

(19) 中华人民共和国专利局

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>  
C12N 5/00  
C12N 15/00



# (12) 发明专利申请公开说明书

(11) CN 86 1 07575 A

CN 86 1 07575 A

(43) 公开日 1987年5月27日

(21) 申请号 86 1 07575

(22) 申请日 86.10.21

(30) 优先权

(32) 85.10.22 (33) 美国 (31) 790.257

(71) 申请人 植物遗传学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 戴维·A·斯图尔特

史蒂文·G·斯特里克兰

(74) 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 王 巍

(54) 发明名称 用于提高体细胞胚胎发生的改良方法和培养基

(57) 摘要

提供了改善通过诱导植物体细胞组织得到的胚胎数量和质量的方法及培养基。培养基内加有一定量的经选择的氨基酸,其数量足以提高所产生之体细胞胚胎的数目。本发明还提供了包含该离子源的培养基以及培养植物体细胞组织的方法。

871A 04876/02-191

## 权 利 要 求 书

---

1. 一种用于诱导、再生和维持植物体细胞胚胎组织的植物细胞培养基，其特征在于它包括一种含铵离子源的培养基，培养基中还加有选自 L-脯氨酸、L-丙氨酸、L-精氨酸、L-谷氨酰胺、L-天冬酰胺、L-丝氨酸、L-鸟氨酸、L-谷氨酸及其酰胺、烷基酯和其二肽衍生物的至少一种氨基酸，与没有加氨基酸的培养基所产生的胚胎相比较，所加入的量足以增加所产生体细胞胚胎的数量和质量。

2. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加有 L-脯氨酸、其酰胺、烷基酯或含 L-脯氨酸的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为 6—300 mM。

3. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-丙氨酸、其酰胺、烷基酯或含 L-丙氨酸的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为 10—200 mM。

4. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-精氨酸、其酰胺、烷基酯或含 L-精氨酸的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为 3—75 mM。

5. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-谷氨酰胺、其酰胺、烷基酯或含 L-谷氨酰胺的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为 3—50 mM。

6. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少加入足够数量的 L-赖氨酸、其酰胺、烷基酯或含 L-赖氨酸的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为 1—10 mM。

7. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-天冬酰胺、其酰胺、烷基酯或含 L-天冬酰胺的二肽衍

生物，使其在培养基中的最终浓度约为  $0.5 - 10 \text{ m M}$ 。

8. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-丝氨酸、其酰胺、烷基酯或含 L-丝氨酸的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为  $0.5 - 2 \text{ m M}$ 。

9. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-鸟氨酸、其酰胺、烷基酯或含 L-鸟氨酸的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为  $1 - 3 \text{ m M}$ 。

10. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-谷氨酸、其酰胺、烷基酯或含 L-谷氨酸的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为  $15 - 40 \text{ m M}$ 。

11. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-脯氨酸或含 L-脯氨酸的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为  $1 - 200 \text{ m M}$ 。

12. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-脯氨酸甲基酯或含 L-脯氨酸甲基酯的二肽衍生物，使其在培养基中的最终浓度约为  $0.3 - 40 \text{ m M}$ 。

13. 根据权利要求 1 或 28 中任一项的培养基，其中至少以足够数量加入 L-脯氨酸-L-丙氨酸，使其在培养基中的最终浓度约为  $1 - 200 \text{ m M}$ 。

14. 一种用于诱导、再生或维持植物体细胞胚胎组织的植物细胞培养基，其特征在于该培养基基本上不含铵离子，其改进包括向培养基内加入至少一种选自 L-脯氨酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-鸟氨酸、L-赖氨酸及其酰胺、烷基酯和二肽衍生物的氨基酸，与没有作如此添加的培养基中产生的胚胎相比，所加数量足以显著地

提高所产生体细胞胚胎的数目或质量。

15. 根据权利要求14的培养基,其中至少以足够数量加入L-脯氨酸、其酰胺、烷基酯或含L-脯氨酸的二肽衍生物,使其在培养基中的最终浓度约为6—300 mM。

16. 根据权利要求14的培养基,其中至少以足够数量加入L-精氨酸、其酰胺、烷基酯或含L-脯氨酸的二肽衍生物,使其在培养基中的最终浓度约为15—100 mM。

17. 根据权利要求14的培养基,其中至少以足够数量加入L-赖氨酸、其酰胺、烷基酯或含L-赖氨酸的二肽衍生物,使其在培养基中的最终浓度约为1—10 mM。

18. 根据权利要求14的培养基,其中至少以足够数量加入L-天冬酰胺、其酰胺、烷基酯或含有L-天冬酰胺的二肽衍生物,使其在培养基中的最终浓度约为2—100 mM。

19. 根据权利要求14的培养基,其中至少以足够数量加入L-鸟氨酸、其酰胺、烷基酯或含有L-鸟氨酸的二肽衍生物,使其在培养基中的最终浓度约为0.3—3 mM。

20. 根据权利要求14的培养基,其中至少以足够数量加入L-脯氨酸酰胺或含脯氨酸酰胺的二肽衍生物,使其在培养基中的最终浓度约为1—200 mM。

21. 根据权利要求14的培养基,其中至少以足够数量加入L-脯氨酸甲基酯或含L-脯氨酸甲基酯的二肽衍生物,使其在培养基中的最终浓度约为0.3—40 mM。

22. 根据权利要求14的培养基,其中至少加入L-脯氨酸—L-丙氨酸,所加量足以使之在培养基中的最终浓度约为1—

2 0 0 m M。

2 3. 根据权利要求 1、1 4 或 2 8 中任一项的培养基，其中植物细胞培养基是选自 Schenk—Hildebrandt 培养基和 Murashige—SkooG 培养基。

2 4. 一种从培养的植物组织中通过体细胞胚胎发生生产胚胎的方法，其特征在于该方法包括在体细胞胚胎发生的诱导、再生或维持期，于权利要求 1 的培养基中培养经过诱导的植物体细胞组织；以及然后从所说的植物培养基中回收体细胞胚胎。

2 5. 一种从培养的植物组织中通过体细胞胚胎发生生产胚胎的方法，其特征在于该方法包括在体细胞胚胎发生的诱导、再生或维持期，于权利要求 1 4 的培养基中培养经过诱导的植物体细胞组织；以及然后从所说的植物培养基中回收体细胞胚胎。

2 6. 根据权利要求 1 的培养基，其中铵离子源是选自一组包括氯化铵、硝酸铵、碳酸铵、硫酸铵、磷酸铵和柠檬酸铵中的至少一种物质。

2 7. 根据权利要求 1 的培养基，其中提供的铵离子源的量足以使之在培养基中的最终浓度达到约为 0. 5—5 0 m M。

2 8. 一种用于诱导、再生或维持植物体细胞胚胎组织的植物细胞培养基，其特征在于该培养基基本上没有铵离子，其改进包括向培养基内加入 L—谷氨酰胺及选自 L—脯氨酸、L—丙氨酸、L—精氨酸、L—天冬酰胺、L—丝氨酸、L—鸟氨酸、L—谷氨酸、及其酰胺、烷基酯和二肽衍生物中的至少一种氨基酸，与没有作如此添加的培养基中产生的胚胎比较，所加量足以提高所产生之体细胞胚胎的数目和质量。

29. 根据权利要求28的培养基,其中所提供的L-谷氨酰胺的量足以使其在培养基中达到大约10—50mM的最终浓度。

30. 一种通过体细胞胚胎发生从培养的植物组织中生产胚胎的方法,其特征在于该方法包括在体细胞胚胎发生的诱导、再生或维持期,于权利要求28的培养基中培养经过诱导的植物体细胞组织;以及然后从所说的植物培养基中回收体细胞胚胎。

31. 根据权利要求24、25或30中任一项的方法,其中植物体细胞组织是选自紫花苜蓿 (Medicago Sativa L.), 芹菜 (Apium graveolens L.), 陆地棉 (Gossypium hirsutum), 克劳次基棉 (Gossypium Klotzschianum), 玉米 (Zea mays L) 和陆稻 (Oryza sativa) 中的至少一种植物。

用于提高体细胞胚胎发生的改良方法和培养基

本发明是 1983 年 5 月 19 日递交的 496186 号申请的后续部分。

一般地说，本发明涉及胚胎植物细胞和组织的培养，更具体地说，本发明涉及特别适于维持由离体诱导体细胞组织产生之胚胎的改良培养基以及使用该培养基的方法。

人们知道，遗传工程的最新进展使得植物育种者能够避免传统育种技术中固有的作物改良中的耗时太长的问題。然而，因为单细胞和多细胞生物需要以不同的方法去改变全部遗传信息，所以，应用这些技术仍有困难。对于微生物，一种尝试就是在细胞水平上去影响改变，并有把握通过连续的细胞传代使之扩增。

对于多细胞生物来说，如植物，在细胞水平上进行遗传操作是较为有利的，然后使之再生并培养成表达新特性的成熟植物。可通过质粒插入以提供特异改变，或通过原生质体融合以进行大批的遗传操作，将外来遗传物质掺入宿主细胞内。使用传统的植物育种技术，用成熟植物作进一步的遗传操作可向具有农业意义的品种掺入新的特性。

[ Allard, R W, Principles of Plant Breeding, John Wiley and Sons, New York, 1960; Simmons, N. W., Principles of Crop Improvement, Langman Group Ltd. London, 1972 ]。

离体培养植物细胞和组织，须将培养物保持在培养基内，由培养基提供营养并维持存活力。常用组织培养基的例子已有过文献评述

[见 Huang, L 和 T. Murashige, " Plant Tissue Culture Media, Major Constituents, their Preparation, and Some applications ", Tissue Culture Association Manual 3 : 539~548, Tissue Culture Association, Rockville, M D, 1977 及 de Fossard, R A, Tissue Culture for Plant Propagators, University of New England Printery, Armidale, N S W, Australia, 1976 ]。

这种培养物维持性能可在植物器官、组织或细胞培养物中得到促进。

在体细胞胚胎发生培养中，一般是诱导植物体细胞在营养培养基上产生反复的细胞分裂，产生无定形细胞团块，即所谓的愈伤组织。此愈伤组织可经过再次培养以达到大量增殖。也可诱导愈伤组织分化，以产生成熟植物的分化的组织和器官。还可在培养物中由其它的已有胚胎形成体细胞胚胎。亲代胚胎可以是包括未成熟的球状阶段至成熟的、发芽胚胎 [见 Lupotto, E, " Propagation of an embryonic Culture of Medicago Sativa L ", Zeit, Pflanzenphysiol. 111: 95—104, 1983 ]。因此，体细胞胚胎可由未分化的愈伤组织或植物组织培养物中已有的胚胎产生。

以这种方法，可在细胞或胚胎水平上影响遗传政变，然后通过继后的发育保留之，以产生具有同一遗传特征的整体作物。这就使得植物育种者能绕过植物繁殖中的正常遗传屏障，并获得更为均一和有利的农田作物。

使用当前的技术，有可能利用体细胞胚胎发生的方法由一克细胞

产生出数千株植物。〔 Evans , D . A . , W . R . Sharp, and C . E . Flick , " Growth and behavior of cell Cultures ; embryo Genesis and Organogenesis ", in Plant Tissue Culture — 1981 , T . A . Thorpe ed . , Academic Press , 45—113 , 1981 〕。这些胚胎可以发芽并转移到温室或农田内，并发育成成熟植物。植物育种者可使用这些植物回收有用的遗传变异，或为植物育种程序通过克隆法增殖品种。

某些测定通过植物体细胞部分培养所得胚胎组织的质量和数量的技术是已知的。可通过测定与胚胎的发育阶段有关结构的产率，来检测体细胞胚胎的数量〔见 Fujimura , T . , 和 A . Komamine , " Synchronization of Somatic embryo Genesis in a Carrot Cell Suspension Culture ", Plant Physiology , 64 : 162—164 , 1979 ; Verma , D . C . 和 D . K . Dougall , " Influence of Carbohydrates on quantitative aspects of Growth and embryo Formation in Wild Carrot Suspension Cultures ", Plant Physiology , 59 : 31—35 , 1977 〕。这一测定一般是使用解剖显微镜对结构进行计数而完成的。

可用多种方法来估计体细胞胚胎的质量。典型的是用目测观察球形期、鱼雷期和小植株期来确定胚胎发育。〔 Ammirato , P . V . " The effects of abscisic acid on the development of Somatic embryos from Cells of

Caraway ( *Carum Carri L.* ) ”, *Botanical Gazette* , 135 : 328 — 337 , 1974 ]。也可根据得自单个体细胞胚胎的小植株的产率确定胚胎发育或质量。 [ Drew , R . L . W . , “ The development of Carrot ( *Daucus Carota L.* ) embryoids ( derived from Cell Suspension Culture ) into Plantlets on a Sugar—free basal medium ”, *Horticultural Research* 19 : 79 , 1979 ]。尽管小植株形成的测定对于确定适于农田使用的胚胎的产率很为重要, 但人们很难检测到小植株的形成。

改善胚胎数量或产率的技术已有过描述。例如, 已知体细胞胚胎的形成需要在培养基中有一种铵源, 这样才能有胚胎发生。 [ Halperin , W . 和 D . F . Wetherell , “ Ammonium requirement for embryogenesis in vitro ”, *Nature* 205 : 519 — 520 , 1965; Walker , K . A . S . J . Sato , “ Morphogenesis in Callus tissue of *Medicago Sativa* ; the role of ammonium ion in Somatic embryogenesis ”, *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1 : 109 — 121 , 1981 ]。因为大多数植物细胞培养基均含有一定量的铵, 故认为将铵浓度调整至一个有高胚胎产率和质量的适当水平是很重要的。 [ 见 Walker 和 Sato 的上述文献, 以及 Wetherell , D . F . 和 D . K . Dougall , “ Sources of nitrogen Supporting growth and embryogenesis in

Cultured Wild Carrot tissue ", *Physiologia Plantarum* 37: 97—103, 1976 ]。

在植物细胞培养物和成熟的植物中，铵和谷氨酰胺或谷氨酸可迅速地被细胞互相转化。〔见 Ojima, K 和 K. Ohira, " Nutritional requirements of callus and Cell Suspension Cultures ", 自 *Frontiers of Plant Tissue Culture — 1978*, T. A. Thorpe ed., University of Calgary Offset Printing Services, 265—275, 1978; Mißlin, B. J. 和 P. L. Lea, " Ammonium assimilation ", 自 *The Biochemistry of Plants*, P. Stumpf 和 E. Gonnard., Academic Press, Vol. 6, 169—201, 1980; Dougall, D. K., " Current Problems in the regulation of nitrogen metabolism in Plant Cell Cultures ", 自 *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, W. Bara, E. Reinhard 和 M. H. Zenk eds., Springer-Verlag, Berlin, 76—81, 1977 ]。

所设想的铵在植物代谢中与谷氨酰胺和谷氨酸的接近，是从氨基酸对体细胞胚胎发生之影响的系统研究方案中反映出来的。研究是使用已从植物细胞培养基中除去了铵的胡萝卜细胞进行的，并试验单一氨基酸对细胞胚胎发生的影响。〔见 Wetherell 和 Dougall 的前述文章; Kamada, H. 和 H. Harada, " Studies on the Organogenesis in Carrot tissue Cultures I.

Effects of amino acids and inorganic nitrogenous Compounds on Somatic embryogenesis", Zeit. Pflanzenphysiologie 91: 453—463, 1979]。Wetherell 和 Dougall 发现,与加铵离子比较,加氨基酸并不能改善胚胎发生。另一方面, Kamada 和 Harada 则发现,在没有铵或没有铵及硝酸盐的情况下,丙氨酸和谷氨酰胺很好地起到为胚胎发生提供还原氮源的作用。一份报告认为,加入的氨基酸浓度为 20 mM 或更高时是不利的。〔见 Reinert, J. 和 M. Tazawa, "Wirkung von Stickstoffverbindungen und von Auxin auf die Embryogenese in Gewebekulturen", Planta, 87: 239, 1969〕(原文为德文)。

上述研究表明,在还原氮源,如铵和氨基酸之间存在着一种等价关系。〔Wetherell 和 Dougall, 上述文章; Kamada 和 Harada, 上述文章〕。Tazawa, M. 和 Reinert, J. 的研究进一步显示了铵和氨基酸间的代谢等价关系〔Tazawa, M. 和 Reinert, J., "Extracellular and intracellular Chemical environments in relation to embryogenesis in vitro", Protoplasma 69: 157—173, 1969〕。在一项进行体细胞胚胎发生的胡萝卜培养物中固有铵水平的研究中,发现不管培养物中是否加铵、氨基酸或硝酸盐,培养物中铵的水平总是与胚胎发生的量相互关联的。结论是  $\text{NH}_4^+$  的固有水平为刺激体细胞胚胎发生的关键因子。 $\text{NH}_4^+$  的内在水平得自外界提供的  $\text{NH}_4^+$  或氨基酸,或者是经生物学还原硝酸

盐得到的  $\text{NH}_4^+$ 。内在的  $\text{NH}_4^+$  可被转化为有机氮化合物，以提供正常细胞所需要的氨基酸〔见 Tazawa 和 Reinert 的上述文献〕。因此确信氨基酸是通过释放铵起作用的，用于刺激胚胎发生。

已知道的可改善胚胎发育的因子有脱落酸、玉米素、赤霉素、高浓度蔗糖和光。〔见 Ammirato, P. V. 和 F. C. Steward, "Some effects of environment on the development of embryos from Cultured free Cells", Botanical Gazette, 132: 149—158, 1971; Ammirato, P. V., "Hormonal Control of Somatic embryo development from Cultured Cells of Caraway, Interactions of abscisic acid, Zeatin and gibberellic acid", Plant Physiology 59: 579—586, 1977〕。铵和氨基酸对胚胎质量的影响尚不清楚。〔Ammirato, P. V., "The regulation of Somatic embryo development in Plant Cell Cultures: Suspension Culture techniques and hormone requirements", Bio/Technology 1: 68—74, 1983〕。

另外，转化频率—作为胚胎质量的一种检定—迄今为止尚不明瞭，并未用于系统地改善胚胎发育。已通过观察胚胎形态来检定胚胎的成熟情况，但这种方法并不能检知单个胚胎形成植物的频率。

为此，本发明的一个目的是提供增加由植物组织产生之体细胞胚胎的数量和质量的方法及材料。

本发明的另一个目的是为体细胞胚胎发生提供最适宜的还原氮源。

本发明的另一个目的是提供通过体细胞胚胎发生大量增殖多种植物的方法和材料。

本发明的再一个目的是提供产生具有同一遗传和表型特征的大量可存活体细胞胚胎的方法和材料。

本发明的其它目的、优点和特征将从以下的描述和相应实施例中看出。

本发明提供了通过加入最适量的氨基酸和还原氮源，由植物组织产生大量高质量体细胞胚胎的新的和改良的方法及材料。本发明的一个方面是提供一种植物细胞培养基，它包含一种具有铵离子源的基质，还加有至少一种选自脯氨酸、丙氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、丝氨酸、鸟氨酸、谷氨酸及其酰胺、烷基酯及其二肽衍生物的氨基酸，所加数量与培养基中不加上述物质时产生的胚胎相比，足够增加所产生之体细胞胚胎的数目和质量。

本发明的另一个方面是提供一种基本上没有铵离子的植物细胞培养基，但其中包括以足够数量加入的至少一种选自脯氨酸、精氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸、赖氨酸及其酰胺、烷基酯及其二肽衍生物的氨基酸，与培养基中不加上述物质的情况比较，可显著提高所产生体细胞胚胎的数量和质量。

另外，本发明还提供了使用该培养基的方法。

单张附图是图解表示作为向培养基内所加氨基酸浓度的函数，所产生之体细胞胚胎数目的增加。

本发明提供增加由植物体组织产生的胚胎的数量和质量的方法，这些方法提供了一种培养所述细胞和组织的培养基，它含有足够数量的经选择的氨基酸，以刺激体细胞的胚胎发生。

本发明还通过提供一种含有足够数量经选择的氨基酸并加有铵离子源的培养这类细胞和组织的培养基，以刺激体细胞胚胎的数量和质量提高。同时提供了一种使用这种植物组织培养基的方法。

虽然前面已确信氨基酸可作为所需要的铵培养基成分的简单等价物，但令人惊异地发现氨基酸以铵的相同浓度使用时，可作为提高体细胞胚胎生成的铵离子的替代物。还惊异地发现经选择的氨基酸连同加入的铵离子源可提供显著增加的益处，而这一点并不能简单地从增加铵离子浓度的添加效应预测到。

已找到了一种含有选自脯氨酸、精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸及这些氨基酸的酰胺、烷基酯及这些氨基酸的二肽衍生物的培养基，该培养基基本上没有铵离子，可用于提高从体细胞组织培养物得到的体细胞胚胎的数量和质量。

还发现一种含有铵离子和选自脯氨酸、丙氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、鸟氨酸、谷氨酸和这些氨基酸的酰胺、烷基酯及这些氨基酸的二肽衍生物的培养基，所加入物质的数量足以刺激胚胎发生或细胞转化，此培养基可产生相似的胚胎增益效应。

已令人惊异地发现，本发明的培养基可增加从愈伤组织得到的体细胞胚胎的产率，优于此前用于诱导、再生和维持胚胎组织的典型培养基。在这些胚胎发生过程的每个阶段，使用本发明的培养基能比使用以前提供的培养基获得大得多的胚胎组织产率。此外，在各种有用植物品种—包括苜蓿、芹菜、棉花、玉米和水稻的应用实践中，证明本发明的培养基具有多方面的优点。

可通过本发明的实践加以改良的植物细胞培养基，包括如 Huang, L. 和 T. Murashige 评述过的以前已知的植物组织

培养基(前述文献和 Cloning agricultural Plants Via in Vitro techniques, B. V. Conger ed., CRC Press, 172, 其公开的内容和配方均列为本文参考文献)。一般说来,植物培养基提供植物营养、能源(如糖)、植物激素和用于控制水溶液 PH 和渗透平衡的缓冲盐类。

这类植物细胞培养基中有代表性的是所谓 Schenk 和 Hildebrandt (SH) 培养基(见 Schenk, R. U. 和 A. C. Hildebrandt, "Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous Plant Cell Cultures", Can. J. Bot. 50: 199, 1972; 其所公开的内容和配方均列文本参考文献)。下文所述的无激素 SH 培养基即该文所公开的包含主要盐类、维生素和蔗糖,但没有 2, 4-D, pCPA 和激动素的培养基。

另有所谓的 Murashige 和 Skoog (MS) 培养基可用以代替 SH 培养基(见 Murashige, T. 和 F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays With Tobacco tissue Culture", Physiologia Planta, 15: 473-497, 1962; 文中所公开的内容和配方均列为本文参考文献)。下文所述的无激素 MS 培养基即该文所公开的包含主要盐类、维生素和蔗糖,但不含吲哚-3-乙酸和激动素的培养基。

在本发明的实践中,对所用基本植物细胞培养基的选择,部分是由所选用的植物体细胞组织的种属决定的,并认为这是在植物细胞的

组织培养和体胚胎发生实践中一个有经验的普通技术人员所熟知的。

大量重要作物和园艺品种都表明可通过组织培养和体细胞胚胎发生使之增殖。这些品种包括但不仅限于以下：

表 1

<u>蔬菜作物</u>	<u>水果和坚果树</u>
苜蓿	巴旦杏
芦笋	苹果
甜菜	香蕉
汤菜	咖啡
胡萝卜	海枣
花椰菜	葡萄油
茄子	柠檬
洋葱	橄榄
菠菜	桔子
白薯	桃
番茄	<u>球茎</u>
<u>水果和浆果</u>	百合
黑莓	黄花菜
葡萄	复活节百合
菠萝	风信子
草莓	<u>花</u>
<u>营养叶</u>	非洲紫罗兰
Silver Vase	花烛属
秋海棠	菊属

Crytanthus

花叶万年青属

龙血树属

eiddleleaf

Pointsettia

Weeping fig

橡胶植物

蕨类植物

澳大利亚灰白水龙骨

波士顿蕨

掌叶铁线蕨

rabbitsfoot fern

石松

刀形蕨

谷类

大麦

玉米

小米

狼尾草属

小麦

扶郎花属

六岩桐属

矮牵牛属

玫瑰

兰科植物

药用植物

癞茄属

人参

除虫菊属

造林植物 ( 林业 )

黄杉属

松树

颤杨

红杉

橡胶树

更为详尽的能进行体细胞胚胎发生的植物品种可参见 Evans ,  
D . A . 等人: " Growth and Behavior of Cell  
Cultures : Embryogenesis and Organogenesis ",  
自 Plant Tissue Culture : Methods and

Applications in Agriculture, Thorpe 编  
Academic Press 出版, 45页(1981); 其相关部分列为  
本文参考文献。

许多氨基酸就是已有技术中已知的,它们中除了个别以外都具有一个共同特点,即有一个游离羧基和在 $\alpha$ -碳原子上有一个未被取代的氨基。脯氨酸是一个很显著的例外,因为脯氨酸的 $\alpha$ -氨基被取代,所以它实际上是 $\alpha$ -亚氨基酸。

氨基酸一般可分为蛋白质和非蛋白质氨基酸,其中蛋白质氨基酸包括20种最常见的氨基酸。这些氨基酸又包括四个亚组:具有非极性疏水取代基的,包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和蛋氨酸;具有不带电极性R基因的氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸及可能还有甘氨酸;具有带负电荷R基因的氨基酸,包括天冬氨酸和谷氨酸;以及具有带正电荷R基因的氨基酸,包括精氨酸、赖氨酸及可能还有组氨酸。

除了20种常见氨基酸外,还有许多其它在蛋白质中很少出现或完全没有的氨基酸。羟赖氨酸和羟脯氨酸很少见,并仅存于纤维蛋白中。另外,已知有150种以上的其它氨基酸以游离或结合的形式存在于不同细胞和组织中,其中包括最常见的瓜氨酸和鸟氨酸,以及许多 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\Delta$ 形式的常见氨基酸。

除了以上讨论的基本氨基酸结构外,还可以多种方式修饰氨基酸而不改变它在本发明中所具有的功能。这些修饰方法包括分别加入氨基和羧基,形成氨基酸酰胺和氨基酸烷基酯。此外,可通过 $\alpha$ -羧基和 $\alpha$ -氨基联接两个氨基酸形成氨基酸的二肽衍生物。很容易理解到,每一对氨基酸都具有两种可能的二肽衍生物。

对于本发明也很重要。为本发明之含氨基酸的培养基补充铵离子 ( $\text{NH}_4^+$ ) 源。铵离子源也是植物组织培养领域中已知的。这样的铵离子通常是通过在培养基内加入一定数量的非毒性铵盐提供的，它与平衡铵离子电荷的阴离子形成如氯化铵、磷酸铵或硫酸铵等。

Walker, K. A. 和 S. J. Sato 在 "Plant Cell Tissue Organ Culture" (1: 109—121, 1981) 一文 (该文有关部分被列为本文参考文献) 中介绍了其它一些铵离子源。

提供下列实施例旨在进一步阐明本发明的各个方面。这些实施例并不是对本发明范围的限定，即并不限定本申请待批准的权利要求。

一般说来，用植物细胞和组织培养物产生体细胞胚胎发生的方法是已知的。只须稍加改变即可适用于选定的植物品种。(例如见 Plant Tissue Culture; Methods and Applications ... in Agriculture, Thorpe 编, (1981); 该文相关部分列为本文参考文献)。

例如苜蓿，在 Saunders 和 Bingham 的 Regen S 品系中可通过常规方法诱导胚胎发生 (见 "Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue", Crop Sci., 12: 804—808, 1972)。

利用紫花苜蓿 (Medicago Sativa) 的栽培品种 Regen S，它是从 Vernal 和 Saranac 品种杂交的第二周期重复选择中得到的。愈伤组织的产生按下述方法进行：用 50% Clorox<sup>R</sup> 对叶柄表面灭菌 5 分钟，用水洗涤并涂布于无激素的 SH 培养平板上，该培养基含有 Schenk — Hildebrandt 培养基 (Schenk, R.

U. 和 A. O. Hildebrandt, 文献同上, (1972) 所含的盐类, 维生素及蔗糖。该培养基含有  $25 \mu\text{M}$   $\alpha$ -亚萘基乙酸、 $10 \mu\text{M}$  激动素和  $0.8\%$  (W/V) 琼脂 (称为维持培养基)。从仍未愈伤化的植物离体组织上分离出在上面形成的愈伤组织, 并在维持培养基上反复培养。愈伤组织以 3 周间隔培养, 并使之于  $27^\circ\text{C}$  在间接光照下生长。

于再培养后 17—24 天, 从维持培养基的平板上收集 3—9 克愈伤组织, 并转移至含有  $50 \mu\text{M}$  2, 4-二氯苯氧基乙酸 (2, 4-D) 和  $5 \mu\text{M}$  激动素 (B) 的  $100 \text{ ml}$  SH 溶液内进行诱导。(见 Walker, X. A. M., L. Wendeln, 和 E. O. Jaworski, *Plant Sci Lett.* 16: 23—30 (1979), 将愈伤组织置于  $100 \text{ ml}$  摇瓶内于  $27^\circ\text{C}$  下培养 3 天, 培养是在间接光照下, 在 100 转/分, P. M. 的轨道震动器上进行的。

于轻度真空下, 在系列柱筛 (Fisher Scientific 公司) 和无菌条件下筛分被诱导的细胞。细胞块通过不锈钢筛沉降或被挤过 35 目 ( $480 \mu\text{m}$ ) 并被收集在 60 目 ( $230 \mu\text{m}$ ) 筛网上。用 SH 无激素培养液洗涤留在 60 目筛网上的细胞, 每  $100 \text{ ml}$  诱导培养液用  $500 \text{ ml}$  洗涤。真空除去洗涤培养液。称量细胞块的湿重并将细胞悬浮于无激素的 SH 培养基内, 每毫升悬浮 150 毫克湿重的细胞。将  $75 \text{ mg}$  ( $0.5 \text{ ml}$ ) 的悬浮细胞吸至  $60 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$  培养皿中的大约  $10 \text{ ml}$  琼脂固体培养基上。

另外, 如将  $300 \text{ mg}$  ( $2 \text{ ml}$ ) 再悬浮细胞移入装在  $50 \text{ ml}$  锥形瓶内的  $8 \text{ ml}$  无激素的 SH 液体培养基中, 在悬浮培养物中将出现体细胞胚胎发生。胚胎发生培养基含有 SH 培养基 ( $\text{NH}_4^+$  等于

2.6 mM), 还含有3% (W/V) 蔗糖, 没有激素。无铵离子培养基是以等量的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  代替 SH 中的  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4^+$  制成的。

2.5 mM  $\text{NH}_4^+$  对照培养基由无铵培养基附加 12.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  组成。通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜将所有有机和无机还原氮源除菌, 然后加至新近高压灭菌过的培养基内。

每种处理一般用 10 个重复平板进行培养。圆盘用保护膜包装并保温 21 天。悬浮液瓶用塑料泡沫塞住并用 Saran Wrap<sup>®</sup> 封口, 在 100 rpm 的轨道震动器上保温 14 天。保温于 27°C 12 小时光照下进行, 光源为冷白荧光灯管, 固体培养物与光源距离为 280 cm, 悬浮培养物距光源为 2000 cm。

保温后, 用放大 10 倍的立体显微镜计数愈伤组织上的绿色中心, 以检测胚胎发生。用放大 10 倍的标定目测尺测量胚胎大小。用目测观察以确定胚胎形状。在初始培养的第 21 天将胚胎由氨基酸处理培养基在无菌条件下移入加有 25  $\mu\text{M}$  赤霉素和 0.25  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -亚萘基乙酸并用 0.8% 琼脂固化的半强度无激素的 SH 培养基内, 以使胚胎转化为有根和萌芽轴 (第一初级叶) 的完整植物。

### 1. 在含铵培养基中的体细胞胚胎的发生

#### A. 豆科植物的体细胞培养。

按上面概述的方法培养豆科的代表性植物——苜蓿组织, (紫花苜蓿, Regen S 品种), 并根据本发明在含有 2.6 mM 铵的培养基中检验体细胞发生。所有蛋白质氨基酸的试验浓度为 1—100 mM。从此初始筛分过程中出现两种反应类型, 基于这些结果, 进一步用筛分的细胞进行试验。表 2 为不包括第一反应类型的氨基酸, 发现这些氨基酸与 SH—对照培养基 (2.6 mM  $\text{NH}_4^+$ ) 比较对生长有

毒性并抑制胚胎发生。这些氨基包含硫和芳香环的，并且大多是分枝链族的。这些氨基酸与 S H 对照培养基比较，均不刺激胚胎发生，并且都是有毒的，它们的浓度为 1 或 10 mM 时都抑制生长或引起愈伤组织的褐化。

与 S H 对照比较，初始筛选的第二反应型可刺激胚胎发生或致使胚胎增大（参见表 2）。对这些氨基酸作了详细的浓度依赖性研究，结果示于图 1 中。刺激体细胞胚胎形成的氨基酸中最有效的是脯氨酸，比 2.6 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 对照产生约多 3 倍的胚胎，而效力是 2.5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>——苜蓿（D）中最适铵浓度的两倍。（见 Walker 等人的上述文献）。丙氨酸、精氨酸、谷氨酰胺和赖氨酸的效力较小，但它们刺激胚胎形成接近 2.5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的水平，丝氨酸和天冬酰胺与 S H 对照比较，其刺激胚胎发生的作用较差，但可增大胚胎体积。

表 2 概括了已发现对苜蓿体细胞胚胎发生有刺激作用的氨基酸和其它氮源。值得注意的是，脯氨酸的酯和酰胺形成，如二肽脯氨酸丙氨酸一样，在刺激胚胎数目和提高质量方面具有很高的活性。有趣的是发现非蛋白氨基酸——鸟氨酸具有活性。

表 2

还原氮源对苜蓿体细胞胚胎发生的影响

刺激源

铵

脯氨酸

丙氨酸

谷氨酰胺

精氨酸

天冬酰胺

鸟氨酸

丝氨酸

赖氨酸

L-脯氨酸

L-脯氨酸-L-丙氨酸

L-脯氨酸甲基酯

使用上述技术，用目测观察胚胎大小以检测胚胎质量。数据列于表3中。

表3 还原氮处理对体细胞胚胎大小的影响

处理	长度	宽度
对照 ( 25mMNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0. 805±0. 084	0. 383±0. 019
100mM L-脯氨酸	1. 143±0. 081	0. 867±0. 046
30mM L-丙氨酸	1. 163±0. 090	0. 744±0. 037
100mM L-丙氨酸	1. 192±0. 102	0. 833±0. 049
30mM L-精氨酸	1. 521±0. 142	0. 663±0. 048
30mM L-谷氨酰胺	1. 342±0. 122	0. 773±0. 051
3mM L-赖氨酸	1. 163±0. 096	0. 652±0. 039
3mM L-天冬酰胺	0. 699±0. 062	0. 446±0. 027
10mM L-天冬酰胺	1. 239±0. 102	0. 610±0. 034

根据表 2 和表 3 中给出的数据，氨基酸添加物在增加胚胎体积中的效力可按下列顺序排列：

精氨酸  $\geq$  谷氨酰胺  $>$  丙氨酸  $>$  脯氨酸  $>$   $\text{NH}_4^+$ 。

使用上述技术，观察了胚胎向带有根及萌芽轴（第一初级叶）之完整植株的转化，并将结果列表如下：

表 4 体细胞胚胎向首蓆小植株的转化

初始处理	有第一初级叶的植株百分数
25mM $\text{NH}_4^+$	33.3% $\pm$ 4.2
100mM L-脯氨酸	54.0% $\pm$ 6.4
50mM L-丙氨酸	63.5% $\pm$ 4.4
30mM L-精氨酸	59.0% $\pm$ 6.2
30mM L-谷氨酰胺	67.0% $\pm$ 3.4

根据表 4 的数据，影响胚胎向小植株转化的添加物的效力顺序是：

谷氨酰胺  $>$  丙氨酸  $\geq$  精氨酸  $>$  脯氨酸  $>$   $\text{NH}_4^+$

这些数据间的相互关系表明，胚胎体积是胚胎向小植株转化的一个良好标志，因此也是上述技术产生的胚胎质量的一个良好标志。

测定了刺激琼脂固体培养物和液体悬浮培养物中体细胞胚胎发生的氨基酸的最适加入量。这些数据在下列表 5 和表 6 中给出：

表 5 向具有 2.6 mM  $\text{NH}_4^+$  的琼脂固体培养物加入氨基酸对首蓆体细胞胚胎发生的刺激作用

来源	%最大刺激	浓度范围 (mM)	最适浓度 (mM)
对照 (2.6mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	100	—	—
L-脯氨酸	330	10—300	(100)
L-丙氨酸	314	20—150	(75—100)
L-谷氨酰胺	175	20—50	(30—40)
L-精氨酸	244	5—50	(30—40)
L-天冬酰胺	155	0.5—3	(1)
L-鸟氨酸	156	1—3	(1—3)
L-丝氨酸	160	0.5—2	(1)
L-赖氨酸	233	1—10	(3)
L-脯氨酰胺	240	30—200	(50—100)
L-脯氨酸甲基酯	241	5—25	(10)
L-脯氨酰—L-丙氨酸	210	30—200	(50—100)

表6 向具有 2.6 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 液体悬浮培养物中加入氨基酸对体细胞胚胎发生的刺激作用

来源	%最大刺激	浓度范围(mM)	最适浓度(mM)
对照(2.6mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	100		
L-脯氨酸	528	100—300	(100)
L-丙氨酸	240	25—200	(50)
L-谷氨酰胺	243	5—75	(50)
L-精氨酸	168	5—75	(50)
L-赖氨酸	180	1—10	(3)

## B. 伞形科植物的体细胞培养

使伞形科的代表性植物—芹菜 (Apium graveolens, Calmario 品种) 的种子萌发 1—2 周。用 10% Chlorox<sup>®</sup> 的溶液将所得籽苗灭菌 20 分钟。除去子叶或胚轴, 将其置于含有  $2.5 \mu\text{M}$  2, 4-D 和  $5 \mu\text{M}$  苜基腺嘌呤的 0.8% 琼脂固化的无激素 SH 培养基上。出现愈伤组织后 (3—4 周), 将愈伤组织移入含  $2.5 \mu\text{M}$  2, 4-D 和  $0.5 \mu\text{M}$  激动素的 SH 培养基内。用滤器将热不稳定性添加物除菌并加入热培养基内。如需要时, 可用改良的括抹装置取得用于接种的特定量的组织并将其充填至均一体积。随后在加有  $1 \mu\text{M}$  毒莠定 (Picloram) 和  $0.5 \mu\text{M}$  苜基腺嘌呤的 SH 培养基上再培养愈伤组织。为进行体细胞胚胎生产, 将 75 mg 愈伤组织细胞移入含有经过滤膜除菌的添加物的 0.8% 琼脂固化的无激素 SH 培养基内, 并在培养苜宿体细胞的同样条件下,  $24^\circ\text{C}$  保温 18 到 30 天。

比较了脯氨酸、丙氨酸和谷氨酰胺等氨基酸处理的胚胎与  $\text{NH}_4^+$  对照处理的胚胎。用 50 mM 丙氨酸处理培养物导致比所有其它处理方法有更高的胚胎发生频率, 而且比其它方法处理的培养物有更好的子叶、根和初级叶发育。观察到所形成的总胚胎数的顺序如下:

$20-100 \text{ mM}$  丙氨酸  $>$   $50 \text{ mM}$  脯氨酸  $>$   $25 \text{ mM}$

谷氨酰胺—N  $>$   $25 \text{ mM}$   $\text{NH}_4^+$

虽然用脯氨酸刺激胚胎发生比用谷氨酰胺更好, 但后者可导致更好的籽苗样胚胎的发育。铵处理的培养物比所有其它的处理发育得较小而且胚胎数较少。谷氨酸以 30 mM 的量单独加入芹菜再生培养基内时, 与  $25 \text{ mM}$   $\text{NH}_4^+$  处理的材料相比较, 它可刺激芹菜胚胎数目的

增加。与  $\text{NH}_4^+$  处理的胚胎比较，上述浓度的丙氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺和谷氨酸可促进胚胎向小植株的转化。

### C. 禾本科植物的体细胞培养

使用本发明的培养基，进行禾本科的代表性植物—玉米 (Zea mays) 的体细胞胚胎发生。

受精十天后收获玉米的穗并在无菌条件下从中解剖出未成熟的胚胎。将胚胎置于加有 3% 蔗糖和  $5 \mu\text{M}$  2, 4-D 的 N-6 矿质盐培养基 (Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther Culture of rice through Comparative experiments on the nitrogen Sources Sci. Sin. 16: 659—688) 上保温 21 天。保温后检定有或没有 L-脯氨酸时每个愈伤组织上形成的胚胎团的数目。结果在表 7 中给出，其中百分反应是 287—1165 个重复胚胎分离块的胚胎形成的平均频数。

表 7 L-脯氨酸对玉米胚胎愈伤组织形成的影响

脯氨酸浓度 (mM)	% 胚胎愈伤组织形成
0	15.8
6	20.6
12	20.8
24	20.2

作为涉及禾本科植物体细胞胚胎发生的进一步的实例，是依据本发明的实践增殖水稻品种陆稻 (Oryza Sativa)。

使陆稻 (Oryza Sativa) 种子去壳, 进行表面消毒并置于加有 4% 蔗糖、0.26 mM 色氨酸、5  $\mu$ M 2, 4-D、1  $\mu$ M 激动素、pH 6.2, 并加有 2.5 克/升 Gelrite 作为凝胶形成剂的 Murashige 和 Skoog (MS) 盐类培养基上 (Murashige, T. 和 F. Skoog, 1962, 见上)。15—21 天后用解剖显微镜检测单个种子的胚轴区上的胚胎形成。表 8 给出了用和不用 L-脯氨酸处理的结果。

表 8 L-脯氨酸对水稻愈伤组织培养物中胚胎形成的影响

脯氨酸浓度 (mM)	% 胚胎形成
0	57.8
3	59.0
10	77.8
30	64.9
50	70.1
100	68.4

#### D. 锦葵科植物的体细胞培养

作为本发明对锦葵科植物体细胞组织的培养实践的一个例子, 在依据本发明所公开的方法制备的培养基中, 繁殖了两个棉花品种的培养物。

陆地棉 (Gossypium hirsutum)。在加有 3% 蔗糖和 0.5  $\mu$ M NAA、5  $\mu$ M 2-异戊基腺嘌呤及 0.8% 琼脂的 Murashige 和 Skoog 盐类培养基上, 将由陆地棉 (Gossypium

hirsutum ) 经表面灭菌的种子起始的培养物再培养 4 周。培养物在含有  $0.5 \mu\text{M}$  2, 4-D 和  $0.2 \mu\text{M}$  激动素或  $1 \mu\text{M}$  NAA 和  $0.5 \mu\text{M}$  激动素的液体悬浮培养基上 (其中加或不加脯氨酸) 诱导 10 天以形成胚胎。然后将细胞移入含 3% 蔗糖和  $10 \text{mM}$  L-谷氨酰胺的无激素 SH 培养基内使之再生。四周后检测带有成熟子叶之胚胎的形成。结果在表 9 中给出。

表 9 在悬浮培养中加脯氨酸对棉花子叶 (Gossypium hirsutum) 胚胎再生的影响

脯氨酸浓度 (mM)	带子叶胚胎
0	5.5
24	12.5

克劳次基棉 (Gossypium Klotzschianum)。在含 3% 蔗糖、 $0.5 \mu\text{M}$  NAA 和  $5 \mu\text{M}$  2-异戊基腺嘌呤的 Murashige 和 Skoog 盐类培养基上再培养由表面灭菌过的种子起始的培养物。将愈伤组织在含 3% 蔗糖和  $0.2 \mu\text{M}$  毒莠定的 MS 盐类培养基中悬浮 10 天, 然后使之在加有 L-谷氨酰胺的无激素培养基上再生 21 天。结果在表 10 中给出。

表 10 L-谷氨酰胺对克劳次基棉 (Gossypium Klotzschianum) 胚胎形成的影响

L—谷氨酰胺浓度 ( m M )	子叶胚胎
5	0
10	2. 0
20	3. 5

## 2. 氨基酸与铵离子源的相互作用

按上述实验方法诱导细胞、进行筛分和平板培养。改变脯氨酸、精氨酸和  $\text{N H}_4^+$  的浓度，以确定其它添加物存在是否影响单独加入任何添加物时的最适浓度。

1. 脯氨酸：试验的脯氨酸浓度范围为 3 0 m M 至 3 0 0 m M，此时所加  $\text{N H}_4^+$  的量变化范围是 0 至 2 5 m M。试验结果在表 1 1 中给出。

2. 精氨酸：为相似实验，其中除加入培养基的  $\text{N H}_4^+$  浓度变化外，精氨酸的浓度也是变化的。结果在表 1 1 中给出。

表 1 1 苜蓿胚胎发生中氨基酸与铵离子相互作用的影响 ( 至少七次试验所产生的胚胎的平均数 )

脯氨酸浓度 ( m M )	3 0	1 0 0	3 0 0
$\text{N H}_4^+$ 浓度 ( m M )			
0	3 2 6	4 7 0	1 3 3
1. 0	5 0 2	7 4 7	5 4 1
2. 6	7 5 3	7 3 1	8 2 5
10. 0	3 8 7	8 1 1	5 7 2
25. 0	7 4 4	1 0 4 2	8 4 4

精氨酸浓度 ( m M )	0	10	30	100
$\text{N H}_4^+$ 浓度 ( m M )				
0	12	147	126	99
1.0	70	252	246	157
2.6	207	298	306	264
10.0	340	408	411	311
25.0	335	297	233	148

从以上各实验看出，当所加精氨酸或脯氨酸为最适浓度，而且  $\text{N H}_4^+$  亦为最适浓度时则产生协同作用。

重复表 1 1 所描述之实例的一部分，试验了  $\text{N H}_4^+$  和 L-脯氨酸的各种不同浓度对体细胞胚胎数量和向小植株转化的影响。

表 1 2 铵和脯氨酸对体细胞胚胎 ( S E ) 数量和质量的影响

脯氨酸 ( m M )	$\text{N H}_4^+$ ( m M )	S E 数量	转化%
0	0	4±1	3±3
0	2.6	36±5	4±3
0	25	60±6	9±5
10	2.6	95±12	25±5
30	2.6	134±17	42±7
100	2.6	175±19	42±4
30	10	187±24	42±6

从中看出加有脯氨酸和铵的培养基可提高胚胎数目；当有高或低

浓度铵离子存在时脯氨酸可提高胚胎质量。

### 3. 向基本上没有铵离子的培养基内添加氨基酸

按上述实施例的方法诱导苜蓿细胞并进行平板培养，不同的是从培养基配方中去掉  $\text{NH}_4^+$ 。试验一系列浓度的氨基酸对体细胞胚胎发生的影响，所得结果概括于表 13 中。

表 13 向基本上没有  $\text{NH}_4^+$  的培养基的琼脂固化的培养物内加氨基酸对苜蓿体细胞胚胎发生的刺激作用

添加	%最大刺激	浓度范围(mM)	最适浓度(mM)
对照(无 $\text{NH}_4^+$ )	100	—	—
L—脯氨酸	525	6—300	(10—30)
L—精氨酸	1200	1—100	(20—50)
L—天冬酰胺	750	1—100	(2—10)
L—鸟氨酸	900	0.3—3	(1)
L—赖氨酸	500	1—10	(3)

基本上没有  $\text{NH}_4^+$  时，以上述氨基酸作为唯一的还原氮源，表明对体细胞胚胎发生有刺激作用。另外，除了鸟氨酸以外，通过胚胎大小、形状和成熟程度的测定，证明加入上述各种浓度范围的氨基酸，均可显著提高所产生胚胎的质量。

### 4. 联合使用氨基酸

下表表明在没有  $\text{NH}_4^+$  时向苜蓿培养物内联合加入氨基酸的效果。联合使用氨基酸对提高胚胎数具有协同作用。

表 1 4	胚胎数
实验 1. 5 0 mM L—脯氨酸	8 0
3 0 mM L—谷氨酰胺	5 0
5 0 m M 脯氨酸和 3 0 m M 谷氨酰胺	2 4 8
实验 2. 1 0 0 mM L—脯氨酸	2 7
1 0 0 mM L—丙氨酸	7 4
1 0 0 mM L—脯氨酸 + 5 0 mM L—丙氨酸	2 1 5
3 0 mM L—精氨酸	1 3 5
1 0 0 m M 脯氨酸 + 3 0 m M 精氨酸	2 1 5

在以脯氨酸与其它氨基酸进行的联合处理中，观察到了最大和质量最好的胚胎。

虽然为清楚了解起见已通过图表和实施例对前述发明作了一定程度的详细描述，但在待批准的权利要求范围内进行某些改变和修饰，对本领域内的普通技术人员来说是显而易见的。

图 1

