

# 不同培养基及外源激素对西洋参毛状根的生长和皂甙含量的影响

王冲之, 丁家宜

(中国药科大学中药学院生物技术研究室, 江苏 南京 210038)

**摘要:** 分析了 1/2MS、改良 White、SJ-1、改良 Nisch、B<sub>5</sub> 和 B<sub>5</sub>-I 6 种液体培养基、水解乳蛋白(LH)以及 IAA、IBA、NAA、6-BA 和 ABA 5 种激素对西洋参(*Panax quinquefolium* L.)毛状根生长及皂甙含量的影响。用高效液相色谱法测定部分毛状根样品的 4 种单体皂甙含量。结果表明 SJ-1 和 B<sub>5</sub> 培养基较好, 水解乳蛋白可增加毛状根的鲜重, 但降低毛状根中总皂甙的含量。IAA、IBA 和 ABA 对毛状根的生长有促进作用, 6-BA 对皂甙积累有显著促进作用, 并较大幅度地提高 Rb<sub>1</sub> 在总甙中所占的比例。

**关键词:** 西洋参; 发根农杆菌; 培养基; 激素; 人参皂甙

**中图分类号:** S567.5<sup>+</sup>3; Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2001)04-0001-04

**Effects of different media and phytohormones on the growth and ginsenoside content of *Panax quinquefolium* L. hairy root** WANG Chong-zhi, DING Jia-yi (Department of Biotechnology of Traditional Chinese Medicine College, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(4): 1-4

**Abstract:** The growth speed and saponins content of *Panax quinquefolium* L. hairy root affected by 6 liquid media (1/2MS, modified-White, SJ-1, modified-Nisch, B<sub>5</sub> and B<sub>5</sub>-I), lactalbumin hydrolysate and 5 phytohormones (IAA, IBA, NAA, 6-BA and ABA) were studied. The contents of 4 kinds of ginsenoside have been determined with the method of high performance liquid chromatography. SJ-1 and B<sub>5</sub> are fairly good media. The fresh weight increased but the content of saponins decreased when lactalbumin hydrolysate was added. The phytohormones of IAA, IBA and ABA could improve the growth speed of the hairy root, while 6-BA could promote marked the saponin accumulation and raise remarkably the proportion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> in the total saponin.

**Key words:** *Panax quinquefolium* L.; agrobacterium rhizogene; medium; phytohormone; ginsenoside

西洋参(*Panax quinquefolium* L.)为人参属(*Panax* L.)植物,是从国外引入的名贵强壮滋补药。前文<sup>[1,2]</sup>报道了西洋参毛状根培养系统的建立及株系筛选。本文报道培养基及外源激素对西洋参毛状根的生长速度,以及总皂甙和单体皂甙含量的影响。由于培养基种类较多,涉及的成分也很复杂,它们都会影响所培养植物的产量及有效成分含量,所以筛选出较适宜的培养基一直是植物组织培养中的一项重要工作。为了获取高产量的西洋参毛状根,并为以后的大规模培养打下基础,作者选取 6 种基本培养基进行毛状根的培养研究,并探讨 5 种激素对毛状根的生长及皂甙含量的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

西洋参毛状根 E106 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。1/2MS、改良 White、SJ-1、改良 Nisch、B<sub>5</sub> 和 B<sub>5</sub>-I 为基本培养基<sup>[3]</sup>。其中 B<sub>5</sub>-I 是甘草毛状根培养基优化研究时得到的改良的 B<sub>5</sub> 培养基<sup>[4]</sup>,其组成为:无机成分为

收稿日期: 2001-07-31

作者简介: 王冲之(1969-),男,四川重庆人,在读博士生,主要从事中药生物技术研究。

$\text{KNO}_3$  50 mg/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  200 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  340 mg/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  240 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  150 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  200 mg/L, 有机成分组成及含量同  $B_5$ 。1/2MS 的无机成分为 MS 的 1/2, 有机成分浓度同 MS。激素 3-吲哚乙酸 (IAA), 生化试剂, 来泽研究所产品; 3-吲哚丁酸 (IBA), 生化试剂, 上海生化试剂站分装厂产品;  $\alpha$ -萘乙酸 (NAA), 化学纯, 上海曹杨第二中学化工厂产品; 6-苄氨基嘌呤 (6-BA), 生化试剂, 上海生物化学研究所产品; 脱落酸 (ABA), 分析纯, 瑞典 FLUCA 公司产品。对照品人参二醇及人参皂甙  $\text{Rb}_1$ 、 $\text{Re}$  和  $\text{Rg}_1$  为中国生物制品检定所产品, 人参皂甙  $\text{Rd}$  由中国药科大学植物化学研究室孟正木教授提供。高效液相色谱仪: LC-10AD 泵, SPD10A 紫外检测器, 日本岛津公司产品, ODS 柱 150mm  $\times$  4mm, 为德国 MERCK 公司产品, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤器为德国 MERCK 公司产品。

## 1.2 实验方法

1.2.1 6种液体培养基的筛选 将毛状根分别接种到 1/2MS, 改良 White, SJ-1, 改良 Nisch,  $B_5$  和  $B_5$ -I 培养基中, 每个样品接种 6 瓶, 用 150 mL 锥形瓶, 每瓶装培养液 50 mL, 在有少量散射光照射及 23 $^\circ\text{C}$  条件下培养, 摇床振摇速度 100 r/min, 30 d 收获。吸干毛状根表面附着的培养液, 称重并计算月增长倍数。

月增长倍数 = (收获量 - 接种量) / 接种量

1.2.2 水解乳蛋白 (LH) 的作用 选用 SJ-1、 $B_5$  和改良 White 3 种液体培养基, 分别加入 LH 500 mg/L 或不加入 LH, 每个样本接种 6 瓶, 培养方式同 1.2.1 节, 收获后测定毛状根的月增长倍数, 毛状根冻干后测定总甙及单体皂甙的含量。

1.2.3 外源激素的作用 取供试 5 种激素, 分别加入到改良 White 液体培养基中, 其中 IAA、IBA、NAA 和 6-BA 的浓度取 4 个梯度: 0.2、0.5、1.0 和 3.0 mg/L, ABA 的浓度梯度为  $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$  和  $10^{-1}$  mg/L, 每个样本接种 3 瓶, 每瓶接种量  $50 \pm 5$  mg, 培养方法同 1.2.1 节, 培养 30 d 收获, 测定并计算月增长倍数。选用各激素最高月增长倍数的激素浓度, 再次接种并培养 30 d 收获并称重, 冻干后测定总甙及单体皂甙的含量。

1.2.4 折干率及总甙含量测定 使用德国产 Chaist L-1 型冷冻干燥机, 将收获的毛状根冻干, 测定其折干率。

折干率 = (干重/鲜重)  $\times$  100%

依据文献[5]的方法制作人参二醇标准曲线, 并用比色法测定西洋参毛状根总皂甙含量。每次测定时取毛状根 1 g, 总甙提取制备过程见文献[6], 样品液定容至 5 mL, 供总甙及单体皂甙测定用。

1.2.5 单体皂甙的含量测定 依据文献[7]的方法, 色谱条件稍作改变。色谱条件: 用 ODS 柱, 检测波长 202 nm, 梯度洗脱, 梯度线性变化, 流动相流速 1 mL/min。流动相组成为 A:  $V(10 \text{ mmol/L } \text{KH}_2\text{PO}_4) : V(\text{乙腈}) = 8:2$ ; B:  $V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 85:5$ 。洗脱程序: 0.01 min: 98% A, 2% B; 17 min: 96.7% A, 3.3% B; 20 min: 95.7% A, 4.3% B; 25 min: 86% A, 14% B; 40 min: 83% A, 17% B; 55 min: 30% A, 70% B; 57 min: 100% B; 67 min: 100% B。

制作 4 种单体皂甙的标准曲线, 测定西洋参毛状根样品中的各单体皂甙的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 6种基本培养基筛选结果

6种基本培养基对西洋参毛状根生长的影响见表 1。可以看出, SJ-1 效果最好, 毛状根的月平均增长量达 31.1 倍,  $B_5$  其次, 1/2MS 最差。

表 1 6种基本培养基对西洋参毛状根生长的影响  
Table 1 Effects of 6 basic media on growth of *Panax quinquefolium* hairy root

培养基 Medium	平均接种量 Average inoculated weight (g/bottle)	平均月增长倍数 Average monthly growth folds
1/2MS	0.048	5.5
改良 White modified-White	0.048	14.5
SJ-1	0.048	31.1
改良 Nisch modified-Nisch	0.057	15.9
$B_5$	0.057	17.9
$B_5$ -I	0.049	8.2

### 2.2 LH 对西洋参毛状根生长的影响

LH 对西洋参毛状根生长的影响见表 2。可以看出, LH 对毛状根的增长有促进作用, 对 White 的促进作用最明显, 对  $B_5$  不很明显。W  $\times$  D  $\times$  C 值表示毛状根皂甙月增长量的相对大小。对于 SJ-1, 虽毛状根月增长倍数不是最大, 但由于折干率高, 皂甙含量高而使得 W  $\times$  D  $\times$  C 值较大。  $B_5$  虽月增长倍数较

大,但折干率及总皂甙含量均较低,  $W \times D \times C$  值仅与 SJ-1 相当。

表2与表1中,对于相同的基本培养基,不同实验条件下,毛状根的月增长倍数有明显差别,尤其是  $B_5$ ,后者比前者高很多。可能是由于毛状根对液体培养基的适应问题。进行培养基筛选实验时,毛状

根是用改良 White 培养基培养物接种的,进行 LH 作用实验时是在同种培养液中继代培养,毛状根已适应了新的培养液。

### 2.3 外源激素对西洋参毛状根生长的影响

5种外源激素对西洋参毛状根生长及总皂甙含量的影响见表3。

表2 水解乳蛋白 LH 对西洋参毛状根生长及总皂甙的影响

Table 2 Effects of LH on growth of *Panax quinquefolium* hairy root and its content of total saponin

培养基 <sup>1)</sup> Medium <sup>1)</sup>	平均接种量 Average inoculated weight (g/bottle)	月增长倍数 Average monthly growth folds	月增长量(鲜重) Monthly growth weight (FW) (g/L)	折干率 Drying rate (%)	总皂甙含量(干重) Content of total saponin (DW) (%)	$W \times D \times C^{2)}$
SJ-1 1	0.065	23.1	30.03	13.3	8.88	355.2
2	0.067	27.8	37.29	11.8	7.28	319.8
$B_5$ 1	0.066	43.4	56.97	9.07	6.70	346.2
2	0.057	46.3	53.10	9.25	6.22	305.4
改良 White modified-White 1	0.065	13.7	17.76	12.7	8.02	181.2
2	0.063	23.7	29.91	12.0	-	-

<sup>1)</sup> 1: 不添加 LH without LH, 2: 添加 LH with LH; <sup>2)</sup>  $W \times D \times C$ : 月增长量(鲜重) × 折干率 × 总皂甙含量(干重) monthly growth weight (FW) × drying rate × content of total saponin (DW)

表3 激素对改良 White 培养基中生长的西洋参毛状根的生长及总皂甙含量的影响

Table 3 Effects of phytohormones on growth of *Panax quinquefolium* hairy root and its content of total saponin in modified-White medium

激素浓度 Concentration of phytohormone (mg/L)	月增长倍数 Monthly growth folds	折干率 Drying rate (%)	总皂甙含量(干重) Content of total saponin (DW) (%)	相对月增长倍数 Relative monthly growth folds	相对折干率 Relative drying rate	相对总皂甙含量 Relative content of total saponin	$P \times D \times C^{1)}$
IAA 0.5	17.9	13.4	7.54	1.30	1.09	0.94	1.33
IBA 0.5	18.2	15.2	9.50	1.32	1.24	1.18	1.93
NAA 0.5	14.1	16.8	6.24	1.02	1.38	0.78	1.10
6-BA 1.0	13.9	15.4	13.20	1.01	1.26	1.65	2.10
ABA $10^{-3}$	17.8	12.9	7.88	1.29	1.06	0.98	1.34
0	13.8	12.2	8.02	1.00	1.00	1.00	1.00

<sup>1)</sup>  $P \times D \times C$ : 相对月增长倍数 × 相对折干率 × 相对总皂甙含量 relative monthly growth folds × relative drying rate × relative content of total saponin

由表3可见,各种激素在适宜浓度下均可不同程度地促进毛状根的生长。6-BA 和 IBA 对皂甙积累有利,尤其是 6-BA 能显著促进皂甙的积累,总皂甙含量高达 13.20%。 $P \times D \times C$  值可表示总皂甙月增长量的相对大小,6-BA 和 IBA 组该值较对照组提高 1 倍左右,表明这 2 种激素可显著促进皂甙的积累。

### 2.4 西洋参毛状根单体皂甙的含量

单体皂甙的标准曲线为:

$$R_g: y = 5.056 \times 10^{-6}x - 0.042 \quad r = 0.9996$$

$$R_e: y = 1.300 \times 10^{-5}x + 0.020 \quad r = 0.9990$$

$$R_{b_1}: y = 1.275 \times 10^{-5}x + 0.154 \quad r = 0.9998$$

$$R_d: y = 6.093 \times 10^{-6}x + 0.029 \quad r = 0.9995$$

几种基本培养基及 LH 对毛状根单体皂甙含量的影响见表4。可以看出,改良 White 培养的毛状根  $R_{b_1}:R_e$  比值接近西洋参。加入 LH 使该比值下降,  $B_5$  加 LH 的作用最强。  $B_5$  培养的毛状根单体皂甙中  $R_{b_1}$  所占的比例与西洋参差别较大。

外源激素对毛状根单体皂甙含量的影响见表5。可以看出,ABA 基本不影响毛状根皂甙的分布,其他激素均能增加  $R_{b_1}:R_e$  的值,即增大  $R_{b_1}$  在总皂甙中所占比例。IAA、IBA 和 6-BA 可使培养的毛状根中所含皂甙接近西洋参中皂甙的分布,6-BA 对  $R_{b_1}$  的积累作用尤为明显,且总皂甙含量很高,应该引起关注。



表4 基本培养基及水解乳蛋白对西洋参毛状根单体皂甙含量的影响(干重)

Table 4 Effects of basic medium and LH on the individual ginsenoside content of *Panax quinquefolium* hairy root (DW)

处理 Treatment	培养基 Medium	皂甙含量 Saponin content (%)					Rb <sub>1</sub> :Re
		Rg <sub>1</sub>	Re	Rb <sub>1</sub>	Rd	总量 Total	
西洋参毛状根 Hairy root	modified-White	0.036	0.662	1.230	0.126	8.02	1.86:1
	B <sub>5</sub>	0.128	1.436	1.634	0.103	6.70	1.14:1
	B <sub>5</sub> + LH	0.099	1.568	1.158	0.049	6.22	0.74:1
	SJ-1	0.229	1.616	2.288	0.126	8.88	1.42:1
	SJ-1 + LH	0.126	1.719	2.135	0.108	7.28	1.24:1
商品西洋参 <i>Panax quinquefolium</i>		0.057	0.944	2.703	0.217	6.35	2.86:1

表5 激素对改良 White 培养基中生长的西洋参毛状根的单体皂甙含量的影响(干重)

Table 5 Effect of phytohormones on the individual ginsenoside content of *Panax quinquefolium* hairy root in modified-White medium (DW)

处理 Treatment	激素浓度 Concentration of phytohormone (mg/L)	皂甙含量 Saponin content (%)					Rb <sub>1</sub> :Re
		Rg <sub>1</sub>	Re	Rb <sub>1</sub>	Rd	总量 Total	
西洋参毛状根 Hairy root	IAA 0.5	0.076	1.179	2.794	0.111	7.54	2.37:1
	IBA 0.5	0.096	1.034	2.516	0.070	9.50	2.43:1
	NAA 0.5	0.062	0.810	1.660	0.051	6.24	2.05:1
	6-BA 1.0	0.100	2.035	6.360	0.272	13.20	3.13:1
	ABA 10 <sup>-3</sup>	0.080	1.125	2.199	0.106	7.88	1.88:1
	0	0.036	0.662	1.230	0.126	8.02	1.86:1
商品西洋参 <i>Panax quinquefolium</i>		0.057	0.944	2.703	0.217	6.35	2.86:1

### 3 讨论

西洋参毛状根培养结果表明, SJ-1 和 B<sub>5</sub> 为较好培养基。毛状根在 B<sub>5</sub> 中增长速度较 SJ-1 高, 但其皂甙月增长量与 SJ-1 相当, 说明毛状根培养过程中不仅要注意增长速度, 更应注意次生代谢产物的积累。

分析 SJ-1 与 B<sub>5</sub> 的成分可知, B<sub>5</sub> 中无机氮 (KNO<sub>3</sub>) 很高, 达 2 500 mg/L, SJ-1 的无机氮含量也较高 [KNO<sub>3</sub> 506 mg/L, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 472 mg/L], 结合 LH 的作用可推测, 氮源(含有机氮)可能是影响毛状根生长的重要因素。SJ-1 的微量元素明显高于 B<sub>5</sub>, 而 SJ-1 皂甙积累量也较 B<sub>5</sub> 高, 表明微量元素的种类和含量可能是影响皂甙积累的重要因素。

5 种外源激素均能不同程度地促进西洋参毛状根的生长, 但其月增长倍数与皂甙含量的高低并不同步, 尤其是 6-BA, 虽月增长倍数与对照组差别不大, 但皂甙含量较对照高 64.6%, 可见外源激素是调节皂甙积累的一种有效方法, 值得深入研究。

人参皂甙 Rb<sub>1</sub> 和 Re 分别是人参二醇组和人参三醇组皂甙的代表, 与人参相比, Rb 组含量高是西洋参的一大特点。从分析结果可知, B<sub>5</sub> 尤其再添加 LH

后, 能显著降低 Rb<sub>1</sub>:Re 的比值。但生长素类激素 (IAA、IBA 和 NAA) 及细胞分裂素类激素 (6-BA) 均能增加 Rb<sub>1</sub>:Re 的比值, 其中, 6-BA 的作用更为显著。

综合本文研究结果, 如何将有利因素组合起来, 使得某种皂甙的含量依照我们的设计提高或降低等, 是值得进一步研究的问题。

#### 参考文献:

- [1] 王冲之, 丁家宜. Ri 质粒转化西洋参的研究 I. 西洋参毛状根培养系统的建立及鉴定[J]. 药物生物技术, 1999, 6(2): 80-84.
- [2] 王冲之, 丁家宜. 西洋参毛状根的诱导及株系筛选[J]. 南京师范大学学报(自然科学版), 1999, 22(3): 157-161.
- [3] 江苏省植物组织培养研究协会. 经济植物组织培养实用技术[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1986. 237-258.
- [4] 杜旻, 向德军, 丁家宜, 等. 甘草毛状根培养系统的建立及化学成分分析[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(1): 7-10.
- [5] 章观德, 周志华, 王慕邹, 等. 人参的分析 II. 人参皂甙的测定[J]. 药学报, 1980, 15(3): 175-180.
- [6] 李晶晶, 徐国钧, 金蓉鸾, 等. 人参与西洋参的皂甙成分分析[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(4): 197-199.
- [7] Chuang W C, Sheu S J. Determination of ginsenosides in ginseng crude extracts by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1994, 685(2): 243-251.

(责任编辑: 宗世贤)