

西洋参组织和细胞培养研究进展

东北农业大学(哈尔滨 150030) 刘本叶* 张艳萍

摘要 概述国内外西洋参组织和细胞培养的药用研究和基础研究。

西洋参 *Panax quinquefolium* 是五加科人参属植物,具有健胃、降低血脂、镇静和造血等医疗作用,其滋补效果优于人参。随着植物组织和细胞培养技术的发展,许多研究者投身于西洋参组织和细胞培养研究,希望通过细胞工程新技术,一方面大量培养西洋参细胞,从中提取西洋参皂甙,使西洋参生产摆脱自然环境条件的限制而进行工厂化生产;另一方面,快速大量繁殖西洋参种苗,以满足生产需要,同时进行西洋参新品种的快速培育。两者都有一定的进展。

1 西洋参组织培养的药用研究

西洋参有效药用成分是皂甙(saponin)。如何提高培养物中皂甙含量和质量,扩大培养规模,最终工业化生产西洋参皂甙,是这一研究领域的重点。为获取西洋参皂甙的组织培养,主要研究了由外植体诱导愈伤组织,愈伤组织生长与皂甙合成关系以及由细胞悬浮培养向工业发酵罐生产过渡等。

1.1 西洋参愈伤组织诱导和培养

1.1.1 外植体:用于诱导愈伤组织的外植体有:不同参龄田间植株的根、根髓、茎段、叶片、叶柄、花药、花蕾、胚及胚培养幼苗的子叶和胚轴。其中嫩茎、幼叶、胚及胚培养幼苗的各部分均是较理想的外植体^[1~8]。愈伤组织诱导率在68.7%~97.7%。郭生桢报道,幼胚的后熟程度对愈伤组织诱导有明显影响。充分后熟的种胚愈伤组织诱导率为81.5%,而未充分后熟的种胚的愈伤组织诱导率仅为22.3%^[8]。我们的试验(未发表)表明,外植体取材时期对诱导愈伤组织影响极大,5月下旬到6月上旬取田间叶片,愈伤组织诱导率可达95%以上,而6月下旬以后取的田间叶片,愈伤组织诱导率仅为30%左右,而且愈伤组织生长缓慢。

1.1.2 培养基:西洋参组织培养中使用效果较好的基本培养基有FOX、6FV、B5、MS等。现在使用最多的是MS培养基^[2,4~9]。将MS基本培养基中的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 含量由370mg/L降低到92.5mg/L,可使嫩茎愈伤组织诱导率提高到100%,愈伤组织生长速度提高1.33倍^[10]。在培养基中附加大豆粉(0.5%),使愈伤组织中皂甙含量提高1倍^[3]。我们的试验结果表明,在培养基中添加水解酪蛋白(CH,500mg/L)对愈伤组织生长有明显的促进作用。

1.1.3 植物激素:西洋参愈伤组织的诱导和培养必须在有生长素的培养基中进行。NAA、IBA、IAA和2,4-D均可诱导外植体产生愈伤组织,其中2,4-D(1~2mg/L)的效果最好^[4,5,7,8]。我们的试验表明,2~5mg/L的IBA诱导愈伤组织的效果与2,4-D的效果类似。这对于解除人们对2,4-D毒副作用的疑虑是一个突破。细胞分裂素和生长素配合使用,对愈伤组织诱导和生长都有明显的促进作用。 GA_3 对愈伤组织生长也有促进作用。

1.1.4 培养条件:温度和光照对西洋参愈伤组织诱导和培养的影响,未见详细报道,一般认为较适宜的温度为23~27℃^[1~9]。诱导愈伤组织均用暗培养,愈伤组织培养在光下进行。根

*Address: Liu Benye, Department of Biotechnology, Northeast Agricultural University, Harbin

据我们的试验, 散射光下诱导出的愈伤组织质量好, 其生长速度和胚胎发生能力均高于暗培养诱导的愈伤组织。

1.1.5 皂甙含量分析: 分析结果表明: 西洋参愈伤组织具有合成西洋参皂甙的能力。在添加大豆粉(0.5%)的培养基上生长的愈伤组织中, 总皂甙含量高达8.5%^[3]。西洋参根愈伤组织继代培养到第5代进行测定, 愈伤组织中含有主要皂甙成分Rb₁、Rg₁及少量抗癌皂甙成分Rh₁, 总皂甙含量为6%^[11]。这些结果均高于天然西洋参根中的皂甙含量(4.9%)。

愈伤组织诱导和培养研究表明: 西洋参愈伤组织可在不含2,4-D的培养基上诱导和培养; 愈伤组织具有合成西洋参皂甙的能力, 皂甙含量高于天然西洋参根中的。因此, 用愈伤组织培养方法生产西洋参皂甙在理论上是可行的。但是愈伤组织固体静止培养细胞增殖慢, 不适于进行大规模生产。

1.2 西洋参细胞悬浮培养及大量培养: 西洋参细胞悬浮培养化固体愈伤组织培养生长速度提高近80%, 皂甙含量略有下降^[11]周立刚等进一步研究了氮源对西洋参细胞悬浮培养的影响, 结果表明, 将MS培养基中的KNO₃含量提高1倍, 同时去掉NH₄NO₃, 细胞的生长速度和皂甙产量比在正常MS培养液中提高65.1%和166.2%, 并确定西洋参细胞悬浮培养生产皂甙的最佳收获期在25d以上, 悬浮细胞合成皂甙高峰在细胞生长对数期稍后出现^[12]。周立刚还进行了西洋参细胞大量培养的工艺学研究, 确定适合于细胞悬浮培养的培养液体积的三角瓶容量的1/5~2/5; 培养液中氧溶浓度的输出随温度升高而升高; 细胞发酵培养较适合的搅拌速度为60r^[13]。方绮民等进行了西洋参细胞悬浮培养中皂甙生物合成的代谢调节研究, 结果表明: 葡枝根霉等6种真菌菌丝体能够促进皂甙合成; 人参寡聚糖既能促进细胞生长, 又能促进皂甙合成, 是1种理想的新型诱导因子^[14]。

以上实验结果为设计适合于西洋参细胞工业化生产西洋参皂甙提供了重要依据。

2 西洋参组织和细胞培养的基础研究

西洋参组织和细胞培养的基础研究主要是形态发生和植株再生, 这些研究服务于快速繁殖和育种。

2.1 胚状体的诱导: 在含2,4-D的培养基上, 可由幼胚、胚轴、子叶等外植体诱导出胚状体。与诱导愈伤组织相比, 诱导胚状体的培养基中不含细胞分裂素。在含2,4-D 0.5mg/L的培养基中加入0.1mg/L KT, 能明显地降低胚状体的发生频率。水解乳蛋白(LH)和水解酪蛋白(CH)对胚状体形成有促进作用, 而酵母提取物(YE)则降低胚状体的诱导率^[6]。

西洋参胚状体可在含2,4-D的培养基上形成并发育成熟的胚状体若不及时移出, 则又重新愈伤组织化, 并分化出更多的胚状体。胚愈伤组织在2,4-D培养基上分化胚状体的能力可保持2~3年^[5]。

西洋参胚状体发生是不同齿的。由同一块愈伤组织上可同时见到球形期心形期, 鱼蕾形期和子叶期的胚状体。西洋参胚状体发生是外起源的, 由靠近愈伤组织外层的细胞经脱分化启动形成, 但确定胚胎原始细胞的位置还有困难^[5]。

成熟的西洋参胚状体在适当的培养基上可萌发生成绿色小植株。但胚状体萌发成植株的频率仍很低^[8]。为此, 如何控制培养条件, 使愈伤组织上形成大量正常、健壮、同步的胚状体, 进而提高再生植株的频率, 是今后研究的重点。

2.2 不定芽的诱导: 用幼胚为外植体, 在含有细胞分裂素和生长素的培养基上, 由胚的子叶和胚轴处诱导出了一不定芽不定芽, 长至1~3片真叶时转入生根培养基中生根形成完整植株。

〔4〕。我们的试验表明,将胚状体转移到含有BA和NAA的培养基上以后,胚状体可萌发出芽,同时主芽基部可再生出多个不定芽。

西洋参组织和细胞培养工作在细胞大量培养生产西洋参皂甙方面虽已取得了较大进展,但目前仍不能付诸商业化生产。关键是在高产细胞系筛选方面工作很少,没有一个理想的高产细胞系。今后要加强这方面的工作。同时,在其它植物上的经验表明,同一细胞系很难既有高的增殖能力,又有高的次生代谢物生产能力,因为前者需要增加细胞的胚性属于脱分化范畴,后者需要增加细胞的分化程度属于分化范畴。不过在人参等植物上获得成功的毛状根培养技术给解决这一难题带来了希望。因为毛状根是1种器官,它集增殖和分化于一身。可以预期,这项技术在西洋参上应用会极大地推动西洋参皂甙工业化生产的研究和应用。

在快速繁殖方面,现在已经能够大量增殖试管苗,关键问题是要改进试管苗移栽技术,提高试管苗移栽成活率。这也是利用基因工程,细胞融合等技术培育新品种的必要基础。在育种方面,要积极开展花药培养、原生质体培养及细胞融合等的研究,这些技术的完善和应用,将会给西洋参育种工作带来生机。

参 考 文 献

- 1 Jhang J J, et al. In Vitro, 1974, 9 (4): 253
 - 2 郭生桢,等.中药材科技, 1979, 3: 5
 - 3 米蔚华,等.中草药, 1980, 11 (10): 47 1
 - 4 孙国栋.植物学通报, 1983, 1: 43
 - 5 桂耀林.植物学报, 1987, 29 (2): 223
 - 6 阎贤伟.植物生理学通讯, 1987, 1: 24
 - 7 Wang A. Hortscience, 1990, 25 (5): 571
 - 8 郭生桢.人参研究, 1991, 3: 5
 - 9 米蔚华.中草药通讯, 1978, 3: 39
 - 10 范代娣.生物技术, 1994, 4 (3): 23
 - 11 郑光植.云南植物研究, 1989, 11 (1): 97
 - 12 周立刚.生物工程学报, 1990, 6 (4): 316
 - 13 周立刚.生物工程学报, 1991, 7 (3): 230
 - 14 方缙民.生物工程学报, 1992, 8 (3): 261
- (1994-12-08收稿)

(上接第606页)

此有关这方面的研究工作应引起国家决策部门和相应研究机构的高度重视,为中草药在航天飞行中的应用尽早提供科学、准确、全面客观的实验数据。

参 考 文 献

- 1 沈羨云.工业卫生与职业病, 1991, 17 (2): 81
 - 2 王爱华.载人航天信息, 1994, 8: 1
 - 3 Atilov O Y, et al. Proceeding of the Fourth World Congress for Microcirculation. Tokyo, 1987, 18
 - 4 Goldstein M A, et al. J Appl Physiol, 1992, 73: 94
 - 5 Musacchia X J. Physiologist, 1992, 35 (1): 92
 - 6 向求鲁,等.中国应用生理学杂志, 1989, 5 (4): 364
 - 7 向求鲁,等.中华航空医学杂志, 1993, 4: 146
 - 8 刘新民,等.中草药, 1991, 22 (11): 501
 - 9 张瑞均,等.航天医学与医学工程, 1993, 6 (4): 290
 - 10 蓝景全,等.航天医学与医学工程, 1990, 3 (3): 157
 - 11 沈羨云,等.空间科学学报, 1993, 13 (3): 204
 - 12 孙亚志,等.航天医学与医学工程, 1993, 4 (6): 286
 - 14 史之祯,等.航天医学与医学工程, 1993, 1 (6): 12
 - 14 钱锦康,等.航天医学与医学工程, 1993, 1 (6): 6
 - 15 张瑞均,等.航天医学工程所论文汇编, 1986, 8: 212
- (1995-04-07收稿)