

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 5/00
A01H 4/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 98804346.7

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 12 日 [11] 授权公告号 CN 1222611C

[22] 申请日 1998.2.20 [21] 申请号 98804346.7
[30] 优先权
[32] 1997. 2. 21 [33] GB [31] 9703628.9
[86] 国际申请 PCT/GB1998/000387 1998.2.20
[87] 国际公布 WO1998/037173 英 1998.8.27
[85] 进入国家阶段日期 1999.10.20
[71] 专利权人 莱拉·扎卡里亚·阿布德拉曼
地址 英国曼彻斯特
[72] 发明人 莱拉·扎卡里亚·阿布德拉曼
审查员 欧阳石文

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗 宏 谭明胜

权利要求书 4 页 说明书 19 页

[54] 发明名称 生产甘蔗体细胞胚的方法
[57] 摘要

使用可以来源于叶、枝条、根和植物的其它部分的外植体材料来繁殖植物、尤其是甘蔗植物。通过从外植体材料培养出未成熟的胚胎、然后从未成熟的胚胎培养出成熟的体细胞胚来生产体细胞胚，所有这些均是在液体悬浮培养中实现的，从而使甘蔗进行显微繁殖且培养物在任何阶段都不会褐变。然后将成熟的胚包封起来以生成用于发芽目的的人造种子。

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

1. 一种包括从甘蔗的外植体生产甘蔗的体细胞胚的方法，该方法进一步包括下列步骤：

(1) 从外植体培养出未成熟的胚胎；

5 (2) 从那些未成熟的胚胎中培养出成熟的甘蔗的体细胞胚，并且其特征在于至少步骤(2)是在液体悬浮培养中发生的。

2. 一种根据权利要求1的方法，其特征在于步骤(1)中胚发生组织的生长以及接下来在步骤(2)中所述胚胎发育至成熟都是在液体培养基中发生的。

10 3. 一种根据权利要求1或2之任一的方法，其特征在于所述的甘蔗的外植体是从甘蔗植物特有的组织化的分生组织或分生组织细胞得到的。

4. 一种根据权利要求1的方法，其特征在于所述的外植体材料包括根衍生的或者成熟的体细胞胚。

15 5. 一种根据权利要求4的方法，其特征在于所述的外植体材料包括通过应激甘蔗外植体材料得到的成熟的体细胞胚，其中所述应激甘蔗外植体材料是在步骤(1)之前进行的。

6. 一种根据权利要求5的方法，其特征在于应激是通过冷却所述的外植体材料来实现的。

20 7. 一种根据权利要求6的方法，其特征在于将所述的外植体材料冷却到5-15℃下1-3个月。

8. 一种根据权利要求5至7之任一的方法，其特征在于应激是通过用醇处理来实现的。

25 9. 一种根据权利要求1的方法，其特征在于步骤(1)所述的从外植体培养未成熟胚胎的方法包括下列步骤：

a) 在培养基上培养外植体材料以生成体细胞

b) 选择并且繁殖来源于所述外植体材料的体细胞

c) 在培养基上培养所述的体细胞一段时间，以便从所述的体细胞中诱导出未成熟的甘蔗的胚胎。

30 10. 一种根据权利要求1的方法，其特征在于所述的未成熟的胚胎是在固体培养基上以胚发生的愈伤组织来引发和维持的、或者是在液体培养基中或在固体和液体培养基结合的培养基中以胚发生细胞的悬浮培养

物来引发和维持的。

11. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于在所述的培养基配方中或者单独或者以组合的方式包括植物生长调节剂, 选自生长素、细胞激动素、赤霉素、脱落酸、抗生长素、细胞分裂素、玉米素和/或活性炭。

5 12. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于所述的方法是在含有以蔗糖作为主要的糖的组分的培养基中进行的。

13. 一种根据权利要求 12 的方法, 其特征在于所用蔗糖的浓度在 10 - 60g/l 的范围内。

10 14. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于外植体材料来源于具有用蜡覆盖了暴露的切口端的甘蔗植物组织。

15. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于选择体细胞是通过采用至少下列方法之一来实现的: 筛分培养物材料、热处理或者搅拌。

16. 一种根据权利要求 15 的方法, 其中使用网眼尺寸为 100 - 50 μ m 的第一个筛子, 接下来使用网眼尺寸为 50 - 38 μ m 的第二个筛子。

15 17. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于在所述未成熟胚胎的生产过程中使用光照和黑暗的循环。

18. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于所述未成熟胚胎的培养涉及使用用于传代培养的新鲜培养基使来自原始培养物的传代培养物生长。

20 19. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于外植体的原始培养涉及在固体培养基上从外植体引发胚发生的愈伤组织、接下来在液体培养基中传代培养来自所述外植体的胚发生的愈伤组织, 以便建立和维持胚发生细胞的悬浮培养物。

25 20. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于在使用叶外植体衍生的培养物的情况下, 作为引发愈伤组织的固体培养基和液体胚发生悬浮培养基的一个组分而包括了抗坏血酸。

21. 一种根据权利要求 20 的方法, 其特征在于由愈伤组织引发悬浮培养物包括大约 50 mg/l - 200 mg/l 的抗坏血酸。

30 22. 一种根据权利要求 20 或 21 的方法, 其特征在于由愈伤组织引发悬浮培养物包括柠檬酸。

23. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于在液体培养基中包括了脱落酸。

24. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于由未成熟的胚胎培养出甘蔗成熟的体细胞胚包括下列步骤:

(1) 由外植体制备未成熟胚胎的液体悬浮培养物;

(2) 在生物反应器中培养所述的悬浮物以形成体细胞胚。

5 25. 一种根据权利要求 24 的方法, 其特征在于步骤(1)以及步骤(2)的培养发生在生物反应器中。

26. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于在发芽之前将生成的成熟的胚胎包封起来。

10 27. 一种根据权利要求 26 的方法, 其特征在于包封剂包括谷物面粉和水性糊状物。

28. 一种根据权利要求 27 的方法, 其特征在于所述的面粉为高粱粉。

29. 一种根据权利要求 4 的方法, 其特征在于步骤(2)中所用的根衍生的培养物产生了胶质状物质, 所述胶质状物质的生产是在无菌条件下通过将根浸入温度约为 35℃的水中来诱导的。

15 30. 一种根据权利要求 29 的方法, 其特征在于对步骤(2)而言, 随后将根衍生的未成熟胚胎转移到基本上不含生长素 2,4-D 的液体培养基中。

20 31. 一种根据权利要求 1 的方法, 其特征在于外植体选自叶和枝条, 并且步骤(2)是在不含生长素 2,4-D 的培养基中进行的, 而在所述的培养基中包括选自活性炭、抗坏血酸和柠檬酸的抗氧化剂。

32. 一种根据权利要求 26 的方法, 其特征在于包封包括下列步骤:

(1) 形成面粉和水的混合物

(2) 向所述的糊状物中加入体细胞胚

25 述胚胎的胶囊

(4) 干燥所述的胶囊。

33. 一种根据权利要求 32 的方法, 其特征在于在干燥步骤(4)之前, 将所述的胶囊浸入杀微生物剂中。

30 34. 一种根据权利要求 33 的方法, 其特征在于杀微生物剂包括杀真菌剂和杀细菌剂。

35. 一种根据权利要求 32 的方法, 其特征在于在干燥步骤(4)之前, 对所述胚胎的包封进一步包括下列步骤:

a) 向所述胶囊中加入海藻酸钠溶液

b) 随后将所述的胶囊放入氯化钙溶液中。

36. 一种根据权利要求 1 的方法，其特征在于甘蔗的小植物是通过胚胎发芽从而使体细胞胚成熟至植物的幼苗来生产的，由此在聚乙烯泡沫上装载的液体培养基中培养单个的体细胞胚。

37. 一种根据权利要求 36 的方法，其特征在于所述的体细胞胚处于晚鱼雷期并且是在不含生长素 2,4-D 的液体培养基中培养的，该液体培养基包括脱落酸。

生产甘蔗体细胞胚的方法

5 本发明涉及甘蔗植物、更具体地讲涉及生产甘蔗体细胞胚的方法。

众所周知甘蔗是一种极其重要的农作物，这是由于其在食品生产中的用途及其诸如糖蜜、蔗渣、滤浆(filter mud)和乙醇这样的副产品的用途，所有这些用途既对发展中国家又对发达国家有着很大的价值。

10 一般说来，甘蔗是作为一种多年生作物进行培养的。可以使该植物生长一年，并称作“甘蔗”。在这一阶段割下甘蔗并进行加工以生产出糖。将甘蔗的根和少量甘蔗的茎留在地里，这可以在来年生长以生成“第一次截根苗”。然后收获该植物以生产出糖，并且保留所述植物的剩余部分以便在下一年中生长来生成“第二次截根苗”。在
15 一些国家中，在最终将植物连根拔起之前要重复这一生长循环直至“第五次截根苗”。

甘蔗是通过风媒传粉的，这就导致在由种子得到的植物中存在着很大的变异性。这对于育种程序是很有用的，因为它产生了可以用来选择新的有用克隆的许多不同的植物变异。但是对于正常的商业繁殖
20 来说，天然的繁殖方法并不提供忠实于原型的(true-to-type)植物。结果直至今日，植物的繁殖仅为繁殖甘蔗的实际的方式。现有繁殖甘蔗的方法依赖于使用成熟甘蔗的茎。从降低甘蔗作物的整体生产率来看该方法浪费很大，从劳动力的消耗来看该方法是昂贵的，从传播病毒疾病（诸如斐济病）、细菌疾病（诸如红腐病）以及黑穗病这样的
25 主要的真菌疾病来看该方法还会产生一些问题。由于所述的疾病是由许多不同的载体传播的并且可以非常迅速地传遍整个的甘蔗种植区，因此甘蔗生产中出现的疾病问题是极其严重的。

不幸的是，由于在把茎切成大约 30cm 的节段之前植物必须要生长 9-12 个月，因此植物的繁殖是非常昂贵的。主要的问题在于甘蔗
30 的切割末端暴露在污染物之中，尤其是由于甘蔗汁中营养物蔗糖的存在。结果便易于传播会对甘蔗生产具有严重影响的病毒、细菌和真菌

疾病。

由于在新的甘蔗植物生产中出现的所有这些问题，因此针对育种和繁殖程序以及消除病毒而言已经研究了组织培养方法。例如，Barredo R., Luzaman R 和 Dequinto B. (1994)使用心叶（分蘖的最靠内部的叶子）从 Phil 74-64 品种生产 13,500 株小植物。但是，他们发现从实验室工作开始起需花费 8 个月的时间来生产能够在田地里种植的幼苗。Barba R.C., Zamora A.B., Linga C.K. 和 Thai Van N. (1975) 使用了可以使它们由 3cm 的甘蔗枝条小片生产出 4,000 株小植物的愈伤组织法，但不利的是，该方法会导致遗传变异。

通过植物组织培养技术，生物技术中最新的进展已经对农作物的改良和繁殖提供了新的机遇。

体细胞胚为含有枝条和根的分生组织的两极结构。它们既可以在愈伤组织中、又可以在细胞悬浮培养物中形成，并且直接导致成熟植物的形成。体细胞胚胎发生为植物的大规模生产提供了潜在的系统。但是对于实际用于植物大规模生产中的体细胞胚胎发生来说，必须克服直至本发明为止时对于甘蔗植物生产的方法仍存在的许多问题。直至本发明时，仅仅从在固体培养基上生长的愈伤组织生产出了成熟的体细胞胚。已知在愈伤组织上生长的细胞在遗传学上是不稳定的，因此从该愈伤组织培养出的胚胎可能在遗传学上是显著的。此外，愈伤组织衍生的胚胎并不同步生长，并且操作是劳动密集型的。这些问题使得愈伤组织衍生的体细胞胚胎发生不适合于大规模的商业化繁殖。与之相比，细胞的液体悬浮培养显示出更大的遗传稳定性，通过改进生长条件可以使之同步生长，并且可以进行自动化操作。到本发明为止，液体培养的尝试仅在生产未成熟的球形胚中取得了成功。

通过考虑上面提到的问题，已经提供了本发明。本发明克服了这些问题，并且提供了生产甘蔗植物的有效且可靠的方法，该方法特别适用于大规模的商业目的。

根据本发明，提供了一种从甘蔗外植体生产甘蔗体细胞胚的方法，该方法包括下列步骤：

- (1) 从外植体培养出未成熟的胚胎；
- (2) 从那些未成熟的胚胎中培养出成熟的甘蔗的体细胞胚，并且其特征在于至少步骤 (2) 是在液体悬浮培养中发生的。

本发明提供了一种涉及用于在甘蔗植物生产中使用的体细胞胚产生的体细胞胚胎发生的系统，因为成熟的体细胞胚可以迅速并大量地产生，而且在体细胞胚中维持了原始的植物基因的特性。

5 随后可以使通过本发明的方法产生的甘蔗体细胞胚发芽以生成甘蔗植物，或者可以将其包封在包封剂中以生成用于直接送入田地里的“人造种子”，从而使胚胎随后在原位发芽。

由本发明的方法生产甘蔗的体细胞胚涉及到体细胞胚胎发生。该方法是非常有价值的，因为它可能会以大约同步的方式在少量体积的培养基中生产出非常大量的胚胎。但是，与其它的甘蔗植物的营养繁殖方法相比，高增殖率仅仅是由用于随后生成甘蔗植物的体细胞胚胎发生提供的几个潜在优点中的第一个优点。例如，步骤（1）中胚发生组织的生长以及接下来在步骤（2）中胚胎发育至成熟都可以在液体培养基中实现，这就使得可能用最少量的处理来操作非常大量的无性繁殖体。此外，体细胞胚胎发生的产物为一种能够通过进一步输入
10 极少量的劳力而发育成再生的甘蔗植物的胚胎。用于生产甘蔗植物的体细胞胚胎发生优于营养繁殖和微量繁殖的现有技术系统之处为在同一单元中同时存在着根和枝条的分生组织，因此无需费力的转移操作，从而非常明显地减少了操作费用。

此外，这种缺乏重复的转移操作可以有利地减少由接触传播的污染。另一个优点为胚发生系统能够生产出分离的单个的胚胎，它不与母体组织或其它胚胎结合。因此，胚发生培养物生成了不仅完全、而且分散的无性繁殖体。这两种特性的结合为体细胞胚提供了直接送入温室或田地里的可能性，例如作为人造种子或处于液体条播（drilling）系统中的组分。
20

25 本发明的方法有利地提供了一种体外的增殖库，从而为迅速地在液体培养基中获得大量的甘蔗胚胎提供了新的可能性。比起目前使用存在着高劳动成本缺点的其它技术（诸如微量繁殖）得到的植物，上述方法可以使甘蔗植物更多和更快地繁殖。

30 使用涉及体细胞胚胎发生的本发明方法再生的甘蔗植物最优选是从甘蔗植物特有的组织化的分生组织或分生组织细胞得到的。这些细胞在遗传学上天生就稳定并且不易于发生突变的改变。的确，有证据表明在体细胞胚发育的过程中存在着有利于在遗传学上为正常细胞的

强烈的选择。结果，由本发明的方法得到的甘蔗植物导致产生了对可靠和有效地大量生产甘蔗植物很重要的真正的克隆群体。

5 因为缺少重复地处理植物组织、易于扩大所述工艺之规模的潜力并且相对容易地使所述工艺自动化，因此胚发生悬浮培养物特别适合于大规模的生产。在理论上将所述方法开发成为实际的生产系统需要生产出单个的胚胎，即所述胚胎处于发育的同一阶段并且存在着最终转化为幼苗的高转化率。使用胚胎作为无性繁殖体的优点为可能将它们包封起来以便直接送入田地里。

10 另外，本发明的方法有利地提供了从已经在操作过的培养物中选择的细胞再生为甘蔗植物的方式。因此，本发明的方法提供了一种用于甘蔗的新的遗传操作技术的有效方法以便进行农作物的改良，诸如体细胞杂交和遗传转化。

15 在本发明方法的步骤 1 中使用的外植体可以取自甘蔗母体植物的任何部分和发育的任何阶段。例如，外植体的来源可以来自甘蔗植物的叶、根、幼枝、芽、花序、年幼的节间，和/或外植体可以包括通过应激(stress)甘蔗植物的叶、幼枝、根、芽、花序或年幼的节间而衍生的成熟的胚胎。应激可以通过用 95% 的乙醇处理植物部分一段时间(优选 1-5 小时)和/或冷却所述植物部分至大约 5-15℃ 的温度下约 1-3 个月来实现。最优选的根衍生的或者成熟的胚胎用作
20 外植体材料。

根外植体在形成未成熟的胚胎中是最有利的，这可能是由于根(尤其是尖部)主要是由分生组织组成的。而且，根外植体有利地不太受到植物组织培养技术中已知的培养基和细胞“褐变”问题的影响。“褐变”结果是由酚类化合物氧化成醌类氧化产物而产生的。酚类衍生物
25 通常是由外植体释放的。由于当从根外植体衍生时未成熟胚胎培养物的褐变基本上是不存在的，因此有利的是不需要改变培养基，从而在任何固定的时间段内，根衍生的培养物倾向于积累更多的生物物质。

使用根外植体、而非叶或枝条外植体的另一个优点为生成了良好的、高度分散的未成熟胚胎培养物。此外，可以将根外植体直接用于
30 在液体悬浮培养中生成胚胎，而无需形成中间的愈伤组织并且无需每隔 2 至 5 天更换培养基。对于使用体细胞胚胎发生而在工业上应用本

发明的方法作为繁殖甘蔗的一种手段来说，这一特点是非常重要的。根外植体和非根外植体共同培养给混合的培养物带来了与上述针对根外植体单独培养的优点基本上相同的优点。例如，“褐变”通常出现在枝条外植体培养的过程中，而在混合的枝条和根的外植体培养中
5 所述的褐变被减小到了最低的程度。

此外，由于通过把至少包括一个节在内的枝条材料放入蒸馏水中可以容易地诱导出根部，因此根的外植体易于得到。在一段时间后，根的网络生长起来，外植体材料即可以来源于此。在工业上应用本发明的方法中，这是特别有用的。

10 使用叶外植体的优点包括其易于得到并且它们通常可以以不受污染的状态得到。

在使用叶外植体的情况下，最优选的叶外植体来源于靠近植物生长点的区域，这是因为培养基褐变的频率随着距离生长点的距离的增加而增加。此外，叶外植体所来源的供体植物的年龄优选介于大约 3
15 - 12 个月，但是最优选大约为 9 个月，这是因为培养基褐变的频率基本上不存在，并且来自 9 个月老的植物的所有叶子的节段实际上都是高度发生胚的。

上面提到的单独或者与其它来源的外植体结合使用根外植体的优点、尤其是避免了在植物培养技术中频繁遇到的“褐变”问题，对于所有类型的植物的培养都是有利的（诸如树、枣椰树、马铃薯），
20 因此甘蔗根的外植体的使用不局限于甘蔗的培养。

由外植体（本发明的步骤 1）培养未成熟的胚胎的方法优选包括下列步骤：

- (a) 在培养基上培养外植体材料以生成体细胞
- (b) 选择并且增殖来源于外植体材料的体细胞
- (c) 在培养基上培养体细胞一段时间，以便从体细胞诱导出未成熟的甘蔗的胚胎

未成熟的胚胎可以在固体培养基上以胚发生愈伤组织来引发和
25 维持，或者在液体培养中以胚发生细胞悬浮培养物来引发和维持，或者在优选称作“双层”培养基的固体和液体培养基结合的培养基上引发和维持。

在本发明的方法中可以使用由 Evans 等、Gamborg 等、Schenk

与 Hildebrandt (SH 培养基) 以及 Murashige 和 Skoog (MS 培养基) 的相对稀释的培养基至更加浓缩的配方这样的宽范围的固体和/或液体培养基。对于本发明的方法来说, 最优选使用的是固体或液体 MS 培养基, 这是由于该培养基特别有利于以胚发生的愈伤组织/悬浮培养物来形成未成熟的胚胎以及诱导其体细胞的胚胎发生, 而这可能是因为在 MS 培养基中存在着较高水平的氨型氮。根据需要, 可以在本发明方法的不同步骤中使用不同的培养基。

在培养基配方中或者单独或者以组合的方式包括最优选的植物生长调节剂, 诸如生长素 (例如 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)、萘乙酸 (NAA)、吲哚 3-乙酸 (IAA))、细胞激动素 (cytokinins)、赤霉素、脱落酸、抗生长素、细胞分裂素、玉米素和/或活性炭。在本发明的方法中, 对于从外植体诱导未成熟胚胎 (愈伤组织的形成和/或悬浮培养) 的发育以及对于从未成熟的胚胎发育成体细胞胚来说, 生长素 2,4-D 是最有效的调节剂。宽的 2,4-D 的浓度范围是合适的 (例如 0.5-10 mg/l), 但是最优选使用相对高的浓度 (诸如大约 3-5 mg/l)。相反地, 细胞激动素对未成熟的甘蔗胚胎的生长具有抑制作用。在培养基中优选同时包含了 ABA 和 2,4-D, ABA 的浓度为 0.1-20 mg/l, 最优选其浓度约为 1 mg/l。ABA 有利地阻滞了非胚发生细胞的生长, 从而使培养物中胚发生细胞的百分比最优化。

作为碳源和能源, 糖是组织培养基的主要和基本的组分。最优选使用蔗糖作为用于培养甘蔗的本发明方法中所用培养基的主要的糖组分。在本发明的培养方法中, 许多其它的单糖 (诸如葡萄糖和果糖)、二糖 (诸如乳糖) 以及其它的糖 (诸如蜜二糖) 也可以支持生长和胚胎发生。但是, 蔗糖的使用对本发明的方法而言是特别有好处的, 因为它不增加培养物的褐变。所用蔗糖的浓度优选在 10-60 g/l 的范围内。所用蔗糖的浓度最优选地约为 30 g/l。直至本发明时, 在培养甘蔗的过程中通常以椰子汁作为培养基的一个组分。但在本发明的方法中, 有利的是椰子汁不是一种必须的组分, 从而降低了成本。

在将外植体材料引入培养基 (步骤 a) 之前, 通过应激外植体材料和/或来源于所述外植体材料的组织来最有效地刺激胚发生愈伤组织和/或胚发生悬浮培养物的生成。

例如,这可以通过涉及将外植体冷却到大约 $5^{\circ}\text{C} - 15^{\circ}\text{C}$ 的温度下大约 1-3 个月的应激-处理来实现。最优选将外植体冷却到大约 10°C 下约 2 个月。用于刺激胚胎产生的其它合适的应激处理包括将外植体在大约 95% 的乙醇中浸泡约 1-5 个小时。优选在后的乙醇方法, 5 因为这是一种处理甘蔗外植体以去除污染、同时保留下对培养而言可存活的细胞以生成胚发生材料的现有的方法。在乙醇中浸泡外植体的最优选的时间约为 4 个小时。

在乙醇处理之前,优选用诸如烛蜡这样的蜡来覆盖取自母体甘蔗植物的组织暴露出的切口端,以便减少在切口处暴露的组织对乙醇的 10 吸附。将组织在乙醇中浸泡之后,优选将所述的组织包裹在无菌干燥的组织试纸或类似物之中以吸去剩余的乙醇。然后可以从供体组织(例如叶、枝条、根)选择和切下外植体材料,并将其引入培养基中。接下来培养外植体一段时间以诱导体细胞形成。通过使用含有 ABA 的培养基,最优选地通过阳性来选择体细胞的发育。ABA 阻滞了其它类型 15 的细胞的生长,从而使得所需的体细胞的百分比最优化。通过根据其尺寸和形状分离细胞的方法进一步选择体细胞。甘蔗的体细胞通常是圆形的,其直径约为 $40 - 65\mu\text{m}$,最通常地直径介于 $46 - 63\mu\text{m}$ 。相反地,非胚发生的甘蔗细胞通常是伸长的,并且其长度小于约 $46\mu\text{m}$ 。基本上仅仅选择体细胞的方便的方法是通过网眼尺寸为 $100 - 50\mu\text{m}$ 20 的第一个筛子来筛分培养物,从而基本上使体细胞和非胚发生的细胞通过(但却收集了任何较大的颗粒,诸如细胞聚集体),随后通过网眼尺寸为 $50 - 38\mu\text{m}$ 的第二个筛子来筛分已过筛的培养物,这就基本上使非胚发生的细胞通过、而基本上收集了体细胞。体细胞最佳的选择发生在第一个筛子约为 $63\mu\text{m}$ 、第二个筛子约为 $45\mu\text{m}$ 的情况下。

25 为了增殖的目的,然后优选将所选择的体细胞重新悬浮在上述含有 2,4-D 的培养基中,该培养基优选还含有如上所述的 ABA。

然后培养体细胞一段时间以生成未成熟的胚胎,步骤(c)。所述的时间通常介于 10 天和 40 天之间,而这取决于例如外植体的性质、所用的培养基以及所用的生长调节剂的浓度和种类。一般说来, 30 体细胞形成未成熟胚胎的百分数随着 2,4-D 浓度的增加而增加。

未成熟的胚胎可以通过本发明的方法在黑暗或者光照的条件下或者结合黑暗和光照的条件来生产。最优选的是将培养物暴露在 16

小时光照和 8 小时黑暗的光循环之中, 因为该循环产生了数量最大的胚胎。

来自起源于外植体的体细胞的未成熟胚胎的培养可能涉及到来自原始培养物的传代培养物的生长。在传代培养至新鲜的培养基上之前, 最优选地将原始培养物在原始培养基上至少维持 3 个月。已经发现这样会生产出数量最佳的胚发生的培养物。

在外植体的原始培养物涉及到在固体培养基上从外植体引发胚发生的愈伤组织时, 本发明方法的步骤 1 进一步涉及到来自外植体的胚发生愈伤组织在液体培养基中的传代培养, 以便建立和维持胚发生细胞的悬浮培养。直至本发明时, 上述传代培养存在着大量问题, 其中包括当转移至液体培养基时愈伤组织培养物广泛地发生褐变, 在液体培养中产生了大量的根、而不是胚胎, 愈伤组织细胞进行聚集、而不是形成了良好的悬浮培养物等等。

以前, 仅仅通过每隔 2-4 天重复地更换培养基来防止液体培养基的褐变。这样的更换耗费了时间, 并且会浪费昂贵的培养基。培养基的更换还能带来培养物污染的可能性并且损失了由细胞产生的重要的化学物质。因此对于通过体细胞胚胎发生来大规模地繁殖甘蔗而言, 替换培养基以克服褐变问题并不是一种切实可行的选择方案。本发明已经发现了解决这一问题的不同的方法, 它们不需要进行上述重复的传代培养来避免褐变。

在本发明中, 最优选的是将由根外植体单独或者与其它类型的外植体一同形成的胚发生愈伤组织用于形成液体悬浮培养物。根的愈伤组织迅速地分散开来, 并且产生了带有最少量细胞聚集体的良好的悬浮物。此外, 根的愈伤组织基本上不产生任何培养基或者细胞的褐变, 因此根愈伤组织的悬浮培养不需要进一步的传代培养以避免培养基和/或细胞褐变的问题。使用甘蔗根的外植体用于培养的本发明的方法对所有类型的植物培养物而言都是重要的, 直至本发明时, 所述的植物培养物都已遇到了“褐变”的问题、诸如枣椰树。

至少在叶外植体衍生的培养物的情况下, 抗坏血酸和柠檬酸协助防止了细胞和培养基的褐变。因此, 作为愈伤组织起始固体培养基和液体胚发生悬浮培养基的一个组分而优选包含着抗坏血酸。在本发明培养过程的不同阶段需要不同浓度的抗坏血酸/柠檬酸。最优选地在

由叶外植体建立愈伤组织时，在固体培养基中含有大约 1-2 mg/l 的抗坏血酸以防止外植体的褐变。对于由愈伤组织建立悬浮培养物时，在培养基中包含有优选 50 mg/l-200 mg/l 的抗坏血酸（最优选大约 100 mg/l 的抗坏血酸）以及优选 250 mg/l 的柠檬酸（最优选大约 150 mg/l 的柠檬酸）。在悬浮培养的起始阶段之后，在维持培养基中应当存在着浓度为 2 mg/l-20 mg/l、并且最优选约为 10 mg/l 的抗坏血酸以避免褐变。

其它的抗氧化剂可能是有用的，例如在把愈伤组织转入液体培养基中以便建立悬浮培养物之前，可以在原始的固体培养基中掺入活性炭。

另一方面，同时培养根和非根的外植体，这是因为根外植体/愈伤组织的存在基本上抑制了培养基和细胞褐变的发生。

影响悬浮培养物形成及其随后生长的一个重要的因素为愈伤组织接种物的密度。接种物的密度越大，细胞聚集的频率也越高。为了得到分散良好的悬浮培养物，优选接种物的密度在 1-10 g/l 培养基的范围内。最优选的密度约为 5 g/l。

对于悬浮培养物的最佳的生长来说，最优选的光照周期为 16 小时光照/8 小时黑暗的循环。

在液体培养基中最优选的糖源为蔗糖。当然可以是诸如上面提到的单糖和二糖这样的其它类型的糖类。对于最佳的胚胎生产来说，最优选使用浓度为 20-60 g/l 的蔗糖和/或葡萄糖、并且最优选约为 30g/l。

在液体培养基中优选包括脱落酸 (ABA)。介于 0.1-20 mg/l 之间的浓度是优选的，并且最优选约为 1 mg/l，因为这样抑制了非胚发生细胞的生长、同时鼓励了胚发生细胞的生长，并且促进了基本上纯的胚培养物的生成。这就特别有利于胚发生培养物高效长期的维持，因为它避免了在每次传代培养的过程中需要密集的劳动以除去所形成的非胚发生细胞，从而确保了高效、长期的再生。在其它类型植物的培养中，这种在培养基中使用 ABA 来抑制非胚发生细胞的生长可能也是重要的。

对于在商业上大规模地繁殖甘蔗胚胎来说，优选的情况是一开始在固体培养基上培养外植体衍生的愈伤组织，从而将其转移以便在液

体培养基中进一步发育。如果一开始在固体培养基上培养的外植体衍生的愈伤组织继续在固体培养基上发育的话,那么尽管最终将胚胎建成为甘蔗小植物,但是胚胎并不同步发育并且必须单独进行处理。因此对在商业上大规模繁殖甘蔗来说,优选的是将外植体衍生的愈伤组织从固体培养基中转移到液体悬浮培养中进行进一步的发育。但重要的是,另外也可能直接在液体悬浮培养基中直接从根的外植体开始未成熟的球形胚的生产,从而避免了例如至少对枝条和叶的外植体培养而言所需要的在固体培养基上进行原始诱导的要求。

因此,本发明方法的步骤2最优选地包括通过诱导体细胞胚胎发生,使得在液相悬浮培养中未成熟的球形胚成熟至发育完全的胚胎。直至本发明为止,问题已经阻碍了在液体培养中成功地生产出成熟的甘蔗胚胎。

本发明提供了一种成功地实现了这种使用根、枝条和叶的外植体作为原始的植物组织来源的方法。最优选使用根的外植体。有利的是,在步骤2中根衍生的培养物生成了一种使悬浮物发粘的胶质状物质。这种胶质状物质具有重要的协助防止褐变的性质。而且,培养基粘度的增加也提高了胚胎发生的程度。通过在相对高的温度下(诸如35℃)、在无菌条件中将根浸入水中,可以从甘蔗的根诱导胶质状物质的生产。然后可以取回胶质状物质,并将其加入任何发生“褐变”的植物组织/细胞培养物中。使用这种物质可以代替对在通常避免“褐变”的培养基中包括昂贵的抗氧化剂的需求。

如前文所述,在含有2,4-D的培养基中从外植体有效地诱导出甘蔗未成熟的胚胎。最优选的是对步骤2而言,随后将未成熟的胚胎转移到不含生长素2,4-D的液体培养基中,以便鼓励成熟胚胎的发育。但是,仅有根衍生的悬浮培养物在不含2,4-D的液体培养基中发育成成熟的胚胎、而基本上不发生褐变。例如将叶和枝条衍生的悬浮培养物转移到不含2,4-D的培养基中时,褐变发展起来、减少了胚胎的成熟。因此在这种情况下,优选在这一阶段向培养基中加入活性炭或其它合适的抗氧化剂,这就协助控制了培养基和细胞的褐变,从而使得并且鼓励成熟胚胎发育。对根衍生的培养物而言,活性炭/抗氧化剂的加入并不是必须的、但却可以包括在某些条件下,例如当根培养物的年龄大于大约2个月时的情况,因为超过该时间以后,根培养物通

常开始产生“褐变”的问题。最优选的是在需要活性炭的情况下，向液体培养基中加入浓度约为 3g/l 的活性炭。

5 优选使培养物在一段时间内发育，优选介于 50-60 天之间。在成熟阶段中，优选频繁地更换培养基，例如每周进行更换。例如取决于培养条件，未成熟球形胚的体细胞胚胎发生成为两极胚、而后成为成熟的体细胞鱼雷胚发生在大约 30-40 天。

10 对于将要用于大规模生产甘蔗植物的体细胞胚胎发生来说，被送入田地里的成熟的胚胎（优选呈合成种子的形式）应当产生均匀生长的植物，以便促进诸如除草、灌溉和收获这样的农业操作。在甘蔗中，为了实现最大量地生产出糖，植物必须处于成熟的某一年龄。开花后，糖的产量显著下降。因此对接下来的发芽来说，关键是让所有成熟的胚胎处于发育的同一阶段，以便植物在同一时间成熟。

15 为了避免未成熟胚胎不同时成熟，步骤 2 最优选地包括一种处理胚胎以克服不同时发育的方法。合适的处理包括在冷的储存器中储存悬浮培养物。最佳的条件例如为在 5℃（+ 或 - 1℃）下储存大约 10 天。另一种可以有利地易于原位使用而没有污染危险的简单的处理为热处理，例如在约 50℃ 下处理 45-60 分钟。在经过该处理后，非胚发生的细胞和胚发生的细胞丧失了其生存能力，而胚胎则不受影响。

20 在所述的热处理之后或者另一方面，为了选择具有体细胞胚的较高百分数的培养物，优选如上关于本发明的第一步所述来筛分悬浮培养物。最理想的是通过一个网眼为 63μm 的第一个筛子筛分悬浮物，并在网眼为 45μm 的第二个筛子上收集。

25 最理想的是在筛分之后搅拌培养物，这就基本上除去了任何剩余的非胚发生的细胞。当所述培养物处于搅拌生物反应器中时，通过在约 500 rpm 下操作搅拌器大约 1 个小时来方便地实现所述的搅拌。应当领会的是对任何种类的植物培养而言，可以有利地应用上述在培养中优化胚胎同步发育的方法，其中异步发育通常发生在例如用于生产树木、枣椰树和马铃薯的胚胎的培养中。

30 对于通过组织和细胞培养来大量地繁殖甘蔗植物来说，使用生物反应器生产甘蔗的体细胞胚是非常合乎需要的。使用生物反应器，就可能控制培养条件、使方法自动化、生产出大量的悬浮培养物并且避免了对所生成的悬浮培养物进行传代培养的需要。

对于体细胞胚胎发生而言, 生物反应器具有许多优于摇瓶的优点。除了它巨大的工作体积之外, 由于通过机械搅拌或者通过给培养基通风而产生的混合, 因此生物反应器提供了均匀的培养。使用生物反应器, 就可能监测 pH、溶氧浓度及其它环境因素。

- 5 最重要的因素之一为培养基中的溶氧浓度, 该浓度是由生物反应器中的通风和搅拌速率来控制的。其它重要的因素为培养基内部细胞的分布和密度。

任何类型的生物反应器都适合于本发明的方法, 诸如气升式生物反应器和机械搅拌生物反应器。在气升式生物反应器中, 使用空气既
10 提供了通风、又混合了培养物。借助机械搅拌生物反应器, 就可能控制与混合的水平无关的培养基的充氧。因此这种在后的生物反应器的类型是优选的, 因为它可能独立地改变机械搅拌器的转动速度。在超过 500 rpm 的转子速度下没有非胚发生细胞存活, 从而转子速度的变化是改进胚发生培养物同步的一种有价值的方式。

- 15 搅拌釜生物反应器中的体细胞胚胎发生的百分数通常高于气升式生物反应器中的百分数。搅拌釜在所有的阶段中均提供了良好的混合, 而气升式生物反应器中的流速必须随着生长的增加而连续地增加, 这是因为若气流速度低的话, 那么许多的细胞将沉淀。伴随着高的气流速度会发生大量的蒸发和泡沫的形成, 这就造成许多的细胞附着到生物反应器的壁上。
20

根据本发明的另一方面, 提供了一种用于从未成熟的胚胎培养甘蔗成熟的体细胞胚的方法, 该方法包括下列步骤:

- (1) 从外植体制备未成熟胚胎的液体悬浮培养物
- (2) 在生物反应器中培养所述的悬浮物以形成体细胞胚。

最优选的是在生物反应器中进行步骤 (1) 和步骤 (2) 的培养。但是, 步骤 (1) 可以换一种方式例如在摇瓶中进行, 并且将未成熟
25 胚胎的培养物用作用于在步骤 (2) 的生物反应器中培养的接种物。

最优选的是步骤 (1) 包括在含有 2,4-D 和 ABA 的培养基中直接培养来自于根外植体的根的胚发生愈伤组织。最理想的 2,4-D 的浓度在 0.1-5 mg/l 的范围内且最优选为 3 mg/l, ABA 的浓度最理想为 0.1-20 mg/l 且最优选为 1 mg/l。优选在步骤 (2) 之前, 所述的方法包括以上述方式通过筛子筛分培养物以形成良好的悬浮物。优选
30

筛子的网眼尺寸为 $63\mu\text{m}$ ，并且在网眼尺寸为 $45\mu\text{m}$ 的筛子上收集悬浮物，这基本上确保了良好的悬浮物基本上包括体细胞胚。接下来，所述的方法优选包括在步骤2之前一个额外的将步骤1的培养物重新悬浮于新鲜培养基中的步骤。这一额外的步骤优选包括在含有 2,4-D 和 ABA 的新鲜培养基中传代培养最理想大约 1 个月，以便形成高度的胚的培养物。对于重新悬浮于生物反应器中来说，最优选的接种密度约为 5 g/l 。最优选通过在 500 rpm 下搅拌培养物 1 小时来除去任何剩余的非胚发生细胞。这可以在搅拌釜型生物反应器中最方便地得以实现，因此可以调节搅拌器转子的速度。

10 步骤(2) 优选包括在不含 2,4-D、而含有 ABA 的培养基中培养悬浮物，其中优选在搅拌式生物反应器中培养。最优选有规律地更换生物反应器中的培养基直至成熟。这通常发生在大约 50 天时。优选例如每 10 天更换一次培养基。

随后可以将由本发明的方法（在生物反应器中或以其它的方式）生产的成熟的胚胎包封起来以形成“人造种子”。

甘蔗小植物的生产包括通过使胚胎发芽来使体细胞胚成熟为植物的幼苗。该步骤最优选包括在液体培养基中培养单个的体细胞胚。所述的培养优选在聚乙烯泡沫上进行。聚乙烯泡沫有利地支持了幼苗，使得可以容易地将幼苗直接转移到田地里。优选体细胞胚处于晚鱼雷期。优选在不含 2,4-D 的液体培养基中培养胚胎。培养基可以有利地包括浓度为 $0.05\text{--}1\text{ mg/l}$ 的 ABA、最优选浓度为 0.1 mg/l 。发现产生于用 ABA 处理的胚胎的幼苗更加茁壮并且在温室条件下生存得更好。

25 在发芽之前，可以将由本发明方法生产的体细胞胚包封起来以形成人造种子。

根据本发明的另一方面，提供了一种用于包封体细胞胚的方法，该方法包括向体细胞胚中加入至少一种包封剂的步骤。该方法适合于包封许多植物的体细胞胚，其中包括但不限于甘蔗、各类树木、马铃薯、枣椰树等，以形成易于处理、储存和运输的所谓的“人造种子”。

30 最优选的包封剂包括至少一种全谷物面粉/水糊状物（water paste）。这种糊状物作为包封剂是特别有利的，因为它给包裹住的胚胎提供了营养物、使得胚胎可以通风、形成了外壳以保持胚胎潮湿

- 并且对胚胎而言易于其发芽，而且它也不贵。全高粱粉是一种特别优选的物质，这是因为它特别便宜。所用的面粉可以是发酵过的或者是没有发酵的。发酵过面粉最为优选，因为由此产生的胶囊基本上都抗裂。面粉与水的混合物优选为每 100ml 的水中有 5-30 g 的面粉，
- 5 并且最优选为大约 10g 面粉/100ml 水。

包封的方法优选包括下列步骤：

- (1) 形成面粉/水糊状物
- (2) 向糊状物中加入体细胞胚
- (3) 把包封在糊状物中的单个的胚胎放入水中，以便
在每个胚胎周围形成胶囊
- (4) 干燥所述的胶囊

形成面粉/水糊状物的方法优选包括将面粉和水混合在一起、加热所述的混合物以形成糊状物、对糊状物进行高压灭菌、冷却所述的糊状物。

- 10 在干燥之前，可以将胶囊浸入诸如杀真菌剂和/或杀细菌剂这样的杀微生物剂之中。

在包封胚胎的方法的步骤(4)之前或之后，所述的方法可以进一步包括下列步骤：

- (a) 向胶囊中加入海藻酸钠溶液
- (b) 接下来把所述的胶囊放入氯化钙溶液中。

- 15 这些额外的步骤产生了含有包封在面粉糊状物中的单个胚胎的海藻酸钙珠。

最理想的是在上述步骤中所用的海藻酸钠溶液的浓度约为 3%，从而理想地将其转移到步骤(ii)中 75 mM 的氯化钙溶液中。可以使含有单个胚胎的海藻酸钙珠在液体或固体培养基中(诸如不含 2,4-D 的培养基)或者直接在土壤中发芽。

- 20 根据本发明的另一方面，提供了一种含有包封在以面粉为基质物质中的植物胚胎的人造种子。优选将面粉包封的胚胎包裹在海藻酸钙珠的内部。人造种子最优选是由上述方法生产的。最优选的植物胚胎为由本发明的方法生产的甘蔗的体细胞胚。

- 25 这种包含体细胞胚的人造种子提供了优于有性种子的许多的优点。例如，其发芽率要高于有性种子的。而且，与通常由有性种子表

- 现出的染色体变异和差的存活能力相比，人造种子在遗传学上是稳定的并且能够高度存活。另外，这种人造种子提供了优于甘蔗的营养繁殖的许多优点，就甘蔗的使用、劳力和运输而言所述的营养繁殖费用大并且也带来了疾病污染的高风险。本发明生产体细胞胚以及随后进行包封以形成人造种子的方法提供了一种非常有效的生产甘蔗的方法，因为它给从单个甘蔗的外植体来大量地生产有活力的、在遗传学上相同的人造种子提供了一种不含污染、低劳力、时间效率高的方法。可以以最低的成本储存、运输和种植所生产的人造种子。

- 由母体植物的营养繁殖产生的植物与那些由本发明的体细胞胚胎发生产生的植物在形态、糖含量、生物化学等方面是相似的，而且由本发明方法产生的植物在许多特性上都类似于原始的母体植物。因此，本发明的方法为甘蔗的大规模生产提供了一种在商业上重要并且富有生命力的新方法。

- 15 现在，通过以下非限制性的实施例来描述本发明。

实施例

叶的外植体的制备

- 将来自 Co527 品种(Kenana 糖业公司)的甘蔗的连根切枝(setts)在 52℃的水浴中浸没 2 天，以便暴露任何的污染物并且促进生根和发芽。

随后在 25℃ 下、以 16 小时光照的光周期在温室中自 11 月至 4 月并且在 5 月至 10 月期间使用自然光、在 Levington Multipurpose Compost (Fisons) 上培养所述的连根切枝。

每周用液体肥料 (Tomorite Rey TM, Fisons) 给正在生长的植物施肥。

在三个月时, 把叶的外植体切成 5mm 的外叶和内叶的节段。

通过在 95% 的乙醇中浸泡 20 分钟来给叶的外植体灭菌。

枝条或根的外植体的制备

在体外从起源于叶外植体 (Co527 品种) 的愈伤组织培养物中得到小植物。母体植物选自那些小植物, 并且在枝条繁殖培养基上进行繁殖。根和枝条的外植体是从这些三个月大的微量繁殖的植物中得到的。在无菌培养中无需灭菌从再生的植物中转移出根和枝条的外植体。

培养物 MS (Murashige 与 Skoog, 1962) 培养基的制备

基本培养基是由贮存液制得的, 然后用各种组合的植物生长调节剂、维生素和糖进行补充, 其贮存液是单独制备的并且在黑暗的瓶子中于 -20℃ 下储存。在制备过程中, 向培养基中加入肌醇、固化剂 (琼脂) 和糖。培养基是由双蒸水制得的。在高压灭菌前加入热稳定的植物生长调节剂以及其它的化合物, 而仅在倒入无菌平板之前才向微温的培养基中加入热不稳定的化合物、诸如玉米素和 ABA。在高压灭菌前, 通过使用 1M NaOH 或 1M HCl 将所有培养基的 pH 调节到 5.8。在固体培养基的情况下, 在调节 pH 之前加入 0.9% (w/v) 的琼脂 (Sigma, UK)。

将含有 30 g/l 蔗糖和 3 mg/l 2,4-D 的 Murashige 与 Skoog (1962) 培养基用于愈伤组织培养物以及摇瓶和生物反应器中的悬浮培养物的生长和维持; 它称为 (MS1)。对胚胎发生而言, 使用含有 30 g/l 蔗糖的 Murashige 与 Skoog 培养基并且称作 (MS2)。根据需要可以对培养基进行调节。

定期无菌地取出样品, 并且将样品涂在 MYGP 琼脂 (麦芽和酵母提取物, 葡萄糖和胨)、PDA (马铃薯葡萄糖琼脂) 和 NA (营养琼脂) 的板上, 所有的试剂均由 Oxoid, Basingstoke, Hants 提供。然后在检查微生物的生长之前, 将这些植物在 25℃ 下培养 1 周。

愈伤组织培养物的引发

通过在用 0.9% 琼脂固化的含有 MS1 的 90×15 mm 无菌的塑料陪替氏培养皿 (Sterilin Ltd. UK) 中培养外植体来引发愈伤组织的培养物。用石蜡膜 (American National Can Co.) 密封陪替氏培养皿以减少由蒸发带来的湿度的损失。在培养几周后, 当愈伤组织已经生长之时, 用无菌镊取出愈伤组织并将其放在新鲜的琼脂板上。然后再培养一个月。弃去包括任何深褐色或者被污染的组织在内的剩余的原始外植体。

悬浮培养物的生产

一开始, 悬浮培养物是通过把 0.5-1.0g (鲜重) 的愈伤组织材料放入含有 50 ml MS1 的无菌的 250 ml 锥形摇瓶 (Corning, Stone, Staffs.) 中来生产的。在用大约 12×12 cm 见方的双层无菌铝箔重新密封后, 将烧瓶放置在转速为 100 rpm 的旋转振荡器上。在几周内, 这种轻柔的振荡作用促进了细胞更小的部分以及单个的细胞离开较大的聚集体。然后对该培养物进行传代培养, 特别注意的是转移出较小的团块并弃去较大的聚集体。每周将较好的细胞聚集体的 10-15ml 的等分试样转移到处于 250 ml 摇瓶的 50 ml 新鲜的培养基中。

根的悬浮培养物的直接建立以便小规模地生产

将从成熟的植物或从微量繁殖的植物收获的根直接放入含有 0.5-10 mg/l 2,4-D (最优选为 3 mg/l) 以及 ABA 0.1-10 mg/l (最优选 1 mg/l) 的液体培养基中。形成了一种良好的悬浮培养物。

通过体细胞胚胎发生进行成熟胚胎的生产

对于胚胎发生来说, 将培养物转移到不含 2,4-D 的 MS 培养基中。胚胎的成熟发生在不含生长调节剂的相同的 MS 培养基中。

用于工业用途的根的悬浮物的建立 (作为大型生物反应器的接种物)

年龄为 9 个月的种植得良好的母体植物为植物材料的来源。将在地面以上的植物切掉 10 cm, 切下带有 2 个节 (大约 20 cm 长) 的连根切枝, 用熔化的石蜡封住切口端。在 20% 的次氯酸钠中使连根切枝灭菌 20 分钟并用蒸馏水洗涤多次, 去掉用蜡封的末端。仔细地除去芽, 从而抑制枝条在生物反应器内部的生长。把植物放入 3 升的生物反应器内且靠近生物反应器的器壁, 并且通过无毒的胶而与器壁连

接的圆形硅管使所述植物固定在器壁上。

生物反应器中装满了蒸馏水，并且通过 35℃ 的水浴且不运行搅拌器来控制温度。庞大的根的网络生长。当根约为 1 英寸长时，用虹吸管抽出蒸馏水并使生物反应器中装满 MS1 培养基。接下来将温度降至 27℃。在 100 rpm 下搅拌生物反应器。1 个月后，不发生褐变的良好的悬浮物随时都可以用作接种物。

通过网眼为 63μm 的筛子来筛分良好的悬浮物，并在网眼尺寸为 45μm 的筛子上收集悬浮物。

用于商业用途的 5 升生物反应器中体细胞胚的生产

从上述接种物中，用 25 g 的细胞来接种采用 MS2 培养基的 5 升搅拌釜生物反应器。在 500 rpm 下操作搅拌器，从而去除了任何剩余的非胚发生的细胞。这一步骤导致高度同步的生长。在运转结束时，93% 的胚胎为鱼雷胚，其密度约为每升中有 1 百万个胚胎。

包封的体细胞胚的生产

将高粱粉 (10g) 与水 (100ml) 混合，并将 pH 调节到 5.8。使该混合物沸腾，同时连续地搅拌以形成粘稠的糊状物 (当以一滴放入水中时，它立即固化)。在该阶段中，在 15 psi、121℃ 下对糊状物高压灭菌 20 分钟。将糊状物冷却到 40℃。对于包封而言，从 3 周后的成熟培养基中挑选出成熟的胚胎，然后将胚胎逐个地滴入糊状物中。使用移液管将包括包封胚胎的糊状物的圆形胶囊滴入冷水中。在该阶段中，可以将胶囊浸入杀真菌剂和杀细菌剂中。然后干燥所述的胶囊。

向 MS2 中加入浓度为 3.0% (w/v) 的海藻酸钠 (Sigma)。在调节 pH 至 5.8 之后，对培养基高压灭菌。首先将面粉包封的胚胎逐个地浸入无菌的海藻酸钠溶液中，然后将其滴入位于放置在磁力搅拌器之上的烧杯中的 75 mM 氯化钙溶液中。通过滗去氯化钙溶液并用 MS 液体培养基洗涤来回收每个含单个体细胞胚的得到的珠子。

胚胎发芽以生成小植物

在 MS (固体或液体) 培养基中发芽之后，将幼苗转移到珍珠石 (perlite)、然后转移到 Levington 混合肥料 (compost) (3 周后) 上，并且在 15-32℃、87% 的相对湿度下在温室中进行培养。在汞汽灯下维持较长的白天的条件 (16 小时光照)。3 周后，将小植物转

移到混合肥料上。

成活力测试

使用荧光素二乙酸酯 (FDA) 测试 (Widholm, 1972) 来评价培养物中细胞和胚胎的成活力。在使用前, 在水中将 FDA 的丙酮溶液 (5
5 mg/ml) 稀释至最终浓度为 0.01%。将等体积的该溶液与细胞悬浮物混合, 并且在室温下至少保留 3 分钟。用移液管吸取一滴混合物到显微镜的玻璃载玻片上, 用玻璃盖玻片覆盖, 并在 Olympus BH2 U.V. 显微镜下观察, 所述的显微镜装配有 BH-RFL-W 型反射光荧光附件、100 瓦的汞汽灯、EY. 455 激发滤片 (exciter filter)、B(DM. 500+
10 0.515) 二色镜以及 530nm 的阻挡滤片。几分钟后使荧光显影, 在 10 随机视野中计量出发黄绿色荧光的细胞 (有成活力的) 的数目以及包括不发荧光的细胞 (没有成活力的) 在内的细胞的总数。

本领域的技术人员应当领会的是本发明提供了一种在时间和劳力方面均高效的、但也很可靠的适合于大规模生产甘蔗成熟胚胎的方法。有利的是该方法适合于在生物反应器中进行生产, 其中所述的方法可以完全实现自动化。
15

应当了解的是本发明的范围不应局限于上述实施例, 因为那些实施例仅仅是通过举例的方式用于说明的。