

## 白英毛状根的培养与薯蓣皂苷元的测定

陈宇<sup>1</sup>, 董瑜<sup>1</sup>, 张楷燕<sup>1</sup>, 孙一铭<sup>1</sup>, 程孟琪<sup>2</sup>, 张来<sup>2</sup>, 孙敏<sup>1\*</sup>

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:** 目的 建立白英 *Solanum lyratum* 毛状根诱导与培养体系, 筛选出薯蓣皂苷元高产的毛状根无性系。方法 利用发根农杆菌 C58C1 感染白英外植体获得毛状根, 建立白英毛状根遗传转化体系。采用 HPLC 法检测薯蓣皂苷元含量。结果 菌液浸染时间为 10 min、共培养时间为 4 d 可获得最佳转化效果, 毛状根诱导率为 83.33%。HPLC 检测结果表明, 野生型白英植株中叶片的薯蓣皂苷元量最高, 为 1.742 mg/g。毛状根中薯蓣皂苷元的平均质量分数为 4.620 mg/g, 是白英叶片的 2.652 倍。结论 通过白英毛状根离体培养, 可以高效率地获得薯蓣皂苷元。

**关键词:** 白英; 毛状根; 薯蓣皂苷元; HPLC; 再生植株

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)07-1199-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.023

## Culture of hairy roots in *Solanum lyratum* and determination of diosgenin

CHEN Yu<sup>1</sup>, DONG Yu<sup>1</sup>, ZHANG Kai-yan<sup>1</sup>, SUN Yi-ming<sup>1</sup>, CHENG Meng-qi<sup>2</sup>, ZHANG Lai<sup>2</sup>, SUN Min<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (MOE), School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. Special and Key Laboratory of Functional Materials and Resource Chemistry of Guizhou Provincial Education Department, Anshun University, Anshun 561000, China

**Abstract: Objective** To establish the introduction and culture system of the hairy roots in *Solanum lyratum* and to screen the clone of hairy roots with more diosgenin. **Methods** The explants of *S. lyratum* were infected by *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1, to obtain the hairy roots and construct the genetic transformation system of the hairy roots in *S. lyratum*. HPLC was used to determine the diosgenin in the hairy roots. **Results** The optimum transformation results were obtained with the max inductivity of hairy roots of 83.33% during infecting time for 10 min by C58C1 and co-cultural time of 4 d. The average content of diosgenin in the hairy roots was 4.620 mg/g, it was 2.652 times as high as that in the leaves (1.742 mg/g) which had the highest diosgenin content in the different tissues of wild type plant of *S. lyratum*. **Conclusion** It is an effective way to obtain diosgenin from the hairy roots of *S. lyratum*.

**Key words:** *Solanum lyratum* Thunb.; hairy roots; diosgenin; HPLC; regeneration plant

白英 *Solanum lyratum* Thunb. 是茄科 (Solanaceae) 茄属 *Solanum* L. 植物, 多年生蔓性草本植物, 又名毛风藤、白毛藤、毛秀才、毛葫芦。白英全草及根干燥后入药, 具有解毒消肿、清热利湿、祛风化痰及抗癌等功效, 目前, 白英已成为常用抗癌中药, 用于治疗宫颈癌<sup>[1]</sup>、肝癌<sup>[2]</sup>等癌症。薯蓣皂苷元 (diosgenin) 是白英中的重要药用成分, 是合成甾体激素类药物最理想的基础原料, 同时也具有治疗心血管疾病<sup>[3]</sup>、抗癌<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、调节血脂<sup>[6]</sup>、抗衰老<sup>[7]</sup>等效果。但大量采

挖白英以获得薯蓣皂苷元不符合可持续发展战略。利用发根农杆菌诱导药用植物产生毛状根, 进行大量离体培养, 从而高效地获得次生代谢产物<sup>[8]</sup>, 是药用植物资源可持续利用的有效途径之一。目前, 对白英的毛状根诱导还未见报道。本实验利用发根农杆菌 C58C1 转化白英产生毛状根, 建立白英毛状根诱导体系, 为高效获得薯蓣皂苷元提供新的途径。

### 1 材料与仪器

样品采自西南大学校园, 经邓洪平教授鉴定为

收稿日期: 2015-06-26

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (XDJK20120088); 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

作者简介: 陈宇 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: 18883307270 E-mail: 543386291@qq.com

\*通信作者 孙敏 Tel: (023)68254061 E-mail: jwscm@swu.edu.cn

白英 *Solanum lyratum* Thunb. 植株。发根农杆菌 C58C1 由本实验室保存, C58C1 是根癌农杆菌经过“Disarmed”改造后, 保留 Helper 质粒, 导入 pRiA4 质粒, 改造后的 C58C1 失去使植物长冠瘤组织的能力, 成为发根农杆菌。

岛津 LC-20AD 自动进样高效液相色谱仪, IKA 旋转蒸发仪, 薯蓣皂苷元对照品 (批号 512-04-9) 购于成都曼彻斯特生物科技有限公司, 质量分数大于 99.99%。

## 2 方法

### 2.1 野生型白英无菌苗的获得

**2.1.1 种子萌发** 取白英种子用 40 °C 水浸泡 1 h, 自来水常温浸泡 24 h 解除休眠。75%乙醇消毒 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<sup>[9]</sup>。

**2.1.2 外植体消毒** 取白英 4~5 cm 长的顶芽, 用洗衣粉水清洗 30 min, 流水冲洗 2 h。在超净工作台上, 用 75%乙醇浸泡 30 s, 无菌水冲洗 2 次, 0.1% HgCl 溶液浸泡 8 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min。用无菌吸水纸吸去顶芽表面的水分后, 接种于 MS 固体培养基中, 14 d 后观察污染情况, 若未污染则说明消毒彻底, 可作为无菌苗进行遗传转化。

### 2.2 菌种的活化

从 -80 °C 超低温冰箱中取出保存的菌株 C58C1 200 μL, 加入 25 mL 附加 40 mg/L 利福平的 YEB 液体培养基中, 200 r/min, 27 °C 快速震荡培养 24 h, 复苏菌体。在 50 mL 附加 40 mg/L 利福平的 YEP 液体培养基中加入 100 μL 上述复苏菌液, 200 r/min 振荡培养至  $A_{600}$  值为 0.3 左右, 加入乙酰丁香酮 (AS) 至 100 μmol/L, 相同条件下继续振荡培养至  $A_{600}$  值为 0.5 左右。将  $A_{600}$  值为 0.5 的菌液分装于 10 mL 离心管内, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 菌体用等体积的附加 100 μmol/L AS 的 MS 液体培养基悬浮培养, 继续活化 30 min 左右后可作为浸染液用于转化。

### 2.3 白英毛状根的诱导

将白英无菌苗叶片切成 0.5~1 cm<sup>2</sup> 的小块, 用无菌针扎出一些伤口, 放入已活化好的菌液中浸泡 5~20 d, 吸干多余菌液, 接种于附加了 100 μmol/L AS 的 MS 固体培养基中, 27 °C 黑暗共培养 3~6 d, 至叶片周围有菌圈出现时, 取出叶片, 用无菌水洗涤 1 次, 无菌吸水纸吸干后转入附加 500 mol/L 头孢噻肟钠 (Cef) 的 MS 培养基上进

行光照除菌培养, 每 7 天更换 1 次培养基, 直至长出毛状根。

### 2.4 毛状根的培养

剪取生长迅速、分枝多的毛状根尖端 3~4 cm, 在 YEB 琼脂培养基上暗培养 7 d, 以确定在植物组织中没有残留农杆菌。除菌彻底后, 剪取分枝多的毛状根根尖 3~4 cm, 接种于含 150 mL 1/2 MS 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 110 r/min, 27 °C 摇床暗培养。每 10 天左右更换 1 次培养基, 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克隆进行扩大培养。培养 45 d 时收获毛状根进行薯蓣皂苷元的测定。

### 2.5 毛状根再生植株的获得

利用 Ri 质粒诱导产生的毛状根易产生再生植株, 且多数毛状根诱导再生植株需在培养基中添加激素。但有些植物可不经愈伤组织阶段直接出芽。如烟草毛状根<sup>[10]</sup>在无激素的培养基上可直接产生大量不定芽。本实验试图验证白英毛状根是否可在无任何外源激素的 1/2MS 液体培养基中直接出芽, 产生再生植株。将 10 组不同的白英毛状根单克隆分别接种于 1/2MS 液体培养基中黑暗摇床培养, 定时观察记录是否有不定芽长出。

### 2.6 白英毛状根 rolB 基因的 PCR 检测

分别取不同单克隆系的毛状根, 用试剂盒法提取 DNA。采用 PCR 扩增法以 f-VirD1/r-VirD1 为引物检测毛状根中 VirD1 基因, 以 f-rolb/r-rolb 为引物检测 rolB 基因。f-VirD1 为 5'-ATGTCGCAAGGAC-GTAAGCCC-3'; r-VirD 为 5'-GGAGTCTTTCAGC-ATGGAGCA-3'。f-rolb 为 5'-GCTCTTGCAAGCTAGATT-3', r-rolb 为 5'-GAAGGTGCAAGCTACTCTC-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, dd H<sub>2</sub>O 10.5 μL, GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix 12.5 μL。取发根农杆菌活菌液 1 μL 作为阳性对照, 同时进行 PCR 反应。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 个循环后 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, 然后于凝胶成像系统中保存拍照。

### 2.7 白英中薯蓣皂苷元的提取

取 6 个在液体培养基中振荡培养 45 d 的不同白英毛状根单克隆进行薯蓣皂苷元测定。提取方法为超声提取法<sup>[11]</sup>。将野生型白英根、茎、叶及毛状根 60 °C 烘干至恒定质量, 充分研磨后过 40 目筛, 精密称定

各单克隆毛状根粉末 0.2 g, 置于 25 mL 具塞锥形瓶中, 加入 95%乙醇 10 mL, 超声 30 min, 静止放冷, 抽滤, 重复操作 1 次, 合并滤液, 旋转蒸发乙醇至干。加浓盐酸 10 mL, 置沸水浴中水解 2 h, 冷却后用 NaOH 溶液调节 pH 至中性, 用石油醚 (60~90 °C) 萃取 3 次, 每次 50 mL, 分别萃取 30 min。合并 3 次所得石油醚, 旋转蒸发仪 50 °C 减压蒸干, 残渣用甲醇定容至 10 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

### 2.8 薯蓣皂苷元的 HPLC 测定

**2.8.1 色谱条件**<sup>[12]</sup> Symmetry-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-三重蒸馏水 (93:7); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 210 nm; 柱温 30 °C, 进样量为 20 μL。

**2.8.2 薯蓣皂苷元标准曲线的绘制** 精确称取薯蓣皂苷元对照品 3 mg, 用甲醇配制成 1 mg/mL 的对照品溶液母液, 用甲醇稀释, 配制为 0.1、0.25、0.5、0.75、1 mg/mL 的对照品溶液。在 210 nm 波长下检测薯蓣皂苷元对照品, 记录出峰时间和峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 以样品质量浓度为横坐标 (X), 得到薯蓣皂苷元标准曲线的线性回归方程为  $Y=4\ 200.1 X-51\ 232$ ,  $R^2=0.999\ 9$ 。线性范围为 0.1~1.0 mg/mL。

## 3 结果与分析

### 3.1 毛状根的诱导

**3.1.1 菌液浸染时间对毛状根诱导率的影响** 外植体在菌液中浸染 10 d 时, 诱导率最高, 为 83.33%, 叶片存活率最高, 为 93%。浸染时间过长会导致叶片死亡, 浸染时间过短则诱导率过低。结果见表 1。

表 1 菌液浸染时间对毛状根诱导率的影响

Table 1 Effect of different bacteria inoculation time on induction rate of hairy roots

浸染时间/d	发根外植体数/个	外植体总数/个	诱导率/%
5	6	30	20.00
10	25	30	83.33
15	11	30	36.67
20	8	30	26.67

**3.1.2 共培养时间对毛状根诱导率的影响** 在诱导毛状根的过程中, 外植体要在菌液浸染后与发根农杆菌共培养一段时间, 使发根农杆菌的 Ri 质粒能够转移到植物基因组中, 所以共培养的时间对提高转化率是非常重要的。共培养 2 d 时, 外植体周围无菌落长出, 进行除菌后培养发根率仅为 23.33%。共

培养时间为 6 d 时, 外植体上以及外植体周围的培养基上有较多的菌落产生, 发根农杆菌大量繁殖对外植体产生了毒害作用, 外植体多数死亡。共培养时间为 4 d 时, 外植体周围有少量菌落产生, 诱导率最高。在共培养的 4 d 里, Ri 质粒较好地完成了整合和转移, 而快速繁殖的发根农杆菌并没有对外植体产生较大的毒害作用, 说明发根农杆菌诱导白英毛状根外植体与农杆菌最佳共培养时间为 4 d (表 2)。

**3.1.3 抗生素质量浓度对毛状根诱导率的影响** 当 Cef 的质量浓度低于 500 mg/L 时, 难以达到较好的除菌效果, 培养基上有菌落长出且 Cef 质量浓度越低菌落越多。当抗生素的质量浓度为 500 mg/L 时除菌效果最好, 无菌落长出且诱导率高。当抗生素的质量浓度大于 500 mg/L 时, 外植体褐化, 诱导率变低 (表 3)。说明 Cef 的质量浓度为 500 mg/L 时既能起到良好的抑菌效果, 又对毛状根的生长影响较小。

表 2 共培养时间对毛状根诱导率的影响

Table 2 Effect of different co-culture time on induction rate of hairy roots

共培养时间/d	发根外植体数/个	外植体总数/个	诱导率/%
2	7	30	23.33
3	13	30	42.33
4	23	30	76.67
5	14	30	46.67
6	8	30	26.67

表 3 抗生素质量浓度对毛状根诱导率的影响

Table 3 Effect of different concentration of antibiotic on induction rate of hairy roots

抗生素/(mg·L <sup>-1</sup> )	发根外植体数/个	外植体总数/个	诱导率/%
200	6	30	20.00
300	11	30	36.67
400	14	30	46.67
500	24	30	80.00
600	13	30	43.33

白英外植体与 C58C1 共培养 4 d 后, 光照培养 10 d, 叶片伤口处开始长出毛状根。诱导产生的毛状根为白色, 多分枝, 多根毛, 无向地性。待毛状根长至 3~4 cm 时切下, 转入附加 Cef 的 MS 固体培养基中除菌培养, 毛状根生长速度加快。待完全除菌后, 切下毛状根 3~4 cm 处多分枝的根尖端, 转入无激素的 1/2 MS 液体培养基中摇床暗培养, 毛

状根生长迅速。液体震荡培养 45 d 时,毛状根生物量明显增多,并出现褐化(图 1),说明毛状根中次生代谢产物已经大量积累,可以收获并进行次生代谢产物量的测定。

### 3.2 白英毛状根再生植株的获得

液体培养 15 d 左右,毛状根上产生不定芽,将不定芽移至 MS 固体培养基中光照培养,得到白英毛状根再生植株。再生植株的根无向地性、根毛多、生长旺盛,具有明显毛状根的特性。再生植株长出侧根后,会由侧根处再生出幼苗。由毛状根产生的白英再生植株叶片较野生型白英更加稠密,茎的木质化程度较弱,生长速度明显高于野生型白英(图 2)。

### 3.3 白英毛状根及再生植株 rolB 基因的 PCR 检测

以白英野生型无菌苗基因组作为阴性对照,以发根农杆菌 C58C1 菌液作为阳性对照进行 PCR 扩增来检测白英毛状根系中的 VirD 基因和 rolB 基因。共检测了 6 个毛状根单克隆系及 5 个毛状根再生植株,其中均检测到 rolB 基因的存在(图 3 和图 4),而 VirD 基因未出现阳性。此结果表明,发根农杆菌 C58C1 中的 Ri 质粒的 T-DNA 已被成功整合到白英的基因中,且这 6 个单克隆系均未被农杆菌污染。

### 3.4 白英毛状根中薯蓣皂苷元的测定

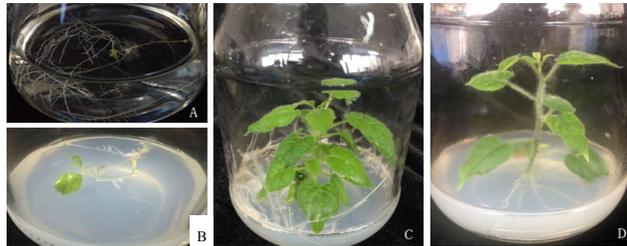
取 6 个培养 45 d 次生代谢产物充分积累的白英毛状根单克隆系(M1~M6)进行 HPLC 检测。



A-发根农杆菌诱导外植体产生的毛状根 B-毛状根单克隆 C-液体培养的毛状根  
A-hairy roots induced by *A. rhizogenes* B-hairy root monoclonal C-hairy roots in liquid medium

图 1 白英毛状根的获得

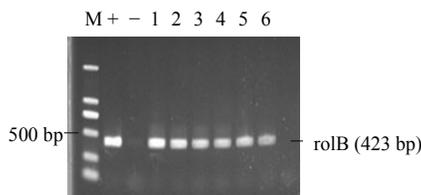
Fig. 1 Hairy roots of *S. lyratum*



A-液体培养产生的不定芽 B-MS 培养基上生长的再生植株 C-生长 30 d 的再生植株 D-野生型白英无菌苗  
A-adventitious bud produced in liquid medium B-regenerated plants growing in MS medium C-regenerated plants grown for 30 d D-aseptic seedling of wild type *S. lyratum*

图 2 白英毛状根再生植株

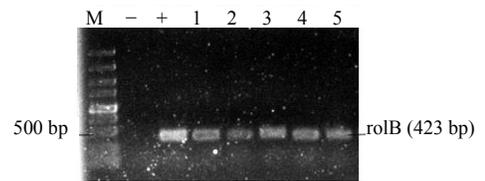
Fig. 2 Hairy roots regenerated plants of *S. lyratum*



M-Marker “+”-阳性对照 C58C1 菌株 “-” 阴性对照野生白英  
1~6-不同白英毛状根单克隆  
M-Marker “+”-C58C1 strain for positive control; “-”-wild type of *S. lyratum* for negative control 1—6-diferent monoclonal hairy roots of *S. lyratum*

图 3 白英部分毛状根 rolB 基因的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of rolB gene in hairy roots of *S. lyratum*



M-Marker “+”-阳性对照 C58C1 菌株 “-” 阴性对照野生白英  
1~5-不同毛状根再生植株  
M-Marker “+”-C58C1 strain for positive control “-”-wild type of *S. lyratum* for negative control 1—5-diferent hairy roots in regenerated plants of *S. lyratum*

图 4 白英部分毛状根再生植株 rolB 基因的 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of rolB gene in hairy roots regenerated plants of *S. lyratum*

同时检测生长了 80 d 的白英野生型无菌苗根、茎、叶中薯蓣皂苷元的量。检测结果表明,野生型白英无菌苗的叶片中薯蓣皂苷元量最高,为 1.742 mg/g (表 4)。生长 45 d 的白英毛状根中薯蓣皂苷元的量明显高于生长 80 d 的野生型白英无菌苗。毛状根单克隆系 M6 中薯蓣皂苷元量最高,为 5.280 mg/g,是野生型白英叶片的 3.031 倍,其每克毛状根中的薯蓣皂苷元的积累效率是白英叶片的 5.571 倍(表 4)。实验结果表明,通过建立白英毛状根诱导体系,获得的毛状根单克隆系中薯蓣皂苷元的量和积累效率都高于野生型白英,为通过培养毛状根高效率获得薯蓣皂苷元建立了基础。

表 4 白英植株及毛状根中薯蓣皂苷元的测定 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 4 Determination of diosgenin in hairy roots and plants of *S. lyratum* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

编号	薯蓣皂苷元/(mg·g <sup>-1</sup> )	薯蓣皂苷元积累量/(mg·d <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> )
根	1.121 0±0.001 3	0.014 0
茎	0.957 0±0.006 3	0.011 9
叶	1.742 0±0.005 7	0.021 7
M1	3.217 0±0.018 8	0.071 5
M2	4.945 0±0.004 8	0.109 9
M3	3.188 0±0.085 1	0.070 8
M4	3.891 0±0.062 6	0.086 5
M5	3.158 0±0.003 2	0.070 2
M6	5.280 0±0.004 6	0.117 3

#### 4 讨论

白英毛状根的诱导过程中发现,白英叶片较软,易损伤,故浸染和洗涤过程中不能震荡。浸染 10 d 的转化效果最好,且叶片成活率最高,浸染时间过长或洗涤次数过多都会引起叶片受损死亡。

薯蓣皂苷元是薯蓣皂苷的配基,在植物中主要以薯蓣皂苷的形式与纤维素结合存在于细胞壁中<sup>[13-14]</sup>,因而需要用酸水解法将薯蓣皂苷元与植物细胞壁分离。实验对比了超声提取法<sup>[11]</sup>和双向酸水解法,结果表明应用超声处理后再进行酸水解来提取薯蓣皂苷元,提取效率较双向酸水解法更高,提纯效果较好,HPLC 检测时峰的分度度较好,无杂峰影响。经对比发现,提取过程中 pH 的调节非常重要,pH 过酸会导致 HPLC 检测时有杂峰干扰。

本实验成功诱导出白英毛状根,建立了白英毛状根诱导体系,得到了优良毛状根单克隆系。通过对野生型白英根、茎、叶经水解产生的薯蓣皂苷元量的测定,结果表明,诱导得到的毛状根薯蓣皂苷元量及日积累效率均显著高于野生型白英。说明白

英毛状根离体培养是一个可以高效获得薯蓣皂苷元的途径。实验得到了 M2 和 M6 2 个高产薯蓣皂苷元的毛状根单克隆系,这为进一步利用毛状根诱导遗传稳定的高产薯蓣皂苷元的再生植株奠定了基础。毛状根液体培养过程中获得了再生植株。与野生型白英植株相比,再生植株叶片稠密,茎较粗壮、茎间距缩短,木质化程度减弱,须根发达,少数再生植株有叶片起皱现象。由毛状根直接产生的再生植株遗传稳定性较好,成活率高,但获得不定芽数量较少,耗时长。所以如何利用毛状根短时间内再生大量遗传稳定的植株将是下一步需要研究的方向。

#### 参考文献

- [1] 吴婉莹,高志刚,李石谷.白英和欧白英的化学成分与药理活性[J].国外医药:植物药分册,2001,16(6):245-247.
- [2] 单长民,胡娟娟,杜冠华.白英提取物诱导人肝癌 BBL-7404 细胞凋亡作用[J].中国临床药理学与治疗学,2001,6(3):200-203.
- [3] Liu K, Zhao W, Gao X, et al. Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKK $\beta$  and IRS-1 pathways[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 223(2): 350-358.
- [4] Gao L L, Li F R, Jiao P, et al. Paris chinensis dioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 39(17): 4389-4395.
- [5] Jung D H, Park H J, Byun H E, et al. Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF- $\kappa$ B and AP-1 activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(9): 1047-1054.
- [6] Son I S, Kim J H, Sohn H Y, et al. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.) on high-cholesterol fed rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(12): 3063-3071.
- [7] Tada Y, Kanda N, Haratake A, et al. Novel effects of diosgenin on skin aging[J]. *Steroids*, 2009, 74(6): 504-511.
- [8] Hamill J D, Parr A J, Rhodes M J C. New routes to plant secondary products[J]. *Biol Technol*, 1987, 5(4): 800-804.
- [9] 张 鸿,张显强,罗正伟,等.曼陀罗种子萌发及植株再生[J].中草药,2012,43(12):2499-2502.
- [10] 侯丽丽,施和平,余 武,等.烟草毛状根多倍体诱导及植株再生[J].生物工程学报,2014,30(4):581-594.
- [11] 周 浓,郭吉芬,杨丽云,等.HPLC 检测不同采收时期滇重楼中薯蓣皂苷元的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):54-56.
- [12] 林世和,易艳东,肖 宏,等.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[J].中国药房,2012,23(27):2544-2545.
- [13] 杨红英,孙长山,马 龄,等.RP-HPLC-ELSD 法同时测定白英中蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元和氢化勒帕茄次碱[J].中草药,2010,41(3):481-483.
- [14] 宋发军.甾体药物源植物薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的研究及生产状况[J].中成药,2003,25(3):232-234.