

人参组织和细胞培养的研究Ⅱ.影响愈伤组织中 人参皂甙生物合成的因素

蒋 晶 王敬文

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所)

关键词 人参; 愈伤组织; 皂甙; 生物合成因素

引 言

自从1950年Arreguin 和 Bonner以生产橡胶为目的培养橡胶愈伤组织,特别是细胞液体培养成功以来,随着近代生物技术的发展,利用植物组织和细胞培养物生产化学物质越来越受到人们的重视。尤其是利用药用植物的组织和细胞培养物来生产其药效成份,更引起各国的极大关注,致使它发展成为植物组织培养在生产应用上的两大主流之一^[1]。正如各国学者们所评论的,这种技术在工业上生产有用的自然物质有着无限的可能性^[2],有可能发展成为新兴的产业部门。

人参是我国著名的贵重药材,早在1964年罗士苇等就报道了诱导出愈伤组织,以后日本、美国、德国、苏联、印度等国也开展了人参组织培养的研究工作,其中较为成功的是Furuya等人的研究^[3,4]。根据他们的专利及发表的论文,粗人参皂甙的含量,以干物重为基础,在愈伤组织(21.1%)、冠瘿组织(19.3%)及再分化根(27.4%)中都显著地高于天然根(4.1%)。

国内近年来相继开展了人参组织培养的研究工作,大多以品种改良为目的,以生产药效成份为目的的研究工作公开报道甚少。人参皂甙是在人参活细胞中合成的,人参细胞培养物具有它们“母株”植物合成皂甙的能力,这种合成人参皂甙的生化过程是受细胞的生理状态和外界环境影响的。本文报道各种培养因素对人参愈伤组织细胞合成和积累人参皂甙的影响。

材料和方法

人参材料和培养方法同前文^[5]。

人参皂甙的分离和制备 人参皂甙的分离和制备按逢煥诚法^[6]。将人参培养物在105℃灭活10 min,然后于60℃烘干,研磨成粉。精确称量人参培养物粉末,加入10倍量的乙醚,加热回流三次,弃去乙醚提取物得脱脂人参培养物粉末。然后加入10倍量甲醇,水浴回流4次,

每次 4 h, 合并甲醇提取液, 于 60 °C 条件下回收甲醇, 得甲醇膏状物。再加入样品 2 倍量的蒸馏水溶解膏状物, 过滤后弃去不溶物, 滤液中加入等体积用水饱和的正丁醇萃取 6 次, 合并正丁醇液, 减压回收正丁醇, 即得人参总皂甙粗制品。取人参总皂甙粗制品用少量甲醇溶解, 加入到约 10 倍体积的丙酮中, 析出黄白色沉淀, 滤集沉淀物。丙酮母液经回收丙酮后, 残留物再用少量甲醇溶解, 再倾入新丙酮中, 又析出沉淀。如此重复 3 次, 合并滤集的黄白色沉淀物, 减压干燥即得精制人参总皂甙量。

实验结果

(一) 外植体

人参皂甙普遍存在于人参植株体内, 但根、茎、叶等不同器官其含量差异很大^[7]。而由根、茎、叶外植体所诱导的愈伤组织, 在同样条件下培养 40 d, 其人参皂甙的含量却是基本相同的, 都显著高于“母株”体上的含量(表 1)。当把从各种外植体诱导出的愈伤组织诱导分化出再生根时, 再生根的人参皂甙含量又显著高于愈伤组织中的含量(表 1)。

(二) 2,4-D 浓度

在培养基中添加植物激素, 实验表明所试验过的几种激素中只有 2,4-D 与人参皂甙的生物合成有密切的关系。在无 2,4-D 培养基上人参培养物生长缓慢, 人参皂甙含量很低; 随着培养基中 2,4-D 浓度的增高, 皂甙含量也随之增高。当 2,4-D 浓度达到 2 mg/L 时, 尽管培养物生长有所减弱, 而人参皂甙含量还是略有增加。实验结果表明, 使人参愈伤组织获得最大生长量和最大皂甙量的培养基最适 2,4-D 浓度为 0.5—1.0 mg/L (表 2)。

(三) 光照

不同的光照强度对人参培养物的生长和人参皂甙的积累, 影响是不同的。在黑暗条件下人参愈伤组织能够生长, 组织细胞中也能合成和积累少量皂甙; 随着光强的增加组织生长越发旺盛, 人参皂甙含量大幅度增加。但光强超过 5 000 lx, 组织生长受到抑制, 相应地人参皂甙含量也下降。在 2 000 lx 光照条件下可获人参皂甙最大产量(表 3)。

(四) 人参培养物的生长和皂甙含量的变化

在固定培养基上培养人参愈伤组织, 每隔 5 d 取样测定其生长量, 同时测定皂甙的含量。测定结果表明, 人参愈伤组织皂甙含量的变化是与生长量的增大相并行的, 当培养 40 d 的组织块停止生长时, 其皂甙含量也增加到最大值(见图)。

表 1 人参不同外植体来源的愈伤组织和再生根的皂甙含量

外植体	种子	根	茎	叶	再生根
皂甙含量 (%)	15.2	17.4	16.7	17.8	22.6

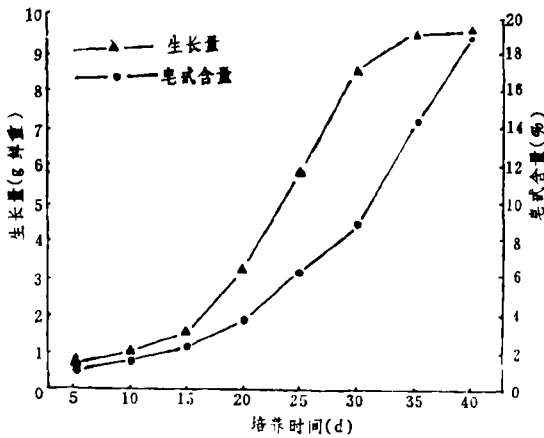
表 2 2,4-D 浓度对人参培养物皂甙含量的影响

2,4-D 浓度 (mg/L)	0	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0
皂甙含量 (%)	0.14	0.6	3.2	10.2	17.3	18.8	21.2	19.7

注: 培养 40 d。

表 3 光照对人参培养物皂甙含量的影响

光照强度 (lx)	黑暗	500	1 000	2 000	5 000	10 000
皂甙含量 (%)	6.7	8.2	14.8	19.6	13.3	8.6



人参培养物的生长和皂甙含量变化图

(五) 无2,4-D细胞系的驯化培养

作为药物使用时,人参培养物应该不含有2,4-D成分,或使其残留量减少到最低限度。在MS培养基中逐步减少2,4-D的添加量,对人参愈伤组织进行无2,4-D驯化培养,经18代驯化培养后能够获得在无2,4-D培养基上正常生长的无2,4-D细胞系,但其人参皂甙的含量低于需2,4-D细胞系的含量(表4)。另一方面,把无2,4-D细胞系在逐步增加2,4-D含量的培养基上继代培养,其合成和积累皂甙的能力又可重新恢复到原来的水平(表5)。

表4 人参无2,4-D细胞系的驯化培养

继代	第0代	第3代	第6代	第9代	第12代	第15代	第18代
2,4-D浓度(mg/L)	0.5	0.2	0.08	0.05	0.01	0.005	0
皂甙含量(%)	16.7	14.1	13.3	11.0	9.8	8.2	7.8

表5 2,4-D对人参无2,4-D细胞系皂甙含量的刺激作用

继代	第0代	第1代	第2代	第3代	第4代	第5代	第6代
2,4-D浓度(mg/L)	0	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
皂甙含量(%)	7.2	8.7	8.9	10.6	14.5	16.4	18.6

讨 论

(一) 许多种药用植物在人工培养条件下能够象在其“母株”上那样具有合成和积累药效成分的能力,这就表现出了培养细胞的药物生物合成的全能性。由不同器官作外植体诱导的人参愈伤组织培养物保持了合成人参皂甙的能力,尽管人参植株的各个器官合成人参皂甙的能力差别很大,但经脱分化诱导形成的愈伤组织合成人参皂甙的能力却是大致相同的,而且都比“母株”上各器官的合成能力更强。这不仅证明了人参细胞合成皂甙的全能性,而且也表明培养条件更适合这种合成能力的表达。人参植株各器官经脱分化后形成的愈伤组织保持了合成皂甙的能力,经过诱导进行了再分化而形成的再生根不仅仍保持着这种合成能力,而且这种能力又进一步被强化,使之超过了原器官和愈伤组织的合成能力。另一方面也有不少报道,相当数量的重要的药用植物在其人工培养细胞中完全不存在药用成分,或者是其药用成分在培养物中存在与否仍含糊不清。一般认为生物碱特别难以通过细胞培养物来生产,其原

因尚不清楚,对某些生物碱来说可能是由于生物合成途径中某一专一反应步骤受到代谢上的阻断,致使生物碱的生物合成减少或不能合成。

(二) 生长调节剂不仅影响培养细胞的生长和分化,而且也影响次生代谢。它们对次生代谢的影响随代谢产物的种类而有很大变化。实验表明,IAA、NAA和KT、6-BA 对人参培养物的生长有影响,而对人参皂甙的含量没有什么显著影响,只有2,4-D不仅影响人参培养物的生长和分化,而且也影响皂甙的合成和积累。逐步减低2,4-D添加量继代培养人参细胞,人参细胞能够被驯化在无2,4-D培养基上生长,但合成皂甙的能力明显下降了。在逐渐增加2,4-D浓度的培养基上继代培养,培养物的生长量有所增加,合成皂甙的能力逐步增强,最后恢复到原来的水平。这表明无2,4-D驯化培养所获得的细胞系不是突变型,而是一种生理适应过程。

参 考 文 献

- [1] 罗士韦, 1978, 植物组织与细胞培养研究工作的进展及应用, 植物生理学报, 4(1):91—112。
- [2] Misawa, M., 1977, Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application, 17—26。
- [3] Furuya, T. et al., 1973, Chem. and Pharm., Bullet., 21(1), 98—103。
- [4] Furuya, T. et al., 1973, Culture of Ginseng cell, Japan. Patent Appl., №48—31917。
- [5] 蒋晶等, 1988, 人参组织与细胞培养的研究 I. 环境因子对人参愈伤组织生长的影响, 林业科学研究, 1(6):681—686。
- [6] 逢焕诚, 1986, 人参, 科学普及出版社, 65。
- [7] 逢焕诚, 1986, 人参, 科学普及出版社, 87。

STUDY ON CULTURE OF GINSENG TISSUE AND CELL I. FACTORS INFLUENCING BIOSYNTHESIS OF GINSENG SAPONIN

Jiang Jing Wang Jingwen

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

Abstract Several factors influencing synthesis and accumulation of ginseng saponin in callus are studied. The abilities of synthesis of ginseng saponin in callus from different explants are same basically. Synthesis and accumulation of ginseng saponin are on a par with the increase of weight of callus. The content of ginseng saponin in cultures is the highest at 0.5—1.0 mg/L 2,4-D. The illumination at 2 000 lx is the most favourable for synthesis and accumulation of ginseng saponin. Free 2,4-D clone is induced by subsequent culture accompanied by reducing 2,4-D concentration gradually. Free 2,4-D clone can synthesize and accumulate ginseng saponin at a lower level, and the ability in synthesis and accumulation of saponin can be raised again up-to original level in medium contained 2,4-D.

Key words ginseng; callus; saponin; biosynthesis factors