



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102202495 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 29

(21) 申请号 200980128793. 2

(22) 申请日 2009. 06. 18

(30) 优先权数据

61/082, 896 2008. 07. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 01. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2009/000221 2009. 06. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/011184 EN 2010. 01. 28

(73) 专利权人 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 R·A·瓦苏德万 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 林晓红

(51) Int. Cl.

A01H 5/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1799340 A, 2006. 07. 12, 全文.

CN 101138320 A, 2008. 03. 12, 全文.

陆伟达等. 麻疯树愈伤组织的诱导及快速繁殖. 《应用与环境生物学报》. 2003, 第9卷(第2期), 127~130.

Timir baran Jha et al.. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. 《Plant Biotechnol Rep》. 2007, 第1卷 135~140.

林娟等. 麻疯树的组织培养及植株再生. 《植物生理学通讯》. 2002, 第38卷(第3期), 252~.

审查员 冀敏

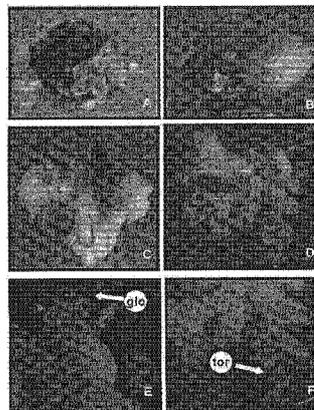
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

从胚珠进行麻风树的体细胞胚发生

(57) 摘要

本发明涉及体细胞胚产生领域, 具体涉及从胚珠进行麻风树的体细胞胚发生的方法。更具体地, 本发明涉及从未开放花芽胚珠进行麻风树的体细胞胚发生的方法和培养基组合物。该方法非常适合麻风树转化, 用于成批产生麻风树无性营养繁殖苗, 用于产生单倍体、双单倍体、二倍体和无病小植株。



1. 一种经由体细胞胚发生再生麻风树的方法,包括步骤:

(a) 在包括 MS 基本培养基和植物激素的第一培养基中暗培养麻风树外植体,以诱导形成胚性愈伤组织,其中麻风树外植体是切开的未开放花芽的胚珠,且其中所述植物激素是浓度为 $2.26 \mu\text{M}$ 至 $9.04 \mu\text{M}$ 的 2,4-二氯苯氧基乙酸;

(b) 在所述第一培养基中在光/暗光周期培养所述胚性愈伤组织,以诱导体细胞胚发育和成熟;和

(c) 在包括 MS 基本培养基和植物激素的第二培养基中在光/暗光周期培养成熟的体细胞胚,以萌发小植株,其中所述植物激素是浓度 $1.23 \mu\text{M}$ 至 $4.92 \mu\text{M}$ 的吲哚丁酸和 $0.72 \mu\text{M}$ 至 $5.76 \mu\text{M}$ 的赤霉素。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述培养基中植物激素的浓度是:

第一培养基: $6.78 \mu\text{M}$ 2,4-D;和

第二培养基: $2.46 \mu\text{M}$ IBA 和 $2.88 \mu\text{M}$ GA₃。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中培养时间为:

第一培养基中 30 天至 60 天,以诱导胚性愈伤组织的形成;

第一培养基中 4 周至 6 周,以使体细胞胚发育和成熟;和

第二培养基中 1 周至 3 周,以萌发小植株。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其中在每种培养基中培养的时间为:

第一培养基中 40 天,以诱导胚性愈伤组织的形成;

第一培养基中 4 周,以使体细胞胚发育和成熟;和

第二培养基中 2 周,以萌发小植株。

5. 如权利要求 3 所述的方法,其中,

第一培养基中,每 2 周继代培养,以使体细胞胚发育和成熟;和

第二培养基中,每 2 周继代培养,以萌发小植株。

6. 如权利要求 4 所述的方法,其中:

第一培养基中,每 2 周继代培养,以使体细胞胚发育和成熟;和

第二培养基中,每 2 周继代培养,以萌发小植株。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其中第二培养基还包含:一种或多种细胞分裂素以增强萌发小植株的生长,其中所述细胞分裂素是激动素、6-苄基氨基嘌呤、噻苯隆或其混合物;且其中一种或多种细胞分裂素浓度是:

(a) $1.16 \mu\text{M}$ 至 $9.28 \mu\text{M}$ KN;

(b) $1.10 \mu\text{M}$ 至 $8.86 \mu\text{M}$ BA;

(c) $1.13 \mu\text{M}$ 至 $9.08 \mu\text{M}$ TDZ;

(d) $1.16 \mu\text{M}$ 至 $4.64 \mu\text{M}$ KN 和 $1.10 \mu\text{M}$ 至 $4.43 \mu\text{M}$ BA;

(e) $1.10 \mu\text{M}$ 至 $4.43 \mu\text{M}$ BA 和 $1.13 \mu\text{M}$ 至 $4.54 \mu\text{M}$ TDZ;或

(f) $1.16 \mu\text{M}$ 至 $4.64 \mu\text{M}$ KN 和 $1.13 \mu\text{M}$ 至 $4.54 \mu\text{M}$ TDZ。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其中一种或多种细胞分裂素浓度是:

(a) $4.64 \mu\text{M}$ KN;

(b) $4.43 \mu\text{M}$ BA;

(c) $4.54 \mu\text{M}$ TDZ;

- (d) 2.32 μ M KN 和 2.21 μ M BA ;
- (e) 2.21M BA 和 2.27 μ M TDZ ;或
- (f) 2.32 μ M KN 和 2.27 μ M TDZ。
9. 如权利要求 1 所述的方法,其中每种培养基还包括碳源。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其中碳源选自由蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖和葡萄糖混合物、果糖和葡萄糖混合物和麦芽糖和葡萄糖混合物组成的组。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中碳源选自由 2% 至 5% 蔗糖、2% 至 5% 葡萄糖、2% 至 5% 果糖、2% 至 5% 麦芽糖、2% 至 3% 蔗糖和 2% 至 3% 葡萄糖混合物、1% 至 2% 果糖和 2% 至 3% 葡萄糖混合物和 1% 至 2% 麦芽糖和 2% 至 3% 葡萄糖混合物组成的组。
12. 如权利要求 2-8 中任一项所述的方法,其中每种培养基还包括碳源。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其中碳源选自由蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖和葡萄糖混合物、果糖和葡萄糖混合物和麦芽糖和葡萄糖混合物组成的组。
14. 如权利要求 13 所述的方法,其中碳源选自由 2% 至 5% 蔗糖、2% 至 5% 葡萄糖、2% 至 5% 果糖、2% 至 5% 麦芽糖、2% 至 3% 蔗糖和 2% 至 3% 葡萄糖混合物、1% 至 2% 果糖和 2% 至 3% 葡萄糖混合物和 1% 至 2% 麦芽糖和 2% 至 3% 葡萄糖混合物组成的组。
15. 如权利要求 1-11 中任一项所述的方法,还包括步骤 (a) 后和步骤 (b) 前的步骤 (a1),其中步骤 (a1) 包括用有丝分裂抑制剂处理胚性愈伤组织以诱导染色体加倍。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其中有丝分裂抑制剂选自由秋水仙素和黄草消组成的组。
17. 如权利要求 15 所述的方法,其中用 0.1%-0.5% 的有丝分裂抑制剂处理胚性愈伤组织。
18. 如权利要求 16 所述的方法,其中用 0.1%-0.5% 的有丝分裂抑制剂处理胚性愈伤组织。
19. 如权利要求 15 所述的方法,其中胚性愈伤组织被处理 1-3 天。
20. 如权利要求 16 所述的方法,其中胚性愈伤组织被处理 1-3 天。
21. 如权利要求 17 所述的方法,其中胚性愈伤组织被处理 1-3 天。
22. 如权利要求 18 所述的方法,其中胚性愈伤组织被处理 1-3 天。

从胚珠进行麻风树的体细胞胚发生

[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及体细胞胚胎产生领域,尤其涉及一种从胚珠进行麻风树(*Jatropha*)的体细胞胚发生的方法。更具体地,本发明涉及一种从未开放花芽胚珠进行麻风树(*Jatropha curcas*)的体细胞胚发生的方法和培养基组合物。该方法非常适于麻风树转化和产生克隆营养繁殖苗用于大规模麻风树种植,以及用于产生单倍体、双单倍体、二倍体和无病小植株。

[0003] 本文中使用的举例说明本发明背景或者提供额外关于实施的详细描述的出版物及其他材料援引加入本文,为方便起见分别附于参考文献中。

[0004] 麻风树属于大戟科植物,原产拉丁美洲,广泛分布于世界热带干旱与半干旱地区。麻风树大属包含 170 种以上。印度最普通的品种是 *J. curcas*、*J. glandulifera*、*J. gossypifolia*、*J. multifida*、*J. nana*、*J. panduraefolia*、*J. villosa* 和 *J. podagrica*。*J. curcas* 是一种带有灰色光滑树皮、切开渗出白色水状液汁的小树或灌木。通常生长到 3 至 5 米高之间,但是在适宜条件下高度可以达到 8 或 10 米。它是耐干旱植物,在边缘土地生长存活达 50 年。

[0005] 麻风树(*Jatropha curcas*)叶深绿色至淡绿色,交互对生。螺旋叶序列,3~5 浅裂。花柄长 6-23mm。花期热季。在湿度适宜和高温土壤中获得几次收获。在这种出现连续生长的条件下,雌或雄花产生的不平衡导致大量雌花。当冬季灌木无叶的时候产生果实。每个花序产生一串大约十个或十个以上的卵形果实。种子成熟并且肉质外果皮变干以后产生带有三个双瓣的小干果。受精二到四个月后荚膜从绿色变为黄色的时候种子成熟。黑色的薄壳种子是椭圆形类似小蓖麻种子。这种植物具有多种的医药应用,特别是在营养制品、药品、皮肤病和个人护理产品方面。麻风树(*Jatropha curcas*)由于存在称作“麻风树碱”的生物碱,其汁液具有抗癌特性。嫩枝用于清洁牙齿。叶子汁应用于外用治疗痔疮。根用作蛇咬的解毒药。种子用于驱虫目的。树皮产生的深蓝色染料可以用于布、鱼网和线的染色。除了产油品种 *J. curcas* 和 *J. glandulifera*,大多数麻风树品种是用于观赏的。这些品种种子包含半干性油,已经发现有助于医药和兽医目的。

[0006] 种子中含油量是 25-30%,核中 50-60%。油含有 21% 的饱和脂肪酸和 79% 的不饱和脂肪酸。麻风树油包含亚麻酸(C18:2)和油酸(C18:1),其总量达到油组分的 80%。油中的其它脂肪酸是棕榈酸(C16:0)和硬脂酸(C18:0)。这种油是不可食用的,但是它可能提供一种有前途的有商业价值的柴油替代物,因为它具有柴油的所有合乎需要的物理化学和性能特性。植物 *J. curcas* 目前作为一种热带能源植物受到特别关注。因为种子油具有接近矿物燃料柴油的特性,因此可用作柴油动力燃料。此外由于它无毒和可生物降解的特性,麻风树生物柴油符合柴油发动机用纯的和混合的汽车燃料的欧洲 EN14214 标准。麻风树(*Jatropha curcas*)种子产量接近 6-8MT/ha,带有大约 37% 的油。这种产量相当于能生产 2100-2800 升燃料油/ha,其能量相当于 19800-26400kwh/ha (Gaydou 等,1982)。因为其非常高的皂化值和无烟燃烧的性能,种子油具有商业用途。例如,广泛用于制造香皂。目前全世界对经济、环境和能源安全的担忧促使从矿物燃料向生物燃料替代物如生物乙醇和生物柴油的转

变。由于生物燃料能从多种作物产生,每个国家采取策略开发所拥有作物的比较优势。

[0007] 不同生物燃料作物中, *Jatropha curcas* 由于生理和天然因素被认为是生产生物燃料的更好选择。对麻风树的油料的强烈兴趣对供应足够种植用的均质及高产种子已产生巨大压力。因此,目前急需大量繁殖精选树。同等急需的是改良麻风树的各种农学性状的方法。基因工程被认为是作物改良的快速方法。植物转化基本上是两步方法,即输送基因进入宿主细胞,随后再生转化细胞为植物。体细胞胚性愈伤组织或者体细胞胚发生悬浮培养物通常被认为是最有效的再生方法,因为大多数转化细胞已获得胚发生潜力,能非常自发地驱动它们发展为体细胞胚,这是类似于合子胚中的受精卵细胞的过程 (Dodeman 等, 1997)。

[0008] 体细胞胚适于经根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) (Mathews 等, 1992)、显微注射 (Neuhaus 等, 1987) 和颗粒轰击 (Wilde 等, 1992) 转化。另外,体细胞胚或体细胞胚性愈伤组织可以用液氮冷冻保存而不丧失活性。因此它们是保持种质及细胞胚发生的理想材料。

[0009] 体细胞胚在来源上是克隆的,因此用体细胞胚增殖可以具有非常高的无性增加速率的潜力,并因此有显著商业价值。经体细胞胚发生的再生是植物组织培养的有吸引力的选择。体细胞胚据报道提供比茎叶 (shoot) 更稳定的再生体 (regenerant)。使用体细胞胚的再生系统的另一个优势是它们的明显单细胞来源。这意味着再生体不太可能是嵌合来源的,因为如果再生体源自一簇细胞而非单细胞,则植物组织可能是嵌合的或者不稳定的并且产生非正常型 (off-type)。

[0010] 为了进一步改良该作物,可以利用诸如组织培养和转化的生物技术。20 多年中,几份研究记录了使用各种外植体使用不同培养基组合物的麻风树再生。这些研究包括经由下胚轴、叶柄和叶子外植体 (Sujatha 和 Mukta, 1996)、上胚轴外植体 (中国专利申请号 200610020449. X)、叶盘 (印度专利申请公开号 490/MUM/2006)、茎尖和节外植体 (欧洲专利申请公开号 1817956 ;Datta 等, 2007)、叶愈伤组织的体细胞胚发生 (Jha 等, 2007) 和子叶盘外植体转化 (Li 等, 2008) 的植物再生。上述所有研究集中在愈伤组织介导和分生组织再生。经由生殖组织 (花药或胚珠) 器官发生或体细胞胚发生的小植株产生能引起产生单倍体、双单倍体或二倍体,其可产生典型的纯合特征,使该方法比植物育种计划有利。

[0011] 倍数性检测通常通过计算染色的根尖上的染色体进行,但是这种方法费劲,对具有小染色体和高倍数水平的品种常常很艰难,还会引起对种质错误分类 (Brummer 等, 1999)。所有染色体位于植物细胞核中,使得核 DNA 含量能够用于测定倍数性水平。最近几年,由于流式细胞仪的容易、快速和准确,已变成测定核 DNA 含量的优选技术 (Rayburn 等, 1989 ;Heslop-Harrison, 1995)。Arumuganathan 和 Earle (1991a) 使用流式细胞仪测定了超过 100 种主要农作物品种的核 DNA 含量。Vogel 等 (1999) 使用流式细胞仪测定多年生小麦染色体组的基础 DNA 含量。流式细胞仪也用于测定柳枝稷 (*Panicum virgatum* L.) (Hultquist 等, 1997 ;Lu 等, 1998)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) (Brummer 等, 1999) 和草皮草种 (Arumuganathan 等, 1999) 的倍数性水平。植物细胞中的 DNA 数量用皮克 (pg) 表示成 “C” 值 (Bennett 和 Smith, 1976)。字母 C 表示单倍体核或染色体组的 DNA “恒量” 或数量 ;2C 值表示二倍体体细胞核的 DNA 含量。用皮克表示的 DNA 数量可通过 $1\text{pg}=980\text{Mbp}$ 的转换因数转换成百万碱基对 (Mbp) (Bennett 等, 2000)。

[0012] 因此,本领域一直需要通过使用生殖组织(花药或胚珠)体细胞胚发生进行的小植株再生。尽管这些研究是成功的,但是本调查中我们首次提出通过从麻风树(*Jatropha curcas*)未开放花芽分离的胚珠外植体的体细胞胚发生进行的高频再生,其是经济的,并允许产生单倍体、双单倍体、二倍体和无病小植株。

发明内容

[0013] 本发明涉及体细胞胚胎产生领域,尤其是本发明涉及一种从胚珠进行麻风树(*Jatropha*)的体细胞胚发生的方法。更具体地,本发明涉及一种从未开放花芽胚珠进行麻风树(*Jatropha curcas*)的体细胞胚发生的方法和培养基组合物。该方法非常适于麻风树转化和产生克隆营养繁殖苗用于大规模麻风树种植,用于产生单倍体、双单倍体、二倍体和无病小植株。该方法也能高效转化这种植物。

[0014] 因此,本发明一方面提供了一种从获得自麻风树(*Jatropha curcas*)胚珠的外植体产生体细胞胚的方法。根据这个方面,外植体从麻风树(*Jatropha curcas*)健壮母株获得。一个实施方案中,胚珠外植体经由未开放花芽获得。另一实施方案中,胚珠是未受精的。再一实施方案中,胚珠外植体是无菌的。胚珠外植体放入包括MS基本培养基(Murashige和Skoog,1962)和含有用于愈伤组织诱导和体细胞胚发生的生长素的初始固体培养基。一个实施方案中,生长素是2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)。一个实施方案中,为了形成胚性愈伤组织,胚珠外植体在初始培养基内暗培养。另一实施方案中,为了体细胞胚发育和成熟,胚性愈伤组织转入新鲜的初始培养基中光培养。成熟的体细胞胚转入包括MS培养基基础盐和生长素和赤霉素(GA_3)的萌发固体培养基。一个实施方案中,生长素是吲哚丁酸(IBA)。一个实施方案中,萌发培养基还包含一种或多种细胞分裂素。另一实施方案中,萌发培养基还包含一种或多种有机添加剂。再一实施方案中,萌发培养基还包含一种或多种细胞分裂素和一种或多种有机添加剂。一个实施方案中,细胞分裂素是激动素(KN)、6-苄基氨基嘌呤(BA)、激动素活性的尿素衍生物(例如噻苯隆(TDZ))或其混合物。一个实施方案中,有机添加剂是干酪素水解物(CH)、硫酸腺嘌呤($AdSO_4$)或其混合物。一个实施方案中,成熟的体细胞胚在萌发培养基内光培养。使萌发的小植株变壮,移入温室。

[0015] 本发明方法包括完整、高效的系统,该系统可用于再生麻风树属植物,特别是*Jatropha curcas*种及其人工杂种。通过这个系统已经产生大量体细胞胚,且再生体已经显示完全正常地营养生长和生殖生长。

[0016] 如本文所示,经由未受精胚珠使用体细胞胚发生方法产生的小植株是单倍体。双倍体(例如双单倍体植物)通过用有丝分裂抑制剂(诸如秋水仙素和黄草消)处理胚发生愈伤组织产生。

[0017] 附图简述

[0018] 图1A-1F出示了麻风树(*Jatropha curcas* L.)胚珠体细胞胚发生。图1A:20天后胚珠愈伤组织诱发。图1B:40天后胚珠胚性愈伤组织诱发。图1C:从胚珠愈伤组织的体细胞胚起始。图1D:75天后来自胚珠愈伤组织的体细胞胚不同发育阶段(球形期、心形期、鱼雷期和子叶期)。图1E和图1F:90天后来自初期体细胞胚的次期体细胞胚的发育(tor:鱼雷形体细胞胚;glo:球形体细胞胚)。

[0019] 图2A-2F出示了麻风树(*Jatropha curcas* L.)胚珠体细胞胚发生的不同阶段。图

2A :胚珠胚性愈伤组织诱发。图 2B :球形期胚(glo)和心形胚(h)。图 2C :鱼雷形胚(tor)。图 2D 和 2E :子叶形体细胞胚(cot) (早期和后期)。图 2F :发芽体细胞胚(r :根)。

[0020] 图 3A-3C 出示了根据本发明再生的植物的倍数性分析。图 3A :本文产生的植物。图 3B :使用流式细胞仪测定的对照双倍体植物的 DNA 含量显示为 2c。图 3C :使用流式细胞仪测定的图 3A 所示植物的 DNA 含量显示为 1c, 指示植物为单倍体。

[0021] 发明详述

[0022] 本发明涉及体细胞胚胎产生领域, 尤其是本发明涉及一种从胚珠进行麻风树(*Jatropha*)的体细胞胚发生的方法。更具体地, 本发明涉及一种从未开放花芽胚珠进行麻风树(*Jatropha curcas*)的体细胞胚发生的方法和培养基组合物。该方法非常适于麻风树转化和产生克隆营养繁殖苗用于大规模麻风树种植, 用于产生单倍体、双单倍体、二倍体和无病小植株。该方法也能高效转化这种植物。

[0023] 通过体细胞胚发生繁殖是指在体外从小部分植物组织或者个体细胞中产生胚的方法。所述胚被称作体细胞胚, 因为其衍生自体细胞(营养性)组织, 而不是衍生自有性生殖过程。通过体细胞胚发生的无性繁殖能够捕获极其优选的基因型的所有遗传获得量。此外, 这些方法易于实现自动化和机械化。最后, 对再生转化的细胞使用体细胞胚发生能够实现植物的高效转化。

[0024] 根据本发明, 通过在外植体组织上诱导体细胞胚形成产生体细胞胚。在一个实施方案中, 从得自麻风树属植物的胚珠外植体中诱导体细胞胚。在一个实施方案中, 胚珠来自未开放的花。另一实施方案中, 胚珠未受精。将胚珠外植体置于固体培养基中, 在此指初始培养基。在一个实施方案中, 初始培养基是 MS 培养基并包括生长素。一个实施方案中, 生长素是 2, 4-D。一个实施方案中, 初始培养基中 2, 4-D 浓度是大约 2.26 μM 至大约 9.04 μM , 优选大约 4.52 μM 至大约 6.78 μM , 更优选大约 6.78 μM 。一个实施方案中, 初始培养基还包括碳源。在一个实施方案中, 碳源是大约 2% 至大约 5%, 优选大约 2% 至大约 3%, 更优选大约 3% 的蔗糖。另一实施方案中, 碳源是大约 2% 至大约 5%, 优选大约 3% 至大约 5% 的葡萄糖。另一实施方案中, 碳源是大约 2% 至大约 5%, 优选大约 2% 至大约 3% 的果糖。又一实施方案中, 碳源是大约 2% 至大约 5%, 优选大约 2% 至大约 3% 的麦芽糖。另一实施方案中, 碳源是蔗糖和葡萄糖混合物, 蔗糖大约 2% 至大约 3%, 优选大约 2%, 葡萄糖大约 2% 至大约 3%, 优选大约 2%。再一实施方案中, 碳源是果糖和葡萄糖混合物, 果糖大约 1% 至大约 2%, 优选大约 1%, 葡萄糖大约 2% 至大约 3%, 优选大约 2%。又一实施方案中, 碳源是麦芽糖和葡萄糖混合物, 麦芽糖大约 1% 至大约 2%, 优选大约 1%, 葡萄糖大约 2% 至大约 3%, 优选大约 2%。

[0025] 一个实施方案中, 将胚珠外植体置于初始培养基中培养大约 30-60 天, 优选大约 40 天。一个实施方案中, 维持大约 25°C \pm 2°C 的暗培养, 55% 至 60% 的相对湿度。在初始培养基中培养的胚珠外植体诱导胚性愈伤组织的形成。

[0026] 在初始培养基暗培养诱导胚性愈伤组织形成后, 为了体细胞胚的发育和成熟, 将胚性愈伤组织置于新鲜的初始培养基中。一个实施方案中, 将胚性愈伤组织置于初始培养基中培养大约 4-6 周, 优选 4 周。一个实施方案中, 将带有正在发育和成熟的体细胞胚的胚性愈伤组织以 2 周周期继代培养。一个实施方案中, 为使体细胞胚发育和成熟, 胚性愈伤组织的培养维持大约 25°C \pm 2°C, 16h/8h (光/暗) 光周期, 55% 至 60% 的相对湿度。一个实施方案中, 光周期是在大约 25 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光密度的白色荧光下进行。

[0027] 在培养产生成熟体细胞胚后,将体细胞胚放入固体培养基中,在此指萌发培养基。在一个实施方案中,成熟体细胞胚是子叶形体细胞胚。在一个实施方案中,萌发培养基是MS培养基并包括生长素和 GA_3 。一个实施方案中,生长素是 IBA。一个实施方案中,萌发培养基中 IBA 浓度是大约 $1.23 \mu M$ 至大约 $4.92 \mu M$,优选大约 $1.84 \mu M$ 至大约 $2.46 \mu M$,更优选大约 $2.46 \mu M$ 。一个实施方案中,萌发培养基中 GA_3 浓度是大约 $0.72 \mu M$ 至大约 $5.76 \mu M$,优选大约 $1.44 \mu M$ 至大约 $2.88 \mu M$,更优选大约 $2.88 \mu M$ 。一个实施方案中,萌发培养基还包含一种或多种细胞分裂素。一个实施方案中,细胞分裂素是 KN、BA、激动素活性的尿素衍生物(例如 TDZ)或其组合物。一个实施方案中,KN 浓度是大约 $1.16 \mu M$ 至大约 $9.28 \mu M$,优选大约 $2.32 \mu M$ 至大约 $4.64 \mu M$,更优选大约 $4.64 \mu M$ 。另一实施方案中,BA 浓度是大约 $1.10 \mu M$ 至大约 $8.86 \mu M$,优选大约 $2.21 \mu M$ 至大约 $4.43 \mu M$,更优选大约 $4.43 \mu M$ 。再一实施方案中,TDZ 浓度是大约 $1.13 \mu M$ 至大约 $9.08 \mu M$,优选大约 $2.27 \mu M$ 至大约 $4.54 \mu M$,更优选大约 $4.54 \mu M$ 。另一实施方案中,细胞分裂素是 KN 和 BA 组合物,其中 KN 值是大约 $1.16 \mu M$ 至大约 $4.64 \mu M$,优选大约 $1.16 \mu M$ 至大约 $2.32 \mu M$,更优选大约 $2.32 \mu M$ 和 BA 值是大约 $1.10 \mu M$ 至大约 $4.43 \mu M$,优选大约 $1.10 \mu M$ 至大约 $2.21 \mu M$,更优选大约 $2.21 \mu M$ 。另一实施方案中,细胞分裂素是 BA 和 TDZ 组合物,其中 BA 值是大约 $1.10 \mu M$ 至大约 $4.43 \mu M$,优选大约 $1.10 \mu M$ 至大约 $2.21 \mu M$,更优选大约 $2.21 \mu M$ 和 TDZ 值是大约 $1.13 \mu M$ 至大约 $4.54 \mu M$,优选大约 $1.13 \mu M$ 至大约 $2.27 \mu M$,更优选大约 $2.27 \mu M$ 。再一实施方案中,细胞分裂素是 KN 和 TDZ 组合物,其中 KN 值是大约 $1.16 \mu M$ 至大约 $4.64 \mu M$,优选大约 $1.16 \mu M$ 至大约 $2.32 \mu M$,更优选大约 $2.32 \mu M$ 和 TDZ 值是大约 $1.13 \mu M$ 至大约 $4.54 \mu M$,优选大约 $1.13 \mu M$ 至大约 $2.27 \mu M$,更优选大约 $2.27 \mu M$ 。另一实施方案中,萌发培养基还包含一种或多种有机添加剂。一个实施方案中,有机添加剂是 CH、 $AdSO_4$ 或其组合物。在一个实施方案中,萌发培养基添加大约 $0.25g$ 至大约 $1.5g$,优选大约 $0.5g$ 至大约 $1.0g$,更优选大约 $1.0g$ 的 CH。一个实施方案中,萌发培养基中添加大约 $25mg$ 至大约 $200mg$,优选大约 $50mg$ 至大约 $100mg$,更优选大约 $100mg$ 的 $AdSO_4$ 。再一实施方案中,萌发培养基还包含一种或多种细胞分裂素和一种或多种有机添加剂。萌发培养基还包括碳源。萌发培养基中的碳源可与初始培养基中相同。优选实施方案中,碳源是大约 2% 至大约 5% ,优选大约 2% 至大约 3% ,更优选大约 3% 的蔗糖。

[0028] 一个实施方案中,将成熟体细胞胚置于萌发培养基中培养大约 1-3 周,优选 2 周。一个实施方案中,将成熟体细胞胚以 2 周周期继代培养。一个实施方案中,成熟体细胞胚的培养维持大约 $25^\circ C \pm 2^\circ C$, $16h/8h$ (光/暗)光周期, 55% 至 60% 的相对湿度。一个实施方案中,光周期是在大约 $25 \mu Em^{-2}s^{-1}$ 光密度的白色荧光下进行。随后使发芽的体细胞胚,即小植株变壮。一个实施方案中,小植株在土壤、沙子、泥沼、木炭(1:1:2:0.5v/v/v/v)或单独其它 Houghland 土壤或在 Houghland 土壤和沙子(2:1v/v)限定比例的组合中变壮。

[0029] 通过流式细胞仪分析 DNA 含量指示,本文描述的通过未受精胚珠体细胞胚发生方法产生的小植株产生单倍体植物。

[0030] 双单倍体植物通过用有丝分裂抑制剂处理胚性愈伤组织产生。一个实施方案中,用有丝分裂抑制剂处理胚性愈伤组织 1-3 天,优选 3 天。一个实施方案中,有丝分裂抑制剂是秋水仙素。一个实施方案中,胚性愈伤组织用 0.1% - 0.5% ,优选 0.5% 的秋水仙素处理。另一实施方案中,有丝分裂抑制剂是黄草消。一个实施方案中,胚性愈伤组织用 0.1% - 0.5% ,优

选 0.5% 的黄草消处理。在胚性愈伤组织转入新鲜的初始培养基前,将有丝分裂抑制剂加入上述的胚性愈伤组织诱导培养基中。添加有丝分裂抑制剂的培养物的培养条件与体细胞胚性愈伤组织诱导相同。用有丝分裂抑制剂处理后,胚性愈伤组织放入用于体细胞胚发育和成熟的新鲜初始培养基并如上述培养。成熟体细胞胚放入萌发培养基并如上述培养以使上述双单倍体小植株萌发。

[0031] 另外,本发明提供了用于麻风树属植物转化的系统。这种转化 / 转染方法对于麻风树属植物的转化并不是关键的,目前可获得各种转化或转染方法。当获得转化作物或其它寄主细胞的更新方法,可以直接采用这些方法。相应地,研制出多种将 DNA 序列插入寄主细胞基因组以得到序列转录和 / 或翻译,从而实现生物体表型改变的方法。因而,可采用任何有效转化 / 转染的方法。例如参见 Mathews 等(1992), Neuhaus 等(1987), Wilde 等(1992), 美国专利号 7241937, 7273966 和 7291765 和美国专利申请公开号 2007/0231905 和 2008/0010704。还参见国际公开申请号 W02005/103271。

[0032] 一个实施方案中,可采用本领域公知技术将外植体组织与农杆菌共同培养,农杆菌菌株包含一个 DNA 构建体, DNA 构建体包含一个或多个关注的基因或核酸。可使用本领域公知的常规技术选择转化组织。另一实施方案中,可采用本领域公知技术将胚发生液体悬浮培养物与农杆菌共同培养,农杆菌菌株包含一个 DNA 构建体, DNA 构建体包含一个或多个关注的基因或核酸。可使用本领域公知的常规技术选择转化组织。再一实施方案中,使用常规技术如粒子轰击技术将 DNA 导入胚发生液体悬浮培养物的外植体组织或细胞。可使用本领域公知常规技术选择转化组织。可使用文中描述的方法再生转化或转基因植物。

[0033] 类似地,插入麻风树属植物的 DNA (关注的 DNA) 对于转化过程并不关键。通常导入植物的 DNA 是构建体的一部分。DNA 可以是基因,例如蛋白编码序列,或者它可以是能调控基因表达的序列,例如反义序列、正义抑制序列或 miRNA 序列。构建体典型地包括有效地连接至关注的 DNA 5' 侧和 / 或关注的 DNA 3' 侧的调控区。包括全部这些元件的盒在此处同样指表达盒。表达盒另外可包括在表达盒构建体中的 5' 前导序列。调控区(即启动子、转录调控区和翻译终止区)和 / 或编码信号锚定的多聚核苷酸对于寄主细胞或者彼此可以是天然的 / 类似的。可选地,调控区和 / 或编码信号锚定的多聚核苷酸对于寄主细胞或者彼此可以是异源的。参见美国专利号 7205453 和美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。表达盒另外可包括可选择标记基因。参见美国专利号 7205453 和美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。

[0034] 通常,为选择转化的细胞,表达盒会包括可选择标记基因。可选择标记基因用于选择转化的细胞或组织。通常,具有合适的基因的植物可选择标记基因可编码抗生素抗性,所述合适的基因包括至少一组编码抗壮观霉素的基因、编码抗链霉素的链霉素磷酸转移酶(spt)基因、编码抗卡那霉素或遗传霉素的新霉素磷酸转移酶(nptII)基因、编码抗潮霉素的潮霉素磷酸转移酶(hpt 或 aphiv)基因、乙酰乳酸合成酶(als)基因。可选地,植物可选择标记基因可编码除草剂抗性,比如磺脲型除草剂、草丁膦、草甘膦、铵、溴苯腈、咪唑啉酮类和 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)抗性,包括编码抑制谷酰胺合成酶的作用的除草剂的抗性基因,,比如草胺膦或 basta (例如 bar 基因)。通常参见 W002/36782, US 专利号 7205453 和美国专利申请公开号 2006/0248616 和 2007/0143880, 并且本文引用这些参考文献。并不限于这里罗列的可选择标记基因。可以使用任何可选择标记基因。

[0035] 许多启动子可用于实施本发明。可以基于所需的结果选择启动子。即核酸可以与组成型、组织优选或者其它启动子组合以在宿主细胞中表达。这样的组成型启动子包括诸如 Rsyn7 的核心启动子(W099/48338 和美国专利号 6072050);核心 CaMV^{35S} 启动子(Ode11 等,1985);水稻肌动蛋白(McElroy 等,1990);遍在蛋白(Christensen 和 Quail,1989 和 Christensen 等,1992);pEMU (Last 等,1991);MAS (Velten 等,1984);ALS 启动子(美国专利号 5659026)等等。其它组成型启动子包括诸如美国专利号 5608149,5608144,5604121,5569597,5466785,5399680,5268463 和 5608142 公开的启动子。

[0036] 其它启动子包括诱导启动子,特别是来自病原诱导启动子。这种启动子包括那些来自病程相关蛋白(PR 蛋白)的启动子,病原侵染后被诱导;例如 PR 蛋白、SAR 蛋白, β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶等。其它启动子包括那些在病原侵染位点上或周围表达的启动子。再一实施方案中,启动子可以是伤害诱导启动子。另一实施方案中,化学调控启动子可通过外源化学调节剂的施加调节植物基因表达。启动子可以是化学诱导启动子,其中施加化学制剂诱导基因表达,或者是化学抑制启动子,其中施加化学制剂抑制基因表达。另外,在特定植物组织内以增强多聚核苷酸的表达为目的能采用组织优选启动子。这些启动子中都在美国专利号 6506962,6575814,6972349 和 7301069 以及美国专利申请公开号 2007/0061917 和 2007/0143880 中描述。

[0037] 当需要时,关注的 DNA 可被优化以增加在转化的植物中表达。即可以使用植物优选的密码子合成编码序列以改良表达。合成植物优选基因的方法是本领域现有方法。例如参见美国专利号 5380831,5436391 和 7205453 和美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。

[0038] 除非另有说明,本发明实施采用化学、分子生物学、微生物、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,都属于本领域技术。例如,参见 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);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. 154 and 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

[0039] 本发明参考以下实施例进行说明, 所述实施例只是举例说明本发明, 无任何限制之意。利用本领域熟知的标准技术或者在下文特别描述的技术。

[0040] 实施例 1

[0041] 母株的制备

[0042] 某些实施方案中, 筛选用于采集外植体的母株以鉴定健康样本和 / 或为无病状态或处理感病的处理。可通过评估植物的大小、重量、总体生长、外观和无污染或无传染来判断是否健康。J. curcas 植物通常被“蛙眼病”(Cercospora spp.), 异翅亚目和黄金叶甲科甲虫(Podagrica species) 的昆虫感染。通过向植物喷施诸如杀菌剂、杀虫剂、农药等来进行去污染。用于预处理母株的优选杀菌剂包括浓度大约为 0.05%-0.2% 的多菌灵™、克菌丹™、代森锌™ 或其组合物。用于预处理母株的优选杀虫剂包括但不限于浓度大约为 0.005%-0.02% 的乐果™、久效磷™、氰胺(Fastac™)、Ultracid™40-WP、硫丹™。

[0043] 实施例 2

[0044] 未开放花芽的消毒

[0045] 麻风树(Jatropha curcas L.) 的未开放花芽收集自新加坡国立大学淡马锡生命科学研究室 1 研究 Link, 新加坡 117604 的温室中的母株(Hong Yon 博士友好提供)。将花芽用氯己啶消毒水(100ml 无菌水中滴两滴)清洗 20 分钟, 接着用 10% 次氯酸钠溶液(商用漂白剂)将这些花芽再次表面消毒 15 分钟, 随后用无菌水冲洗 5 次。为了保证完全无菌, 在这些花芽切开分离胚珠用作外植体之前再次用 70% 酒精清洗 3 分钟, 随后用无菌水冲洗 3 次。

[0046] 实施例 3

[0047] 培养基和激素

[0048] 初始培养基为添加有蔗糖(3%)作为碳源的 MS 基础培养基(MS 矿物盐和和维生素)和包括作为凝胶剂的植物琼脂(0.8%)。培养基 pH 值为 5.8。萌发培养基为添加有蔗糖(3%)作为碳源的 MS 基础培养基(MS 矿物盐和和维生素)和包括作为凝胶剂的植物明胶(0.25%)。培养基 pH 值为 5.8。培养基放入无菌佩氏培养皿(90×50mm 大小, 塑料聚碳酸酯, 加拿大)。用于培养基制备的化学制剂具有分析级(Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands

and Sigma Aldrich 公司, 圣路易, 美国)。

[0049] 用于本发明培育方法的培养基中添加不同的激素。通常, 培养基包含降低浓度的植物激素。在培养基中测试的激素是在组织培养的各个阶段会以所需的方式影响生长的植物激素。测试的植物激素例子包括天然或合成生长素(2, 4-D、吲哚乙酸(IAA)、IBA)、细胞分裂素(BA、KN)、GA₃ 或激动素活性的尿素衍生物(例如 TDZ)。单独或组合测试激素。只有 2, 4-D(2.26、4.52、6.78 和 9.02 μM)对诱导胚性愈伤组织是有效的。其它生长素 IAA(0.71、1.42、2.85 和 5.70 μM)、IBA (0.615、1.23、2.46 和 4.92 μM)以及 2, 4-D (2.26、4.52、6.78 和 9.02 μM) 或 IAA (0.71、1.42、2.85 和 5.70 μM) 或 IBA (0.615、1.23、2.46 和 4.92 μM) 与细胞分裂素、BA (1.10、2.20、4.43 μM)、KN (1.16、2.32、4.64 μM) 和 TDZ (1.13、2.27、4.54 μM) 的组合物单独或组合仅诱导非胚性愈伤组织。

[0050] IBA (1.23、1.84、2.46 和 4.92 μM) 和 GA₃ (0.72、1.44、2.88 和 5.76 μM) 对体细胞胚萌发是有效的。测试了 GA₃ (0.72、1.44、2.88 和 5.76 μM) 与 IAA (1.42、2.85、5.70 和 8.56 μM) 和 NAA (1.34、2.68、5.37 和 8.04 μM) 的组合, 但是没有效果。添加细胞分裂素(1.16、2.32、4.64 和 9.28 μM KN ; 1.10、2.21、4.43 和 8.86 μM BA ; 1.13、2.27、4.54 和 9.08 μM TDZ ; 1.16、2.32、4.64 μM KN 和 1.10、2.21、4.43 μM BA ; 1.10、2.21、4.43 μM BA 和 1.13、2.27、4.54 μM TDZ ; 1.16、2.32、4.64 μM KN 和 1.13、2.27、4.54 μM TDZ)和 / 或有机添加剂(0.25g、0.5g、1.0g CH ; 25mg、50mg、100mg、200mg AdSO₄ ; 或其组合)增强了萌发小植株的生长。

[0051] 实施例 4

[0052] 胚珠外植体的分离和培养

[0053] 使用立体显微镜解剖消毒后的花芽, 使用解剖针分离和损伤胚珠。受损的胚珠外植体接种于添加不同植物激素的初始培养基中暗培养 40 天。由这些胚珠诱导的愈伤组织转入新鲜的初始培养基中光(16h/8h (光 / 暗) 光周期, 25 μEm⁻²s⁻¹ 光密度) 培养, 用于体细胞胚发育和成熟。每 2 周继代培养带有正在发育和成熟的体细胞胚的愈伤组织。从该胚性愈伤组织发育的成熟子叶形体细胞胚转入萌发培养基中以萌发。每 2 周继代培养正在萌发的体细胞胚。使萌发的小植株变壮, 移入温室。所有培养物维持在 25°C ± 2°C, 55% 至 60% 的相对湿度。每 100mg 胚性愈伤组织发育出将近 12-15 个成熟叶形体细胞胚, 并且发育出 95% 的体细胞胚。

[0054] 实施例 5

[0055] 麻风树(*Jatropha curcas*) 体细胞胚发生

[0056] *Jatropha curcas* 由于其高油含量被认为是产生生物燃料的更好选择, 目前作为一种热带能源植物受到特别关注。由于具有高油含量的这些生理因素, 所以提高其生物量产量是重要的。由于这个原因, 可利用如组培和转化的生物技术。尽管有关于愈伤组织和分生组织再生(Sujatha 和 Mukta, 1996 ; 中国专利申请号 200610020449 ; 印度专利申请公开号 490/MUM/2006 ; 欧洲专利申请公开号 1817956 ; Datta 等, 2007)和叶愈伤组织的体细胞胚发生(Jha 等, 2007) 的报告, 但是没有 *J. curcas* 经由生殖器官尤其是未受精胚珠作为外植体的体细胞胚发生再生的报告。本研究中, 我们标准化了 *J. curcas* 使用未受精胚珠经由体细胞胚发生的再生。

[0057] 在单独或组合包含不同生长素和细胞分裂素的 MS 培养基诱导愈伤组织。不同

培养基类型中,包含 2,4-D 的 MS 培养基对于诱导胚性愈伤组织(图 1A、1B 和 2A 所示使用 6.78 μ M 2,4-D)和体细胞胚发育(球形、心形、鱼雷形和子叶形)(图 1C 和 1D、图 2A-2E)是有效的。其它植物激素不能诱导胚性愈伤组织。体细胞胚在包含 2,4-D 的 MS 培养基中连续培养会形成畸形体细胞胚,不能萌发。

[0058] 应当注意到光在胚性愈伤组织诱导中起重要作用。胚珠在添加 2,4-D 的 MS 培养基暗培养诱导胚性愈伤组织。但是,胚珠在添加 2,4-D 的 MS 培养基有光存在下培养不会诱导胚性愈伤组织。同样,体细胞胚仅在有光条件下发育,不会在无光条件下发育。

[0059] 在添加 GA_3 和 IBA 的 MS 培养基培养引起体细胞胚萌发。添加细胞分裂素(KN、BA、TDZ、KN/BA、KN/TDZ 和 BA/TDZ)和有机添加剂(CH、 $AdSO_4$ 、CH/ $AdSO_4$)增强了萌发小植株的生长。还注意到次期体细胞胚和初期体细胞胚一起出现(图 1E 和 1F)。

[0060] 与此相反,Jha 等(2007)报导了在添加有 KN (9.3 μ M) 的 MS 培养基中诱导 *J. curcas* 叶外植体的胚性愈伤组织,在添加有 KN (2.3 μ M) 和 IBA (1.0 μ M) 的 MS 培养基中发育出体细胞胚。Jha 等(2007)还报道了添加硫酸腺嘌呤(13.6 μ M)刺激体细胞胚发育过程。目前研究认为,在愈伤组织诱导培养基中添加 $AdSO_4$ 导致绿色紧密愈伤组织的产生,该愈伤组织变为非胚性愈伤组织。仅仅 2,4-D 和暗条件对于胚性愈伤组织诱导是关键。Kim 等(2007)报导了在盾叶鬼臼上相同的研究结果。Jha 等(2007)陈述了 *J. curcas* 体细胞胚发生系统需要 12-16 周。然而在本研究中完整的体细胞胚发生系统可以在少于 12 周内完成 95% 体细胞胚萌发。当未受精胚珠发育为体细胞胚的时候,该系统可用于产生单倍体、双单倍体或二倍体植物,这些植物用于植物育种和产生转基因植物。

[0061] 实施例 6

[0062] 再生植物倍数性测定

[0063] 本研究的目的是测定来自 *Jatropha curcas* L 未受精花芽以及在体生长的染色体数目为 $2n=22$ 的二倍体植物的小植株体细胞胚的核 DNA 含量。

[0064] Arumuganathan 和 Earle (1991b) 和 Tuna 等(2001) 描述的步骤用于测定每个核的 DNA 含量。简言之,该步骤包括切开植物组织制备完整细胞核的悬浮液,在混合有 DNA 标准液的 $MgSO_4$ 缓冲液中和溶解原生质,和在包含无脱氧核糖核酸酶的核糖核酸酶溶液用碘化丙啶(PI)给核染色。通过比较在体 *Jatropha curcas* 双倍体植物核的荧光强度来判断染色核的荧光强度。

[0065] 从衍生自幼体细胞胚的枝切下将近 500mg 新鲜的绿色的组织,将其在 35 乘 10mm 的无菌塑料佩氏培养皿中置于冰上。添加大约 500mg 麻风树苗的叶组织作为标准。在 1ml A 溶解液(24ml $MgSO_4$ 缓冲液(冰冷的);25mg 二硫苏糖醇;500 μ l 碘化丙啶原液(1.0ml 重蒸馏水中 5.0mg 碘化丙啶);625 μ l 聚乙二醇辛基苯基醚原液(10ml 重馏水中 1.0g 聚乙二醇辛基苯基醚)中将叶组织切成 0.25-1.0mm 碎片。匀浆经由 33 μ M 尼龙网过滤后装入微量离心管,并以 13000RPM 转速离心(VS-15 微型离心机, Shelton Scientific, Shelton, CT) 20 秒。丢弃悬浮液,微粒在 400 μ l 的 B 溶液(7.5ml A 溶液;17.5 μ l 核糖核酸酶(无脱氧核糖核酸酶))中再悬浮,微粒在流式细胞仪分析前于 37°C 培养 15min。

[0066] 制备的材料在纳米微量分光光度计中分析。为了测定,用 CellQuest 软件(Becton Dickinson Immuno cytometry system, San Jose, CA)采集 20000 核的 PI 荧光区域信号(FL2-A)。通过 FL2-A 和 FSC-H 参数使用活动门仪器结构,参数使得核的荧光测定产生 FL2-A

柱状图。通过 CellQuest 软件分析采集的数据确定样本和内标的 G0/G1(核)峰的平均位置。每株植物的平均 DNA 含量是基于 20000 个扫描的核。将荧光值转换为 DNA 含量的公式是:核 DNA 含量 = (未知峰位的平均位置) / (已知峰位的平均位置) × 已知标准的 DNA 含量。

[0067] *Jatropha curcas* 二倍体对照植物的幼叶流式细胞仪的分析表明 DNA 脉冲幅度信号的二个峰值对应 2C 和 4C 染色体含量(图 3B)。如果是来自小植株的体细胞胚(图 3A),仅仅看到一个峰值,其低于对应 2C 染色体含量的 DNA 脉冲幅度信号并且是 2C DNA 含量的将近一半(图 3C)。观察到这个单独的峰值表明该植物是具有染色体数量为 $n=11$ 的单倍体,对照植物观察到两个峰值表明植物是具有染色体数量为 $2n=22$ 的双倍体。将单倍体和双倍体植物叶子的 DNA 含量量化,观测到单倍体和双倍体植物叶子分别包含 245.15ng/ μ l 和 508.3ng/ μ l 的 DNA 含量。当通过从 *J. curcas* 未受精花芽子房分离的胚珠的愈伤组织介导体细胞胚发生再生小植株的时候,小植株通过流式细胞仪确定为单倍体。已经报道了西葫芦(*Cucubita pepo* L.)甜菜(*Beta vulgaris* L.)的未受精胚珠的离体培养产生单倍体的相同观察结果(Metwally 等(2004);Gürel 和 Gürel (1998);Bossoutrot 和 Hosemans. (1985);Galatowitsch 和 Smith (1990);Van Geyt 等(1987))。未受精植物产生的单倍体植物在 *Jatropha curcas* 上是首次报道。

[0068] 实施例 7

[0069] 麻风树(*Jatropha curcas*)双单倍体再生植物的产生

[0070] 如实施例 5 中所述制备的将发育为体细胞胚(胚性愈伤组织诱导 40 天后)的胚性愈伤组织用不同浓度(0.1-1%)的秋水仙碱处理 3 天。培养条件(温度、光周期和光)与上述相同。在秋水仙碱处理后,处理的胚性愈伤组织转入新鲜的初始培养基(包含 2,4-D (6.78 μ M)的 MS 培养基),并且在上述用于体细胞胚发育的实施方案 5 中培养。成熟体细胞胚转入萌发培养基(添加 GA_3 和 IBA 的 MS 培养基),并且在上述用于小植株发育的实施例 5 中培养。

[0071] 不同秋水仙碱处理中,0.5% 的浓度在双单倍体产生中是最有效的。如果浓度超过 0.5%,愈伤组织就会褐变死亡。秋水仙碱处理的小植株的形态学特性与双单倍体类似。这种技术还能用于植物育种计划。

[0072] 除非特别指出或者上下文明确相反,否则本发明描述内容(特别是权利要求的上下文中)中,术语“一”、“所述”和类似词语应理解包括单数和复数。除非另外提到,否则术语“包括”、“具有”、“含有”、“包含”被认为是开放式术语(即,意味着“包括,但不限于”)。文中数值范围的列举仅仅是充当范围内每个单独数值一个一个提到的简写方法,除非特别指出,否则每个单独值并入说明书,如同一个一个在此提到。例如,如果公开了范围 10-15,那么 11、12、13 和 14 也被公开了。除非特别指出或者上下文明确相反,否则文中描述的所有方法能以任何适宜顺序进行。任何实施例的使用,或者文中提供的举例语言(例如“诸如”),除非文中要求保护,否则仅仅为了更好说明本发明,并不限制本发明范围。说明书语言不应解释为指定对于本发明实践关键的任何未要求元素。

[0073] 应意识到本发明的方法和组合物包括各种形式的实施方案,本文仅仅公开了一小部分。本发明文中描述的实施方案包括本发明人已知地实施本发明的最好方式。本领域普通技术人员在阅读以上描述的基础上可显而易见实施方案的变化。本发明人期望技术人员可以适当应用这些改变,且可以本文所述不同的方式实施本发明。相应地,本发明包括适用

法律允许的在所附权利要求中所述主题的所有修改和等价物。此外,除非特别指出或者上下文明确相反,则上述元素的所有可能范围内的任意变化组合均包含在本发明内。

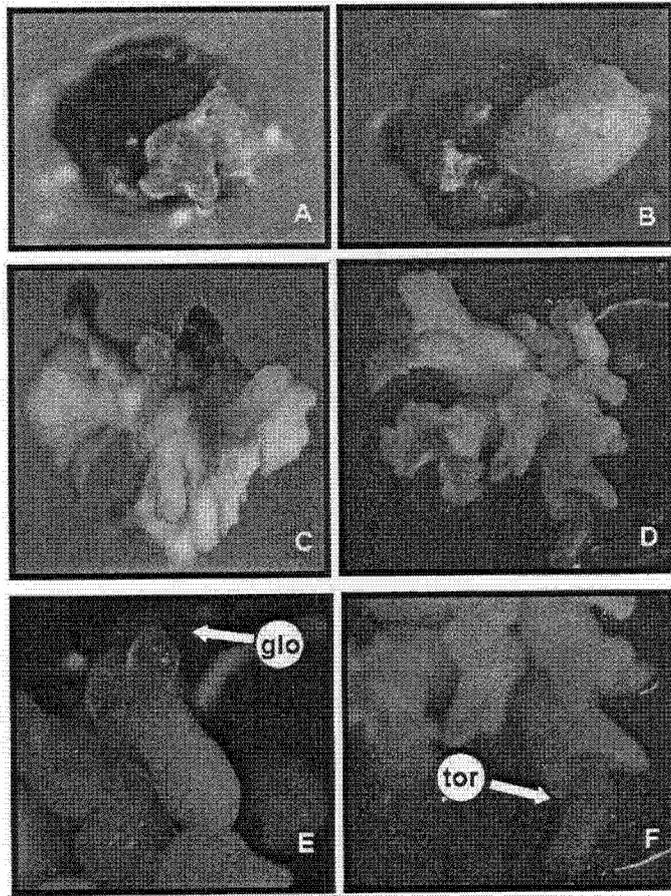


图 1

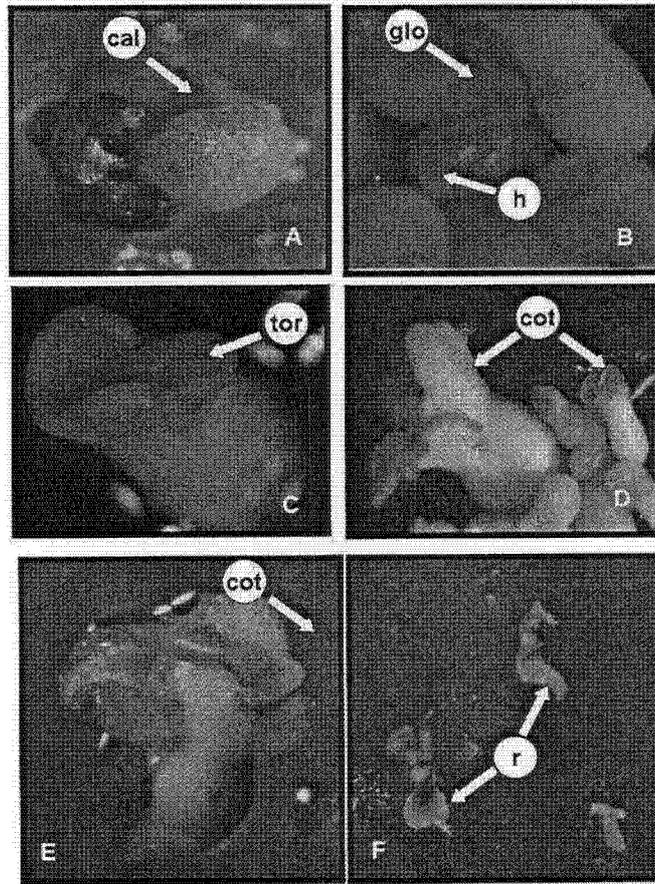


图 2

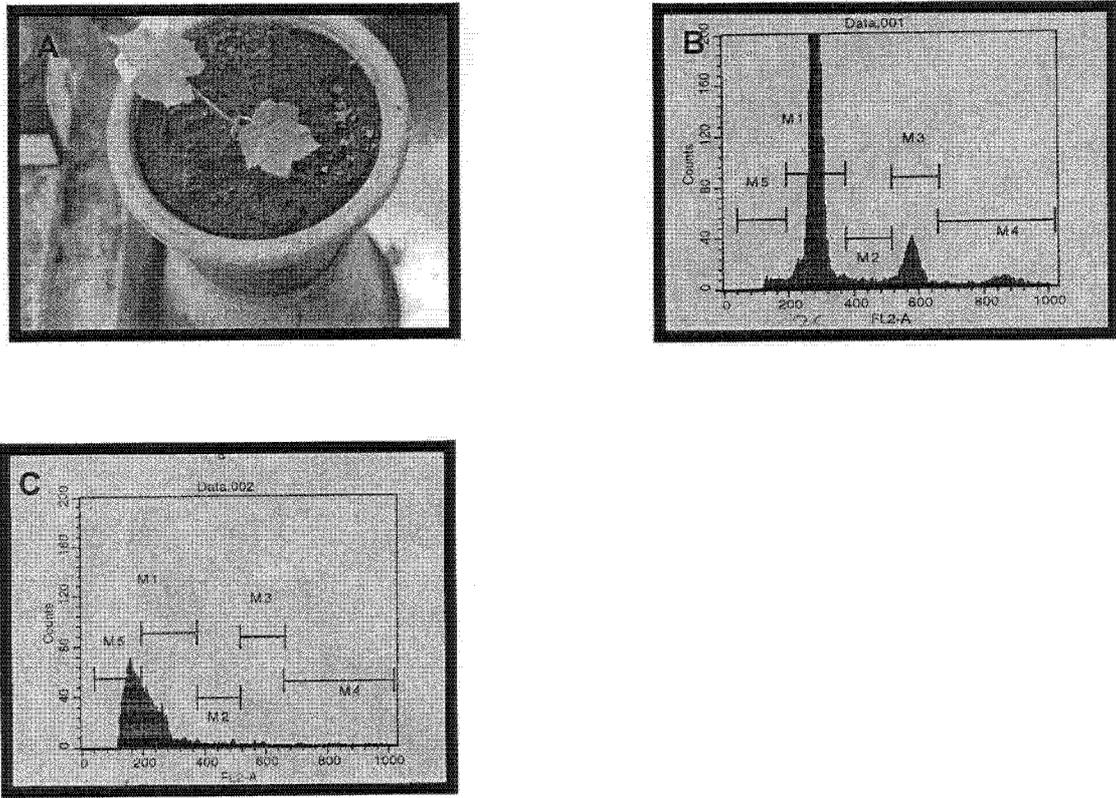


图 3