

三七组织培养的建立

郑光植 王世林 甘烦远

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

梁 峰

(中国科学院植物研究所, 北京)

从三七的根、块根、根茎、茎、叶柄、叶和花蕾等各部位诱导出愈伤组织。当这些愈伤组织无性系继代培养到第5代后进行了药用成分皂苷薄层层析的初步鉴定。结果表明三七愈伤组织中含有皂苷的主要成分Rg₁、Rb₁和Rh₁。粗总皂苷含量比原植物高,为干重的5.37% (原植物为干重的4.25%),粗皂苷元含量也高于原植物。愈伤组织的生长速率是54.0mg干重/L/day。各部位愈伤组织中以茎愈伤组织较好,无论干重增加、生长速率、粗总皂苷含量和产率、粗皂苷元含量还是皂甙组成上均比其他部位愈伤组织优越。

对于茎愈伤组织的生长,基本培养基以MS培养基较好,最适pH值为5.8,最适温度为26℃。光照对生长稍有促进但不显著。

关键词 三七; 愈伤组织; 皂苷; 生长速率; 细胞工程

植物次级代谢物细胞工程主要是利用植物细胞体系,以提供各种次级代谢物产品。由于植物的特殊性,研究中通常从愈伤组织的诱导和培养开始,进而细胞悬浮培养、细胞大量培养,再从培养细胞中分离有用次级代谢物。我们早期提出了植物培养细胞或组织次级代谢的全能性^[1]、多条性^[2]观点,本文将进一步为这种思想提供证据。

三七属五加科人参属植物,是我国特产的名贵药材之一,是著名云南白药的重要成分,有止血、补血、强身、治疗冠心病和脑血管疾病等等医疗作用。三七多糖能提高免疫功能^[3],三七皂苷中的Rg₁和Rh₁成分有抗癌作用^[4]。三七虽早有栽培,但要三、四年以上才能收获,栽培技术也较复杂,常有严重的病虫害,因而价格昂贵供不应求。三七的主要药用成分之一是皂苷,迄今三七的皂苷和多糖尚未人工合成。因此三七细胞工程的研究是有意义的。三七组织培养细胞工程的研究,除我

们发表过简报^[5]外,尚未见报道过。

材 料 和 方 法

(一) 实验材料

用于诱导愈伤组织的实验材料是“文山三七”。挖取栽培三年生的三七,用我们过去的方法^[5-7]将根、块根、根茎、茎、叶柄、叶和花蕾分别进行愈伤组织的诱导。诱导培养基为附加2,4-D 2ppm、激动素0.5ppm的MS培养基^[8]。诱导在暗中26±1℃进行。

(二) 培养条件

根据不同的实验要求,采用不同的培养基、pH值、温度及光照或暗中进行,详见结果与讨论。实验均采用同一无性系,每次培养30天,用50ml三角瓶每瓶装培养

本文于1987年12月8日收到。

本文属中国科学院基金资助项目。

我所杨崇仁同志赠给皂苷成分Rg₁、Rb₁和Rh₁标准样品,特此致谢。

基20ml, 每处理重复5次。无性系的建立是将诱导的每一块愈伤组织分别一代代的继代培养, 下一代来自上一代的一块愈伤组织, 不使其混杂。30天转代一次, 这样就建立起多个愈伤组织无性系。无性系和实验培养同于愈伤组织诱导。

(三) 三七皂苷成分的鉴定

愈伤组织在60℃以下烤至恒重或冰冻干燥后打成细粉。用甲醇提取, 减压蒸去甲醇, 残渣使溶于水, 然后用正丁醇抽提得皂苷正丁醇溶液(糖类杂质留在水相中)。另一法是将上述残渣水溶液通过吸附树脂D柱层析, 用水洗去糖类杂质, 再用65%的乙醇洗脱被树脂吸附的皂苷, 减压蒸去甲醇, 残渣使溶于甲醇得皂苷甲醇溶液。将上述皂苷正丁醇溶液或甲醇溶液进行薄层层析, 载体为硅胶G, 推动溶剂有两个系统, 一是氯仿: 甲醇: 水 = 65: 35: 10, 另一是正丁醇: 醋酸乙酯: 水 = 40: 10: 50。层析时以经过鉴定的皂苷成分 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和 R_{h_1} 单体为标准样品同时进行。

(四) 生长和粗总皂苷含量测定

愈伤组织的生长按文献^[6,7]测定。生长以干重增加和生长速率两个指标表示。干重增加是经30天培养后总干重减去接种量, 表示干愈组织的得率。生长速率是30天培养后平均每一培养(20ml培养基)的干重换算成每天每升的愈伤组织干重增加的mg数, 以表示生长速度。粗总皂苷除以干重为基础的百分含量表示外, 还以每一处理的皂苷百分含量乘以总干量得出产率以表示每一处理的总皂苷得率来表示。

结果与讨论

(一) 愈伤组织的诱导和皂苷的初步

鉴定

为了获得较好的部位愈伤组织, 分别从三七的根、块根、根茎、茎、叶柄、叶和花蕾诱导了愈伤组织。这些愈伤组织的诱导频率和速率, 以茎、叶柄和叶最高最快, 其次是花蕾和根、块根和根茎诱导愈伤组织最低最慢。当这些愈伤组织无性系继代培养到第6代才进行培养实验、皂苷含量测定及皂苷成分鉴定。因为这时愈伤组织已经驯化而变得均一, 也排除了从原植物切段带来次级代谢物皂苷的可能性。

首先关心的是诱导出来的愈伤组织是否具有合成目的次级代谢物皂苷的能力。在我们过去的报道中^[5], 已初步看到三七根和茎愈伤组织中皂苷的组成都分别与它们的“母体”根和茎的组成相似, 且根、茎愈伤组织中均含有皂苷成分 R_{g_1} , 根愈伤组织中还含有 R_{b_1} 。但茎愈伤组织中是否含有 R_{b_1} 还不能确定, 为此采用了另外两种溶剂系统进行了薄层层析的鉴定(图版I)。三七的皂苷(总皂苷)由20几种皂苷成分(单体皂苷)组成, 我们只鉴定了其中主要成分 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和 R_{h_1} 。如果某种愈伤组织中没有这三种主要皂苷成分, 不等于没有别的皂苷成分。图版I表明, 三七根、茎、叶愈伤组织都具有合成皂苷的能力。根愈伤组织中的皂苷成分与原根不同, 没有 R_{h_1} , R_{b_1} 也只有痕迹不能确定其存在。叶愈伤组织中三种主要皂苷成分 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和 R_{h_1} 都不能确定其存在。只有茎愈伤组织中皂苷成分最多, 三种主要皂苷成分都有, 原茎中还不含有 R_{h_1} 。

中医是以块根商品入药, 三七植物粗皂苷含量以根茎最高^[10]。通常认为三七皂苷的合成部位是在根部, 这在整体植物的情况下和从图版I的结果看可能是这样。但在离体人工培养下的三七愈伤组织

却表现不同,上述结果再次证明了我们早期提出的植物培养细胞次级代谢的全能性^[1]、多条性的观点。

(二) 愈伤组织的初步选择

对于获得的6种愈伤组织的生长(如图1)来说都较缓慢,相对比较以茎、叶和

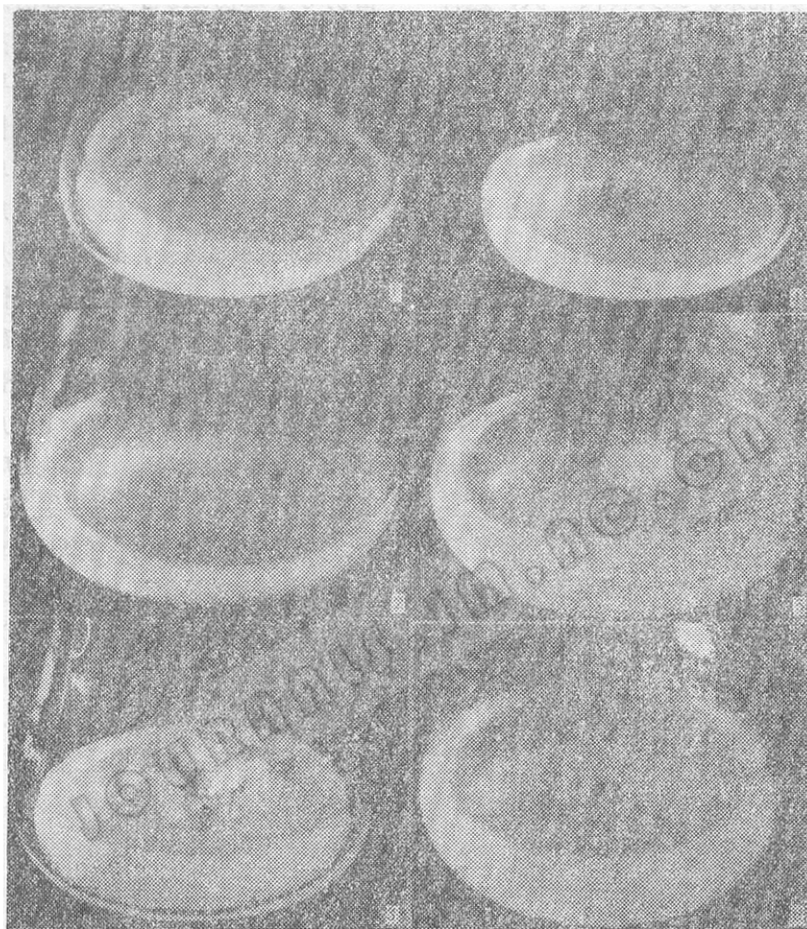


图 1 不同三七愈伤组织的培养
Fig.1 The culture of different calluses of *P. notoginseng*

- | | | |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. 根愈伤组织 Root-callus | 2. 块根愈伤组织 Root tuber-callus | 3. 茎愈伤组织 Stem-callus |
| 4. 叶柄愈伤组织 Petiole-callus | 5. 叶愈伤组织 Leaf-callus | 6. 花蕾愈伤组织 Flower bud-callus |

细胞根愈伤组织较快些。其次是叶柄和花蕾愈伤组织。块根愈伤组织生长最慢,几乎不生长。

原初培养(第6代)的这些部位愈伤组织的生长速率最高的茎愈伤组织为54.0mg干重/L/day。我们早期报道过三七愈伤组织中粗皂苷含量和粗皂苷元含量均超过原植物的块根,其中又以茎愈伤组织的含量更高^[5]。当时的测定方法是重

量法,含量的绝对值偏高,但相对比较还是可以的。现在用较新的方法测定粗皂苷含量的结果,仍以茎、根、叶愈伤组织含量较高。粗皂苷含量(第6代)最高的茎愈伤组织为干重的5.37%,仍超过了原植物(为干重的4.25%)。因此对三七根、茎、叶愈伤组织培养做了进一步的比较研究,结果三种愈伤组织中,仍以茎愈伤组织生长最快,干重增加和生长速率均最高

表 1 三七不同愈伤组织培养之间的比较

Table 1 The comparison between the different calluses culture of *Panax notoginseng*

愈伤组织 Calluses	干重增加 Increased dry wt. (mg)	生长速率 Growth rate(mg dry wt./L/day)	皂苷含量 Saponin cont. (%)	皂苷产率 Saponin yield (mg)
根愈伤组织 Root-callus	22.96	33.27	6.39	3.50
茎愈伤组织 Stem-callus	53.70	89.50	7.34	6.28
叶愈伤组织 Leaf-callus	34.68	57.80	6.04	4.02

(表 1)。其次是叶愈伤组织。根愈伤组织生长最慢。愈伤组织中粗皂苷含量也以茎愈伤组织最高。虽然根愈伤组织中粗皂苷含量高于叶愈伤组织,但由于生长低于叶愈伤组织,故皂苷产率(平均每瓶愈伤组织的皂苷总得率)也低于叶愈伤组织(表 1)。

综上所述,无论生长(图 1)速率和干重增加(表 1)、粗皂苷含量和产率(表 1)、粗皂苷元含量^[6]、主要皂苷成分 Rg₁、Rb₁ 和 Rh₁ 及其含量(图版 I)、皂苷组成(图版 I)还是诱导愈伤组织的频率及速率,都以茎愈伤组织更为优良。这样就选出了茎愈伤组织无性系做为今后三七细胞工程学的研究对象。

(三) 茎愈伤组织的初步培养

上述结果表明,相对比较茎愈伤组织好些,但就是茎愈伤组织的生长仍然相当缓慢,这成了三七细胞工程工业生产应用上的主要矛盾。为此,以三七茎愈伤组织为对象,以促进生长为目标进行了组织培养的研究。

1. 基本培养基的选择:为了找到较合适的基本培养基,选择了 Heller^[11]、MS^[8]、Miller、B5^[12]和 B5+N 等 5 种培养基进行对比试验。结果如表 2 所示,虽然茎愈伤组织的生长在这 5 种培养基上都不算好,但相对比较以 MS 培养基较好些。

表 2 培养基对三七愈伤组织生长的影响

Table 2 The influence of media on calluses growth of *P. notoginseng*

培养基 Media	干重增加 Increased dry wt. (mg)	生长速率 Growth rate (mg dry wt./L/day)
Heller	26.5	20.4
MS	33.8	26.5
Miller	37.0	32.4
MS	40.1	35.3
B5	27.0	32.9
B5+N	31.0	38.2
MS	43.0	54.0

2. pH 值的影响:培养基的 pH 值对三七茎愈伤组织生长的影响如图 2 所示。

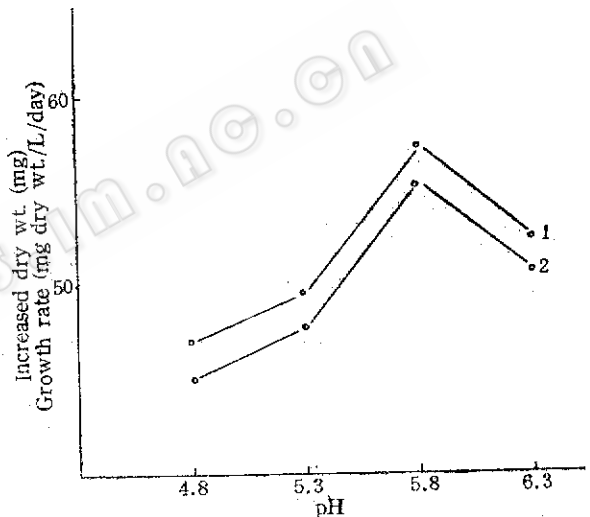


图 2 培养基 pH 值对三七愈伤组织生长的影响

Fig. 2 The influence of medium pH value on calluses growth of *P. notoginseng*

1. 生长速率 Growth rate
2. 干重增加 Increased dry wt.

愈伤组织的生长随 pH 值的增高(4.8—5.8)而增高。当 pH 值达 6.3 时生长又明显减慢。以培养基的 pH 值为 5.8 时较好。

3. 光照和温度的影响:温度对三七茎愈伤组织生长的影响是比较明显的。在 22℃ 到 26℃ 的温度范围内培养愈伤组织时,均能较好的生长。但当温度达 30℃ 时,愈伤组织的生长严重被抑制。光照对

愈伤组织的生长有促进作用,但不显著。温度和光照对三七愈伤组织生长的影响如表3所示。

通过以上研究,确立了三七细胞工程的研究以茎愈伤组织细胞体系为对象,以pH值为5.8的MS培养基为基本培养基,在26°C光照下进行培养。这样就建立起三七的组织培养。

表3 光照和温度对三七愈伤组织生长的影响
Table 3 The influence of light and temperature on calluses growth of *P. notoginseng*

生 长 Growth	光 照 Light	黑 暗 Dark		
	26°C	22°C	26°C	30°C
干重增加 Increased dry wt. (mg)	40.0	34.8	32.6	16.7
生长速率 Growth rate (mg dry wt./L/day)	50.9	41.8	40.7	20.9

参 考 文 献

- [1] Cheng Kuang-chih and Liang Cheng, Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Peking, pp.469—479, 1978.
- [2] 梁峥, 郑光植: 植物生理学通讯, (1): 14—21, 1981.
- [3] 田中治编: 第五回天然药物の開発と应用シンポジウム, pp.76—78, 1984.
- [4] 大浦彦吉等编: 药用人参, 共立出版株式会社, pp.194—209, 1981.
- [5] 郑光植, 梁峥: 植物学报, 20(4):373—375, 1978.
- [6] 郑光植, 梁峥: 植物学报, 18(2):163—169, 1976.
- [7] 郑光植等: 植物生理学报, 6(4):377—385, 1980.
- [8] Murashige, T. et al., *Physiol. Plant*, 15:473—497, 1962.
- [9] 章观德等: 药学报, 15(3):175—181, 1980.
- [10] 杨崇仁等: 药学报, 20(6):337—338, 1985.
- [11] 罗士韦等: 植物生理学通讯, (5):16—25, 1957.
- [12] Gambory, O.L. et al., *Exp. Cell Res.*, 50:151—158, 1968.

ESTABLISHMENT OF TISSUE CULTURE FROM *PANAX NOTOGINSENG*

Zheng Guangzhi Wang Shilin Gan Fanyuan

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Liang Zheng

(Botany Institute, Academia Sinica, Beijing)

Galluses were induced from root, root tuber, root-stem, stem, petiole, leaf and flower bud of *Panax notoginseng* and preliminary identification of medicinal compounds in these calluses was carried out by TLC method with subcultured calluses of the sixth generation. The results demonstrated that the callus had the capability to synthesize saponins including the ginsenoside Rb₁, Rg₁ and Rh₁. The quantity of saponins (5.37%, D.W.) in callus was higher than that in intact plant which was 4.25% (D.W.). The quantity of sapogenins in callus was also higher than that in intact plant. Growth rate of callus was 54.0mg (D.W.)/L/day. Among all of the calluses, the callus induced from

stem was the best not only in growth, the quantities of saponins and sapogenins but also in the composition of saponins.

MS medium was better for the growth of callus which was induced from stem. The optimum PH was about 5.8 and the optimum temperature was about 26°C. Light had only a little promotive effect for callus growth.

Key words

Panax notoginseng; callus; saponins; growth rate; cell technology

Explanation of plate

The comparison of TLC between the calluses and their intact plant.

3: Standard samples of R_{b1} , R_{g1} and R_{h1} (their R_f values from small to big) of saponins respectively

1,2,4: The calluses induced from root, stem and leaf of *P. notoginseng* respectively

5,6,7: Root, stem and leaf of intact plant respectively

The eluent systems were $n\text{-BuOH-AcOEt-H}_2\text{O}$ (4:1:5) (1-4) and $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (65:35:10) (5-7)

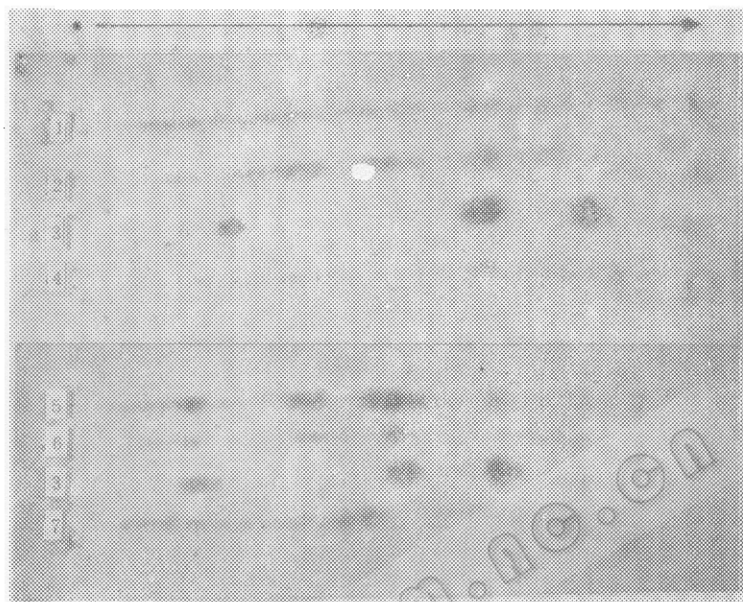
The coated TLC plate was silica G

郑光植等：三七组织培养的建立

Zheng Guangzhi et al.: Establishment of tissue culture from *Panax notoginseng*

图版 I

Plate I



余红等：质粒pXZ10145 DNA转化棒杆菌原生质体的研究

Yu Hong et al.: Transformation of *Corynebacterium* Protoplasts with plasmid PXZ10145 DNA

图版 I

Plate I

