

生物科学译文选

第二集

1979-7

河北省科学院生物研究所情报室

植物学实验法

第二版

1979-7

周志德 周志德 周志德 周志德 周志德

目 录

一、植物细胞培养的工业潜力

1—35

二、用光合细菌生产单细胞蛋白

36—61

三、植物病原菌的微生物控制

62—94

植物细胞培养的工业潜力

Z. Puhon + S. M. Martin

1. 引言

植物组织培养技术的应用逐渐开辟了植物科学的新的前途，自从36年前，当第一次成功地完成了根和愈伤组织培养，造成惊人的进展，现在使科学家能够大量的培植从植物的许多部分下来的不同的植物细胞。高等植物分离细胞的培养为了生物合成经济上重要的植物成分——初生的和次生的植物产品——其潜力早在1950已认识，这题目的出版物数量增加，证明植物细胞培养的全部工作是真正大量的，进一步飞快的进展导致技术的发展，可以大规模培养分离的植物细胞在混悬液中在常规基础上，这个报告的目的是检查在生物体外生物合成经济上有用的植物成分的实际可能性。

植物组织培养的历史开始于1902年，Haberlandt企图从高等植物分离的细胞在人工培养基上生长但失败了，直到30年以后Gautheret和White成功的开辟愈伤组织和根培养的领域，高等植物分离细胞的培养是一种技术进展，对研究细胞和生理课题，只开新的前途，正如其他生物学方法能认识到发展的三时期：

1. 基本技术的发展和提高，
2. 肯定这些技术对课题的应用，

3, 新问题的处方和检查这技术在工业规模应用的可能性。

植物组织培养技术的应用于这样一些课题, 细胞的分裂, 增殖, 分化, 形态发生方面, 植物生长调节剂的估价, 病毒的敏感性, 试验药物效率, 癌瘤的生长, 专性寄生性, 霉菌和绿虫的培养和细胞代谢物的产生, 许多很好的综述已经总结了植物组织培养领域的各种发展。

在过去十年中植物组织培养的进展, 产生了用高等植物细胞无菌培养, 商业生产代谢物的有趣的前途, 观察到植物组织培养能进行分化导致器官形成, 从植物不同部分下来的愈伤组织常能成根, 最惊人的事实是愈伤组织的分化从游离的混悬胡萝卜细胞发育成完全的植株, 接着, 另一个工作者报告从愈伤组织或其他形式的组织发育成植株, 总之, 这表明, 如 *Stefan and et al* 的引语, "任何两倍体细胞都有形成完全生物体的倾向而往往受到化学刺激的控制 (引起或控制) ……" 可见整个植株的任何产物是从该植株下来的细胞的潜在产物。

如前所述, 这个报告的目的是检查在生物体外生物合成经济上有用的植物成分实际可行性和不打猎来查阅有关植物组织培养的整个文献。

因为我们的兴趣集中在工业应用和因为混悬培养技术似应用已广, 我们尽可能限制在我们对混悬培养的讨论。

2. 培 养

根据 Koblitz 植物组织培养可以下定义为一种植物组织从它天然环境中割下来和在无菌条件下在并内人工培养基上生长，这些细胞能分裂连接着细胞质生成质另的增加，Kobitz 从病理学观察将组织培养分类为四类：

愈伤组织——从伤口组织下来的，在切面发生和几乎不变的绝对需要一种植物生长素。

驯化组织——可能是愈伤组织的体细胞突变，和能在没有植物生长素下生长，但常被植物生长素所刺激。

冠瘿瘤组织——由 *Agrobacterium tumefaciens* 引起和常是植物生长素的无养型。

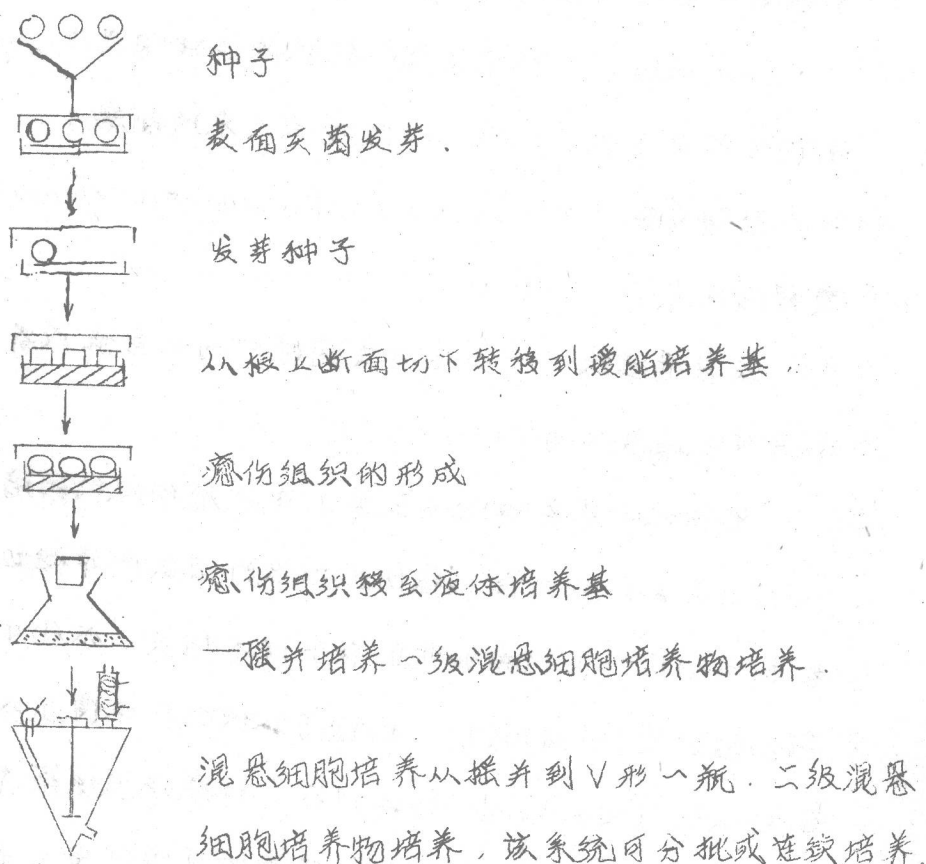
病毒瘤组织——由昆虫传病媒介的病毒造成寄主植物系统感染和瘤生长来的。

植物组织培养领域的主要工作是愈伤组织的培养。Smet 指出虽然在许多场合，愈伤组织作为组织培养报道，但他们和植物体的任何组织在细胞形态上既不相关，亦和生理上不相关，愈伤组织是种的特异性，在愈伤组织培养中得出不同的染色体组可以认出彼此不同，但任何一丫种愈伤组织培养物能得出许多不同形式的正常组织细胞，培养物可得到发生的单丫分离细胞，但绝大多数得出全丫植株丫分化和含有不同形式的细胞。

2. 1 细胞培养的建立*

植物组织培养最普通的形式是愈伤组织培养它是不分化的植物细胞群体，愈伤组织可来自几乎任何植物下分。

通常的技术是将灭菌的植物下分放在一个适当的培养基上含有促进愈伤组织形成的生长调节剂，其步骤见图解1建立静止的（固体培养基）和混悬（液体培养基）培养用来表明其步骤，混悬培养的出发也是将灭菌的割下的植物下分直接放在液体培养基中。



2, 2, 可利用的培养物

植物组织培养领域的进展有可能代表几乎所有的植物，所有的植物，所有形式的组织和不同的染色体组合的组织生长在1959 Gautheret 发表了一张100种植物能组织培养的表，而这个数字年々有所增加，培养的植物部分包括根，茎，叶，花瓣，胚乳，花粉，块茎，子叶，根茎，球果轴和下胚轴，病理的和非病理的组织都曾报道。

2, 3, 细胞培养物的保持

不像动物细胞培养物能在低温时长期保藏，植物细胞培养物必须周期性转接到新鲜培养基，通常每3至4星期，如果培养物贮藏在 $5-10^{\circ}\text{C}$ 时转接率可以降低，奎矿物油常用来保存许多微生物，Caplin 表明油覆盖技术也可用于保存植物细胞培养物，发见接种物的形状对保藏培养物很重要，Mifra 观察到愈伤组织的经常转接导致形态和生化上的变异。

植物组织培养物保存的进一步研究迫切需要，长期贮存法不仅节约规律性的接种工作而且可以减少由于连续接种产生变异，如果经济上工业法的发展，适当的保存法将是绝对重要的，举例来说，如果没有适当的方法来保存改良菌株遗传不变状态，那么菌株的改良将没有指示性工作可做。

2, 4, 细胞特性的保持

曾反复观察到植物细胞生长在生物体外培养中的变化，

细胞学的分析表明培养物常有均一的外观而所含细胞却有不同的倍性，曾报道某些培养基有利于开始单倍或二倍到高倍性的转移，没有弄清培养物生长到什么程度促使染色体不稳或什么程度发生细胞畸变。Demissey + Partanen研究核种和环境条件对牡丹 *Paeonia suffruticosa* 组织培养的行为影响，不论在固体或液体培养基培养物在早期有利于四倍体细胞增殖以后就又让路给原来的二倍体细胞。

许多工作者注意到在培养物所来自的植物下分细胞和培养物细胞间存在着不同。Tulecke + Nickell举例，总结了龙舌兰 *Agave schottlandii* 组织培养物在细胞学、生理学和生化上和亲本植物下分的不同。Grant + Fickler强调了易碎和不易碎培养物之间化学组成的不同，后者有一个很大总量的细胞壁多糖但低百分比的纤维素与果胶类物质及半纤维素比较。Gaulborg + Finlafson指出它们的不同从事实推测由于细胞培养物是未分化的分生细胞而植物组织含有不同的分化细胞。

相反的观点存在，关于细胞培养物生物合成性质的保持，Reinhard发现几种烟草 *Nicotiana glauca* 愈伤组织培养物失去它们合成菸碱和毒藜碱的 (Anabasine) 的能力在培养几个月以后，相反，Chan + Staba报告曼陀罗 *Datura stramonium* 愈伤组织培养在11个月培养后如它刚分离时一样产生那么多的生物碱。Bodley et al 用长春花 *Vinca rosea* 愈伤组织培养，在20

芽的移植后仍然产生生物碱

3. 培养基

开始成功的植物学家大多应用复合培养基来培养从很大范围的各个种的根和愈伤组织建立混悬培养。诱导单细胞连续分裂和培养未成熟胚，最近则大多应用化学限定培养基 *Chemical define media* 常用的营养物通常分成六类组分：糖，主要无机盐，微量元素，氨基酸，酰胺和嘌呤；维生素；植物生长素，此外，许多培养基添加天然来源的复合溶液如椰乳，酵母膏和水解酪蛋白，关于植物细胞培养的营养有一些很好的综述。

许多糖，包括单糖，双糖和多糖和粉糖，研究作为植物组织培养的碳源，它们只有很少数能为植物细胞利用，最成功的是蔗糖，稍有成功的是甘露醇和山梨醇，在有些例子，果糖是有益的但在其他例子则结果不佳，葡萄糖虽然正常来说是一个好的碳源，在植物细胞培养通常认为是蔗糖的较差代替物，剩下的根需要可利用的糖用以生长，*White* 标准根培养基正常含 2% 蔗糖，*Street* 的综述总结正好和 *Carew + Staba* 报告相反，对大多数单子叶植物的根，葡萄糖优于蔗糖，由此壳物培养基本培养基含葡萄糖开始浓度为 2%，有报告愈伤组织能以甘油作为单一碳源培养而其他多元醇则无效，*Brakke + Nickell* 第一次表明有些植物组织培养以淀粉为碳源能发育得很好由于 α -淀粉酶的活性分泌到培养基内，*Karstens et al* 培养一个茶

草 Nicotiana 五种在含淀粉培养基上表明在培养中存在 α -淀粉酶和可能 β -淀粉酶, Constable 报告杜松, juniperus + Communis 培养物胞外水解麦芽粉, 椰子粉, 淀粉和蔗糖, Macarenha et al 观察玉米小麦, 大麦, 和水稻的组织培养在葡萄糖, 蔗糖或淀粉上生长得一样的好。

培养基配方只含少量或一些维生素, 它们中常用的是对氨基苯甲酸, 抗坏血酸, 生物素, 胆碱, 氰钴胺, 叶酸, m-肌醇吡哆醇, 核黄素和菸酸, 根培养常需硫酸, 吡哆醇和菸酸。

Stell 指出硫酸常常是生长必需, 组织本身能合成一些维生素, 所以难以观察到硫酸缺乏, 根的培养研究显示一些维生素能在生长中合成, Torrey & Reinert 报告用化学限定培养基维生素的需要对迅速生长细胞混悬物较对缓慢组织群体有着不同的。

化合物作为生长促进剂分为二型: (1) 化学剂如吲哚乙酸 (IAA) 萘乙酸 (NAA), 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D) 赤霉素和细胞分裂素是生长调节剂 (植物生长素) 和 (2) 复合添加剂如椰乳, 水解酪蛋白, 和酵母膏。根据 Kefford & Goldacre 植物生长物质如 IAA 和 2, 4-D 是植物生长的有关调节剂能致细胞变化, 其变化的确切性质, 却用其他化学调节剂如赤霉素和细胞分裂素来确定, 对大多数混悬培养物培养基必须除植物生长素外, 含维生素或维生素与还原氮化合物或一复合添加剂如椰

乳，同种的不同变种的组织可以表现不同植物生长素的需要，这似乎可能这些组织不需要外面添加植物生长素来满足生物合成的植物生长素需要和一些人工作者得到在冠腰和植物生长素营养缺陷型愈伤组织内有足够水平的胞内植物生长素发生的证明。常常在癌组织内发现很高的植物生长素水平可能由于植物生长素破坏酶的低水平，这样的设想被“驯化”的胡萝卜和 *Scor Zonera* 组织不需外添加植物生长素而能生长，也不产生胞外植物生长素吡苄酶 (IAA 氧化酶) 来支持，Nicrell & Tuttle 发现作为一原，单子叶植物组织能被赤霉素 (10ppm) 所抑制，试验 25 种植物中只有很少组织能生长促进，发表了一些植物生长素的综述。

表 I，细胞混悬培养的非限定培养基

(Nicrell & Mavet Zri)

组 分	毫克/升	组 分	毫克/升
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	175	$FeSO_4 \cdot H_2O$	2.5
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	200	2,4-D	6
Na_2SO_4	200	精氨酸	50
KNO_3	80	硫胺·HCl	0.1
KCl	65	吡哆醇 HCl	0.8
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	16.5	菸酰胺	0.8
KI	0.75	酵母膏	1×10^3

$MnSO_4 \cdot H_2O$	4.5	麦精	1×10^3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5	蔗糖	20×10^3
H_3BO_3	1.5		

常用的许多培养基含有除上述六类组分外的复合添加剂，虽然，从最新文献显然复合添加剂常用已知组成的化学剂代替。鉴别天然生长刺激物质的有效成分从液体的胚乳如椰子，七叶树和玉米，表现了极大的兴趣，有关椰乳化学成分的知识 Tulecke et al 作了摘要，这些添加剂的常用浓度在 5-20% 之间，大多数工作者得自成熟的貯存的坚果，在其他复合培养基的添加剂常是酵母膏、麦精和水解酪蛋白，Fox + Miller 报告了玉米浆的生长促进特性。

表Ⅱ，细胞混悬培养的非限定培养基

(Veliky And martin)

组 分	毫克/升	组 分	毫克/升
蔗 粉	20×10^3	K I	0.05
水 解 酪 蛋 白	2×10^3	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	13.90
NaH_2PO_4	150	Na_2EDTA	18.60
Na_2HPO_4	20	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	200
KCl	200	硫 胺 · HCl	0.50
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	吡 哆 醇 HCl	0.50
$(NH_4)_2SO_4$	100	菸 酸	1.25
KNO_3	800	泛 酸 钙	1.00
$Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	肌 醇	100.00
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.25	激 动 素	0.25
$MnSO_4 \cdot H_2O$	4.00	茶 乙 酸	0.10
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.50	2,4-D	1.50
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.25	吡 啶 乙 酸	1.00
H_3BO_3	5.00		

消毒前 PH 4.5

表Ⅲ 细胞混悬培养的限制培养基

(Gamborg et al)

组 分	毫克/升	组 分	毫克/升
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10
KNO_3	2500	H_3BO_3	3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	$\text{Na}_2\text{MgO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150	CuSO_4	0.025
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	28	$\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
菸酸	1	KI	0.75
硫胺 HCl	10	蔗糖	20×10^3
吡哆醇 HCl	1	2,4-D	2
M-肌醇	100		

PH 5.5

表4 细胞混悬培养的限制培养基

(Murashige and Skoog)

组 分	毫克/升	组 分	毫克/升
NH_4NO_3	1650	$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.025
KNO_3	1900	$\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	蔗糖	30×10^3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	乳白蛋白胰酶消化	1×10^3
KH_2PO_4	170	甘氨酸	2.0
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.3	吡哆乙酸	1-30
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	激动素	0.04-10
H_3BO_3	6.2	M-肌醇	100
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	菸酸	0.5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	吡哆醇 HCl	0.5
KI	0.83	硫胺 HCl	0.1
$\text{Na}_2\text{MgO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25		

PH 5.7-5.8

表5 细胞混悬培养限定培养基

(Torrey and Reinert)

组 分	毫克/升	组 分	毫克/升
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	200.0	次黄嘌呤	2.50
Na_2SO_4	200.0	抗坏血酸	6.0
KNO_3	80.0	L-精氨酸HCl	7.8
KCl	65.0	L-胱氨酸	1.5
NaH_2PO_4	16.5	L-谷氨酸	14.0
MgSO_4	360.0	甘氨酸	13.0
MnSO_4	4.5	L-组氨酸	2.6
ZnSO_4	1.5	DL-异亮氨酸	10.4
H_3BO_3	1.5	L-亮氨酸	15.6
KI	0.750	L-缬氨酸	15.6
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	2.50	DL-蛋氨酸	13.0
蔗糖	20×10^3	L-苯丙氨酸	2.5
硫酸	0.10	L-脯氨酸	5.0
吡啶醇	0.10	L-苏氨酸	6.50
菸酸	0.50	L-色氨酸	4.0
L-肌酸	100.0	L-酪氨酸	40.0
胆碱	10.0	L-缬氨酸	13.0
核黄素	0.10	L-谷氨酰胺	50.0
抗坏血酸	0.10	L-天门冬酰胺	20.0
D-泛酸钙	0.10	氯酚红	4.0
生物素	0.01		

表6, 细胞混悬培养限定培养基

(Tallack et al)

成 分	毫克/升			
	玫瑰	蕃茄	玉米	银杏
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	760.0	370.0	530.0	730.0
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	280.0	—	325.0	280.0
Na_2SO_4	200.0	—	200.0	200.0
KNO_3	80.0	1900.0	80.0	80.0
KCl	900.0	—	65.0	65.0
NH_4NO_3	—	1650.0	—	—
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	—	440.0	—	—
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	300.0	—	165.0	165.0
$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	170.0	—	—
$NaNO_3$	1800.0	—	—	—
Na_2EDTA	—	37.3	—	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	—	27.8	—	—
H_3BO_3	0.2	6.2	0.500	0.100
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	(H_2O)0.8	22.3	3.00	3.00
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	($4H_2O$)86	0.500	0.500
KI	0.5	0.83	—	—
$NaMnO_4 \cdot 2H_2O$	—	0.25	0.025	0.025
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	(H_2O)0.02	0.025	0.025	0.025

—14—

续见下页