

# 植物激素对人参毛状根生长和皂甙含量的影响

周倩耘, 丁家宜, 刘峻, 高培, 张树潘

(中国药科大学中药学院生物技术研究室, 江苏南京 210038)

**摘要:** 就植物激素 IAA、IBA、NAA、2,4-D 和 6-BA 对人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 毛状根生长及皂甙含量的影响进行了研究。结果表明, 4 种生长素在适宜的浓度下均可不同程度地促进人参毛状根的生长以及皂甙的积累, 同时能影响单体皂甙的分布。NAA 和 IBA 能显著促进毛状根的生长, 其中 0.500 mg/L IBA 能显著促进毛状根生长和总皂甙的积累。细胞分裂素 6-BA 在较低浓度时虽然对生长无明显的促进作用, 但对皂甙积累有利, 同时显著促进单体皂甙 R<sub>b1</sub> 的积累, 增大 R<sub>b1</sub> 在总甙中所占的比例。

**关键词:** 人参; 毛状根; 植物激素; 人参皂甙

**中图分类号:** S567.5<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)01-0026-03

**Effects of different phytohormones on the growth and ginsenoside content of *Panax ginseng* hairy root**  
ZHOU Qian-yun, DING Jia-yi, LIU Jun, GAO Pei, ZHANG Shu-pan (Department of Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(1): 26-28  
**Abstract:** The growth speed and ginsenoside content of *Panax ginseng* C. A. Meyer hairy root affected by 5 phytohormones including IAA, IBA, NAA, 2,4-D and 6-BA were studied. Added to the culture system, 4 auxins could improve the growth of the hairy root and promote the saponin accumulation in varying degrees. NAA and IBA could significantly promote the growth of the hairy root. 0.500 mg/L IBA could markedly increase both the growth and the saponin accumulation of the hairy root. 6-BA could promote the saponin accumulation and raise remarkably the proportion of ginsenoside R<sub>b1</sub> in the total saponins.

**Key words:** *Panax ginseng* C. A. Meyer; hairy root; phytohormone; ginsenoside

人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 系传统的名贵药材, 其性较温和, 具有滋补、强心、造血、健胃、镇静和降血脂的医疗作用。人参的主要药用成分是人参皂甙, 已确定结构的至少在 30 种以上, 但至今无法人工合成。由于人参生产中存在栽培困难、周期过长及地域限制等难题, 人参的组织培养受到广泛重视。本实验室建立了人参毛状根培养体系, 与细胞培养相比, 它具有生长速度快、有效成分含量高和遗传性状稳定等特点<sup>[1]</sup>。但如何提高培养物中人参皂甙的含量, 从而降低生产成本仍是实现工业化生产的主要难题。本实验选取 4 种生长素和 1 种细胞分裂素, 就植物激素对人参毛状根的生长和皂甙含量的影响进行了初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 毛状根 E4 株

系, 由中国药科大学中药学院生物技术研究室诱导并筛选获得。3-吲哚丁酸 (IBA): 上海生化试剂站分装厂产品; 3-吲哚乙酸 (IAA): 来泽研究所产品;  $\alpha$ -萘乙酸: 上海曹杨第二中学化工厂产品; 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D): 生化试剂, 上海试剂四厂产品; 6-苄氨基嘌呤 (6-BA): 上海生物化学研究室产品; 对照品人参二醇及人参皂甙 R<sub>b1</sub>、R<sub>e</sub> 和 R<sub>g1</sub>: 中国生物制品检定所产品; R<sub>d</sub>: 中国药科大学植物化学研究室孟正木先生惠赠; 乙腈: 色谱纯, 美国 MERCK 公司产品。高效液相色谱仪为日本岛津公司产品, 附有 LC-10AD 泵和 SPD10A 紫外检测器; 色谱柱 C18S-Pack CLC-ODS (1.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m); 0.45  $\mu$ m 微孔过滤器系美国 MERCK 公司产品; 冷冻干燥机为德国 Christ L-1 型; 紫外分光光度计 UVBC-2501 系日本岛津公司产品。

收稿日期: 2002-10-25

作者简介: 周倩耘 (1976-), 女, 江苏武进人, 在读硕士生, 主要从事中药生物技术研究。

## 1.2 实验方法

1.2.1 毛状根培养 基本培养基为 B<sub>3</sub> 培养基 (pH 5.8), 培养基中各外源激素的浓度梯度分别为 0.005、0.050、0.500 和 2.000 mg/L。每瓶加入 75 mL 上述培养基, 高压灭菌后, 每瓶接种 100 mg 新鲜嫩根, 培养 30 d 后收获。对照为不加外源激素的 B<sub>3</sub> 培养基。

1.2.2 毛状根生长量测定 测定毛状根生长量时, 先吸干毛状根表面附着的培养基, 称鲜重并计算月增长倍数和月增长量。将毛状根冷冻干燥, 测定其折干率。

$$\text{月增长量} = (\text{收获量} - \text{接种量}) \times 1000 / 75$$

1.2.3 毛状根中皂甙的提取 毛状根皂甙提取方法参见文献[2], 每次测定时取毛状根 1 g, 样品溶液定容至 10 mL, 供总甙及单体皂甙测定用。

1.2.4 总皂甙含量的测定 总皂甙含量测定按文献[3]进行, 制作人参二醇标准曲线, 用比色法测定人参毛状根总皂甙含量。

1.2.5 单体皂甙含量的测定 测定单体皂甙的色谱条件为: ODS 柱, 检测波长 203 nm; 流动相: 100% 乙腈 (A), 3% 甲醇 (B); 梯度洗脱程序: 0.01 min, 20% A, 80% B; 20.0 min, 20% A, 80% B; 20.01 min, 42% A, 58% B; 60.0 min, 42% A, 58% B。分别取单体皂甙 R<sub>b1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>g1</sub> 和 R<sub>d</sub> 各 1 mg, 精密称定, 用色谱纯甲醇溶解并定容至 1 mL, 分别取各单体皂甙标准品溶液, 配成混合标准品溶液, 制作 4 种单体皂甙的标准曲线, 测定时进样量为 20 μL。以进样浓度 C (mg/mL) 对峰面积进行线性回归, 得到各单体皂甙的回归方程。样品中各单体皂甙的含量根据回归方程计算得到。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源激素对人参毛状根生长的影响

5 种外源激素对人参毛状根生长的影响见表 1。由表 1 可见, 随着浓度的升高, 生长素 IBA 和 NAA 对人参毛状根生长的促进作用增加; 2,4-D 在浓度为 0.005 和 0.050 mg/L 时促进生长, 但随着浓度的增高反而显示出抑制作用; IAA 在 0.005 ~ 0.500 mg/L 浓度范围时, 对毛状根的生长也有促进作用。6-BA 对生长无明显的促进作用, 在 2.000 mg/L 时对生长有抑制作用。

### 2.2 外源激素对人参毛状根总皂甙含量的影响

5 种外源激素对人参毛状根总皂甙含量的影响见表 1。

由表 1 可见, 生长素 2,4-D 和 IBA、NAA 均能显著促进总皂甙的积累。2,4-D 浓度为 2.000 mg/L 时总皂甙含量高达 12.95%, 与对照 (3.62%) 相比, 增加了约 3.5 倍; 而 IBA 浓度为 0.500 mg/L 时总皂甙含量也高达 10.81%。细胞分裂素 6-BA 也对总皂甙积累有利, 0.500 mg/L 是其较适宜的浓度, 总皂甙含量达到 5.02%。IAA 则对总皂甙的积累无显著的促进作用。

表 1 外源激素对人参毛状根生长及总皂甙含量的影响  
Table 1 Effects of different phytohormones on fresh weight and content of total saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer hairy root

激素 Phytohormone	浓度 Concentration (mg/L)	月增长量 (FW) Monthly growth weight (g)	总皂甙含量 (DW) Content of total saponins (%)
对照 (CK)		47.25	3.616
2,4-D	0.005	60.17	7.226
	0.050	59.98	6.365
	0.500	16.22	6.135
NAA	2.000	6.25	12.947
	0.005	51.05	7.103
	0.050	56.79	7.668
	0.500	65.75	6.439
IBA	2.000	76.32	5.849
	0.005	61.47	6.882
	0.050	61.64	6.587
	0.500	78.33	10.805
IAA	2.000	78.88	5.186
	0.005	57.01	3.588
	0.050	64.83	3.981
	0.500	61.75	3.422
6-BA	2.000	46.53	3.127
	0.005	42.03	4.531
	0.050	47.42	3.998
	0.500	45.37	5.024
	2.000	26.34	3.539

### 2.3 外源激素对人参毛状根单体皂甙含量的影响

外源激素对人参毛状根中单体皂甙含量的影响结果见表 2。由表 2 可以看出, 不同浓度的外源激素对人参毛状根中单体皂甙含量的影响不同。2,4-D 能同时抑制 R<sub>g1</sub> 和 R<sub>d</sub> 的积累, 当浓度为 0.500 和 2.000 mg/L 时没有检测到 R<sub>d</sub>。较低浓度的 NAA 能促进 R<sub>b1</sub> 的积累, 即增加 R<sub>b1</sub>:R<sub>e</sub> 的值, 但随浓度的升高反而显示出抑制作用。6-BA 能显著促进 R<sub>b1</sub> 的积累, 明显增加 R<sub>b1</sub>:R<sub>e</sub> 的值, 当浓度为 0.050 mg/L

时该比值达到 2.428,约为对照(1.187)的 2 倍。IBA 和 IAA 基本不影响毛状根单体皂甙的分布。

表 2 外源激素对人参毛状根中单体皂甙含量的影响  
Table 2 Effects of different phytohormones on the individual ginsenoside contents of *Panax ginseng* C. A. Meyer hairy root

激素 Phytohormone	浓度 Concentration (mg/L)	单体皂甙的含量 Ginsenoside content (%) (DW)				Rb <sub>1</sub> :Re
		Rg <sub>1</sub>	Re	Rb <sub>1</sub>	Rd <sup>1)</sup>	
对照(CK)		0.219	0.222	0.264	0.242	1.187
2,4-D	0.005	0.271	0.259	0.303	0.362	1.167
	0.050	0.194	0.222	0.271	0.217	1.224
	0.500	0.114	0.273	0.318	-	1.165
	2.000	0.007	0.689	0.434	-	0.630
NAA	0.005	0.280	0.289	0.394	0.304	1.361
	0.050	0.258	0.250	0.447	0.302	1.788
	0.500	0.250	0.224	0.333	0.449	1.486
	2.000	0.287	0.223	0.177	0.166	0.794
IBA	0.005	0.314	0.280	0.267	0.226	0.954
	0.050	0.288	0.295	0.356	0.336	1.208
	0.500	0.236	0.228	0.318	0.314	1.392
	2.000	0.239	0.199	0.173	0.188	0.869
IAA	0.005	0.192	0.213	0.299	0.208	1.405
	0.050	0.258	0.284	0.385	0.358	1.352
	0.500	0.240	0.286	0.370	0.336	1.293
	2.000	0.168	0.211	0.269	0.203	1.273
6-BA	0.005	0.257	0.290	0.424	0.234	1.465
	0.050	0.213	0.237	0.576	0.178	2.428
	0.500	0.138	0.270	0.466	0.192	1.723
	2.000	0.110	0.174	0.356	0.100	2.043

1) -: 未检出 no detectable

### 3 讨论

人参毛状根能在无外源激素的培养基上生长,但外源性植物激素的加入对人参毛状根的生长及次生代谢产物的合成也会有一定的作用。本实验结果表明,4种生长素在适宜的浓度下均可不同程度地促进人参毛状根生长以及总皂甙的积累,同时能影响单体皂甙的分布,其中 0.500 mg/L IBA 是促进人参毛状根生长以及皂甙积累的最佳浓度。细胞分裂素 6-BA 在较低浓度时虽然对人参毛状根的生长无明显的促进作用,但对皂甙积累有利,同时显著促进单体皂甙 Rb<sub>1</sub> 的积累,增大 Rb<sub>1</sub> 在总甙中所占的比例。

植物激素在植物生长发育过程中起着不同的作用。IAA 是植物内源生长素,IBA 则是在 IAA 结构上增加 2 个碳原子的人工合成生长素,随着吡啶 3

位取代碳链的延长,活性也增加。在本实验中,IBA 对毛状根的作用高于 IAA。2,4-D 是 1 种人工合成生长素,当浓度高于 0.050 mg/L 时显著抑制毛状根生长,并且毛状根特征消失,出现愈伤化现象。2,4-D 浓度为 2.000 mg/L 时总皂甙含量高达 12.95%,这可能与 2,4-D 改变了毛状根的生长及其次生代谢产物合成有关,具体的调控机理还有待于进一步研究。

单体皂甙 Rb<sub>1</sub> 和 Re 分别属于人参二醇和人参三醇,而人参二醇和人参三醇的生理活性是有差别的<sup>[4]</sup>。前者具有抑制中枢神经系统、抗溶血等作用,而后者则有兴奋中枢神经系统、溶血等作用。外源激素能够调节 Rb<sub>1</sub>:Re 的比值,即调节 Rb<sub>1</sub> 和 Re 在总甙中所占的比例,可见这是研究毛状根次生代谢产物调控的有效方法之一。

植物激素与环境因子对植物细胞中各种酶的合成和活性具有调节作用,激素可以通过促进合成或抑制降解来增加酶的活性。植物激素对酶活性的调节可以帮助人们从分子水平上进一步探讨激素的作用机理。近年来的研究表明,生长素和细胞分裂素可以调节蛋白质的代谢,并且对植物基因的表达有显著的调节作用<sup>[5-7]</sup>。由此可以推测,植物激素之所以能影响人参毛状根的生长及次生代谢产物的合成,可能由于其对某些基因的调控,影响了皂甙生物合成过程中某些关键酶合成的缘故。本文结果对今后寻找人参皂甙生物合成的关键酶和功能性基因有一定的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 刘峻,丁家宜,徐红,等. Ri 质粒人参转化系统的建立及鉴定[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 95-97.
- [2] 李晶晶,徐国钧,金蓉鸾,等. 人参与人参的皂甙成分分析[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(4): 197-199.
- [3] 章观德,周志华,王慕邹,等. 人参的分析 II. 人参皂甙的测定[J]. 药学学报, 1980, 15(3): 175-180.
- [4] 窦德强,靳玲,陈黄杰. 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 2: 151-154.
- [5] Dominov J A, Strmzler L, Lee S, et al. Cytokinins and auxins control the expression of a gene in *Nicotiana glauca* cells by feedback regulation[J]. Plant Cell, 1992, 4: 451-461.
- [6] Chen C, Anderson B R, Ertl J R. Modulation of plant gene expression by cytokinins[J]. Aust J Plant Physiol, 1993, 20: 609-619.
- [7] Schumllig T, Silke S, George R. Cytokinins as regulators of gene expression[J]. Physiol Plant, 1997, 100: 505-519.