

丹参的冠瘿组织培养和丹参酮的产生

张荫麟 宋经元 赵保华 刘慧灵

(中国医学科学院药用植物研究所 北京 100094)

摘要 用根癌农杆菌感染丹参无菌苗获得冠瘿组织,除菌后的冠瘿组织在无激素的 MS 培养基上生长良好。经高压电泳检查,冠瘿组织中含有冠瘿碱,证实根癌农杆菌的 Ti 质粒转化成功。冠瘿组织的生长和丹参酮的积累与基本培养基有关,B5 和 MS 培养基有利于生长,月增殖倍数分别达到 102 倍和 90 倍,而 67-V 和 WP 培养基则有利于丹参酮的合成,在培养过程中丹参酮能分泌到培养液中。研究表明用冠瘿组织作为培养系统,生产药用植物有效成分具有良好的开发前景。

关键词 Ti 质粒转化,冠瘿组织培养,丹参酮

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)为唇形科鼠尾草属植物,是用于治疗心血管系统疾病的重要中草药,主要有效成分为丹参酮。利用丹参的细胞悬浮培养和细胞固定化培养生产隐丹参酮和铁锈醇等次生代谢物,已有报道^[1-3]。

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Ti 质粒的 T-DNA 片断上含有 tms 基因和 tmr 基因^[4],它们通过根癌农杆菌感染植物可以被整合进入植物细胞的基因组,诱导冠瘿组织(Crown gall tissue)的发生。冠瘿组织离体培养时具有激素自主、增殖速度较常规细胞培养快等特点。利用冠瘿组织培养生产有药用价值的次生代谢物已引起了人们的重视,如利用柠檬留兰香(*Mentha citrata*)的冠瘿组织生产萜烯^[5],洋地黄(*Digitalis lanata*)的冠瘿组织生产强心甙^[6]等。本文报道利用丹参的冠瘿组织培养生产丹参酮的部分研究结果。

1 材料与方 法

用胭脂碱型根癌农杆菌 C58 菌株感染丹参无菌苗,诱导出冠瘿组织。获得的冠瘿组织在含有 500mg/L 羧苄青霉素的 MS 培养基上除菌。除菌完成后在不含激素的 MS 培养基上继代培养,并选择生长较快的株系作为各项研究的试验材料。

根据 Otten, L. A. B. M. 等人的方法^[7]测定冠瘿组织中的胭脂碱,证实 Ti 质粒转化。

用紫外分光光度计法^[8]测定冠瘿组织中丹参酮含量,TLC 法鉴定培养液中丹参酮的成分。

2 结果与讨论

2.1 丹参冠瘿组织的诱导及除菌

丹参种子经 0.1% 升汞消毒 10 分钟,无菌蒸馏水冲 3 次,于 MS/2 琼脂培养基上(大量元素减半)萌发获得无菌苗。培养条件 25℃,每天光照 16 小时。一月后切取茎尖转移到

本文于 1994 年 1 月 17 日收到。

新鲜培养基上做无菌苗的继代培养。取丹参无菌苗,高约 6cm,保留顶芽和 3 片叶,去掉其余叶片,在茎节处涂上生长良好的 C58 菌株并用解剖针刺破表皮,置 25℃ 漫射光下培养。6 天以后,在针刺接种处开始出现明显肿胀,继续生长形成冠瘿瘤(见图版 I-A),待冠瘿瘤长到 5mm³ 大小时(一般需 10 天),从母体上切下移到含有 500mg/L 羧苄青霉素的 MS 琼脂培养基上培养。在含抗生素的培养基上经 5 次转移,约 70 天后完成除菌过程,获得无菌的冠瘿瘤。无苗冠瘿瘤在不含激素的 MS 培养基上生长良好,形成冠瘿组织。来源于不同冠瘿瘤的组织在增殖速度上有显著差异,从 5 个冠瘿瘤中选出生长较快的 Ca 株系(图版 I-B)作为试验材料。

2.2 冠瘿组织中冠瘿碱的测定

根癌农杆菌 C₅₈ 菌株 Ti 质粒的 T-DNA 含有胭脂碱合成酶基因,植物染色体内不含该基因,如果 Ti 质粒将该基因导入了植物细胞,在诱导出来的冠瘿组织中就能检测到胭脂碱,表明转化成功。用高压纸电泳检测了 Ca 及 mH 两个株系冠瘿组织的冠瘿碱,结果显示了两个株系中都含有胭脂碱,见图版 I-C(图中精氨酸是合成胭脂碱的前体),表明 T-DNA 已转移到丹参细胞中并获得表达。

2.3 冠瘿组织培养及丹参酮的产生

将丹参冠瘿组织 Ca 株系接到不含激素的 MS、B₅、67-V、WP^[9] 四种基本培养基中进行液体培养,培养条件 25℃,黑暗,摇床转速 140r/min,500ml 圆底烧瓶中含 100ml 培养液,培养 31 天。结果表明,冠瘿组织在不同培养基上生长及丹参酮生产有明显差异。冠瘿组织在 67-V 中分化出大量叶芽,叶柄较短,是典型的畸胎瘤(Teratoma)表型;MS 中偶有小叶片产生;WP 和 B₅ 中也有叶片分化,但较 67-V 少,比 MS 多。冠瘿组织在 67-V 和 WP 中液体培养三周以后,培养液开始变橙黄色,继而变为橙红色。变色 10 天后收获。这时冠瘿组织本身显浅红色,而在 B₅ 和 MS 中培养的冠瘿组织为淡黄色,培养液无色透明。收获后计算冠瘿组织在各基本培养基中的增殖速度并分析冠瘿组织中丹参酮的含量,结果如表 1 所示。

表 1 不同基本培养基对冠瘿组织生长和丹参酮生产的影响

Table 1 Effect of different basic medium on the growth of crown gall tissue cultures and production of tanshinone

Basic medium	Inoculum* (mg)	Harvest biomass* (mg)	Times increase	Increase** rate (mg/d)	Tanshinone*** content in grown gall (%, dwt)	Pigment content in medium (mg/L)
MS	248	22690	90	724	0.01	0
B ₅	248	25462	102	813	0.018	0
67-V	248	16019	64	509	0.027	24
WP	248	13562	54	429	0.084	20

*: Times increased = (Harvest biomass - inoculum) / inoculum (mg of per flask, fwt)

** : Increase rate = (Harvest biomass - inoculum) / d (mg/d, per flask, fwt)

*** : Tanshinone content in drug is 0.386%

将 67-V 和 WP 培养液分别用氯仿提取出红色部分,经 TLC 鉴定表明,在 WP 培养液中含有丹参酮 II_A 及隐丹参酮,67-V 培养液中含隐丹参酮。可见,丹参冠瘿组织在液体培养时能够将丹参酮分泌到培养液中。

丹参冠瘿组织培养表现为激素自养型,即在无激素在培养基中也可旺盛生长,在适当条件下可以合成丹参根中所含的有效成分,并能将产生的色素(丹参酮类化合物)释放到培养基中。根据实验结果,丹参冠瘿组织中丹参酮含量和原植物(生药)比较还不高,尚需进一步探索提高冠瘿组织合成丹参酮能力的有效方法。目前我们通过冠瘿瘤筛选,已选择一个高产株系,初步分析结果表明其丹参酮含量已超过生药的含量,有关研究结果将另行报道。

通过上述丹参冠瘿组织培养的研究表明,冠瘿组织,即根癌农杆菌 Ti 质粒转化后的表现型,像毛状根(发根农杆菌 Ri 质粒转化后的表现型)^[10,11]一样,可以作为一个有效的培养系统,用来生产有药用价值的次生代谢产物,有着良好的开发前景。

参 考 文 献

- [1]陶璐璐等.生物工程学报,1990,6(3):218-223.
- [2]Hitoshi M *et al.* Phytochemistry,1986,25(7):1621-1624.
- [3]Hitoshi M *et al.* Phytochemistry,1987,26(5):1421-1424.
- [4]Harry Klee *et al.* Ann Rev Plant Physiol,1987,38:467-486.
- [5]Andrew Spencer *et al.* Plant Cell Reports,1990,8:601-604.
- [6]Moldenhauer D *et al.* Planta Medica,1990,8:601-604.
- [7]Otten L A B M *et al.* Biochem Biophys Acta,1978,527:497-500.
- [8]沙世炎等.中草药有效成分分析法,上册,北京:人民卫生出版社,1982,pp. 64-66.
- [9]陈维伦等.植物生物技术,北京:科学出版社,1987,p. 10-11.
- [10]张荫麟等.植物学报,1992,34(8):603-608.
- [11]孙 敏等.生物工程学报,1993,9(3):287-290.

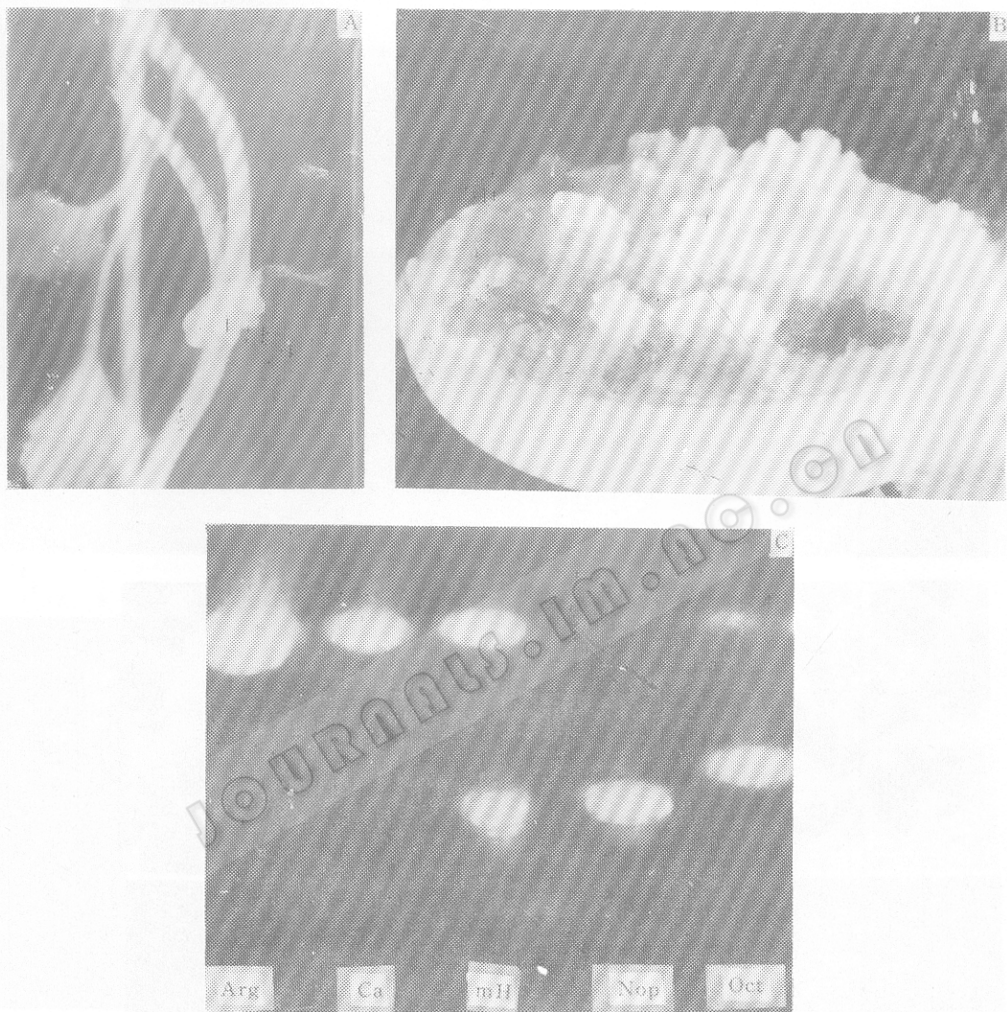
Crown Gall Tissue Culture and Production of Tanshinone in *Salvia miltiorrhiza*

Zhang Yinlin Song Jingyuan Zhao Baohua Liu Huiling

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese
Academy of Medicinal Sciences, Beijing 100094)

Abstract Crown galls were induced by direct infection of sterile seedlings with *Agrobacterium tumefaciens* C58 and the transformation was proved by opine identification. The crown galls grew well in hormone-free medium. B5 and MS basic medium are good for growth of the crown galls in which crown gall (Strain Ca) increased up to 102 and 90 times in a month, respectively. However, 67-V and WP basic medium are good for tanshinone production. It showed that crown galls can be utilized as useful culture system to produce secondary metabolites.

Key words Transformation of Ti-plasmid, crown gall tissue culture. tanshinone



A. Crown gall induced
from sterile seedling of
S. miltiorrhiza infected
with *A. tumefaciens*

B. Crown gall tissue
cultures (Strain Ca) growing
on MS hormone-free medium
for 30 days

C. Opine detection of crown gall tissues

Arg: Arginine

Ca: Crown gall tissue strain Ca

mH: Crown gall tissue strain mH

Nop: Nopaline

Oct: Octopine