

植物生长物质对白英毛状根生长及薯蓣皂苷元含量的影响

董瑜¹, 陈宇¹, 张楷燕¹, 孙一铭¹, 张来², 孙敏^{1*}

¹西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆400715; ²安顺学院, 贵州省教育厅功能材料与资源化学特色重点实验室, 贵州安顺561000

摘要: 利用含pRiA4质粒的农杆菌C58C1浸染白英叶片获得能在无植物生长物质培养基上自主生长的毛状根单克隆系, 且毛状根中薯蓣皂苷元含量高于野生型白英植株。在液体培养基中添加不同浓度的6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)或6-BA与NAA的结合处理白英毛状根, 观察其对毛状根生长的影响, 并利用高效液相色谱法(HPLC)测定毛状根中薯蓣皂苷元含量。结果表明, 6-BA抑制白英毛状根的生长, 且随6-BA浓度增加, 抑制作用越明显, 6-BA能增加白英毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元的含量, 但降低培养瓶中毛状根薯蓣皂苷元总量。NAA对毛状根的生长有促进作用, 其中, 经0.5 mg·L⁻¹ NAA处理的毛状根在培养30 d时干重达到同期对照的1.76倍。虽然NAA降低每克干物质中薯蓣皂苷元含量, 但提高培养瓶中毛状根薯蓣皂苷元总量, 薯蓣皂苷元总量最高可达0.97 mg (DW)·瓶⁻¹, 是对照整个培养过程中最大值的1.37倍。6-BA与0.5 mg·L⁻¹ NAA的结合抑制白英毛状根的生长, 同时降低每克干物质中薯蓣皂苷元的含量。

关键词: 白英; 毛状根; 植物生长物质; 薯蓣皂苷元; HPLC

白英(*Solanum lyratum*)是茄科(Solanaceae)茄属植物的全草, 又名白毛藤, 多年生蔓性草本。白英含有多种化学成分, 主要有甾体皂苷类、甾体生物碱类、有机酸等化合物, 其全草具有清热解毒、祛风除湿、抗癌等功效(孙立新等2006; Sun等2006, 2011; 王文昌等2011)。白英中的主要药用成分为薯蓣皂苷元(diosgenin), 是用于合成各种避孕药和甾体激素类药物的主要基础原料, 它除了主要的抗肿瘤作用之外, 还具有肝脏保护、调血脂、抗氧化、促进骨骼形成和消炎等药理活性(何焱等2013)。

毛状根的产生是由发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的Ri质粒的T-DNA片段在植物基因组中整合表达的结果。利用发根农杆菌诱导植物外植体能获得在无生长物质培养基上自主生长、遗传稳定、多分支且次生代谢产物含量高于野生植株的毛状根系。在此基础上, 为进一步扩大毛状根生长量以及提高毛状根在一定培养时间内其主要药用成分的积累, 适当的添加植物生长物质对毛状根的生长及毛状根中次生代谢产物的合成具有一定的影响, 且植物生长物质的种类及浓度不同, 影响也不同(Meyer和Vanstanden 1995; 于荣敏等2006; 施和平等2006; 齐香君2009; 房翠萍等2011; 徐大卫2012; 何含杰2014; 王瑜2014)。本实验研究了细胞分裂素6-BA、生长素NAA, 以及6-BA和NAA的组合对白英毛状根生长和薯蓣皂苷元含量的影响, 以求找到能有效提高白英毛状根

生长量和薯蓣皂苷元含量的植物生长物质培养条件, 为扩大化生产奠定基础。

材料与方法

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料

农杆菌C58C1菌株, 是根癌农杆菌经“解除武装(disarmed)”改造后, 保留Helper质粒, 导入pRiA4质粒而成的发根农杆菌, 改造后的C58C1失去使植物长冠瘤组织的能力。菌株由西南大学廖志华教授提供。

白英(*Solanum lyratum* Thunb.)种子采自西南大学校园内, 经西南大学生命科学学院邓洪平教授鉴定为白英种子, 于4°C冰箱内保存。

1.2 试剂

实验所用试剂中, 用于处理实验和物质提取的6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)、萘乙酸(α -naphthaleneacetic, NAA)、盐酸、甲醇、乙醇、石油醚均为分析纯, 用于高效液相色谱检测的甲醇、乙腈为色谱纯; 薯蓣皂苷元标准品购于成都曼思特生物科技有限公司(HPLC检测纯度 $\geq 99.99\%$)。

收稿 2016-02-25 修定 2016-03-22

资助 中央高校基本科研业务费专项资金项目(XDJK2012C088)和贵州省功能材料与资源化学特色重点实验室开放基金项目。

* 通讯作者(E-mail: jwasm@swu.edu.cn)。

1.3 仪器

实验所用仪器有GXZ型智能光照培养箱(宁波东南仪器公司)、培英大容量全温振荡器(太仓实验设备厂)、CS101-3ABY电热鼓风干燥箱(重庆永生实验仪器公司)、SHZ-III型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂)、旋转蒸发器RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂)、岛津LC-20AD自动进样高效液相色谱仪(日本)和Symmetry-C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)。

2 方法

2.1 无菌苗的获得

白英种子用40°C水浸泡1 h, 自来水常温浸泡24 h解除休眠。75%酒精消毒30 s, 无菌水冲洗3次, 升汞消毒10 min, 无菌水冲洗4次, 接种于MS培养基中25°C暗培养至萌发(张鸿等2012), 萌发后转移至光照培养箱内25°C, 光强40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间12 h·d⁻¹, 获得白英无菌苗待用。

2.2 菌种的活化

从-80°C超低温冰箱中取保存的C58C1菌株200 μL, 加入25 mL YEP(附加利福平40 mg·L⁻¹)液体培养基中, 200 r·min⁻¹、27°C振荡培养24 h, 复苏菌体。在50 mL YEP(附加利福平40 mg·L⁻¹)液体培养基中加入100 μL上述复苏菌液, 200 r·min⁻¹振荡培养10 h, 加入乙酰丁香酮至终浓度为100 μmol·L⁻¹, 相同条件下继续振荡培养2 h左右。将上述50 mL的菌液分装于无菌离心管内, 4 000 r·min⁻¹离心10 min, 弃上清液, 菌体用等体积MS液体培养基(附加100 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮)悬浮培养, 继续活化30 min左右作为浸染液用于转化白英外植体(张显强等2012)。

2.3 白英毛状根的诱导与培养

将白英无菌苗叶片切成0.5~1 cm²的小块, 用无菌针扎出一些伤口, 放入已活化好的菌液中, 200 r·min⁻¹、27°C振荡10 min后, 用无菌吸水纸吸干多余菌液, 接种于附加100 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮的MS固体培养基中, 27°C黑暗共培养3~4 d至叶片周围有菌斑出现时, 取出叶片, 无菌水洗涤2次, 用无菌吸水纸吸干水分后转入附加500 mg·L⁻¹头孢噻肟钠的MS培养基上进行光照培养, 每7 d更换一次培养基, 直至毛状根长出。当毛状根长至2~3 cm时, 剪下不同单克隆接种于附加500 mg·L⁻¹头孢噻肟钠的1/2MS培养基上进行除菌培养, 每7 d剪取根尖继代

培养, 继代5~6次后, 将毛状根转接至YEP琼脂培养基上暗培养7 d, 以确定毛状根无农杆菌污染后, 接种于1/2MS液体培养基中, 110 r·min⁻¹、27°C黑暗振荡培养。培养30 d左右收获毛状根进行分子检测后, 选取分支较多且性状稳定的阳性毛状根单克隆进行扩大培养, 供后续实验使用。

2.4 白英毛状根中*rolB*基因的分子检测

分别取不同单克隆系的毛状根, 试剂盒提取DNA。采用PCR扩增的方法检测毛状根基因组中的*rolB*基因, *rolB*基因正向引物为5'-GCTCTTG-CAGTGCTAGATTT-3', 反向引物为5'-GAAGGTG-CAAGCTACCTCTC-3'。PCR反应体系为25 μL, 依次加入DNA模板1 μL、正反引物各0.5 μL、ddH₂O 10.5 μL和GoTaq[®] Green Master Mix 12.5 μL。发根农杆菌C58C1作为阳性对照。PCR扩增条件: 94°C预变性5 min; 94°C变性45 s, 55°C退火20 s, 72°C延伸30 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。扩增产物于120 V、90 mA下进行0.1%琼脂糖凝胶电泳后于凝胶成像系统中拍照保存。

2.5 外源植物生长物质处理实验

将继代培养20 d的生长旺盛的新鲜白英毛状根约0.30 g(干重0.018 g)接种至添加不同质量浓度的6-BA、NAA和6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA组合的1/2MS液体培养基中, 其中6-BA、NAA质量浓度梯度均为0.1、0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹, 每个100 mL锥形瓶中分装培养基50 mL, pH 5.80~5.85, 于110 r·min⁻¹、27°C黑暗振荡培养, 每个浓度处理设置3个重复。对照组为不添加任何植物生长物质的相同培养条件下的白英毛状根。

2.6 白英毛状根生物量测定

在30 d的培养过程中, 每5 d随机抽取不同生长物质及其浓度处理的毛状根各3瓶, 用蒸馏水洗净培养物上的培养基, 并用吸水纸吸干水分后测定毛状根的鲜重。将称量鲜重后的毛状根于60°C恒温烘箱中烘干至恒重, 测定干重后供薯蓣皂苷元的提取和测定。

2.7 白英毛状根中薯蓣皂苷元含量的测定

2.7.1 薯蓣皂苷元的提取

精密称取毛状根粉末0.05 g, 置于250 mL锥形瓶中, 加入水13 mL, 甲醇70 mL, 再加浓盐酸溶液17 mL, 水浴加热回流3 h, 室温放置冷却后抽滤, 取滤液, 用石油醚(60~90°C)萃取3次, 每次30 mL, 取石油

醚层, 收集合并石油醚, 旋转蒸干后用甲醇溶解并定容至10 mL, 经0.45 μm 微孔滤膜过滤, 用于HPLC测定(孙立新等2007; 周浓等2010; 林世和等2012)。

2.7.2 色谱条件

采用Symmetry-C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相A为乙腈, 流动相B为超纯水, 体积比为93:7, 进样量20 μL , 流速1.0 mL·min⁻¹, 柱温30°C, 检测波长210 nm (孙立新等2007; 林世和等2012)。

2.7.3 薯蓣皂苷元标准品配置及标准曲线的制作

准确称取薯蓣皂苷元标准品3 mg, 用甲醇配置成1 mg·mL⁻¹的标准品母液, 用甲醇稀释, 配置0.1、0.25、0.5、0.75和1 mg·mL⁻¹的标准品溶液, 按上述色谱条件测定相应的峰面积, 以进样体积和峰面积之间的关系, 得到薯蓣皂苷元测定标准曲线方程为 $Y=6970.9X-84377$, $R^2=0.9998$, X 为进样体积, Y 为峰面积。

实验结果

1 白英毛状根的诱导与培养

白英叶片经C58C1浸染共培养4 d后, 光照培养10 d左右开始有毛状根长出。毛状根表现出无向地性, 生长迅速, 分枝多且密被根毛。当毛状根长至3~4 cm时切下, 接种到加有头孢噻肟钠的MS固体培养基中培养。待除菌彻底后, 将毛状根转入1/2MS液体培养基中振荡暗培养, 毛状根生长迅速。

2 白英毛状根中 $rolB$ 基因的分子检测

以野生型白英基因组作为阴性对照, 发根农杆菌C58C1作为阳性对照, 检测白英毛状根系中的 $rolB$ 基因。检测结果(图1)表明, 在检测的11个毛状根单克隆系中, 有2个单克隆未检测到 $rolB$ 基因, 其他9个均检测到 $rolB$ 基因的存在。选取分支较多且

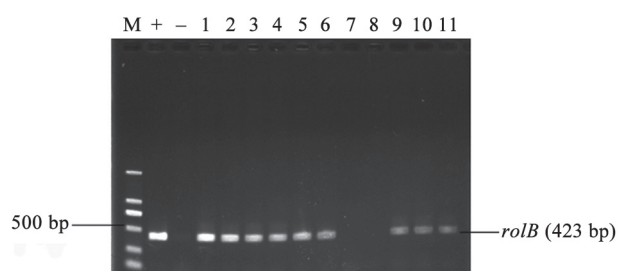


图1 白英毛状根 $rolB$ 基因的PCR检测

Fig.1 PCR detection of $rolB$ gene in hairy roots of *S. lyratum*
M: DL 2000 DNA Marker; +: 阳性对照为C58C1菌株; -: 阴性对照为野生型白英; 1~11: 不同的白英毛状根单克隆。

性状稳定的阳性毛状根单克隆进行扩大培养。

3 6-BA对白英毛状根生长的影响

白英毛状根在含不同浓度6-BA的培养基中培养25 d的生长情况如图2, 与对照相比, 6-BA明显抑制白英毛状根的生长, 且随6-BA浓度升高, 抑制作用越明显。随着培养时间的增加, 毛状根逐渐褐化, 生长速度减慢, 并出现少量愈伤组织。培养至30 d时, 经6-BA处理的毛状根干重为同期对照生物量的47.6%~66.9% (图3)。这表明6-BA会抑制白英毛状根的生长。

4 6-BA对白英毛状根薯蓣皂苷元含量的影响

6-BA对白英毛状根中薯蓣皂苷元含量的影响见图4, 对照与不同浓度6-BA处理的白英毛状根中薯蓣皂苷元含量均有先上升后下降的趋势。在培养至25 d时, 白英毛状根中薯蓣皂苷元含量达到最大值, 对照毛状根中薯蓣皂苷元含量约为4.47 mg·g⁻¹ (DW) (图4-A), 同期经0.1、0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹ 6-BA处理的毛状根中薯蓣皂苷元含量分别约为4.50、4.69、5.19和4.75 mg·g⁻¹ (DW)。这表明, 随培养时间的增加, 6-BA可提高白英毛状根每克

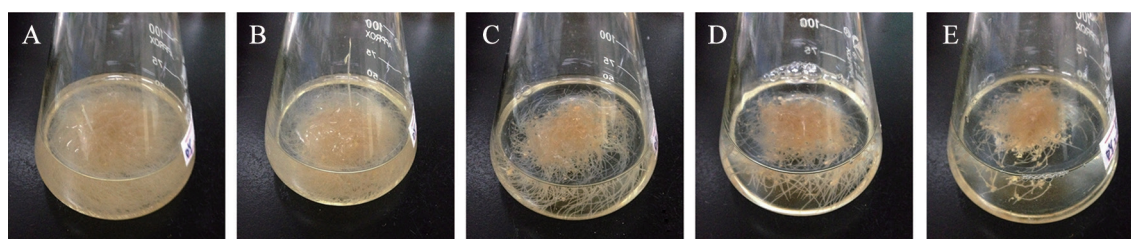


图2 白英毛状根在含不同浓度6-BA的培养基中培养25 d

Fig.2 *S. lyratum* hairy roots cultured in medium containing different concentrations of 6-BA for 25 days

A: 对照; B: 6-BA 0.1 mg·L⁻¹; C: 6-BA 0.5 mg·L⁻¹; D: 6-BA 1.0 mg·L⁻¹; E: 6-BA 2.0 mg·L⁻¹。

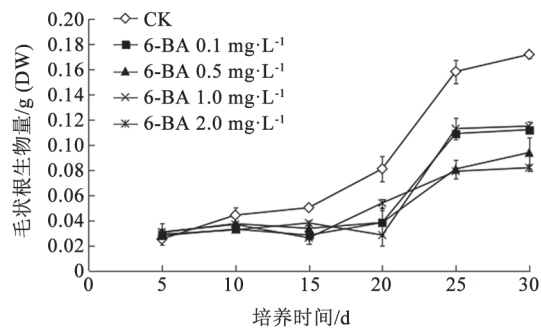


图3 6-BA对白英毛状根生长的影响

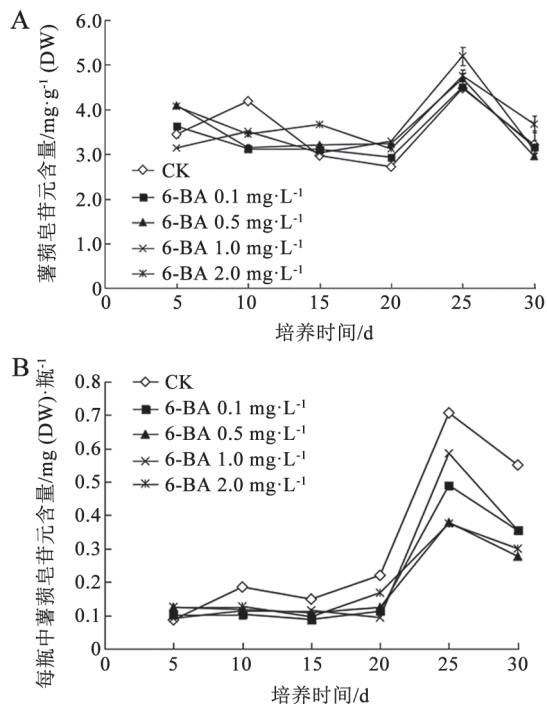
Fig.3 Effects of 6-BA on the growth of *S. lyratum* hairy roots

图4 6-BA对白英毛状根薯蓣皂苷元含量的影响

Fig.4 Effects of 6-BA on the contents of diosgenin in *S. lyratum* hairy roots

干物质中薯蓣皂苷元的含量。但以每个培养瓶中白英毛状根薯蓣皂苷元总量来看, 培养至25 d时, 对照每个培养瓶中毛状根的薯蓣皂苷元总量约为0.71 mg (DW), 而经不同浓度6-BA处理的培养瓶中毛状根薯蓣皂苷元的总量为同期对照的53.1%~82.8% (图4-B)。表明6-BA会降低每个培养瓶中白英毛状根薯蓣皂苷元总量。

5 NAA对白英毛状根生长的影响

图5为白英毛状根在含不同浓度NAA的培养基中培养25 d的生长情况。从图5可以看出, 低浓度NAA促进毛状根侧根分支的产生, 从而提高毛状根的生物量, 而高浓度的NAA使得毛状根愈伤化。当培养至30 d时, 0.5 mg·L⁻¹ NAA处理的毛状根干重达到0.30 g, 为同期对照的1.76倍(图6)。表明适当低浓度的NAA可以促进白英毛状根的生长, 主要表现在促进毛状根分支的增多。

6 NAA对白英毛状根薯蓣皂苷元含量的影响

对照毛状根在25 d时达到最大值, 毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元含量约为4.47 mg (图7-A)。与对照相比, 除培养至15 d和20 d时, 经NAA处理的毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元含量稍高于同期对照外, NAA均降低了白英毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元的含量。但以每个培养瓶中白英毛状根薯蓣皂苷元总量来看, 经NAA处理的毛状根薯蓣皂苷元含量在设置的培养时间内一直处于上升或平缓增加趋势, 无下降趋势(图7-B)。培养至30 d时, 经0.1、0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹ NAA处理的培养瓶中毛状根的薯蓣皂苷元总量分别约为0.65、0.97、0.55和0.62 mg (DW)·瓶⁻¹, 分别为同期对照的1.18、1.76、1.00和1.12倍, 同时经0.5 mg·L⁻¹ NAA处理的培养瓶中毛状根的薯蓣皂苷元总量最高达0.97

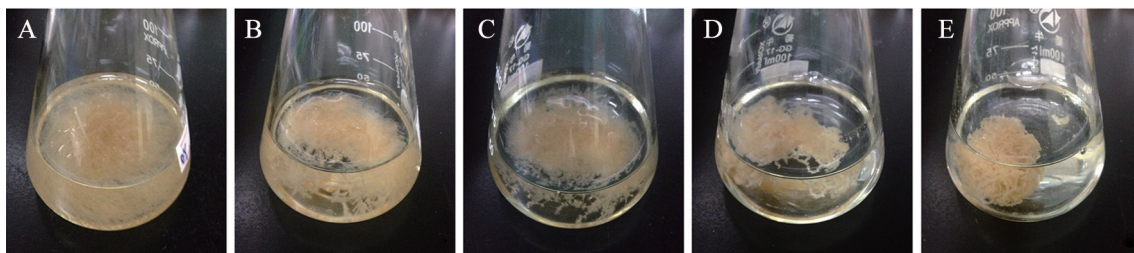


图5 白英毛状根在含不同浓度NAA的培养基中培养25 d

Fig.5 *S. lyratum* hairy roots cultured in medium containing different concentrations of NAA for 25 days

A: 对照; B: NAA 0.1 mg·L⁻¹; C: NAA 0.5 mg·L⁻¹; D: NAA 1.0 mg·L⁻¹; E: NAA 2.0 mg·L⁻¹。

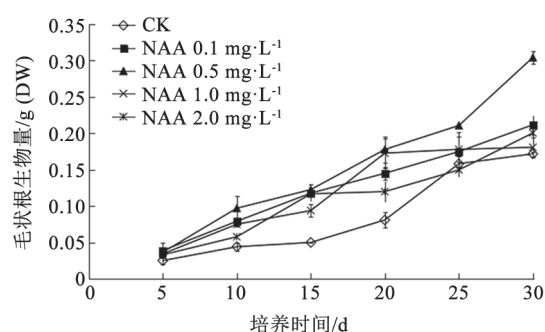


图6 NAA对白英毛状根生长的影响

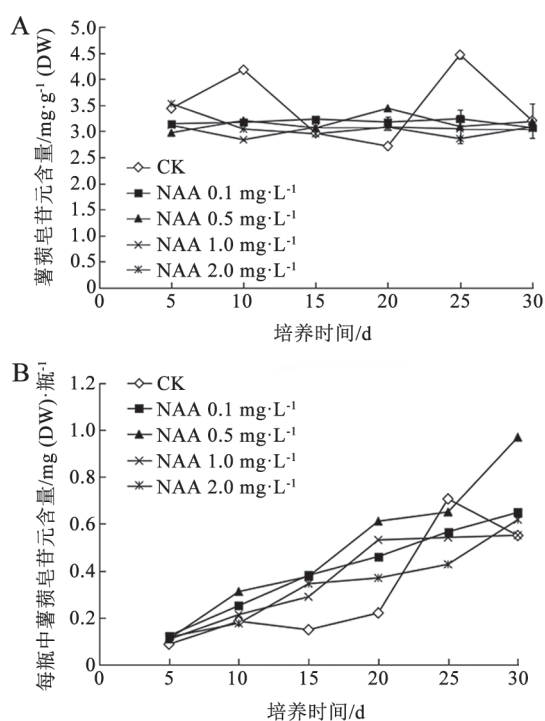
Fig.6 Effects of NAA on the growth of *S. lyratum* hairy roots

图7 NAA对白英毛状根薯蓣皂苷元含量的影响

Fig.7 Effects of NAA on the contents of diosgenin in *S. lyratum* hairy roots

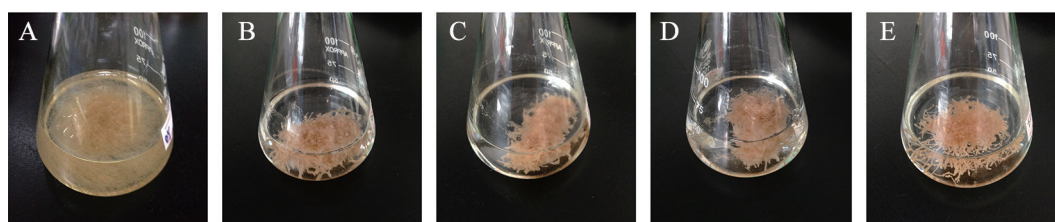
mg (DW)·瓶⁻¹, 高于对照整个培养过程中的最大值 0.71 mg (DW)·瓶⁻¹ (图7-B)。表明低浓度NAA可以很好的促进每个培养瓶中白英毛状根薯蓣皂苷元总量的积累。

7 6-BA和NAA结合对白英毛状根生长的影响

不同浓度6-BA与0.5 mg·L⁻¹ NAA组合处理对白英毛状根生长的影响见图8、9。从图8可以看出, 6-BA与0.5 mg·L⁻¹ NAA结合, 抑制毛状根的伸长和侧根的产生, 使毛状根膨大增粗, 逐渐褐化, 愈伤化严重。与对照相比, 不同浓度6-BA与0.5 mg·L⁻¹ NAA结合均提高了每个培养瓶中干物质的量(图9)。培养至25 d时, 0.1 mg·L⁻¹ 6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA结合处理的毛状根干物质达到0.34 g (DW)·瓶⁻¹, 为对照整个培养过程中最大值[0.17 g (DW)·瓶⁻¹]的2倍(图9)。结果表明, 虽然6-BA与0.5 mg·L⁻¹ NAA结合处理白英毛状根提高了每个培养瓶中的生物量, 但实际上抑制白英毛状根的生长。

8 6-BA和NAA结合对白英毛状根薯蓣皂苷元含量的影响

图10为6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA结合对白英毛状根薯蓣皂苷元含量的影响。从图10可见, 培养至25 d时, 对照白英毛状根中薯蓣皂苷元含量达到最大值, 毛状根中薯蓣皂苷元含量约为4.47 mg·g⁻¹ (DW) (图10-A)。与对照相比, 经不同浓度6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA结合处理的毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元含量分别为同期对照的64.1%~72.3% (图10-A)。表明6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA结合降低毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元的含量。若以每瓶白英毛状根的薯蓣皂苷元总量来看, 经0.1、0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹ 6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA处理的培养瓶中毛状根薯蓣皂苷元的总量在培养至30

图8 白英毛状根在含不同浓度6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA的培养基中培养25 dFig.8 *S. lyratum* hairy roots cultured in medium containing different concentrations of 6-BA and NAA 0.5 mg·L⁻¹ combination for 25 days

A: 对照; B: 6-BA 0.1 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹; C: 6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹; D: 6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹; E: 6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹。

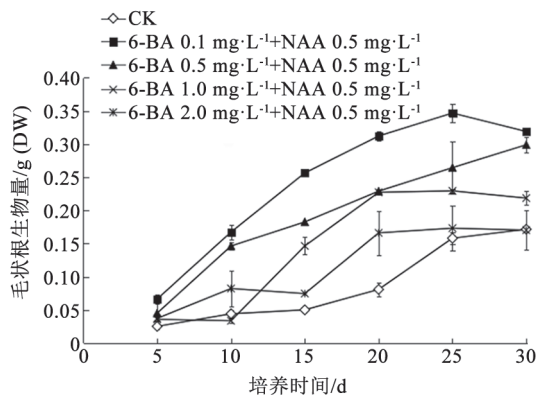


图9 6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA结合对白英毛状根生长的影响
Fig.9 Effects of 6-BA and NAA 0.5 mg·L⁻¹ combination on the growth of *S. lyratum* hairy roots

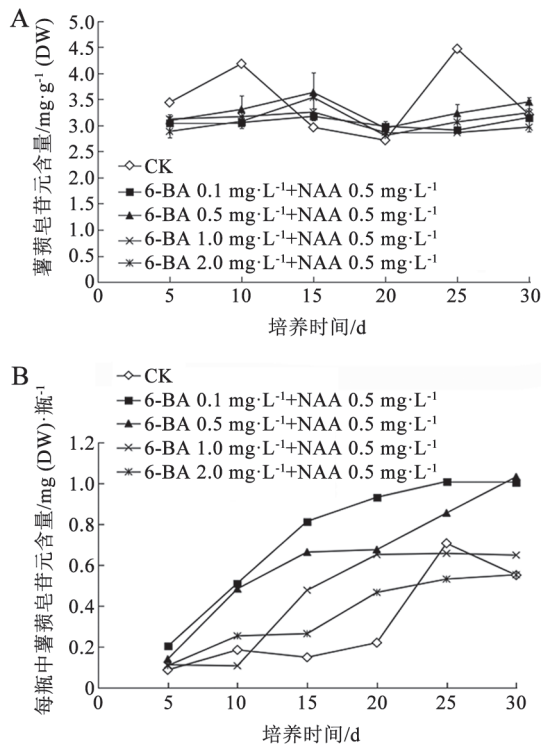


图10 6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA结合对白英毛状根薯蓣皂苷元含量的影响

Fig.10 Effects of 6-BA and NAA 0.5 mg·L⁻¹ combination on the contents of diosgenin in *S. lyratum* hairy roots

d时均达到最大值,分别为同期对照的1.83、1.87、1.19和1.00倍,且其中0.1 mg·L⁻¹和0.5 mg·L⁻¹ 6-BA与0.5 mg·L⁻¹ NAA结合处理的值分别为1.01 mg (DW)·瓶⁻¹和1.03 mg (DW)·瓶⁻¹,均高于对照整个培养过程中的最大值0.71 mg (DW)·瓶⁻¹ (图10-

B)。但结合图8可以看出,造成这个结果的原因,是由于经6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA结合处理后白英毛状根膨大、严重愈伤化,致使每个培养瓶中干物质总量高于对照,从而导致添加了不同浓度6-BA与0.5 mg·L⁻¹ NAA组合的培养瓶中毛状根总量与每克干物质中薯蓣皂苷元含量的乘积高于对照。

讨论

毛状根具有生长迅速、能在无植物生长物质的培养基上自主生长、遗传稳定性和次生代谢产物产量高等特点。本实验获得了能在无植物生长物质的培养基上自主生长且薯蓣皂苷元含量高于野生型白英植株的毛状根单克隆系。通过优化培养条件,可以有效地提高毛状根的生长量及次生代谢产物含量,而影响毛状根培养的因素有很多,包括光照、温度、培养基种类、植物生长物质、诱导子等(孙晶等2014)。已有研究表明,植物生长物质是毛状根培养过程中影响毛状根生长和次生代谢产物积累的重要因素之一,且随植物生长物质种类和浓度的不同,影响程度不同,对于不同的植物种类及毛状根类型,植物生长物质对其的影响也存在差异(Meyer和Van Standen 1995; 于荣敏等2006; 施和平等2006; 齐香君和郭乐康2009; 房翠萍等2011; 徐大卫2012; 何含杰和施和平2014; 王瑜2014)。本次实验首次用6-BA和NAA以及6-BA与NAA的组合对白英毛状根进行诱导培养,研究了不同种类、不同浓度的外源植物生长物质以及添加植物生长物质后培养时间的长短对白英毛状根生长及毛状根中薯蓣皂苷元含量的影响。发现6-BA抑制白英毛状根的生长,且抑制作用与6-BA浓度成正比。6-BA可以增加白英毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元的含量,但降低每个培养瓶中毛状根的薯蓣皂苷元总量。NAA能促进白英毛状根侧根的增多,其中,0.5 mg·L⁻¹ NAA能很好地促进白英毛状根的生长,经其处理的毛状根生长量是对照的1.76倍。与对照相比,NAA并不能有效增加白英毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元的含量,但低浓度NAA能提高每个培养瓶中毛状根的薯蓣皂苷元总含量,比对照提高约36.6%。这与徐大卫(2012)、王瑜(2014)在研究不同因子对植物毛状根生长及次生代谢产物的影响实验中利用6-BA、

NAA诱导处理毛状根的实验结果基本一致。6-BA与 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的组合会明显抑制白英毛状根的正常生长,同时降低毛状根每克干物质中薯蓣皂苷元的含量。因此,在生产中,我们可以尝试在培养基中添加 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右低浓度的NAA来提高白英毛状根的生长量及薯蓣皂苷元的含量。但外源植物生长物质对毛状根生长及次生代谢产物含量的调控机制尚不清楚,目前相关的研究还很少,其具体机制还有待今后进一步研究。

参考文献

- Fang CP, Wang WT, Wang ZF, Shan CG, Ni DP, Zhang YQ (2011). Effects of phytohormones on hairy root growth and tanshinone biosynthesis of *Salvia miltiorrhiza*. *J Chin Med Mater*, 34 (5): 661–664 (in Chinese with English abstract) [房翠萍, 王维婷, 王志芬, 单成钢, 倪大鹏, 张玉琼(2011). 植物激素对丹参毛状根生长和丹参酮生物合成的影响. *中药材*, 34 (5): 661–664]
- He HJ, Shi HP (2014). Effects of 6-benzylaminopurine and α -naphthaleneacetic acid on growth and isoflavone contents of *Pueraria phaseoloides* hairy roots. *Chin J Biotechnol*, 30 (10): 1573–1585 (in Chinese with English abstract) [何含杰, 施和平(2014). 6-苄氨基腺嘌呤和萘乙酸对三裂叶野葛毛状根生长和异黄酮含量的影响. *生物工程学报*, 30 (10): 1573–1585]
- He Y, Wang JS, Zhang P, Hua ZC (2013). Research progress on pharmacological properties of diosgenin and its mechanism. *Chin Traditional Herbal Drugs*, 44 (19): 2759–2765 (in Chinese with English abstract) [何焱, 王继双, 张鹏, 华子春(2013). 薯蓣皂苷元药理作用及其机制研究进展. *中草药*, 44 (19): 2759–2765]
- Lin SH, Yi YD, Xiao H, Yu NC (2012). Study on distribution regularity of diosgenin content in different medicinal parts of *Solanum lyratum* during different growing periods. *Chin Pharm*, 23 (27): 2544–2545 (in Chinese with English abstract) [林世和, 易艳东, 肖宏, 余南才(2012). 白英不同药用部位不同生长期薯蓣皂苷元含量分布规律的研究. *中国药房*, 23 (27): 2544–2545]
- Meyer HJ, Van Standen J (1995). The *in vitro* production of an anthocyanin from cell cultures of *Oxalis linearis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 40: 55–58
- Qi XJ, Guo LK (2009). Effects of exogenous phytohormones on hairy root of *Scutellaria baicalensis* biomass and biosynthesis baicalin. *J Shanxi Univ Sci Technol*, 27 (2): 48–50 (in Chinese with English abstract) [齐香君, 郭乐康(2009). 外源激素对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响. *陕西科技大学学报*, 27 (2): 48–50]
- Shi HP, Qi Y, Zhang Y, Liang S (2006). Induction of cucumber hairy roots and effect of cytokinin 6-BA on its growth and morphology. *Chin J Biotechnol*, 22 (3): 514–520 (in Chinese with English abstract) [施和平, 齐莹, 张悦, 梁山(2006). 黄瓜毛状根的诱导及细胞分裂素6-BA对其生长和形态的影响. *生物工程学报*, 22 (3): 514–520]
- Sun J, Yang HY, Sui C (2014). Research progress on various influences in hairy root yield and secondary metabolites accumulation of medicinal plant. *Modern Chin Med*, 16 (11): 945–952 (in Chinese with English abstract) [孙晶, 杨洪一, 隋春(2014). 不同因子对药用植物毛状根产量和次生代谢产物积累影响的研究进展. *中国现代中药*, 16 (11): 945–952]
- Sun LX, Bi KS, Wang MW (2006). Progress in the studies of *Solanum lyratum* Thunb. *J Shenyang Pharm Univ*, 23 (4): 251–255 (in Chinese with English abstract) [孙立新, 毕开顺, 王敏伟(2006). 中药白英的研究进展. *沈阳药科大学学报*, 23 (4): 251–255]
- Sun LX, Fu WW, Ren J, Xu L, Bi KS, Wang MW (2006). Cytotoxic constituents from *Solanum lyratum*. *Arch Pharm Res*, 29 (2): 135–139
- Sun LX, Meng N, He M, Zhang KX, Bi KS, Wang MW (2007). Determination of the contents of diosigenin of the *Solanum lyratum* Thunb. by HPLC. *J Shenyang Pharm Univ*, 24 (1): 29–31 (in Chinese with English abstract) [孙立新, 孟楠, 何珉, 张克星, 毕开顺, 王敏伟(2007). HPLC法测定中药白英中薯蓣皂苷元的含量. *沈阳药科大学学报*, 24 (1): 29–31]
- Sun LX, Qi W, Yang HY, Jia YR, Tong LJ (2011). Nitrogen-containing compounds from *Solanum lyratum* Thunb. *Biochem System Ecol*, 39 (3): 203–204
- Wang WC, Hu DY, Yang S (2011). Study on chemical constituents and bioactivities of plants from *Solanum lyratum* Thunb. *Guangzhou Chem Ind*, 39 (9): 3–6 (in Chinese with English abstract) [王文昌, 胡德禹, 杨松(2011). 白英化学成分及生物活性研究进展. *广州化工*, 39 (9): 3–6]
- Wang Y (2014). Effects of different impact factors on the hairy root growth and its secondary metabolites of *Vaccaria segetalis* (Master's thesis). Jilin: Jilin Agricultural University, 12–19 (in Chinese with English abstract) [王瑜(2014). 不同因子对王不留行毛状根的生长及次生代谢产物的影响(硕士论文). 吉林: 吉林农业大学, 12–19]
- Xu DW (2012). Effects of different impact factors on the hairy root growth and its secondary metabolites of *Pharbitis purpurea* (Master's thesis). Jilin: Jilin Agricultural University, 17–22 (in Chinese with English abstract) [徐大卫(2012). 不同因子对圆叶牵牛毛状根的生长及次生代谢产物的影响(硕士论文). 吉林: 吉林农业大学, 17–22]
- Yu RM, Ma N, Yan CY, Zhao Y (2006). Effects of exogenous phytohormones on hairy root growth and biosynthesis of anthraquinones in the hairy root culture of *Polygonum multiflorum*. *Chin J Biotechnol*, 22 (4): 619–623 (in Chinese with English abstract) [于荣敏, 马娜, 严春艳, 赵昱(2006). 外源激素对何首乌毛状根生长及蒽醌类成分生物合成的影响. *生物工程学报*, 22 (4): 619–623]
- Zhang H, Zhang XQ, Luo ZW, Chen JW, Sun M (2012). Seed germination and plant regeneration of *Datura stramonium*. *Chin Traditional Herbal Drugs*, 43 (12): 2499–2502 (in Chinese with English abstract) [张鸿, 张显强, 罗正伟, 谌金吾, 孙敏(2012). 曼陀罗种子萌发及植株再生. *中草药*, 43 (12): 2499–2502]
- Zhang XQ, Luo ZW, Zhang H, Wang FY, Sun JW, Sun M (2012). Scopolamine and hyoscyamine synthesis in hair roots culture of *Datura metel*. *China J Chin Materia Medica*, 37 (21): 3223–3228 (in Chinese with English abstract) [张显强, 罗正伟, 张鸿, 王凤英, 孙际薇, 孙敏(2012). 白花曼陀罗毛状根的诱导及东莨菪碱和莨菪碱的合成. *中国中药杂志*, 37 (21): 3223–3228]
- Zhou N, Guo JF, Yang LY, Xu P, Jiang B (2010). Determination of diosgenin in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* at different collecting time by HPLC. *Chin J Exp Traditional Med Formulae*, 16 (18): 54–56 (in Chinese with English abstract) [周浓, 郭吉芬, 杨丽云, 徐萍, 姜北(2010). HPLC测定不同采收期滇重楼中薯蓣皂苷元的含量. *中国实验方剂学杂志*, 16 (18): 54–56]

Effects of plant growth substance on growth and diosgenin content of *Solanum lyratum* hairy roots

DONG Yu¹, CHEN Yu¹, ZHANG Kai-Yan¹, SUN Yi-Ming¹, ZHANG Lai², SUN Min^{1*}

¹Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; ²Special and Key Laboratory of Functional Materials and Resource Chemistry of Guizhou Provincial Education Department, Anshun University, Anshun, Guizhou 561000, China

Abstract: Hairy roots of *Solanum lyratum* could be obtained by infecting leaf explants with *Agrobacterium rhizogenes* C58C1 harboring pRiA4 plasmid. The hairy roots could grow rapidly on medium without plant growth substance and contained more diosgenin than the wild *S. lyratum*. In order to study the effects of plant growth substance on the growth and diosgenin contents of *S. lyratum* hairy roots, we cultured the hairy roots with different concentrations of 6-benzylaminopurine (6-BA), α -naphthaleneacetic (NAA) alone or 6-BA in combination with NAA. The diosgenin of hairy roots were examined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that 6-BA inhibited the growth, and increased the hairy roots per gram of dry matter contents of diosgenin. But 6-BA decreased the content of total diosgenin. Furthermore, the inhibition was increased with the concentration of 6-BA. NAA promoted the growth and increased the content of total diosgenin. The hairy roots cultured with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA after 30 d, the weight was 1.76 times of control, and the content of total diosgenin reached $0.97 \text{ mg (DW)}\cdot\text{flask}^{-1}$, it's 1.37 times of maximum value of control. Different concentrations of 6-BA in combination with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA could inhibit the growth of hairy roots and decrease the content of total diosgenin.

Key words: *Solanum lyratum*; hairy roots; plant growth substance; diosgenin; HPLC

Received 2016-02-25 Accepted 2016-03-22

This work was supported by the Central University Basic Scientific Research Business Expenses Special Fund Project (Grant No. XDJK2012C088) and Special and Key Laboratory of Functional Materials and Resource Chemistry of Guizhou Provincial Fund Project.

*Corresponding author (E-mail: jwscm@swu.edu.cn).