

# 人参组织和细胞培养的研究 I. 环境因子 对人参愈伤组织生长的影响

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; 环境因子; 生长速率

人参(*Panax ginseng*)是我国传统的名贵药材,不仅在临床医学上用于治疗多种疾病,而且在保健食品、保健饮料中的应用也越来越广泛。随着人们生活水平的提高,对人参的需求量也越来越大。由于人参栽培需要特殊的气候、土壤条件,我国只在部分地区种植,而且需要种植5—6 a才能收获,年产量不能满足人们的需求。为了改进人参药材的品质和增加市场供应量,有必要利用近代生物技术开展人参组织和细胞培养的研究,探讨人工培养工业化生产人参的技术路线。

早在60年代我国罗士韦<sup>[1]</sup>从人参叶柄成功地诱导出愈伤组织。70年代以来,国外已进行了人参细胞悬浮培养的研究,日本明治制药厂甚至在130 600 L大罐中成功地进行了大规模培养,但由于植物细胞大规模悬浮培养还存在若干难以克服的困难,实施商业化生产仍属将来的问题,许多研究者重又转向固相—气相培养和液相—气相培养的研究。在此同时国内也陆续开展了人参组织培养的研究,其主要目标是利用组织培养术改良品种,个别单位进行了人参悬浮细胞培养的研究,试图探索悬浮培养工业化生产的途径,取得了一定的进展。应用固相—气相培养的方式来探讨工业化生产的技术路线的研究尚未见详细报道。

## 一、材料和方法

人参(*panax ginseng*)种子购自黑龙江省宁安县江山娇实验林场。干燥种子用1 000 ppm赤霉素水溶液20℃浸种72 h,然后埋藏在湿砂中8—10℃催芽45 d。种子萌发至种壳裂口露白时,取一部分作为接种材料,其余的种植于湿润砂中,在10—15℃下继续发芽。当其幼根长至3 cm时,取一部分种子的初生根为接种材料。待苗长至6—8 cm时,取其幼茎、叶片为接种材料。将已取好的外植体先用自来水冲洗干净,再用肥皂粉液洗涤。冲净残留肥皂粉后,在无菌条件下,于70%酒精中漂洗20 s,冲洗掉酒精,再放入0.5%升汞中消毒3 min,用无菌水洗涤三次,三次洗涤时间共计不短于10 min,消毒后的材料可用于接种培养。基本培养基组成如下:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  370 mg/L、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  440 mg/L、 $KNO_3$  1 900 mg/L、 $NH_4NO_3$  1 650 mg/L、 $KH_2PO_4$  170 mg/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  27.8 mg/L、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$

22.3mg/L、KI 0.8 mg/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6 mg/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.02 mg/L、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2 mg/L、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25 mg/L、甘氨酸 2mg/L、肌醇 100 mg/L、V. B<sub>1</sub> 0.1 mg/L、V. B<sub>6</sub> 0.5 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、2, 4-D 0.01—8 mg/L、6-BA 0.01—2 mg/L、蔗糖 5—50 g/L、琼脂 10 g/L, pH 6.5。培养基经1.2 kg/cm<sup>2</sup> 30 min 高温灭菌后, 在无菌条件下接种。培养温度16—35 °C, 光照 0—20 000 lx。

## 二、实验结果

1. 外植体 人参的萌发种子、初生根、幼茎和叶片都可以诱导出愈伤组织(表1), 诱导率以幼茎为最高, 叶片最低。幼茎开始形成愈伤组织的时间比其他外植体早, 在激素浓度 2, 4-D 2 mg/L、6-BA 1 mg/L 条件下, 接种的幼茎 5—7 d 即见有膨大的愈伤组织出现, 而接种的种子约在14 d 后才形成愈伤组织。从不同外植体诱导出的愈伤组织, 其颜色、质地有所不同, 生长速度也有快慢。幼茎的愈伤组织生长快, 幼根和叶片的愈伤组织生长慢, 生长快的愈伤组织继代培养效果良好, 生长慢的不宜作继代培养的起始材料。

表1 不同外植体诱导的愈伤组织

外植体	接种数 (个)	形成愈伤 组织数	诱导率 (%)	愈伤组织颜色	愈伤组织质地
种子	200	133	66.5	黄—褐	疏松
初生根	200	167	83.5	黄—黄	密致
幼茎	200	183	91.5	米黄	疏松、粘着
叶片	200	82	41.0	黄—绿	密致

2. 碳源 从幼茎诱导的愈伤组织在以蔗糖、葡萄糖为碳源的培养基上生长良好, 碳源浓度和配比不同其生长速度有所不同。把正在旺盛生长的愈伤组织分割成约1 g 重的小块, 接种在试验培养基上, 培养6周后取出测定其鲜重。实验表明: 虽然单独用蔗糖作为碳源时, 3 %蔗糖最适于愈伤组织生长(表2), 但3 %蔗糖与0.5 %葡萄糖相配伍使用作为碳源时, 则对愈伤组织生长更有显著促进作用(表3)。

表2 不同浓度蔗糖对人参愈伤组织生长的影响

浓度 (%)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
接种瓶数	20	20	20	20	20	20
最大鲜重(g)	3.8	4.3	6.8	7.6	6.8	6.1
平均鲜重(g)	2.4	3.6	4.4	5.3	4.7	3.9
标准偏差	0.51	0.68	0.96	0.74	0.49	0.52
变动系数(%)	21.3	18.9	21.8	13.4	10.4	13.3

注: 2, 4-D 1 mg/l, 6-BA 0.5 mg/l, 培养6周。

3. 有机氮源 酪朊水解物(美国, Gibco)、牛肉浸膏(中国, 上海)和大豆水解物作为有机氮源。大豆水解物是自制的, 大豆粉经乙醚脱脂干燥后, 以4 N HCl 100 °C 回流水解4 h, 滤去残渣, 滤液用NaOH调至中性, 浓缩、干燥后备用。在基本培养基中加入各种有

表 3 葡萄糖不同添加量对人参愈伤组织生长的影响

添 加 量 (%)	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0
接种瓶数	20	20	20	20	20
最大鲜重(g)	7.4	8.3	6.7	5.2	4.6
平均鲜重(g)	5.0	5.6	4.6	4.3	4.3
标准偏差	0.68	0.77	0.85	0.35	0.52
变动系数(%)	13.6	13.8	18.5	8.1	12.1

注: 蔗糖浓度为 3%, 2,4-D 1 mg/l, 6-BA 0.5 mg/l, 培养 6 周。

机氮源, 在 25 °C 每天 16 h、5 000 lx 光照下培养愈伤组织。实验结果表明, 大豆水解物对愈伤组织生长有较好的促进作用, 牛肉浸膏不仅不利于生长, 而且有毒害作用, 培养一周后组织块发生褐变, 继而黑变而死亡(表 4)。

表 4 不同有机 N 源对人参愈伤组织生长的影响

有 机 N 源	接 种 瓶 数	最 大 鲜 重 (g)	平 均 鲜 重 (g)	标 准 偏 差	变 动 系 数 (%)
基本培养基	20	6.8	4.6	1.3	28.3
1%酪朊水解物	20	7.8	4.9	1.2	25.5
1%牛肉浸膏	20	—	—	—	—
1%大豆水解物	20	7.2	5.2	0.87	16.7

注: 2,4-D 1 mg/l, 6-BA 0.5 mg/l, 培养 6 周。

4. 温度 在恒温条件下培养, 人参愈伤组织对 28 °C 以上的温度非常敏感, 30 °C 持续培养一周后, 生长停止, 在 32 °C 时细胞开始死亡, 而对较低的温度有较好的适应性。人参组织生长的最适温度为 20—24 °C(表 5)。在较高温度下生长的愈伤组织色泽加重变褐, 在

表 5 温度对人参愈伤组织生长的影响

温 度 (°C)	16	18	20	22	24	26	28	30
接种瓶数	20	20	20	20	20	20	20	20
最大鲜重(g)	4.8	6.2	7.2	6.7	7.0	6.6	3.6	—
平均鲜重(g)	3.3	4.4	4.9	5.2	4.8	3.7	2.8	—
标准偏差	0.98	1.21	1.25	0.99	1.73	1.62	1.11	
变动系数(%)	29.7	27.5	25.5	19.0	36.0	43.8	39.6	

注: 2,4-D 1 mg/l, 6-BA 0.5 mg/l, 每天 16 h、5 000 lx 光照下培养 6 周。

最适温度下生长的其色泽为米黄色, 质地松脆。

5. 光照 人参愈伤组织在暗培养中虽能够生长, 但实验结果表明不同光照强度对其生长有明显的影响。5 000 lx 以上的光强不利于愈伤组织生长, 如果每天光照时间缩短为 8 h 以下, 可以减弱高光强的不利影响。实验中发现, 在 2 000 lx 光强下间歇照光(暗:光 = 1:2) 最适于人参愈伤组织生长(表 6)。

表6 光照对人参愈伤组织生长的影响

光 照	20 000 lx		10 000 lx		5 000 lx		2 000 lx		1 000 lx	
	8 h	16 h	8 h	16 h	8 h	16 h	8 h	16 h	8 h	16 h
接种瓶数	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
最大鲜重 (g)	2.4	—	3.3	—	4.2	3.4	6.2	7.1	5.1	6.0
平均鲜重 (g)	1.6	—	2.1	—	3.6	2.8	4.2	5.2	3.6	4.5
标准偏差	0.42		0.64		0.81	0.93	1.21	1.07	1.17	1.10
变动系数 (%)	26.3		30.5		22.5	33.2	28.8	20.6	32.5	24.4

注: 2,4-D 1 mg/l, 6-BA 0.5 mg/l, 24 ℃培养 6 周。

6. 激素 人参愈伤组织诱导和培养必须在基本培养基中添加植物激素, 研究结果证明只有 2,4-D 是必需的, 其余几种激素对人参愈伤组织没有明显的作用, 但 6-BA 可能在细胞中起激素平衡的作用, 对生长略有促进(表 7)。人参愈伤组织对 2,4-D 浓度变化不敏感, 在浓度相当宽的幅度内都能良好生长(表 8), 2,4-D 浓度还与人参皂甙的合成和积累有密切的关系(待发表)。

表7 生长调节物质对人参愈伤组织生长的影响

生物调节物质	接种瓶数	最大鲜重 (g)	平均鲜重 (g)	标准偏差	变动系数 (%)
2,4-D (2 mg/L)	20	6.7	5.2	1.13	21.8
6-BA (1 mg/L)	20	—	—		
2,4-D (2 mg/L) + (6-BA 1 mg/L)	20	7.6	5.7	1.87	32.8

注: 光照 2 000 lx, 16 h, 24 ℃, 培养 6 周。

表8 2,4-D 浓度对人参愈伤组织生长的影响

浓 度 (mg/L)	0	0.05	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0	5.0	8.0
接种瓶数	20	20	20	20	20	20	20	20	20
最大鲜重 (g)	—	2.6	5.8	7.4	8.1	6.9	5.3	3.7	2.5
平均鲜重 (g)		1.8	4.3	5.8	5.6	5.2	4.1	3.3	1.4
标准偏差		0.67	1.02	1.43	2.34	1.98	0.81	0.74	0.74
变动系数 (%)		37.2	23.7	24.7	41.8	38.0	19.8	22.4	52.9

注: 2 000 lx, 16 h, 24 ℃, 培养 6 周。

7. 生长曲线 选取第二代培养 25 d 的愈伤组织块接种在含有 3 % 蔗糖 + 0.5 % 葡萄糖、1 mg/L 2,4-D 的基本培养基上, 在 24 ℃ 和 2 000 lx 间歇光照下培养, 定时取样测定组织块的生长量, 据此绘出生长曲线图。从图 1 可以看出, 组织块约经 5—6 d 的静止期后开始缓慢生长, 约 10 d 后生长加速, 进入对数生长期, 约 30 d 后生长渐慢, 40 d 后生长完全停止, 继而组织块自内而外、自下而上发生老化和褐变。

8. 细胞悬浮培养 选取松软的人参愈伤组织放入灭菌的液体基本培养基中, 再加入经超滤消毒的果胶酶, 使酶浓度为 0.5 %。经振荡后细胞大部分由组织块脱落成单细胞和少量细胞团, 用 120 目尼龙滤布过滤去除大细胞团块, 在显微镜下计数(每毫升细胞数, 10 个细胞以

下的细胞团按单细胞计数)。然后接种到盛有 100 ml 培养液的 250 ml 三角瓶中,使细胞起始密度为 $10^5$ 个/ml。培养液中蔗糖浓度为 3%,2,4-D 浓度为 1 mg/L。在室内自然光和 20—25 °C 下振荡培养,每分钟往复振荡 90 次,每两天取样测定培养液细胞密度。悬浮培养细胞增殖变化为图 2 所示。

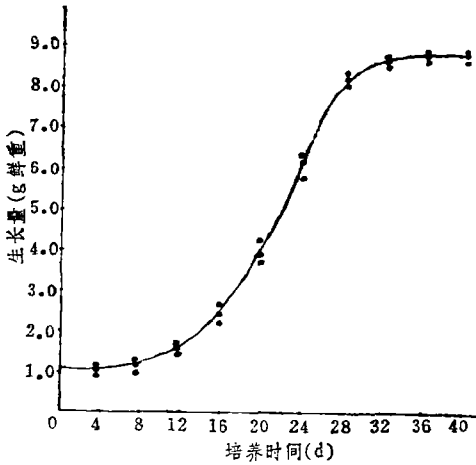


图 1 人参愈伤组织生长过程

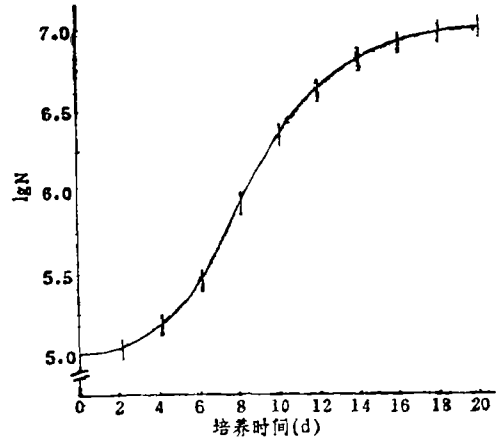


图 2 人参悬浮培养细胞增殖进程

### 三、讨 论

1. 人参的萌发种子、初生根、幼茎和叶片都能被诱导形成愈伤组织。叶柄也是诱导愈伤组织常用的外植体材料<sup>[3]</sup>。幼茎所形成的愈伤组织生长迅速、质地松脆。后来的研究结果(待发表)也发现,从质地松脆、生长迅速的愈伤组织中很方便地筛选到快速生长的细胞株系,而且其人参皂甙含量也较高。

2. 人参是喜阴植物,人参愈伤组织还保持着植株的习性。较低温度和弱光强对愈伤组织生长有利,较高温度( $>25$  °C)和较强光强( $>2000$  lx)对愈伤组织生长不利。但在连续黑暗中培养的愈伤组织不仅生长很差,而且其细胞中人参皂甙含量也很低(待发表)。可见,光照是人参愈伤组织细胞生长和合成人参皂甙的必要条件<sup>[5]</sup>。

蔗糖和葡萄糖都是人参愈伤组织生长的良好碳源,尤其 3%蔗糖与 0.5%葡萄糖配伍可使愈伤组织生长更快。这主要是由于缩短了愈伤组织生长曲线中的静止期和滞缓期,从而加速了生长进程。

有机 N 源看来不是人参愈伤组织生长所必须的 N 源。国外一些实验室施用牛肉浸膏培养人参组织,对生长有促进作用<sup>[3]</sup>,本实验中施用牛肉浸膏不仅不利于生长,甚至有很强的毒害作用,这有可能是由于其中的防腐剂成分所造成的。

2,4-D 是人参愈伤组织和悬浮培养细胞所必需的生长调节物质,而且 2,4-D 的浓度与细胞中人参皂甙的合成和积累密切相关(待发表)。在本研究中还发现在 2 mg/L 浓度下培养的人参组织有少量根分化出来,但其生长量也随之减少。在今后的研究中需要找出施用 2,4-D 的浓度临界值,以便既能促进组织生长,又能使细胞大量的合成积累有效成分(人参皂甙),

而且又能最大限度地减少人参产品中的化学污染成分。国外已有人进行人参无激素培养的驯化研究<sup>[2]</sup>，也有人设想把根癌杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的生长因子转移到人参细胞中而不再添加生长调节物质<sup>[4]</sup>。

3. 人参愈伤组织固相—气相培养和人参悬浮细胞液相培养,其生长进程基本是相同的,生长曲线都可划分四个阶段:静止期、滞缓期、对数增长期、休止期。在固—气相培养中,影响静止期、滞缓期长短的因素,除培养条件外主要取决于所接种的起始细胞的生理状态。如果起始细胞是处于对数增长期的活跃生长的细胞,大约10 d就可度过静止期—滞缓期而进入对数增长期;如果起始细胞是早已进入休止期的细胞,那么静止期—滞缓期甚至可拖延到20 d之久。在细胞悬浮培养中,影响静止期—滞缓期长短的主要因素是接种细胞的起始密度,如果起始密度低于某一临界值,甚至会使静止期无限地拖延下去直至细胞死亡。

人参细胞悬浮培养可以获得比固—气相培养大得多的生物产量。在固—气相培养中培养物重量在6周内一般增重4—5倍,而在液相悬浮培养中20 d内细胞数增殖80—100倍。但由于大规模悬浮培养在技术上和经济效益上还有一系列需要克服的困难,距实行商业化生产尚有相当一段距离,因而近期内研究人参组织固—气相培养的技术方法更具有现实意义。

#### 参 考 文 献

- [1] 罗士韦等, 1964, 植物生理学通讯, (2), 26.
- [2] Furuya, T. et al., 1983, Effects of auxins on growth and saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Plant Medica.*, 47(3):183—187.
- [3] Furuga, T. et al., 1973, Production of Ginseng radix, Japan patent (open)., 73—31917.
- [4] Rhodes, M. J. C., 1986, *Agricell Report.*, 7(5):34.
- [5] Yasuda, S. et al., 1972, Studies on the cultural conditions of plant cell suspension culture, in *Fermentation Technology Today*, Terui, G. Ed., Society Fermentation Technology, Osaka, Japan, 697.

A STUDY ON CULTURE OF *PANAX GINSENG*  
TISSUE AND CELL I. EFFECTS OF CULTURAL  
CONDITIONS ON GROWTH OF *PANAX GINSENG* CALLUS

Jiang Jing

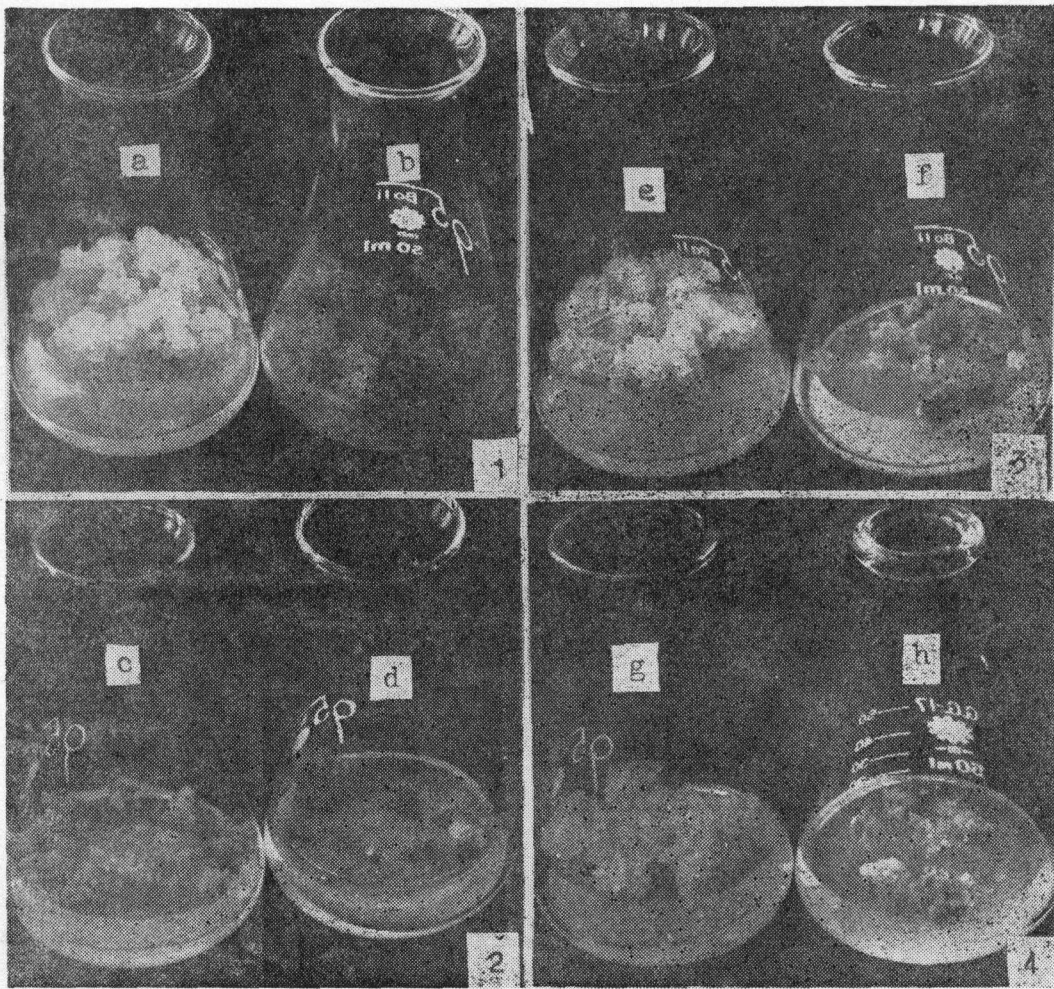
Wang Jingwen

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

Abstract

Callus was induced from *Panax ginseng* seed, primary root, young stem and leaf. Effects of temperature, illumination, carbon sources, organic nitrogen sources and plant hormone on its growth were studied. The callus induced from young stem is the best cultural material. The optimum temperature of culture is at 20—24 °C, and the optimum illumination is at 2 000 lx, and the best carbon source is 3 % sugar added with 0.5 % glucose. Organic nitrogen source is not necessary for growth of callus and suspension cell in *Panax ginseng*, and beef extract is injurious to *Panax ginseng* callus. 2,4-D is a necessary hormone for growth of callus and suspension cell, and the optimum concentration is at 0.5—1.0 mg/L. The fresh weight of callus increased 4—6 times in solid-gass phase culture for 6 weeks, and the fresh weight of suspension cultural cell increased 100 times for 20 days.

Key words: *Panax ginseng*; callus; environmental factors; growth rate



1. 培养时间对人参愈伤组织的影响

- a. 生长30 d 的人参愈伤组织;
- b. 生长45 d 后人参愈伤组织呈褐色;

2. 蔗糖浓度对人参愈伤组织的影响

- c. 含0.5%蔗糖培养基培养的人参愈伤组织生长不良;
- d. 含5%蔗糖培养基培养的人参愈伤组织生长不良;

3. 光照对人参愈伤组织的影响

- e. 2000 lx 光照培养的人参愈伤组织;
- f. 暗培养的人参愈伤组织生长不良;

4. 2,4-D对人参愈伤组织的影响

- g. 加1 mg/L 2,4-D的培养基培养的人参愈伤组织;
- h. 未加2,4-D的培养基培养人参愈伤组织生长不良。