



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1422949 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 02141400.9

C12N 15/87 (2006.01)

(22) 申请日 2002.04.10

A01H 5/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A01H 4/00 (2006.01)

09/832626 2001.04.11 US

C08B 30/00 (2006.01)

(73) 专利权人 布鲁诺布二世有限公司

(56) 对比文件

地址 荷兰阿纳姆

姚献平等. 几种天然淀粉的理化性质. 造纸
化学品 7 2. 1995, 7(2), 第 13-14 页.

专利权人 阿韦贝公司

审查员 王慧梅

(72) 发明人 R·G·F·菲瑟

C·J·J·雷马克尔斯 E·雅各布森

J·E·M·B·范德伦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 张广育 刘玥

(51) Int. Cl.

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 5 页

(54) 发明名称

生产和转化木薯原生质体的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种生产木薯或其近亲种的具有再生植株能力的原生质体的方法。该方法包括利用木薯及其近亲种的外植体生产松散胚发生愈伤组织,再从松散胚发生愈伤组织中分离原生质体。本发明还涉及用上述方法获得的原生质体。本发明更进一步涉及一种转化这种木薯或其近亲种的原生质体的方法和用该方法获得的转化原生质体。另外,本发明还涉及一种从这些原生质体再生植株的方法和由这种方法获得的木薯或其近亲种植物。从上述木薯植物的块根中分离的淀粉的支链淀粉的含量增加。这种淀粉和从所述植物中分离该淀粉的方法也属于本发明的一部分。

1. 天然的支链淀粉木薯淀粉,其支链淀粉的含量至少为约 90wt%。
2. 权利要求 1 的淀粉,其支链淀粉的含量至少为约 95wt%。
3. 权利要求 1 的淀粉,其支链淀粉的含量至少为约 98wt%。
4. 权利要求 1 的淀粉,其粘度比普通木薯淀粉至少高约 30%。
5. 权利要求 1 的淀粉,其粘度比普通木薯淀粉至少高约 50%。
6. 权利要求 1 的淀粉,其粘度比普通木薯淀粉至少高约 80%。
7. 权利要求 1 的淀粉,该淀粉用物理方法、化学方法或酶促法进行了修饰。
8. 包含权利要求 1 的淀粉的组合物。
9. 权利要求 8 的组合物,该组合物选自纸产品、食品、药品、营养品、个人护理产品、去污剂、乳化剂、包囊剂和可生物降解的泡沫产品。
10. 制备权利要求 8 的组合物的方法,包括用权利要求 1 的淀粉代替常用淀粉。
11. 包含权利要求 7 的淀粉的组合物。
12. 权利要求 11 的组合物,该组合物选自纸产品、食品、药品、营养品、各人护理产品、去污剂、乳化剂、包囊剂和可生物降解的泡沫产品。
13. 制备权利要求 11 的组合物的方法,包括用权利要求 7 的淀粉取代常用淀粉。

生产和转化木薯原生质体的方法

[0001] 本申请是美国申请序列号 No. 09/832,626 的部分在续申请,而该申请又是 USSN09/180,481 申请的继续部分,所述申请的内容引入本文作为参考。

发明领域

[0002] 本发明涉及一种生产木薯或其近亲种的具有再生植株能力的原生质体的方法。该方法包括利用木薯及其近亲种的外植体生产松散胚发生愈伤组织,再从松散胚发生愈伤组织中分离原生质体。本发明还涉及用上述方法获得的原生质体。本发明更进一步涉及一种转化这种木薯或其近亲种的原生质体的方法和用该方法获得的转化原生质体。另外,本发明还涉及一种从这些原生质体再生植株的方法和由这种方法获得的木薯或其近亲种植物。

背景技术

[0003] 基因修饰或基因转化是把一个或几个基因加入到商业上感兴趣的基因型或克隆中的技术,原则上说,一个成功的转化体系需要有效的系统,在其中,新植株是由植株的特定部分(如茎、叶、节等)或在所述特定部分上诱导的特定组织(体细胞胚、胚发生愈伤组织、松散的胚发生愈伤组织(friable embryogenic callus))或来源于这些部分或特定组织的原生质体(没有细胞壁的单细胞)形成;一个把 DNA 分子转化到植物体的一部分或原生质体的系统;一个能够筛选出包含有导入基因并且能够表达该基因的组织或植株的系统。一般来说,原生质体是 DNA 递送最理想的系统,它们能作为单细胞培养,并生产出多细胞集落,从其中发育出植株。由原生质体生长形成的植株一般在起源上是纯系的,这就为转化系统提供了一个有用的工具,因为它能消除转基因植物中的嵌合现象。

[0004] 然而,利用植物原生质体再生出木薯是很困难的,仅仅只有一篇有关木薯原生质体再生出茎的报道(Shahin 和 Shephard,1980),他们利用充分膨大的叶片分离出原生质体。但是从那以后,虽然作了很多努力,利用原生质体(从叶、茎、根分离的)再生出植物始终没能再现(Anonymous,1985 ;Nzoghe,1991 ;Anthony 等,1995 ;Sofiari,1996)。一个可能的方法是利用含有胚发生细胞的组织。这样的细胞存在于顶端分生组织、幼叶或培养在补充有植物生长素的培养基中的体细胞胚(Stamp 和 Henshaw,1987a ;Raemakers 等 1993a ;),但是从这些组织中分离出的原生质体在最好情况下也只能生长出绿色愈伤组织和不定根(Sofiari. 1996)。近年来,出现了一种新型的体细胞胚发生方式,在体外系统中,这种胚的生长不会超过前球形期阶段,并且胚发生愈伤组织是高度松散的(Taylor 等.,1995),把这种松散的胚发生愈伤组织(friable embryogenic callus, FEC)转移到液体培养基中产生一种悬浮状的培养物。对于韭(Buitenvelde 和 Creemers,1994)、牵牛花(Power 等,1979)、稻(Kyozuka 等,1988)、甘蔗(Chen 等,1988)和小麦(Chang 等,1991),这些培养物是原生质体再生的非常好的来源。我们发现,迄今为止在木薯中 FEC 是唯一的能分离出具有再生植株能力的原生质体的组织。更进一步的,我们发现 FEC 能用来再生木薯,使木薯的块根含有的淀粉中基本上没有直链淀粉。

[0005] 发明概述

[0006] 所以,本发明提供了一种生产具有再生成植株的能力的木薯或其近亲种的原生质体的方法,该方法包括从木薯或其近亲种的外植体中分离出松散的胚发生愈伤组织,然后从所述松散的胚发生愈伤组织中分离出原生质体。如下文所述,很明显,为获得合适的原生质体,FEC 溶液中的培养物是非常重要的。所以,本发明还提供了一种使松散胚发生愈伤组织在液体培养基中培养的方法。

[0007] 原生质体优选利用酶促裂解植物细胞的细胞壁而获得。于是本发明提供了一种利用细胞壁降解酶,如纤维素酶、果胶裂解酶和 / 或解析酶混合物来生产原生质体的方法。

[0008] 很明显,为保证本发明的方法最佳地实施,提供外植体的植株要经过预处理,因此,本发明提供了一种用下文描述的植物生长素预处理外植体供体植株的方法。

[0009] 在外植体中,优选诱导胚发生,从而产生了一种创造性的方法,其中利用初生的、次生的或循环的胚发生组织生产松散的胚发生愈伤组织,在本发明的详细描述部分将作详细解释。另外,用上述方法得到的原生质体也属于本发明的一部分。

[0010] 理所当然的,要得到能再生成植株的原生质体的重要原因是该原生质体能很容易地被转化或转导或通过其他合适的方法能提供额外的遗传信息。因此可以提供具有感兴趣的遗传物质的木薯植株或其近亲种。因此,本发明也提供了一种转化(由任何合适的方式提供)木薯或其近亲种的原生质体以使其携带额外的遗传信息的方法,该方法可以通过用携带有额外遗传信息的细菌,如根癌土壤杆菌来感染上述原生质体而实现,也可以通过用电穿孔或化学穿孔技术提供携带有额外遗传信息的载体而实现,或者用包被有额外遗传信息的粒子进行轰击来实现。通过上述方法,来自松散的胚发生愈伤组织的原生质体被转化,本发明包括通过上述任何一种方法得到的原生质体。

[0011] 下文还将对被转化的植物,比如木薯的用途,作简要的介绍。

[0012] 植物基因技术的应用涵盖了一系列不同的技术,包括有用基因的分离、定性、操作,以及植物中修饰结构的重导入(Lonsdale,1987)。植物基因技术将大大促进植物育种的发展,例如可以从转基因农作物:稻(Chen等;Shimamoto等,1989)、玉米(Gordon-Kamm等.,1990;Vain等.,1993)、小麦(Marks等.,1989)和马铃薯(De Block,1988;Visser等.,1989)中表现出来。基因技术的迅速发展也使人们可以深入认识植物病原体的复杂分子机制,以及宿主植物的天然防御机制。这些技术可用于目的基因型的控制和高效鉴定,远远超出了传统育种技术的能力。

[0013] 例如,对来自悬浮培养物的原生质体进行电穿孔就能转化玉米(Rhodes等,1988)、稻(Toriyama等,1988)、和鸭茅(Horn等,1988)。

[0014] 提高对致病病毒抗性的试验也已经获得成功,所述病毒如烟草中的烟草花叶病毒(Powel Abel等.,1986)、马铃薯中的马铃薯X病毒(Hoekema等,1989)和番木瓜中的马铃薯X病毒(Fitch等.,1992)。在这些例子中,引入的性状是基于编码外壳蛋白的单基因的表达。在木薯中,利用外壳蛋白介导的抗性技术可以控制非洲木薯花叶病毒(ACMV)和木薯常见花叶病毒(CCMV)(Fauquet等,1992)。而且,编码生氰关键酶的基因已经被克隆(Hughes等,1994),这就使利用反义途径基因转化来操纵木薯的生氰作用成为可能。本发明的另一个实施方案是对木薯块根中的淀粉的操作。

[0015] 因此,本发明提供了一种转化的原生质体,该原生质体携带的额外遗传信息包含

有一个反义构建体,特别是一个能抑制直链淀粉合成途径的反义构建体。

[0016] 虽然原生质体是转化所必需的,但是原生质体本身不能在地里生长收获,因此,所述的原生质体必须能够再生成胚或 / 和植株。这是本发明的一个重要的实施方案,因为已经证明从木薯原生质体的再生是很困难的,我们怎样达到这个目的在发明详述部分将作详细的解释,更进步的信息可以参考 E. Sofiari 的“木薯的再生和转化”(Manihot Esculenta Crantz)。本申请包含了这篇文章的拷贝,所述内容引入本文作为参考。因此,本申请提供了一种由原生质体再生植株的方法,该原生质体被诱导产生胚,胚接着被诱导产生植株。

[0017] 通过上述方法获得的植株也是本发明的一部分,特别是块根中基本上不包含直链淀粉的植株。

[0018] 另外,本发明提供了一种从所述木薯块根中获得淀粉的方法。该方法与从马铃薯块根中分离淀粉的方法基本上相类似。本发明的一个实施方案是,该方法包括以下步骤:洗涤块根,然后捣碎并研磨,然后用离心机或水力旋流器等分离器从其纤维和浆汁中分离淀粉,接着把分离出的淀粉过筛、洗涤、干燥。洗涤可以在水力旋流器中进行,用真空滤器和干燥塔烘干。

[0019] 从木薯块根中获得的支链淀粉含量增加的淀粉也是本发明的一部分。这种淀粉优选基本不含直链淀粉,即意味着支链淀粉含量至少为约 90wt%,更优选至少约 95wt%,最优选至少约 98wt%,以淀粉(干物质)重量计。在本申请中,支链淀粉或直链淀粉含量低的淀粉就是指从提高了支链淀粉含量的植株中提取的淀粉。另外,这种淀粉还有许多不同的性质,比如分子量、内在粘性、颗粒大小和链长分布,这些在下文中将作进一步的阐述。

[0020] 发明的详细描述

[0021] FEC 的启动

[0022] 图 1 列出了获得 FEC 的过程,该过程开始于初生胚的诱导。初生胚的形成需要两个步骤,第一步是在培养基中培养外植体,为了启动胚的形成,在该培养基中补充加入了盐和维生素(最好是 mruashige 和 skoog(1962))、糖源(比如 20 克 / 升蔗糖)和植物生长素(比如 1-8 毫克 / 升毒莠定或麦草畏或 2,4-D),在第一号培养基中培养 10 到 15 天之后,形成双极鱼雷形胚,该双极鱼雷形胚拥有明显的下胚轴和子叶原基。然后把带有该双极鱼雷形胚的外植体转移到步骤 2 培养基(和第一步的培养基一样但不含植物生长素,另加入了细胞分裂素),培养至鱼雷形胚发育成熟,成熟的胚拥有很大的绿色子叶。

[0023] 初生胚可以从合子胚(Stamp 和 Henshaw 1982 ;Konan 等,1994)、幼叶外植体或顶端分生组织(Stamp 和 Henshaw,1987a ;Szabados 等 1987 ;Mroginsky 和 Scocchi,1993 ;Raemakers 1993a ;Narayanaswamy 等,1995)和花组织(Mukherjee,1995 ;Woodward 和 Puonti-Kaerlas,2001)中获得。用上述方法可以评价多种不同基因型形成初生胚的能力。在这个方案中,初生体细胞胚仅仅只能在固体培养基中培养后才能形成,而在液体培养基中培养不能形成,而且只有在培养基中加入了植物生长素毒莠定、麦草畏或 2,4-D,而不含 LAA、IBA 或 NAA 的情况下(初生)体细胞胚才能形成。

[0024] 在本发明的技术方案中,每个培养的外植体形成的成熟胚数目随基因型不同而变化。基因型 M. Col1505、M. Col22 和 Gading 在每个培养的叶外植体形成的成熟胚(ME/CLE)数量最高,但是形成的成熟胚数量很少。在 M. Col22 中,由体外生长植物分离并在含有 4 毫克 / 升 2,4-D 的步骤 1 培养基中培养的叶外植体最多只有 22% 形成 ME,最多形成 0.8 个

ME/CLE。在含有 8 毫克 / 升 2,4-D 的步骤 1 培养基中培养叶外植体最多只有 49% 形成 ME, 最多 3.5 个 ME/CLE, 更高的 2,4-D 浓度不能再提高外植体的胚发生能力。

[0025] 为了促进叶外植体形成初生体细胞胚的能力, 我们让供体植物在不同的条件下生长。在不同的光照时间下 (8, 12, 16 或 24 小时), 供体植株的体外生长对于胚发生反应没有影响, 但是降低光照强度却能产生阳性效果, 从 $8 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的条件下生长的供体植株分离, 并且在步骤 1 的培养基中培养的叶外植体得到了最佳结果。

[0026] 其它的研究表明, 对于一定的基因型, 麦草畏 (1-66 毫克 / 升) 和毒莠定 (1-12 毫克 / 升) 诱导初生胚发生优于 2,4-D (Ng1992 ; Sudarmonowati 和 Henshaw, 1993 ; Taylor 和 Henshaw, 1993)。Mathews 等 (1993) 提高了基因型 M. Col1505 的初生胚发生效率, 他把外植体在步骤 1 培养基中培养 15 天后转移到补充加入了 0.5% 炭的没有生长调节剂的培养基中, 这种培养基促进成熟, 因此成熟胚的数量从对照的 0.4 增加到 3.4 ME/CLE。如果供体植株用植物生长素如 2,4-D 或毒莠定或麦草畏预处理会产生更好的结果。为此, 让植株生长在 MS20 液体培养基中, 并且在生长 12 天后补加植物生长素 (最终浓度为 8 毫克 / 升), 两天后, 叶外植体从供体植物中分离出来, 培养在含有 8 毫克 / 升 2,4-D、毒莠定或麦草畏的步骤 1 培养基中, 结果 M. Col122 克隆产生 9.4 个 ME/CLE, 这比用水处理的对照植株所得到的 3.5 个 ME/CLE 要高得多 (表 3)。

[0027] 植物生长素预处理的一般适用性在几种不同基因型中作了测试。没有预处理供体植株的, 只有两种基因型形成 ME 并且低频率。经过预处理的供体植株, 几乎所有基因型的叶外植体都形成 ME。

[0028] 最后, 我们从 28 种被测基因型的 24 种中得到了成熟的初生体细胞胚 (表 1, 除了 TMS30221, TMS30001, TMS30572 和 Sao Paolo 外)。这些数据表明, 木薯中几乎所有的基因型都有体细胞胚发生, 到目前为止已经证明, 有 60 多种基因型能够进行初生体细胞胚发生。(Thro 等, 1999)。

[0029] 来源于合子胚和叶的初生体细胞胚可以作为外植体用来启动次生体胚的形成 (Stamp 和 Henshaw, 1987b ; Szabados 等, 1987 ; Mathews 等, 1993 ; Raemakers 等, 1993bc ; Luong 等, 1995)。在补加有植物生长素的培养基中连续培养体细胞胚, 产生一种体细胞胚发生的循环系统。这种传代培养体细胞胚使之形成次生胚的方式对胚发生组织的形态有影响。在含有 2,4-D 的固体培养基中及黑暗的环境下再培养一个月, 体细胞胚的胚块会发育成为指状胚, 该指状胚最初在较早形成胚的顶端形成。该胚不经过鱼雷形胚阶段。

[0030] 把胚块转移到步骤 2 培养基中并在光照的条件下继续培养, 胚块继续发育 (Szabados 1987)。一般的, 成熟的体细胞胚在光照的条件下在步骤 1 培养基中培养 20 天后, 将外植体转移到步骤 2 培养基中培养直至成熟。在这个系统中, 胚发育成成熟胚, 带有大的绿色子叶的成熟胚用于开始一个新的胚发生循环, 在其他的系统中, 鱼雷形胚被用来开始一个新的次生体细胞胚发生的循环。

[0031] 在表 1 提到的基因型的 1420 个植株中, 对这个成熟胚增殖系统已经作了测试。尽管大多数基因型中只有一些成熟初生胚可以利用, 但是除了一种以外, 所有基因型在补充有 2,4-D 的培养基中培养, 都能生长出新的成熟胚, 而且比初生体细胞胚发生的机率高得多 (Raemakers 等, 1993b, c, 2000, 2001, Sofiari 等 1996)。通过定期传代培养成熟胚, 胚发生能够保持一年以上 (Szabados 等, 1987 ; Mathews 等, 1993 ; Raemakers, 1993)。新的体

细胞胚在液体培养基和固体培养基中都能够形成,我们发现所有的基因型在液体培养基中比在固体培养基中能产生更多的胚,而且在开始次生体细胞胚发生的新循环之前,相对于整个胚来说将胚分成片断能增加产量。比如 M. Col22,在固体培养基中培养的完整胚每个胚只能产生 8 个胚,而在液体培养基中培养分成片断的胚,每个培养的胚能生产 32 个胚 (Raemakers 等,1993c)。不仅 2,4-D、麦草畏、毒莠定,而且 NAA 也能诱导次生胚发生,IBA 和 LAA 不能诱导次生胚发生。NAA 已成功用于 Adira 1, Adira 4, Gading, line 11, M. Col22, M. Col1505, TMS90853 和 Gading (Sofiari, 1996)。一般来说,在补加有 NAA 的培养基中比在补加有 2,4-D、麦草畏或毒莠定的培养基中有更多的成熟胚产生,而且 NAA 诱导成熟胚的发育比 2,4-D、麦草畏或毒莠定诱导的胚发育要快。缩短培养周期是有益的,特别是在大规模操作时。

[0032] 在组织学上,用 2,4-D 诱导的新次生胚垂直附着在外植体,而用 NAA 诱导的次生胚水平附着。

[0033] 科学家在获得某些木薯基因型的胚发生培养物过程中仍然存在困难 (Mroginski 和 Scocchi, 1992; Taylor 等, 1992; Narayanaswamy 等, 1995; Sudarmonowati 和 Bachtiar, 1995), 主要问题不在于从初生外植体中获得胚发生组织,而在于通过次生胚发生大量增殖该组织。为了达到此目的,包含有鱼雷形胚或成熟胚的组织都能被用来增殖,鱼雷形胚的增殖是基因型高依赖性的,而成熟胚的增殖在很大程度上是基因型非依赖性的 (Raemakers, 1993)。初生和次生体细胞胚发生的特征都在于带有两极结构的繁殖体的形成。带有两极结构的鱼雷形胚在补加有植物生长素的步骤 1 培养基中已经形成,因此, Taylor 等 (1995) 提出了有组织的胚发生这一术语。有组织的细胞定义为一群使组织和器官形成一个性质一致的整体的活跃分裂的细胞 (Walker, 1989)。

[0034] Taylor 等已研发出了一种组织程度较低的体细胞胚发生类型 (1995)。经过连续选择,在补加了 10 毫克 / 升的毒莠定的 Gresshoff 和 Doy (1972) 盐和和维生素培养基 (GD2) 中培养的有组织的胚发生组织逐渐会转化为组织程度较低的组织,该组织是由非常松散的愈伤组织样 (前) 球形胚团块组成。所以,把这种组织命名为松散的胚发生愈伤组织 (FEC)。FEC 中的细胞连续地处于脱离群体控制的状态,因此没有组织成统一的结构。FEC 在由 Gresshoff 和 Doy (1972) 盐和和维生素、7 克 / 升 Daichin 琼脂、20 克 / 升蔗糖和 10 毫克 / 升毒莠定组成的培养基 (固体 GD2) 中持续培养,每三个星期将松散胚在如上所述的培养基上传代培养。为了能启动液体悬浮培养物的产生,把 0.5 克松散胚转移到含有 50 毫升液体培养基的 200 毫升的长颈瓶中,该培养基补加了 Schenk 和 Hildebrandt (1972) 盐和和维生素、60 克 / 升蔗糖和 10 毫克 / 升毒莠定 (液相 SH6)。该培养基每隔 2-7 天更换一次,14 天后,把每个瓶中的物质分装在另外 5 个长颈瓶中,调节 pH 值到 5.7,高压灭菌。培养箱温度保持 30℃,光照周期为 12 小时,光照强度为 $40 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。在补加有 6% (w/v) 蔗糖、10 毫克 / 升毒莠定的 Schenk 和 Hildebrandt (1972) 培养基 (SH6) 中培养 FEC,以启动悬浮培养物的形成,每隔 2-3 天更换培养基一次。

[0035] 为了使培养物处于高度松散状态,FEC 必须每两个月过筛一次,操作中能通过网眼为 1mm^2 的筛子的 FEC 用来传代培养。

[0036] FEC 在 GD2 或 SH6 培养基中几乎不形成鱼雷形胚。如果 FEC 培养在成熟培养基中,就可形成鱼雷形胚和随后形成成熟胚。成熟培养基由 Murashige 和 Skoog (1962) 盐和维生

素、1 毫克 / 升的毒莠定组成,培养过程中每 3 星期更换一次成熟培养基。

[0037] 成熟胚培养在补加有 2,4-D、毒莠定、麦草畏或 NAA 的 MS20 培养基中被诱导,导致次生体细胞胚发生。初生和次生体细胞胚比较容易在广泛的基因型中建立(见表 1),而 FEC 暂时只限于几种基因型。虽然还要做进一步的研究来使这些系统能适合更多的基因型,但是用 FEC 来建立一种新的体细胞胚发生系统和基因转化是可能的。对这个过程起重要作用的是高度有组织的组织的可利用性和其转化为 FEC 的能力。Taylor 等(1995)使“使用的有组织的胚发生组织”在鱼雷形期增殖,从而启动 FEC 形成。这个方法中的两步(启动有组织的组织和转化成无组织的组织)是 FEC 形成成功启动的决定因素,且都是基因型依赖性的。假如使有组织的组织在如 Raemakers(1993)所述的成熟阶段增殖,则该组织转化为 FEC 的能力是启动 FEC 形成决定性的一步。有组织的组织能否作为起始材料仍需研究。如果不能使用有组织的组织,那么这些组织在诱导使之形成 FEC 之前的非成熟阶段就应该首先进行增殖,该增殖可以通过以高密度培养外植体或减少循环周期就能很容易的实现。

[0038] 在 R60、R90、M7、TMS60444 和 Adira4 中已经获得 FEC 系(Raemakers 等,2000,2001),利用 R60、R90、M7、TMS60444 和 Adira4 的 FEC 再生出植株也获得了成功(Raemakers 等,2000,2001)。Taylor 等(2000)也在基因型品系 2、M. col1505、TMS90853、Kataoli 和 Bonoua Rouge 中获得了 FEC 系。

[0039] 用原生质体再生出植株

[0040] 原生质体的分离

[0041] 为了分离原生质体,FEC 一般培养在固体培养基 GD2 中或液体培养基 SH6 中,但是在液体 SH6 培养基中培养 1-3 周从 PEC 获得的原生质体的产量最高。

[0042] 把两克 FEC 放入装有 10 毫升细胞壁裂解液的培养皿(直径 9 厘米)中,该细胞裂解液是由以下物质组成的混合物:细胞壁降解酶;10 毫克 / 升果胶裂解酶 10 克 / 升纤维素,200 毫克 / 升解析酶生长调节因子(1 毫克 / 升 NAA、1 毫克 / 升 2,4-D、1 毫克 / 升玉米素),主要盐(368 毫克 / 升 CaCl_2 ,34 毫克 / 升 KH_2PO_4 ,740 毫克 / 升 KNO_3 ,492 毫克 / 升 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),次要盐(19.2 毫克 / 升 NA-EDTA、14 毫克 / 升 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和渗透剂(91 克 / 升 D-甘露醇)和 0.5 克 / 升 MES。细胞壁裂解酶纤维素酶(1-10 克 / 升)加解析酶(200 毫克 / 升)能成功地分离出原生质体。果胶酶(0.001-0.01 克 / 升)和 / 或 Driselase(0.02 克 / 升)的加入能增加原生质体的产量。温育 18 小时后,往溶液中加入 10 毫升洗涤培养基。该洗涤培养基的渗透压浓度为 0.530mOsm/kg,由以下物质组成:主要盐(参见细胞壁裂解液),45.5 克 / 升甘露醇和 7.3 克 / 升 NaCl。消化过的组织用孔径为 73um 的滤器(PA55/34Nybolt-Switzerland)过滤到 250 毫升的广口杯中,过滤液等量分装到两个 12 毫升的锥形拧盖试管中,600rpm 离心 3 分钟(Mistral2000),弃去上清液,重复此过程两次,用含有主要盐和次要盐(参见细胞壁裂解液)和 105 克 / 升蔗糖的溶液 9.5 毫升再悬浮原生质体溶液。保持 pH 为 5.8,渗透压为 0.650mOsm,将原生质体溶液平衡 5 分钟,然后慢慢加入 0.5 毫升的冲洗液,700rpm 离心 15 分钟(Mistral 2000),原生质体在蔗糖和洗涤液之间浓集成一条带,用巴氏德管收集原生质体层,再用标准血球计数皿计算其产量。

[0043] 原生质体的培养

[0044] 原生质体在装有 10 毫升同样液体培养基的培养皿中培养,该液体培养基已加了 0.2% W/V 琼脂糖使之固化(Dons en Bouwer,1986),以下培养基可形成微愈伤组织:

[0045] -TM2G 培养基 (Wolters 等,1991),仅补加植物生长素 (0.1-10 毫克 / 升 NAA 或 0.1-10 毫克 / 升毒莠定,或 0.1-10 毫克 / 升 IAA,或 0.1-10 毫克 / 升 2,4-D,或 0.1-10 毫克 / 升麦草畏)或在补加植物生长素时还补加细胞分裂素 (0.01-1 毫克 / 升玉米素,0.01-1 毫克 / 升 2-iP,0.01-1 毫克 / 升 BA,0.01-1 毫克 / 升 TDZ,0.01-1 毫克 / 升激动素)。

[0046] -培养基 A (Murashige 和 Skoog (1962) 盐和和维生素,4.5 克 / 升肌醇,4.55 克 / 升甘露醇,3.8 克 / 升木糖醇,4.55 克 / 升山梨醇,0.098 克 / 升 MES,40 毫克 / 升腺嘌呤硫酸盐和 150 毫克 / 升酪蛋白水解产物,0.5 毫克 / 升 d-泛酸钙,0.1 毫克 / 升氯化胆碱,0.5 毫克 / 升抗坏血酸,2.5 毫克 / 升烟酸,1 毫克 / 升吡哆醇-HCl,10 毫克 / 升硫胺-HCl,0.5 毫克 / 升叶酸,0.05 毫克 / 升生物素,0.5 毫克 / 升甘氨酸,0.1 毫克 / 升 L-半胱氨酸和 0.25 毫克 / 升核黄素和 59.40 毫克 / 升葡萄糖),仅补加植物生长素 (0.1-10 毫克 / 升 NAA 或 0.1-10 毫克 / 升毒莠定,或 0.1-10 毫克 / 升 IAA,或 0.1-10 毫克 / 升 2,4-D,或 0.1-10 毫克 / 升麦草畏)。还补加细胞分裂素 (0.01-1 毫克 / 升玉米素,0.01-1 毫克 / 升 2-iP,0.01-1 毫克 / 升 BA,0.01-1 毫克 / 升 TDZ,0.01-1 毫克 / 升激动素)。

[0047] 培养基每隔 10 天用 9 毫升的新鲜培养基更换一次,在第一种培养基中培养两个月后。挑选质量好的 FEC,继续培养使之继续增殖或使之成熟。为了使 FEC 继续增殖,把 FEC 转移到补加有 40 克 / 升蔗糖、7 克 / 升 Daichin 琼脂和 2 毫克 / 升毒莠定的 Gresshoff 和 Doy (1974) 培养基 (GD4) 中。三星期后,把 FEC 转移到补加有 20 克 / 升蔗糖、7 克 / 升琼脂和 10 毫克 / 升毒莠定的 Gresshoff 和 Doy (1974) 培养基 (GD2) 中。再把 0.1 克 FEC 转移到补加有 10 毫克 / 升毒莠定的 SH6% 液体培养基中,以启动悬浮培养物的产生。两星期后把悬浮物用长颈瓶分装,使每个瓶中有体积为 1.0 毫升的初步收集细胞。

[0048] 培养 2 个月之后,10⁴ 个原生质体在补加有 0.5 毫克 / 升 NAA 和 1 毫克 / 升玉米素的 TM2G 培养基中以 10⁵ / 毫升的密度培养,产生 1058 个微愈伤组织,而以 10⁶ / 毫升的密度培养的 10⁴ 个原生质体,只能产生 64 个微愈伤组织。

[0049] 用培养基 A 代替 TM2G 培养基,在上述两种密度下微愈伤组织的产量都大大减少。在这个阶段,至少会产生三种类型不同的愈伤组织,其中一种由球形胚组成,最常在 10⁶ 密度下培养的原生质体中形成。其中一些发育成子叶状结构,浅绿色。但是这些胚不能正常发芽。另一种类型生长速度快,由大的致密愈伤组织组成,在上述两种密度下培养原生质体都能形成。这些愈伤组织不形成胚;第三种是高度松散的愈伤组织,在上述两种密度下都能形成。在 2-5×10⁵ 密度下形成 (TM2G 培养基) 的 60% 的愈伤组织是松散的和胚发生的 (TM2G 培养基)。把 FEC 进行传代培养使之继续增殖或使其成熟。

[0050] 来源于原生质体的 FEC 的增殖

[0051] 选择 FEC 之后,将其中的 0.1g 在加有 2 毫克 / 升毒莠定的 GD4 培养基中培养 3 个星期,使之增殖为 0.7 克的组织,这种组织的 95% 以上是由高质量的 FEC 组成的。接着,通过在补加 10 毫克 / 升毒莠定的 GD2 培养基中传代培养 3 个星期而保持该组织。把 FEC 转移到液体培养基中使之开始产生悬浮培养物。这种原料产生的收集细胞体积 (PCV) 增加比初始原料略高 (数据没有显示)。

[0052] 来源于原生质体的 FEC 的成熟

[0053] 为了诱导胚的成熟, FEC 在 TM2G 培养基中培养两个月后分离在成熟培养基中培养,成熟培养基由 Murashige 和 Skoog (1962) 盐和和维生素、10 克 / 升 Daichin 琼脂,0.1 克 /

升肌醇, 20 克 / 升蔗糖, 18.2 克 / 升甘露醇, 0.48 克 / 升 MES, 0.1 克 / 升酪蛋白水解产物, 0.08 克 / 升腺嘌呤硫酸盐, 0.5 毫克 / 升 d- 泛酸钙, 0.1 毫克 / 升氯化胆碱, 0.5 毫克 / 升抗坏血酸, 2 毫克 / 升烟酸, 1 毫克 / 升吡哆醇-HCl, 10 毫克 / 升硫胺-HCl, 0.5 毫克 / 升叶酸, 0.05 毫克 / 升生物素, 0.5 毫克 / 升甘氨酸, 0.1 毫克 / 升 L- 半胱氨酸和 0.25 毫克 / 升核黄素和 1 毫克 / 升毒莠定组成。该成熟培养基每隔 3 星期更换一次。

[0054] 在此培养基上, 存在一个从增殖到成熟的转变。因此在液体成熟培养基中培养两个星期后, 收集细胞体积以 4 的因数增加。转移到固态成熟培养基后继续增殖。两个星期后, 固态培养基中的大多数胚发育成球形胚, 这些球形胚中只有一些进一步发育。在固态成熟培养基中培养一个月后就能看见形成的第一个鱼雷形胚。成熟胚和鱼雷形胚的数量和平板效率没有关联, 但和最初培养的原生质体的密度有关系。假如原生质体培养在不含生长调节因子的 TM2G 培养基中则不能得到这种胚。若原生质体是培养在补加有 0.5 毫克 / 升 NAA 和 1 毫克 / 升玉米素的 TM2G 培养基中, 则能生产最多数量的成熟胚和鱼雷形胚。假如用毒莠定代替 NAA, 那么鱼雷形胚和成熟胚的数量大大降低 (表 2)。经测试, 毒莠定以浓度为 2 毫克 / 升为最佳。培养 3 个月后, 每个琼脂糖胶块能分离出 60 个到 200 个的鱼雷形胚和成熟胚。鱼雷形胚培养在新鲜成熟培养基或补加有 0.1 毫克 / 升 BAP 的 MS2 培养基中, 能以高几率发育成熟。

[0055] 次生体细胞胚发生和来源于原生质体的成熟胚的萌芽

[0056] 在补加有 10 毫克 / 升 NAA 或 8 毫克 / 升 2,4-D 的固态或液态 MS2 培养基中培养, 只有一些鱼雷形胚发育成次生胚 (数据没有显示)。成熟胚是形成次生胚的更好外植体。与 NAA 比较, 在固态或液态培养基中 2,4-D 在诱导次生胚发生方面是较优的, 假如成熟胚首先在含有 2,4-D 的培养基中培养, 然后再在含 NAA 的液态培养基中培养, 产生的次生胚与单独在含 2,4-D 的培养基中培养产生的次生胚差不多。同样在含有 2,4-D 的培养基中经历了一个次生体细胞胚发生周期的胚, 再在补加有 10 毫克 / 升 NAA 的 MS20 培养基中培养, 有很高的次生胚发生效率。

[0057] 比较液体培养基中植物生长素 2,4- 二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 或萘乙酸 (NAA) 诱导的循环或次生体细胞胚的萌芽。在所有的基因型中, 脱水能促进 NAA 诱导的胚的正常萌芽, 但是要使其高效率萌芽, 脱水胚的培养基中必须补加入细胞分裂素, 如苄基氨基嘌呤 (benzylaminopurine) (BAP), 且发育成的秧苗的形态依赖于 BAP 的浓度。BAP 的浓度为 1 毫克 / 升时, 植株的主根粗而短, 须根形成许多节。BAP 的浓度为 0.1 毫克 / 升时, 主根细而长, 茎只有一两个顶端分生组织。假如胚被不适当的脱水, 那么相对于适当脱水的胚来说, 刺激其萌芽就需要更高浓度的 BAP。培养在黑暗环境下的脱水胚相对于在光照环境下培养的胚来说, 需要较低的 BAP 浓度, 且发芽速度较快。体细胞胚诱导开始后四个星期完整植株形成。2,4-D 诱导的胚显示不同的反应。只有在一种基因型中脱水作用加强了 2,4-D 诱导的胚的萌发, 在另外三种中没有提高。对于所有的基因型来说, 脱水作用能促进根的形成, 在黑暗环境中培养的胚主要形成不定根, 而在光照环境下培养的胚主要形成主根。

[0058] 基因转移系统

[0059] 在过去的几年里, 已经产生了几种可以把 DNA 转移原生质体的转移技术, 如硅纤维技术 (silicon fibers) (Kaepler 等, 1990)、显微注射技术 (De Laat 和 Blaas, 1987) 和电泳技术 (Griesbach 和 Hammond, 1993)。常用的且适用的技术是土壤杆菌介导的基因递

送、微粒 / 粒子轰击和原生质体电穿孔技术。

[0060] 根癌土壤杆菌 DNA 递送系统是最常用的技术, 该技术可能涉及到用这种方法在植株中递送 DNA 的首次发明。最初该系统只限于高凉菜属和茄科 (Solanaceae) 植物, 特别是烟草。如今, 土壤杆菌介导的转化的用途发生了很大改变, 已经可以用来转化广泛范围的植物, 包括最重要的单子叶植物如玉米和稻 (Wordragen 和 Dons 给予了综述)。

[0061] 虽然木薯是土壤杆菌的宿主, 但已经证明用该菌转化木薯并不是很容易。

[0062] 来自木薯的 FEC 通过根癌土壤杆菌已经得到有效的转化 (Raemakers 等, 2000, Schreuder 等, 2001)。Raemakers 等, 2000 和 Schreuder 等, 2001 描述的方法用于从 Adira 4 和 TMS604444 基因型产生基因修饰植物已获得成功, 该基因型携带的反义 bgss 基因处于 CaMV 启动子的控制下。

[0063] 原则上, 原生质体是 DNA 递送的最理想的外植体。他们能作为单细胞培养, 该单细胞能产生可发育为植株的多细胞集落。由原生质体发育而来的植物一般都是纯系来源, 这就为转化系统提供了一个有用的工具, 因为它能消除转基因植物中的嵌合现象, 但是, 高度物种依赖性的再生系统阻碍原生质体的这种用途。已经证明, 用 PEG 结合原生质体一起使用能改变质膜, 继而导致逆向渗透, 从而能使 DNA 进入细胞质, 例如, 描述于 *Lolium multiflorum* (Potrykus 等, 1985) 和 *Triticum monococcum* (Lörz 等, 1985)。其他增加质膜和细胞壁对 DNA 的渗透性的技术是电穿孔技术 (参见 Jones 等, 1987), 在这个方法中, 电脉冲能使 DNA 进入细胞。稻是用原生质体电穿孔技术获得可繁殖植株的第一种农作物 (Shimamoto 等, 1989)。

[0064] 用粒子轰击或 biolistics 递送外源 DNA 的技术为木薯转化提供了一个可选择的方法, 粒子轰击是唯一一种可以把 DNA 递送到几乎所有组织细胞中的技术。用这个方法获得的第一个转基因植物是烟草 (Klein 等, 1989)。按照这个成功的转化方法, 粒子轰击被广泛用于不容易受根瘤土壤杆菌感染的植株, 特别是单子叶植物中。用于 DNA 递送的几种粒子加速装置的改进产生了最新模型 Biolistic™PDS-1000 (Bio-Rad 实验室, Richmond, Ca)。这种装置被普遍采用, 但是目前其价格较高, 一般用 DNA 包被的钨或金颗粒作为微粒来递送 DNA 到靶组织 (综述于 Song stad 等, 1995)。

[0065] 基因修饰所用的筛选和报道基因

[0066] 为了能鉴别出被转化的细胞, 目的基因必须和可选择的标记基因连接在一起, 该标记基因是筛选转化细胞所必须的。筛选是基于转化细胞 / 组织的可见性状进行的。例如从萤火虫中分离的荧光素酶基因, 编码这个基因且提供底物荧光素的植物细胞就会发光, 用特殊的设备能够检测到 (Qw 等, 1986)。筛选转化组织的另一种方法是引入一个基因, 该基因编码对抗生素或除草剂的抗性 (Thompson 等, 1987 ; Gordon-Kamm 等, 1990)。

[0067] 许多抗生素和除草剂被用来作为植物转化的选择试剂。在谷类作物中, 对除草剂药物膦丝菌素 (PPT) 的抗性被用来筛选转基因植物 (Cao 等, 1990)。在番木瓜 (Fitch 等, 1994)、葡萄 (Nakano 等, 1994 ; Scorza 等, 1995)、玉米 (Rhodes 等, 1998) 和水稻 (Chen 等, 1987) 中, 赋予卡那霉素及相关抗生素抗性的新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 基因 (Fraley 等, 1986) 被用来作为筛选标记。

[0068] 在木薯中, 以上筛选系统都是可用的, 但是基于 PPT 的筛选更有效, 因为它能提高 FEC 形成成熟胚的能力从而促进植株的再生。

[0069] 下文将描述怎样修饰木薯基因,从而生产出块根中有高含量的支链淀粉的木薯植株。

[0070] 木薯 gbss 基因的分离和植物转化载体的构建

[0071] 在以前的研究中, gbss 基因是用马铃薯 gbss 基因 (Visser 等,1989) 作为探针来从木薯中分离的 (Salehuzzaman 等,1993)。把 gbss 基因按照反义方向亚克隆到 pUC19 的马铃薯 gbss 启动子 (Visser 等,1991) 和胭脂碱合成酶终止子之间,构建成载体 pAG61 (Salehuzzaman 等,1993)。也可以使用其它优选块根特异性启动子如木薯蛋白合成延伸因子 1 α (Suhandono 等,2001),木薯 gbss 基因启动子或者更常规的启动子如 CaMV 指导 gbss 基因的表达。

[0072] 从 pJIT100 (Guerineau 等,1993) 中分离完整的荧光素酶基因 (BgIII 片段),将其插入到 pAG61 的 BamHI 位点,于是产生两种不同的载体 :pGBSSas2 和 pGBSSas7 (这两个载体的区别在于荧光素酶基因与反义 gbss 基因彼此之间的方向不同)。这两种构建体都能用来成功生产高支链淀粉含量的木薯植株。

[0073] 所用的植物原料和组织培养基

[0074] 每月在补加有 Murashige 和 Skoog (1962) 盐和维生素和 40 克 / 升蔗糖的培养基 (MS4) 中传代培养一个结节的切取物,使基因型为 TMS6044 的植株得以保持。松散胚发生愈伤组织 (FEC) 系通过以下方法诱导产生 :

[0075] - 从供体植株中分离分生组织或未成熟叶。

[0076] - 在补加有 6 毫克 / 升 NAA 和 6 毫克 / 升毒莠定的 MS40 培养基中培养分生组织 / 叶。

[0077] - 分离致密胚发生组织,在补加有 Gresshoff 和 Doy (1974) 盐和和维生素、60 克 / 升蔗糖和 10 毫克 / 升毒莠定的培养基 (GD6) 中培养。

[0078] - 分离培养在 GD6 培养基中培养的 FEC (球形单位的聚合小团块)。在 GD6 培养基中传代培养 3 周以维持 FEL。把 0.5gFEC 转移到装有 50 毫升液体培养基 (SH6) 的 200 毫升长颈瓶中使其产生液体培养物,该培养基中补加有 Schenk 和 Hidebrandt (1972) 盐和和维生素、60 克 / 升蔗糖和 10 毫克 / 升毒莠定。培养基一星期更换两次。两星期后,把每个长颈瓶中的物质分装到 5 个新的瓶中,在转速为 120rpm 的摇床 (LAB-line Instruments Inc. Model 3519) 上培养。

[0079] 粒子的 DNA 包被

[0080] 采用 Cabe 等 (1988) 的改进方法,用 DNA 来包被粒子。80 微克 DNA (用 Promega 公司的 WizardTM Maxipreps DNA 纯化系统从载体 pGBSSas2 和 pGBSSas7 中分离) 与 10 毫克金颗粒 (1.6 μ m, BioRad)、30 微升 5M NaCl、pH 为 8.0 的 5 微升 2M tris-HCl、965 微升 H₂O、100 微升 25% PEG 1550、100 微升 0.1M 亚精胺和 50 微升 2.5M CaCl₂ 混合,离心,用 10 毫升无水酒精再悬浮沉淀物,作短时间的超声处理。吸取 160 微升悬浮液移到倒置在巨载体上的巨载体座的孔中。5 分钟后移开巨载体座。把此盖有一薄层金颗粒的巨载体在烤炉中烘干 (10 分钟,40 $^{\circ}$ C) 用于轰击。

[0081] FEC 的轰击和转基因植物的筛选

[0082] FEC 在液体 SH6 培养基中至少培养 5 星期,用孔径为 1 毫米的滤器过筛并收集。把一百毫克的 FEC 平铺在 GD6 培养基中,用 BioRad PDS-1000He biolistic 装置轰击 (氦压为

1100p. s. i, 防爆盘与巨载体之间和巨载体与阻挡盘之间距离都是 0.5 厘米, 阻挡盘和 FEC 之间是 5.0cm, 27 英寸 Hg 真空)。

[0083] 分别用 GBSSas2 或 GBSSas7 轰击 212 个和 184 个装有来自 TMS60444 的 FEC 的 Petri 培养皿。轰击之后, 被轰击的 FEC 培养在装满了液体 SH6 培养基的塑料罐中。两星期后, 收集固体 GD6 培养基中的 FEC, 检测其荧光素酶活性。每一个荧光素酶 (LUC) 点作为一个单独系传代培养, GBSSas2 构建体总共产生 186 个 LUC 点, GBSSas7 产生 222 个 LUC 点。因为准确定位含有 LUC 活性的 FEC 单元并避免转基因组织的丢失是不可能的, 因此 LUC 点周围直径 0.5-1 厘米范围的组织都被转移到液体 SH6 培养基中。两星期后, 检测 FEC 的荧光素酶活性, 没有荧光素酶活性的系被丢弃, 含有 4 个或更多个活性位点的株系用于亚块分离 (subclumpdivision), 含有 1-3 个位点的株系又一次被转移到液体 SH6 培养基中, 两个星期后将 LUC 点的数量增到 4 个或更多的这些株系用于亚块区分离, 其他的被丢弃。

[0084] 用 GBSSas2 轰击获得了 44 个株系, 用 GBSSas7 轰击获得 40 个株系。通过亚块分离技术 (Raemakers 等, 2000) 分离、纯化转基因组织。亚块分离从传代培养荧光素酶阳性点周围的组织 (直径 0.5-1cm) 开始。这些组织在 GD6 培养基中尽可能被分开。两个星期后 Petri 培养皿上覆盖了小块的 FEC 组织。仅传代培养 LUC 阳性块。为此把这些块分成亚块在 GD6 培养基中培养。为植株再生而培养组织之前, 该选择步骤要再重复 1-2 次或更多。因此挑选了 84 个株系, 把这些株系每隔 2-3 周在成熟培养基 (补加有 1 毫克 / 升毒莠定的 MS4) 中传代一次, 持续 10-12 周。从 FEC 中分离出鱼雷型体细胞胚, 在补加有 0.1 毫克 / 升 BAP 的 MS4 培养基中培养, 该培养基能促使胚的继续成熟。成熟的体细胞胚首先在液体培养基中培养两个星期, 然后一直在固体萌芽培养基 (MS4+1 毫克 / 升 BAP) 中培养。植株在 MS4 培养基中生根。从培养的 44 个 GBSSas7 系中获得 31 株植株, 从 40 个 GBSSas7 系中获得 27 株植株。这些植株先在 Murashige 和 Skoog 培养基中生长, 该培养基补加有 8% 蔗糖以使淀粉位于木薯植株的茎 (Salehuzzaman 等, 1994)。直链淀粉 / 支链淀粉的比率通过用 Lugol's 溶液 (I2:KI) 对体外增粗茎的横切面进行碘染色而显现着色的茎切面能在显微镜下显现出来。总共产生 9 株 (3 株来自于 GBSSas2, 6 株来自于 GBSSas7) 着色模式发生改变的植株, 即意味着上述植株茎中的淀粉组成发生改变。把这些植株转移到温室里使之形成块根。三个月后将形成的块根剥皮, 储藏根的中央圆柱体部分在实验室搅拌器中研磨, 搅拌器的水中加入了少量 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 。浆液转入 Sanamat 分离淀粉。再把水-淀粉的颗粒悬浮液转移到离心管中离心。淀粉 20 摄氏度下干燥 3 天。

[0085] 支链淀粉 / 直链淀粉的含量通过 Hovenkamp-Hermelink 等 (1988) 描述的方法测定。

[0086] 经测试, 总共有两个株系 (GBSSas2 和 GBSSas7 各一株) 发育成两个试验中都测量出高支链淀粉含量的植株。一年后, 把这些植株再转移到温室中。用碘染色方法和分光光度技术分析两个株系的总共 30 棵植株的淀粉。所有的植株淀粉的支链淀粉的含量都很高。同时从 3000 多颗植株中分离淀粉。在三个不同的实验室中分析该淀粉, 再次证明该淀粉中支链淀粉的百分比较高。

[0087] 原料和方法

[0088] 样品

[0089] 木薯淀粉

对照样品

- [0090] 支链木薯淀粉 来源于 Wageningen 的 AFC3KD
- [0091] 马铃薯淀粉 Oostermoer 1998
- [0092] 支链马铃薯淀粉 Oostermoer 1995
- [0093] 玉米淀粉 Meritena A
- [0094] 蜡质玉米淀粉 Meritena 300
- [0095] 方法
- [0096] 氮含量 ($N_{\text{总}}$)
- [0097] ISO 5378(1978), 淀粉及其衍生产物 - 用 Djeldahl 方法 - 分光光度法测量氮含量。
- [0098] 颗粒大小分布
- [0099] 颗粒大小用 Coulter Multisizer II 测量, 用 Coulter calibration standard P. D. V. B Latex Lot F. 34 校准, 测量管直径 140 μm , 测量 256 个样品, 测量范围是 3, 1-107, 7 μm (马铃薯淀粉) 和 2, 8-82, 0 μm (其他淀粉)。样品在等渗盐溶液中悬浮 (DiluidTM azid free, J. T. Baker), 超声波浴中均化 (Branson 5510)。
- [0100] 示差扫描热测量
- [0101] 用 Perkin-Elmer DSC-7 进行示差扫描热测量试验。至少 10 毫克淀粉和 40 毫克软化水加到不锈钢 DSC- 盘中, 使水的含量在考虑到淀粉中水分的情况下为 80%, 该 DSC- 盘密封, 在室温下保藏过夜使之平衡。第二天, 以 10 $^{\circ}\text{C}$ / 分钟的速度把样品从 5 $^{\circ}\text{C}$ 加到 130 $^{\circ}\text{C}$ 。
- [0102] 干物质含量
- [0103] ISO1666(1997), 淀粉及其衍生物 - 水份含量测定 - 烘干法。
- [0104] 灰分含量
- [0105] ISO 5984(1978), 动物饲料 - 粗灰含量的测定。
- [0106] 固有粘度 (IV)
- [0107] 以 1M 氢氧化钠作为溶剂, 用乌氏粘度计以已知方式来测量固有粘度, 用 g/dl 表示, 见 H. W. leach 在谷物化学, Vol140, 595 页 (1963) 所描述。
- [0108] 磷含量 (P)
- [0109] ISO 3946(1982), 淀粉和其衍生产物 - 总磷含量测定 - 分光光度法。
- [0110] 粘性状况
- [0111] 用 Newport Scientific 的 Rapid Viso Analyser (RVA) 测定其粘性状况。在 6% 的浓度下, 在去离子水中, 400rpm 下测量。温度循环为 :45 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 分钟, 以每分钟增加 14 $^{\circ}\text{C}$ 的速度加热到 90 $^{\circ}\text{C}$, 再以每分钟降低 14 $^{\circ}\text{C}$ 的速度冷却到 30 $^{\circ}\text{C}$ 。
- [0112] 链长分布
- [0113] 用异淀粉酶脱去支链淀粉的支链, 产生的线性 α -1,4 麦 - 寡糖用带有电流检测系统的高效阴离子交换层析进行检测。
- [0114] 结果
- [0115] 结果如下表所示 :
- [0116] 表 1 :链长分布 (平均重量)

	木薯	支链淀粉 粉末木薯	玉米	蜡质 玉米	马铃薯	支链淀粉 马铃薯
DP 6 t/m 9	4.1 (5.9)	4.6 (5.7)	2.4 (3.9)	3.3 (3.7)	2.1 (3.7)	2.6 (3.9)
DP 6 t/m 12	14.7 (21.7)	16.4 (20.4)	11.2 (18.2)	15.3 (17.0)	7.6 (13.5)	9.5 (14.1)
[0117] DP 13 t/m	31.9 (46.6)	36.9 (46.0)	33.2 (54.0)	46.2 (51.4)	29.2 (51.7)	33.3 (49.4)
24						
DP 25 t/m	14 (20.4)	17.5 (21.8)	13 (21.1)	19.2 (21.4)	12.6 (22.3)	14.9 (22.1)
40						
DP >40	7.8 (11.4)	9.4 (11.7)	4.3 (7.0)	8.9 (9.9)	7.4 (13.1)	9.8 (14.5)
回收 (%)	68.5 (100)	80.2 (100)	61.5 (100)	89.9 (100)	56.5 (100)	67.4 (100)

[0118] 表 2:各种参数

[0119]

参数	蜡质玉米	支链淀粉 粉末木薯 (ACS)	支链淀粉 马铃薯 (APS)	特征ACS
RVA				
Tg	62.3 °C	61.7 °C	63.3 °C	支链淀粉低Tg
Tg - Ttop	10.0 °C	5.9 °C	5.8 °C	快速溶解
Ttop visco	75 RVU	112 RVU	171 RVU	
Tend visco	48 RVU	87 RVU	77 RVU	
Brabender				
Tg	66 °C	60.5 °C	61.5 °C	支链淀粉低Tg
Tg - Ttop	6.5 °C	6 °C	7 °C	快速溶解
Ttop visco	685 BU	990 BU	1560 BU	
T20'90	250 BU	290 BU	440 BU	
Tend visco	400 BU	495 BU	670 BU	
支链淀粉含量		< 1%	< 1%	Schoch, 检测水平
粘度稳定性	Stable	Stable	Stable	无差异
蛋白质	0.41 mg/g	0.16 mg/g	0.10 mg/g	澄清溶液
磷酸盐	< 0.05 mg/g	0.06 mg/g	0.81 mg/g	澄清溶液, 粘度水平
链长分布	21	27	28	

[0120] 表 3:各种参数

	干物质表示为 mg/g	灰分 mg/g ds	N _{total} mg/g ds	P mg/g ds	IV dl/g ds
木薯	860	3.5	0.11	0.06	2.4
支链淀粉粉末木薯	863	2.3	0.16	0.06	1.7
[0121] 木薯					
马铃薯	844	4.7	0.13	0.85	2.4
支链淀粉马铃薯	856	4.7	0.10	0.81	1.8
玉米	879	1.1	0.53	0.18	1.7
蜡质玉米	881	<1.0	0.41	<0.05	1.6

[0122] 表 4:颗粒大小分布

[0123]

	平均重量	d ₁₀	d ₅₀	d ₉₀
	μm	μm	μm	μm
木薯	13.0	7.8	12.6	16.9
支链淀粉木薯	14.0	7.7	13.0	19.2
木薯				
马铃薯	42.9	23.0	42.4	63.3
支链淀粉马铃薯	45.0	23.2	44.7	67.0
玉米	14.0	9.8	14.1	18.4
蜡质玉米	14.3	9.3	14.0	18.3

[0124] 表 5 :用 DSC 测量胶凝行为的结果

[0125]

	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{end} (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
木薯	60.2 ± 0.4	65.0 ± 0.6	72.8 ± 0.7	12.6 ± 0.3	19.19 ± 1.2
支链淀粉木薯	61.7 ± 0.3	67.6 ± 1.0	75.9 ± 0.6	14.2 ± 0.4	19.11 ± 2.2
木薯					
马铃薯	62.6 ± 0.3	67.3 ± 0.6	75.1 ± 0.9	12.5 ± 0.6	22.12 ± 2.7
支链淀粉马铃薯	63.3 ± 0.3	69.1 ± 0.4	75.2 ± 0.6	11.9 ± 0.5	24.04 ± 1.4
玉米	67.4 ± 0.2	73.2 ± 0.3	79.3 ± 0.9	12.1 ± 0.9	15.92 ± 0.6
蜡质玉米	62.3 ± 0.3	72.3 ± 0.3	80.4 ± 0.2	18.1 ± 0.4	18.76 ± 0.8

[0126] 与蜡质玉米淀粉相比支链淀粉木薯淀粉的不同性质：

[0127] • 低 T_g[0128] • 是快速溶解的淀粉 (T_{胶凝化} 和 T_{top} 的不同)

[0129] • 粘性高 20% 左右

[0130] • 低蛋白质含量, 杂质含量低

[0131] 与支链淀粉马铃薯淀粉相比支链淀粉木薯淀粉的不同性质：

[0132] • T_g 稍低 (< 1C)

[0133] • 快速溶解的淀粉, 但支链淀粉马铃薯淀粉的粘度较高 (δ C = 6C-BU = 1400)

[0134] • 粘度低 30% 左右

[0135] • 颗粒小

[0136] • 可结晶

[0137] 表 6 :用于体细胞胚发生的木薯基因型

[0138] Indonesia	Nigeria	TMS90853	M. Col22,	Sao Paolo
[0139] Adira 1	TMS50395	TMS30555	Zimbabwe	Thailand
[0140] Tjurug	TMS60444	TMS30211	Line 11	R5
[0141] Adira 4	TMS90059	TMS30395	M7	KU50
[0142] Mangi 4	TMS30572	TMS30001	Venezuela	R60
[0143] Gading	TMS4(2) 1244	Columbia	M. Ven77	R90
[0144] Faroka	TMS60506	M. Col 1505	Brasil	R1

[0145] 表 7 :供体植物体外生长中的光照强度对响应于成熟胚形成的叶外植体数量和每个培养的叶外植体的成熟胚数量 (#ME/CLE) 的影响

[0146] 光强度 [0147] ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)	外植体数	相应的外植体 ^a	产量 (#MF/CLE ^b)
[0148] 40	48	18b	1.7b
[0149] 28	48	26ab	4.9ab
[0150] 8	48	31a	6.6a

[0151] ^{ab}是指同样的字母表示分别用 Chi-square 检验 ($p < 0.1$) 和用 LSD 检验 ($p < 0.1$) 没有明显的区别。

[0152] 表 8 :2,4-D 预处理对 11 个尼日利亚木薯基因型和 M. Co122 基因型形成初生成熟胚 (# 从植株体外分离的每个叶外植体形成的成熟胚) 和通过次生体细胞胚发生而增殖成熟胚的影响。

[0153] 胚发生	初生	次生
[0154] 2, 4-D 预处理	否	是
[0155] M. Co122	3.5	9.4
[0156] TMS 30555	0	0.7
[0157] TMS 50395 -	0	<0.1
[0158] TMS 60506	0	<0.1
[0159] TMS 90059	0	<0.1
[0160] TM S 30211	0	0
[0161] TMS 60444	0	1.1
[0162] TMS 30395	0	0.1
[0163] TMS 90853	<0.1	0.2
[0164] TMS 4(2)1244	<0.1	0
[0165] TMS 30001	0	0
[0166] TMS 30572	0	0

[0167] a) 三个试验的平均数 (总共 48-74 个叶外植体), b) 两个试验的平均数 (总共 24-48 个 ME 外植体)。

附图说明

[0168] 图 1 :木薯体细胞胚发生的示意图,包括初生、次生体细胞胚发生,松散胚发生愈伤组织的筛选,成熟和脱水、其后的萌发。

[0169] gd2 = 补加有 Gresshoff 和 Doy 盐 (1974) 和维生素、20 克 / 升蔗糖的培养基。

[0170] gd4 = 补加有 Gresshoff 和 Doy 盐 (1974) 和维生素、40 克 / 升蔗糖的培养基。

[0171] ms2 = 补加有 Murashige 和 Skoog 盐和维生素、20 克 / 升蔗糖的培养基。

[0172] pic = 10 毫克 / 升毒莠定, NAA = 10 毫克 / 升萘乙酸, 2,4-D = 8 毫克 / 升 2,4-二苯氧乙酸。

[0173] sh6 = 补加有 Schenk 和 Hildebrandt (1972) 盐和维生素和 60 克 / 升蔗糖的培养基。

[0174] 图 2 :通过 GPC 测得的普通木薯淀粉和支链淀粉木薯淀粉的分子量分布。

[0175] 图 3 :通过 GPC 测得的存在于普通木薯和支链淀粉木薯淀粉中的去支链的支链淀粉的分子量分布。

[0176] 图 4 :通过 GPC 测得的去支链的普通木薯和支链淀粉木薯淀粉的分子量分布。

[0177] 图 5 :普通木薯和支链淀粉木薯的 Brabender 粘度。

[0178] 因此,本发明的范围包括天然和衍生支链淀粉木薯淀粉、和含有这种淀粉的组合物。这种淀粉经过化学修饰或不经修饰,可以广泛由于不同的食品、制药、和工业应用。

[0179] 本发明的支链淀粉倾向于指支链淀粉的含量比普通木薯淀粉的支链淀粉含量明显更高的淀粉或面粉,优选的支链淀粉的重量百分含量是至少约 90%,更优选的是至少约 95%,特别优选的是至少约 98%。

[0180] 支链淀粉木薯淀粉可以通过上文所描述的 FEC 方法获得。所有支链淀粉木薯植株产生的木薯支链淀粉都包含在本发明的范围之内,这些植株可以是天然存在的,也可能是通过标准培养和杂交技术获得的,或者是利用易位、反转、转化或其他引入变异,从而获得本发明淀粉的特性的基因工程或染色体工程技术而获得的。另外,从可以用已知的标准突变要交方法获得的以上同属植株的人工突变和变异植株提取的淀粉也包含在本发明的范围之内。

[0181] 基本纯的淀粉可以从支链淀粉木薯植株的根中提取得到。提取方法可以是本领域已知的方法,包括但不限于将根粉碎,并且采用水提取法从剩余成分中分离淀粉。

[0182] 支链淀粉木薯的淀粉直链淀粉水平较低,支链淀粉水平较高。支链淀粉木薯淀粉比普通淀粉有更高的粘度,优选比普通木薯淀粉粘度至少高约 30%,更优选至少高约 50%,更优选的至少高约 80%。特别合适的支链淀粉木薯淀粉用下文实施例 3a 中描述的方法通过 Rapid Visco Analyzer 测定的峰值粘度至少约 1200,更优选约 1300。

[0183] 本发明所产生的天然淀粉具有独特的在许多应用中需要的性质和功能。这种天然淀粉不经过化学修饰就具有完成所需功能的其他益处。但是,本发明的天然淀粉也可以是经过修饰而增强了其性质和功能的淀粉。修饰的方法包括化学的、物理的、或酶促的等本领域已知的任何修饰。

[0184] 化学衍生物包括形成醚、酯或半酯,比如羟基烷基酯、乙酸酯、磷酸酯、琥珀酸酯、即琥珀酸辛酯、叔胺酯和季胺酯等等的技术,或者用本领域已知的其他修饰技术。

[0185] 本发明的淀粉的化学修饰包括交联。本领域的任何交联剂都可以用来实现此目的,包括但不限于表氯醇、线性二羧酸酐、柠檬酸丙烯醛、磷酰氯、己二酸/乙酸混合酸酐、三金属磷酸盐、甲醛、氰尿酸氯、dithioscyanates 和二乙基硫。

[0186] 本发明的淀粉也可以进行物理修饰,比如 W095/04082(公开日为 1995.2.9)所描述的热抑制或剪切。

[0187] 本发明的淀粉也可以用一种或多种本领域已知的酶进行修饰,包括但不限于 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、maltogenase、异淀粉酶和支链淀粉酶。

[0188] 淀粉也可以被预凝胶化,制备预凝胶化淀粉的方法在 U. S. 4,280,851(Pitchon 等)、U. S. 4,465,702(Eastman 等)、U. S. 5,037,929(Rajagopalan)、U. S. 5,131,953(Kasica 等)和 U. S. 5,149,799(Rubens)中已被公开。预凝胶化淀粉的常规方法是本领域普通技术人员公知的,该方法在以下文章中有详细的描述:淀粉:化学和技术,Vol. III-工业方面,第 XXII 章“预凝胶化淀粉的制备和用途”,R. L. Whistler 和 E. F. Paschall 编,纽约学术出版社 1967 年出版。

[0189] 淀粉也可以被转化,从而生产获得流体淀粉或稀糊淀粉,方法包括氧化、酶转换,特别是通过 α -淀粉酶、酸水解,或者加热和/或酸性糊精化作用。

[0190] 用本领域的公知技术除去淀粉本身含有的或在淀粉修饰过程中产生的臭味和颜

色,以使本发明的淀粉得以纯化。

[0191] 为了得到具有所需功能和性质的淀粉,本领域的普通技术人员可以用一种方法进行修饰,也可以几种修饰方法组合使用,这些修饰方法是本领域的公知常识。得到的淀粉性质和功能将依据所使用的修饰类型、修饰的程度和反应条件等而不同。

[0192] 使用本发明的支链淀粉木薯淀粉可获得的功能包括但不限于胶囊化、乳化、增稠和增强粘性、胶凝和成膜。

[0193] 本发明的支链淀粉木薯淀粉可以用于不同的工业应用,包括但不限于纸产品、食品、药品和营养品、个人护理产品及其他工业产品。

[0194] 纸产品包括但不限于纸、纸板、linerboard、波纹板、卡纸板、袋和信封。

[0195] 食品指的是任何可食用的产品,包括但不限于谷类食品,面包及面包产品,奶酪及仿奶酪产品,调味品,糖果,香料:包括可倾倒香料和可用匙取的香料,馅料,包括水果馅和乳酪馅,调味品,卤汁,类似物和清淡果酱,布丁,奶油冻,酸奶酪,酸乳酪,粘合剂,饮料:包括乳品饮料、糖衣、汤、和婴儿食品。

[0196] 药品和营养品包括药物赋型剂,片剂:包括泡腾剂、细淀粉和粉末,和生物前体产品。

[0197] 个人护理产品包括但不限于除臭剂和防汗药,头发定型剂:包括喷雾、凝胶、摩丝、洗液和润发油,肥皂和清洁剂,化妆品:包括眼影、香粉、粉底和胭脂,香波和护发素、漱口药、空气清新剂和牙膏。

[0198] 其他工业产品包括但不限于清洁剂,能够生物降解的泡沫制品:包括疏松填料(loosefill)、薄板(sheet)、模制塑胶(shapes)。

[0199] 支链淀粉木薯淀粉可以以不同的水平使用,使用的量依据其性能而定。一般来说,支链淀粉木薯淀粉的用量可以占产品重量的约 1% -95%,优选约 5% -60%,更优选约 10% -40%。

实施例

[0200] 下面的实施例将进一步证明和解释本发明,但不限制本发明的保护范围,所有的百分比都是重量百分比。

[0201] 在下文的实施例中,用到的木薯样品是:木薯 1 = 从国家淀粉和化学公司(Bridgewater, NJ, 美国)买到的泰国普通木薯淀粉。

[0202] 木薯 2 = 从 Avebe B. A. (Foxhol, 荷兰)买到的印度尼西亚普通木薯淀粉。

[0203] ACS1-3 = 以反义方式导入 GBSS 基因,使用再生木薯植株的 FEC 而遗传生产的支链淀粉木薯淀粉。

[0204] 马铃薯 = 从 Avebe B. A. (Foxhol, 荷兰)买到的普通马铃薯淀粉。

[0205] AMF 马铃薯 = 从 Avebe B. A. (Foxhol, 荷兰)买到的直链淀粉含量低马铃薯淀粉。

[0206] 玉米 = 从根据淀粉和化学公司(Bridgewater, NJ, 美国)买到的普通谷类淀粉。

[0207] 蜡质 = 从国家淀粉和化学公司(Bridgewater, NJ, 美国)买到的直链淀粉含量低的蜡质玉米淀粉。

[0208] 实施例 1- 直链淀粉含量

[0209] a. 直链淀粉含量是用电位滴定法测定的。将约 0.5g 淀粉样品中加入 10 毫升浓缩氯化钙（约 30 重量%），95℃加热 30 分钟。冷却到室温后用 5 毫升 2.5%的乙酸双氧铈稀释，混合，2000prm 离心 5 分钟，过滤样品使溶液澄清。

[0210] 用 1cm 的偏振测定皿偏振测定淀粉的浓度，然后用标准化的 0.01N 碘溶液直接滴定等分的样品（一般 5 毫升），以 KCl 作为参考电极，铂为测量电极记录其电位。到达反射点需要的碘量作为结合碘直接测量。假设 1.0 克直链淀粉将结合 200 毫克碘，计算直链淀粉的含量。

[0211] 电位滴定的结果如表 9 所示。

[0212] 表 9

[0213]

基质淀粉	直链淀粉含量
木薯 1	20%
木薯 2	17.4%
ACS1	2.0%
ACS2	2.8%
ACS3	2.7%

[0214] 可以从表 9 判断，支链淀粉木薯淀粉中的直链淀粉含量明显低于普通木薯淀粉中的直链淀粉含量。

[0215] b. 通过凝胶渗透层析（GPC）来测定直链淀粉的含量。把 4-8 毫克淀粉加到含有 5mM 硝酸钠的二甲亚砜（DMSO）溶液中，匀浆化后，100℃加热 2 小时以制备样品。如果需要，过滤样品，再注射（300 μ l）到 GPC 150C 层析仪（Waters Corporation, Amherst, MA）。该凝胶渗透层析利用了 4 个柱（防护柱， 10^5 ， 10^3 ， 10^2 微米（标定的）孔径柱，都是从聚合物实验室，Amherst, MA 获得），移动相是含有 5mM 硝酸钠的二甲基亚砜。80℃下操作，流速为 0.7 毫升 / 分钟。用分子量为 5800-850,000 的支链淀粉标准（Showa Denko K.K, 日本）校准柱。图 2 显示了通过 GPC 测得的普通木薯和支链淀粉木薯淀粉的分子量分布，如图所示。支链木薯淀粉在分子量的对数值大约为 6.83 处出现相应的峰值，而且只有一个唯一波峰，相反，普通淀粉在分子量的对数值大约为 6 处显现出一个额外直链淀粉峰，这证明了三种支链淀粉木薯淀粉含有更多的支链淀粉。

[0216] 实施例 2 一结构

[0217] 去支链化通过以下步骤来完成。将 20 毫克淀粉加入 2 毫升浓度为 90% DMSO（含 10%的水），在 95℃下搅拌直至溶解，再向管瓶加入 7.980 毫升 pH 为 4.8 的乙酸缓冲液，搅拌。这时如果一些直链淀粉出现沉淀，则煮沸直至澄清。往完全溶解的样品中加入 20 微升纯的异淀粉酶，38℃恒温培养 16 小时，最后用加样品取出 1 毫升样品，转移到一个 2 毫升的管瓶中以进行链长分布测定。剩余的样品用 50 毫升丙酮沉淀。沉淀的物质通过一个 0.2mm 的尼龙滤网过滤收集，准备进行 GPC。

[0218] 理想化的方案是 b 部分在 a 部分之前实施,把所有的去支链化的淀粉进行层析(b),然后仅仅合并支链淀粉峰(a),从而获得去支链的支链淀粉结构。

[0219] a. 用实施例 1b 中的 GPC 法测定了高直链淀粉含量的去支链的支链淀粉和普通木薯淀粉中的分子量分布。图 3 显示了去支链的支链淀粉木薯淀粉的分子量分布测定结果。从中可以看出,不同木薯淀粉的支链淀粉的结构是完全相同的。

[0220] b. 按实施例 1a 的方法测定了去支链的支链淀粉和普通木薯淀粉的分子量分布。图 4 显示了木薯淀粉分子量分布的测定结果。该图证实了支链淀粉结构是相似的,但大量存在,基本在相同的(相对)分子量对数峰,该峰值为约 3.0 和 4.0。另外,该图表示在支链淀粉木薯中,没有大量直链淀粉,这是由缺乏(相对)分子量对数为 5.81 左右的峰值所证明的。

[0221] 实施例 3- 粘度

[0222] a. 粘度是用 RVA 系列 4Rapid Visco Analyzer 来测定的(NewportScientific, New South Wales, 澳大利亚)。准备含干重 5% 淀粉的浆,以每分钟提高 3℃ 的速率从 50℃ 加热到 95℃,在 95℃ 下加热 5 分钟。最后,以每分钟 6℃ 的速率从 35℃ 冷却到 6.0℃,160rpm 测定粘度,结果(表示粘度的波峰)如下表 10 所示。

[0223] 表 10

[0224]

基质淀粉	粘度 (RVA 单位)
木薯 1	600
木薯 2	1015
ACS1	1230
ACS2	1360
ACS3	1330

[0225] 从表 10 可以看到,支链淀粉木薯淀粉具显著高的峰粘度,比印度尼西亚普通木薯淀粉约高 30%,大约为泰国普通木薯淀粉的两倍。

[0226] b. 利用 Visco/amylo/graph, VA-1A 型(C. W. Brabender 仪器公司, Hackensack, 新泽西, 美国 07606) 也可测量粘度。制备干重 5% 淀粉的浆液并且利用柠檬酸 / 柠檬酸三钠缓冲液调节到 pH3。以每分钟 1.5℃ 速度将总重 460 克从 50℃ 加热到 92℃。然后将浆液在 92℃ 加热到 30 分钟。在 Visco/amylo/graph 加热膏状物时测量热粘度,得到的粘度分布显示于附图 5。该图证实支链淀粉木薯淀粉比普通木薯淀粉有更高的峰值粘度。

[0227] 实施例 4- 胶凝温度

[0228] a. 胶凝温度可以用不同的示差扫描热测定仪测定。水与淀粉以 2 : 1 比例混合,以每分钟 10℃ 的速率从 5℃ 加热到 140℃,对样品进行扫描,多次操作取其平均值,表 11 列出了测定结果。

[0229] 表 11

[0230]

基质	起始 ($^{\circ}\text{C}$)	峰 ($^{\circ}\text{C}$)	终点 ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{J/g})$
木薯 1	62.6 ± 0.4	69.0 ± 0.3	81.0 ± 0.1	16.05 ± 1.00
木薯 2	56.7 ± 0.1	63.2 ± 0.2	72.9 ± 0.3	16.0 ± 0.43
ACS1	58.1 ± 0.1	65.7 ± 0.0	74.5 ± 0.0	17.80 ± 0.80
ACS2	58.6 ± 0.0	65.5 ± 0.2	75.6 ± 0.3	18.08 ± 0.36
ACS3	58.6 ± 0.0	65.4 ± 0.0	74.5 ± 0.1	17.7 ± 0.20

[0231] 如表 11 所示,所有的三种支链淀粉木薯淀粉的起始胶凝温度比泰国普通木薯淀粉稍高,比印度尼西亚普通木薯淀粉稍低。所有的三种支链木薯淀粉比普通木薯淀粉有更高的胶凝焓。

[0232] b. 起始凝结温度也可以用实施例 3b 的方法通过 Brabender 来测定。从图 5 可以看出,支链淀粉木薯淀粉的起始凝结温度比普通泰国木薯淀粉要低。

[0233] 参考文献

[0234] 匿名,1985.CIAT: 年刊:Centro international de agricultura Tropical, Cali,哥伦比亚,Pp:197-217。

[0235] Anthony, P., Davey, MR, Power, J. B, 和 Lowe, K. C. 1995. An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplasts, 植物细胞组织和器官培养, 42:229-302。

[0236] Buttevele, J., 和 Creemers-Mloenaar, J. 1994. Plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). 植物科学杂志, 100:203-210。

[0237] Cao, J., Duan, X. McElroy, D, 和 Wu, R. 1990. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells, 植物杂志, 11:586-591。

[0238] Chang, Y. F., Wang, W. C., Colleen, Y. W., Nguyen, H. T., 和 Wong, JR. 1991. Plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell cultures of wheat (*Triticum aestivum*). 植物细胞杂志. 9:611-614。

[0239] Chen, W. H., Davey, MR., Power, JB., 和 Cocking, E. C. 1988. Sugarcane protoplasts factors affecting division and plant regeneration. 植物细胞杂志, 7:344-347。

[0240] Chen, W. H, Gartland, K. M. A., Davey, MR, Sotak, R., Gartland, J. S., Mulligan, B. J., Power, J. B., and Cocking, E. C. 1987, Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimeric gene. 植物细胞杂志. 6:297-301。

[0241] Delaet, A., and Blaas, J., 1987. An improved method for protoplast

microinjectionsuitable for transfer of entire plant chromosomes. 植物科学. 50 : 161-169。

[0242] Fitch, M. M. M. , Pang, S. Z. , Slightom, Lius. S. , Tennant, P. , Manshardt, T. M. , andGonsalves, D. 1994. Genetic transformation in *Carica papaya* (papaya). IN : Bajai (Eds). 生物技术在农业和林业中的应用 . Vol. 29. Plant protoplasts and genetic engineeringV. Springer-Verlag, 柏林. P :237-255。

[0243] Dons, J. J. M. , and Bouwer, R. 1986. Improving the culture of cucumber protoplastsby using an agarose-disc procedure, 由美国食品农业部和国际原子能协会共同组织的关于核技术和植物的体外培养技术的研讨会 . 举行地点是维也纳, 19-23, 1995. 8. P :498-504。

[0244] Fraley R. T. , Rogers S. G. , 和 Horsch, R. B. 1986, 高等植物中的遗传转化, 植物科学在的 CRC 重点回顾, 4(1) :1-46。

[0245] Gordon-Kamm, W. J. , Spencer, TM, Mangano, M. R, Adams, T. R, Daines. R. J. , William, G. S. , Obrien, J. V. , Chambers, S. A. Adams, Jr. W. R. , Willetts, N. G. , Rice, TB. , Machey C. J. , Krueger, R. G. , Kausch, A. P. 和 Lemaux P. G. 1990, 玉米细胞的转化和可育的转基因植物再生, 植物细胞, 2 :603-618。

[0246] Gresshoff, P. M. , 和 Doy, C. H. 1974, 单倍体西红柿的发育和分化, 植物学. 107 : 161-170。

[0247] Griesbach, R. J. , 和 Hammond, J. 1993. 经胚电泳将 GUS 基因掺入兰花, Acta. Hort. 363 :165-169。

[0248] Guerineau F. & Mullineaux P. M. 1993. Plant transformation and expression vectors. In :Croy R. R. K(ed), 植物分子生物学. Labfax, BIO. S Scientificpublishers, Oxford, UK. 1993, pp121-148。

[0249] Horn, M. e. , Shillito, R. K. , Conger, B. V. , 和 Harms, C. T 1988. 来自原生质体的转基因鸭菜 (*Dactylis glomerata* L.) 植物, 植物细胞报道. 7 :469-472。

[0250] Hovenkamp-Hermelink, JHM, De vries JN, Admase P, Jacobsen E, WithokdB, Feenstra WJ, 1988. Tapid estimation of the amylose/amylopectine ration in smallamounts of tuber and leaf tissue of potato. 马铃薯研究. 31 :241-246。

[0251] Jones H. , Tempelast M. J. , 和 Jones, M. G. K. . 1987. 植物电穿孔的最新进展, 牛津大学对植物分子生物学和细胞生物学的调查. 4 :347-357。

[0252] Kaeppler, H. F. , Gu, W. , Somres, D. A. Rines, H. W. , Cockburn, A. F. 1990. 硅碳纤维介导的 DNA 传递进植物细胞, 植物细胞杂志. 8 :415-418。

[0253] Klein T. M. , Kornstein L. , Sanfords J. C. , 和 Fromm M E. 1989, 以粒子轰击遗传转化玉米细胞植物生理学, 91 :440-444。

[0254] Honan N. K. , Sangwan R. S. , 和 Sangwan-Norren. 1994, 节部腋生分生组织用作木薯幼苗生产和遗传转化的靶组织, 木薯生物技术网络 II 的第二届国际科学会议, 印度尼西亚的博果尔. p :276-288。

[0255] Kyoizuka, J. , Otoo ;E. , 和 Shimamoto, K. 1988, 从印度水稻原生质体再生植物, 培养反应的基因型差异, 基因和应用遗传学. 76 :887-890。

- [0256] Lorz, H., Baker, B., 和 Schell, J. 1985. 原生质体转化介导的谷类细胞的基因转移, 分子普通遗传学. 199 :178-182。
- [0257] Luong, H. T., Shewry, P. R., 和 Lazzeri, P. A. 1994. Gene transfer to cassava somatic embryos via tissue electroporation and particle bombardment. In : 木薯生物技术网络 II 的第二届国际会议。印度尼西亚的博果尔. p :304-314。
- [0258] Mathews, H., Carcamo, R., Chavarriaga, Schopke, C. P., Fauquet, C. and Beachy, R. N., 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava 植物细胞杂志. 12 :328-333。
- [0259] Mroginski and Scocchi, 1992. Somatic embryogenesis of Argentine cassava varieties. In : Roca, W. M., and Thro, A. M. (Eds). 木薯生物技术网络 I 的第二届国际会议。Cartagena, 哥伦比亚. 1992. 8. 25-28. p :375-377。
- [0260] Murashige, T., 和 Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. 植物生理学. 15:473-497。
- [0261] Nakano, M., Hoshino, Y., 和 Mil, M. 1994 : Regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis Vinifera* L.) via *Agrobacterium* rhizogenesis-mediated transformation of embryogenic calli. 植物学杂志. 45(274) :649-556。
- [0262] Narayanaswamy, T. C., Ramaswamy, N. M., 和 Sree Rangaswamy, SR. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. 木薯生物技术网络 II 的第二届国际会议。印度尼西亚的博果尔, 22-26. 1994. 8. p :324-329。
- [0263] Ng SYC (1992) Tissue culture of root and tuber crops at IITA. In : Thottappilly G, Monti LM, Mohan Raj KR, Moore AW (eds), Biotechnology : enhancing research on tropical crops in Africa CTA/IITA co-publication, IITA, Ibadan, Nigeria, pp 135-141。
- [0264] Nzoghe, K. 1989. Recherche de conditions permettant l'obtention de neoformations chez différents géotypes de manioc (*Manihot esculenta* Crantz). Extension à la culture de protoplastes. Thèse. Université De Paris Sud Centre D'Orsay. P :119。
- [0265] Ow, K. W., Wood, K. V., Deluca, M., Ke Wet, JR, Helinski, DR., 和 Howell, S. H. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. 科学. 234 :856-859。
- [0266] Potrykus, I., Saul, M., Paskowski, J., and Shillito, R. D. 1985. Direct gene transfer into protoplasts of a graminaceous monocot. 基因分子生物学. 199 :183-188。
- [0267] Power, J. B., Bery, S. F., Chapman J. V., and Cocking, E. C. 1979. Somatic hybrids between unilateral cross-incompatible *Petunia* species. 基因的应用理论. 55 :97-99。
- [0268] Raemakers, C. J. J. M. 1993. Primary and cyclic somatic embryogenesis in cassava *Manihot esculenta* Crantz. Wageningen 农业大学的博士论文, 荷兰. p :119。
- [0269] Raemakers, C. J. J. M., Bessembinder, J., Staritsky, G., Jacobsen, E., and Visser,

R. G. F. 1993a. Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. 植物细胞组织和器官培养. 33 :151-156.

[0270] Raemakers, C. J. J. M, Amati, M., Staritsky, G., Jacobsen, E., and Visser, R. G. F. 1993b. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. 植物学年报. 71 :289-294.

[0271] Raemakers, C. J. J. M, Schavemaker, C. M., Jacobsen, E., 和 Visser, R. G. F. 1993c. Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). 植物细胞杂志. 12 :226-229.

[0272] Raemakers K, Schreuder, M, Muniykw, T., Jacobsen E. 和 & visser R., 2000. Towards a routine transformation procedure for cassava. In :Carvalho, L. J. C. B., Thro, A. M. 和 Vilarinhos A. D. (eds). 木薯生物技术 IV 国际科学会议 -CBN, pp250-267. (ISBN85-87697-05-6). 巴西农业研究合作 -EMBRAPA 巴西。

[0273] Raemakers K, Schreuder, M, Pereira, I., Muniykw, T., Jacobsen E. 和 & Visser R., 2001. Progress made in FEC transformation of cassava. *Euphytica* (in press)。

[0274] Rhodes, C. A., Pierce, D. A, Metler, I. J., Mascarenhas, D., 和 Detmer, J. J. 1988. 来自原生质体的遗传学转化的玉米植物,. 科学. 240 :204-207.

[0275] Salehuzzaman S. N. J. M., Jacobsen, E 和 RGF Visser, 1993. Isolation and characterisation of a cDNA encoding granula-bound starch synthase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. 植物分子生物学. 23 :947-962.

[0276] Salehuzzaman S. N. J. M., Jacobsen, E 和 RGF Visser, 1994. Expression patterns of two starch biosynthetic genes in in vitro cultured cassava plants and their induction by Plant science 98 :53-62.

[0277] Schenk R. U. & Hildebrandt A. C. 1972. 诱导和培养单子叶和双子叶植物细胞培养物的培养基和技术。加拿大植物学杂志. 50 :192-204.

[0278] Schreuder, M. M., Reamakers C. J. J. M., Jacobsen E. & visser R. G. F. 2001. Efficient production of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Euphytica* (in press)。

[0279] Scorza, R., Cordts, J. M., Ramming, K. W., 和 Emershad, R. L. 1995. Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. 植物细胞杂志. 14 :598-592.

[0280] Shahin, E. A., 和 Shepard, J. F. 1980. Cassava mesophyll protoplasts : isolation proliferation and shoot formation. *Plant Science Letters* 17 :459-465.

[0281] Shimamoto. K., Terada, R., Lzawa, T., 和 Fujimoto, H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. 自然. 338 :274-276.

[0282] Sofiari, E, 1996. Regeneration and transformation in cassava *Manihot esculenta* Crantz. Wageningen 农业大学博士论文. 荷兰. p :136.

[0283] Songstad, K. K., Somatic, D. A., and Grisbach, R. J. 1995. Advances in

alternative DNA delivery techniques. 植物细胞组织和器官培养. 40 :1-15.

[0284] Stamp, J. A., and Henshaw, G. G. 1987a. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissue of cassava. 植物学年报. 59 :445-450.

[0285] Stamp, J. A., 1987. Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process. 植物学年报. 59 :451-459. Stamp, J. A., and Henshaw, G. G. 1987b. 木薯的次生体细胞胚胎发生和植物再生. 植物细胞组织和器官培养. 10 :227-233.

[0286] Stamp, J. A., and Henshaw, G. G. 1982. 木薯的体细胞胚胎发生 Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 105 :183-187.

[0287] Sudarmonowati and Bachtiar, 1995. Induction of somatic embryogenesis in Indonesian cassava genotypes. 木薯生物技术网络的第二次科学会议记录, 印度尼西亚的博果尔, 1994. 8. 22-26. p :364-374.

[0288] Sudarmonowati, E., and G. G. Henshaw. 1992. The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cultivars using picloram and dicamba. In: Roca, W. M., and Thro, A. M. (Eds). 木薯生物技术网络的第一次科学会议记录, 哥伦比亚卡塔赫纳. 1992. 8. 25-28. p128-133.

[0289] Suhandano, S., Hughes, J., Brown, K., Sirju-Charan, G., Hughes, M., 2000. Characterization of an elongation factor-1- α gene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz); 生物技术的一个新的启动子 In: Carvalho, L. J. C. B., Thro, A. M. and Vilarinhos A. D. (eds). 木薯生物技术 IV 国际科学会议 -CBN, pp572-581. (ISBN85-87697-05-6). 巴西农业研究合作 -EMBRAPA 巴西。

[0290] Szabados L., Hoyos R. and Roca W. 1987. 木薯的体外体细胞胚胎发生和植物再生. 植物细胞杂志. 6 :248-251.

[0291] Taylor, N. J., Clarke, M., and Henshaw, G. G. 1992. 在 15 种非洲木薯栽培品种中诱导体细胞胚发生, Roca W. M., 和 Thro, A. M. (Eds). 木薯生物技术网络的第一次科学会议记录, 哥伦比亚卡塔赫纳. 1992. 8. 25-28p :134-137.

[0292] Taylor, N. J., Edwards, M., 和 Henshaw, G. G. 1995. 在两大类木薯基因型中生产脆性胚发生愈伤组织和悬浮培养物系统, 木薯生物技术网络 II 的第二届国际会议. 印度尼西亚的博果尔. P :229-240.

[0293] Taylor, N. J., Masona, M. V., Schopke C., Carcamo, R., Ho, T., Gonzalez, A. E., Beaychy, T. N. 和 Fauquet, C., 2000. Production of genetically modified plants containing various genes of interest. In: Carvalho, L. J. C. B., Thro, A. M. and Vilarinhos A. D. (eds). 木薯生物技术 IV 国际科学会议 CBN, pp. 267-276. (ISBN85-87697-05-6). 巴西农业研究合作 -EMBRAPA 巴西。

[0294] Thompson, J. C., Novva, N. R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwerys, M., and Botterman, J. 1987. 来自吸水链霉菌的除草剂抗性基因的鉴定, EMBOLJ6 (9) : 2519-2523.

[0295] Kaeriyas, J., Schopke, R., Visser, R., Potrykus, I., Fauquet, C., Roca, W., Hershey, C., 1999. Genetic biotechnologies and cassava-based development. In: Hojn,

T and Leisinger, K. M. (eds). Biotechnology of food crops in developing countries. pp141-185. Springer Wien New-York (ISBN3-211-83240-8)。

[0296] Visser RGF, Hergersberg M, van der FR, Jacobsen E, Witbolt B, Feenstra WJ; 1989. Molecular cloning and partial characterization of the gene for the gene for granula-bound starch synthase from a wild type and a amylose-free potato. 植物科学. 64:185-192。

[0297] Visser RGF, Stolte A, Jacobsen E, 1991. Expression of a chimeric granula-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato tubers. 植物生理 82: 411-416。

[0298] Walker, P. M. B. 1989. Chambers Biology Dictionary. W & R Chamber Ltd. Clay Ltd, St. Ives Plc. 英格兰. P:205。

[0299] Wolters, A. M. A., Schoenmakers, H. C. H., van der Meulen-Muiser, J. J. M., van der Knaap, E., Kerks, F. H. M., Koornaeef, M., and Zeleer, A. 1991. Limited DNA elimination from the irradiated potato parent in fusion products of albino *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. 基因的应用理论. 83:225-232。

[0300] Wordragen M. F., and Dons, H. N. L. 1992. 农杆菌介导的 recalcitrant 作物的转化植物。分子生物学杂志. 10:12-36。

[0301] Woodward, B., and Puonti-Kaerlas, 2001. 木薯的花组织的体细胞胚的发生。(Manihot esculenta Crantz. Euphytica (in press))。

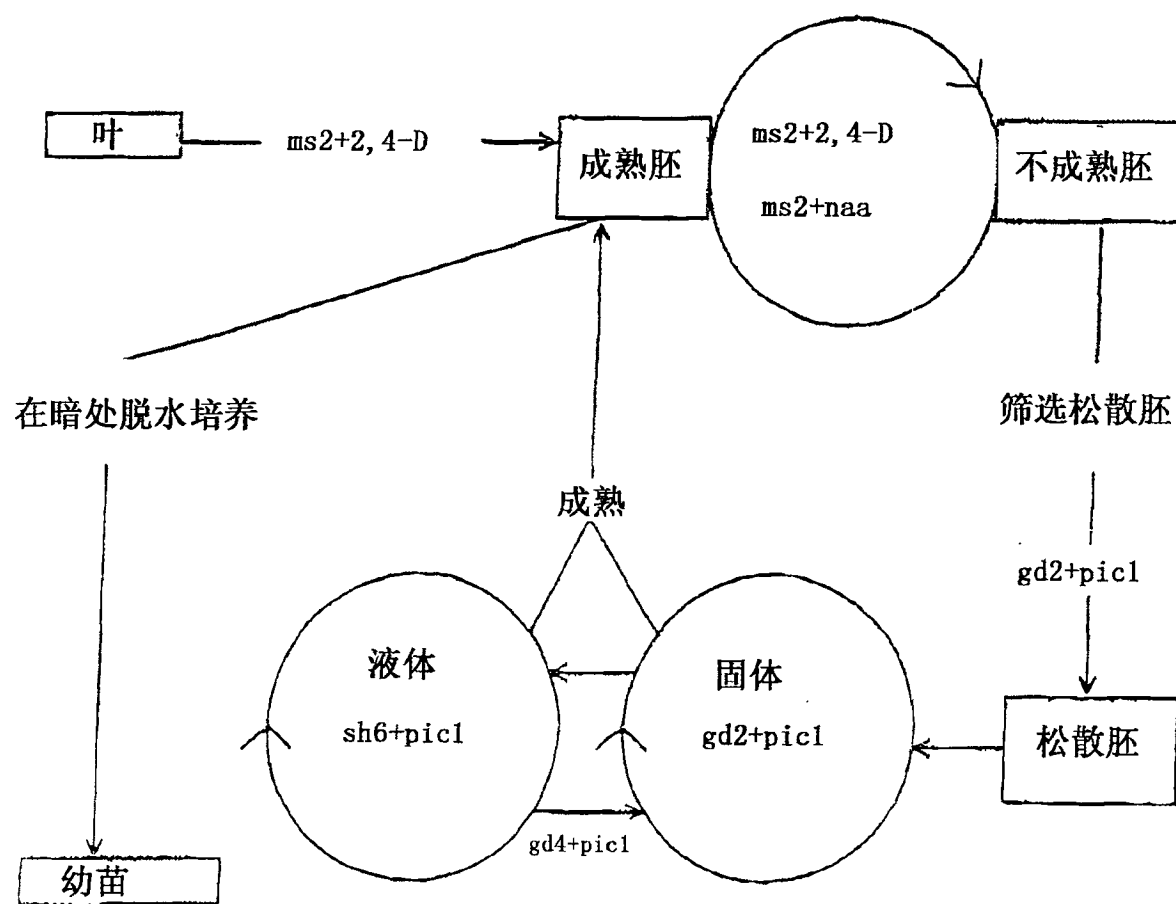


图 1

木薯淀粉的分子量比较

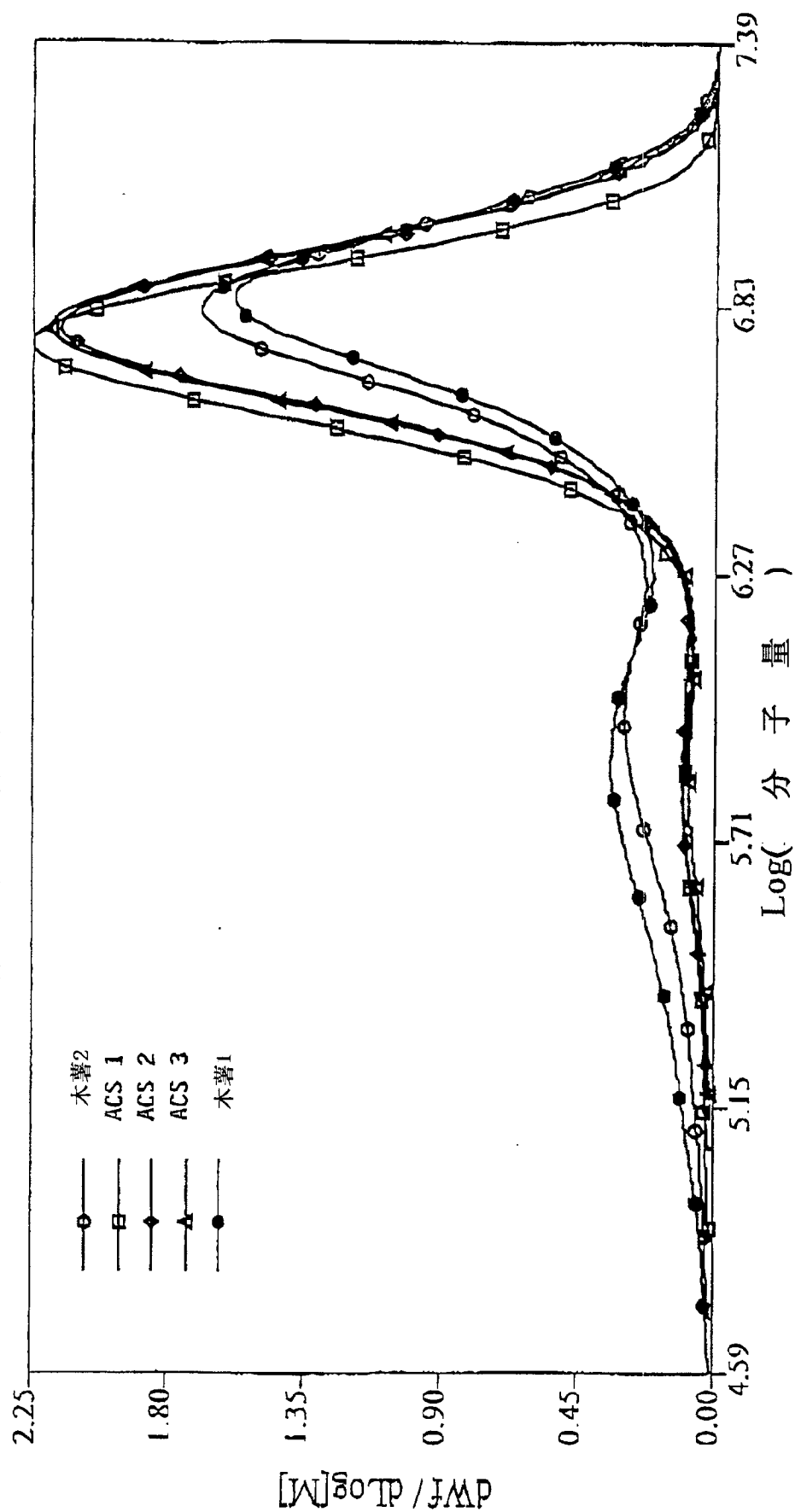


图 2

蜡质和普通木薯的支链淀粉结构

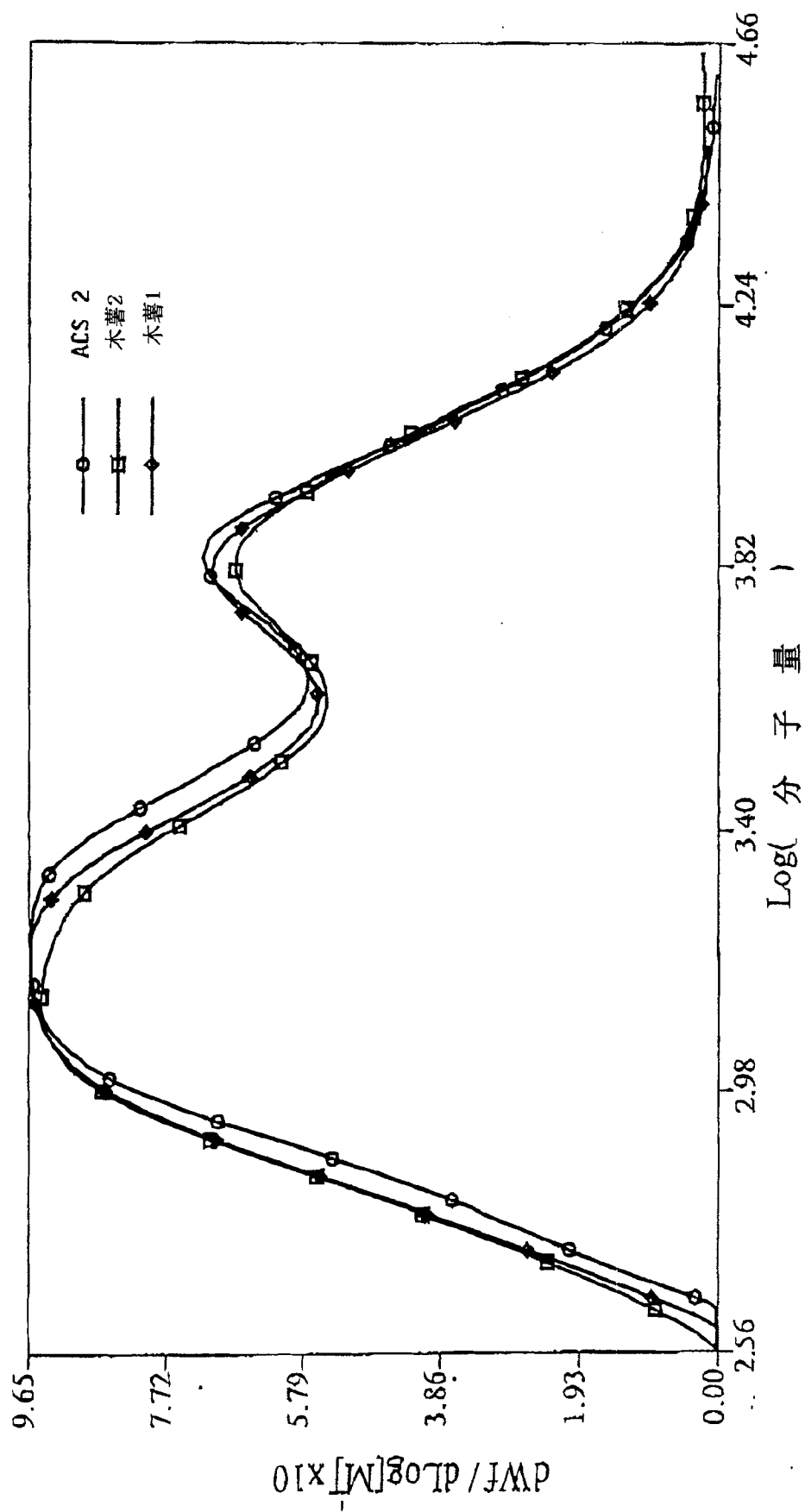


图 3

分子量分布: 去支链木薯淀粉

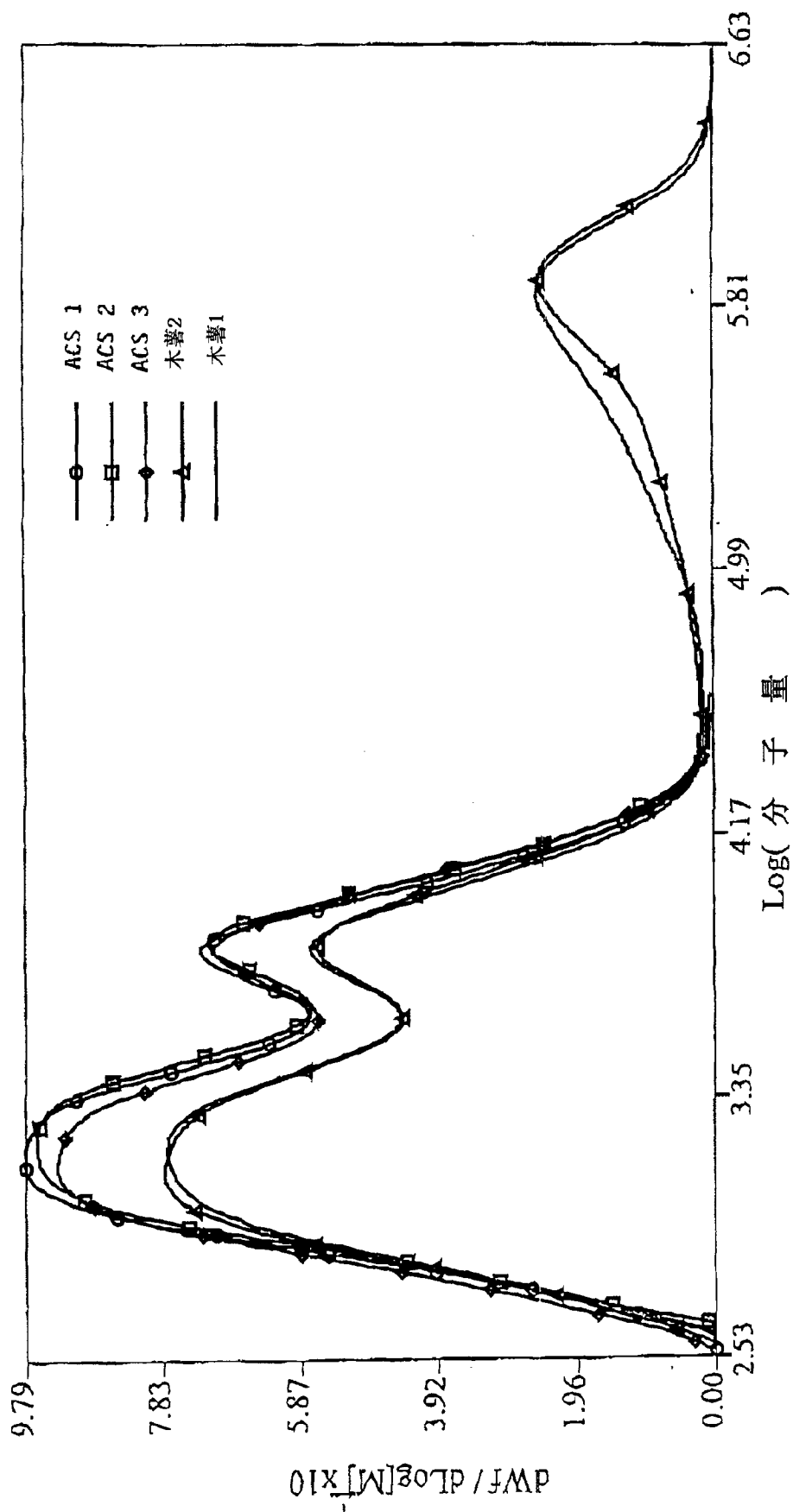


图 4

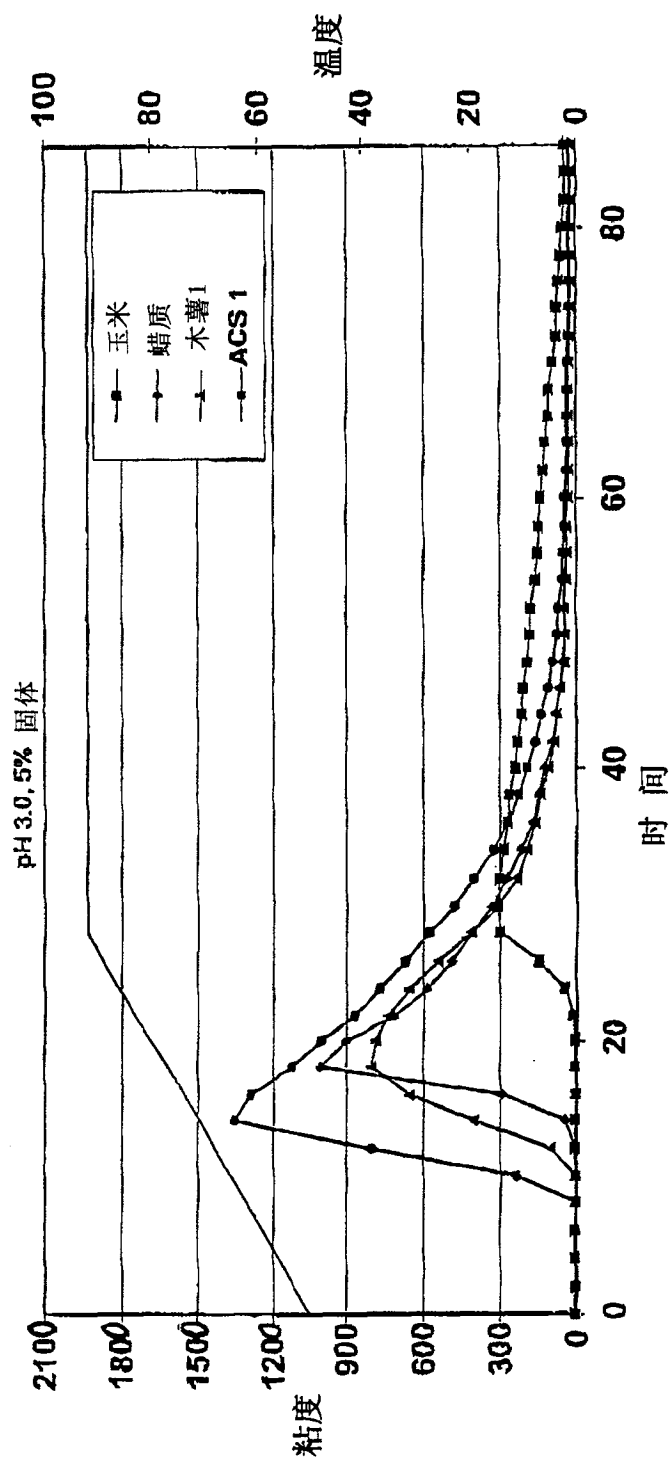


图 5