa ttaaggcgcg cggccaagt | 100 |
| <210> 6 | |
| <211> 100 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列 | |
| <400> 6 | |
| tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc ttaattcaat | 60 |
| attggctcta gaacataact tgtttaacac taaatataag | 100 |
| <210> 7 | |
| <211> 1176 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列 | |
| <400> 7 | |
| cattatataa aaagaaaat tttaatata aaaaaaatat attaaaacag tgaatcaaca | 60 |
| atcatgtctc ttaaatgaa aaaaattatc atttaaaatt ttaattaat aaaagtaaaa | 120 |
| tgaaatkaa acattttacc tgactttaac agtatagata attcaaaagt aaatatgatt | 180 |
| tcttctgatt tttcaaaaca aatttagaga ttataaatgc cattcgtcga tcattttgac | 240 |
| acgaaagatt taagaaaagc aaatgtaacc tttgacatga tgagcataat cacttcaaat | 300 |
| agtatttttt tttatttcca acgtcaatat attgaaatat ttttttatag aataaactat | 360 |
| agcaattttt gccatgatgg ttcaacttat accactatcc ttaaccaata tatttttggt | 420 |
| tagacattag gagttaagtc tgaigtcggg tgttttgttc cttatttatt cagggtgttt | 480 |
| ataattttac ttatgaaaga ggttggtttt tctcaatgca ttctaatat catatataca | 540 |
| catlgatiga gcaaaaaaaa aaaaaactat cctcaaccaa tgtagaagtg agttggttgc | 600 |
| atgatctttt atttgaattt tcaatattga aaaaactaaa accacatgtc ttaatccatc | 660 |
| gtaataatac tgctattatt tgaaaagttg atagcaaata ttacaataga aaatgtagat | 720 |
| ctataagaag aaagtatagc tatgtgaaat ctcatataac taatggtatg attaatgttg | 780 |
| atttatattca aagtgttgat aatctcacat attctttgac aaaagcttta gttagagaaa | 840 |
| aaaatatgga tagtaataat gaggataaga ctaaagccig aacaataata aaaatcaata | 900 |
| ataaggatac ttacataat gattagagat ccaaaaaatt agattcaaaa ggaaaaatga | 960 |
| atacatattt aaaaaatctc tcttttcggt ataataatg taggtataac aataatagaa | 1020 |
| gttgagtata actatactct taatgaggtc cataactagt ttgagtgaat tgcagagtta | 1080 |
| caagaacatc cttgataacc ttatttatat aaaaattagg acatattctc ttaaggtagc | 1140 |
| caaagcccgg gcttaattaa ggcgcgccgg ccaagt | 1176 |
| <210> 8 | |

[0003]

| | | |
|------------|--|------|
| <211> | 1188 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列 | |
| <400> | 8 | |
| tgaccatcat | actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc ttaattcaat | 60 |
| attggctcta | gaacataact tgtttaacac taaatataag ttatgccat tgacatatgt | 120 |
| ataatgcata | actttctatc ttcacttgaa aagagagatt tactttcttc aaaatgtttg | 180 |
| tgtattaatt | tagaagattt aaaccacgag acttgaagat ttaagatat cgatagattc | 240 |
| aagtacactt | tcgcatatat ttatgttct taatgatttg acatgataaa actcggttta | 300 |
| tttagtttta | tattataatt ttatgattgt aaccttaat tgataatgac atgatcaact | 360 |
| attaatttga | caaaatcaaa agaaatagaa accgactttt cattttatgt ttagaatgaa | 420 |
| aaattcagtg | tctaatttag atgagtcaaa tatttattca taattaggtc aggaatatac | 480 |
| ttaattactt | gggtaaccaa aattggagtt tgattttcaa taattagatc aagttagtgt | 540 |
| tttaattact | tataagaaaa ttttaatacc caaattacta atcaaatcta ttagaataaa | 600 |
| attagatgaa | gatagaaaaa ttagctaata tatttaatga aaatttaatt ctaggtattt | 660 |
| actattgatt | gattattctt ttgttagag ttatgtgacc tgaatcccggt ttgatctgat | 720 |
| ctgaaaagtt | cgacgtacaa ttcatttgtc aaataaataa aataaagagg caaaatagga | 780 |
| gatctgtata | ggaclataat tcttcaatla aacattgatt ctaaaagggt tgtttaatcc | 840 |
| ttaaaatgcg | tgtagtcgaa aacctcttgt attgtgattt ttaatatata gtgaatttct | 900 |
| cctctctgt | ccgtgatatt tcccgataag ggtttttcaa ataaaacttg tgtattctta | 960 |
| ttttctttc | ttattgtttt acgatccttc ctattgccat tatcgagta tagtataaca | 1020 |
| cttttaaatc | ttttaaaaat tatattatca attattttta taagttaaaa gaatataagt | 1080 |
| tacaaataat | aatttttata ccatttatea cgaaatatat acttgcgggt acgatatttg | 1140 |
| tccacaaacc | cttaacctcg tgttgagttg tgaacttcag ctatataa | 1188 |
| <210> | 9 | |
| <211> | 4105 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 包含转基因序列的人工DNA序列 | |
| <400> | 9 | |
| tctcttaagg | tagccaaagc cgggcttaa ttaaggcgcg ccggccaagt cgcccgcggc | 60 |
| cgcgtaaca | agcttctgca gaattcgtca acgagatctt gagccaatca aagaggagtg | 120 |
| atgtagacct | aaagcaataa tggagccatg acgtaagggc ttacgcccac acgaaataat | 180 |
| taaaggctga | tgtgacclgt cgglciclca gaacctttac tttttatggt tggcgtgtat | 240 |
| ttttaaattt | ccacggcaat gacgatgtga cccaacgaga tcttgagcca atcaaagagg | 300 |
| agtgatgtag | acctaagca ataatggagc catgacgtaa gggcttacgc ccatacgaaa | 360 |
| taattaaagg | ctgatgtgac ctgtcggtct ctcagaacct ttacttttta tatttggcgt | 420 |
| gtatttttaa | atttccacgg caatgacgat gtgacctgtg catccgcttt gectataaat | 480 |
| aagttttagt | ttgtattgat cgacacggtc gagaagacac ggccattcta gttctcaaca | 540 |

[0004]

| | |
|--|------|
| caacatatac aaaacaaacg aatctcaagc aatcaagcat tctactteta ttgcagcaat | 600 |
| ttaatcatt tcttttaag caaaaagcaat tttctgaaaa tttccacat ttacgaacga | 660 |
| tagccatggc gcaagllagc agaatctgca atgggtgca gaacccatct cttatctcca | 720 |
| atctctcgaa atccagtcaa cgcaaatctc ccttatcggg ttctctgaag acgcagcagc | 780 |
| atccacgagc ttatccgatt tcgtcgtcgt ggggattgaa gaagagtggg atgacgttaa | 840 |
| ttggctctga gcttcgtcct ctttaaggta tgtctctgt ttccacggcg tgcattctca | 900 |
| ctttcgttag aaacgcttgg tacgttctg cacttctga ggagttagc gagaagcctc | 960 |
| taggaagaac taccctgat actccactag ctctctatcg tcaacctgac ggagtgtcgc | 1020 |
| ctgcccctgct tgatatttgt ccgcctcgtc tcgctccggt gagtgacggg attctagtca | 1080 |
| acggacatct ccagtgtcca tatcacggtc tggaaattga cggaggtggc cagtgtgtcc | 1140 |
| acaacccgca cggcaacgga gcccccctg cttctctgaa cgtcgcgata ttccctgtcg | 1200 |
| tggaaagaga cgcattgac tggatctggc ctggagatcc agcactcgca gatcccggcg | 1260 |
| ctatccctga ctttgggtgt cgtgttgatc cagcttaccg tactgtcggg ggttacggtc | 1320 |
| acgtggactg caactacaag ctcttctggg ataacctcat ggatcttggg cacgctcagt | 1380 |
| acgtgcaccg cgtaacgcc caaacagacg ccttcgatag acttgagcgt gaggtgatcg | 1440 |
| ttggcgacgg cgagatccag gcgctcatga agatccctgg tggcacacce tcagttctca | 1500 |
| tggctaagtt cttgcgtggt gctaacacac cagttgacgc ctggaacgac atccgggtgga | 1560 |
| ataaggtgtc ggctatgctg aacttcatcg cggctcgcgc ggaagggacg ccgaaggagc | 1620 |
| agtcaatcca ctcccagga acccatatcc ttactctgca gaccgaggca agctgccatt | 1680 |
| acttcttcgg tagttcccgc aacttcggta tagacgatcc agagatggac ggtgttctca | 1740 |
| ggagctggca agctcaagcc ctgggtgaagg aggacaaagt ggtcgttgaa gctatcgaaa | 1800 |
| ggcggagggc ttacgtcgaa gegaacggga tcagaccgcg catgtttgcc tgcgacgagg | 1860 |
| cagccgtcag ggtatccagg gagattgaga agctcgaaca actagaagcg gcgtgaggat | 1920 |
| ccactagtaa cggcggccag tgtgctggaa ttcccccctg aattcaggcc tgatcacctg | 1980 |
| tcgtacagta tttctacatt tgatgtgiga ttigtgaaga acatcaaaaa aaacaagcac | 2040 |
| tggctttaat atgatgataa gtattatggt aattaattaa ttggcaaaaa caacaatgaa | 2100 |
| gctaaaattt tatttatgga gcttgcggg taatttcttg tgatgatctt tttttttatt | 2160 |
| ttctaattat atatagtctt ctttgccttg aaatgctaaa gttttgagag agttatgctc | 2220 |
| ttttttctt cctctttctt ttttaacttt atcatacaaa ttttgaataa aaatgtgagt | 2280 |
| acattgagct ctctgcaggt ccgattgaga cttttcaaca aagggttaata tccggaaacc | 2340 |
| tctctggatt ccattgcca gctatctgct actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag | 2400 |
| gtggctccta caaatgcat cattgcgata aaggaaagc catcgttgaa gatgcctctg | 2460 |
| ccgacagtgg tcccaagat ggacccccac ccacgaggag catcgttgaa aaagaagacg | 2520 |
| ttccaaccac gcttcaaaag caagtggatt gatgtgatgg tccgattgag acttttcaac | 2580 |
| aaagggtaat atccggaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg | 2640 |
| tgaagatagt gaaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat aaagaaagg | 2700 |
| ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaaga tggaccccca cccacgagga | 2760 |
| gcacgttga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata | 2820 |

[0005]

| | |
|--|------|
| tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttccctcta | 2880 |
| tataaggaag ttcatttcat ttggagaggc ctcagaaaaa tttgctacat lgtllcacia | 2940 |
| acllcaaaala ttattcattt atttgtcagc tttcaaactc tttgtttctt gtttgttgat | 3000 |
| tgagaatagg atccatgagc ccagaacgac gcccggccga catccgccgt gccaccgagg | 3060 |
| cggacatgcc ggcggtctgc accatcgtca accactacat cgagacaagc acggtcaact | 3120 |
| tccgtaccga gccgcaggaa ccgcaggagt ggacggacga cctcgtccgt ctgcgggagc | 3180 |
| gctatccctg gctcgtgcc gaggtggagc gcgaggtcgc cggcatcgcc tacgcgggcc | 3240 |
| cctggaaggc acgcaacgcc tacgactgga cggccgagtc gaccgtgtac gtctccccc | 3300 |
| gccaccagcg gacgggactg ggtcccacgc tctacacca cctgctgaag tccctggagg | 3360 |
| cacagggcct caagagcgtg gtcgctgtca tccggctgcc caacgacccg agcgtgcgca | 3420 |
| tgcacgaggc gctcggatat gccccccgc gcatgctcgc ggcggccggc ticaagcacg | 3480 |
| ggaactggca tgacgtgggt ttctggcagc tggacttcag cctgcccgtta ccgccccgtc | 3540 |
| cggctctgcc cgtcaccgag atctgagaat tgatcgttca aacatttggc aataaagttt | 3600 |
| cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataattc tgttgaatta | 3660 |
| cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat | 3720 |
| gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa | 3780 |
| ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcacc tatgttacta gatcctcgag tggaggcctc | 3840 |
| atcctcatct aagcccccat ttggacgtga atgtagacac gtcgaaataa agatttccga | 3900 |
| attagaataa tttgtttatt gctttcgct ataaatcga cggatcgtaa tttgtcgttt | 3960 |
| tatcaaatg tactttcatt ttataataac gctgcggaca tctacatctt tgaattgaaa | 4020 |
| aaaaattggt aattactctt tcttttctc catattgacc atcatactca ttgctgatcc | 4080 |
| atgtagattt cccggacatg aagcc | 4105 |

<210> 10
 <211> 6369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 包含棉花基因组序列和转基因序列的人工DNA序列

| | |
|--|-----|
| <400> 10 | |
| cattatataa aaagaaaaat tttaaatata aaaaaaatat attaaaacag tgaatcaaca | 60 |
| atcatgtctc ttaaaatgaa aaaaattatc atttaaaatt ttaattaat aaaagtaaaa | 120 |
| tgaaatataa acattttacc tgactttaac agtatagata attcaaaagt aaatatgatt | 180 |
| tcttctgatt tttcaaaaca aatttagaga ttataaatgc cattcgtcga tcattttgac | 240 |
| acgaaagatt taagaaaagc aaatgtaacc tttgacatga tgagcataat cacttcaaat | 300 |
| agtatttttt tttatttcca acgtcaatat attgaaatat ttttttatag aataaactat | 360 |
| agcaattttt gccatgatgg ttcaacttat accactatcc ttaaccaata tatttttggt | 420 |
| tagacattag gagttaagtc tgatgtcggg tgtttgttc cttatttatt caggtgtttt | 480 |
| ataattttac ttatgaaaga ggttggtttt tctcaatgca tttctaatat catatataca | 540 |
| cattgattga gcaaaaaaaaa aaaaaactat cctcaaccaa tgtagaagtg agttggttgc | 600 |
| atgatctttt atttgaattt tcaatattga aaaaaactaaa accacatgtc ttaatccatc | 660 |

[0006]

| | |
|---|------|
| gtaataatac tgctattatt tgaaaagttg atagcaaata ttacaataga aaatgtagat | 720 |
| ctataagaag aaagtatagc tatgtgaaat ctcatataac taatggtatg attaatgltg | 780 |
| attatattca aagtgttgat aatctcacaI atlclllgac aaaagcttta gttagagaaa | 840 |
| aaaatatgga tagtaataat gaggataaga ctaaagcctg aacaataata aaaatcaata | 900 |
| ataaggatac ttacataat gattagagat cccaaaaatt agattcaaaa ggaaaaatga | 960 |
| atacatattt aaaaaatctc tcttttcggt ataataaatg tatgtataac aataatagaa | 1020 |
| gttgagtata actatactct taatgagtc cataactagt ttgagtgaat tgcagagtta | 1080 |
| caagaacatc cttgataacc ttatttatat aaaaattagg acatattctc ttaaggtagc | 1140 |
| caaagcccg gcttaattaa ggcgcgccg ccaagtcggc cgcggcccg ttaacaagct | 1200 |
| tctgcagaat tcgtcaacga gatcttgagc caatcaaaga ggagtgatgt agacctaaag | 1260 |
| caataatgga gccatgacgt aagggttac gccatacga aataattaa ggctgatgtg | 1320 |
| acctgctggt ctctcagaac ctttactttt tatgtttggc gtgtattttt aaatttccac | 1380 |
| ggcaatgacg atgtgacca acgagatctt gagccaatca aagaggagtg atgtagacct | 1440 |
| aaagcaataa tggagccatg acgtaagggc ttacgccat acgaaataat taaaggctga | 1500 |
| tgtgacctgt cggctctca gaaccttac tttttatatt tgccgtgtat ttttaaattt | 1560 |
| ccacggcaat gacgatgtga cctgtgcatc cgtttgcct ataataaagt tttagttgt | 1620 |
| attgatcgac acggtcgaga agacacggcc attctagttc tcaacacaac atatacaaaa | 1680 |
| caaacgaatc tcaagcaatc aagcattcta cttctattgc agcaatttaa atcatttctt | 1740 |
| ttaaagcaaa agcaatttct tgaattttt caccatttac gaacgatagc catggcgcaa | 1800 |
| gtagcagaa tctgcaatgg tgtgcagaac ccatctctta tctccaatct ctcgaaatcc | 1860 |
| agtcaacgca aatctccctt atcggtttct ctgaagacgc agcagcatcc acgagcttat | 1920 |
| ccgatttctg cgtcgtggg attgaagaag agtgggatga cgttaattgg ctctgagctt | 1980 |
| cgtctctta aggtcatgtc ttctgttcc acggcgtgca tgcctacttt cgttagaaac | 2040 |
| gcttggtacg ttgctgcaact tctgaggag ttgagcgaga agcctctagg aagaactatc | 2100 |
| ctcgatactc cactagetct ctatcgtcaa cctgacggag ttgtcgtgc cctgcttgat | 2160 |
| atttgtccgc atcgcttgc tccgttgagt gacggtatc tagtcaacgg acatctccag | 2220 |
| tgtccatc acggtctgga atttgacgga ggtggccagt gtgtccaaa cccgcacgce | 2280 |
| aacggagccc gccctgttc tctgaacgtg cgatcattcc ctgtcgtgga aagagacgca | 2340 |
| ttgatctgga tctggcctgg agatccagca ctgcagatc ccggtgctat ccctgacttt | 2400 |
| gggtgtcgtg ttgatccagc ttaccgtact gtcggaggtt acggtcacgt ggactgcaac | 2460 |
| tacaagctcc ttgtggataa cctcatggat cttggacacg ctcagtagt gcaccgcgct | 2520 |
| aacccccaaa cagacgcctt cgatagactt gagcgtgagg tgatcgttg gcagggcgag | 2580 |
| atccagggc tcataagat cctgggtgac acaccctcag ttctcatggc taagtctttg | 2640 |
| cgtggtgcta acacaccagl tgacgcctgg aacgacatcc ggtggaataa ggtgtcggct | 2700 |
| atgctgaact tcacgcggg cgcgccgaa gggacgccga aggagcagtc aatccactcc | 2760 |
| cgaggaaccc atatccttac tctgagacc gaggcaagct gccattactt cttcggtagt | 2820 |
| tccegcaact tcggtataga cgatccagag atggacgggt ttctcaggag ctggcaagct | 2880 |
| caagccctgg tgaaggagga caaagtggtc gttgaagcta tgaaggcg gagggttac | 2940 |

[0007]

| | |
|---|------|
| gtcgaagcga acgggatcag acccgccatg ttgtcctgcg acgaggcagc cgtcagggta | 3000 |
| tccagggaga ttgagaagct cgaacaacta gaagcggcgt gaggatccac tagtaacgge | 3060 |
| cgccagtgtg ctggaattcg cccttgaatt caggcctgat cacclgtcgt acagtatttc | 3120 |
| tacatttgal glgtgatttg tgaagaacat caaacaaaac aagcactggc tttaatatga | 3180 |
| tgataagtat tatggtaatt aattaattgg caaaaacaac aatgaagcta aaattttatt | 3240 |
| tattgagcct tgcggttaat ttcttgtgat gatctttttt tttattttct aattatata | 3300 |
| agtttccitt gctttgaat gctaaagtt tgagagagtt atgetctttt tttcttctc | 3360 |
| tttctttttt aactttatca tacaattttt gaataaaaat gtgagtacat tgagctctct | 3420 |
| gcaggtccga ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctctc cggattccat | 3480 |
| tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaagggtg ctcctacaaa | 3540 |
| tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtcc | 3600 |
| aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct | 3660 |
| tcaaagcaag tggattgatg tgatggctcg attgagactt ttcaacaag ggtaatatcc | 3720 |
| ggaaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa | 3780 |
| aaggaagggt gctcctacaa atgcatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat | 3840 |
| gcctctgccg acagtgttcc caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa | 3900 |
| gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatctc cactgacgta | 3960 |
| agggatgacg cacaatccca ctatccttgc caagacctt cctctatata aggaagttca | 4020 |
| tttcatttgg agaggcctca gaaaaattg ctacallgll tcacaaactt caaatattat | 4080 |
| tcatttattt gtcagctttc aaactctttg tttcttgttt gttgattgag aataggatcc | 4140 |
| atgagcccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcggg catgccggcg | 4200 |
| gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg | 4260 |
| caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta tccctggctc | 4320 |
| gtcgcggagg tggacggcga ggtcgccggc atcgccctacg cgggccccctg gaaggcacgc | 4380 |
| aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtactgtt ccccccgcca ccagcggacg | 4440 |
| ggactgggct ccacgtctta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca gggttcaag | 4500 |
| agcgtggctg ctgtcatcgg gctgcccac gacccgagcg tgcgcatgca cgaggcgctc | 4560 |
| ggatatgcc cccgcggcat gctgcgggcg gccggttca agcacgggaa ctggcatgac | 4620 |
| gtgggtttct ggcagctgga cttcagctg ccggtaccgc cccgtccggt cctgcccgtc | 4680 |
| accgagatct gagaattgat cgttcaaaca ttggcaata aagtttctta agattgaatc | 4740 |
| ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt gaattacgtt aagcatgtaa | 4800 |
| taattaacat gtaatgatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc | 4860 |
| aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aatatagcg cgcaactag gataaattat | 4920 |
| cgcgcgcggt gtcatttatg ttactagatc ctcgagtgga ggcctcatcc tcatctaagc | 4980 |
| ccccatttgg acglgaatgt agacacgtcg aaataaagat ttccgaatta gaataattg | 5040 |
| tttattgctt tcgctataa atacgacgga tcgtaatttg tcgttttacc aaaatgtact | 5100 |
| ttcattttat aataacgtg cggacatcta ctttttgaa ttgaaaaaa attgtaatt | 5160 |
| actctttctt tttctcata ttgaccatca tactcatgic tgatccatgt agatttccc | 5220 |

[0008]

gacatgaagc cttaatcaaa tattggctct agaacataac ttgtttaaca ctaaatataa 5280
 gtttatgccca ttgacatatg tataatgcat aactttctat cttcacttga aaagagagat 5340
 ttactttctt caaaatgttt gtgtattaat ttagaagatt taaaccacga gacttgaaga 5400
 ttttaagata tcgatagatt caagtacact ttgcgatata ttttatgttc ttaatgattt 5460
 gacatgataa aactcggttt atttagtttt atattataat tttatgattg taacacttaa 5520
 ttgataatga catgatcaac tattaatttg acaaaatcaa aagaaataga aaccgacttt 5580
 tcattttatg tttagaatga aaaattcagt gtctaattta gatgagtcaa atatttattc 5640
 ataattaggt caggaatata ctttaattact tgggtaacca aaattggagt ttgattttca 5700
 ataattagat caagttagtg ttttaattac ttataagaaa attttaatac ccaaattact 5760
 aatcaaatct attagaataa aattagatga agatagaaaa attagctaata atatttaatg 5820
 aaaatttaat tctaggtatt taciattgat tgattattct ttttgttaga gttatgtgac 5880
 ctgaatccccg tttgatctga tctgaaaagt tcgacgtaca attcatttgt caaataaata 5940
 aaataaagag gcaaaatagg agatctgtat aggactatat ttcttcaatt aaacattgat 6000
 tctaaaaggg ttgttttaate cttaaaatgc gtgtagtcga aaacctcttg tattgtgatt 6060
 ttttaatat agtgaatttc tccctctctg tccgtgatat ttcccgataa gggtttttca 6120
 aataaaactt gtgtattctt atttttcttt cttattgttt tacgatcctt cctattgcca 6180
 ttatcgaagt atagtataac acttttaaat ctttlaaaaa ttatattatc aattattttt 6240
 ataagttaa agaataaag ttacaaataa taatttttat accatttacc acgaaatata 6300
 tacttgccggg tacgatattt gtccacaac ccttaacctc gtgttgagtt gtgaacttca 6360
 gctatataa 6369

- <210> 11
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 化学合成的寡核苷酸PCR引物

<400> 11
 gaccatcata ctcattgctg atcc 24

- <210> 12
- <211> 31
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 化学合成的寡核苷酸PCR引物

<400> 12
 gtgttaaaca agttatgttc tagagccaat a 31

- <210> 13
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 化学合成的寡核苷酸PCR探针

<400> 13
 tagatttccc ggacatgaa 19

[0009]

| | | |
|-------|---------------------------------|----|
| <210> | 14 | |
| <211> | 29 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 化学合成的寡核苷酸PCR引物 | |
| <400> | 14 | |
| | gaaatctatg tgtttgacac aatacacag | 29 |
| <210> | 15 | |
| <211> | 16 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 化学合成的寡核苷酸PCR探针 | |
| <400> | 15 | |
| | ttcccaaag aagcct | 16 |

麦草畏 - 草铵膦耐受的棉花事件 MON88701

[F] SEQ ID NO: 10

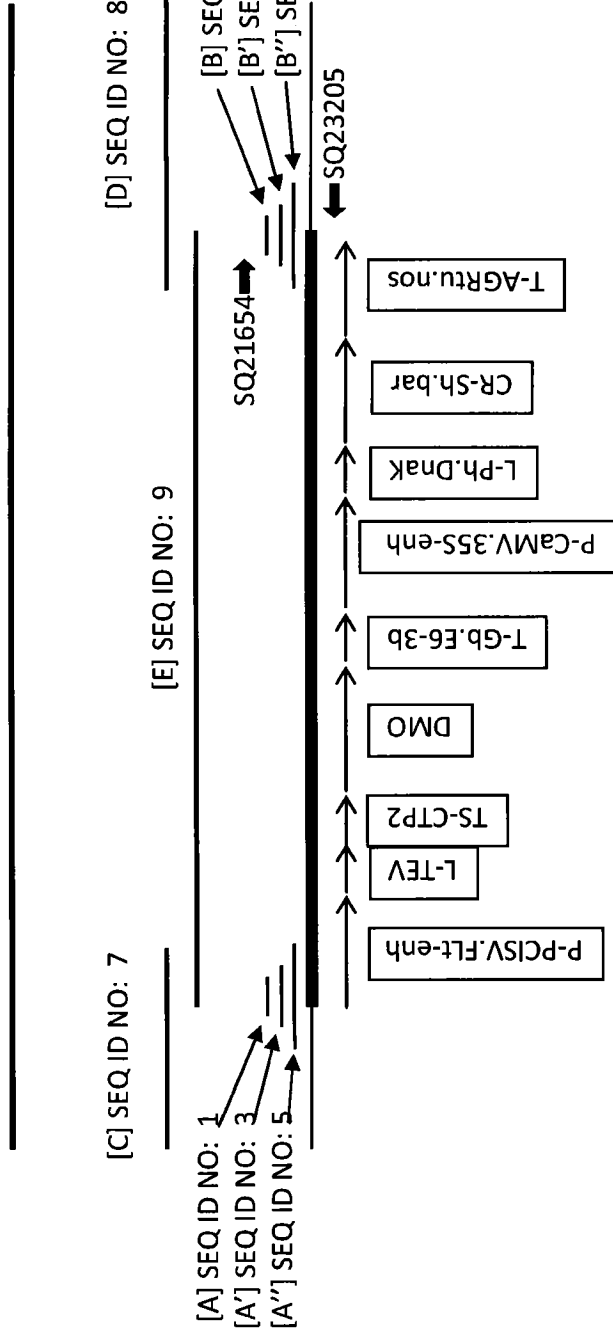


图 1

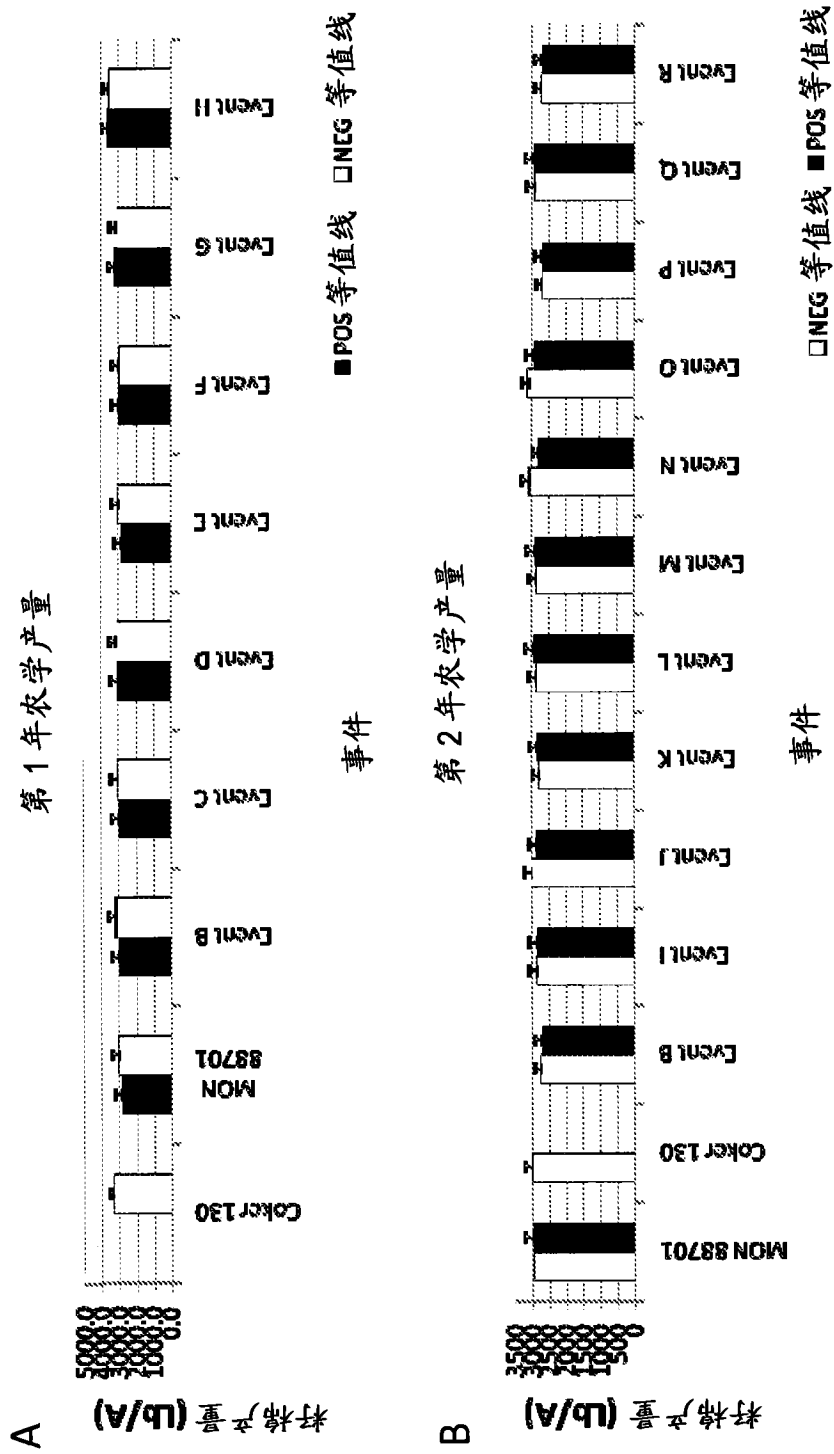


图 2

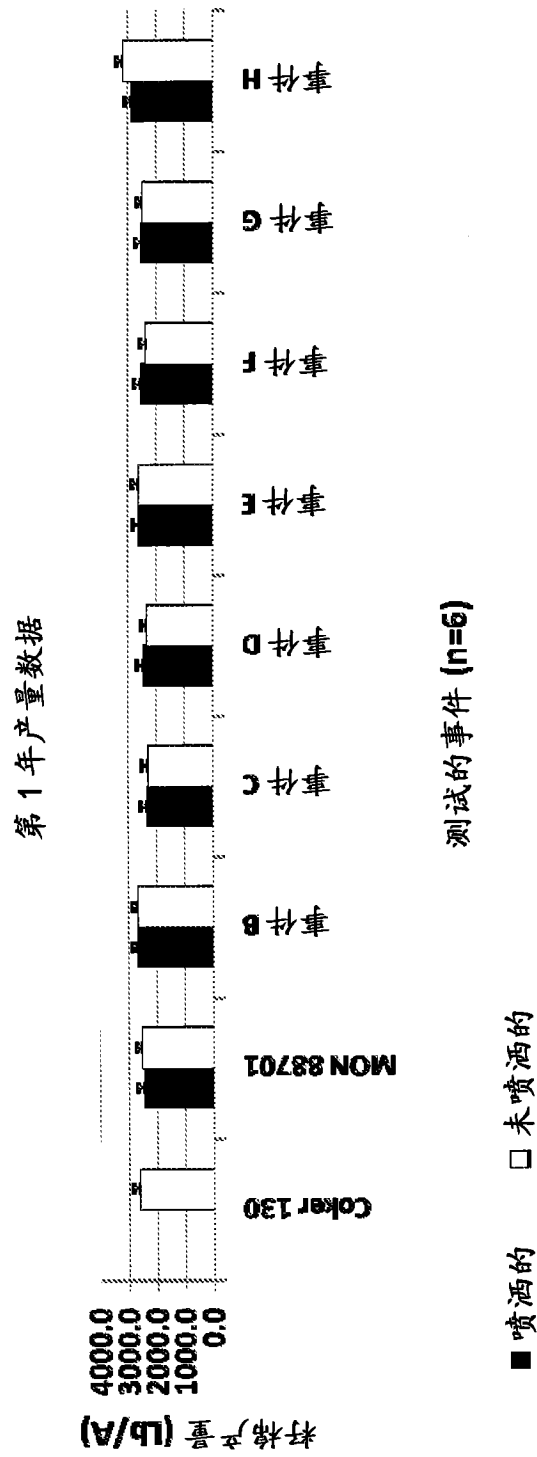


图 3

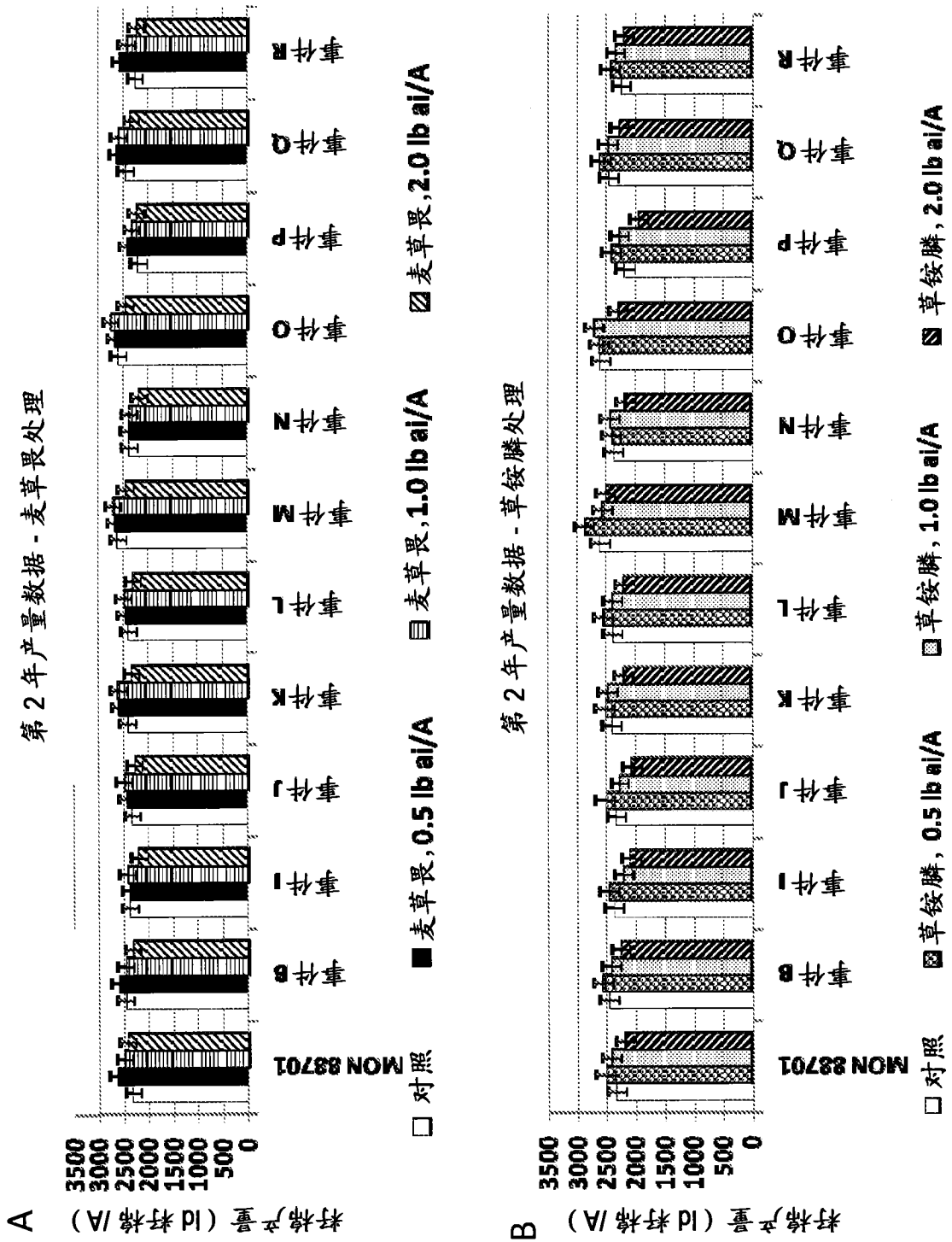


图 4

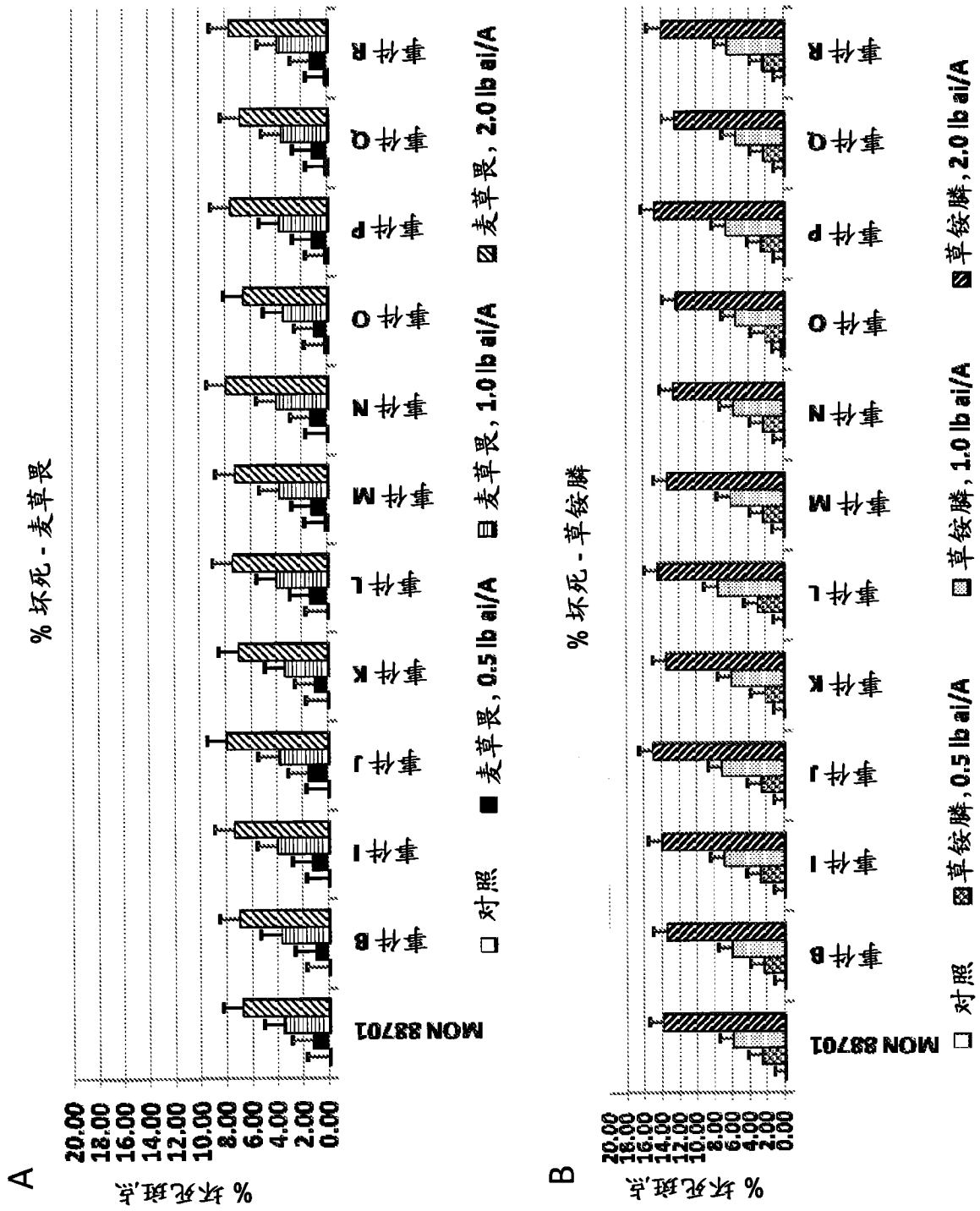


图 5

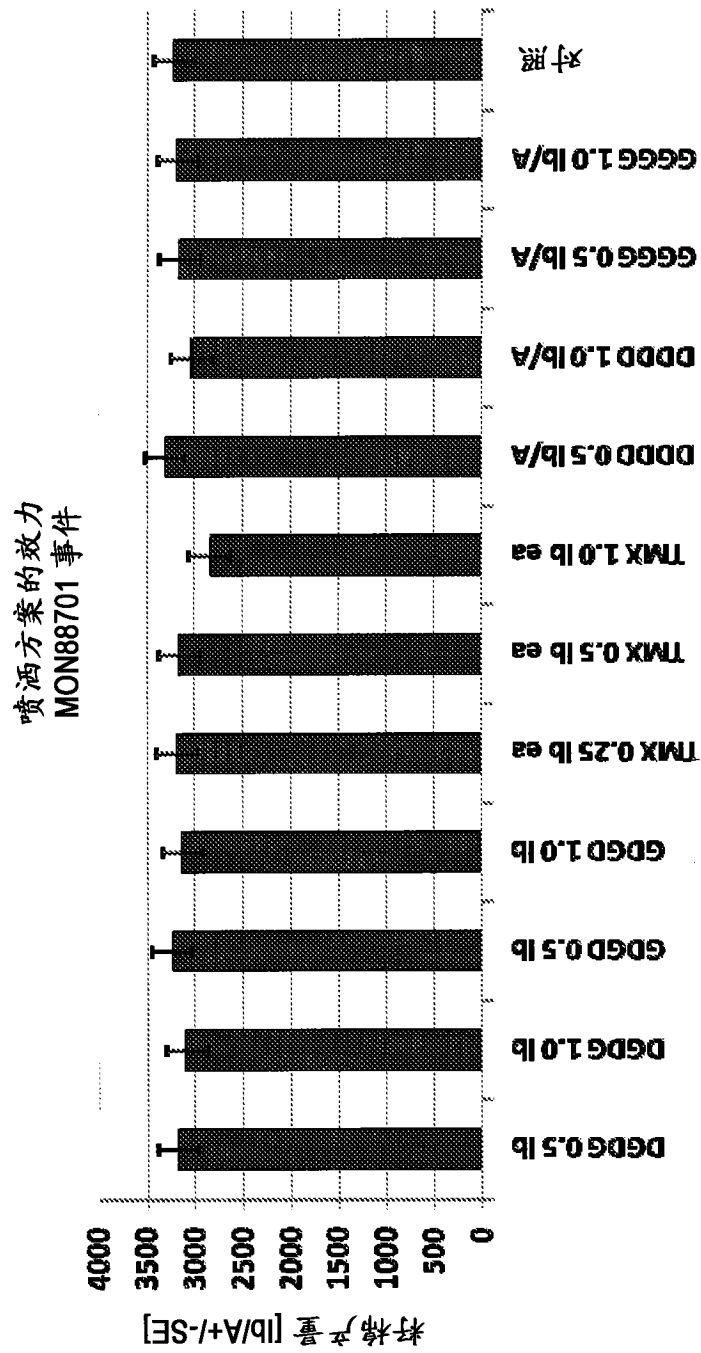


图 6

非转基因 Coker 130 棉花

MON88701 棉花



图 7