

三七愈伤组织的培养*

郑光植 王世林

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

摘要 在MS培养基中加入不同浓度的KT和2,4-D, 综合考虑三七愈伤组织生长缓慢兼顾皂甙含量, 较合适的KT浓度为0.7ppm, 较合适的2,4-D浓度在2—3ppm之间。在培养基中补充各种添加剂, 结果以椰子乳和水解乳蛋白较好。综合生长和皂甙含量以20%的椰子乳和0.7%的水解乳蛋白较合适。从21个三七愈伤组织无性繁殖系中筛选出了5个较优的无性系, 特别是其中04号无性系更优, 无论生长速率还是总皂甙含量都更高。通过以上研究, 使三七愈伤组织的生长速率达220毫克/升/天, 是原初培养愈伤组织(54.0mg 干重/升/天)的4倍。愈伤组织中总皂甙含量高达13%, 是原初培养愈伤组织(5.37%)的2.4倍, 为原植物的3倍。从而证明了三七培养组织次级代谢的全能性是可调节的, 为三七细胞工程的工业生产应用打下了初步基础。

关键词 三七; 愈伤组织; 皂甙; 植物激素; 复合补充物; 无性系的选择

三七是我国特有的名贵中药, 主产云南, 其次广西。由于三七的医疗作用不断扩大, 因而供不应求、价格昂贵。三七的主要药用成分之一是皂甙。要实现三七次级代谢物皂甙细胞工程的工业化生产, 关键在于提高培养组织细胞的生长速率及其皂甙含量。皂甙含量能否提高取决于培养组织细胞是否具有次级代谢途径的多条性从而具有可调性。本文报道提高三七培养组织的生长速率及其皂甙含量的结果, 也能为次级代谢的多条性观点(1, 2)提供一些证据。

材 料 和 方 法

实验材料 用于本研究的实验材料是1985年诱导并经10—14次转移(C₁₀—C₁₄代)培养的茎愈伤组织无性系。继代培养30—40天转代一次, 培养基为每升附加2,4-D 2ppm、KT 0.5ppm的MS培养基(3)。培养在暗中16±1°C进行。

培养条件 基本培养基和培养条件同上。根据实验要求, 采用不同激素及其不同浓度, 不同添加剂及其不同浓度, 加入培养基进行培养调节试验。有的试验, 如添加物试验、KT浓度试验是在基本培养基的基础上进行。有的试验, 如2,4-D浓度试验是在KT浓度的基础上进行, 即在2,4-D浓度试验的培养基中加入了较合适的KT浓度0.7ppm,

1988-08-08收稿

* 国家自然科学基金资助项目

培养基的其它成分同于基本培养基。各试验的培养条件如接种量,也不可能完全一致,故重复性不是太好。

生长及总皂甙含量测定 愈伤组织的生长仍用过去的方法^[4],以干重增加和生长速率来表示。愈伤组织中总皂甙含量的测定用薄层层析比色法^[5]进行。除测定百分含量外,还以总皂甙产率,即平均每一三角瓶中总皂甙得率的毫克数,来表示总皂甙产率。

结果与讨论

培养中的激素调节

激素调节是植物组织和细胞培养中次级代谢调节的主要手段之一。曾做过不同激素对三七愈伤组织生长的影响试验,结果相对比较以KT和2,4-D较好,但不显著。因此进一步做了不同浓度的KT和2,4-D的对比试验。

不同浓度的KT对三七愈伤组织生长和皂甙含量的影响如图1所示。愈伤组织的干重增加和生长速率都随KT浓度的增加而增加,但当KT浓度达1.5 ppm以上时,生长又明显下降。对于愈伤组织生长的较适KT浓度是1.0 ppm。愈伤组织中总皂甙含量和总皂

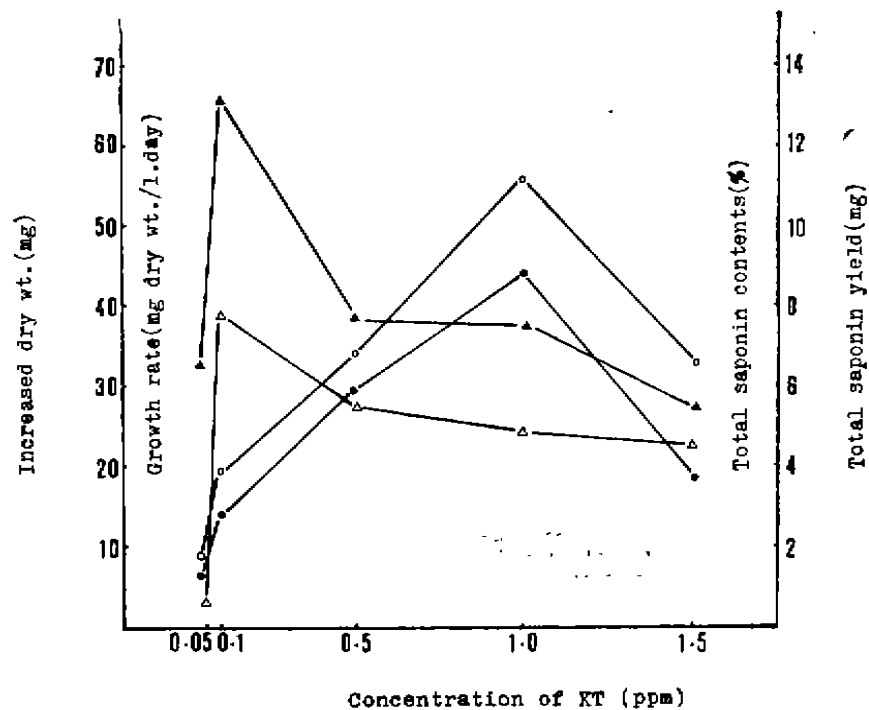


图1 不同浓度的激动素对三七愈伤组织培养的影响

接种量: 40 mg干重/20 ml培养基。

o—o—o 生长速率; ▲—▲—▲ 总皂甙含量; △—△—△ 总皂甙产率; ●—●—● 干重增加;

Fig. 1 The influence of different concentration of kinetin on calluses culture of *Panax notoginseng* [Inoculum quantities, 40 mg dry wt./20 ml medium.

甙产率则以0.1 ppm的KT时为高,再增加KT浓度,总皂甙含量及产率都明显下降(图1)。根据三七愈伤组织生长缓慢的特点,综合考虑生长及皂甙含量,对于三七愈伤组织培养较合适的KT浓度应为0.7 ppm。

在上述KT浓度试验的基础上,我们进行了不同2,4-D浓度对三七愈伤组织生长及皂甙含量的影响试验,即在2,4-D浓度试验的培养基中加入了较合适的KT浓度0.7 ppm,培养基的其它成分仍与基本培养基相同。

不同浓度的2,4-D对三七愈伤组织的影响如图2所示,与KT浓度的影响不同,无论愈伤组织的干重增加、生长速率还是总皂甙含量、总皂甙产率均随2,4-D浓度(0.5、1.0、2.0 ppm)的增加而增加,但当2,4-D浓度达3.0 ppm时,又随2,4-D浓度(3.0、4.0、5.0 ppm)的增加而下降。从图2可以看出,当2,4-D浓度为2.0 ppm或3.0 ppm时,无论愈伤组织的干重增加和生长速率还是愈伤组织中总皂甙含量或总皂甙产率均未达到峰值,因而对三七愈伤组织培养的适合2,4-D浓度应在2.0 ppm与3.0 ppm之间。

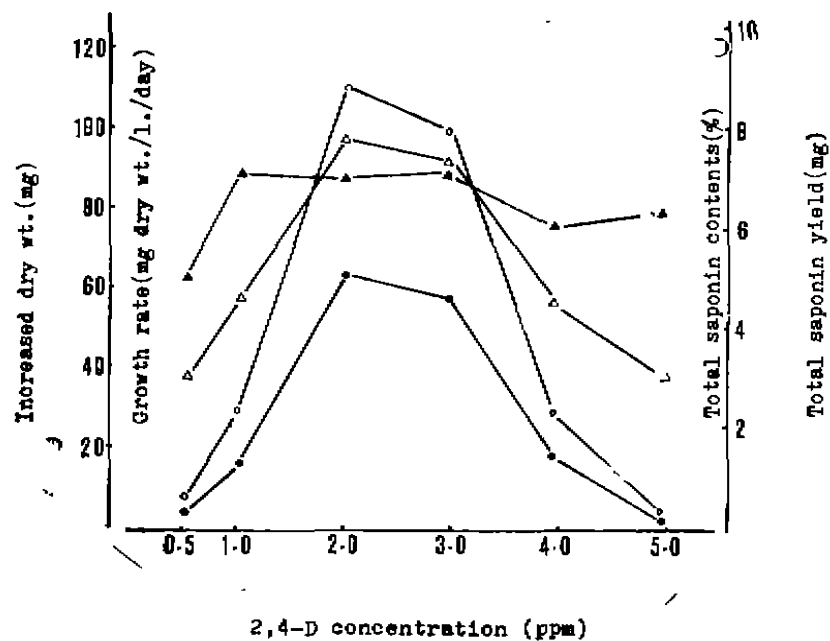


图2 不同浓度的2,4-D对三七愈伤组织培养的影响

接种量: 40毫克干重/20毫升培养基

—●—●—●—干重增加; ○—○—○—生长速率; ▲—▲—▲—总皂甙含量; △—△—△—总皂甙产率

Fig. 2. The influence of different concentration of 2,4-D on callus culture of *Panax notoginseng*

Inoculum quantities, 40 mg dry wt./20 ml medium.

上述结果表明,培养的三七愈伤组织细胞不仅具有次级代谢物皂甙生物合成的全能性,而且这种全能性是可以通过植物激素进行调节的。这在我们三分三的研究中^[6]更加明显。

培养中的营养调节

组织和细胞培养的优越性之一是在全人工控制的条件下进行^[7],不仅可以应用基

因、酶、激素、理化因子等等进行调控,而且可以在培养基中供给营养物质以满足其营养需要,进行次级代谢调节使其全能性表达出来。因此试验了四种复合营养物添加到培养基中,来观察对三七愈伤组织培养的影响,结果列于表1。

表1 添加剂对三七愈伤组织生长和总皂甙合成的影响
Table 1. The influences of complex complements on the growth and the total saponin synthesis of *P. notoginseng* calluses

添加剂 Complex comp.	干重增加 Increased dry wt. (mg)	生长速率 Growth rate(mg dry wt./1/day)	皂甙含量 Saponin contents (%)	皂甙产率 Saponin yield (mg)
椰子乳 Coconut milk(10%)	89.6	135.8	5.37	7.34
活性炭 Active carbon(0.2%)	-2.1	-3.2	4.20	1.47
水解乳蛋白 Lactalbumin hydrolysate(0.2%)	56.2	85.2	6.39	5.96
破碎花粉 Broken pollen(0.2%)	34.2	51.8	4.46	3.18
对 照 Control(0.0%)	28.9	43.8	4.76	3.14

接种量: 40毫克干重/20毫升培养基。

Inoculum quantities: 40 mg dry wt./20 ml medium.

在培养基中补充椰子乳(以下简称椰乳)、水解乳蛋白(以下简称乳蛋白)、破碎党参花粉三种复合添加剂时,对三七愈伤组织的干重增加、生长速率和愈伤组织中总皂甙含量、总皂甙产率均有较好的影响。其中以椰乳和乳蛋白的影响更加明显。破碎党参花粉对三七愈伤组织中的总皂甙含量似乎没有促进作用,但由于生长明显优于未加任何添加剂的对照,因而总皂甙产率也较对照稍高。

在三七愈伤组织培养中发现,每次的继代培养期间的后期时,生长明显减慢。考虑到是否由于培养愈伤组织产生的次级代谢物累积到一定量时的反馈作用抑制了生长的结果,因此在试验中(表1)设了一个添加活性炭的处理,试图去掉次级代谢产物的这种反馈作用。结果愈伤组织的生长速率和干重增加均为负数,这就表明不仅愈伤组织没有生长而且引起细胞的大量死亡。这可能是由于活性炭把培养基中的大部分营养成分吸收固定所造成的。愈伤组织的生长严重被抑制,因而愈伤组织中总皂甙含量及总皂甙产率也远低于对照。这些结果表明在三七愈伤组织培养中可能不存在次级代谢物的反馈作用,同时证明了营养对三七愈伤组织培养的重要性,进而证明次级代谢物皂甙是在三七愈伤组织细胞生长过程中合成的。三七愈伤组织细胞是具有次级代谢的全能性和可调性的。

表1中使用的椰乳和乳蛋白浓度不一定是合适的,为此做了不同浓度的椰乳(图3)和乳蛋白(图4)对三七愈伤组织培养的影响的对比试验。三七愈伤组织的干重增

加和生长速率都随椰乳浓度的增加而增加, 而愈伤组织中的总皂甙含量和总皂甙产率则在低浓度时 (5、10%) 增加, 高浓度时 (15、20、25%) 降低, 对于愈伤组织中皂甙含量较合适的椰乳浓度为10% (图3)。

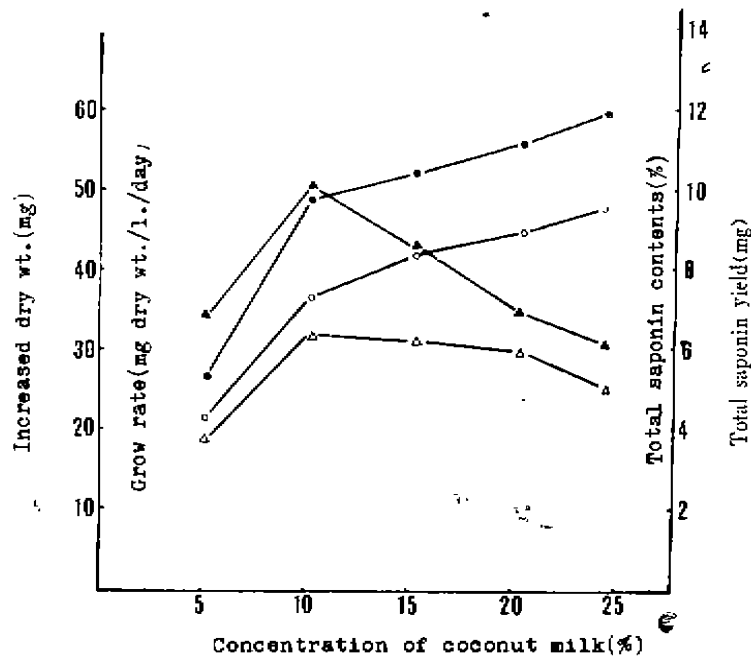


图3 不同浓度的椰子乳对三七愈伤组织培养的影响

接种量: 30毫克干重/20毫升培养基

·—·—·干重增加; ○—○—○生长速率; ▲—▲—▲总皂甙含量; △—△—△总皂甙产率

Fig. 3. The influences of different concentration of coconut milk on calluses culture of *Panax notoginseng* Inoculum quantities, 30 mg dry wt./20 ml medium.

对于植物次级代谢物细胞工程的工业生产应用来说, 细胞的生长速率及其次级代谢物的含量都十分重要。但对三七细胞工程来说皂甙含量固然还需进一步提高, 但其主要矛盾是生长缓慢。据此综合考虑生长和皂甙含量, 对三七愈伤组织培养较合适的椰乳浓度应为20%左右。当培养基中补充20%的椰乳培养三七愈伤组织时, KT的使用浓度为0.7 ppm 就更为合理, 因为椰乳中含有KT。

对三七愈伤组织的干重增加和生长速率, 乳蛋白浓度的影响不同于椰乳, 低浓度的乳蛋白 (0.1、0.5%) 促进, 高浓度的乳蛋白 (1.0、2.0、3.0%) 则抑制。对愈伤组织生长较合适的乳蛋白浓度为0.5% (图4)。对三七愈伤组织中的总皂甙含量则随乳蛋白浓度的增加而增加。愈伤组织中的总皂甙产率则因其生长被高浓度的乳蛋白 (1.0、2.0、3.0%) 抑制, 随乳蛋白浓度的增加而减少, 对皂甙含量较合适的乳蛋白浓度为1.0%。基于上述相同原因, 综合考虑生长和皂甙含量, 对三七愈伤组织培养适合的乳蛋白浓度应为0.7%左右。

乳蛋白对植物组织和细胞培养本是比较好的复合营养物质^[8], 它由20多种氨基酸组成,

其中某些氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸等等是抑制生长的^[8]，当乳蛋白达一定浓度其抑制生长的作用就表现出来（图4）。

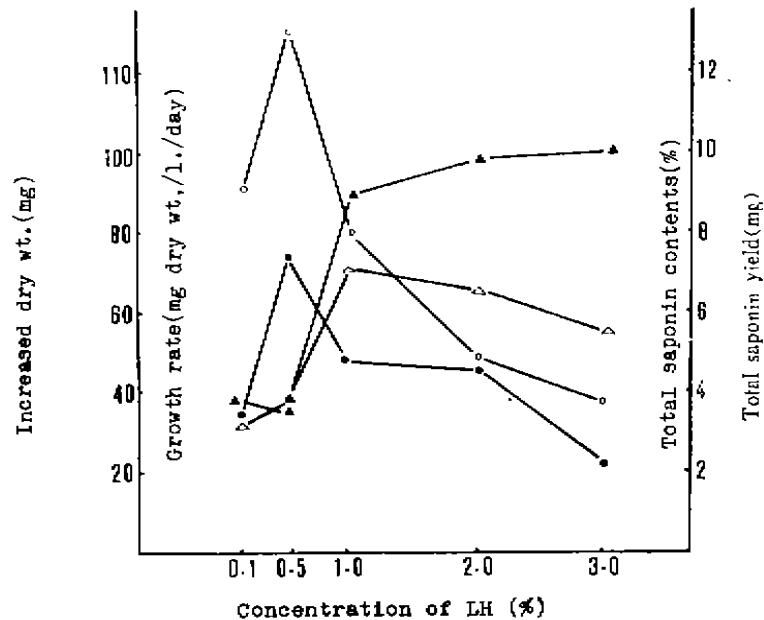


图4 不同浓度的水解乳蛋白对三七愈伤组织培养的影响

接种量: 30毫克干重/20 ml 培养基

·-·-·-干重增加; ○-○-○-生长速率; ▲-▲-▲-总皂甙含量; △-△-△-总皂甙产率

Fig. 4 The influence of different concentration of lactalbumine hydrolysate

on calluses culture of *Panax notoginseng*

Inoculum quantities, 30 mg dry wt./20 ml medium.

优良无性系的选择

在三七愈伤组织无性系的继代培养中，发现不同无性系间的生长相差很大，因此采用上述较好的试验结果为培养条件，即用补充KT 0.7 ppm、2,4-D 2.5 ppm、乳蛋白0.7%、椰乳20%的MS培养基对不同无性系进行了培养试验，结果列于表2。表2表明，生长速率最高的无性系可达到219.2毫克干重/升/天，最低的无性系仅49.0毫克干重/升/天。从21个三七茎愈伤组织无性系中，选出5个较优的无性系，即04号、02号、08号、14号和03号无性系，它们的生长速率都在100毫克干重/升/天以上（表2）。特别是其中的04号无性系更优，其干重增加为171.0毫克干重，生长速率高达219.2毫克干重/升/天，其总皂甙含量也达干重的12.8%。这样，我们以后的研究工作均以04号无性系为材料。

通过以上对三七愈伤组织培养中次级代谢调节研究，使三七愈伤组织的生长速率达220毫克干重/升/天，是原初培养愈伤组织的4倍。愈伤组织中总皂甙含量达干重的13%，是原初培养愈伤组织的2.4倍，是原植物的3倍。从而也证明了三七培养愈伤组织细胞次级代谢的全能性是可以调节的。

表 2 三七优良无性系的选择
Table 2. Selection of fine clone of *P. notoginseng*

无性系 编 号 clones No.	干重增加 Increased dry wt.(mg)	生长速率 Growth rate(mg dry wt./1/day)	无系性 编 号 clones No.	干重增加 Increased dry wt.(mg)	生长速率 Growth rate(mg dry wt/1/day)
01	50.4	61.1	11	74.5	95.5
02	126.1	161.7	12	53.2	68.2
03	79.9	101.2	13	42.1	54.0
04	171.0	219.2	14	92.8	120.0
05	68.4	87.7	15	55.8	71.5
06	75.3	96.5	16	74.8	96.3
07	58.0	74.4	17	74.0	94.9
08	100.8	128.2	18	41.1	52.7
09	48.1	61.7	19	38.2	49.0
10	72.8	93.3	20	53.0	67.9
			21	46.8	60.0

参 考 文 献

- 1 Cheng Kuangchih, Liang Cheng. Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, 1978 pp. 469—479
- 2 梁焯, 郑光植. 植物生理学通讯 1981(1), 14—21
- 3 Murashige, T. et al. *Physiol Plant* 1962(15), 473—479
- 4 郑光植, 梁焯. 植物学报 1976, 18(2), 163—169
- 5 章观德等. 药学报 1980, 15(3), 175—181
- 6 郑光植等. 植物生理学报 1982, 8(1), 53—58
- 7 郑光植. 云南植物研究 1988, 增刊 I, 127—136
- 8 郑光植, 梁焯. 植物学报 1977, 19(3), 209—215

CALLUS CULTURE FROM PANAX NOTOGINSENG

Zheng Guangzhi, Wang Shilin

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)

Abstract The growth rate was 54.0 mg D.W./l/day and saponin content was 5.37% for original culture callus from *Panax notoginseng*. As we considered low growth rate of *P. notoginseng* callus and saponin content, the suitable KT concentration and 2,4-D concentration should be 0.7 ppm and 2.5 ppm respectively when the different concentration of KT and 2,4-D were added in to medium. Coconut milk (CM) and laetalbumin hydrolysate (LH) had more efficient nutrient regulation in the callus culture. 20% CM and 0.7% LH were therefore more suitable both growth and saponin content respectively. Five fine clones had been selected from twenty-one clones of *P. notoginseng* callus, among which No. 04 which growth rate was as high as 219.2 mg D.W./l/day and that saponin content 12.8% was finest.

The growth rate of the callus was reached as high as 220 mg D.W./l/day through the studies on metabolism regulation in callus culture of *P. notoginseng* and this was four times as that of the original culture callus. The total saponin content in the callus was 13% which was 2.4 times as that the original culture callus and as three times of the original plant. The results confirmed that the totipotency of secondary metabolism in culture cell of *P. notoginseng* might be regulated.

Key words *Panax notoginseng*, Callus, Saponin, Phytohormone, Complex complement, Selection of clone