

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201611001

引文格式: 齐琳琳, 李刚, 刘志伟, 等. 培养条件对三七愈伤组织生长和皂苷积累的影响 [J]. 广西植物, 2017, 37(8):1035–1042

QI LL, LI G, LIU ZW, et al. Effects of culture conditions on the growth and accumulation of saponin in *Panax notoginseng* callus [J]. Guihaia, 2017, 37(8):1035–1042

培养条件对三七愈伤组织生长和皂苷积累的影响

齐琳琳¹, 李刚², 刘志伟², 金朝霞¹, 张宗申^{1*}

(1. 大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 安徽红果春生物制药有限公司, 安徽 广德 242200)

摘要: 以 MS 为基础培养基, 改变激素配比、氮源和光照等因素, 以分光光度法和 HPLC 法分析三七愈伤组织培养过程中皂苷含量的变化。结果表明: 培养条件对三七愈伤组织中皂苷积累有一定影响, 激素对比对愈伤组织中皂苷含量的影响最大, 在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 组合下, 培养物中总皂苷含量最多, 达到 $4.72\% \pm 0.29\%$; 在总氮量为 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下, $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3 + 7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$ ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ = 7:1$) 时, 愈伤组织皂苷含量最多, 达到 $4.71\% \pm 0.17\%$; 分别在 1 000 lx 和 500 lx 光强下每天光照 12 h 的愈伤组织, 皂苷含量均低于黑暗培养的愈伤组织, 三者皂苷含量分别为 $1.94\% \pm 0.31\%$ 、 $2.38\% \pm 0.12\%$ 和 $3.57\% \pm 0.27\%$, 光照引起愈伤组织表面变绿及细胞分化, 可能是抑制愈伤组织中皂苷合成与积累的主要原因; HPLC 检测发现, 三七愈伤组织和根中均含有 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 及 Rd 四种皂苷, 但栽培三七根含有 R_1 皂苷, 而三七愈伤组织中未检测到 R_1 , 其原因需要进一步研究。该研究结果为未来愈伤组织培养成为部分代替人工栽培生产三七天然产物的潜在途径提供了研究基础。

关键词: 激素配比, 三七, 愈伤组织, 皂苷, 组织培养**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2017)08-1035-08

Effects of culture conditions on the growth and accumulation of saponin in *Panax notoginseng* callus

QI Lin-Lin¹, LI Gang², LIU Zhi-Wei², JIN Zhao-Xia¹, ZHANG Zong-Shen^{1*}

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China;

2. Anhui Hongguochun Biopharmaceutical Co. Ltd., Guangde 242200, Anhui, China)

Abstract: It is well known that the growth and secondary metabolites accumulation of plant cells cultured *in vitro* are determined by many factors, such as culture conditions, nutrients supply, phytohormone application, etc. This study aims to explore the affecting factors during *Panax notoginseng* callus culture. On the basis of MS, modulations of phytohormone combination, nitrogen resource and illumination strength were carried out, and then the changes in saponins content during culture of *P. notoginseng* callus were measured and analyzed with spectrophotometry and HPLC. The results showed that the culture conditions had an considerable effect on the saponin accumulation in *Panax notoginseng* callus,

收稿日期: 2016-11-01 修回日期: 2016-12-03

基金项目: 河南省科技创新杰出人才基金(134200510002) [Supported by the Excellent Talents Fund of Henan(134200510002)].

作者简介: 齐琳琳(1990-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 研究方向为珍稀濒危药用植物细胞工程, (E-mail) qilinlin1002@126.com。

*通信作者: 张宗申, 博士, 教授, 研究方向为珍稀濒危药用植物细胞工程, (E-mail) zhangzs@dlpu.edu.cn。

in detail, combination of phytohormone had significant effects on saponin content with a peak of $4.72\% \pm 0.29\%$ from the callus cultured on MS supplemented with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA; The total N source concentration was maintained at $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the saponin accumulated at the highest level of $4.71\% \pm 0.17\%$ in the callus under the ratio of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ = 7:1$ ($45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3 + 7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$); When cultures grown in the light ($1\ 000 \text{ lx}$ and 500 lx for $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively) versus dark, their saponin content were calculated as $1.94\% \pm 0.31\%$, $2.38\% \pm 0.12\%$ and $3.57\% \pm 0.27\%$, respectively. In addition, greening and cell differentiation were observed on the surface of callus under light, might be the main cause resulting in the inhibition of saponins synthesis and accumulation in callus. Saponins of *P. notoginseng* have been acknowledged to be the major compounds functioning in medical treatment of diseases, herein they are employed as the indicator of callus evaluation. Four kinds of saponins including R_{g_1} , R_{e} , R_{b_1} and R_{d} were identified from both the *P. notoginseng* callus and root by HPLC, and R_1 could not be detected in the former, however, presence in the latter, the reason for which needs to be further investigated. The above results are likely to provide technical support for the production of natural compounds through callus culture in large scale instead of field cultivation partly in the future, furthermore, which would also be a potential alternative to wild medicinal plant resources for its merits of sustainable and rational exploitation.

Key words: ratio of phytohormones, *Panax notoginseng*, callus, saponins, tissue culture

三七 (*Panax notoginseng*) 系五加科人参属植物,在我国已有 400 多年的栽培历史,是传统名贵中药材 (Liu et al, 2011; Guo et al, 2010)。三七的药理作用主要体现在对血液系统、心血管系统、脑血管系统、神经系统、代谢、免疫调节等的影响 (Zhang et al, 2013; Lei & Chiou, 1986; Yu et al, 2012)。三七的主要药理活性成分为三七总皂苷,具有降血脂、清除自由基、抗炎、抗氧化等药理作用 (Kim, 2012; Konoshima et al, 1999; Liu et al, 1994)。三七药材市场供应主要靠人工栽培,从种子萌发到收获入药周期需 3~5 a,时间和劳动力成本高,生长期间还需使用大量农药防治病虫害而污染环境,且由于环境污染等原因导致三七药材中重金属残留。因此,采用生物工程技术规模化培养三七愈伤组织,以提取其天然产物代替或部分代替人工栽培三七,将是未来解决三七药材存在问题的潜在技术 (李云芳等, 2014)。与传统栽培相比,利用细胞培养技术生产三七的替代品可以不受土地、环境、气候等因素影响,且产品质量均一,具有很大的优势 (田蕾等, 2015)。然而,利用细胞培养也存在一些生物学问题需要解决,如目的化合物含量低、在未分化细胞中检测不到目的产物等,培养效率低、成本高,限制了该技术的商业化应用 (Zhang et al, 2013)。近年来,通过添加诱导子、改变培养条件和培养方式等手段可调控药用植物细胞中次生代谢产物的途径,

通过优化和改进药用植物细胞培养技术可促进细胞离体培养过程中次生代谢产物的生物合成,如人参、红豆杉、雷公藤等 (Oh et al, 2014; Cusido et al, 2014; Miao et al, 2013)。

目前,对于三七细胞培养中皂苷积累规律的研究较少,而愈伤组织培养是进行细胞规模化培养的前提。本研究对影响愈伤组织中皂苷积累的因素进行了研究,获得的数据为后续建立细胞规模化培养技术体系提供了参考,为三七细胞工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以大连工业大学珍稀濒危药用植物细胞工程实验室用云南文山三七种子制备的无菌苗为外植体,诱导出愈伤组织、继代培养;挑选质地均一、生长快、颜色鲜黄的三七愈伤组织,具体操作参考 Zhang et al (2014) 的方法进行。对照材料取自云南文山栽培 3 a 的三七根,干燥、粉碎,备用。

1.2 方法

1.2.1 激素配制 MS+ $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉, pH 值 5.8,培养基中需要添加的激素组合与配比按照表 1 进行配制。愈伤组织在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下暗培养 3 个月后进行皂苷含量的测定与分析,并与人

工栽培三七根进行比较。

1.2.2 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 影响皂苷含量的试验 基本配方为 $\text{MS}+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 2,4-D}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 琼脂粉}$ (不含 MS 基本培养基中的 N 源), pH5.8;氮源总量为 $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,培养基中需要添加的 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 按照表 2 进行配制。将愈伤组织在 $(25\pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$ 下暗培养 3 个月后进行皂苷含量的测定和分析,并与对照材料进行比较。

1.2.3 光照处理方法 培养基配方为 $\text{MS}+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 2,4-D}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}+6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 琼脂粉}$,pH 5.8。挑选生长均一的三七愈伤组织分为三组,每组 60 瓶,分别置于 1 000、500 及 0 lx (黑暗)光强下培养,光照时间为 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,在 $(25\pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 3 个月后进行皂苷含量的测定与分析,并与三七对照材料进行比较。

1.2.4 总皂苷提取与分光光度法分析 标准曲线制作参考 Zhang et al(2014)的方法。准确称取人参皂苷 Re 标准品 5 mg 于 5 mL 容量瓶中,用甲醇定容;吸取 10、20、40、60、80 和 100 μL 标准液分别置于 10 mL 具塞试管中,水浴挥干溶剂;各自加入 0.2 mL 新配制的 5%香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴恒温 15 min,立即置于冰水中冷却 5 min,加入冰醋酸 5 mL 摇匀,放置 10 min,迅速在 545 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标、标准品 Re 质量(mg)为横坐标绘制标准曲线。

样品总皂苷提取:将愈伤组织在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干至恒重,研碎后过 65 目筛,准确称取 1 g 于烧杯中,加入 50 mL 甲醇,室温下放置过夜,然后置于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴上保温 2 h,冷却至室温,然后用容量瓶定容至 50 mL,摇匀,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 尼龙滤膜过滤,收取滤液,备用。

取 100 μL 样品总皂苷提取液分别置于具塞试管中,其余操作与标准曲线制作一致。每个样品设置 3 个平行,取平均值,根据回归方程计算总皂苷的含量。

1.2.5 三七总皂苷的 HPLC 分析 使用 LC2000 液相色谱仪,LC2130 紫外可见检测器及 T2100P 色谱工作站对总皂苷进行检测分析。色谱条件:Kromasil 100-5C18 色谱柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$)。流动相:乙腈(A):水(B);0~20 min,20% A 等度;20~30 min,20% A~32% A 线性梯度;30~40 min,32% A~43% A 线性梯度;40~70 min,43% A~100% A 线性梯度。进样量为 10 μL ;柱温为 $35\text{ }^\circ\text{C}$;体积流量为

表 1 激素配比组合
Table 1 Combinations of phytohormones

编号 Number	基本培养基 Basic medium	2,4-D	6-BA
		2,4-Dichlorophenox- yacetic acid ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6-Benzylaminopurine ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	MS	2.0	0.5
2	MS	2.0	1.0
3	MS	2.0	2.0
4	MS	1.0	0.5
5	MS	1.0	1.0
6	MS	1.0	2.0
7	MS	0.5	0.5
8	MS	0.5	1.0
9	MS	0.5	2.0

表 2 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 配比
Table 2 Ratio of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

编号 Number	基本培养基 Basic medium	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	KNO_3 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	NH_4NO_3 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	MS	1 : 1	0	30
2	MS	3 : 1	30	15
3	MS	5 : 1	40	10
4	MS	7 : 1	45	7.5
5	MS	9 : 1	48	6
6	MS	60 : 0	60	0

1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长为 203 nm(李龙华等,2011)。

将 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准品溶液(单体皂苷 R_1 、 Rg_1 、Re、 Rb_1 与 Rd 混合液)与待测样品溶液用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,分别精确吸取 10 μL ,进行 HPLC 测定。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

以试剂空白作参比于 545 nm 处测定不同浓度 Re 溶液的吸光度,以对照品质量(mg)为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为 $Y=8.96X-0.013\text{ 6}$, $R^2=0.999\text{ 3}$ 。

为了评价愈伤组织中皂苷水平,按照 1.2.4 方法,同时测定了栽培三七根中总皂苷含量。生长 3

年的三七根(0.6 g)总皂苷提取液的OD值为0.743,根据回归方程可得其总皂苷含量为 $7.04\% \pm 0.13\%$,在后续研究中均以此值为参考,与愈伤组织皂苷含量进行比较分析。

2.2 激素对比对愈伤组织中皂苷积累的影响

植物激素是植物组织培养过程中调节细胞生长发育和次生代谢的常用手段(Collin, 2001; Dicosmo & Misawa, 1995)。本研究发现激素对比对三七愈伤组织的生长和皂苷含量有很大影响,当培养基中激素组合为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA时,愈伤组织中皂苷含量最高,达到 $4.72\% \pm 0.29\%$;当激素组合为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA时,愈伤组织中皂苷含量最少(图1)。从愈伤组织在各种激素组合下生长25 d时的状态(图2)可以看出,当激素组合为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA时,愈伤组织体积最大,表明其生长最快,但是皂苷含量最少(图1:3);而当愈伤组织体积较小,生长较慢时,它们的皂苷含量与之相反,都比较高(图1:2,4,7,8,9)。该研究结果与李汉伟等(2010)研究冬凌草愈伤组织生长及迷迭香酸的积累的结果一致。能促进三七愈伤组织生长的激素组合,反而抑制其次生代谢,说明三七细胞皂苷代谢积累与细胞生长阶段呈负相关性。

2.3 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 对三七愈伤组织生长和皂苷含量的影响

在植物细胞培养过程中,大量元素对愈伤组织生长和次生代谢的影响非常大,通过优化培养基中的氮源种类及其浓度,可以改变植物细胞的生长和次生代谢物质的积累。本研究 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比例对三七愈伤组织生长及皂苷含量的影响,试图找到改善三七细胞中皂苷积累的简便手段。图3结果表明,在总氮量为 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下, $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3 + 7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$ ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ = 7:1$)时培养的愈伤组织中皂苷含量最多,达到 $4.71\% \pm 0.17\%$,但低于栽培三七根中皂苷含量;培养基中只加 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NO}_3^-$,不添加 NH_4^+ ,即 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ = 60:0$,愈伤组织中皂苷含量最少。说明培养基中高比例 NO_3^- 不利于三七皂苷的积累,适当比例的 NH_4^+ 才有利于皂苷积累。

图4显示,培养基中添加不同 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 条件下,三七愈伤组织生长25 d时的状态。 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ = 60:0$ 时愈伤组织生长最快,但皂苷含量却最少。

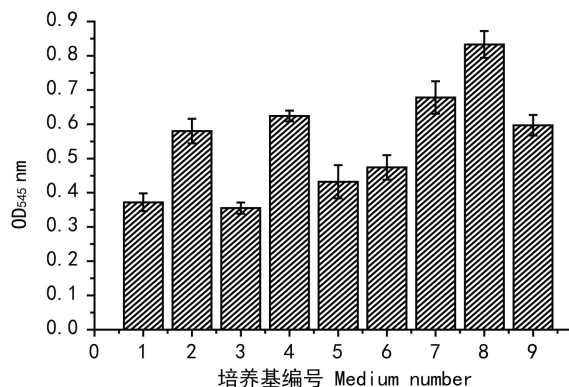


图1 激素组合对比对三七愈伤组织中皂苷含量的影响
Fig. 1 Effects of phytohormone combination on the saponin accumulation of *Panax notoginseng* callus 1. MS+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 2. MS+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 3. MS+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 4. MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 5. MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 6. MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 7. MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 8. MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 9. MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The same below.

何雪娇和赖钟雄(2012)研究N源对朱砂根愈伤组织生长及次生代谢的影响时,发现 NO_3^- 有利于愈伤组织生长,且培养基中 NO_3^- 浓度越高,愈伤组织的增殖系数增大,对次生代谢抑制作用越强。本研究结果也证明 NO_3^- 和 NH_4^+ 通过促进愈伤组织生长的途径调节次生代谢作用,且这种促进以减少次生代谢产物生产为代价(Collin, 2001)。

2.4 光照对三七愈伤组织中皂苷积累的影响

将长势均一的三七愈伤组织分组后置于不同光强下培养,25 d后观察愈伤组织生长状态和测定皂苷含量(图5、图6)。图5显示,0(黑暗)、500和1 000 lx三种光强下三七愈伤组织中皂苷含量分别为 $3.57\% \pm 0.27\%$, $2.38\% \pm 0.12\%$ 和 $1.94\% \pm 0.31\%$,表明无论500或1 000 lx光照均对皂苷积累有一定的抑制作用。进一步观察发现,愈伤组织在光下培养后发生分化,表面变绿,甚至长出幼芽(图6)。文涛等(2007)发现弱光有利于虎杖愈伤组织中白藜芦醇积累;李琰等(2010)发现光照不仅影响雷公藤愈伤组织的生长,且对雷公藤内酯醇及总生物碱的合成具有很强的抑制作用。关于光照对植物次生代谢的影响也有相反的报道,如连续光照可以明显增强黄芩毛状根中糖苷元、黄酮和黄芩素等次生代谢物质积累水平(Marsh

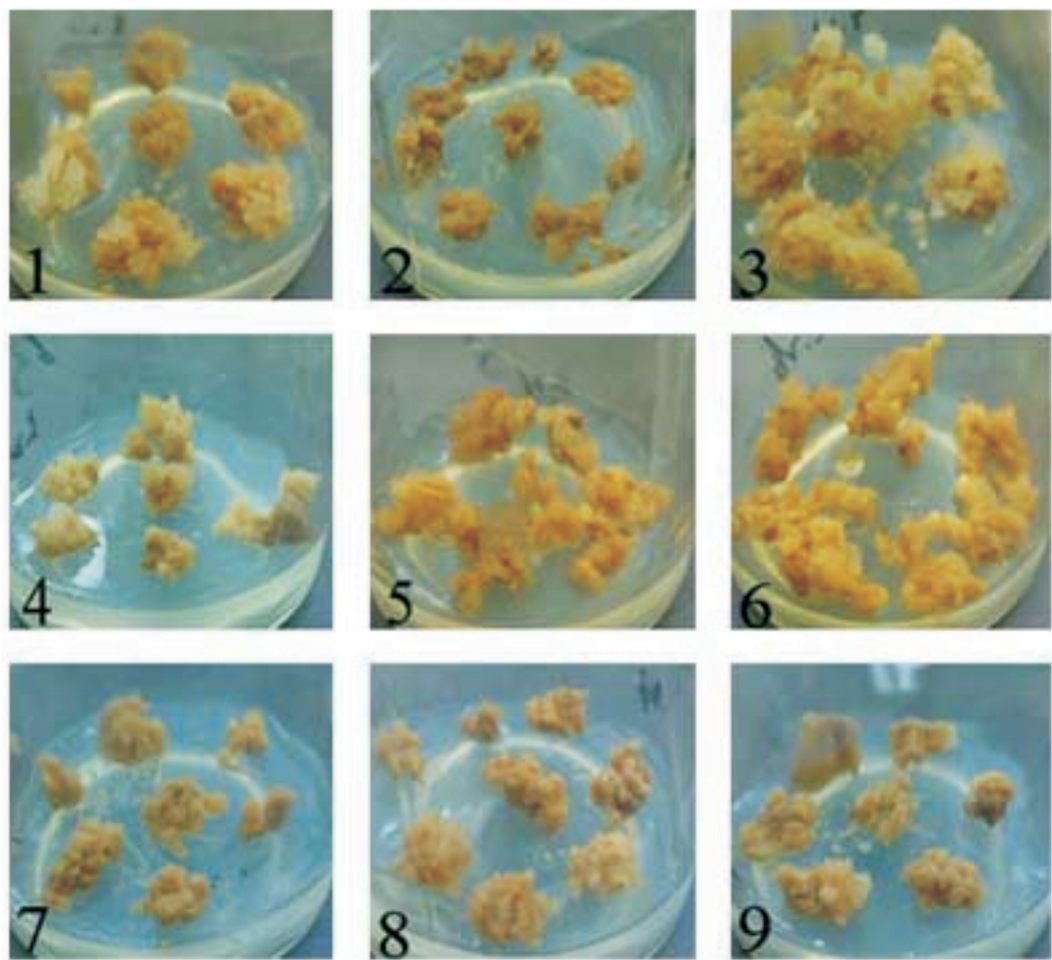


图 2 激素组合配比对三七愈伤组织生长状态的影响
Fig. 2 Effects of phytohormone combination on the growth status of *Panax notoginseng* callus

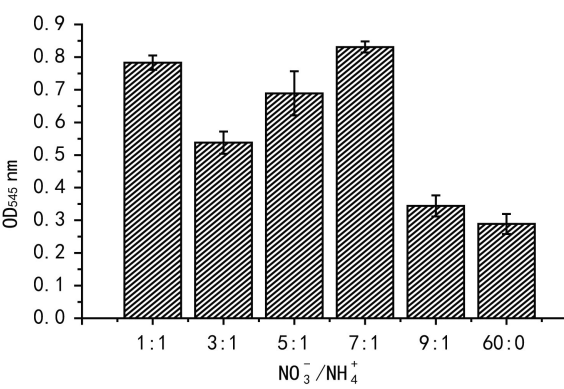


图 3 培养基中 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 对愈伤组织皂苷积累的影响
Fig. 3 Effects of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on the saponin accumulation of *Panax notoginseng* callus

et al, 2014)。

从本研究和前人研究中可以发现,光照对不同植物细胞次生代谢的影响是有差异的,这可能与次生代谢的复杂性有重大关系,因为植物细胞次生代谢与物种基因型、细胞生长状态和发育阶段、环境条件等因素有很大联系(何雪娇和赖钟雄,2012)。在离体培养条件下,细胞、组织和器官等不同水平培养物中次生代谢活跃程度不同,对环境因素如光照等反应也有差异。这些结果对于今后以组织培养技术规模化生产天然产物,特别是在培养参数设置和生物反应器设计等方面具有重要参考意义。

2.5 三七愈伤组织中皂苷 HPLC 分析

为了研究三七愈伤组织中皂苷变化,本研究将愈伤组织和人工栽培 3 年生的三七根中皂苷进行了

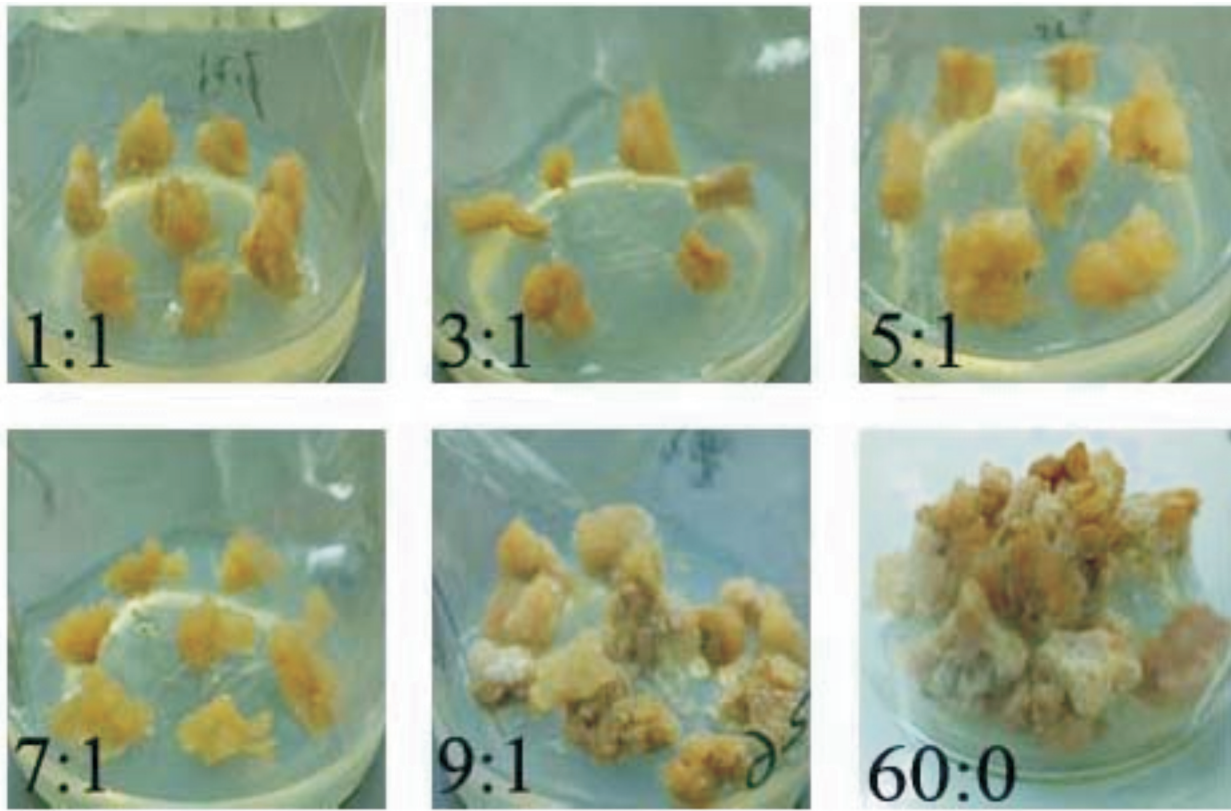


图 4 培养基中 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 对愈伤组织生长的影响
Fig. 4 Effects of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on the growth of *Panax notoginseng* callus

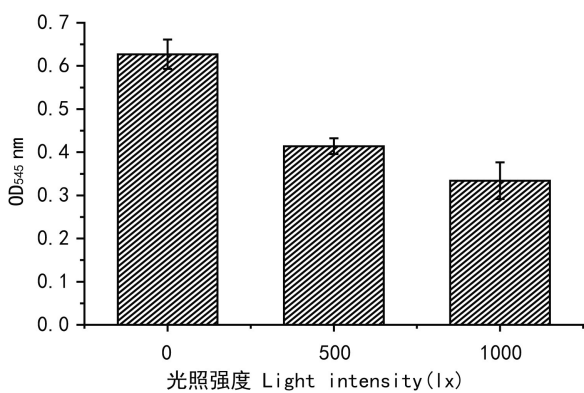


图 5 光强对三七愈伤组织中皂苷积累的影响
Fig. 5 Effects of light strength on the saponin accumulation of *Panax notoginseng* callus

栽培三七根和三七愈伤组织 ($\text{MS}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 2,4-D}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$) 皂苷 HPLC 分析图谱。

通过保留时间和峰面积分析,栽培三七根中包含 Rg_1 、 Rb_1 、 Rd 、 R_1 及 Re 五种皂苷,它们含量从高到低顺序是 $\text{Rg}_1>\text{Rb}_1>\text{Rd}>\text{R}_1>\text{Re}$,且 Rg_1 和 Rb_1 含量明显高于其它三种皂苷含量(图 7:b)。许重阳等(2008)在研究三七根茎、主根和支根三个部位中皂苷成分时发现,人参皂苷 Rg_1 、 Rb_1 和三七皂苷 R_1 的含量最高,其中三七皂苷 R_1 是三七特有的特征皂苷,各皂苷含量 $\text{Rg}_1>\text{Rb}_1>\text{R}_1$,这与本文结果一致。

离体培养的三七愈伤组织中仅含有 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 及 Rd 四种皂苷,其含量从高到低为 $\text{Rg}_1>\text{Rb}_1>\text{Rd}>\text{Re}$ (图 7:c)。三七不同部位的皂苷种类不同,如三七绒根含人参皂苷 Rg_1 、 Rb_1 、 Rh_1 和三七皂苷 R_1 ,三七芦头主要含人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 ,三七叶、花、果中皂苷含量较少,种类也少(鲍建才等,2006)。

与栽培三七根中皂苷分布相比,愈伤组织中缺

HPLC 分析(图 7)。图 7:a 是标准品 R_1 、 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 及 Rd 的保留时间图谱,图 7:b 和图 7:c 分别是

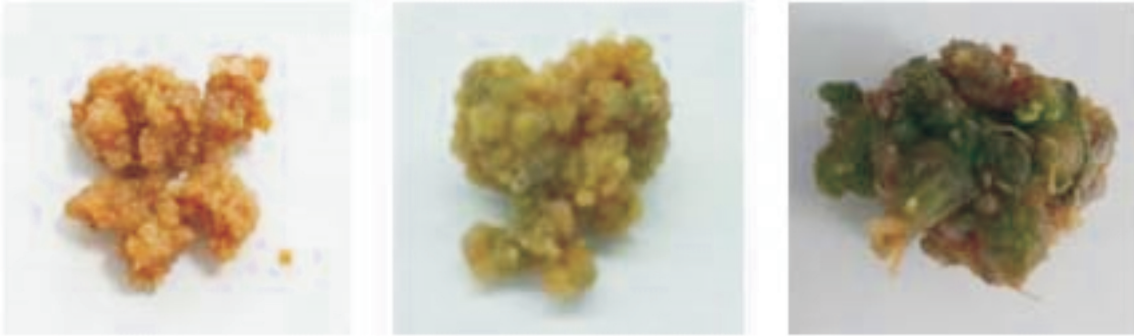


图 6 光强对三七愈伤组织生长的影响 1. 0 lx; 2. 500 lx; 3. 1 000 lx。
Fig. 6 Effects of light strength on the growth of *Panax notoginseng* callus

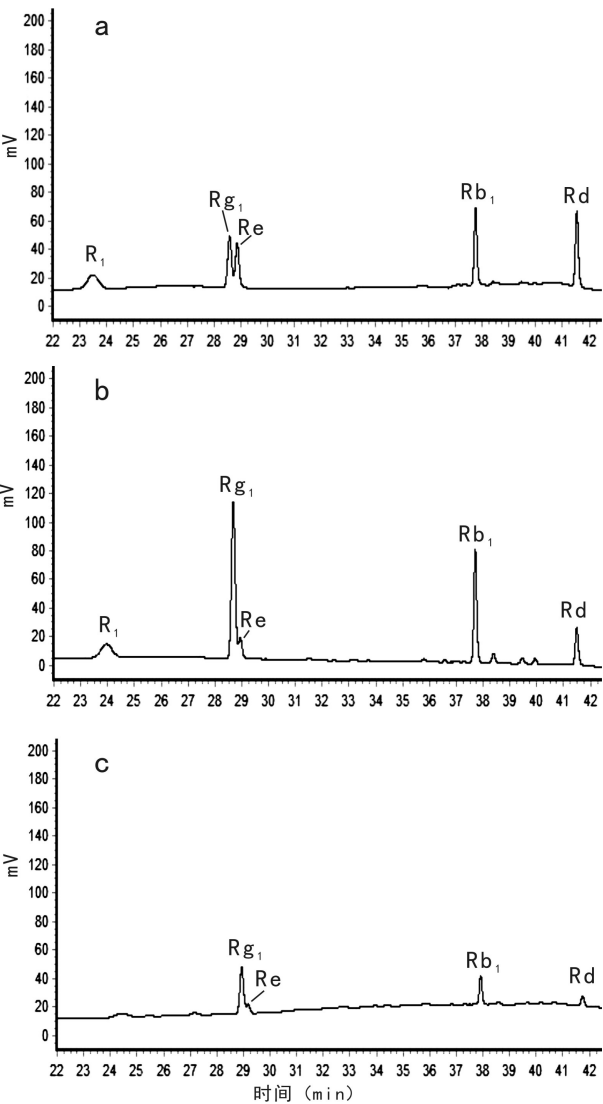


图 7 三七愈伤组织 HPLC 图谱 a. 皂苷标准品; b. 栽培三七根; c. 愈伤组织。

Fig. 7 HPLC chromatogram of *Panax notoginseng* callus
a. Reference saponin; b. Field cultivated roots; c. Callus.

少三七皂苷 R_1 , 可能是 R_1 含量太少而无法检出, 也可能是三七愈伤组织在培养过程中 R_1 合成水平低, 也可能是在离体条件下皂苷之间互相转化的结果。目前, 对于三七愈伤组织中皂苷种类及含量的研究较少, 无法确定三七愈伤组织较栽培三七根中缺少三七特征皂苷 R_1 的具体原因。

3 结论

激素对比对三七愈伤组织中皂苷含量的影响最大, 含有 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养基上培养的愈伤组织中皂苷含量最多, 达到 $4.72\% \pm 0.29\%$ 。在总氮量为 $60\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ = 7:1$ 条件下培养的愈伤组织中皂苷含量最多, 达到 $4.71\% \pm 0.17\%$; 黑暗培养有利于三七愈伤组织中皂苷积累, 光照具有一定的抑制作用, 这可能是与光照促进愈伤组织分化有关。与人工栽培三七根中皂苷相比, 愈伤组织中含有 R_{g1} 、 R_{b1} 、 R_d 和 R_e 四种皂苷, R_1 未检出, 可能是含量低、生物合成能力差和皂苷之间转化等原因造成的。

参考文献:

BAO JC, LIU G, CONG DL, et al, 2006. Research progress on chemical constituents of *Panax notoginseng* [J]. Chin Trad Pat Med, 28(2): 246-253. [鲍建才, 刘刚, 丛登立, 等, 2006. 三七的化学成分研究进展 [J]. 中成药, 28(2): 246-253.]
COLLIN H, 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures [J]. Plant Growth Regul, 34: 119-134.
CUSIDO RM, ONRUBIA M, SABATERr-JARA AB, et al,

2014. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp [J]. *Biotechnol Adv*, 32(6): 1157–1167.
- DICOSMO F, MISAWA M, 1995. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production [J]. *Biotechnol Adv*, 13(3): 425–453.
- GUO HB, CUI XM, AN N, et al, 2010. Sanchi ginseng [*Panax. notoginseng* (Burk.), F. H. Chen] in China: Distribution, cultivation and variations [J]. *Genet Resour Crop Ev*, 57(3): 453–460.
- HE XJ, LAI ZX, 2012. Effect of light and nitrogen source on the growth of callus and the content of bergenin in *Ardisia crenata* [J]. *J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed)*, 41(5): 486–490. [何雪娇, 赖钟雄, 2012. 光照和氮源对朱砂根愈伤组织生长及岩白菜素含量的影响 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 41(5): 486–490.]
- KIM DH, 2012. Chemical Diversity of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium*, and *Panax notoginseng* [J]. *J Ginseng Res*, 36(1): 1–15.
- KONOSHIMA T, TAKASAKI M, TOKUDA H, 1999. Anti-carcinogenic activity of the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Biol Pharm Bull*, 22(10): 1150–1152.
- LEI XL, CHIOU GC, 1986. Cardiovascular pharmacology of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen and *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Am J Chin Med*, 14: 145–152.
- LI HW, SU XH, DONG CM, et al, 2010. Effects of carbon, nitrogen sources on growth and rosmarinic acid accumulation of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) hara callus [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 21(6): 1348–1350. [李汉伟, 苏秀红, 董诚明, 等, 2010. 氮源和碳源对冬凌草愈伤组织生长及迷迭香酸的积累的影响 [J]. 时珍国医国药, 21(6): 1348–1350.]
- LI L, FENG JT, WANG YH, et al, 2010. Effects of basic media and culture conditions on callus growth and secondary metabolite content of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Sci Silv Sin*, 46(5): 64–69. [李琰, 冯俊涛, 王永宏, 等, 2010. 培养基及培养条件对雷公藤愈伤组织生长和次生代谢产物含量的影响 [J]. 林业科学, 46(5): 64–69.]
- LI LH, YU HS, JIN FX, et al, 2011. Separation and purification of ginsenoside Rh_1 in *Panax notoginseng* [J]. *J Dalian Polytech Univ*, 30(1): 23–25. [李龙华, 鱼红闪, 金凤鸢, 等, 2011. 三七中人参皂苷 Rh_1 的分离与纯化 [J]. 大连工业大学学报, 30(1): 23–25.]
- LIU H, XIA T, ZUO Y, et al, 2011. Development and characterization of microsatellite markers for *Panax notoginseng* (Araliaceae), a Chinese traditional herb [J]. *Am J Bot*, 98(8): e218–e220.
- LIU J, LIU YP, KLAASSEN CD, 1994. The effect of Chinese hepatoprotective medicines on experimental liver-injury in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 42(3): 183–191.
- LI YF, JIN ZX, ZHANG ZS, et al, 2014. Studies on the techniques of aseptic seedlings from *Panax notoginseng* seeds [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 25(8): 1999–2000. [李云芳, 金朝霞, 张宗申, 等, 2014. 三七种子无菌育苗技术的研究 [J]. 时珍国医国药, 25(8): 1999–2000.]
- MARSH Z, YANG TH, LUIS NOPO-OLAZABAL L, et al, 2014. Effect of light, methyl jasmonate and cyclodextrin on production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* [J]. *Phytochemistry*, 107: 50–60.
- MIAO GP, ZHU CS, FENG JT, 2013. Aggregate cell suspension cultures of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. for triptolide, wilforgine, and wilforine production [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 112(1): 109–116.
- OH JY, KIM YJ, JANG MG, et al, 2014. Investigation of ginsenosides in different tissues after elicitor treatment in *Panax ginseng* [J]. *J Ginseng Res*, 38(4): 270–277.
- TIAN L, LI YF, ZHANG ZS, et al, 2015. Effects of phytohormone combination on the multiplication of *Panax notoginseng* calls [J]. *J Zhoukou Norm Univ*, 32(5): 114–117. [田蕾, 李云芳, 张宗申, 等, 2015. 植物激素对三七愈伤组织增殖的影响 [J]. 周口师范学院学报, 32(5): 114–117.]
- WEN T, LIANG L, ZENG Y, et al, 2007. Effect of different light intensity on *Polygonum cuspidatum* callus [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 32(13): 1277–1280. [文涛, 梁莉, 曾杨, 等, 2007. 不同光照强度对虎杖愈伤组织的影响 [J]. 中国中药杂志, 32(13): 1277–1280.]
- XU CY, FU HY, HUANG LX, et al, 2008. The test of saponin in underground structure of *Panax notoginseng* by HPLC and the comparison of their content [J]. *Chin Prac Med*, 3(24): 52–53. [许重阳, 付海云, 黄利夏, 等, 2008. 三七地下部位皂甙成分的 HPLC 测定及含量比较 [J]. 中国实用医药, 3(24): 52–53.]
- YU M, ZHANG C, YUAN D, et al, 2012. *Panax notoginseng* saponins enhances the cytotoxicity of cisplatin via increasing gap junction intercellular communication [J]. *Biol Pharm Bull*, 35(8): 1230–1237.
- ZHANG Y, HAN L, SAKAH KJ, et al, 2013. Bioactive protopanaxatriol type saponins isolated from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen [J]. *Molecules*, 18(9): 10352–10366.
- ZHANG ZS, QIU N, WANG C, et al, 2014. Induction and characterization of callus from *Psammosilene tunicoides* hairy roots [J]. *J Chem Pharm Res*, 6(3): 1394–1399.
- ZHANG ZS, YU Z, JIN Z, et al, 2013. Liquid culture of adventitious roots is a potential alternative to field cultivation for *Psammosilene tunicoides*, a rare and endangered endemic medicinal plant [J]. *Adv J Food Sci Technol*, 5(2): 127–131.