

人参皂苷对人参幼苗生长发育的影响

张秋菊^{1,2}, 耿艳秋¹, 郜玉刚¹, 张连学^{1*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 通化师范学院 生物系, 吉林 通化 134002

摘要: **目的** 考察人参总皂苷(total ginsenosides, TGS)和人参皂苷Rg₁、Rb₁、Re的生态活性。**方法** 从四年生的人参根中提取TGS并进一步分离出3种单体皂苷,考察了不同质量浓度(25、50、100 mg/L)的TGS和人参皂苷Re、Rg₁、Rb₁对人参幼苗生长发育的影响。**结果** TGS和人参皂苷Rb₁处理对人参的幼苗和幼根的生长发育表现出明显的高质量浓度抑制而低质量浓度促进作用,而人参皂苷Rg₁和Re却对人参幼苗的各项生长指标总体表现为微弱的促进作用,4种化合物的抑制效应依次为人参皂苷Rb₁>TGS>人参皂苷Rg₁>人参皂苷Re,其中TGS和人参皂苷Rb₁处理组人参生长的变化趋势相近。人参幼苗叶绿素的合成随着各皂苷质量浓度的升高而降低,但高质量浓度处理的叶绿素量仍然都高于对照。透射电镜观察到人参幼根细胞在100 mg/L TGS和人参皂苷Rb₁处理后,发生了质壁分离和细胞器降解,液泡膜也逐渐分解,核膜变得模糊不清。人参根尖在高质量浓度的人参皂苷处理后因细胞功能受损而不能完成正常的生理活动。**结论** TGS和3种单体皂苷对人参幼苗生长发育的作用效应不同,TGS和人参皂苷Rb₁有较明显的化感活性。

关键词: 人参总皂苷; 幼苗; 生长发育; 化感活性; 叶绿素

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)12-2503-05

Effects of ginsenosides on seedling growth and development of *Panax ginseng*

ZHANG Qiu-ju^{1,2}, GENG Yan-qi¹, GAO Yu-gang¹, ZHANG Lian-xue¹

1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China

Key words: total ginsenosides (TGS); seedling; growth and development; allelopathic activity; chlorophyll

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 是我国传统名贵中药。研究发现,人参根系能向环境中释放很多有生物活性的化学物质,其中某些物质长期积累于根际土壤中,对其幼苗早期的生长发育产生毒害作用,即化感作用^[1]。人参化感作用是近年来备受关注的热点问题,但是想确定具体是哪些物质起了化感作用却是很困难的^[2]。

人参皂苷是五加科植物的特征性药效成分,多积累于人参根的外周皮组织中。人参皂苷是由多个单体皂苷组分组成的复杂混合物,并且每种单体皂苷所占的比例及溶解度也有差异。已经发现的人参皂苷有40多种,按照皂苷元的不同分为原人参二醇型皂苷、原人参三醇型皂苷和齐墩果烷型皂苷等类型^[3-4]。

杨靖春等^[4]首次发现人参皂苷存在于人参根系

渗出物中,并刺激了人参根际黑曲霉和青霉的群落增长。韩东^[5]测定了人参愈伤组织培养基中人参皂苷的量为8.94 mg/L。Nicol等^[6]发现基质栽培的西洋参根系每天都能分泌出微量的人参皂苷,用根系分泌物收集系统收集并测定了三年生西洋参土壤中的皂苷量,约占土壤干质量的0.06%。人参皂苷是土壤微生物的基质,作为化感因子成为调节植物与细菌相互关系的种间媒介。这些发现使人们关注人参皂苷在植物与环境互相作用中的意义和作用。张爱华等^[7]发现原人参二醇组和原人参三醇组皂苷对人参、西洋参的幼苗及愈伤组织抗氧化酶有着不同程度的影响,但人参皂苷生态活性的研究鲜见报道。

本实验选择种子萌动后早期生长发育的人参为研究对象,以人参总皂苷(total ginsenosides, TGS)及人参皂苷Rb₁、Rg₁、Re为处理物质,设置3个

收稿日期: 2012-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070316); 国家科技支撑计划子项目(2007BAI38B01)

作者简介: 张秋菊(1968—),女,吉林通化人,副教授,博士,发表学术论文20余篇,出版教材一部,主要从事药用植物资源研究。

E-mail: zhangqiuju5515@163.com

*通讯作者 张连学 E-mail: zlx863@163.com

质量浓度水平,研究了 TGS 及单体皂苷对人参幼苗根系活力、叶绿素合成以及细胞亚显微结构的影响,探讨人参皂苷的生理生态机制,为人参化学生态适应性研究提供参考。

1 材料

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 种子购于吉林省抚松县万良镇,由吉林农业大学中药材学院张连学教授鉴定。甲醇、乙醇等分析纯均为北京化工厂生产。高效液相色谱 (LC-2010AHT) 和 C₁₈ 色谱柱均为日本岛津公司生产。

2 方法

2.1 人参皂苷的提取和分离

取四年生人参干燥根,粉碎,过 60 目筛,取样品 500 g 加入 10 倍体积的甲醇,于振荡器上室温提取 24 h,提取 2 次,减压抽滤后,合并滤液,过 D-101 大孔树脂柱,先用蒸馏水冲洗,再用 80%乙醇洗脱,洗脱液减压回收,残渣蒸干后再用 20 倍 95%乙醇超声溶解精制,得人参总皂苷粗品。

将提取的总皂苷进一步分离出单体人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 和 Re,通过反复纯化使其质量分数达 80%,将各单体和总皂苷粉末分别用去离子水溶解,配制 25、50、100 mg/L 的溶液,密封置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

2.2 生物测定

2.2.1 生物量的测定 将打破休眠露白的人参种子用 5%次氯酸钠消毒 5 min,去离子水冲洗 3 次,分别播种于干净泡沫培养箱中,每箱 20 粒,培养箱内填充有高温消毒过的玻璃砂为基质。每个培养箱加盖后置于 (20±2) ℃ 下培养,待出苗后给予 12 h/12 h 的光暗处理 [光照强度 (280 μmol/m²·s)]。不同质量浓度的 TGS 和人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Re 溶液被注入到小苗周围,每株 1 mL,对照加入等体积的去离子水。培养期间所有处理均用 1/2 Hoagland 营养液 (pH 5.8) 保持湿度。15 d 后测定幼苗的鲜质量及苗高、根长。将幼苗置于 60 ℃ 烘箱中烘至恒质量。

2.2.2 生物指标的测定 同上方法培养人参幼苗,挑选 15 d 生长均匀的幼苗,流水冲净根部玻璃砂,放入注有 15 mL 1/2 Hoagland 营养液的培养瓶中,每瓶 15 株。将不同质量浓度的 TGS、人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 和 Re 溶液分别加入每个培养瓶中,每瓶 5 mL,对照加入等体积的去离子水。各处理置于 (22±2) ℃ 下培养,12 h/12 h 的光暗处理,定时将各处理

机重排,保证培养条件均匀一致。24 h 后,分别测定幼苗的各项生理指标。

2.3 根系活力及叶绿素的测定

根系活力测定采用 TTC (红四氮唑) 法^[8]。采用丙酮-乙醇-H₂O (45:45:10) 为溶剂,4 ℃ 暗中共浸提叶绿素 48 h,测定并计算叶绿素总量。所有处理均重复测定 3 次。

2.4 根尖细胞亚显微结构观察

分别切取 100 mg/L TGS 和人参皂苷 Rb₁ 处理 48 h 的人参幼根根尖,用 4%戊二醛 (用 0.1 mol/L、pH 7.4 的 PBS 稀释而成) 于 4 ℃ 固定,抽真空 12 h,1%锇酸固定 4 h, PBS 漂洗,乙醇脱水, Epon-812 环氧树脂渗透、包埋,用 Leica UC7 超薄切片机切片,经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后,在日立 H-7650 透射电镜 (Tokyo, 日本) 下观察拍照。

2.5 数据分析

所有实验均按随机区组设计,每个处理均重复 3 次。化感效应指数 (RI) 计算参考 Williamson^[9] 方法。实验数据均采用 SPSS 17.0 (SPSS Inc., 美国) 进行 one-way ANOVA 方差分析, LSD 检验各处理间的差异显著性,所有数据为 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果与分析

3.1 对人参幼苗生长的影响

TGS 和 3 种单体人参皂苷对人参幼苗早期生长的影响见表 1。在高质量浓度作用下,所有处理的人参幼苗苗高均有所降低,而低质量浓度处理对苗高的增长均有不同促进作用。与对照相比,苗高的最低值出现在 100 mg/L 人参皂苷 Rb₁ 处理后。4 种人参皂苷对人参幼苗生长的抑制效应依次为人参皂苷 Rb₁ > TGS > 人参皂苷 Rg₁ > 人参皂苷 Re。

25~100 mg/L TGS 和 3 种单体皂苷处理后,人参幼根伸长的表现差异很大。TGS 和人参皂苷 Rb₁ 两组处理的表现相近,均为中、低质量浓度促进而高质量浓度抑制;人参皂苷 Rg₁ 处理组人参幼根的根长,随着处理质量浓度的增加而增加,且高质量浓度处理组的根长与对照差异显著;人参皂苷 Re 处理组与人参皂苷 Rg₁ 处理组的表现刚好相反,在低质量浓度处理下,幼根的伸长明显被促进,随着处理质量浓度的升高根长的增加趋势逐渐减弱,但仍高于对照。100 mg/L TGS 和人参皂苷 Rb₁ 处理对幼根伸长的抑制强度最大,为 5.3% 和 8.12%。当人参皂苷 Rb₁ 的质量浓度达最大时,根鲜质量最小,比对照降低了 12.3%,其根

表 1 TGS 和 3 种单体皂苷处理后人参苗高、根长及生物量的变化

Table 1 Changes of height, root length, and biomass of *P. ginseng* treated by TGS and three monomer saponins

处理	质量浓度 / (mg·L ⁻¹)	苗高 / cm	根长 / cm	根干质量 / mg
CK	0	3.124±0.188	1.095±0.041**	0.593±0.027*
TGS	25	3.122±0.114	1.135±0.108*	0.617±0.041*
	50	2.987±0.158*	1.152±0.056	0.603±0.013*
	100	2.874±0.096**	1.037±0.058**	0.540±0.033**
人参皂苷 Rg ₁	25	3.231±0.201	1.096±0.012**	0.583±0.009*
	50	3.145±0.117	1.105±0.070*	0.597±0.038*
	100	3.088±0.078	1.221±0.093	0.607±0.053*
人参皂苷 Rb ₁	25	3.196±0.124	1.165±0.066	0.637±0.032*
	50	2.875±0.097**	1.131±0.047*	0.620±0.030*
	100	2.654±0.068**	1.006±0.073**	0.520±0.026**
人参皂苷 Re	25	3.220±0.192	1.222±0.022	0.673±0.009
	50	3.177±0.174	1.165±0.084*	0.597±0.017*
	100	3.089±0.155	1.115±0.113*	0.595±0.009*

与对照组相比, 有显著性差异* $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs negative control

干质量也比对照降低了 8.93%; 而根干质量的最大值出现在 25 mg/L 人参皂苷 Re 处理后, 比对照增加了 13.5%。其他各处理的幼根干质量与对照相比均无明显变化。

3.2 人参幼苗根系活力的变化

TGS 和人参皂苷 Rb₁ 处理后人参根系活力的变化趋势相近, 均表现为低质量浓度升高而高质量浓度下降; 高质量浓度的 TGS 和人参皂苷 Rb₁ 处理后, 根系活力的降低幅度分别为对照的 60.4%和 51.9%; Rg₁ 处理组的表现刚好与二者相反, 低质量浓度根系活力略有降低, 但随着质量浓度的增加根系活力急剧上升而后开始下降, 在中质量浓度根系活力的增加幅度最大, 为对照的 103.8%; 人参皂苷 Re 处理后, 根系活力与处理质量浓度成正相关, 随着质量浓度的升高, 根系活力缓慢增高, 增幅分别为对照的 8.23%, 20.6%和 42.6% (图 1)。

3.3 人参幼苗叶绿素合成的变化

叶绿素量是叶绿素 a 和叶绿素 b 的量之和, 叶绿素合成的进度会直接影响叶片的光合作用。从总体趋势上看, TGS 和单体对人参幼苗叶绿素的合成都表现为“低促高抑”的作用 (图 2)。在低质量浓度处理下, 4 种化合物对叶绿素合成均有促进作用, 促进效应依次为 TGS>Rg₁>Re>Rb₁, 增幅分别为 55.3%、51.9%、42.6%、19.8%; 而在 4 种化合物的高质量浓度处理下, 虽然人参幼苗的叶绿素合成的

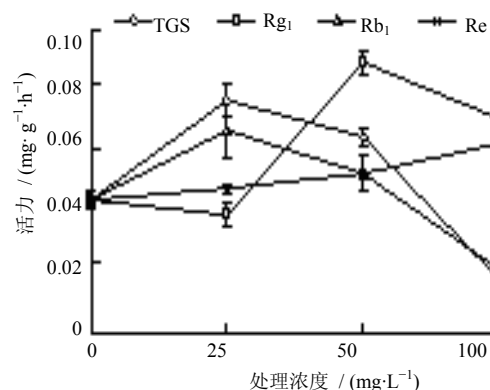


图 1 TGS 和 3 种单体皂苷处理后人参幼苗根系活力的变化
Fig. 1 Changes of root vigor of *P. ginseng* seedling treated by TGS and three monomer saponins

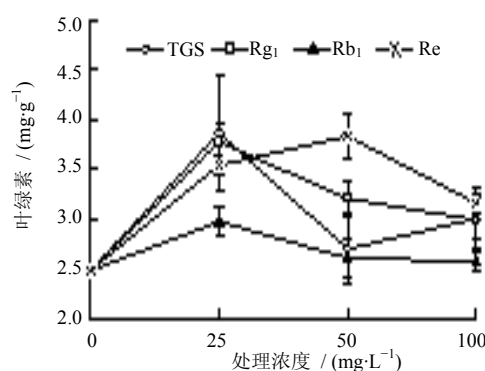


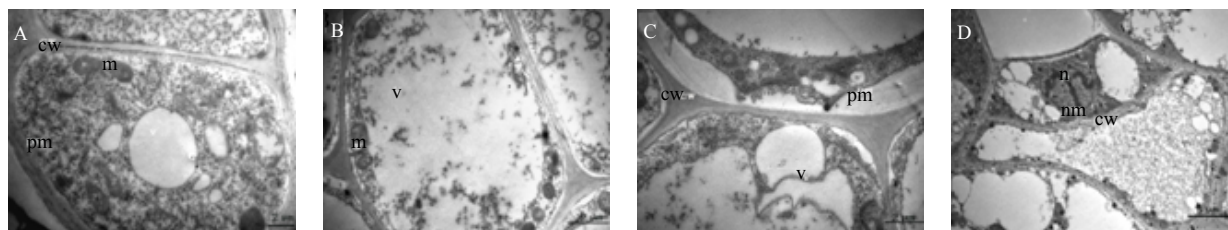
图 2 TGS 和 3 种单体皂苷处理后人参幼苗叶绿素量的变化
Fig. 2 Changes of chlorophyll contents of *P. ginseng* seedlings treated by TGS and three monomer saponins

趋势均是随着处理质量浓度的升高而降低,但各处理的叶绿素量仍然高于对照。

3.4 根尖细胞亚显微结构的变化

在正常的人参幼苗根尖细胞中,具有被完整的细胞壁所包被的细胞结构,细胞质膜与细胞壁紧密贴合,线粒体结构清晰完整,其他细胞器也清晰可

见,细胞质中分布着很多大小不等的液泡(图3-A)。用100 mg/L TGS和人参皂苷Rb₁培养人参幼苗48 h后,通过透射电镜观察到人参根尖细胞内细胞器的结构发生了明显变化(图3-B、D),在高质量浓度的TGS处理的根尖细胞内,有明显的质壁分离现象,液泡膜彻底分解,其他细胞器也被不同程度地



A-正常的根尖细胞 B、C-TGS 100 mg/L 处理后的根尖细胞 D-人参皂苷 Rb₁ 处理后的根尖细胞

cw-细胞壁 pm-细胞质膜 m-线粒体 v-液泡 n-细胞核 nm-核膜

A-normal root-tip cells B and C-root-tip cells treated with 100 mg/L TGS D-root-tip cells treated with Rb₁

cw-cell wall pm-protoplasmic membrane m-mitochondrion v-vacuole n-nucleus nm-nuclear membrane

图3 TGS和人参皂苷Rb₁(100 mg/L)处理48 h后人参幼苗根尖亚显微结构的变化

Fig. 3 Submicroscopic structure of root-tip cells of ginseng seedling treated with TGS and Rb₁ (100 mg/L) for 48 h

破坏而变得模糊不清(图3-C)。100 mg/L 人参皂苷Rb₁处理后,部分液泡分解,细胞核扭曲变形,核膜模糊不清(图3-D)。

4 讨论

根系分泌出的一些化学物质通过植物与其他的邻近植物种类的互作调节了植物种群的早期建立^[10]。本实验选择在人参幼苗的短期生长阶段进行生物测试,恰恰是因为从种子萌发到幼苗形成时期是植物最敏感也是代谢最旺盛的时期。本研究结果显示,高质量浓度的TGS和单体Rb₁处理对人参的幼苗和幼根的生长发育表现出明显的抑制作用,而单体Rg₁和Re却对人参幼苗的各项生长指标总体表现为促进作用。说明TGS及其单体都明显干扰了人参幼苗的早期生长,而且这种干扰作用还与人参皂苷的种类及质量浓度密切相关。人参皂苷还对人参幼苗的根系活力及叶绿素的合成产生不同影响,这与以前报道的很多植物化感物质的作用机制相似^[11]。透射电镜观察到人参幼根细胞在三萜皂苷类物质的诱导培养下,发生了质壁分离和细胞器降解,细胞因功能受损,不能进行正常的生理活动。说明三萜皂苷诱导出了人参细胞的化感胁迫效应。细胞结构的变化一直是植物受到环境胁迫伤害最直接的证据,本实验结果与人参根际土壤浸提物对人参幼苗的化感作用结果相近^[12]。

在人参早期生长发育过程中观察到人参皂苷对

幼苗的生理生化过程有一定的影响,并且发现组成总皂苷的几种主要单体的生态活性各有差异,推测可能与单体皂苷的结构特性有关。人参皂苷由三萜苷元和糖基组成,人参皂苷Rb₁属于原人参二醇型皂苷,人参皂苷Re、Rg₁属于原人参三醇型皂苷,人参皂苷Rb₁的化感活性远大于人参皂苷Re和人参皂苷Rg₁,而人参皂苷Re和人参皂苷Rg₁活性总体表现差异不大,二者虽同为三醇型皂苷,母核相同但糖基位点却不同。Adel等^[13]和Agrell等^[14]一致认为构成皂苷的糖基没有活性,而皂苷元有活性,这个实验结论也许可以解释人参皂苷Rb₁与人参皂苷Re、人参皂苷Rg₁单体皂苷间化感活性的差异。在植物的化学通讯中多个分子不同质量浓度的组合就可以改变传递的信息,而人参皂苷是个复杂的多组分物质,因此很可能因为组分的复杂性而导致多样的化学作用机制。

三萜人参皂苷作为人参、西洋参最独特的次生代谢成分,已经被证实是一种化感防御物质,对于土传病原菌的繁殖以及虫害防治都有影响,是人参属植物在长期适应环境过程中进化出的一种独特的应对机制。在药用植物化感作用的研究中“一物多用”的同源现象是很常见的,人参皂苷就与三七皂苷具有类似的生态活性^[15]。但人参皂苷的单体种类极其繁多,说明其代谢途径有许多小分支,属于进化程度较高的途径。一条代谢途径的形成与进化必

有其形成与进化的必要性。因此搞清单体皂苷的作用机制是研究人参皂苷进化和生态学意义的重要环节, 也有助于单体皂苷生物合成途径的探索。

参考文献

- [1] 雷锋杰, 张爱华, 张秋菊, 等. 人参、西洋参化感作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2221-2226.
- [2] 张连学, 陈长宝, 王英平, 等. 人参忌连作研究及其解决途径 [J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4): 481-485.
- [3] 鱼红伞, 陈 琪, 金凤燮. 不同种类人参及其各部位中皂苷组成和比例的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(2): 24-28.
- [4] 杨靖春, 李治平, 酒井斐子. 人参根系分泌物及其对人参根际微生物作用的研究 [J]. 东北师范大学学报: 自然科学版, 1982, 1: 71-76.
- [5] 韩 东. 连作、轮作技术在药用植物组织培养中的应用探索 [D]. 吉林农业大学, 1999.
- [6] Nicol R W, Yousef L, Traguair J A. Ginsenosides stimulate on the growth of soil-borne pathogens of American ginseng [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 257-264.
- [7] 张爱华, 雷锋杰, 许永华, 等. 外源人参皂苷对人参种子萌发和幼根抗氧化酶活性的影响 [J]. 生态学报, 2009, 29(9): 4934-4941.
- [8] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [9] Williamson G B. Bioassay for allelopathy measuring treatment responses with independent controls [J]. *J Chem Ecol*, 1998, 14: 181-187.
- [10] Bertin C, Yang X H, Weston L A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere [J]. *Plant Soil*, 2003, 256: 67-83.
- [11] Tiffany L W, Park S W, Jorge M V. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 472-479.
- [12] 许世泉, 艾 军, 王英平, 等. 人参化感物质对人参根尖组织结构的影响研究 [J]. 特产研究, 2008, 30(2): 36-41.
- [13] Applebee T A, Gibson D J. Elevated atmospheric carbon dioxide alters the effects of allelochemicals produced by tall fescue on alfalfa seedling [J]. *Trans Illinois State Acad Sci*, 1999, 92(1): 23-31.
- [14] Agrell J, Oleszek W, Stochmal A. Herbivore-induced responses in alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *J Chem Ecol*, 2003, 29(2): 303-320.
- [15] 韦美丽, 孙玉琴, 黄天卫, 等. 化感物质对三七生长的影响 [J]. 特产研究, 2010, 1: 32-34.