

第 四 届
国际植物组织与细胞培养大会
论文选译专辑

中国科学院遗传所情报图书室

1979年11月

前 言

第四届国际植物组织与细胞培养学术讨论大会于1978年8月20至25日在加拿大 Calgary 大学举行。来自39个国家的五百四十余名代表出席了大会。

大会采取大会报告、分组讨论、圆桌会议讨论以及用墙报展示成果等形式，宣读了论文，交流了成果，探讨了有关的问题。

会后，由 Calgary 大学生物系的 Thorpe 教授负责编辑大会论文集。论文集共收入50篇文章，分为18个专栏。文集的标题为“植物组织培养的前线”，于今年年初出版。

现在我们从论文集中选了十二篇文章，全文译出，每篇后面并附有文献索引，目的是为读者提供一份资料，通过它了解国际植物组织和细胞培养研究的概况和发展趋势。

由于编译者的水平所限，无论在选材，还是在翻译质量上，都会存在缺点和错误，望读者不吝批评指正。

目 录

植物细胞培养对工业的影响	1
植物组织培养对农业的影响	27
离体器官发生的生理和生化研究	63
作为植物细胞遗传转移载体的根癌病土壤杆菌质体	81
培养中的花粉分裂和分化	101
来源于小孢子的单倍体植株的产生和利用	119
植物细胞的细胞分裂和 DNA 合成	137
植物细胞培养物生产生物碱的调节机制	157
培养细胞和再生植株中染色体数的变异	177
抗性突变体及其在遗传操作上的应用	191
谷类作物和牧草离体再生植株的研究	215
对大会展出的研究成果的评论	229

植物细胞培养对工业的影响

M. H. Zenk

(西德 Ruhr 大学植物生理系)

前 言

在过去五年里,植物细胞培养技术已经达到考虑用它来解决经济问题的程度。细胞培养与常规农业生产相比,优点很多(1,2)。植物产物的生产不受环境因素,如气候、病虫害和季节的支配,并能在地球上的任何地方进行。从而排除政治危机和外来竞争的影响。粗制品能达到在大田生长的材料中从未看到的那种整齐一致的质量,而且任何新发现的药用植物都能立即进行培养,并能缩短农业上繁殖和栽培的漫长试验。还能够严格控制下生长像吗啡和可待因一类重要药物,以防止滥用。世界人口在不断增加,对生活用品的需要会剧增,因此要占用本应用来生产粮食的土地。然而,决定工业是否采用植物细胞培养新技术的唯一标准是经济标准。只有通过细胞培养方法生产的植物产品在价格上等于甚至低于大田生产的产品时,才能促使细胞培养方法生产的产品工业化。

次级产物的形成与调节

植物细胞在初级代谢产物方面决不可能与微生物(如细菌和真菌)细胞竞争。植物细胞的生长与代谢速度比细菌和真菌慢得多。植物细胞培养在工业上应用的几乎唯一的机会是,生

产只能由高等植物合成的、特殊的和有价值的低分子量或高分子量产物。迄今认为植物细胞培养物很少能产生有效成分的提取物，而且在形态分化过程中显然没有看到所谓的次级化合物的化学合成的潜力（如文献3, 4, 5），这几乎已成为一种教条。

因此应该提出和回答的第一个问题是：有没有可能产生高产的细胞培养物，如何才能达到这个目的？这方面工作的先决条件之一是，倘若想让植物细胞培养物产生天然化合物，就应该用各种办法确定该种植物在分类上是同一个东西，而且要检验整个植株确实含有要寻找的化合物。不应该盲目相信或过分迷信从某个植物园或种子供应厂商得到的种子袋上的标记！

1973年，Teuscher (2) 在一篇非常精采的综述中报道说，仅有一种植物，即 *Ammi visnaga* 的悬浮培养物的次级产物 visnagin 比分化植株的产量更高。过去几年这种情况已有所改变。有些细胞培养物在某种化合物的产量上已超过分化亲本植株，例子列于表1。

表1. 化合物产量等于或超过分化亲本植株的细胞培养物

C = 愈伤组织

S = 悬浮培养

产 物	植 物 种	培 养 条 件	细 胞 培 养 物 干 重 %	产 量 克 / 升	植 株 干 重 %	因 子	参 考 文 献
Ginsenoside	Panax ginseng	C	27	—	4.5	6	(6)
Anthraquinones	Morinda citrifolia	S	18	2.5	2.2	8	(7)
Rosmarinic acid	Coleus blumei	S	15	3.6	3	5	(8,9)
Shikonin	Lithospermum erythrorhizon	C	12	—	1.5	8	(10)
Anthraquinones	Cassia tora	C	6	—	0.6	10	(11)
Diosgenin	Dioscorea deltoidea	S	2	—	2	1	(12)
Biscoclaurine	Stephania cepharantha	C	2.3	—	0.6	3	(13)
Caffeine	Coffea arabica	C	1.6	—	1.6	1	(14)
Ajmalicine	Catharanthus roseus	S	1.0	0.26	0.3	3	(15)
paniculide B	Andrographis paniculata	C	0.9	—	0	∞	(16)
Serpentine	C. roseus	S	0.8	0.16	0.5	1.6	(15)

接上表

4

Serpentine	<i>C. roseus</i>	C	0.5	—	0.5	1	(17)
protopine	<i>Macleaya microcarpa</i>	C	0.4	—	0.32	1.25	(18)
Visnagin	<i>Ami visnaga</i>	C	0.31	—	0.1	3	(19)
Glutathione	<i>Nicotiana tabacum</i>	S	—	0.22	0.1	10	(20)
Ubiquinone — 10	<i>N. tabacum</i>	S	0.036	0.045	0.003	10	(21)

迄今为止，已报道过的合成次级化合物最多最大的要数迷迭香酸 (rosmarinic acid)。已设计出使 1000 毫升培养基产生 3.6 克迷迭香酸的条件，即相当于细胞干重的 15%，超过分化洋紫苏 (*Coleus blumei*) 植株的五倍 (8, 9)。此外，通过对车前草属、猪殃殃属、茜草属蒽醌 (anthraquinone) 产物的系统研究，现在可以这样乐观地评价培养条件，在所研究的 18 个种 (干重) 中，有 17 个种的细胞培养物所产生的蒽醌，最多超过完整植株的根组织 (22)。以往对培养基中碳源浓度很少注意。在我们研究过的许多情况下，如果提高培养基中的蔗糖浓度，比通常高出 2-3%，合成的次级化合物就会大量增加。通过前体饲喂实验，有可能提高某种指定的代谢物产量，这很引人注意，而且迄今未充分利用。

另外一种因素，即天然或合成植物激素或有效物质，对细胞培养物的生长与产物的形成也有巨大影响。我们实验室对此进行了系统的研究，测验了近 200 种合成的有效物质 (生长素型) 对 *Morinda citrifolia* 细胞培养物产生蒽醌的作用，发现这些细胞培养物对激素质量的反应非常敏感 (7, 22)。例如，在各种激素都能促进细胞生长与增殖的情况下，苯氧基乙酸系 (phenoxyacetic acid series) 的 *p* 位取代基的性质，对启动次级产物的形成有剧烈作用 (22)。激素被大家公认为次级产物形成的启动因子 (见文献 23)。因此，为了要确定在细胞悬浮培养物中没有形成某种次级产物，必须检验包括激素与有效物质在内的培养基各种成分的所有变动范围。植物细胞的全能性证明，在分离细胞中，拥有形成产物所

需的所有遗传与生理精力。因此，必须找到合适的钥匙（有效物质，引起反应的刺激物质）将门启开，让细胞的贮存 P 位充满所需要的产物。尽管事实上已经有了大易的能启动次级产物合成的化学因子，依然有一些细胞培养物不能诱导产生大易的甚至含易都测不到的产物。有人指出，在细胞培养物中不能形成这些产物，是由于不能形成某些必要的生物合成酶（2, 24），然而可能形成同一途径的其他的酶（24, 25）。这些酶的调整作用至今仍不了解，应引起注意。

除化学因子外，物理因子对细胞培养物也有影响。其中之一是光（23），一种化合物的生物合成可以（ P 分）在叶绿体中进行（如文献26），且因为绝大多数离体生长的植物细胞并不含有有功能的叶绿体，这就会妨碍产物的形成。然而光作为诱导某些化合物合成的一种手段，很难用于正常的工业发酵罐。但是，我认为，商业上感兴趣的产物的形成与叶绿体或植物光敏素系统有联系的比较少见。

生产率高的变异细胞

植物细胞培养物通常仅产生很少易的有其流出植物的特征的化合物，这一事实曾使几乎所有评论这一领域的科学家感到惋惜（1-5, 23, 27, 28）。然而，令人惊奇的是，这种现象从未令人满意地研究过。我们至少能设想出以下两种可能：第一，由高产植株衍生的全 P 细胞在培养中仅合成在分化植株的浓度的一 P 分；第二，绝大多数培养细胞没有产生和积累这些产物的生化潜力，但有少数“变异”细胞能产生浓

度与在株细胞相等的化合物。在另一类培养物中，发现次级产物“很少”，可能正是来自这次做的变异体，即高产细胞。用放射免疫测定技术定量分析无性繁殖的细胞，有可能说明上述第二种情况是正确的(15)。从一个培养皿里随机选择一个P位，将所有长春花细胞群落(colony)收集起来，分别分析其生物碱阿吗利新(ajmalicine)和蛇根碱(serpentine)的含量。这些群落的化学特性的定量分析说明，不能产生任何生物碱的群落，与生物碱产量超过流出的母本植株的群落间变异很大。经测定，有些群落所产生的生物碱比群落群体的平均值高4倍至5倍。利用这种群落选择法有可能分离出生物碱产量高的细胞系。高产细胞系中，有的回复到低产或不产状态，有的则保持稳定，并能连续继代培养。因此，有可能从产生“很少量”化合物的细胞群体(population)中分离出产量高的、甚至超过分化植株的稳定细胞系。这种现象一般看来是正确的。图1列出了 *Solanum laciniatum* 平板培养群落中甾类生物碱羟基茄碱(solasonine)含量的分布频率。这种分布状况值得注意，因为有人曾指出，*S. laciniatum* 细胞培养物不产生这种甾类化合物(29)。看来上述报道(29)中，该作者偶然述出一个不能产生甾类化合物的细胞系。然而，利用无性繁殖选择方法能获得所需要的化合物的在产量上类似分化植株的细胞系。有人用黄花菸草的茄碱生产系统地研究了上述现象(30)。我们用普通菸草细胞进一步证实了这些结果。

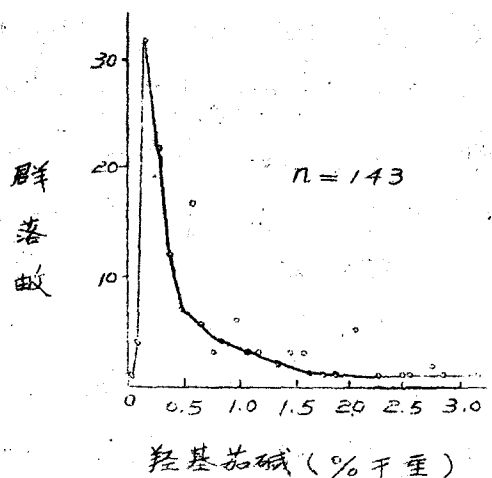


图1. 在培养皿里生长的细胞群落
羟基茄碱 (Solasonine)
含量的分布频率

有人扼要地综述了细胞系生物合成活性的变异问题 (15, 31)。但目前对这类变异的生化和遗传基础一无所知。总之, 我们可以设想, 变异细胞的选择 (近来发展的一种复制技术对这种选择大有帮助), 可用来使愈伤组织或细胞悬浮培养物形成任何天然产物。选择的基础是从正常的变异库中分离具有特殊生化特性的细胞, 而这种变异则为体细胞群体所固有 (15)。除非对这些自然存在的变异体进行透彻的研究, 人必然转而利用通过诱变剂处理人工产生的调节突变体。我们认为, 从目前来看, 选择所需的自然化合物产量高而稳定变异细胞系, 是在工业上应用细胞培养技术的最有希望的地方。产生这些高产变异系的总的策略如图2所示, 来自文献 (15)。这种程序的至

要特点是，要有高度敏感、特异的定量或半定量检验系统，如 RIA (33, 34) 已用于变异系的探测研究。

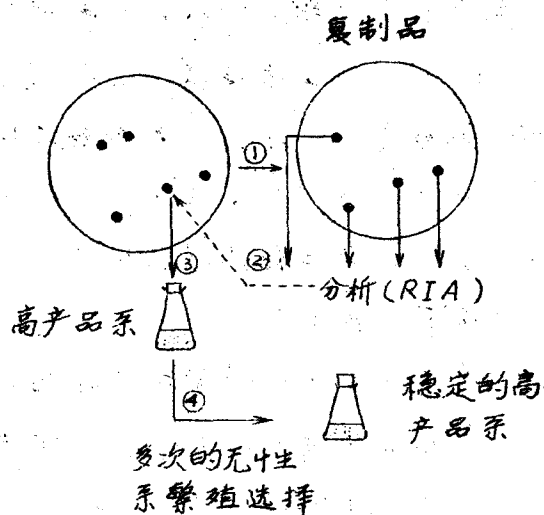


图2. 高产细胞系选择程序示意图

品系的稳定性

从品系生产稳定性来说，至少有两类细胞培养物。一类全下或大部分细胞都能产生特异的化合物，而且高产。这类培养物不是用无性系方法选择的，但是从一开始就高产，而且多年稳产。例如三角叶薯蓣 (12)、人参 (6)、鸡眼藤属 (*Morinda citrifolia*) (7)、*Ammi visnaga* (19)、洋紫苏 (8, 9)、以及茜草科中能产生蒽醌的 18 个种，等等。在我们实验室，通过悬浮培养 *M. citrifolia* 已保存七年以上（约转移 180 次），其生产能力无任何变化。甚至培养超过七年，也只观察到蒽醌产量有微小的季节性变化，而苯醌（可能

是萘醌之误。——译者) 产萘上的重要变化总是能追踪到掌握操作上有误。这个品系还在有 2,4-D 条件下保持同样长的时间。研究表明, 2,4-D 完全抑制萘醌的形成 (7)。在加 2,4-D 条件下生长数年后, 如果把培养细胞转移到加萘乙酸的培养基中, 转移一、两次就能恢复萘醌的形成。这就清楚地说明, 至少在这一例情况下, 2,4-D 并未造成染色体畸变。还分析了两种培养细胞的核的成分 (DNA), 并与变异植株 (根尖) 进行比较。发现甚至培养八年以后, 在这三个品系中则不出现有重大变异 (35)。这说明这类二倍体植物细胞培养物从形成某些产物的能力来讲具有稳定性。

第二类细胞培养物的代表有产生吲哚碱的长春花, 和形成菸碱的黄花菸草。仅通过无性系选择就得到了高产细胞系, 然而这些细胞系表现出相当明显的生化不稳定性。图 3 表明累积吲哚碱阿吗利新的生化潜力, 在后来的继代培养中迅速丧失, 而通过严格无性系选择, 使碱产量保持恒定, 甚至还会提高 (36)。通过严格的无性系繁殖选择最终可望产生出能像第一类细胞那样稳定的品系, 可是至今仍不了解这种不稳定性的遗传或生理基础。然而, 优良品系在产物形成上的不稳定性和变质, 对工业微生物学家普通而且常见, 用麦角菌品系生产麦角碱就是一例 (37)。除无性系选择外, 另有一种办法可能克服连续转移培养过程中存在的不稳定性问题, 即植物细胞系的水冻保存。从原理上讲这种冰冻技术能达到目的 (如文献 30), 但是, 细胞系产生某种指定的物质的能力和冰冻样品能保持多长时间而不发生变化, 至今没有进行试验。植物细胞的低温耐

存不仅是可能的，而且还可以消除任何导致发生变化从而影响产物形成的代谢活性。

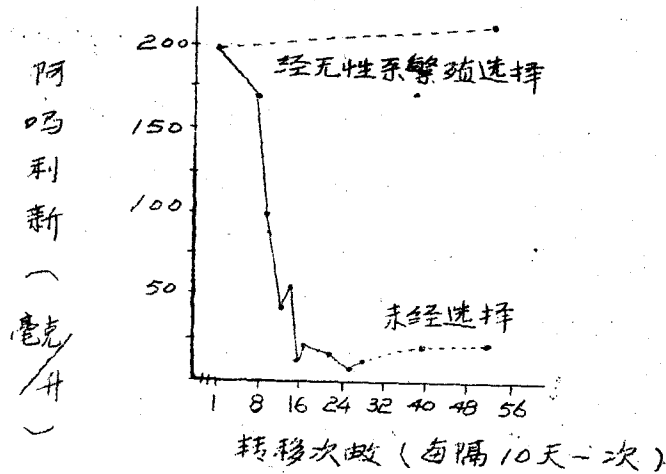


图3. 无性系繁殖选择对产生阿吗利新生化潜力的作用。

理论上的产品产易

正如作者在前言里所强调的，决定植物细胞培养技术实现工业化的唯一因素是产易（价值），即单位时间里经过发酵能生产指定产物的产易。这方面最重要的参数是细胞产易、产物产易和生长速率。和大多数微生物不同，植物细胞的次级代谢产物一般不排泄到培养基里，而是保留和贮存在液泡里。因此，细胞质内的调节过程和液泡积累某种产物的能力将决定一种产物的产易。莖菜属植物，在花瓣表皮细胞里积累的次级代谢物（花色素苷）的最高产易，约为其干重的35%。我们还观察到长春花的分散状态良好的细胞悬浮培养物，最高的细胞产易

为 36 克/升 (干重)。从这些数字可以推测,在悬浮培养中,产生一种化合物的理论上的最高产值应该在每升培养基 12 克的范围内。在某些情况下,观察到产物的积累达到 27% (在人参属愈伤组织里,粗皂角苷配基的干重) (6)。到目前为止,已报道过的植物悬浮培养形成的单一次级化合物的最高产量约为每升 4 克 (迷迭香酸)。这些产量已经达到了工业发酵生产某些抗菌素以及维生素和核苷酸的程度 (39)。这些数字都没有考虑与植物细胞发酵有关的时间因素。植物细胞发酵速度比大多数微生物的慢十倍。

然而,根据野口等人 (40) 关于细胞培养生产率合乎逻辑的最佳化的报道,应该说近来有一项突破。他们用了 30 小时的时间,在 20000 升发酵罐里,得到了 7.34 克干重/升/天 (稳定状态) 的生产率,70 小时后达到了 15 克/升的最高产量,这相当于细胞总重增加了 15 倍。但是加速细胞生长,并不总能改进培养物某些所需成分的生产率 (40)。因为液泡在细胞内积累某种产物的最高产量上有一种自然限度。这不像细菌,细菌在产生初级代谢时,如谷氨酸发酵,分泌高达 100 克/升的代谢物到培养基里 (39)。植物细胞通常在自身里贮存代谢物。但也有例外,如有人曾报道菸草细胞分泌大量谷胱甘肽到培养基中。一定有可能用化学触发剂使活的植物细胞把贮存的次级产物释放到培养基里,然后从培养基里收取次级产物而不致破坏细胞。这样就有可能实现周期收获次级产物的循环过程,在此过程中排去用过的细胞培养基,也就去掉了否则会留在细胞内的次级产物 (5)。化学触发剂可以是像 sorbi-

tanoleate、中黄胆酸盐或二甲基亚砷等的物质。次级产物的绝对产量和生产率是否能因此而提高还有待证明。事实上如果考虑到产物的分离，低分子易次级产物贮存在细胞的液泡里也可能是有利的。植物细胞能通过重力过滤或类似的过程从培养基里分离出来。对包含在细胞里的产物来讲，浓度是相当重要的因素。

植物细胞的成批发酵技术

1977年曾报道了有关植物细胞发酵的两项重要成果。菸草细胞能以高达20000立升那样的体积生长，证明利用现代发酵技术知识，经过绝对消毒，能使植物细胞在大容积条件下保持一段时间(40)。其次，用*M. citrifolia*的悬浮培养物，在各种反应系统里比较了细胞的产量与(蕙醌)生产率(41, 42)。这一研究表明，与其他四种系统(摇瓶、两种类型的涡轮叶轮，和带卡普兰涡轮的通风管)比较，空气上升反应口(airlift reactor)是使悬浮培养物增加和获得最高生产率的一种很有前途的容口。按比例增加(实验性试验达到200立升)和恰当设计大容积的空气上升反应口，一般看来问题不大，操作简单，投资较少，而且消毒问题小，因为没有通风套筒。由于植物细胞对切应力敏感，细胞产量达到20克/升(干重)以上时，高粘滞的发酵流体造成搅拌和通气上的特殊问题。对鸡眼藤属来讲，已测出在生产期间其临界切应力为800-2000达因/平方厘米(42)，并发现其临界氧张力为5%饱和度，而最大氧摄入率为1毫克氧/升/分(42)。

因此通气不是严重问题。植物细胞是专性需氧生物，但由于生长率低，通常很少形成泡沫。培养物能耐一系列抗泡沫药剂（42，43），但是，在大规模培养中，细胞粘附在反应器壁上，有时会引起麻烦。近来日本共和发酵公司的研究室有一项令人很感兴趣的发现，降低培养基中 Ca^{++} 的水平，可以减少或防止粘附作用和过多起沫。

另一个使培养过程费用昂贵的问题是，为最终发酵在接种物繁殖的扩大操作期间，发酵物占据的时间，在最后阶段，一定要考虑多达两周的发酵时间。已经注意培养细胞生产率的提高问题（如文献8），但这类问题显然是能被控制的（41，42）。

总之，用植物细胞生产天然产物，发酵时间长而成本又昂贵的问题，至少通过建造大为简化的空气上升反应器或富氧反应器以及保证发酵系统绝对无菌而得到补偿。应考虑用比钢材便宜的材料，如玻璃纤维，以减少投资，使发酵过程更加经济。

发 酵 成 本

1974年，Jones（28）对由细胞培养物产生的植物的产物产量作出了一项“乐观的估计”。他假定，一立方米培养物，发酵10天产生15公斤干重的细胞，其中产物的产量为10%。这种产量按每年进行35次发酵培养计算，用2000公斤籽，每年从70,000立升培养基中可提取52.5公斤产物。培养基的其他成分，电力消耗以及所用的人力还没有算进去。即使如此，至1974年距离达到这一目标也还很遥远。然