

## 人参发根的诱导及其适宜培养条件的研究

赵寿经<sup>1\*</sup> 李昌禹<sup>2</sup> 钱延春<sup>1</sup> 骆晓佩<sup>1</sup> 张 昕<sup>1</sup> 王雪松<sup>1</sup> 康波愈<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(吉林大学生物与农业工程学院,长春 130022)

<sup>2</sup>(中国农业科学院特产研究所,吉林 132109)

**摘 要** 利用发根农杆菌  $A_4$  菌株在人参根外植体上直接诱导产生发根。在 1/2MS 固体培养基上建立起发根离体培养系,经连续多代的培养,发根仍保持旺盛生长状态。PCR 扩增结果表明,发根农杆菌  $R_1$  质粒的 *rolC* 基因已在人参发根基因组中整合并得到表达。液体培养基中发根生长速度约为固体培养的 2 倍。经对发根中人参皂苷含量及比生长速率的测定,筛选出高产发根系 R9923。利用 HPLC 法测定了 R9923 发根系中单体皂苷 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2 和 Rd 的含量,人参总皂苷含量达 15.2mg/g。确定 1/2MS 培养液(30g/L 蔗糖)摇床转速 110r/min、每 2 周更换一次培养液、继代培养时间 4 周,为人参发根生长适宜条件。探讨了培养容积、发根初始接种量以及分级放大培养工艺对发根大规模生产过程中生物产量和皂苷含量的影响。

**关键词** 发根农杆菌;PCR 扩增;人参皂苷;液体培养;分级放大培养工艺

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0215-06

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)侵染双子叶植物,将其所含  $R_1$  质粒的 T-DNA 片段整合到植物基因组中,并表达产生发根<sup>[1,2]</sup>。由于发根具有生长速度快、次生代谢产物含量高以及生化特性不易改变的特点,已成为继植物细胞培养后的又一新的生产植物有效成分的培养系统<sup>[3,4]</sup>。

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)是名贵中药材。人参皂苷是人参的主要有效成分,人参所表现出的药理活性主要是人参皂苷作用的结果<sup>[5,6]</sup>。目前,人参皂苷主要从栽培人参中提取,由于人参生长缓慢(6 年收获),且采用伐林栽参生产方式,所以生产成本高、资源破坏严重<sup>[7,8]</sup>。我国在人参发根的诱导及其培养方面虽然已开展了一些研究,但仍有许多工作需要完善<sup>[9]</sup>。

本文在前期研究工作的基础上<sup>[10-12]</sup>,利用发根农杆菌  $A_4$  菌株在人参根外植体上直接诱导产生人参发根。筛选出人参高产发根系 R9923,并对该发根系的液体培养条件进行了系统研究。通过对培养时间、培养液配比、培养液更换时间、培养液碳源种类含量、摇床转速以及分级扩大培养工艺等因素的比较研究,优化了人参发根液体培养条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌菌株及培养

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) $A_4$  菌株由中国农业科学院生物技术研究所贾士荣先生赠送,在 YEB 固体培养基上暗培养和 4℃ 保存,定期取出活化。感染外植体前,将活化的  $A_4$  菌株转入 YEB 液体培养基中 28℃、110 r/min 摇床上培养过夜,备用。

### 1.2 外植体的准备

取生长健壮的 2 年生(吉参 1 号人参品种)人参根 100 余株,用肥皂水洗净,70% 酒精及 0.1% 氯化汞消毒,无菌水冲洗 3 次,将参根切成 2~3mm 的薄片,置于无激素的 MS 固体培养基上预培养 1~2d。

### 1.3 发根的诱导、灭菌及在固体培养基上生长特性

利用无菌注射器将培养过夜的微量菌液直接滴加在上述预培养的根片上,在 25℃ 下暗培养诱导发根。计算发根诱导率(产生发根的外植体数/总外植体数)、发根诱导密度(发根总数/产生发根的外植体数)。将长至 1cm 左右的小发根切下,接于含有 500mg/L 羧苄青霉素的 MS 基本培养基上进行灭菌处理。每隔 5~7 天转移 1 次,直至无细菌生长。将

无菌的发根培养在不含激素的 MS 和 1/2MS 固体培养基上,每 4 周继代 1 次,测定生长量 and 人参皂苷含量,计算比生长速率(培养后发根鲜重/培养前发根鲜重),观察发根在固体培养基上生长特性。

#### 1.4 发根的 PCR 检测

采用 CTAB 法<sup>[13]</sup>提取发根及栽培人参(对照)基因组 DNA。取 0.5g 材料用液氮速冻,在研钵中将其磨碎,加入 90℃ 的 2 × CTAB 缓冲液提取。根据 Slightom 等<sup>[14]</sup>发表的 A<sub>4</sub> 菌株 Ri 质粒 T-DNA 序列,设计并合成一对 PCR 引物。引物 1: 5'CGAAGCTTC-TATATTCGCACAACG3'; 引物 2: 5'GCGAATTCGCGATGAAATCAAGTA TCC3'。PCR 扩增反应采用 100 μL 体系,依次加入模板 10 μL(50ng), 10 × PCR 缓冲液 10 μL, dNTP 混合液(各 2.5 μM) 8 μL, 引物 I 与引物 II 各 3 μL, Taq 酶(5u/μL) 0.5 μL。扩增程序为: 96℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 45s, 50℃ 退火 50s, 72℃ 延伸 70s, 循环 30 次,最后 70℃ 延伸 8min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, EtBr 染色分析扩增片段大小<sup>[15]</sup>。

#### 1.5 人参皂苷含量测定

人参单体皂苷含量测定采用高效液相色谱(HPLC)法<sup>[11]</sup>。LC-10ATVP 高压液相色谱仪测定,色谱柱: Irregular-HC18 粒径 10 μm; 流动相: A = 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>CN(80:20), B = H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN(15:85) 流速: 1 mL/min 室温, 检测波长: 203nm。总皂苷含量测定采用分光光度比色法<sup>[10]</sup>。

#### 1.6 人参发根的液体培养及高产发根系的筛选

将诱导的发根系培养在不含激素的 MS 液体培养液中,培养温度 25℃<sup>[10]</sup>,每 4 周继代 1 次。用灭菌滤纸吸干发根表面培养液,在无菌条件下称量接种时每瓶发根鲜重(g)和培养后每瓶发根鲜重,用这些数据计算生长量、比生长速率(培育后发根鲜重/培养前发根鲜重)。同时,计算人参皂苷含量和人参皂苷产量(发根产量 × 皂苷含量)。选择比生长速率和人参皂苷含量高的发根系扩大培养。

#### 1.7 液体培养条件的优化

将高产发根系 R9923 转至无激素的 MS、1/2MS 及 1/5 MS(KNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的浓度降低 5 倍)液体培养基上,分别在 25℃ 不同转速(80 r/min、110 r/min、140 r/min)的摇床上培养,培养液更换方式采用每 2 周更换 1 次和每 4 周更换 1 次两个处理;培养液中碳源种类及含量试验分别设 30g/L 蔗糖、15g/L 蔗糖和 30g/L 葡萄糖三个处理;接种量对发根生长影响试验,初始发根接种量约 1g、2g、3g 和 4g 四个处理;

扩大培养工艺试验设种子瓶容积 0.1L、次级培养瓶容积 0.5L 和生产瓶容积 2.0L 三步培养工艺,同时设计了每步培养时间、种子瓶接种量、次级培养瓶接种量和生产瓶接种量对发根放大培养的影响。

## 2 结 果

### 2.1 人参发根的诱导及杀菌培养

接菌培养 5~6 周后,在一些人参根组织块的切面上长出白色小发根(图 1)或瘤状小突起。而其它处理的根组织切面上则无发根及小突起产生。经统计,在 60 个根外植体中共有 11 个外植体诱导出 19 个发根,诱导率为 18.3%,发根诱导密度为 1.72。将长至 1cm 左右的小发根切下,接于含羧苄青霉素的 MS 基本培养基上灭菌培养。每隔 5~7d 转移 1 次,直至无细菌为止。其中有 3 个发根在杀菌过程中坏掉,而共获得 16 个无菌发根。

### 2.2 人参发根的固体培养特性

将杀菌后的发根转至不含激素的 MS 及 1/2MS 基本固体培养基上继代繁殖。完全无菌的发根在无激素的固体培养基上经连续多代(5 代)的培养,始终保持初始时的生长茂盛,且分支性强、丛生、无向地性的特性(图 2)。尽管发根在 1/2MS 固体培养基上的生长状况与在 MS 固体培养基上的生长状况基本相同,但由于 1/2MS 培养基成本低于 MS,因此具有成本低的优点。

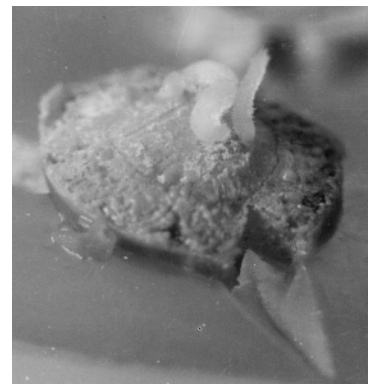


图 1 经发根农杆菌 A<sub>4</sub> 菌株侵染人参根外植体产生的发根

Fig.1 Hairy roots from explants of ginseng root transformed by A<sub>4</sub> strain

### 2.3 发根中 rolC 基因的 PCR 扩增

rolC 是发根农杆菌 Ri 质粒 T<sub>L</sub>-DNA 上决定生根的一个基因。我们根据合成的一对 rolC 基因引物,应用 PCR 仪以人参发根基因组 DNA 为模板,扩增出 rolC 基因。根据所设计的引物判断,扩增的目的基

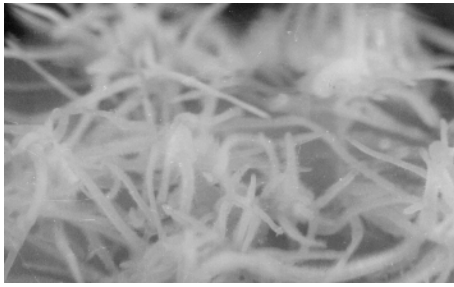


图2 发根在 MS 固体培养基上的生长状况及特性

Fig.2 State and feature of hairy roots on MS medium

因应为 872bp 的特异产物。经 3 次重复实验,结果在 1% 琼脂糖凝胶上,用 DNA marker 2000 标记,可见一条约 0.8kb 的泳带(图 3)。证明了本试验由发根农杆菌 A4 菌株介导产生的人参发根,确实已被 TL-DNA 所转化。

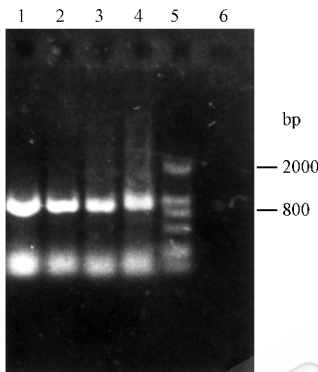


图3 人参发根中 *rolC* 基因的 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification of *rolC* gene in ginseng hairy roots genome

1 2 3 hairy root R9912, R9923 and R9915;  
4 :A<sub>4</sub>Ri plasmid 5 :molecular weight marker;  
6 non-transformed ordinary ginseng roots

## 2.4 人参发根的液体培养及高产发根系的筛选

实现人参发根大规模液体培养,是人参皂苷工厂化生产的关键。我们对主要人参发根系在固体及液体培养基上生长情况的调查结果表明,发根在液体培养基上的比生长速率约为固体培养基的 2 倍。

通过对生长在相同液体培养条件下的 16 个发

表2 培养 1 至 4 周发根 R9923 系中单体皂苷与总皂苷含量

Table 2 Total ginsenoside and monomer ginsenoside content in hairy root R9923 cultured from 1 to 4 weeks

Culture time (week)	Rg1 (mg/g)	Re (mg/g)	Rf (mg/g)	Rb1 (mg/g)	Rc (mg/g)	Rb2 (mg/g)	Rd (mg/g)	Total ginsenoside (mg/g)
1	6.25	4.68	0.88	3.30	0.83	1.18	1.43	18.55
2	5.56	3.28	0.63	2.25	0.75	0.90	1.63	15.00
3	7.23	3.73	0.65	2.88	0.95	1.18	2.25	18.87
4	5.75	3.80	0.55	2.35	0.85	0.93	1.60	15.83

根系比生长速率及人参总皂苷含量的测定,发现发根系间在这两个性状上存在着一定差异。表 1 列出 3 个具有较高生长速率和人参皂苷含量的发根系,其中发根系 R9923 具有最高的生长速率,在连续培养 4 周后生长量比最初提高了 28.8 倍,人参皂苷产量(比生长速率 × 总皂苷含量)也高于其它发根系。说明 R9923 是一个生长速度快、皂苷含量高的高产发根系。

对生长 1~4 周的高产发根系 R9923 主要单体皂苷含量进行了 HPLC 测定。结果表明(见表 2),发根中含有检测的 7 种单体皂苷,总皂苷的含量达 18mg/g,与栽培 3 年生人参所含总皂苷含量相当<sup>[10]</sup>。由表 2 还可以看出,发根培养过程中的皂苷含量基本保持稳定,并随培养时间的延长总皂苷含量有增加的趋势,但同时也存在高-低-高-低的含量变化,这种变化与二周更换一次培养液相吻合,可能与培养液中营养成分的充足与否有关。

表1 人参主要发根无性系的比生长速率及人参总皂苷含量  
Table 1 Specific growth rate and total ginsenoside content of main ginseng hairy root clones

Hairy root Strains	Growth rate	Dry weight of hairy roots/ (g·L <sup>-1</sup> )	Total ginsenoside	
			Content/%	Yield/(g·L <sup>-1</sup> )
R9912	25.82	22.2	1.14	0.253
R9923	28.80	28.4	1.52	0.432
R9948	21.23	18.8	1.56	0.293

## 2.5 人参高产发根系 R9923 液体培养条件的优化及扩大培养工艺

2.5.1 培养液配比和摇床转速、培养液更新时间对发根生长的影响:以选择的 R9923 人参高产发根系为试验材料,通过不同液体培养基配比(MS、1/2MS、N/5MS)和不同摇床转速(80r/min、110r/min、140 r/min)对发根比生长速率影响的研究,发现人参发根在 1/2 MS 液体培养基和 110 r/min 转速的摇床上的比生长速率较大(表 3)经连续 14 d 的培养,发根

比生长速率达到 7.97。最短加倍时间仅为 5 d 左右。

表 3 液体培养条件对人参发根 R9923 比生长速率的影响\*

Table 3 Effect of liquid culture factors on specific growth rate of ginseng hairy root

Culture medium	Rotatory speed of shaker/(r/min)		
	80	110	140
MS	7.55 ± 0.7	7.97 ± 1.3	7.68 ± 0.9
1/2MS	7.28 ± 0.9	7.52 ± 0.8	7.36 ± 1.1
N/5MS	5.15 ± 1.0	5.35 ± 1.2	5.42 ± 0.7

\* Data for 14 day. Fresh weight of the hairy roots before culture was about 1.0g

如果以培养天数(d)为横坐标,发根的生物产量为纵坐标作一生长曲线(如图4所示),我们不难看出:人参发根的生长可基本分成3个阶段,即前2周(0~14 d)的快速生长阶段,3~4周(14~28 d)的中速生长阶段和4周后的慢速生长阶段。所以,人参发根液体培养的最佳继代培养时间为4周。如果两周后更换新培养液,则发根生长速率比不更换培养液的处理要高。可见,在人参发根液体培养时每2周更换一次培养液,可以获得更高的生长速率和生物产量。

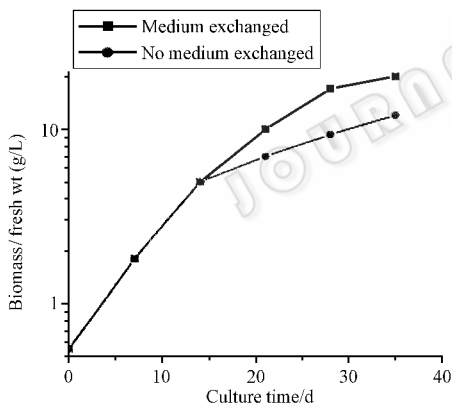


图4 人参发根在液体培养条件下的生长曲线

Fig.4 Growth curve of ginseng hairy roots in liquid-culture condition

2.5.2 培养液糖种类、含量、培养容积及接种量对发根生长的影响:分别以蔗糖和葡萄糖为碳源,进行了4周的培养。结果表明,添加蔗糖的处理在发

根生物产量和人参皂苷含量上比添加葡萄糖的处理高出很多。蔗糖的含量以 30g/L 的处理优于 15g/L 的处理,见表4。

为了确定不同培养容积对人参发根生物产量与人参皂苷产量的影响,在初接种量基本相同的条件下,分 100mL、250 mL 和 500 mL 三种培养瓶,在 1/2MS 培养液中,25℃,110r/min 的摇床上培养 4 周。结果表明(见表5)随着培养放大规模的提高,初始接种量的大小对发根生物产量和人参皂苷产量的影响也越来越重要。同时,发根在液体培养条件下所受的剪切力、流体特性和空气溶解量等因素也会随培养容积的提高发生改变。

表4 糖种类含量对发根生物产量和皂苷含量的影响  
Table 4 Effect on biomass and ginsenoside content of hairy roots by different carbohydrate

Treatment		Hairy roots		
		Dry weight (g/L)	Ginsenoside /%	Ginsenoside yield (g/L)
Glucose	30g	3.527	0.442	0.016
Sugar	30g	10.754	1.695	0.182
Sugar	15g	5.505	1.082	0.059

适宜接种量试验在 100mL 培养瓶内进行,设计接种量分别为 1g、2 g、3 g 和 4 g,每个处理 5 瓶,连续培养 4 周,中间更换培养液 1 次。结果如表 6 所示,尽管随着初始接种量的提高,发根比生长速率有所降低,但总的生物产量是与初始接种量成正比的。所以,在扩大培养时,应随着培养容积的增大,适当增加初始接种量,以获得较高的发根生物产量。

2.5.3 人参发根放大培养生产工艺:由以上研究结果看出,人参发根培养要获得较高的生物产量及皂苷生产能力,必须进行分级放大培养,并确定分级培养时间、培养容积、初始接种量以及培养液更换方式等参数。本实验确定三级培养方式,种子瓶容积 0.1L,次级培养瓶容积 0.5L,生产瓶容积 2.0L(见图5)。根据发根前两周为快速生长期的特性,并免去更换培养液的麻烦,确定前两级的培养时间为 2 周;第三级培养时间为 4 周,培养 2 周后更换 1 次培养液。在这些基本参数确定后,不同容积培养瓶的发

表5 不同培养容积下人参发根的生物产量和人参皂苷含量

Table 5 Biomass and ginsenosides content of hairy roots in different culture volume

Culture volume/mL	Average first-weight/g	First-weight/(g/L)	Biomass fresh weight/g	Biomass/(g/L)	Ginsenoside content/%
100	1.34	13.40	15.72	157.2	1.04
250	2.95	11.80	36.01	144.0	0.95
500	6.13	12.26	53.90	107.8	0.75

根投放量,便成为控制最终产量的重要环节。

表 7 列出三级放大培养过程中不同接种量对发根终产量影响的结果。按该放大培养工艺,在平均初始接种量约 4g,次级接种量 30g 左右,生产瓶接种量约 60g 的情况下,最终发根产量(鲜重)可达 270g 左右。在具体操作时,应设立 3 个以上种子瓶,为次级培养提供充足的接种量。

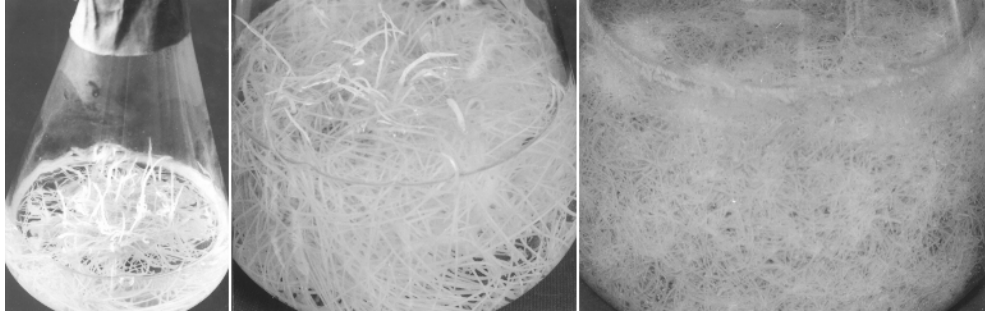


图 5 人参发根三级放大培养及发根在液体培养液中的生长状态

Fig.5 Three steps culture and growth state of ginseng hairy roots in liquid culture

表 7 发根放大培养过程中接种量与生物产量间的关系

Table 7 Relationship between inoculation and biomass in the scale-up process of hairy roots

Treatment	0.1L volume						0.5L volume			2.0L volume		
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	①	②	③	I	II	III
Inoculation(g)	4.38	3.73	3.78	4.20	4.83	2.76	10.59(1)	20.24(2+3)	33.38(4+5+6)	28.95	37.58	59.36
2weeks yield(g)	10.59	10.54	9.70	10.56	13.72	9.10	28.95	37.58	59.36			
4weeks yield(g)										108.20	159.50	270.10

### 3 讨论

利用生物工程技术生产天然药用植物的有效成分,是药用资源植物可持续发展的有效途径之一。我们利用发根农杆菌诱导人参根外植体成功,获得具有生长速度快、人参皂甙含量高的人参发根系,并取得小规模人参皂苷工厂化生产成功,对推动我国人参产业的可持续发展,促进高新技术在人参生产上的应用,以及探索人参新的药用资源,具有一定的理论和现实意义。

A4 菌株为野生型农杆菌,本试验中表现出较好的致病性。由于野生型农杆菌在土壤中对双子叶植物根的侵染是普遍存在的,因此, A4 菌株对人参的遗传转化在某种程度上讲,比人为改造的农杆菌要安全得多。人参药用部位为根部,根据药用植物有效成分器官的专一性,以根为外植体诱导发根在人参有效成分生产上将具有很重要的意义。据有关报道<sup>[16]</sup>,一般植物在感染发根农杆菌后 2~4 周即可长出发根。本试验中,发根出现的高峰一般在第 6 周,比一般双子叶植物要晚 1 倍左右,可能与人参属植物生长缓慢的特点有关。

表 6 不同接种量对培养 4 周的发根生物产量的影响

Table 6 Effect on biomass of hairy roots with different inoculation cultured 4 weeks

Inoculation/g	Specific growth rate	Fresh weight/g
1.0	13.76	6.878
2.0	13.24	13.236
3.0	13.09	19.632
4.0	10.74	21.484

发根在液体培养条件下的生长速度、药用有效成分含量,以及后代产量的稳定性等,是生物工程生产天然药用植物有效成分的关键。本文通过对诱导的不同发根系比生长速率、人参总皂甙含量、主要单体皂甙含量的测定,筛选出具有生长速度快、人参皂甙含量高的高产人参发根无性系 R9923,并通过本研究基本确立了人参发根适宜液体培养条件。实现人参发根大规模培养的另一个主要问题是发根的不易流动性,为发根连续培养过程中的转移带来困难,易造成污染。所以,进一步研究适于发根大规模培养装置,提高其大规模培养的生产效率和有效成分含量,就显得十分重要。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] White FF, Nester EW. Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol*, 1980 **41**: 1134 - 1141
- [2] Chilton MD, Tepfer D, Petit A et al. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 1982, **29**: 432 - 434
- [3] Hu ZB(胡之璧), Alfermann AW. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 1993 **32**(2): 699 - 703

- ginseng transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep*, 1987, **6**: 449 – 453
- [ 5 ] Wang TS(王铁生). Chinese Ginseng: Liao Ning: Liao Ning Science and Technology Press, 2001, pp. 1 – 53
- [ 6 ] Wang BX(王本祥). Advance in Ginseng Research: Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1991 pp. 22 – 36
- [ 7 ] Yu DR(于得荣), Zhao SJ(赵寿经), Cao XY(曹秀英) *et al.* Comparative studies on physical and chemical properties of agricultural soil and high-yield humus soil of ginseng. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 1990, **27**(2): 228 – 232
- [ 8 ] Zhao SJ(赵寿经), Li FY(李方元), Liu YZ(刘云章) *et al.* Studies on selection theory for high-yield variety of Panax ginseng and breeding of Jishen1. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 1998, **31**(5): 56 – 62
- [ 9 ] Chang YC(常钰), Liu D(刘涤), Hu ZB(胡之璧). Progress of Large-scale Culture of Plant Cells and Organs. *Biotechnology Information*(生物技术通报) 2001, **16**(1) 31 – 36
- [ 10 ] Zhao SJ(赵寿经), Yang ZK(杨振堂), Li CY(李昌禹) *et al.* Selection and high-efficient culture of high-yielding hairy root clone of ginseng. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2000, **33**(5): 103 – 105
- [ 11 ] Zhao SJ, Yang ZT, Li CY *et al.* Genetic transformation and *in vitro* hairy roots culture of ginseng. *Journal of Tropical Medicinal Plants*, 2001, (2): 259 – 264
- [ 12 ] Zhao SJ(赵寿经), Li CY(李昌禹), Qian YC(钱延春) *et al.* Impact of T-DNA on ginsenosides in ginseng hairy roots cloning and sequence analysis of *rolC* gene. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2003, **11**(3) 249 – 252
- [ 13 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 14 ] Slightom JL, Mylene DT, Lise J *et al.* Nucleotide sequence analysis of T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid identification of open reading frames. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, **261**(1): 108 – 121
- [ 15 ] Wang GL(王关林), Fang HJ(方宏筠). Plant gene-engineering(植物基因工程). 2<sup>nd</sup> ed, Beijing: Science press, 2002
- [ 16 ] Christen P, Aoki T, Shimomura K. Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Plant Cell Reports*, 1992, **11**: 597 – 600

## Induction of Hairy Roots of *Panax ginseng* and Studies on Suitable Culture Condition of Ginseng Hairy Roots

ZHAO Shou-Jing<sup>1\*</sup> LI Chang-Yu<sup>2</sup> QIAN Yan-Chun<sup>1</sup>

LUO Xiao-Pei<sup>1</sup> ZHANG Xin<sup>1</sup> WANG Xue-Song<sup>1</sup> KANG Bo-Yu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(College of Biology and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

<sup>2</sup>(Institute of Special Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132109, China)

**Abstract** Ginseng is a valuable medicinal plant with ginsenosides as its main effective components. Because ginseng is a perennial plant and has a very strict demand for soil conditions, the way of cultivating ginseng by cutting woods is still used in China at present and thus forest resources has been extremely destroyed. Increasing attention has been paid to the hairy roots induced by the infection of *Agrobacterium rhizogenes* in the production of plant secondary metabolic products for the hairy roots are characterized by rapid growth and stable hereditary and biochemical traits. That has opened a new way for the industrial production of ginsenosides. However, there is little report for such studies from China. In this paper, hairy roots of ginseng were induced from the root explants of two-year-old ginseng by *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub> with directly inoculating. The transformed hairy roots could grow rapidly on MS medium and 1/2 MS medium without hormones. The cultured clones of the hairy roots were established on a solid 1/2MS medium. After 4 ~ 5 subcultures the hairy roots still maintained a vigorous growth. A pair of primers were designed and synthesized according to the analytical results of RiA4TL-DNA sequence by Slightom *et al.* 0.8kb *rolC* was obtained by PCR using the genome DNA of hairy root of ginseng. Transformation was confirmed by PCR amplification of *rolC* genes from the hairy roots of *P. ginseng*. Growth rate of hairy roots on liquid medium increased by 2 times then that of the solid medium. The growth of the hairy roots can be divided into three stages: high speed in the first two weeks, middle speed in the 3 ~ 4 weeks and low speed hereafter. Changing the culture solution at 2 weeks regular intervals is conducive to maintaining the rapid growth of the hairy roots. By means of determination for specific growth rate and ginsenosides content, the high-yield hairy root clone R9923 was selected. The content of monomer ginsenoside of Rg1, Re, Rf, Rb1, Rc, Rb2 and Rd in hairy root clone R9923 was determined by the HPLC. The total ginsenosides content in the hairy root clone R9923 came up to 15.2mg/g. The suitable culture conditions for ginseng hairy roots growing were 1/2MS liquid medium (30g/L glucose), in a shaker at 110r/min, changing the culture solution at 2 weeks and subculture time 4 weeks. In the liquid fermented culture of 2L medium, the yield of the hairy roots could amount to 270.10g in 4weeks. The industrial production of ginsenosides has been preliminarily realized. Effect factors on biomass and ginsenosides content such as culture volume, inoculation, in steps cultural technology at the scale-up process of hairy roots culture were also explored. Our results have laid a foundation for defining optimum culture manner for large-scale cultivation and large-scale production of ginsenosides.

**Key words** *Agrobacterium rhizogenes*, PCR amplification, ginsenosides, liquid culture, in steps cultural technology

Received: 09-08-2003

\* Corresponding author. Tel: 86-431-4649935; E-mail: swgc@jlu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>