



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104883874 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201380065542. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 30

A01H 4/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/727, 319 2012. 11. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2013/000468 2013. 10. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/077779 EN 2014. 05. 22

(71) 申请人 淡马锡生命科学研究院有限公司

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 M·S·坦卡拉伊萨拉马尔

S·拉马钱德兰

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路

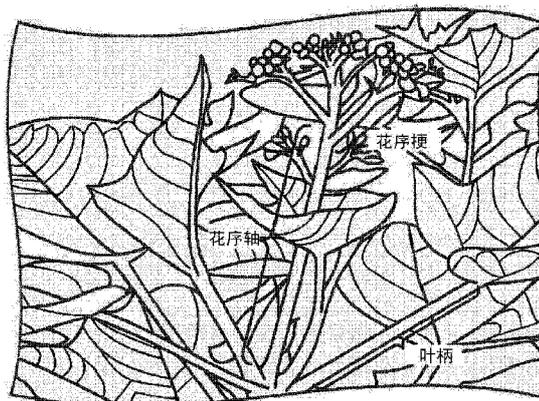
权利要求书3页 说明书14页 附图2页

(54) 发明名称

麻风树属植物的直接和间接器官发生

(57) 摘要

本发明大体上与植物生物技术相关。更具体来说,本发明涉及用于麻风树属植物,如麻风树的高效的直接器官发生和间接器官发生的方法和培养基组成。



1. 通过器官发生再生麻风树属植物的方法,包括以下步骤:

(a) 将麻风树属植物外植体在固体枝芽诱导培养基上培养,诱导枝芽形成,其中所述麻风树属植物外植体是叶柄、花梗、花序梗或花序轴外植体的薄切片或来自所述叶柄、花梗、花序梗、或花序轴外植体的愈伤组织,其中所述枝芽诱导培养基包含 MS 基础盐、B5 维生素、吲哚-3-丁酸 (IBA)、噻苯隆 (TDZ)、6-苄基氨基嘌呤 (BA)、硫代硫酸银 (STS) 和酪蛋白水解物;

(b) 将枝芽在固体枝芽增殖和发育培养基上培养,以使枝芽增殖和发育,其中所述枝芽增殖和发育培养基包含 MS 基础盐、B5 维生素、IBA、TDZ、BA、玉米素 (Zn)、硫酸腺嘌呤 ( $\text{AdSO}_4$ ) 和酪蛋白水解物;

(c) 将从发育的枝芽衍生而来的枝芽丛在固体芽伸长培养基上培养,以使芽伸长,其中所述芽伸长培养基包含 MS 基础盐、B5 维生素、IBA、激动素 (Kn)、赤霉素 ( $\text{GA}_3$ )、硫酸腺嘌呤 ( $\text{AdSO}_4$ ) 和酪蛋白水解物;

(d) 将从所述枝芽丛分离出的伸长的芽在固体芽成熟培养基上培养,以使芽成熟,其中所述芽成熟培养基包含 MS 基础盐、B5 维生素、IBA、Kn、 $\text{GA}_3$ 、硫酸腺嘌呤 ( $\text{AdSO}_4$ ) 和酪蛋白水解物;和

(e) 将成熟的芽在液体生长调节剂溶液中浸渍,将浸渍过的芽转移到土里,以使麻风树属植物生长,其中所述液体生长调节剂溶液包含 MS 基础盐、B5 维生素和 IBA。

2. 权利要求 1 所述的方法,其在步骤 (a) 之前进一步包括以下步骤:

将外植体的薄切片在固体愈伤组织诱导培养基上培养,以诱导器官发生性愈伤组织,其中所述固体愈伤组织诱导培养基包含 MS 基础盐、B5 维生素、IBA、2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D)、TDZ、BA 和脯氨酸。

3. 权利要求 2 所述的方法,其中所述固体愈伤组织诱导培养基包含:

IBA,含量为约  $0.05 \mu\text{M}$ -约  $4.90 \mu\text{M}$ ;

2,4-D,含量为约  $0.05 \mu\text{M}$ -约  $4.53 \mu\text{M}$ ;

TDZ,含量为约  $0.05 \mu\text{M}$ -约  $2.27 \mu\text{M}$ ;

BA,含量为约  $0.04 \mu\text{M}$ -约  $4.44 \mu\text{M}$ ;和

脯氨酸,含量为约  $10\text{mg}/\text{l}$ -约  $500\text{mg}/\text{l}$ 。

4. 权利要求 3 所述的方法,其中所述固体愈伤组织诱导培养基包含:

IBA,含量为约  $0.49 \mu\text{M}$ ;

2,4-D,含量为约  $0.45 \mu\text{M}$ ;

TDZ,含量为约  $0.45 \mu\text{M}$ ;

BA,含量为约  $0.66 \mu\text{M}$ ;和

脯氨酸,含量为约  $100\text{mg}/\text{l}$ 。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中培养基包含:

枝芽诱导培养基包含:

IBA,含量为约  $0.05 \mu\text{M}$ -约  $4.90 \mu\text{M}$ ;

TDZ,含量为约  $0.05 \mu\text{M}$ -约  $2.27 \mu\text{M}$ ;

BA,含量为约  $0.02 \mu\text{M}$ -约  $4.44 \mu\text{M}$ ;

STS,含量为约  $0.10 \mu\text{M}$ -约  $20 \mu\text{M}$ ;和

酪蛋白水解物,含量为约 5mg/l- 约 200mg/l ;

枝芽增殖和发育培养基包含 :

IBA,含量为约 0.05  $\mu$ M- 约 4.90  $\mu$ M ;

TDZ,含量为约 0.01  $\mu$ M- 约 2.27  $\mu$ M ;

BA,含量为约 0.04  $\mu$ M- 约 4.44  $\mu$ M ;

Zn,含量为约 0.05  $\mu$ M- 约 4.56  $\mu$ M ;

AdSO<sub>4</sub>,含量约 5.43  $\mu$ M- 约 271.5  $\mu$ M ;和

酪蛋白水解物,含量为约 5mg/l- 约 200mg/l ;

枝芽伸长培养基包含 :

BA,含量为约 0.04  $\mu$ M- 约 4.44  $\mu$ M ;

Kn,含量为约 0.05  $\mu$ M- 约 4.65  $\mu$ M ;

GA<sub>3</sub>,含量为约 0.03  $\mu$ M- 约 2.89  $\mu$ M ;

AdSO<sub>4</sub>,含量为约 5.43  $\mu$ M- 约 271.5  $\mu$ M ;和

酪蛋白水解物,含量为约 5mg/l- 约 200mg/l ;

芽成熟培养基包含 :

IBA,含量为约 0.05  $\mu$ M- 约 4.90  $\mu$ M ;

Kn,含量为约 0.05  $\mu$ M- 约 4.65  $\mu$ M ;

GA<sub>3</sub>,含量为约 0.03  $\mu$ M- 约 2.89  $\mu$ M ;

AdSO<sub>4</sub>,含量为约 5.43  $\mu$ M- 约 271.5  $\mu$ M ;和

酪蛋白水解物,含量为约 5mg/l- 约 200mg/l ;以及

液体生长调节剂溶液包含 :

IBA,含量为约 4.90  $\mu$ M- 约 245.0  $\mu$ M。

6. 权利要求 5 所述的方法,其中培养基包含 :

枝芽诱导培养基包含 :

IBA,含量为约 0.98  $\mu$ M ;

TDZ,含量为约 0.45  $\mu$ M ;

BA,含量为约 0.22  $\mu$ M ;

STS,含量为约 4.0  $\mu$ M ;和

酪蛋白水解物,含量为约 100mg/l ;

枝芽增殖和发育培养基包含 :

IBA,含量为约 0.49  $\mu$ M ;

TDZ,含量为约 0.23  $\mu$ M ;

BA,含量为约 0.44  $\mu$ M ;

Zn,含量为约 0.92  $\mu$ M ;

AdSO<sub>4</sub>,含量为约 135.75  $\mu$ M ;和

酪蛋白水解物,含量为约 100mg/l ;

枝芽伸长培养基包含 :

BA,含量为约 0.66  $\mu$ M ;

Kn,含量为约 1.17  $\mu$ M ;

GA<sub>3</sub>, 含量为约 0.73 μM ;  
AdSO<sub>4</sub>, 含量为约 135.75 μM ;和  
酪蛋白水解物, 含量为约 100mg/l ;  
芽成熟培养基包含 :  
IBA, 含量为约 0.49 μM ;  
Kn, 含量为约 1.17 μM ;  
GA<sub>3</sub>, 含量为约 0.73 μM ;  
AdSO<sub>4</sub>, 含量为约 135.75 μM ;和  
酪蛋白水解物的含量为约 100mg/l ;以及  
液体生长调节剂溶液包含 :  
IBA, 含量为约 49.0 μM。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法, 其中每种培养基进一步包含约 0.5% - 约 10% 的蔗糖和约 0.5% - 约 1.0% 的琼脂。

8. 权利要求 7 所述的方法, 其中每种培养基包含约 3% 的蔗糖和约 0.8% 的琼脂。

9. 权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法, 其中每个培养步骤在约 25 ± 2°C 进行。

10. 权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中每个培养步骤在光周期为 16 小时光照 / 8 小时黑暗, 光强 150 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 进行。

11. 权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法, 其中所述培养进行的时间如下 :

约 2- 约 4 周, 用于愈伤组织诱导 ;

当外植体为叶柄、花梗、花序梗或花序轴外植体的薄切片时, 约 2- 约 5 周, 用于枝芽诱导, 或当外植体为来自所述叶柄、花梗、花序梗或花序轴外植体的愈伤组织时, 约 4- 约 8 周, 用于枝芽诱导 ;

约 2- 约 4 周, 用于芽增殖和发育 ;

约 2- 约 4 周, 用于芽伸长 ; 和

约 2- 约 6 周, 用于芽成熟。

12. 权利要求 11 所述的方法, 其中培养进行的时间如下 :

约 3 周, 用于愈伤组织诱导 ;

当外植体为叶柄、花梗、花序梗或花序轴外植体的薄切片时, 约 4 周, 用于枝芽诱导, 或当外植体为来自所述叶柄、花梗、花序梗或花序轴外植体的愈伤组织时, 约 7 周, 用于枝芽诱导 ;

约 3 周, 用于芽增殖和发育 ;

约 3 周, 用于芽伸长 ; 和

约 3 周, 用于芽成熟。

## 麻风树属植物的直接和间接器官发生

[0001] 交叉引用相关申请

[0002] 本申请涉及提交于 2012 年 11 月 16 日的美国临时专利申请序列号 61/727, 319, 并要求其优先权。此申请在此以其整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 本发明大体上与植物生物技术相关。更具体来说, 本发明涉及用于麻风树属植物, 如麻风树 (*Jatropha curcas*) 的高效的直接器官发生和间接器官发生的方法和培养基组成。

[0004] 文中用于说明本发明的背景或者提供关于实践的额外细节的出版物和其他材料以引用方式并入, 并且为方便起见, 分别分组于参考书目中。

[0005] 麻风树属于大戟科。麻风树属是一个包括超过 170 个物种的大属。植物麻风树近来作为热带能源植物引起特别关注。将种子粉碎, 可以加工得到的油以产生可在一个标准的柴油汽车使用的高品质的生物柴油。该植物每公顷的燃料产量可能是大豆的四倍多, 玉米的十倍多。一公顷麻风树属植物据称生产 1892 升的燃料 ([http://en.wikipedia.org/wiki/Jatropha\\_oil](http://en.wikipedia.org/wiki/Jatropha_oil))。麻风树主要通过种子繁殖, 通过种子培育的植株中观察到种子产量和油含量变化显著 (Kumar&Reddy 2010, Pant et al., 2006 ;Jha et al., 2007)。因此, 通过种子的常规繁殖是不可靠的, 以及通过枝插 (stem cutting) 无性繁殖不足以满足需求 (Heller, 1996 ;Openshaw, 2000)。

[0006] 体外再生技术提供了用于种质资源保存、纯系植物质量增加和遗传转化的强大的工具。过去二十年, 为用不同的培养基组成开发麻风树的高效再生付出了相当大的努力。这些报道包括下胚轴器官发生 (He et al., 2009 ;Sharma et al., 2011 ;Sahoo et al., 2011)、上胚轴器官发生 (Wei et al., 2004)、叶柄器官发生 (Kumar and Reddy, 2010a, b, Dubey et al., 2010, Kumar et al., 2011a)、茎器官发生 (Singh et al., 2010)、叶外植体器官发生 (Sujatha and Mukta, 1996 ;Sujatha et al., 2005 ;Deore and Johnson, 2007 ;Kumar et al., 2010a, b ;Kumar et al., 2011a)、茎尖和结外植体器官发生 (Rajore&Batra(2005) ;Sreenivasachar, 2007 ;Datta et al 2007)、子叶盘器官发生 (Li et al., 2008) 和体细胞胚胎发生 (Jha et al. 2007)。以往的研究开发的系统缺乏效率和可重复性以及需要大量外植体作为起始材料。

[0007] 想要开发从麻风树的外植体薄切片开始的高效再生系统。

### 发明内容

[0008] 本发明大体上与植物生物技术相关。更具体来说, 本发明涉及用于麻风树属植物, 如麻风树 (*Jatropha curcas*) 的高效的直接器官发生和间接器官发生的方法和培养基组成。

[0009] 因此, 本发明提供了通过从麻风树属植物, 如麻风树, 获得的外植体器官发生生产植物的方法。根据本发明, 外植体从健康的植物获得。在一个实施方式中, 所述健康的植物

扦插繁殖并保持在温室中。在另一个实施方式中,所述健康的植物从田间获得。根据本发明,外植体从叶柄、花梗花序梗和花序轴外植体的薄切片获得。

[0010] 一方面,该方法是麻风树属植物的直接器官发生的方法。按照该方面,该方法包括:(a) 将本文描述的外植体的薄切片在固体枝芽(shoot bud)诱导培养基上培养以诱导枝芽的形成,(b) 将枝芽在固体枝芽增殖发育培养基上培养以使枝芽增殖和发育,(c) 将从发育的枝芽衍生而来的枝芽丛在固体芽伸长培养基上培养,以使芽(shoot)伸长,(d) 将从枝芽丛分离出的伸长的芽在固体芽成熟培养基上培养,以使芽成熟,(e) 将成熟的芽浸入液体生长调节剂溶液,将浸过的芽转移到土里以使麻风树属植物生长。

[0011] 在第二方面的实施方式中,该方法是麻风树属植物的间接器官发生的方法。按照该方面,该方法包括:(a) 将本文描述的外植体的薄切片在固体愈伤组织诱导培养基上培养以诱导器官发生性愈伤组织形成,(b) 将器官发生性愈伤组织在固体枝芽诱导培养基上培养以诱导枝芽的形成,(c) 将枝芽在固体枝芽增殖发育培养基上培养以使枝芽增殖和发育,(d) 将从发育的枝芽衍生而来的枝芽丛在固体芽伸长培养基上培养,以使芽伸长,(e) 将从枝芽丛分离出的伸长的芽在固体芽成熟培养基上培养,以使芽成熟,(f) 将成熟的芽浸入液体生长调节剂溶液,将浸过的芽转移到土里以使麻风树属植物生长。

[0012] 在一个实施方式中,固体枝芽诱导培养基包含 MS 基本盐(Murashige and Skoog, 1962)、B5 维生素(Gamborg et al., 1968)、植物激素、硫代硫酸银(STS)以及酪蛋白水解物。在一个实施方式中,植物激素是生长素和细胞分裂素的混合物。在另一个实施方式中,生长素是吲哚-3-丁酸(IBA)。在进一步的实施方式中,细胞分裂素是噻苯隆(TDZ)和 6-苄基氨基嘌呤(BA)。在一个实施方式中,培养基含有碳源,如蔗糖和固化剂,如琼脂。在另一个实施方式中,培养在光/暗周期完成。

[0013] 在一个实施方式中,固体枝芽增殖和发育培养基包含 MS 基础盐、B5 维生素、植物激素、硫酸腺嘌呤( $\text{AdSO}_4$ )和酪蛋白水解物。在一个实施方式中,植物激素是生长素和细胞分裂素的混合物。在另一个实施方式中,生长素是吲哚-3-丁酸(IBA)。在进一步的实施方式中,细胞分裂素是 TDZ、BA 和玉米素(Zn)。在一个实施方式中,培养基含有碳源,如蔗糖和固化剂,如琼脂。在另一个实施方式中,培养在光/暗周期完成。

[0014] 在一个实施方式中,固体芽伸长培养基包含 MS 基础盐、B5 维生素、植物激素、硫酸腺嘌呤( $\text{AdSO}_4$ )和酪蛋白水解物。在一个实施方式中,植物激素是赤霉素( $\text{GA}_3$ )和细胞分裂素的混合物。在另一个实施方式中,细胞分裂素是 BA 和激动素(Kn)。在一个实施方式中,培养基含有碳源,如蔗糖和固化剂,如琼脂。在另一个实施方式中,培养在光/暗周期完成。

[0015] 在一个实施方式中,液体生长调节剂溶液包含 MS 基础盐、B5 维生素和生长素。在一个实施方式中,生长素是 IBA。在另一个实施方式中,麻风树属植物的生长在光/暗周期完成。

[0016] 在一个实施方式中,固体愈伤组织诱导培养基包括 MS 基础盐、B5 维生素、植物激素和脯氨酸。在一个实施方式中,植物激素是生长素和细胞分裂素的混合物。在另一个实施方式中,生长素是 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)和 IBA。在进一步的实施方式中,细胞分裂素是 TDZ 和 BA。在一个实施方式中,培养基含有碳源,如蔗糖和固化剂,如琼脂。在另一个实施方式中,培养在光/暗周期完成。

## 附图说明

[0017] 图 1a 显示从麻疯树的叶柄、花梗和花序轴组织衍生而来的外植体来源图解说明。

[0018] 图 1b 显示从麻疯树的花序梗组织衍生而来的外植体来源图解说明。

[0019] 图 2a-f 显示从外植体（叶柄、花梗、花序梗和花序轴）的薄切片直接器官发生的代表性阶段。图 2a：接种到芽诱导培养基上的外植体，显示 2 周后芽的最初形成。图 2b：4 周后显示发育良好的枝芽的培养物。图 2c：从枝芽形成微芽。图 2d：芽的伸长。图 2e：芽的成熟。图 2f：伸长的芽的离体生根。

[0020] 图 3a-f 显示从外植体（叶柄、花梗、花序梗和花序轴）的薄切片间接器官发生的代表性阶段。图 3a：外植体，如叶柄外植体，接种到愈伤组织诱导培养基，一个星期内显示膨胀。图 3b：2 周后在芽诱导培养基里形成致密的愈伤组织。图 3c：4 周后枝芽诱导。图 3d：从枝芽发育出微芽。图 3e：芽的成熟。图 3f：芽的离体生根。

[0021] 发明详述

[0022] 本发明大体上与植物生物技术相关。更具体来说，本发明涉及用于麻风树属植物，如麻风树 (*Jatropha curcas*) 的高效的直接器官发生和间接器官发生的方法和培养基组成。

[0023] 因此，本发明提供了通过从麻风树属植物，如麻风树，获得的外植体器官发生生产植物的方法。根据本发明，外植体从健康的植物获得。在一个实施方式中，健康的植物扦插繁殖并保持在温室中。在另一个实施方式中，健康的植物从田间获得。根据本发明，外植体从叶柄、花梗、花序梗和花序轴外植体的薄切片获得（图 1a 和图 1b）。在一个实施方式中，所述外植体是来自第 2 到第 4 叶的叶柄。在另一个实施方式中，外植体是来自开花前的花序的花梗、花序梗、和花序轴。在一个实施方式中，外植体的切片被水平地切成约 0.5mm 至约 1.0mm 厚的薄切片，优选小于约 1.0mm 厚。在进一步的实施方式中，外植体在流动的自来水中洗涤约 3min 至约 7min，优选约 5min。外植体随后在氯己定外科洗液（100ml 蒸馏水中 2 滴）洗约 8min 至 12min，优选约 10min，以去除粘附表面的颗粒。然后将外植体用 0.1% 氯化汞表面灭菌约 8min 至约 12min，优选约 10min，接着用无菌蒸馏水洗涤数次，如三次。

[0024] 一方面，该方法是麻风树属植物的直接器官发生的方法。按照该方面，该方法包括：(a) 将本文描述的外植体的薄切片在固体枝芽诱导培养基上培养以诱导枝芽的形成，(b) 将枝芽在固体枝芽增殖发育培养基上培养以使枝芽增殖和发育，(c) 将从发育的枝芽衍生而来的枝芽丛在固体芽伸长培养基上培养，以使芽伸长，(d) 将从枝芽丛分离出的伸长的芽在固体芽成熟培养基上培养，以使芽成熟，(e) 将成熟的芽浸入液体生长调节剂溶液，将浸过的芽转移到土里以使麻风树属植物生长。

[0025] 在第二方面的实施方式中，该方法是麻风树属植物的间接器官生成的方法。按照该方面，该方法包括：(a) 将在此描述的外植体的薄切片在固体愈伤组织诱导培养基上培养以诱导器官发生性愈伤组织形成，(b) 将器官发生性愈伤组织在固体枝芽诱导培养基上培养以诱导枝芽的形成，(c) 将枝芽在固体芽增殖发育培养基上培养以使芽增殖和发育 (d) 将从发育的枝芽衍生而来的枝芽丛在固体芽伸长培养基上培养，以使芽伸长，(e) 将从枝芽丛分离出的伸长的芽在固体芽成熟培养基上培养，以使芽成熟，(f) 将成熟的芽浸入液体生长调节剂溶液，将浸过的芽转移到土里以使麻风树属植物生长。

[0026] 在一个实施方式中，固体枝芽诱导培养基含有 MS 基本盐 (Murashige and

Skoog, 1962)、B5 维生素 (Gamborg et al., 1968)、植物激素、硫代硫酸银 (STS) 以及酪蛋白水解物。在一个实施方式中,植物激素是生长素和细胞分裂素的混合物。在另一个实施方式中,生长素是吲哚-3-丁酸 (IBA)。在进一步的实施方式中,细胞分裂素是噻苯隆 (TDZ) 和 6-苄基氨基嘌呤 (BA)。在一个实施方式中,培养基含有约  $0.05 \mu\text{M}$  至约  $4.90 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.25 \mu\text{M}$  至约  $3.67 \mu\text{M}$ , 更优选约  $0.98 \mu\text{M}$  MIBA。在另一个实施方式中,培养基含有约  $0.05 \mu\text{M}$  至约  $2.27 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.09 \mu\text{M}$  至约  $1.82 \mu\text{M}$ , 更优选约  $0.45 \mu\text{M}$  TDZ。在进一步的实施方式中,培养基含有约  $0.02 \mu\text{M}$  至约  $4.44 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.04 \mu\text{M}$  至约  $3.33 \mu\text{M}$ , 更优选约  $0.22 \mu\text{M}$  BA。在一个实施方式中,培养基含有约  $0.10 \mu\text{M}$  至约  $20.0 \mu\text{M}$ , 优选约  $1.0 \mu\text{M}$  至约  $10 \mu\text{M}$ , 更优选约  $4.0 \mu\text{M}$  STS。在另一个实施方式中,培养基含有约  $5\text{mg}/1$  至约  $200\text{mg}/1$ , 优选约  $10\text{mg}/1$  至约  $150\text{mg}/1$ , 更优选约  $100\text{mg}/1$  酪蛋白水解物。在一个实施方式中,培养基含有碳源,如蔗糖和固化剂,如琼脂。在此培养基中可以使用本领域技术人员所熟知的任何合适的碳源和合适的固化剂。在一个实施方式中,蔗糖为约  $0.5\%$  至约  $10\%$ , 优选为约  $1\%$  至约  $6\%$ , 更优选约  $3\%$ 。在另一个实施方式中,琼脂为约  $0.5\%$  至约  $1.0\%$ , 优选为约  $0.6\%$  至约  $0.9\%$ , 更优选约  $0.8\%$ 。在另外的实施方式中,培养是在光/暗周期完成。在进一步的实施方式中,光周期为 16 小时光照/8 小时黑暗,光强  $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0027] 在一个实施方式中,固体枝芽增殖和发育培养基包括 MS 基础盐、B5 维生素、植物激素、硫酸腺嘌呤 ( $\text{AdSO}_4$ ) 和酪蛋白水解物。在一个实施方式中,植物激素是生长素和细胞分裂素的混合物。在另一个实施方式中,生长素是 IBA。在进一步的实施方式中,细胞分裂素是 TDZ、BA 和玉米素 (Zn)。在一个实施方式中,培养基含有约  $0.05 \mu\text{M}$  至约  $4.90 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.10 \mu\text{M}$  至约  $3.67 \mu\text{M}$ , 更优选约  $0.49 \mu\text{M}$  IBA。在另一个实施方式中,培养基含有约  $0.01 \mu\text{M}$  至约  $2.27 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.05 \mu\text{M}$  至约  $1.82 \mu\text{M}$ , 更优选约  $0.23 \mu\text{M}$  TDZ。在更进一步的实施方式中,培养基含有约  $0.04 \mu\text{M}$  至约  $4.44 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.08 \mu\text{M}$  至约  $3.33 \mu\text{M}$ , 更优选约  $0.44 \mu\text{M}$  BA。在另外的实施方式中,培养基含有约  $0.05 \mu\text{M}$  至约  $4.56 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.23 \mu\text{M}$  至约  $3.42 \mu\text{M}$ , 更优选约  $0.92 \mu\text{M}$  Zn。在一个实施方式中,培养基含有约  $5.43 \mu\text{M}$  至约  $271.5 \mu\text{M}$ , 优选约  $27.15 \mu\text{M}$  至约  $162.9 \mu\text{M}$ , 更优选约  $135.75 \mu\text{M}$   $\text{AdSO}_4$ 。在另一个实施方式中,培养基含有约  $5\text{mg}/1$  至约  $200\text{mg}/1$ , 优选约  $10\text{mg}/1$  至约  $150\text{mg}/1$ , 更优选约  $100\text{mg}/1$  酪蛋白水解物。在一个实施方式中,培养基含有碳源,如蔗糖和固化剂,如琼脂。在此培养基中可以使用本领域技术人员所熟知的任何合适的碳源和合适的固化剂。在一个实施方式中,蔗糖为约  $0.5\%$  至约  $10\%$ , 优选为约  $1\%$  至约  $6\%$ , 更优选约  $3\%$ 。在另一个实施方式中,琼脂为约  $0.5\%$  至约  $1.0\%$ , 优选为约  $0.6\%$  至约  $0.9\%$ , 更优选约  $0.8\%$ 。在另外的实施方式中,培养是在光/暗周期完成。在进一步的实施方式中,光周期为 16 小时光照/8 小时黑暗,光强  $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0028] 在一个实施方式中,固体芽伸长培养基含有 MS 基础盐、B5 维生素,植物激素、硫酸腺嘌呤 ( $\text{AdSO}_4$ ) 和酪蛋白水解物。在一个实施方式中,植物激素是赤霉素 ( $\text{GA}_3$ ) 和细胞分裂素的混合物。在另一个实施方式中,细胞分裂素是 BA 和激动素 (Kn)。在一个实施方式中,培养基含有约  $0.03 \mu\text{M}$  至约  $2.89 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.06 \mu\text{M}$  至  $2.17 \mu\text{M}$ , 更优选  $0.73 \mu\text{M}$   $\text{GA}_3$ 。在进一步的实施方式中,培养基含有约  $0.04 \mu\text{M}$  至约  $4.44 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.08 \mu\text{M}$  至约  $3.33 \mu\text{M}$ , 更优选  $0.66 \mu\text{M}$  BA。在另外的实施方式中,培养基含有约  $0.05 \mu\text{M}$  至约  $4.65 \mu\text{M}$ , 优选约  $0.23 \mu\text{M}$  至约  $3.49 \mu\text{M}$ , 更优选约  $1.17 \mu\text{M}$  Kn。在一个实施方式中,培养基含有约  $5.43 \mu\text{M}$

至约 271.5  $\mu\text{M}$ , 优选约 27.15  $\mu\text{M}$  至约 162.9  $\mu\text{M}$ , 更优选约 135.75  $\mu\text{M}$   $\text{AdSO}_4$ 。在另一个实施方式中, 培养基含有约 5mg/1 至约 200mg/1, 优选约 10mg/1 至约 150mg/1, 更优选约 100mg/1 酪蛋白水解物。在一个实施方式中, 培养基含有碳源, 如蔗糖和固化剂, 如琼脂。在此培养基中可以使用本领域技术人员所熟知的任何合适的碳源和合适的固化剂。在一个实施方式中, 蔗糖为约 0.5% 至约 10%, 优选为约 1% 至约 6%, 更优选约 3%。在另一个实施方式中, 琼脂为约 0.5% 至约 1.0%, 优选为约 0.6% 至约 0.9%, 更优选约 0.8%。在另外的实施方式中, 培养是在光 / 暗周期完成。在进一步的实施方式中, 光周期为 16 小时光照 / 8 小时黑暗, 光强  $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0029] 在一个实施方式中, 固体芽成熟培养基包括 MS 基础盐、B5 维生素、植物激素、硫酸腺嘌呤 ( $\text{AdSO}_4$ ) 和酪蛋白水解物。在一个实施方式中, 植物激素是  $\text{GA}_3$ 、生长素和细胞分裂素的混合物。在另外一个实施方式中, 生长素是 IBA。在进一步的实施方式中, 细胞分裂素是 Kn。在一个实施方式中, 培养基含有约 0.03  $\mu\text{M}$  至约 2.89  $\mu\text{M}$ , 优选约 0.06  $\mu\text{M}$  至约 2.17  $\mu\text{M}$ , 更优选约 0.73  $\mu\text{M}$   $\text{GA}_3$ 。在进一步的实施方式中, 培养基含有约 0.05  $\mu\text{M}$  至约 4.90  $\mu\text{M}$ , 优选约 0.10  $\mu\text{M}$  至约 3.67  $\mu\text{M}$ , 更优选约 0.49  $\mu\text{M}$  IBA。在另外的实施方式中, 培养基含有约 0.05  $\mu\text{M}$  至约 4.65  $\mu\text{M}$ , 优选约 0.23  $\mu\text{M}$  至约 3.49  $\mu\text{M}$ , 更优选约 1.17  $\mu\text{M}$  MKn。在一个实施方式中, 培养基含有约 5.43  $\mu\text{M}$  至约 271.5  $\mu\text{M}$ , 优选约 27.15  $\mu\text{M}$  至约 162.9  $\mu\text{M}$ , 更优选约 135.75  $\mu\text{M}$   $\text{MAdSO}_4$ 。在另一个实施方式中, 培养基含有约 5mg/1 至约 200mg/1, 优选约 10mg/1 至约 150mg/1, 更优选 100mg/1 酪蛋白水解物。在一个实施方式中, 培养基含有碳源, 如蔗糖和固化剂, 如琼脂。在此培养基中可以使用本领域技术人员所熟知的任何合适的碳源和合适的固化剂。在一个实施方式中, 蔗糖为约 0.5% 至约 10%, 优选为约 1% 至约 6%, 更优选约 3%。在另一个实施方式中, 琼脂为约 0.5% 至约 1.0%, 优选为约 0.6% 至约 0.9%, 更优选约 0.8%。在另外的实施方式中, 培养是在光 / 暗周期完成。在进一步的实施方式中, 光周期为 16 小时光照 / 8 小时黑暗, 光强  $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0030] 在一个实施方式中, 液体生长调节剂溶液含有 MS 基础盐、B5 维生素和生长素激素。在一个实施方式中, 生长素是 IBA。在进一步的实施方式中, 培养基含有约 4.90  $\mu\text{M}$  至约 245.0  $\mu\text{M}$ , 优选约 9.8  $\mu\text{M}$  至约 196.0  $\mu\text{M}$ , 更优选约 49.0  $\mu\text{M}$  IBA。在一个实施方式中, 在浸入液体生长调节剂溶液前, 芽的底部用蒸馏水冲洗, 以去除痕量的培养基。在另一个实施方式中, 麻风树属植物的生长是在光 / 暗周期完成。在一个实施方式中, 土壤是盆栽土壤或盆栽混合土。在另一个实施方式中, 完全成熟的芽在土壤生长的三周内开始产出新的叶子和根。

[0031] 在一个实施方式中, 固体愈伤组织诱导培养基包含 MS 基础盐、B5 维生素、植物激素和脯氨酸。在一个实施方式中, 植物激素是生长素和细胞分裂素的混合物。在另一个实施方式中, 生长素是 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D) 和 IBA。在进一步的实施方式中, 细胞分裂素是 TDZ 和 BA。在另一个实施方式中, 培养基含有约 0.05  $\mu\text{M}$  至约 4.53  $\mu\text{M}$ , 优选约 0.09  $\mu\text{M}$  至约 3.40  $\mu\text{M}$ , 更优选约 0.45  $\mu\text{M}$  2,4-D。在进一步的实施方式中, 培养基含有约 0.05  $\mu\text{M}$  至约 4.90  $\mu\text{M}$ , 优选约 0.10  $\mu\text{M}$  至约 2.45  $\mu\text{M}$ , 更优选约 0.49  $\mu\text{M}$  IBA。在另一个实施方式中, 培养基含有约 0.05  $\mu\text{M}$  至约 2.27  $\mu\text{M}$ , 优选约 0.09  $\mu\text{M}$  至约 1.82  $\mu\text{M}$ , 更优选约 0.45  $\mu\text{M}$  TDZ。在一个实施方式中, 培养基含有约 0.04  $\mu\text{M}$  至约 4.44  $\mu\text{M}$ , 优选约 0.08  $\mu\text{M}$  至约 3.33  $\mu\text{M}$ , 更优选约 0.66  $\mu\text{M}$  BA。在另一个实施方式中, 培养基含有约 10mg/1 至约 500mg/1

1, 优选约 25mg/l 至约 200mg/l, 更优选约 100mg/l 脯氨酸。在一个实施方式中, 培养基含有碳源, 如蔗糖和固化剂, 如琼脂。在此培养基中可以使用本领域技术人员所熟知的任何合适的碳源和合适的固化剂。在一个实施方式中, 蔗糖为约 0.5% 至约 10%, 优选为约 1% 至约 6%, 更优选约 3%。在另一个实施方式中, 琼脂为约 0.5% 至约 1.0%, 优选为约 0.6% 至约 0.9%, 更优选约 0.8%。在另外的实施方式中, 培养是在光 / 暗周期完成。在进一步的实施方式中, 光周期为 16 小时光照 / 8 小时黑暗, 光强  $150 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0032] 在直接器官发生方法中使用以下培养时间。如本领域技术人员所熟知的, 如有必要, 约每 2-3 周, 可以在新鲜的培养基上继代培养, 优选为约每三周。

[0033] 枝芽诱导: 约 2- 约 5 周, 优选为约 4- 约 5 周, 更优选为约 4 周。

[0034] 枝芽增殖和发育: 约 2- 约 4 周, 优选为约 3- 约 4 周, 更优选约为 3 周。

[0035] 芽伸长: 约 2- 约 4 周, 优选约 3- 约 4 周, 更优选约 3 周。

[0036] 芽成熟: 约 2- 约 6 周, 优选为约 3- 约 6 周, 更优选约 4 周。对于在第一次培养期后生理学未成熟的芽, 可以使用额外的相同培养时间。

[0037] 在间接器官发生方法中使用以下培养时间。如本领域技术人员所熟知的, 如有必要, 约每 3 周, 可以在新鲜的培养基上继代培养。

[0038] 愈伤组织诱导: 约 2- 约 4 周, 优选约 2- 约 3 周, 更优选约 3 周。

[0039] 枝芽诱导: 约 4- 约 8 周, 优选约 4- 约 7 周, 更优选约 7 周。在优选的实施方式中, 每 2 周将愈伤组织于新鲜培养基上继代培养。

[0040] 枝芽增殖和发育: 约 2- 约 4 周, 优选约 3- 约 4 周, 更优选约 3 周。

[0041] 芽伸长: 约 2- 约 4 周, 优选约 3- 约 4 周, 更优选约 3 周。

[0042] 芽成熟: 约 2- 约 6 周, 优选约 3- 约 6 周, 更优选约 4 周。对于在第一次培养期后生理学未成熟的芽, 可以使用额外的相同培养时间。

[0043] 另外, 本发明提供可用于麻风树属植物的转化系统。对麻风树属植物的转化而言, 转化 / 转染的方法不是关键的; 目前多种转化 / 转染方法可用。随着更新的方法可转化作物或其它宿主细胞中, 它们可直接应用。因此, 已经开发了各种各样的方法将 DNA 序列插入宿主细胞的基因组, 以获得该序列的转录和 / 或翻译, 以实现在生物体的表型变化。因此, 任何可提供有效转化 / 转染的方法都可采用。见, 例如, Mathews et al. (1992)、Neuhaus et al. (1987)、Wilde et al. (1992)、美国专利号 7, 241, 937、7, 273, 966 和 7, 291, 765 和美国专利申请公开号 2007/0231905 和 2008/0010704。也见, 国际专利申请公开号 W02005/103271。

[0044] 在一个实施方式中, 可以使用本领域中公知技术将外植体组织和携带 DNA 构建体的农杆菌菌株共培养, 所述 DNA 构建体含有感兴趣的基因或核酸。转化的组织可以使用本领域中熟知的常规技术进行选择。在进一步的实施方式中, DNA 可使用常规的技术, 如颗粒轰击导入外植体组织。转化的组织可以使用本领域中熟知的常规技术进行选择。转化或转基因植物可以使用本文描述的器官发生方法再生。

[0045] 类似地, 被插入麻风树属植物的 DNA (感兴趣的 DNA) 不是转化方法的关键。通常, 导入植物的 DNA 是构建体的一部分。所述 DNA 可以是感兴趣的基因, 如蛋白质的编码序列, 或者它可以是能够调节基因表达的序列, 如反义序列、正义抑制序列或 miRNA 序列。所述构建体通常包括调节区, 可操作地连接到感兴趣的 DNA 的 5' 端, 和 / 或感兴趣的 DNA 的 3' 端。

含有所有这些元件的盒在此也被称为表达盒。表达盒可另外在表达盒构建体中含有 5' 前导序列。调节区（即启动子，转录调节区和翻译终止区）和 / 或编码信号锚的多核苷酸对于宿主细胞或彼此可以是自身的 / 不同来源的。或者，调节区和 / 或编码信号锚的多核苷酸对于宿主细胞或彼此可以是异源的。参见，美国专利号 7, 205, 453 和美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。表达盒可以额外含有可选择的标记基因。参见，美国专利号 7, 205, 453 和美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。

[0046] 通常，表达盒会包含可选择的标记基因用于选择转化的细胞。可选择的标记基因用于转化的细胞或组织的筛选。通常，植物可选择的标记基因编码抗生素抗性，合适的基因包括至少一组编码抗生素奇霉素抗性的基因、编码链霉素抗性的链霉素磷酸转移酶 (spt) 基因、编码卡那霉素或遗传霉素抗性的新霉素磷酸转移酶 (nptII) 基因、编码潮霉素抗性的潮霉素磷酸转移酶 (hpt 或 aphiv) 基因，乙酰乳酸合酶 (als) 基因。或者，植物可选择的标记基因编码除草剂抗性，如对磺酰脲类除草剂、草铵膦、草甘膦、铵、溴苯腈、咪唑啉酮、和 2, 4- 二氯苯氧基乙酸 (2, 4-D) 的抗性，包括编码抑制谷氨酰胺合酶作用的除草剂如草丁膦或 basta 的基因（如 bar 基因）。通常参见，W002/36782，美国专利号 7, 205, 453 和美国专利申请公开号 2006/0248616 和 2007/0143880，以及其引用的那些参考文献。这一系列可选择的标记基因并不意味着限定。任何可选择的标记基因都可以使用。

[0047] 许多启动子可用于本发明的实践。启动子可以基于所需结果选择。即，核酸可以与组成型、组织偏爱型或者其它启动子组合在目标宿主细胞中进行表达。组成型启动子包括，例如，Rsyn7 的核心启动子 (W0 99/48338 和美国专利号 6, 072, 050)；核心 CaMV35S 启动子 (Odell et al., 1985)；水稻肌动蛋白 (McElroy et al., 1990) 泛素 (Christensen and Quail, 1989; Christensen et al., 1992)；pEMU (Last et al., 1991)；MAS (Velten et al., 1984)；ALS 启动子 (美国专利号 5, 659, 026) 等。其他组成型启动子包括，例如，美国专利号 5, 608, 149；5, 608, 144；5, 604, 121；5, 569, 597；5, 466, 785；5, 399, 680；5, 268, 463；和 5, 608, 142 中公开的那些。

[0048] 其它启动子包括诱导型启动子，特别是病原诱导启动子。这些启动子包括那些来自病原相关蛋白 (PR 蛋白) 的启动子，其由以下病原体感染诱导：例如，PR 蛋白、SAR 蛋白、 $\beta$ -1, 3- 葡聚糖酶、几丁质酶等。其它启动子包括那些在病原体感染位置或附近表达的启动子。在进一步的实施方式中，启动子可以是创伤诱导型启动子。在其他实施方式中，化学调控启动子可通过外源化学调节剂的应用来调节基因在植物中的表达。启动子可以是化学诱导型启动子，其应用化学品诱导基因表达，或者化学抑制型启动子，其应用化学品阻遏基因表达。此外，组织偏爱型启动子可以用于靶向增强特定植物组织内感兴趣的多核苷酸的表达。每个这些启动子被描述在美国专利号 6, 506, 962、6, 575, 814、6, 972, 349 和 7, 301, 069 和美国专利申请公开号 2007/0061917 和 2007/0143880。

[0049] 在适当情况下，可以优化感兴趣的 DNA 以在转化的植物中增加表达。即，可以使用植物偏爱的密码子合成编码序列以提高表达。本领域有可用于合成植物偏爱基因的方法。见，例如，美国专利号 5, 380, 831、5, 436, 391、和 7, 205, 453 和美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。

[0050] 本发明首次展示叶柄、花梗、花序梗和花序轴外植体的薄切片的高效和使用以大规模体外生产麻风树组培苗。该方法采用从外植体薄切片直接和间接枝芽诱导，使用含有

MS 基础盐、B5 维生素并辅以不同浓度的植物激素和添加剂的培养基。植物激素包括生长素、细胞分裂素和赤霉素。添加剂包括酪蛋白酸水解产物、脯氨酸、硫代硫酸银 (STS)。当外植体和愈伤组织置于含 TDZ、IBA、BA 和 STS 的培养基上,可观察到最高效的枝芽诱导 (>90%)。含有不同浓度的 2,4-D、TDZ、BA、IBA 和脯氨酸的培养基是诱导器官发生性愈伤组织必不可少的。诱导的枝芽转移到含有 TDZ、BA、IBA、Zn、AdSO<sub>4</sub>和酪蛋白水解物的培养基上以使枝芽增殖和发育。微芽能在含有不同浓度的 BAKn、AdSO<sub>4</sub>、GA<sub>3</sub>和酪蛋白水解物的 MS 培养基上伸长。伸长的芽在含有不同浓度的 Kn、IBA、AdSO<sub>4</sub>、GA<sub>3</sub>和酪蛋白水解物的培养基上培养,以达到生理成熟。将完全成熟的芽在含有 IBA 的溶液中浸渍,然后移到土壤里,其能离体自我生根。

[0051] 除非另有说明,本发明的实践使用化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA、遗传学、免疫学、细胞生物学、细胞培养和转基因生物学的常规技术,这些都在本领域的技术范围内。见,例如,Maniatis et al.,1982,Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Sambrook et al.,1989,Molecular Cloning,2nd Ed.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Sambrook and Russell,2001,Molecular Cloning,3rd Ed.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Green and Sambrook,2012,Molecular Cloning,4th Ed.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Ausubel et al.,1992,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,including periodic updates);Glover,1985,DNA Cloning(IRL Press,Oxford);Russell,1984,Molecular biology of plants:a laboratory course manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.);Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Guthrie and Fink,Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology(Academic Press,New York,1991);Harlow and Lane,1988,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York);Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames&S.J.Higgins eds.1984);Transcription And Translation(B.D.Hames&S.J.Higgins eds.1984);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Methods In Enzymology,Vols.154and 155(Wu et al.eds.),Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer and Walker,eds.,Academic Press,London,1987);Handbook Of Experimental Immunology,Volumes I-IV(D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds.,1986);Riott,Essential Immunology,6th Edition,Blackwell Scientific Publications,Oxford,1988;Fire et al.,RNA Interference Technology:From Basic Science to Drug Development,Cambridge University Press,Cambridge,2005;Schepers,RNA Interference in Practice,Wiley - VCH,2005;Engelke,RNA Interference (RNAi):The Nuts&Bolts of siRNA Technology,DNA Press,2003;Gott,RNA Interference,Editing,and Modification:Methods and

Protocols (Methods in Molecular Biology), Human Press, Totowa, NJ, 2004 ;Sohail, Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application, CRC, 2004.

### 实施例

[0052] 参照下列实施例描述本发明,这是通过说明的方式提供并且非旨在以任何方式限制本发明。利用本领域已知的标准技术或下文具体描述的技术。实施例 1:用于开发冷适应的材料和方法

[0053] 外植体的植物材料和来源:选择麻风树杂交种。植物扦插繁殖并保持在新加坡国立大学淡马锡生命科学实验室的实验温室中 (Temasek Lifesciences Laboratory, #1Research link, National University of Singapore, Singapore 117604)。这些植物用作外植体的来源。

[0054] 外植体灭菌:来自第 2 到第 4 叶的叶柄和来自开花前的花序的花梗、花序梗和花序轴被选为本研究的外植体。外植体最初在流动的自来水中洗 5 分钟,接着在氯己定外科洗液中 (100 毫升蒸馏水中 2 滴) 洗 10 分钟,以去除粘附于表面的颗粒。然后将外植体用 0.1% 氯化汞表面灭菌 10 分钟,接着用灭菌的蒸馏水洗三次。

[0055] 培养基和培养条件:本研究中使用的化学试剂购自 Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands 和 Sigma Aldrich, Inc., St Louis, USA。培养基由 MS 基础盐、B5 维生素、3% 蔗糖和 0.8% 琼脂固化剂组成。培养基的 pH 值在高压灭菌前调节到 5.6-5.8。所有的培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 光照周期为 16 小时光照 /8 小时黑暗, 光强  $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。培养条件在整个器官发生阶段相同。培养基的组成如表 1 所示, 其还显示了根据本发明从麻风树的外植体直接或间接的器官发生的培养条件。

[0056] 表 1:从麻风树叶柄、花梗、花序梗和花序轴的外植体的薄切片直接和间接器官发生

[0057]

阶段	培养基组成	推论		时期 (周)	
		直接	间接	直接	间接
愈伤组织诱导	MS 盐 + B5 维生素 + 2,4-D (0.45 $\mu\text{M}$ ) + TDZ (0.45 $\mu\text{M}$ ) + BA (0.66 $\mu\text{M}$ ) + IBA (0.49 $\mu\text{M}$ ) + 脯氨酸(100 mg/l).	-	外植体切口的愈伤化	-	3
枝芽诱导	MS 盐 + B5 维生素 + TDZ (0.45 $\mu\text{M}$ ) + BA (0.22 $\mu\text{M}$ ) + IBA (0.98 $\mu\text{M}$ ) + STS (4.0 $\mu\text{M}$ ) + 酪蛋白水解物(100 mg/l).	枝芽从外植体萌生	枝芽从愈伤组织萌生	4	7

[0058]

枝芽增殖和发育	MS 盐 + B5 维生素 + TDZ (0.23 $\mu$ M) + AdSO <sub>4</sub> (135.75 $\mu$ M) + Zn (0.92 $\mu$ M) + BA (0.44 $\mu$ M) + IBA (0.49 $\mu$ M) + 酪蛋白水解物 (100 mg/l).	枝芽增殖和发育	枝芽增殖和发育	3	3
伸长	MS 盐 + B5 维生素 + BA (0.66 $\mu$ M) + Kn (1.17 $\mu$ M) + AdSO <sub>4</sub> (135.75 $\mu$ M) + GA <sub>3</sub> (0.73 $\mu$ M) + 酪蛋白水解物(100 mg/l).	芽伸长	芽伸长	3	3
成熟	MS 盐 + B5 维生素 + Kn (1.17 $\mu$ M) + AdSO <sub>4</sub> (135.75 $\mu$ M) + GA <sub>3</sub> (0.73 $\mu$ M) + IBA (0.49 $\mu$ M) + 酪蛋白水解物 (100 mg/l).	芽变得强壮和健康	芽变得强壮和健康	4	4
体外生根	MS 盐 + B5 维生素 + IBA (49.0 $\mu$ M) (浸渍液)	芽生根	芽生根	3	3
从叶柄、花梗、花序梗和花序轴的外植体的薄切片建立再生系统总共所需时间				17	23

[0059] 愈伤组织诱导:将外植体水平地切成小于 1.0 毫米厚的薄片,在含有 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D,0.45  $\mu$ M)、噻苯隆 (TDZ,0.45  $\mu$ M)、6-苄基氨基嘌呤 (BA,0.66  $\mu$ M)、吲哚-3-丁酸 (IBA,0.49  $\mu$ M) 和脯氨酸 (100mg/l) 的愈伤组织诱导培养基上培养。

[0060] 枝芽诱导:所有外植体(叶柄、花梗、花序梗和花序轴)的薄切片和在愈伤组织诱导培养基从不同外植体(叶柄、花梗、花序梗和花序轴)萌生的愈伤组织在含有 TDZ(0.45  $\mu$ M)、BA(0.22  $\mu$ M)、IBA(0.98  $\mu$ M)、硫代硫酸银 (STS,4.0  $\mu$ M) 和酪蛋白水解物 (100mg/l) 的枝芽诱导培养基上培养。

[0061] 枝芽增殖和发育:外植体和愈伤组织诱导出的枝芽被转移到含有 TDZ(0.23  $\mu$ M)、硫酸腺嘌呤 (AdSO<sub>4</sub>,135.75  $\mu$ M)、Zn(0.92  $\mu$ M)、BA(0.44  $\mu$ M)、吲哚-3-丁酸 (IBA,0.49  $\mu$ M) 和酪蛋白水解物 (100mg/l) 的枝芽增殖和发育的培养基上。

[0062] 芽伸长:发育良好的枝芽以芽丛形式取出 (dissect),被转移到含有 BA(0.66  $\mu$ M)、激动素 (Kn,1.17  $\mu$ M)、AdSO<sub>4</sub>(135.75  $\mu$ M)、赤霉素 (GA<sub>3</sub>,0.73  $\mu$ M) 和酪蛋白水解物 (100mg/l) 的芽伸长培养基上。

[0063] 芽成熟:从所述丛分离伸长的芽,在含有 Kn(1.17  $\mu$ M)、AdSO<sub>4</sub>(135.75  $\mu$ M)、GA<sub>3</sub>(0.73  $\mu$ M)、IBA(0.49  $\mu$ M) 和酪蛋白水解物 (100mg/l) 的成熟培养基上培养。

[0064] 离体生根:选择完全成熟的芽,芽的底部用无菌的蒸馏水冲洗,以去除痕量的培养

基。然后芽在含有不同浓度的 IBA (49.0  $\mu$ M) 和 0.5% Bavistin™ 杀真菌剂的液体生长调节剂溶液浸渍后,转移到含有高压灭菌的盆栽混合土的植物 (phyta) 托盘。浸渍溶液含有 MS 盐、B5 维生素和 IBA (49.0  $\mu$ M)。

[0065] 实施例 2:麻风树的器官发生

[0066] 本发明提供用于高效的直接和间接器官发生系统的标准化方法,所述系统使用麻风树叶柄、花梗、花序梗和花序轴的外植体的薄切片。直接器官发生系统直接进行枝芽诱导,直至芽增殖和发育、芽伸长、芽成熟和生根。间接器官发生系统首先采用愈伤组织诱导步骤,接着进行与直接器官发生系统相同的阶段。

[0067] 愈伤组织诱导:接种到愈伤组织诱导培养基上的外植体膨胀,并且在培养开始一星期后,开始长出绿色致密愈伤组织。所有测试的外植体对愈伤组织诱导的响应效率 95% 以上,诱导而生的愈伤组织是绿色致密的且是器官发生性的。

[0068] 枝芽诱导:置于枝芽诱导培养基的外植体的薄切片膨胀,弯曲向上,两周内开始从外植体产生不定芽。据观察,薄切片的器官发生效率从外植体远端到近端相对降低。以直接从外植体诱导出枝芽的形式观察到直接器官发生,没有任何中间的愈伤组织阶段。在芽诱导培养基上培养的愈伤组织 2 周后更致密。每两周,将愈伤组织在同样的培养基上继代培养。在第二次继代培养的末期观察到愈伤组织上长出小芽。芽诱导的效率随外植体变化,发现叶柄外植体是最适合直接器官发生的,最高响应率 >85%,花序轴外植体最适合间接器官发生,响应率 >90%。

[0069] 芽增殖和发育:三周内,在芽增殖和发育的培养基上培养的枝芽产生另外的枝芽,并发育成微芽。通过直接器官发生诱导的枝芽显示出旺盛的增殖和较少的发育,而通过间接器官发生诱导的枝芽显示出较少的增殖但发育多。

[0070] 芽伸长:含有来自以上步骤的微芽的丛在伸长培养基上培养时,三周后开始伸长成芽。超过 50% 的微芽转化成芽。

[0071] 芽成熟:小心地从所述丛分离伸长良好的芽被,并转移到成熟培养基,以诱导生理学成熟。大多数在成熟培养基上培养的芽三周后达到成熟,然而一些芽仍然额外需要三周,在相同的培养基上培养以带来生理学成熟。

[0072] 直接生根:将完全成熟的芽转移到土壤里,三周内开始长出新叶子和根。

[0073] 本发明提供了简单、快速、可重复的方法,从叶柄、花梗、花序梗和花序轴的外植体再生麻风树。这些实施例首次展示叶柄、花梗、花序梗和花序轴外植体的薄切片的高效和使用以大规模生产麻风树组培苗。Kumar 等 (2011b) 用叶柄外植体获 57.61% 的响应率,每 0.5cm 长的叶柄外植体在含有噻苯隆 (TDZ ;2.27  $\mu$ M) 的培养基上平均产生 4.98 个芽,然而在本实施例里,我们获得更高的效率 (>90%),每个外植体 7-10 个芽。这一结果与 Kumar 等 (2011b) 不同,其教导使用高浓度的 TDZ 产生更多异常幼芽 (bud) 和进一步转化幼芽成芽将更加困难。Mishra 等 (2010) 报道,从叶外植体诱导枝芽 4-6 周内可见。不同的是,本实施例表明通过用我们的芽诱导培养基,2-3 周内有可能从所有测试的外植体诱导出芽。Singh 等 (2010) 从麻风树茎外植体在含有 BA (4.44  $\mu$ M) 和 Kn (4.65  $\mu$ M) 的培养基上诱导出枝芽。本实施例表明,仅有 BA 和 Kn 对从所测试的外植体芽诱导无作用。Misra 等 (2010) 用 BA (2.22  $\mu$ M) 结合 IBA (0.49  $\mu$ M) 从叶外植体诱导枝芽。在枝芽增殖和分化培养基上培养枝芽被发现是在本发明中生产健康枝芽必须的。在增殖和发育培养基里,降低 TDZ 的浓

度并加入  $\text{AdSO}_4$  以提高枝芽增殖和生长。Kumar 和 Reddy (2010) 已经报道在含有 BA、Kn 和 NAA 的 MS 培养基上培养的枝芽诱导芽增殖,接着转移到含有 BA 和 IAA 的 MS 培养基上进行芽伸长。这与本实施例的观察不同,TDZ 对枝芽增殖是必要的,Kn、 $\text{AdSO}_4$ 、 $\text{GA}_3$  和 BA 联用对健康芽的伸长是必要的。为有效生根,芽必须达到生理成熟。在本实施例中,我们观察到,在含有 Kn、 $\text{GA}_3$  和 IBA 的培养基里,芽达到成熟,BA 在成熟培养基的存在阻碍了成熟,并导致了异常芽生成和体外开花。在本实施例里,所测试的外植体(叶柄、花梗、花序梗和花序轴)显示不同的枝芽再生百分率,每个外植体的枝芽数目。这个结果可能是由于在再生期间内源激素水平,特别是细胞分裂素水平的差异(Preece and Imel, 1991)。

[0074] 本实施例使用叶柄,花梗,花序梗和花序轴外植体,表明,这些外植体的薄切片是适合大规模生产麻风树组培苗的。根据这些实施例通过修改培养基组分以及加入添加剂,有可能从这些外植体的薄切片中再生出更多数量的植株。虽然 Sujatha 和 Dhingra (1993) 报道从麻风树属琴叶珊瑚 (*Jatropha integerrima*) 的花序梗外植体进行芽繁殖,通过文献调研,很清楚这是首次报道从麻风树的叶柄、花梗、花序梗和花序轴这些外植体的薄切片进行体外再生。如本发明所示,可以在短短 15-23 周内从一个外植体的薄切片产生约 7-10 个健康植株。本系统可用于大规模生产组培苗和遗传转化。

[0075] 术语“a”, “an” 和 “the” 以及类似指代的使用在描述本发明的语言环境中(特别是在以下权利要求的语言环境中)应被解释为包括单数和复数,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应理解为开放式术语(即,意思是“包括,但不限于,”),除非另有说明。本文数值列举范围仅旨在用作单独提及的落在该范围内每一个单独的值的简写方式,除非在此另有说明,并且每个单独的值的范围的叙述被并入说明书中,好像其在本文中单独列举一样。例如,如果公开了 10-15 的范围,那么 11、12、13 和 14 也被公开。本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序进行,除非本文另外指出或另外与上下文明显矛盾。本文所提供的任何和所有实例,或示例性语言(例如,“如”)的使用,仅仅是为了更好地阐明本发明,而不会构成限制本发明的范围,除非另有要求。说明书中的任何语言不应被解释为表示任何未要求保护的元素是本发明的实践必需的。应当理解的是,本发明的方法和组分可以并入各种形式的实施方式,只有少数的内容在此公开。本发明的实施方式在本文中描述,包括发明人己知的用于实施本发明的最佳模式。阅读了前面的描述后,这些实施方式的变化形式可能对本领域技术人员,变得显而易见了。发明人预期本领域技术人员酌情采用这些变型,并且发明人预期本发明也可以以不同于这里具体描述的方式被实施。因此,本发明包括权利要求中所附的适用法律允许的权利要求书的主题的所有修改和等同物。此外,在所有可能的变化中上述元素的任何组合均被本发明所包括,除非本文另外指出或另外与上下文明显矛盾。

[0076] 参考书目

[0077] Deore AC and Johnson TS (2008). High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotech Rep* 2:10-15.

[0078] Dubey, A., Orey, S., Gupta, N., Pandey, K.L., Shah, P., Arif, M., 2010. In vitro regeneration of *Jatropha curcas* L. using petiole explants. *Biochem. Cell. Arch.* 10(1)7-12.

- [0079] Gamborg, O. L. et al. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.
- [0080] He, Y., Guo, X., Lu, R., Niu, B., Pasapula, V., Hou, P., Cai, F., Xu, Y., Chen, F., (2009). Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 98, 11-17.
- Heller, J., 1996. *Physic Nut, Jatropha curcas*. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- [0081] Jha, T. B., Mukherjee, P., Datta, M. M., 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnol. Rep.* 1, 135-140.
- [0082] Kumar N, and Reddy MP (2010). Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Ann. Appl. Biol.* 156:367-375.
- [0083] Kumar N, Vijay Anand KG, Reddy MP (2010a). A shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiol. Plant.* 32:917-924.
- [0084] Kumar, N., Vijay Anand, K. G., Pamidimarri, D. V. N. S., Sarkar, T., Reddy, M. P., Radhakrishnan, T., Kaul, T., Reddy, M. K., Sopori, S. K., (2010b). Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Ind. Crop. Prod.* 32, 41-47.
- [0085] Kumar N, Vijay Anand KG, Reddy MP (2011a). Plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas*-impacts of plant growth regulators, source and type of explants. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 20:125-133.
- [0086] Kumar N, Vijay Anand KG, Reddy MP (2011b). In vitro regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Industrial Crops and Products.* 33:146-151
- [0087] Li, M. R., Li, H. Q., Jiang, H. W., 2008. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92, 173-181.
- [0088] Misra P, Gupta N, Toppo DD, Pandey V, Mishra MK, Tuli R (2010) Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 100:189-197.
- [0089] Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497.
- [0090] Openshaw, K., 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass & Bioenergy* 19:1-15.
- [0091] Pant K. S., Khosla V., Kumar D., Gairola S. (2006) Seed oil content variation

in *Jatropha curcas* L. in different altitudinal ranges and site conditions in H. P. India. *Lyonia*, 11, 31–34.

[0092] Preece JE, and Imel MR(1991). Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron P. J. M. Hybrids*. *Sci. Hortic.* 48:159–170.

[0093] Rajore, S. , and Batra, A. , 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *J. Plant Biochem. Biotech.* 14, 73–75.

[0094] Sahoo N, Thirunavoukkarasu M, Behera PR, Satpathy GB(2011) Direct shoot organogenesis from hypocotyl explants of *Jatropha curcas* L. an important bioenergy feedstock. *GCB Bioenergy* 4:2234–238.

[0095] Sharma. , S, Kumar. , N, Reddy. , M(2011). Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of in vitro regeneration. *Ind. Crops Prod.* doi:10. 1016/j. indcrop. 2011. 02. 017.

[0096] Singh, A. , Reddy, M. P. , Chikara, J. , Singh, S. , 2010. A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* a biodiesel plant. *Ind. Crop Prod.* 31, 209–213.

[0097] Sujatha M, and Dhingra M(1993). Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 35:293–6.

[0098] Sujatha M, and Mukta N(1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 44:135–141.

[0099] Sujatha, M. , Makkar, H. P. S. , Becker, K. , 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regul.* 47, 83–90.

[0100] Wei, Q. , Lu, W. D. , Loao, Y. , Pan, S. L. , Xu, Y. , Tang, L. , Fang, C. , 2004. Plant regeneration from epicotyl explants of *Jatropha curcas*. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* 30, 475–478.

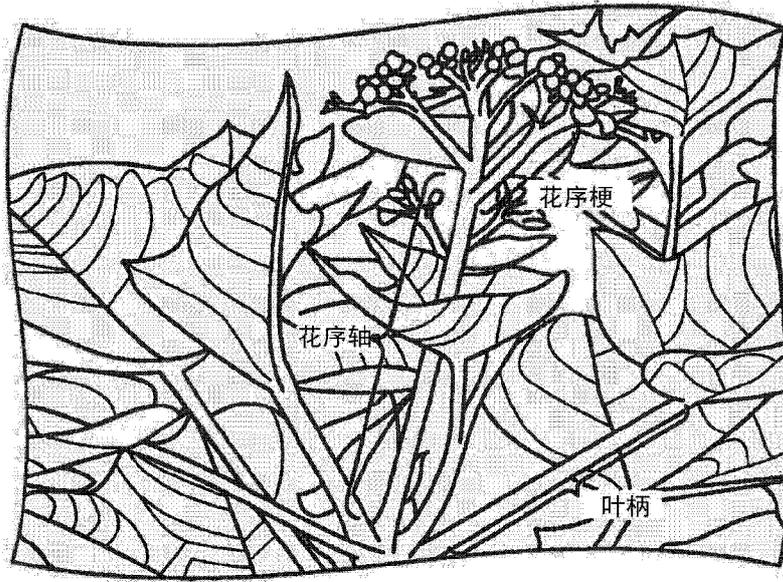


图 1A



图 1B

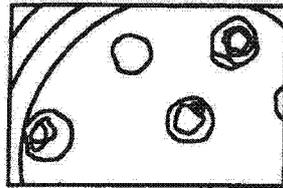


图 2A

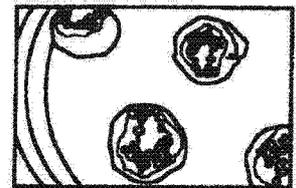


图 2B

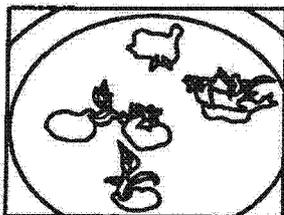


图 2C

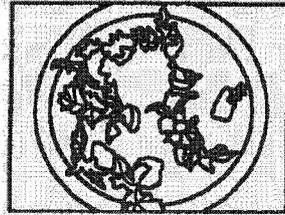


图 2D



图 2E

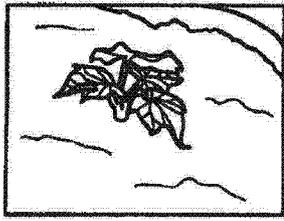


图 2F

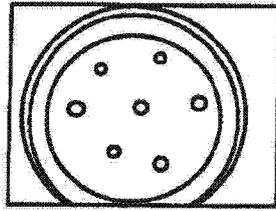


图 3A

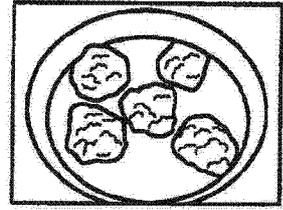


图 3B

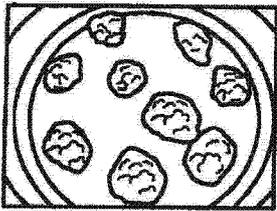


图 3C

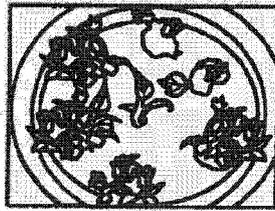


图 3D

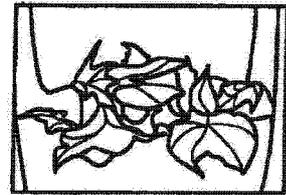


图 3E

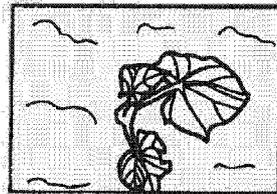


图 3F