

## 丹参冠瘿组织高产株系选择和丹参酮的产生

宋经元 张荫麟 祁建军 吕桂兰

(中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所 北京 100094)

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)是治疗心血管系统疾病的重要中草药。前文我们已报道了丹参冠瘿组织培养的部分研究结果<sup>[1]</sup>。利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Ti质粒转化产生的冠瘿组织进行高产株系选择的研究还很少,本文报道丹参冠瘿组织高产株系选择和丹参酮产生的研究结果。

### 1 材料与方法

丹参冠瘿组织的诱导见前文<sup>[1]</sup>。冠瘿组织在70℃干燥箱中烘干至恒重,用紫外分光光度法测定冠瘿组织中丹参酮含量<sup>[2]</sup>。冠瘿组织液体静止培养的方法见文献<sup>[3]</sup>。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 冠瘿组织高产株系的选择

将继代于MS基本培养基上的冠瘿组织转至67-V基本培养基上,一个月后冠瘿组织中出现一些红色组织块或红色斑点状组织,将红色部分挑选出来接到新鲜的67-V培养基上培养。结合继代培养每月进行一次选择。经过12个月不断选择,得到一个含量较高的株系(C1株系)。C1株系在67-V培养基上生长良好,在不断选择过程中红色组织块逐渐增多,颜色越来越深,其丹参酮含量在不断提高(表1,表中数据系3次重复的结果,“±”号后面的数据为标准误。以下各表同此)。表1说明根据冠瘿组织中出现的红色组织块选择高产株系是有效的。经过继代和培养36个月后,C1株系的丹参酮含量已达选择前的79倍,是生药含量的3.8倍。

#### 2.2 C1株系和Ca株系的生长与丹参酮含量比较

我们曾报道在MS培养基上获得了生长较快的冠瘿组织Ca株系<sup>[1]</sup>,现将Ca株系和C1株系的生长和丹参酮

表1 选择过程中C1株系的丹参酮含量变化

时间/月	C1株系中丹参酮含量/%*	与生药比较差异显著性
0	0.046±0.008	p<0.01
12	1.142±0.090	p>0.05
20	1.849±0.039	p<0.01
36	3.615±0.123	p<0.01

\* 生药中丹参酮含量为0.947%干重。

产生的情况做一比较。用MS和67-V固体培养基为基本培养基,分别接种Ca株系和C1株系,在25℃暗中培养29d后收获,两个株系在不同培养基上的生长和丹参酮含量见表2。表2表明,根据不同目的选择的株系在生长和活性成分的含量上表现不相同,如Ca株系是根据增殖速率来选择的,因而比C1株系生长快;C1株系是根据丹参酮含量来选择的,则丹参酮含量明显高于Ca株系。另外,不同培养基对同一株系的生长和活性成分产生的影响也不相同,从表2的结果可看出,MS培养基有利于培养物的生长,而67-V培养基则有利于丹参酮的产生。

#### 2.3 C1株系和Ca株系的液体静止培养

采用液体静止培养的方法,在67-V培养基上观察C1株系和Ca株系的生长和丹参酮产生的情况。将冠瘿组织均匀地接种在聚胺酯泡沫塑料上,置25℃暗中培养28d后更换新鲜的67-V培养液,再培养

22d 收获, 2 个株系的增殖速率及丹参酮含量见表 3。结果表明, 在液体静止培养条件下, C1 株系仍可保持高产特性, 丹参酮含量是 Ca 株系的 18.5 倍, 是生药的 1.9 倍。实验中使用的液体静止培养方法是一种简便、成本低廉的大量培养方法, 它适合于丹参冠瘿组织高产株系的扩大培养。

表 2 Ca 株系和 C1 株系在 MS 和 67-V 培养基上生长及丹参酮含量的比较

株系	培养基	接种量/mg	收获量/mg	增殖速率 <sup>*</sup> /mg·d <sup>-1</sup>	冠瘿组织中丹参 酮含量/%	丹参酮含量的差 异显著性	
						0.05	0.01
C1	67-V	940	2621	58	2.857 ± 0.257	a	A
C1	MS	940	6729	200	1.037 ± 0.076	b	B
Ca	67-V	678	4871	145	0.148 ± 0.020	c	C
Ca	MS	678	9661	310	0.029 ± 0.003	c	C

\* 增殖速率 = (收获量 - 接种量) / 天 (mg·d<sup>-1</sup>, 每瓶鲜重)

表 3 C1 株系和 Ca 株系在液体静止培养时生长情况和丹参酮含量的比较

株系	接种量/g	收获量/g	增殖速率/g·d <sup>-1</sup>	冠瘿组织中丹参 酮含量/%	丹参酮含量的差异 显著性
Ca	7.51	69.6	1.22	0.098 ± 0.021	p < 0.01
C1	4.60	24.7	0.39	1.812 ± 0.167	

## 2.4 诱导子对 C1 株系产生丹参酮的影响

2.4.1 酵母浸出物的作用: 采用液体静止培养方法, C1 株系先在 67-V 培养基上培养 27d, 更换 67-V 时附加 1g/L 的酵母浸出物, 对照更换新鲜的 67-V 培养液, 更换后再培养 28d (25℃ 暗培养) 收获, 结果如表 4 所示。说明用酵母浸出物做诱导子显著提高了丹参酮含量(是对照的 2.6 倍, 是生药样品的 3.7 倍)。

表 4 酵母浸出物对 C1 株系生产丹参酮的影响

	接种量/g	收获量/g	增殖速率/mg·d <sup>-1</sup>	冠瘿组织中丹参 酮含量/%	丹参酮含量的差异 显著性
对照	5.543	36.974	571	1.364 ± 0.328	p < 0.01
处理	5.543	32.134	483	3.486 ± 0.096	

2.4.2 蜜环菌发酵液的作用: 实验用液体静止培养的方法, 培养条件同上。在 67-V 培养基上培养 24d 后, 更换每升 67-V 培养基含 100ml 蜜环菌发酵液, 蜜环菌发酵液的制作方法见文献[4], 对照更换新鲜的 67-V 培养液。再培养 18d 收获, 结果见表 5。表明加入蜜环菌发酵液之后, 培养物中丹参酮含量提高到对照的 1.6 倍, 是生药样品的 3.6 倍, 说明蜜环菌发酵液对提高高产株系的丹参酮含量也有一定作用。

表 5 蜜环菌发酵液对 C1 株系生产丹参酮的影响

	接种量/g	收获量/g	增殖速率/mg·d <sup>-1</sup>	冠瘿组织中丹参 酮含量/%	丹参酮含量的差异 显著性
对照	5.000	35.266	721	2.093 ± 0.143	p < 0.01
处理	5.000	30.919	617	3.437 ± 0.175	

丹参冠瘿组织高产株系的选择与培养基有一定关系,在无激素的 MS 培养基上不能获得高产株系,而在无激素的 67-V 培养基上则有利于选择出高产株系。据报道,丹参愈伤组织的高产株系在连续的继代培养中隐丹参酮的含量会逐渐减少<sup>[5]</sup>。我们发现已选出的冠瘿组织高产株系丹参酮含量高,而且较稳定,但仍然存在一定程度的变化(1.3%~2.8%, dwt),因此为了长期保持高产株系的稳定,有必要在继代过程中反复选择。

近年来已有许多关于用诱导子技术促进药用植物细胞培养物产生活性成分的研究报道<sup>[6,7]</sup>。本项实验中,我们使用酵母浸出物和蜜环菌发酵液作为诱导子,证明对促进丹参冠瘿组织高产株系产生丹参酮有明显的效果,且含量已达到生药样品的3倍以上。因此,利用选出的高产株系再配合诱导子技术和液体静止培养,可能是生产丹参酮的可行途径。

### 参 考 文 献

- [1]张荫麟,宋经元,赵保华等.生物工程学报,1995,11(2):150~152。
- [2]沙世炎,徐礼棠,严敏如等.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。
- [3]张荫麟,李英.中草药,1984,15(4):31~32。
- [4]张荫麟,朱敏,赵保华.植物学报,1992,34(9):658~661。
- [5]Miyasaka H, Nasu M, Yamamoto T *et al.* Phytochemistry, 1987,26(5):1421~1424.
- [6]James P K, Mijo D S, Gary M H *et al.* Plant Cell Reports, 1993,12:356~359.
- [7]Mizukami H, Ogawa T, Ohashi H *et al.* Plant Cell Reports, 1992,11:480~483.

## Selection of a High Tanshinone-producing Crown Gall Strain and Production of Tanshinone in the Strain

Song Jingyuan Zhang Yinlin Qi Jianjun Lü Guilan

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100094)

**Abstract** Crown galls were induced by direct infection of sterile seedlings of *Salvia miltiorrhiza* with *Agrobacterium tumefaciens* C58 and subcultured in 67-V hormone-free medium by successively selecting red cell aggregates. A high tanshinone-producing crown gall strain C1 was obtained after 12 months in subculture. It grows well and keeps high tanshinone-producing characteristic in liquid stationary culture. It was obvious that yeast extract and *Armillaria mellea* as elicitors could promote the strain C1 to produce tanshinone. Tanshinone content of the strain C1 cultures was over three times higher than that of the crude drugs. The results indicated that the crown gall tissue and elicitor technique could be provided some new clues for producing tanshinone under the condition of liquid stationary culture.

**Key words** High tanshinone-producing crown gall strain, liquid stationary culture, elicitor