

# 不同光质对人参愈伤组织生长及皂苷含量的影响

任跃英<sup>2</sup>, 牛晨<sup>1,2</sup>, 王京京<sup>1,2</sup>, 杨鹤<sup>1,2</sup>, 许永华<sup>1,2\*</sup>, 刘志<sup>2\*</sup>

1. 吉林农业大学人参新品种选育与开发国家地方联合工程研究中心, 吉林 长春 130118
2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

**摘要** 人参主要依靠大田栽培, 耗时长, 利用植物组织培养技术不仅可以缩短育种年限, 还可以用来生产次生代谢产物。在组织培养中, 光质对于药用植物次生代谢产物的影响受到了人们广泛关注。以人参愈伤组织为试材, 采用超高效液相色谱法, 研究了不同光质(包括红光、红蓝光、蓝光、绿光、黄绿光)对人参愈伤组织生长状态、总皂苷及9种皂苷单体 Rg1, Re, Rf, Ro, Rb1, Rc, Rb2, Rb3, Rd 含量的影响。结果表明: 绿光加速人参愈伤组织老化, 促进次生代谢产物的积累, 而蓝光对人参愈伤组织生长有促进作用; 红光和绿光对总皂苷作用不明显, 且蓝光、红蓝光(1:1)、黄绿光(1:1)对人参皂苷转化与合成起到明显的抑制作用; 与对照组相比, 绿光处理后 Rg1、Rf 含量均偏高, 其含量分别为 4.063 和 1.194 mg·g<sup>-1</sup>, 对 Rg1、Rf 人参皂苷单体含量有促进作用。表明不同光质对人参愈伤组织生长及皂苷含量有不同的影响, 可以通过绿光处理来获得人参单体皂苷 Rg1 和 Rf。该研究旨在探究光质对人参愈伤组织生理生化的影响, 提高人参皂苷含量, 为工业化生产提供理论依据。

**关键词** 人参; 愈伤组织; 光质; 人参皂苷; 超高效液相色谱

**中图分类号:** O657.7+2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)04-1318-05

## 引言

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)是五加科人参属多年生药用植物, 人参肉质根为著名的强壮滋补药, 味甘、微苦, 微温, 具有大补元气, 复脉固脱, 补脾益肺, 生津养血, 安神益智之功效<sup>[1]</sup>。人参在《神农本草经》中被列为上品滋补药物, 具有“多服久服不伤身, 轻身益气不老延年”的作用<sup>[2]</sup>, 其具有多种生物活性, 包括抗肿瘤、调节免疫力、抗衰老和抗疲劳等, 同时亦有提高记忆力和改善心肌缺血损伤作用<sup>[3]</sup>。人参含有多种化学成分, 包括人参皂苷、多糖、蛋白质、氨基酸、黄酮类、无机元素、维生素等物质, 而人参皂苷是人参中主要的活性成分, 属于三萜类皂苷, 根据糖苷配基结构不同分为达玛烷型四环三萜类和齐墩果酸型五环三萜类(主要包括 Ro)<sup>[4]</sup>, 达玛烷型人参皂苷又根据其苷元不同分为原人参二醇型(PPD型, 主要包括 Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd)和原人参三醇型(PPT型, 主要包括 Rg1, Re 和 Rf)<sup>[5]</sup>。

人参育种工作已经开展了几十年, 但发展缓慢, 是由于人参自身的某些特性所导致的<sup>[6]</sup>。利用植物组织培养技术可

使植物实现离体快繁, 大大缩短育种时间。在植物组织培养过程种, 光是重要的影响因素之一。有研究表明, 光质对植物的结构发育及形态有很大的影响<sup>[7]</sup>, 对于次生代谢产物的产生有促进作用<sup>[8]</sup>, 并且对完整植物和离体的植物组织均有影响<sup>[9]</sup>。而光质对于植物的影响会因植物种类的不同而产生不同的影响<sup>[10]</sup>。目前, 有关光质对人参愈伤组织皂苷含量影响还没有相关研究。本工作以人参愈伤组织为试验材料, 探究光质对人参愈伤组织中人参皂苷含量的影响, 旨在提高人参皂苷含量。

## 1 实验部分

### 1.1 试验材料

人参采自吉林农业大学药植园, 愈伤组织由二年生人参越冬芽诱导而来。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人参愈伤组织诱导与培养

取二年生人参越冬芽, 先用流水冲洗 4~6 h, 除去泥土, 再用洗洁精进行表面清洗, 后用滤纸吸干表面水分, 放

收稿日期: 2020-11-03, 修订日期: 2021-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770378)资助

作者简介: 任跃英, 女, 1958年生, 吉林农业大学中药材学院教授 e-mail: 381717169@qq.com; liuzhi1978@126.com

\* 通讯作者 e-mail: xuyonghua@jlau.edu.cn; liuzhi1978@126.com

入干净的组培瓶中转至超净工作台。将人参越冬芽外植体用75%酒精消毒15~20 s,再用无菌水冲洗1次,0.1%升汞消毒10~15 min,无菌水冲洗4~5次。人参愈伤组织的诱导与继代培养基为MS基础培养基,添加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>、琼脂7 g·L<sup>-1</sup>、2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>、6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,pH 5.8。培养条件为暗培养,温度(25±2)℃,湿度60%。

### 1.2.2 不同光质处理人参愈伤组织及其形态观察

以培养4周且生长状态良好的人参愈伤组织为材料,接种至MS基础培养基中,每瓶均匀接种5块,每块鲜重约0.2 g,每个处理30瓶,重复3次,共接种180瓶。将其平均分为6组,分别置于红光、红蓝光、蓝光、绿光、黄绿光、黑暗(CK)五种不同光质条件下培养。不同光源技术参数如表1所示。培养温度(25±2)℃,光照时长16 h·d<sup>-1</sup>,光照强度(200±10) μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,培养28 d,在第5,15,21,25和30 d时拍照、观察并记录其形态。

表1 不同LED光源技术参数

Table 1 Different LED light source technical parameters

光源	光谱组成	波长/nm	峰值波长/nm
R	100%红	615~630	660
B	100%蓝	440~475	460
G	100%绿	515~535	525
RB	50%红+50%蓝	615~630, 440~475	660+460
YG	50%黄+50%绿	580~596, 515~535	597+521
CK	—	—	—

注:“—”表示没有

Note: ‘—’ means nothing

### 1.3 项目测定

收获培养28 d的人参愈伤组织,用滤纸吸干其表面水分,称重,记为鲜重,后置于40℃烘箱中烘干至恒重,称其重量记为干重,再用研钵研磨成粉末,过80目筛,保存备

用。精密称取0.1 g的样品粉末,置于5 mL的离心管中,加入2.5 mL氨水-水-甲醇溶液(NH<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O+CH<sub>3</sub>OH=4+21+75, V:V),封口胶封住管口,用混匀器混匀,超声提取30 min(功率600 W,频率35 kHz),静置48 h,取上清液,0.22 μm微孔滤膜过滤,用超相液相色谱进行检测。每个样品重复3次。

### 1.4 数据分析

用DPS对实验数据进行分析,采用Duncan新复极差法进行显著性分析,Excel 2019进行图形分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同光质对人参愈伤组织形态的影响

不同光质处理对人参愈伤组织生长及形态变化有明显差异。如图1所示,蓝光处理下人参愈伤组织最早出现发白现象,且边缘产生灰色物质[图1(A1)],处理第30 d时,愈伤组织逐渐呈灰白色,愈伤块增大[图1(A5)];红光处理下人参愈伤组织也出现变白现象,但程度低于蓝光处理[图1(B1)],后又呈现黄白色,处理第30天时,与对照相比,红光处理后的愈伤偏白,且有愈伤发生褐变,愈伤块明显缩小[图1(B5)];绿光处理下人参愈伤组织颜色发白,但次于其他光质,但逐渐出现大面积的褐变愈伤,少部分仍呈白色[图1(C5)],可能是由于绿光能加速愈伤组织老化,促进次生代谢产物的积累;红蓝光处理下愈伤也呈现白色,但程度低于蓝光而高于其他光质,处理第30 d时,颜色偏灰褐色,且愈伤块缩小,老化程度严重[图1(D5)]。黄绿光处理下人参愈伤组织初期无明显的颜色变化,后亦发白,且边缘有褐色物质产生[图1(E1)],处理第30 d时,黄绿光处理后大部分愈伤呈白色,白色程度最显著,强于其他光质[图1(E5)];黑暗条件下人参愈伤组织偏黄,边缘有红色物质产生,组织疏松,含水量大[图1(F1)],处理第28 d时,愈伤组织表面呈现红褐色[图1(F5)]。

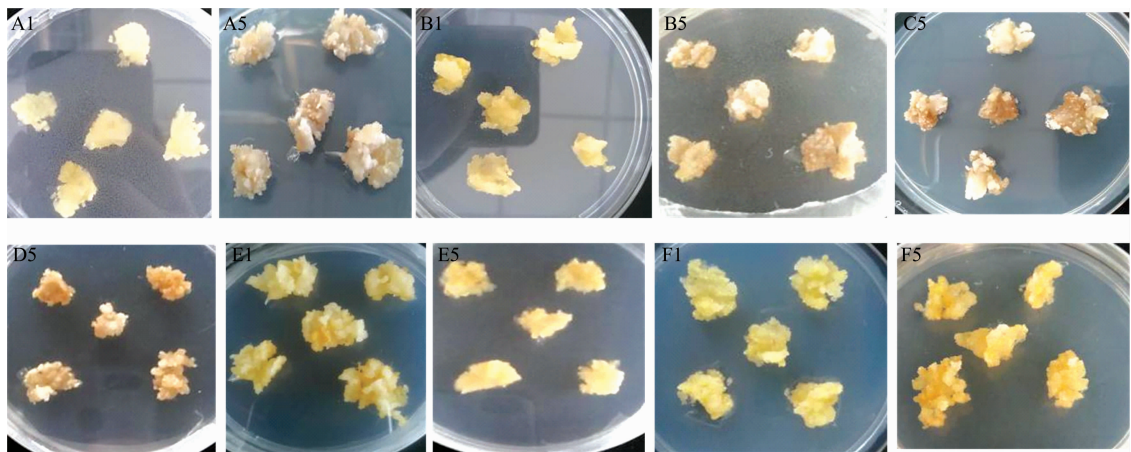


图1 不同光质对人参愈伤组织形态的影响

A: 蓝光; B: 红光; C: 绿光; D: 红蓝光; E: 黄绿光; F: 黑暗(CK); 1, 5 分别代表第5天、第30天

Fig. 1 Effects of different light qualities on callus morphology of *P. ginseng*

A: Blue light; B: Red light; C: green light; D: Red and blue light; E: Yellow and green light; F: Dark(CK);

The numbers 1 and 5 on the figures represent the treatment of the 5th and 30th day, respectively

## 2.2 不同光质对人参愈伤组织生长的影响

不同光质对人参愈伤组织生长影响如图 2 所示。与对照相比,蓝光对愈伤组织生长有促进作用,其他光质对愈伤组织鲜重积累呈不同程度的抑制作用,但与对照相比差异都不显著( $p>0.05$ );除蓝光外,其他光质对鲜重影响均低于对照,但其干重均略高于对照,分析原因可能是由于折干率不同,且不同光质的折干率与对照相比差异显著( $p<0.05$ )。由此可见,经过蓝光处理,愈伤组织的鲜重、干重均达到最大,说明蓝光对愈伤组织生长起到较好的促进作用,但彼此之间差异不显著( $p>0.05$ )。

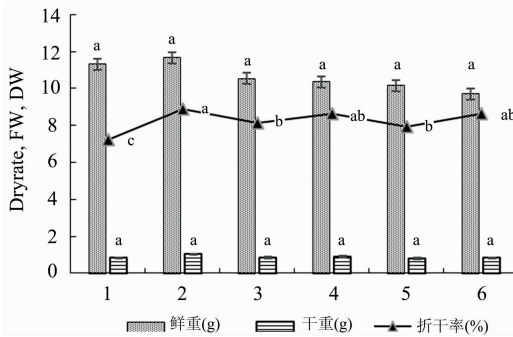


图 2 不同光质对人参愈伤组织生长的影响

1: 黑暗(CK); 2: 蓝光; 3: 红蓝光; 4: 红光; 5: 绿光; 6: 黄绿光; 不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著( $p<0.05$ )

Fig. 2 Effects of different light qualities on callus growth of *P. ginseng*

1: Dark(CK); 2: Blue light; 3: Red and blue light; 4: Red light; 5: Green light; 6: Yellow and green light; The different normal letters indicated significant difference among treatments at 0.05 level ( $p<0.05$ )

## 2.3 不同光质对人参愈伤组织中 PPD、PPT 型、齐墩果酸型人参皂苷和总皂苷含量的影响

不同光质对人参愈伤组织中 PPD、PPT 型、齐墩果酸型人参皂苷和总皂苷的影响见表 2, 其中 a—d 表示不同光质处理样品中皂苷含量差异的显著性( $p<0.05$ ), 若字母相同则表示差异不显著(下同)。由表 2 可知, 不同光质处理后人参愈伤组织中 PPD 型、PPT 型、齐墩果酸型人参皂苷和总皂苷含量多数低于对照, 且与对照差异显著( $p<0.05$ ); 但相比其他光质, 绿光处理后 PPD 型、PPT 型、齐墩果酸型人参皂苷和总皂苷含量均较高; 蓝光、红蓝光、黄绿光处理后齐墩果酸型人参皂苷消失, 而红光、绿光处理后其明显减少; 蓝光、红蓝光、黄绿光处理后 PPD 型、PPT 型人参皂苷和总皂苷含量极低; 但经过蓝光、红蓝光、黄绿光处理后 PPT 型人参皂苷含量略高于 PPD 型皂苷含量, 其中蓝光和红蓝光导致的变化最为凸显, 黄绿光导致的变化不明显; 绿光处理后总皂苷略低于对照, 而 PPT 型人参皂苷略高于对照, 但彼此差异都不显著( $p>0.05$ )。不同光质对人参愈伤组织中总皂苷含量的影响依次为黑暗>绿光>红光>黄绿光>蓝光>红蓝光; 对 PPD 型人参皂苷的影响依次为黑暗>绿光>红光>黄绿光>蓝光>红蓝光; 对 PPT 型人参皂苷的影响依次为黑暗>绿光>红光>黄绿光>红蓝光>蓝光; 对齐墩果酸型人参皂苷的影响均较弱。红光和绿光对人参皂

苷作用不明显, 而蓝光、红蓝光、黄绿光对人参皂苷合成却起到明显的抑制作用。

表 2 不同光质对人参愈伤组织中 PPD、PPT 型、齐墩果酸型人参皂苷和总皂苷的影响

Table 2 Effects of contents of PPD, PPT, oleanolic acid-type and total ginsenosides in *P. ginseng* callus by different light qualities ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

光质	总皂苷 <sup>a</sup>	PPD 型 <sup>b</sup>	PPT 型	齐墩果酸型 <sup>d</sup>
CK	14.644 a	8.22 a	6.004 a	0.42 a
R	11.725 b	6.63 b	4.844 b	0.251 b
B	1.707 cd	0.677 cd	1.03 c	—
G	13.722 a	6.907 b	6.549 a	0.266 b
RB	1.426 d	0.292 d	1.134 c	—
YG	2.816 c	1.374 c	1.442 c	—

注: “—”表示未检测到; a: Rg1+Re+Rf+Ro+Rb1+Rc+Rb2+Rb3+Rd; b: Rb1+Rc+Rb2+Rb3+Rd; c: Rg1+Re+Rf; d: Ro

Note: “—”means not detected; a: Rg1+Re+Rf+Ro+Rb1+Rc+Rb2+Rb3+Rd; b: Rb1+Rc+Rb2+Rb3+Rd; c: Rg1+Re+Rf; d: Ro

## 2.4 不同光质对人参愈伤组织中 9 种皂苷单体含量的影响

采用超高效液相色谱法测定不同光质对人参愈伤组织中 9 种皂苷单体含量的影响, 结果如表 3 所示。不同光质处理对人参愈伤组织中 Rb3 的含量无影响, 均未检测到 Rb3 的存在; 蓝光、红蓝光、黄绿光处理后 9 种皂苷类成分含量偏低, 甚至检测不到 Rf, Ro 和 Rc 的存在; 与对照相比, 绿光处理后 Rg1 和 Rf 含量均偏高, 此时含量分别为 4.063 和 1.194  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 对 Rg1 和 Rf 人参皂苷单体含量有促进作用, Rg1 变化差异显著( $p<0.05$ ), 但 Rf 之间差异不显著( $p>0.05$ ); 相比蓝光、红蓝光、黄绿光, 红光和绿光处理后人参皂苷单体含量较高, 且绿光优于红光; 总之, 红光、蓝光、绿光、红蓝光、黄绿光处理对人参皂苷含量的影响均不如黑暗处理。

近年来, 已有不少学者研究光对愈伤组织诱导、植株再生、诱导生根、组培苗生长和次生代谢产物积累等方面的影响, 光照虽不是愈伤组织生长的必要条件, 但在愈伤组织诱导分化、次生代谢产物积累方面却起着重要的作用, 而光质、光照强度、光照周期是影响愈伤组织中次生代谢产物积累的主要因素。魏喜等<sup>[11]</sup>研究发现, 红蓝混合光有利于棉花愈伤组织的诱导分化。刘生财等<sup>[12]</sup>也曾报道红蓝复合光有利于龙眼胚性愈伤组织中类黄酮及表儿茶素合成, 且蓝光比例越大越有利于次生代谢物质的合成。相比田间栽培, 植物组织培养技术具有高效、快速等优点, 也是生产次生代谢产物最有效的方法之一。不同光质作为外界因素, 会对细胞培养产生直接影响, 导致其生长环境发生改变, 引起细胞体系的改变, 从而对愈伤组织生长和次生代谢产物积累产生影响。本工作以愈伤组织为材料, 探究不同光质对人参愈伤组织中 9 种人参皂苷单体及总皂苷含量的变化。结果表明, 不同光质处理后人参愈伤组织中 PPD 型、PPT 型、齐墩果酸

型人参皂苷和总皂苷含量均低于对照,红光和绿光对人参皂苷含量作用不明显,且蓝光、红蓝光、黄绿光对人参中主要皂苷类成分起到明显的抑制作用。推测可能因不同光质都是由具有相对能量的光线组成的,会产生一定热量,从而使愈伤组织表面温度升高,而高温高压的环境会使人参皂苷发生降解和转化,可能会生成其他皂苷类成分或增加人参总糖含

量,谢丽娟等<sup>[13]</sup>研究发现,温度较高( $>30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),会使人参失去部分糖基,易水解成原人参二醇、原人参三醇或其他次生苷。高越等<sup>[14]</sup>也证实了高温会降低 Rg1, Re 和 Rb2 人参皂苷单体的含量。而且愈伤组织是由未分化的原始细胞团构成的,没有正常人参植株那么复杂的结构,降低了转化时的结构障碍,使得人参皂苷单体之间更易相互转化。

表3 不同光质对人参愈伤组织中9种皂苷类成分含量的影响

Table 3 Contents of 9 kinds of individual ginsenosides in *P. ginseng* callus by different light qualities

光质	皂苷类成分含量/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )								
	Rg1	Re	Rf	Ro	Rb1	Rc	Rb2	Rb3	Rd
CK	3.341 b	1.899 a	0.764 a	0.42 a	6.667 a	0.487 a	0.466 a	—	0.601 a
R	2.557 c	1.658 ab	0.629 a	0.251 b	5.385 b	0.233 b	0.486 a	—	0.527 a
B	0.749 d	0.281 c	—	—	0.549 cd	—	—	—	0.128 c
G	4.063 a	1.292 b	1.194 a	0.266 b	5.839 b	0.264 b	0.453 a	—	0.351 b
RB	1.134 d	—	—	—	0.292 d	—	—	—	—
YG	1.1 d	0.342 c	—	—	1.121 c	—	0.039 b	—	0.214 c

注:“—”表示未检测到

Note: ‘—’ means not detected

### 3 结论

光质处理会影响人参愈伤组织形态及生物量,绿光会加速人参愈伤组织老化,促进次生代谢产物积累,而蓝光对人参愈伤组织生长有促进作用。在对人参愈伤组织中9种人参皂苷成分的研究中发现,蓝光、红蓝光、黄绿光处理后9种皂苷类成分含量极低;与对照相比,绿光处理后 Rg1、Rf 含量均偏高,对 Rg1、Rf 人参皂苷单体形成有促进作用;相比

蓝、红蓝、黄绿三种光质,红光和绿光处理后人参皂苷单体含量较高,且绿光优于红光;总之,红光、蓝光、绿光、红蓝光、黄绿光处理对人参皂苷含量的影响均不如对照。

综上所述,绿光会加速人参愈伤组织老化,而蓝光会促进人参愈伤组织生长。不同光质对人参愈伤组织中总皂苷及9种单体皂苷类成分的影响有所不同,绿光对 Rg1、Rf 人参皂苷单体含量有促进作用,并且其含量与光质所具能量高低有一定关系。从光照的角度出发,对如何提高人参皂苷含量的方法还有待进一步深究。

### References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press(北京:中国医药科技出版社), 2020.
- [2] SONG Qi(宋齐). Ginseng Research(人参研究), 2017, 29(2): 47.
- [3] YAO Meng-jie, LÜ Jin-peng, ZHANG Qiao, et al(姚梦杰, 吕金朋, 张乔, 等). Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine(吉林中医药), 2017, 37(12): 1261.
- [4] ZHANG Tao, WANG Guan, ZHANG Wei-wei, et al(张涛, 王冠, 张维维, 等). Chinese Herbal Medicines(中草药), 2020, 51(19): 5035.
- [5] Kim Y J, Zhang D, Yang D C. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 717.
- [6] QI Hai-jun, GAO Hui, CHEN Fen-fen, et al(齐海军, 高慧, 陈芬芬, 等). Northern Horticulture(北方园艺), 2016, (14): 109.
- [7] Naveed Ahmad, Abdur Rab, Nisar Ahmad. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 2016, 154: 51.
- [8] Sahil Kapoor, Rinky Raghuvanshi, Pushpender Bhardwaj, et al. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 2018, 183: 258.
- [9] LI Han, YANG Dan-ting, MENG Jia-mei, et al(李哈, 杨丹婷, 孟佳美, 等). Chinese Agricultural Science Bulletin(中国农学通报), 2018, 34(36): 65.
- [10] Muhammad Younas, Samantha Drouet, Muhammad Nadeem, et al. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 2018, 184: 61.
- [11] WEI Xi, WANG Qian-hua, GE Xiao-yang, et al(魏喜, 王倩华, 葛晓阳, 等). Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学), 2019, 52(6): 968.
- [12] LIU Sheng-cai, LI Han-sheng, YANG Xi-chen, et al(刘生财, 李汉生, 杨曦晨, 等). Journal of Henan Agricultural Sciences(河南农业科学), 2020, 49(8): 109.

- [13] XIE Li-juan, YUAN Bing-bing, LI Jian-hao, et al(谢丽娟, 苑冰冰, 李健豪, 等). *Ginseng Research(人参研究)*, 2019, 31(6): 57.
- [14] GAO Yue, YU Yang, NIU Shu-jing, et al(高越, 于洋, 牛淑静, 等). *Modern Chinese Medicine(中国现代中药)*, 2015, 17(4): 335.

## Effects of Different Light Qualities on Growth and Ginsenoside Contents in Callus of *Panax ginseng*

REN Yue-ying<sup>2</sup>, NIU Chen<sup>1, 2</sup>, WANG Jing-jing<sup>1, 2</sup>, YANG He<sup>1, 2</sup>, XU Yong-hua<sup>1, 2\*</sup>, LIU Zhi<sup>2\*</sup>

1. State Local Joint Engineering Research Center of Ginseng Breeding and Application, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China
2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Abstract** Ginseng mainly relies on field cultivation, which takes a long time. The use of plant tissue culture technology can not only shorten the breeding period, but also can be directly used to produce secondary metabolites. In plant tissue culture, the influence of light quality on the secondary metabolites of medicinal plants has attracted widespread attention. In our work, ginseng callus was used as the experimental material, and ultra-high performance liquid chromatography was used to study the effects of different light qualities (including red light, red-blue light, blue light, green light, yellow-green light) on the total saponins and the contents of 9 saponins monomers Rg1, Re, Rf, Ro, Rb1, Rc, Rb2, Rb3, Rd. The results show that green light accelerates the aging of ginseng callus and promotes the accumulation of secondary metabolites, while blue light can promote the growth of ginseng callus; red light and green light have no obvious effect on total saponins, and blue light, red-blue light (1 : 1), yellow-green light (1 : 1) have obvious inhibitory effects on the conversion and synthesis of ginsenosides; compared with the control group, the contents of Rg1 and Rf were higher under green light treatment, and the contents were 4.063 and 1.194 mg · g<sup>-1</sup>, respectively, the green light also promoted the content of Rg1 and Rf ginsenoside monomers. This experiment shows that different light qualities have different effects on the growth of ginseng callus and the content of saponins. Green light treatment is beneficial to obtain ginseng monomer saponins Rg1 and Rf. The purpose of this article is to explore the effects of light quality on the physiology and biochemistry of ginseng callus, increase the content of ginsenosides, and provide a theoretical basis for industrial production.

**Keywords** *Panax ginseng*; Callus; Light quality; Ginsenosides; Ultra performance liquid chromatography

(Received Nov. 3, 2020; accepted Jun. 8, 2021)

\* Corresponding authors