

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/87

A01H 1/06 A01H 5/00



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01104428.4

[45] 授权公告日 2005 年 3 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1194095C

[22] 申请日 2001.2.26 [21] 申请号 01104428.4

[71] 专利权人 山东大学

地址 250100 山东省济南市山东大学东校区  
生物楼

[72] 发明人 张举仁 张可炜 杨爱芳 权瑞党  
张岳 尹小燕

审查员 康宇宁

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种转化大粒种子植物的方法及其  
应用

[57] 摘要

本发明涉及一种转化大粒种子植物的方法及其应用。该方法的步骤主要包括：以无菌种子产生的小苗为材料，剥去芽鞘或子叶及幼叶，裸露出茎尖为转化受体，采用农杆菌中介法导入目的基因；转化后的小苗移栽到花盆中，覆盖蛭石，浇灌营养液，待植株长出 3-4 片新叶后喷洒选择剂，筛选出表现抗性的转基因植株。本发明能有效地克服基因型制约，可使通过组织培养途径不易再生植株的植物成批产生转基因植株，对具有重要经济价值的禾谷类作物、大粒豆科作物、棉花等的遗传改良有重要价值。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种转化大粒种子植物的方法，其特征是该方法主要包括以下步骤：
  - (1) 取大粒种子或成熟胚或未成熟胚萌发，得到受体植株；
  - (2) 以幼年的受体植株为材料，在适宜时机剥去芽鞘或子叶及幼叶，裸露出茎尖作为遗传转化的直接受体；
  - (3) 用农杆菌中介法转化受体植株的茎尖，将目的基因导入茎尖分生组织细胞；
  - (4) 转化后的植株长出3-4片新叶后喷洒选择剂，筛选出表现抗性的转基因植株；
  - (5) 对转基因植株的子代进行抗性和分子证据检测，选出转基因个体。
2. 权利要求1的方法，其中所说的大粒种子植物是禾谷类作物植物。
3. 权利要求1的方法，其中所说的大粒种子植物是玉米、小麦、水稻、高粱、大麦、燕麦、黑麦。
4. 权利要求1的方法，其中所说的大粒种子植物是豆科作物植物。
5. 权利要求1的方法，其中所说的大粒种子植物是大豆、花生、绿豆、菜豆、豌豆、四季豆、蚕豆、芸豆。
6. 权利要求1的方法，其中所说的大粒种子植物是经济类作物植物。
7. 权利要求1的方法，其中所说的大粒种子植物是棉花、向日葵、蓖麻。
8. 权利要求1的方法，其中所说的“得到受体植株”的途径可根据植物种类的不同而分别选择，有：
  - (1) 通过萌发成熟种子获得转基因受体植株；
  - (2) 取成熟种子的胚萌发产生转基因受体植株；
  - (3) 培养未成熟胚使其萌发获得转基因受体植株；
  - (4) 将双子叶植物的种子播种在花盆或苗圃中。
9. 权利要求1的方法，其中所说的“适宜时机”因植物种类而异，且以植物生长点处于对农杆菌为最佳感受态时为最佳。
10. 权利要求1的方法，其中所说的“农杆菌中介法”包括浸泡法、浸蘸法、注射法、超声波处理-农杆菌感染法、射线处理-农杆菌感染法、农杆菌感染-真空导

入法。

11. 权利要求 1 的方法，其中所说的“选择剂”为除草剂。
12. 一种生产大粒种子植物的转基因植株子代的方法，其特征是该方法应用权利要求 1 的转化大粒种子植物的方法。
13. 一种产生大粒种子植物的转基因自交系的方法，其特征是该方法应用权利要求 1 的转化大粒种子植物的方法。
14. 一种避免使用抗生素抗性基因的转化大粒种子植物的方法，其特征是该方法应用权利要求 1 的转化大粒种子植物的方法。

## 一种转化大粒种子植物的方法及其应用

本发明的技术领域：

本发明所属的技术领域是农业生物技术领域和植物基因工程领域。

本发明的研究背景：

植物遗传转化（Genetic transformation）或称转化是指把外源核苷酸片段转入植物细胞或组织，使其在受体细胞或再生植株中稳定保留和表达，并通过有性或无性繁殖传递给后代。通过转化，可把控制特定性状的基因转入现有植物品种，打破原有种属的生殖障碍，大大缩短育种周期，创造出常规育种技术很难得到的新型优良品种。

要成功地把外源基因引入某一植物，提高转化频率，就必须找到适合该种植物的最佳转化方法。理想的植物转化方法应具备如下特点：（1）DNA 转移效率高；（2）能以相当高的频率再生出可育植株；（3）基因型依赖性小；（4）程序简单、高效、经济、可重复；（5）方便筛选转化细胞或植株；（6）组织培养需要的时间短或不经组织培养，以减少体细胞无性系变异的发生。

采用常用的转基因技术（农杆菌介导的遗传转化、基因枪轰击法和原生质体为受体的遗传转化）能有效地将外源基因导入植物细胞，但能否从所需的基因型再生大批量的转基因植株则依赖于受体体系。因此，建立能够不受基因型制约的高效转基因受体体系，就是植物基因工程育种领域研究的重要内容。

对植物遗传转化体系的研究已有 30 多年的历史。1980 年代中期，随着多种原生质体培养再生植株的成功，以原生质体为受体的遗传转化工作得到迅速发展。在 1980 年代后期和 1990 年代初，用电激法、PEG 诱导法等分别获得了多种转基因植株。选用原生质体为受体进行遗传转化，虽具有操作简单、转化率高、转基因植株产生于单细胞克隆和协同转化率高等优点，但由于原生质体再生植株受基因型限制很大，很难用生产上所用的基因型为材料，因而导致该方法不能被普遍采用。

1985 年，Horsch 等(Horsch, R.B.等, 1985, *Science*, 227:1229-1231)首创由根瘤农杆菌介导的烟草叶盘转化法（leaf disc transformation）。该方法的意义在于：  
（1）不必利用原生质体、悬浮培养细胞或愈伤组织作为基因转移的受体，可以直接用植物组织进行转化；（2）建立了利用天然 T-DNA 从农杆菌细胞向植物细

胞转移目的基因的简便方法。

在此之后,不同植物组织的转化研究相继开展。分别以植物叶片、叶柄、子叶、子叶柄、下胚轴、茎、花茎、匍匐茎、块茎、茎尖分生组织、芽根、块根、合子胚或体细胞胚、甚至成熟种子等作外植体,都已成功获得转化组织或/和植株。由于单子叶植物不是农杆菌的天然宿主,农杆菌介导的转化方法曾主要用于双子叶植物(Hawes, M.C.等, 1987, *Plant Cell Rept.*, 6:287-290)。但伴随着对T-DNA 转移机理的认识,人们近年来在单子叶植物特别是禾谷类作物上做了大量研究,该技术已发展成为禾谷类作物转化的主要技术。

1987年,康乃尔大学的研究者首先设计出一种基因枪, Sanford等(Wang, YC.等, 1988, *Plant Mol. Biol.*, 11:433-439)用基因枪法转化洋葱表皮细胞获得成功。这一技术很快被用于禾谷类作物和豆科植物的遗传转化(Wang, YC.等, *Plant Mol. Biol.*, 11:433-439),主要受体材料为胚性愈伤组织。从1980年代末到1990年代中期,采用此种方法已在玉米、水稻、小麦及大豆等作物上获得转基因植株,从而使禾谷类作物及难于用农杆菌转化的双子叶植物的遗传转化取得较大突破(Saito等, Europe Patent Application 672752)。

相对于直接转化法来讲,通过农杆菌介导法获得的转基因植株质量和育性都较高,且外源基因整合入受体基因组更为精确(Hansen等, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94:11726-11730),通常为单拷贝或低拷贝,并基本符合孟德尔遗传定律;转移的DNA片段具有特定末端,基因重排较小;可转移大片段的DNA。因此,农杆菌介导的遗传转化倍受重视。

在对于重要农作物的转化研究中,学者们采用了多种方法,试图建立理想的受体体系,但到目前为止,虽然已获得了多种转基因植株,但绝大多数农用品种仍未建立起效率较高的转基因体系。或者说,针对主要农产品植物品种的转化方法仍未得到有效建立。

用农杆菌感染向日葵的研究早在1970年代就开始。1983年, Murai等获得了转菜豆贮藏蛋白基因的向日葵愈伤组织。继后, Matzke及 Goldsbrough相继用类似方法获得了向日葵转化细胞。1987年, Everett等利用农杆菌转化向日葵,获得了转基因植株。1992年, Bidney等取离体的向日葵顶端分生组织为受体,先用基因枪轰击,再用农杆菌感染,显著提高了转化频率,但缺点是取材不便,技术难度大。由于向日葵多数品种不易从培养组织和细胞再生植株,因而建立新的转化体系十分必要(Takeuchi, Y.等, 1992, *Plant Mol. Biol.*, 18:835-839)。

棉花易受农杆菌感染,但组织和细胞培养难度大。1987年, Firoozabady等和 Umbeck等分别以棉花子叶和下胚轴为受体,采用农杆菌介导法将NPT II基因导入培养细胞并获得转基因植株。1990年代初,转Bt基因的抗虫棉花进入田

间实验。1991年, McCabe等(McCabe, DE.等, 1991, III International Congress of Plant Mol. Biol. Tuscon, AZ)用基因枪轰击棉花茎尖分生组织, 得到转基因植株。其具体方法是: 种子消毒后, 去掉无菌苗的胚轴, 露出分生组织, 过夜培养后用基因枪轰击, 然后培养成株。

大豆转基因工作在1988年取得突破性进展, Agracetus公司(McCabe, DE.等, 1988, *Bio/technol.*, 6:923-926)和Monsanto公司分别获得转基因植株。Agracetus公司采用的是基因枪轰击法, 靶组织为大豆胚的初生分生组织和腋生分生组织, 该系统的优点在于较易获得再生植株, 但获得完全转化体的频率较低。Monsanto公司利用农杆菌介导法进行转基因, 外植体为刚发芽种子的子叶切段, 将NPT II、GUS和草甘磷耐性基因导入细胞并再生植株。由于许多大豆品种不易受农杆菌感染(Owens, LD.等, 1985, *Plant Physiol.* 77:87-94; Owens, LD.等, 1988, *Plant Physiol.* 88:570-573; Delzer, BW.等, 1990, *Crop Sci.* 30:320-322; Mauro, AO.等, 1995, *Crop Sci.* 35:1152-1156), 因此Monsanto公司的转化系统仅适用于少数大豆品种。

此后, Christou等(Christou, P.等, 1990, *Trends in Biotech.*, 8:145-151)用专用的基因枪转化大豆茎尖, Finer等(Finer, JJ.等, 1990, *Plant Mol. Rep.*, 9:189-194)用Biolistics<sup>®</sup>基因枪转化胚性悬浮细胞, Sato等用Biolistics<sup>®</sup>基因枪转化未成熟胚茎尖及长期分裂的大豆悬浮细胞培养物均获成功。此外, Dhir等(Dhir, SK.等, 1991, *Plant Cell Rep.* 10:106-110.)用电击法转化大豆原生质体也获得完整的转化植株, Chee等(Chee等, 1994, 美国专利: 5376543)分别在1992年和1994年两次申请“采用农杆菌中介法转化植物萌发种子”的美国发明专利。在该专利的说明书中, 只报道了采用野生型农杆菌转化萌发24-48小时的大豆和菜豆种子获得结瘤植株的工作。该专利稍后被放弃。2000年, Finer等报道了采用超声处理-农杆菌感染法转化大豆子叶可获得良好效果的结果(Finer, KR.等, 2000, *Lett Appl Microbiol.*, 30:406-410)。

花生遗传转化难度大。直到1991年, Lacorte等(Lacorte等, 1991, *Plant Cell Rep.* 10:354-357)才利用农杆菌转化花生外植体获得转基因的愈伤组织。1993年, Ozias-Akins等(Ozias-Akins等, 1993, *Plant Sci.*, 93:185-194)以胚性愈伤组织为受体获得了转基因植株。1997年, Cheng等(Cheng等, 1997, *Plant Physiol.*, 115: 971-980)和Eapen等分别获得花生转基因植株, 但植株再生困难, 受基因型制约大。在近年的研究报道中, 所用的花生转基因受体体系仍存在植株再生难度大、再生植株育性差等缺点。

以原生质体为受体的水稻转化工作在1980年代中期已获得转化细胞, 但直到1988年, Zhang等(Zhang, W.等, 1988, *Theor. Appl. Genet.*, 76:835-840)才采用电

击法获得转基因植株。此后，同类报道很多，但获得转基因植株的工作效率不高。1992年，Cao 等(Cao, J.等, 1992, *Plant Cell Rept.*, 11: 586-591)采用基因枪轰击法获得抗除草剂的转基因植株。此后，以幼胚为受体，采用基因枪轰击法获得转化植株的工作在多个实验室都获得成功，该方法也成为1990年代中期水稻遗传转化的主要方法。

利用农杆菌转化水稻的研究始于1980年代后期。1990年，Raineri等用乙酰丁香酮预处理具有广寄主范围的野生型农杆菌，然后感染水稻盾片，在诱导的愈伤组织中检测到T-DNA在水稻细胞中整合。1993年，Chan等用农杆菌侵染粳稻的幼胚，得到转基因植株，但转化频率较低。次年，Hiei 等(Hiei, Y.等, 1993, 欧洲专利申请: 604662; 1997, 美国专利: 5591616; 1994, *The Plant J.*, 6:271-277)构建了高效转化载体，结合使用乙酰丁香酮，建立了农杆菌高效转化粳稻的方法，并对大群体的转化体进行了分子生物学和遗传学分析，研究了水稻中T-DNA旁侧序列。此后，利用农杆菌介导法转化水稻成功的报道不断增多，成为粳稻遗传转化的常规技术。

玉米遗传转化研究进展在很大程度上依赖于受体体系的改进。1980年代后期，玉米原生质体再生植株成功，以原生质体为受体的遗传转化工作迅速展开。1988年，Rhodes等 (Rhodes等, 1988, *Science*, 240:204-207)用电击法获得转基因植株，但该植株不育。1990年，Gordon-Kamm等(Gordon-Kamm, WJ.等, *The Plant Cell*, 2: 603-618)用基因枪轰击法获得能育的转基因玉米。此后，基因枪轰击法在玉米转基因中应用较多。该方法受体广泛，可以是外植体（幼穗、幼胚或成熟胚等）、愈伤组织或悬浮培养细胞等，操作较简单，效果也较好，被广泛采用。

玉米农杆菌介导的遗传转化虽开始较早，但至今技术尚待改进。1987年，Grimsley 等(Grimsley等, 1987, *Nature*, 325:177-179)报道将玉米条斑病毒(maize streak virus, MSV)的cDNA通过农杆菌转入玉米，使植株发生系统感染。但是，该研究并未表明MSV cDNA能稳定整合到玉米基因组中。1991年，Gould等(Gould等, 1991, *Plant Physiol*, 95:426-434)用农杆菌侵染玉米离体芽尖，得到转基因植株。但是，剥离0.1mm x 0.3mm的芽尖需要的技巧很高，工作量也很大，并且，以后的一些研究者没能重复成功。

1993年，Hiei等报道了一种用农杆菌介导的转化单子叶植物的方法。该方法采用正在脱分化或已经脱分化的（水稻和玉米）外植体作为受体，将HPT和GUS基因转入玉米(A188)或水稻(japonica rice)。1996年，Ishida 等(Ishida等, 1996, *Nature Biotechnol.*, 14:745-750)报道了用农杆菌侵染玉米幼胚，A188自交系的转化率为12-30%。但是，来源于A188的单交种的转化率要比A188的(5.3%)低得多。然而Ishida在A188以外的品系中没有得到转化体。1999年，先锋种子子公司Zhao等

(Zhao, ZY等, 1999, US Patent 5981840) 获得农杆菌转化玉米骨干自交系幼胚方法的专利。该转化方法与Ishida 等方法相近, 但以A188和其它自交系杂交产生的单交种为材料, 转化率从Ishida等的0.4-5.3%提高到6.9-50.5%; 用玉米骨干自交系PHJ90、PHN46HE和PHP38为材料, 转化率为0.9-9.0%, 而用Ishida等的方法未获得这3个自交系的稳定转化体。

同年, 我国黄璐等报道了采用农杆菌转化玉米单交种胚性愈伤组织成功并再生植株的工作(黄璐等, 1999, 《实验生物学报》, 32(4):381-389)。尽管玉米转基因研究已有大量报道, 转基因抗虫玉米已大面积推广, 但以自交系为材料再生大量转基因植株的工作仍是玉米基因工程育种中的制约环节。从大批量获得转基因植株的角度出发, 尚需建立起经济有效的技术方法和体系。以生产上所用的骨干自交系为材料, 玉米组织和细胞培养难度大, 不易再生出大量植株, 且再生植株自交结实更难。因此, 克服基因型障碍, 发展高效的玉米培养体系和转基因方法尤为重要。这是玉米基因工程育种能否高效的关键环节。

1990年代初, Sautter 等(Sautter, C. 等, 1991, *Bio/Technology*, 9:1080-1085)和Vasil 等(Vasil, V. 等, 1991, *Bio/Technology*, 9: 743-747; 1992, *Bio/Technology*, 10:667-674)分别采用基因枪轰击法获得小麦转基因植株, 郭光庆等(郭光庆等, 1993, 《科学通报》, 38: 1226-1231)采用PEG诱导法获得小麦转基因植株。这些工作依赖于材料的基因型, 且转化细胞再生植株的频率均不高。此后, Altpeter等(Altpeter, F. V. 等, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:1155-1159)和Barro 等(Barro, F. 等, 1997, *Nature Biotechnology*, 15:1295-1299)分别将高分子量麦谷胱亚基基因转入小麦中, 转基因植株表现出新特性。1997年, Cheng等(Cheng等, 1997, *Plant Physiol.*, 115: 971-980)首次报道了采用农杆菌成功转化小麦的工作, 该项工作得到了分子生物学证据, 并对后代进行了遗传学分析。上述这些工作都是以春性或半冬性小麦为材料进行的。其它麦类作物的遗传转化进展也不快(Pawlowski等, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95:12106-12110)。截止到目前为止, 麦类作物遗传转化仍是公认的难题。

在以上报道中, 除少数工作外, 转基因植株的获得都依赖于器官、组织和细胞培养技术; 绝大多数具有重要经济价值的基因型, 其组织培养和遗传转化能否成功在很大程度上取决于基因型, 特别是禾谷类作物和大粒豆科作物; 只有少数基因型材料能通过组织和细胞培养再生出大批植株。此外, 转化效率也很低。尤其是以具有商业价值的品种和自交系为受体。从以上报道还可看出, 利用离体茎尖或胚芽进行遗传转化, 不仅操作难度大, 效率低, 而且转化条件不易掌握, 实验重复性差。因此, 发展不受基因型制约的简单有效的遗传转化方法和体系具



有重大意义 (Hansen 等, 1999, *Trends Plant Sci.*, 4(6):226-231)。

本发明的用语和培养基:

在本发明中,“大粒种子植物”主要是指(1)玉米、小麦、水稻、高粱、大麦、燕麦、黑麦等禾谷类作物;(2)大豆、花生、绿豆、菜豆、四季豆等豆科作物;(3)棉花、向日葵等经济作物。“茎尖”是指十到几十微米的茎尖分生组织(shoot meristemetic)和大到几十毫米的芽端(shoot tip),“茎尖分生组织”是指顶端生长锥及其邻近的叶原基。

在本发明中,农杆菌(*Agrobacterium*, 包括 *A. tumefaciens* 和 *A. rhizogenes*)介导的转化程序基本上同 Ishida 等(Ishida 等, 1996, *Nature Biotechnol.*, 14:745-750)报道的。在转染液中添加乙酰丁香酮(acetosyringone, As)等酚类化合物和中性单糖。

在本发明中,转染所用的农杆菌含有改造后的 Ti-质粒,后者可携带或不携带除草剂抗性基因或其它选择剂抗性基因。

在本发明中,所用的除草剂抗性基因或其它抗性基因只要在转化植物细胞中活跃表达并赋予植株抗性即可,不限制基因的来源、大小、所用启动子和所抗除草剂(或其它选择剂)的种类,也不受农杆菌菌株的限制。

在本发明中,基本培养基及植物生长调节物质用热压灭菌;抗生素等活性成分用过滤灭菌,在培养基灭菌后加入。

在本发明中,除草剂等筛选剂用中性自来水溶解后喷洒。

在本发明中,农杆菌培养一般采用 YEP 培养基(酵母提取物 10 g/l, 蛋白胨 10 g/l, NaCl 5g/l, pH 7.0, 固体培养基加入 15 g/l 琼脂)培养。

禾谷类作物种子萌发和胚培养采用的基本培养基为改良 MS 培养基: KNO<sub>3</sub> 1900mg/l、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1650mg/l、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 440mg/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 370mg/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 170mg/l、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 27.8mg/l、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg/l、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 22mg/l、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10mg/l、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.5mg/l、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.05mg/l、CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05mg/l、盐酸硫胺素 10mg/l、盐酸吡哆醇 1mg/l、烟酸 1mg/l、甘氨酸 2mg/l、肌醇 100mg/l、生物素 0.05mg/l、酪蛋白水解物 250mg/l、蔗糖 30g/l、琼脂粉 7g/l、pH 5.8-6.0。植物生长调节物质的种类和浓度因培养材料的基因型而调整。

豆科作物种子萌发和胚培养采用的基本培养基为改良 MS 培养基(同上)或改良 B5 培养基。后种培养基成分为: KNO<sub>3</sub> 2500mg/l、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 134mg/l、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 150mg/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 250mg/l、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 150mg/l、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 27.8mg/l、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2mg/l、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 10mg/l、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10mg/l、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>

0.5mg/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.05mg/l、 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05mg/l、盐酸硫胺素 10mg/l、盐酸吡哆醇 1mg/l、烟酸 1mg/l、甘氨酸 2mg/l、肌醇 100mg/l、生物素 0.05mg/l、酪蛋白水解物 250mg/l、蔗糖 20g/l、琼脂粉 7g/l、pH 5.8-6.0。植物生长调节物质的种类和浓度因培养材料的基因型而调整。

在本发明中，移栽苗隔天浇灌 1/2 改良 MS 培养基无机盐溶液或 1/2 改良 B5 培养基无机盐溶液，pH 6.0-7.0。

本发明的技术方案：

### 1. 建立受体体系

根据植物种类的不同可分别选择以下途径。

#### (1) 通过萌发成熟种子获得转基因受体植株。

取饱满干净的种子（利用杂种优势的作物选用套袋获得的自交系种子、有坚硬种皮或外绒毛的种子去掉种皮或外绒毛），用 70%乙醇浸泡 1-15 分钟（因种子种类和带菌情况确定），再用 0.1%氯化汞浸泡 10-15 分钟，然后用无菌水洗涤 3-5 遍。灭菌期间不断晃动种子，以保证表面灭菌彻底。灭菌后种子放在无菌三角瓶内萌发，瓶内放入少量无菌水（30-40 毫升水/250 毫升三角瓶），封口后在黑暗条件（15-35℃）下萌发，并注意晃动种子。萌发温度和时间因种子种类而定。待种子萌动（露白）后，将其放在培养基上于黑暗条件下继续萌发。待胚芽或胚轴伸长至 3-5 厘米、胚根 2-7 厘米时，剥离胚芽鞘或子叶及 2-3 片幼叶，暴露茎尖分生组织用于转化。操作时应避免对根系造成损伤。

#### (2) 通过成熟胚萌发产生转基因受体植株。

种子表面灭菌（有坚硬种皮或外绒毛的种子去掉种皮或外绒毛）时，先用 70%乙醇浸泡 1-15 分钟（因种子种类和带菌情况确定），再用 0.1%氯化汞浸泡 10-15 分钟，然后用无菌水洗涤 3-5 遍。灭菌期间不断晃动种子，以保证表面灭菌彻底。灭菌后种子放在无菌三角瓶内萌发，瓶内放入少量无菌水（30-60 毫升水/250 毫升三角瓶），封口后在黑暗条件（22-30℃）下放置 12-24 小时（确切时间因种子种类和温度而定）。待种子充分吸涨后，用镊子取胚接种在培养基上，在黑暗条件下萌发，萌发温度一般为 22-30℃。培养基具体成分因植物种类而有差异。待胚芽或胚轴伸长到 3-5 厘米、胚根 2-4 厘米时，剥离胚芽鞘或子叶及 2-3 片幼叶，暴露茎尖分生组织用于转化。操作时应避免对根系造成损伤。

#### (3) 培养未成熟胚获得转基因受体植株。

未成熟果实或果穗用 70%乙醇浸泡 1 分钟左右，再用 0.1%氯化汞浸泡 6-15 分钟（因材料种类和带菌情况确定），然后用无菌水洗涤 3-5 遍。灭菌期间不断晃动，以保证表面灭菌彻底。然后取球形胚以后时期的未成熟胚进行离体培养。

未成熟胚接种在附加 6-BA (6-苄基嘌呤) 0.05-0.8mg/l、蔗糖浓度 3-5%的改良 MS 培养基或改良 B5 培养基上进行培养, 温度 22-30°C, 散射光或黑暗条件下培养。培养基成分因植物种类而变化。待胚芽或胚轴伸长至 3-5 厘米、胚根 2-4 厘米时, 剥离胚芽鞘或子叶及 2-3 片幼叶, 裸露茎尖的小苗用于转化。操作时应避免对根系造成损伤。

(4) 将双子叶植物的种子播种在苗圃或花盆中。

小苗出土后避光生长, 待子叶展开后, 剥去子叶, 暴露生长点, 用毛细滴管或注射器向生长点导入农杆菌。

## 2. 转化试管苗或苗圃苗

取裸露茎尖分生组织的种子苗或胚发育的小苗为转化受体, 以农杆菌介导法将目的基因转入受体植株茎尖的分生组织细胞。具体步骤为:

### (1) 制备转化用载体。

将带有双元载体 (Mini-Ti 质粒, 带有目的基因和/或除草剂抗性基因和/或其它选择标记基因) 或共整合载体 (T-DNA 区含有目的基因和/或除草剂抗性基因和/或其它选择标记基因) 的农杆菌 (如 EHA101、AGL1 和 LBA4404) 在附加抗生素的 YEP 培养基中 28°C 震荡培养, 震荡速率为 110 r/min, 使细菌处于对数生长期; 然后在 3000 r/min 下离心 10 分钟, 弃上清液, 菌体用 1/2 改良 MS 液体培养基 (即改良 MS 培养基基本成分减半) 洗涤, 再离心收集; 再将菌体用添加乙酰丁香酮 (acetosyringone, As) 的 1/2 改良 MS 液体培养基悬浮, 稀释 5-20 倍用于转化。

### (2) 采用农杆菌中介法转入目的基因。

可采用以下任一程序进行转化:

A、将无菌苗裸露的茎尖分生组织放入农杆菌液中浸泡 0.5-8 分钟 (其它部位尽量避免接触农杆菌), 用灭菌滤纸吸去茎尖的多余菌液, 再将植株根部插入固体培养基 (一般用原培养基) 中, 放在黑暗条件下培养 (22°C 左右) 2-4 天, 然后在光照下培养 (22-25°C) 2-3 天, 此时植株顶端已有小叶出现。再将植株移栽到铺有上层蛭石和下层壤土的花盆中。

B、将无菌苗裸露的茎尖分生组织放入农杆菌液中浸泡 0.5-8 分钟 (其它部位尽量避免接触农杆菌), 用灭菌滤纸吸去茎尖的多余菌液, 然后将其移栽到铺有上层蛭石和下层壤土的花盆中, 植株顶部覆盖 2 厘米厚度的蛭石, 使其处于避光状态, 并保持湿度。在适宜温度 (18-23°C) 下, 植株一周后长出新叶。

C、将花盆或苗圃中的小苗剥去子叶, 暴露出生长点, 然后用带有毛细玻璃管或 4 号 (中华人民共和国注射针标准) 注射针的注射器将农杆菌液注入生长点。注射后用吸水纸吸去多余液滴, 然后在植株顶部覆盖 2 厘米厚度的蛭石或其它无

土介质，使其处于避光状态，并保持湿度。在适宜温度（18-23℃）下，植株在一周后长出新叶。

### （3）转化植株的筛选、移栽和管理。

对于花盆或苗圃中的转化小苗，隔天浇灌 1/2 改良 MS 或 1/2 改良 B5 培养基无机盐，长出 3 片新叶后，喷洒适宜浓度（杀死或抑制非转基因植株生长的浓度）的除草剂或其它类型的选择剂。未转化的植株缺乏特定抗性性状，用除草剂或其它类型的选择剂处理后逐渐死亡。转基因植株因对除草剂或其它类型的选择剂有抗性，在喷洒除草剂或其它类型的选择剂后仍能存活和生长。若用除草剂抗性基因 *als*（乙酰乳酸合成酶基因）为选择标记，转化后的玉米植株在喷洒除草剂后，抗性个体的比例可达 30% 以上。抗性植株长到 5 叶期，将其定植到土壤肥沃的温室或田间。适宜生长条件（因植物种类、品种或生态型而变化）下，转基因植株正常发育和结实。对于非严格自花授粉的植物，要注意适时套袋和自交。

### （4）转基因植株的鉴定和子代抗性分析。

取转化植株的叶片提取 DNA，采用 PCR 技术进行目的基因检测。对获得的 PCR 阳性植株采用 Southern blotting 方法鉴定以确定转基因植株。分子生物学鉴定结果表明，若用除草剂抗性基因 *als*（乙酰乳酸合成酶基因）为选择标记，80% 以上的抗除草剂植株为转基因个体，见附图 1、2。如果不用除草剂或其它选择标记筛选经过转化处理的植株，直接采用技术检测，在转化处理个体中，转基因植株比例达 20-40%。

一般认为，遗传转化只能使幼胚或分生组织中少数细胞得到转化，若不利用选择标记进行筛选，细胞分裂形成嵌合体，只有当嵌合体中的转化细胞形成配子，转化性状才能传递给后代。为了解转基因植株子代中有多少个体携带外源基因，可在子代植株长到 3-5 叶期时喷洒除草剂或用其它类型的选择剂处理植株叶片。结果表明，采用该技术体系获得的转基因玉米的自交子代，几乎各株系均存在转基因个体，在 60% 左右的株系中，外源基因的分离比例符合孟德尔遗传规律。在本发明中，转化程序中虽无筛选转化细胞的步骤，但由于农杆菌长时间同分生组织接触，可能使较多细胞得到转化；在用除草剂选择转化小苗时，非转化细胞的增生受到抑制，其比例在顶端分生组织中迅速降低。以致导致产生生殖器官的细胞几乎都是转化细胞。

### 本发明的有益效果：

本发明以大粒植物成熟或未成熟种子为起始材料，灭菌后在黑暗条件下萌发或培养，然后剥去芽鞘或子叶及幼叶，以农杆菌为中介进行转化，进而得到转基因植株。本发明能有效减少基因型障碍，可从绝大多数基因型中有效获得转基因

植株；并且转基因植株生长发育正常，结实性好，其后代也基本能够保持原基因型的特征特性。

与以胚性愈伤组织和幼胚为受体进行遗传转化的技术方法相比较，本发明具有的优势在于：能够让绝大多数基因型产生转基因植株；实验周期短；成功率高；免去抗生素抗性基因的使用；取材不受季节限制。对于利用杂种优势的作物，若以自交系为受体，转基因植株绝大多数无需进行多代回交就可产生转基因自交系。

与离体培养芽尖为受体进行遗传转化的技术方法相比较，本发明具有的优势在于：免去茎尖培养再生植株的过程，操作简单，转化效率和转化频率大幅度提高；重复性好；免去抗生素抗性基因的使用，有利于食用产品通过安全性鉴定；转基因当代植株发育正常，能大批获得转基因植株的子代等。

本发明的实施例：

以下叙述本发明的实施例。须说明的是，本发明的实施例只对本发明起说明作用而没有限制作用。

实例一、以农杆菌为中介转化玉米自交系无菌苗

#### 1. 玉米无菌苗的获得。

套袋获取玉米骨干自交系或杂交种种子，用70%乙醇浸泡10分钟，再用0.1%氯化汞浸泡10-12分钟，然后用无菌水洗涤3-5遍。灭菌期间不断晃动种子，以保证表面灭菌彻底。灭菌后种子放在无菌三角瓶内萌发，瓶内放入少量无菌水（30-40毫升水/250毫升三角瓶），封口后放在黑暗条件（23-30℃）下1-2天。待种子萌动（露白）后，将其放在改良MS培养基上，在黑暗条件下继续萌发。待胚芽伸长至3-5厘米时，剥离胚芽鞘及2-3片幼叶，露出茎尖顶端生长锥。

#### 2. 农杆菌培养及活化。

将带有双元载体（Mini-Ti质粒带有除草剂绿黄隆抗性基因 $als$ ，该基因来自抗绿黄隆的拟南芥植株并经过修饰，李国圣等，2000，〈〈科学通报〉〉，45：2181--2184）的根瘤农杆菌（AGL1或LBA4404）在附加抗生素的YEP培养基中28℃震荡培养，震荡速率为110 r/min，使细菌处于对数生长期。然后在3000 r/min下离心10分钟，弃上清液。菌体用1/2改良MS液体培养基洗涤，离心收集。再将菌体用添加100mg/l乙酰丁香酮的1/2 MS改良液体培养基悬浮，稀释5-20倍用于转化。

#### 3. 玉米无菌苗转化。

（1）把菌液倒在4.5厘米直径的培养皿中，倾斜培养皿，将露出茎尖生长锥的无菌苗顶端浸泡在菌液中2-5分钟（AGL1 2分钟，LBA4404 5分钟）。

(2) 浸染后的芽尖用无菌滤纸吸干, 将根部插入改良 MS 培养基中于黑暗中培养 2-3 天, 培养温度为 22-24°C, 然后将无菌苗放在散射光下培养 2 天。

(3) 将照光培养后的无菌苗移栽到铺有上层蛭石和下层壤土的花盆中, 蛭石覆盖植株顶部。然后让植株在自然光照下生长, 日温 22-28°C, 夜温 18-23°C, 隔天浇灌 1/2 改良 MS 培养基无机盐。

#### 4. 转化植株筛选与定植

转化植株长出 3 片叶后, 喷洒 20mg/l 绿黄隆 (沈阳农药厂生产, 有效成分 25%) 水溶液, 以未转化植株为对照。喷洒量以植株掉液滴为宜。对照植株在喷洒后 3 天停止生长, 10 天左右开始死亡。转化处理后的植株, 一些个体的变化与对照植株相似, 另一些个体则持续生长, 无明显变化。存活植株长到 5 叶期, 将其定植到田间。

#### 5. 转基因植株的鉴定

抗除草剂植株生长到 7-8 叶时, 取叶片提取 DNA, 采用 PCR 技术检测外源基因, 对 PCR 阳性植株进行 Southern blotting 检测。结果见附图 1、2、3。结果显示, 约 86% 的抗除草剂植株为转基因个体。

#### 6. 转基因植株的管理和子代分析

转基因植株开花后套袋自交或姊妹交结实。种子播种在大田或温室, 植株长到 4-6 叶期时取叶片提取 DNA, 采用 PCR 技术检测是否带有外源基因, 并统计外源基因在子代植株中的分离比例。结果见表 1。

表 1、外源基因 *als* 在转基因植株子代中的频率

株系	子代植株数	PCR 阳性植株数	阳性/阴性株比率	近似分离比率 阳性/阴性	是否符合孟德尔遗传定律
TA--01	35	27	27/8	3/1	是
TA—02	30	28	28/2	14/1	是
TA—04	33	25	25/8	3/1	是
TA—06	32	32	32/0	1/0	待定
TA—08	30	28	28/2	14/1	是
TA—10	29	20	20/9	2/1	否
TA—12	30	27	27/3	9/1	否
TA—14	31	30	30/1	30/1	待定
TA—16	32	30	30/2	15/1	是
TA—18	30	21	21/9	2/1	否
TA—20	43	40	40/3	13/1	是

TA—22	32	25	25/7	3/1	是
TA—24	30	28	28/2	14/1	是
TA—26	30	19	19/11	2/1	否
TA—28	50	47	47/3	15/1	是
TA—30	31	7	7/24	1/3	否
TA—32	30	30	30/0	1/0	待定
TA—34	31	26	26/5	5/1	否
TA—36	34	32	32/2	16/1	是
TA—38	29	27	27/2	14/1	是

数据表明，以无菌苗茎尖分生组织为转基因的受体组织，能高效获得转基因植株，外源基因在子代植株中的分离比例多数符合孟德尔遗传定律。

#### 实例二、以农杆菌为中介转化由玉米未成熟胚产生的无菌苗

##### 1. 玉米无菌苗获得

取套袋授粉后 15-20 天的玉米骨干自交系自交果穗，去掉苞叶后用 70%乙醇浸泡 5-8 分钟，然后用手术刀削去种子顶部，用镊子挑出未成熟胚，接种在附加 0.25mg/l 2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸)的改良 MS 培养基上，在黑暗条件(23-26°C)下培养。待胚芽伸长至 3-5 厘米时，剥离胚芽鞘及 2-3 片幼叶，裸露出茎尖生长锥。然后采用农杆菌中介法转化茎尖分生组织。

2. 其余操作步骤，包括农杆菌培养及活化、玉米无菌苗转化、转化植株筛选、定植和分子生物学鉴定等皆与实施例一相同。

#### 实例三、以农杆菌为中介转化小麦无菌苗

##### 1. 小麦无菌苗获得

小麦优良品种的种子，用 70%乙醇浸泡 1-3 分钟，再用 0.1%氯化汞浸泡 8-12 分钟，然后用无菌水洗涤 3-5 遍。灭菌期间不断晃动种子，以保证表面灭菌彻底。灭菌后种子放在无菌三角瓶内萌发，瓶内放入少量无菌水（30-40 毫升/250 毫升三角瓶），封口后放在黑暗条件（23-30°C）下 1-2 天。待种子萌动（露白）后，将其放在改良 MS 培养基上于黑暗条件下萌发。待胚芽伸长止 3-5 厘米时，剥离胚芽鞘及 2-3 片幼叶，露出茎尖顶端生长锥。

##### 2. 农杆菌培养及活化

将带有双元载体（Mini-Ti 质粒带有除草剂抗性基因 *bar*）的根瘤农杆菌（AGL1 或 LBA4404）在附加抗生素的 LB 培养基中 28°C 下震荡培养，震荡速率为 110 r/min，使细菌处于对数生长期。然后在 3000 r/min 下离心 10 分钟，弃上清

液。菌体用 1/2 MS 液体培养基洗涤，离心收集。再将菌体用添加 100mg/l 乙酰丁香酮的 1/2 MS 液体培养基悬浮，稀释 5-20 倍用于转化。

### 3. 小麦无菌苗转化

(1) 将菌液倒在 4.5 厘米直径的培养皿中，倾斜培养皿，使露出茎尖生长锥的无菌苗顶端浸泡在菌液中 3-6 分钟。

(2) 浸染后的芽尖用无菌滤纸吸干，将根部插入附加 200mg/l 谷氨酰胺的改良 MS 培养基上于黑暗中培养 2-3 天，培养温度为 22-24℃。然后将无菌苗放在散射光下培养 2 天。

(3) 将照光培养后的无菌苗移栽到铺有上层蛭石下层壤土的花盆中，并用蛭石覆盖植株顶部。然后让植株在自然光照下生长，日温 22-28℃，夜温 15-21℃，隔天浇灌 1/2 改良 MS 培养基无机盐。

### 4. 转化植株筛选与定植

转化植株长出 3 片叶后，喷洒除草剂 phosphinothricin (Sigma 公司, St. Louis, MO, USA) 2mg/l 水溶液，以植株掉液滴为宜。未转化对照植株在喷洒后 5 天后停止生长，15 天左右开始死亡。转化植株在喷洒后，一些个体变化同对照植株相似，另一些个体持续生长，变化不明显。待存活植株长到 7-8 叶时，将其定植到田间，并促进分蘖。

5. 抗除草剂植株经春化处理，在起身-拔节期取叶片提取 DNA，采用 PCR 技术检测转化植株。PCR 阳性植株进行 Southern blotting 检测，在获得的 368 株抗除草剂植株中，约 80%左右 (296/368) 为转基因个体。

### 6. 转基因植株子代分析

通过春化阶段（低温处理条件因品种而异）的植株在长日照下起身、拔节、开花结实。转基因植株产生的种子，在浸水萌动后放冰箱(0-2℃)中进行春化处理 30-65 天。部分春化处理后的种子用 phosphinothricin (Sigma 公司, St. Louis, MO, USA) 2mg/l 水溶液处理，观察统计抗性和敏感性个体比例；另一部分春化处理后的种子播种在大田或温室，待植株长到 5-6 叶期时取叶片提取 DNA，采用 PCR 技术检测外源基因，并统计外源基因在子代植株中的分离比例。抗性筛选和分子生物学检测结果均表明，在约半数的株系中，外源基因在子代植株中的分离比例符合孟德尔遗传定律。

## 实例四、以农杆菌为中介转化棉花无菌苗

### 1. 棉花无菌苗获得

取棉花自交系或优良品种的种子，用浓硫酸脱去表面绒毛，用 70%乙醇浸泡 2 分钟，再用 0.1%氯化汞浸泡 10-12 分钟，然后用无菌水洗涤 3-5 遍。灭菌期间



不断晃动种子，以保证表面灭菌彻底。灭菌后种子放在无菌三角瓶内萌发，瓶内放入少量无菌水(30-40 毫升水/250 毫升三角瓶)，封口后放在黑暗条件(23-30°C)下 1-2 天。待种子萌动(露白)后，将其放在铵盐减半的改良 MS 培养基上于黑暗条件下萌发。待胚轴伸长至 3-5 厘米时，剥去子叶及幼叶，露出茎端生长锥。

## 2. 农杆菌培养及活化

将带有双元载体(Mini-Ti 质粒带有除草剂绿黄隆抗性基因 *als*)的根瘤农杆菌(AGL1 或 LBA4404)在附加抗生素的 YEP 培养基中 28°C 下震荡培养，震荡速率为 110 r/min，使细菌处于对数生长期。然后 3000 r/min 下离心 10 分钟，弃上清液。菌体用铵盐减半的 1/2 改良 MS 液体培养基洗涤，离心收集。再将菌体用添加 100 mg/l 乙酰丁香酮的铵盐减半的 1/2 MS 液体培养基悬浮，稀释 10-25 倍用于转化。

## 3. 棉花无菌苗转化

(1) 将菌液倒在 4.5 厘米直径的培养皿中，倾斜培养皿，使露出茎尖生长锥的苗端浸泡在菌液中 2-5 分钟。

(2) 浸染后的芽尖用无菌滤纸吸干，把根部插入无生长调节剂的改良 MS 培养基上于黑暗中培养 2-3 天，培养温度为 24-26°C。然后将无菌苗放在散射光下培养 2 天。

(3) 将照光培养后的无菌苗移栽到上层蛭石下层壤土的花盆中，蛭石覆盖植株顶部。然后让植株在自然光照下生长，日温 22-28°C，夜温 18-23°C，隔天浇灌 1/2 改良 MS 培养基无机盐。

## 4. 转化植株筛选与定植

转化植株长出 3 片叶后，喷洒 1.5mg/l 绿黄隆(沈阳农药厂生产，有效成分 25%)水溶液，以植株掉液滴为宜。未转化的对照植株在喷洒后 3 天停止生长，12 天左右开始死亡。转化植株在喷洒后，一些个体变化同对照植株相似，另一些个体有很强抗性，持续生长。存活植株长到 5 叶期时，将其定植到田间。

## 5. 抗除草剂植株的分子生物学鉴定

抗除草剂植株长到 7-8 叶时，取叶片提取 DNA，采用 PCR 技术检测外源基因。PCR 阳性植株进行 Southern blotting 检测。在获得的 186 株抗除草剂 PCR 阳性植株中，约 80%以上(157/186)的植株为转基因个体。

## 6. 转基因植株子代的分子生物学鉴定

转基因植株开花后自交或姊妹交结实。种子播种在大田或温室，在植株 4-6 叶期时取叶片提取 DNA，采用 PCR 技术检测子代植株是否带有外源基因，并统计外源基因在子代分离比例。结果表明，以无菌苗茎尖分生组织为转基因受体组织，能高效获得转基因植株。并且，在 60%左右(23/38)的转基因株系中，外源基

因在子代植株中的分离比例多数符合孟德尔定律。

#### 实例五、以农杆菌为中介转化大豆无菌苗

##### 1. 大豆无菌苗获得

取优良品种的种子，用 70%乙醇浸泡 2-3 分钟，用 0.1%氯化汞浸泡 10-12 分钟，然后用无菌水洗涤 3-5 遍。灭菌期间不断晃动种子，以保证表面灭菌彻底。灭菌后种子放在无菌三角瓶内萌发，瓶内放入少量无菌水（50-60 毫升水/250 毫升三角瓶），封口后放在黑暗条件（23-30℃）下 2-3 天。待种子萌动（露白）后，将其放在改良 B5 培养基上于黑暗条件下萌发。待胚轴长至 3-5 厘米时，剥去子叶并露出茎端生长锥。

##### 2. 农杆菌培养及活化

将带有双元载体（Mini-Ti 质粒带有除草剂绿黄隆抗性基因 *als*）的根瘤农杆菌（AGL1 或 LBA4404）在附加抗生素的 YEP 培养基中 28℃ 下震荡培养，震荡速率为 110 r/min，使细菌处于对数生长期。然后 3000 r/min 下离心 10 分钟，弃上清液。菌体用 1/2 改良 B5 液体培养基（即改良 B5 培养基基本成分减半）洗涤，再离心收集。再将菌体用添加 100mg/l 乙酰丁香酮的 1/2 改良 B5 液体培养基悬浮，稀释 5-10 倍用于转化。

##### 3. 大豆无菌苗转化

（1）将菌液倒在 4.5 厘米直径的培养皿中，倾斜培养皿，使露出茎尖生长锥的无菌苗顶端浸泡在菌液中 3-6 分钟。

（2）浸染后的芽尖用无菌滤纸吸干，把小苗根端插入改良 B5 培养基上于黑暗中培养 3-4 天，培养温度为 22-24℃。

（3）将无菌苗移栽到铺有上层蛭石下层壤土的花盆中，顶部覆盖蛭石，自然光照下生长，日温 23-28℃，夜温 20-25℃，隔天浇灌 1/2 改良 B5 培养基无机盐。

##### 4. 转化植株筛选与定植

转化植株长出 3 片叶后，喷洒 2.0mg/l（因基因型而不同）绿黄隆（沈阳农药厂生产，有效成分 25%）水溶液，以植株掉液滴为宜，未转化的对照植株在喷洒后 4 天停止生长，15 天左右开始死亡。转化植株在喷洒后，一些个体的变化与对照植株相似，另一些个体持续生长，变化不明显。存活植株长到 5 叶期，将其定植到田间。

5. 抗除草剂植株生长到 7-8 叶时，取叶片提取 DNA，采用 PCR 技术检测外源基因。PCR 阳性植株进行 Southern blotting 检测。在获得的 253 株抗除草剂 PCR 阳性植株中，约 60%以上（156/253）的植株为转基因个体。

## 6. 转基因植株子代的分子生物学鉴定

转基因植株产生的种子，播种在大田或温室。植株 3-4 叶期时取叶片提取 DNA，采用 PCR 技术检测外源基因，并统计外源基因在子代植株中的分离比例。结果表明，以无菌苗茎尖分生组织为转基因受体组织，能高效获得转基因植株。在约半数（16/30）的株系中，外源基因在子代植株中的分离比例符合孟德尔遗传定律。

说明书附图说明:

图 1、抗除草剂转基因(*als*)植株的 PCR 结果:

其中, 1、11 为 GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 2-8 为阳性结果, 9 为质粒 PCR 结(示 1.1kb 条带)果, 10 为阴性对照。

图 2: 抗除草剂转基因(*als*)植株的 Southern 杂交结果

其中, 1-5 为阳性结果, 6 为阴性对照, 7 为质粒 DNA/*EcoRI* (示 2.5kb 条带), 8 为  $\lambda$ DNA/*HindIII*。

图 3: 抗除草剂转基因(*als*)再生植株

对转基因小苗喷施浓度为 40mg/L 的绿黄隆溶液, 小苗的生长不受影响, 转基因植株对除草剂绿黄隆的耐受性强。

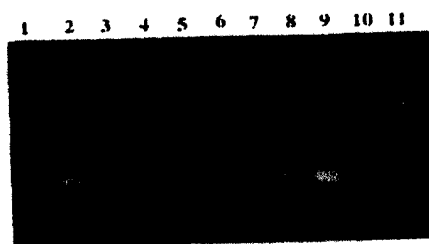


图 1

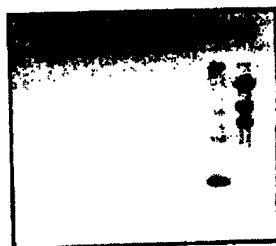


图 2



图 3