

不同品系丹参毛状根的诱导效应比较研究

熊丙全¹, 刘冬青², 廖相建¹, 郑雪莲^{2*}¹成都农业科技职业学院园林园艺分院, 成都 611130; ²电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054

摘要: 不同遗传背景丹参材料的质量存在差异,但其毛状根的诱导效应是否存在差异尚未验证。本试验利用发根农杆菌 C58C1 诱导 7 个不同遗传背景的丹参无菌苗产生毛状根,并比较其毛状根的诱导率、生长速率、有效成分含量等差异表现,结果表明,不同遗传背景的丹参材料,其毛状根诱导效应存在差异,其中 Ds2 品系的诱导率最低,显著低于其他 6 个品系;而 Ds5、Ds6、Ds7 三个品系的生长速率显著低于 Ds1、Ds3、Ds4;比较 Ds1、Ds3、Ds4 三个品系的有效成分含量,则发现其差异明显,且各有优势,首次验证了不同遗传背景丹参毛状根的诱导效应存在显著差异。同时,通过综合评价,筛选出 3 个适宜毛状根高效发酵生产的优良丹参品系 Ds1、Ds3、Ds4,其中生产迷迭香酸选用 Ds1、Ds4,生产丹酚酸 B 选用 Ds4,生产丹参酮 I 选用 Ds3,生产丹参酮 II A 选用 Ds1,为丹参毛状根技术的生产应用提供了实验依据。

关键词: 丹参;毛状根;诱导效应;不同品系

中图分类号: S567.2; Q943

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.006

Study on Inductive Effect of *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root with Different StrainsXIONG Bing-quan¹, LIU Dong-qing², LIAO Xiang-jian¹, ZHENG Xue-lian^{2*}¹ Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China; ² School of Life Sciences and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China

Abstract: The quality of *Salvia miltiorrhiza* is different in different genetic backgrounds; however, the induction effect of *Salvia miltiorrhiza* hairy root has not been verified. In this experiment, transformed hairy roots of seven different *Salvia miltiorrhiza* strains were obtained by the infection of *Agrobacterium rhizogenes* C58C1 and a hairy root culture system *in vitro* was established. By comparing induction efficiency, growth rate, content of active component from the above seven different genetic background *Salvia miltiorrhiza*'s hairy root, the results showed that the induction effects of hairy root in different genetic backgrounds were different. Among them, the induction rate of Ds2 strain was lowest, which was significantly lower than that of the other 6 lines; the growth rates of three strains of Ds5, Ds6 and Ds7 were lower than Ds1, Ds3 and Ds4 strains; comparing the effective components content of three strains of Ds1, Ds3 and Ds4, it was found that the differences were obvious, and each had its advantages. Therefore, it was the first time to verify the induction effect of hairy root of *Salvia miltiorrhiza* in different genetic backgrounds. At the same time, through comprehensive evaluation, we screened three fine *Salvia miltiorrhiza* strains Ds1, Ds3 and Ds4 which were suitable for efficient fermentation of hairy roots. Rosmarinic acid was produced by Ds1 and Ds4, salvianolic acid B was produced by Ds4, and Ds3 was used to produce tanshinone I, Ds3 was used to produce tanshinone II A.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; hairy root; inductive effect; different strains

丹参 (*Salvia miltiorrhiza*), 别名紫丹参、血参、大红袍、红根等, 来源于唇形科鼠尾草属植物, 以根入药, 是我国传统医药学中应用最早且最广泛的药物之一, 其干燥根及根茎, 是著名的活血化瘀药, 也是大宗药材之一^[1]。目前以丹参为原料生产的复方

产品有近百种, 但随着城市和人口的发展, 丹参野生资源不断减少, 栽培丹参逐渐成为市场供应的主要来源, 而栽培丹参存在生长周期长、质量不可控、农药残留超标等问题, 寻找替代性资源满足市场需求是解决这一问题的重要措施之一。

丹参毛状根属于激素自养型, 具有有效成分含量高、生理生化和遗传性稳定、易于进行操作控制等特点, 可在离体培养条件下表现出次生代谢产物的合成能力, 可作为替代丹参的材料。利用发根农杆

收稿日期: 2017-09-11 接受日期: 2017-11-28

基金项目: 四川省教育厅 2017 年度自然科学基金项目 (17ZB0069);
2015 年成都农业科技职业学院院级科研课题 (CNY15-09)

* 通讯作者 E-mail: zhengxl@uestc.edu.cn

菌诱导丹参生成毛状根的方法早在上世纪九十年代就已经被建立,并且获得了稳定的丹参毛状根株系,且在毛状根中及培养基中都发现了丹参酮类、酚酸类等化学成分^[2,3]。我国丹参植物资源丰富,且在全国各地分布广泛,有研究表明,丹参中药材存在道地性的特点,不同产地或居群丹参存在遗传差异,其生物量与活性成分含量具有明显差异,一方面可能是环境条件影响植株代谢的结果,另一方面则与种质自身的分化与变异密切相关^[4,6]。因此,不同遗传背景的丹参毛状根诱导效应及次生代谢产物生产也会存在差异,但目前尚未见相关报道;而从丰富的丹参资源中筛选出优良丹参品种作为诱导毛状根的材料对于丹参毛状根技术的应用意义重大。本试验针对以上问题,建立七个不同遗传背景的优良丹参品系的毛状根诱导体系,比较其毛状根诱导效率、生长速率、有效成分含量等差异表现,以验证不同遗传背景丹参种质资源的毛状根诱导效应是否存在差异,并从中筛选出适宜毛状根高效发酵生产的优良丹参品系,为丹参毛状根培养的研究及工业化应用提供理论参考和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)材料分别采集于四川中江、山东等地,由电子科技大学生命科学与技术学院植物基因组工程实验室培育成无菌苗,统一编号为Ds1、Ds2、Ds3、Ds4、Ds5、Ds6、Ds7。含 *Agrobacterium rhizogenes* 毛状根诱导质粒 pRiA4 的 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 菌株由上海师范大学开国银教授惠赠,保存于电子科技大学植物基因组工程实验室。

1.2 农杆菌介导的丹参毛状根的诱导

分别选取7个不同品系丹参生长状况良好的无菌苗中部叶片,切成约0.5 cm × 0.5 cm的叶盘,浸泡于提前培养好的根癌农杆菌 C58C1 重悬菌液中,侵染25 min左右;取出叶盘,正面向上接入的共培养培养基上(MS + 100 μM AS,表面覆盖一张灭菌滤纸),25 °C室温下暗培养2天。然后将叶盘正面向上接入毛状根诱导培养基(1/2MS + 500 mg/L Cef)中,在25 °C、16 h/8 h光周期条件下持续培养20天,统计不同品系丹参诱导培养阶段的诱导率(诱导率 = 生根外植体数/感染外植体数 × 100,每个品系丹参感染外植体30个,共计3批)。

将诱导培养20天,生长良好的毛状根从叶盘上

全部切下,整齐接入筛选培养基中,培养基配方为B5 + 500 mg/L Cef + 筛选压(50 mg/L Kan),并标记根尖起始位点;置于25 °C黑暗条件下连续培养,每10天统计1次毛状根生长率,生长率(cm/d) = 毛状根的增长长度/天数;每10天继代1次,继代1~2次,培养20~30天,抽样进行PCR检测。

1.3 毛状根的发酵培养

切取经过PCR检测的丹参根系材料上长度约5 cm、旺盛生长的侧根及主根,转入液体发酵培养基(1/2 B5 + 500 mg/L Cef)中进行毛状根发酵培养,每瓶放入3~5根,26 °C,120 rpm,黑暗培养30天,毛状根颜色变红后,取样进行有效成分检测。

1.4 丹参毛状根的PCR检测

丹参毛状根筛选培养20~30天后,切取旺盛生长根系材料(非生长点部分),进行gDNA PCR阳性检测,用CTAB法提取丹参毛状根的总DNA,以rolC基因的序列设计PCR检测引物(rolC-F: 5'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3'; rolC-R: 5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3');反应体系为:19.8 μL ddH₂O, 2.5 μL 10 × Taqbuffer (Mg²⁺), 0.5 μL 10 mmol/L dNTPs, 0.5 μL 10 μmol/L rolC-F, 0.5 μL 10 μmol/L rolC-R, 0.2 μL Taq聚合酶, 1 μL 丹参毛状根基因组DNA;反应条件为:94 °C, 3 min → (94 °C 30 s → 55 °C, 30 s → 72 °C, 1 min) 36 cycles → 72 °C, 5 min → 10 °C, 10 min。

1.5 丹参毛状根有效成分含量测定

将10 mg/mL的丹参毛状根甲醇提取液用于HPLC检测^[7]。检测条件为:色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱, SP-120-5-C₁₈-AP, 4.6 mm ID × 250 mm;流动相A:0.2%磷酸水溶液;流动相B:乙腈;检测波长:270 nm;流速:0.7 ml/min;柱温:35 °C;梯度洗脱条件:0~5 min:10%乙腈;5~10 min:10%乙腈-20%乙腈;10~15 min:20%乙腈-25%乙腈;15~40 min:25%乙腈-60%乙腈;40~60 min:60%乙腈;60~70 min:60%乙腈-100%乙腈;70~80 min:100%乙腈。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的丹参毛状根诱导与培养

选取长势良好的Ds1、Ds2、Ds3、Ds4、Ds5、Ds6、Ds7七个品系丹参无菌苗,通过发根农杆菌 C58C1 诱导生成了丹参毛状根,并对产生的毛状根筛选出长势好的毛状根进行发酵培养,诱导与培养的各阶段具体生长情况见图1。

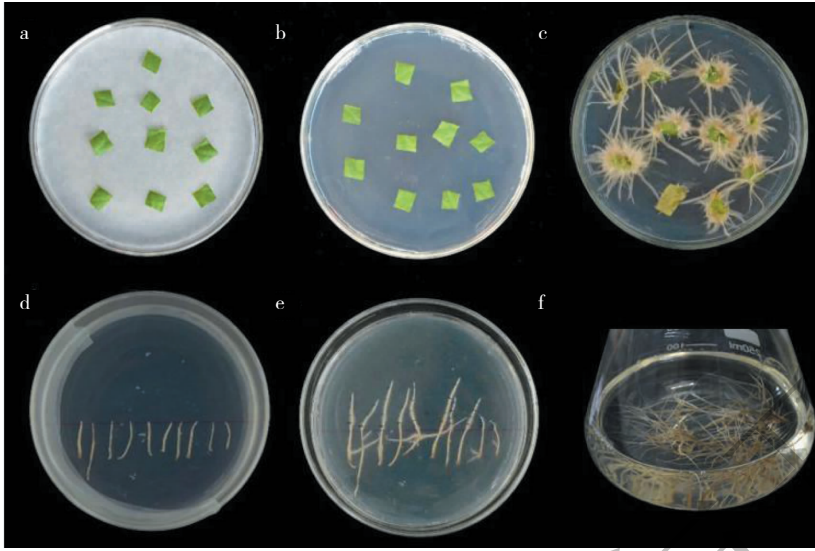


图1 丹参毛状根诱导培养各阶段流程及生长情况示意图

Fig. 1 Growth of various stages of hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza*

注: (a) 共培养阶段的叶片; (b) 诱导培养 1d 的叶片; (c) 诱导培养 20d 的叶片, 毛状根大量产生; (d) 筛选培养 1d 的毛状根; (e) 筛选培养 10d 的毛状根 (f) 液体培养基中发酵培养的毛状根

Note: (a) Leaves of co culture stage (b) Leaves of induction culture stage for 1 day (c) Leaves of induction culture stage for 20 days, a large number of hairy roots (d) Leaves of screening culture stage for 1 day (e) Leaves of screening culture stage for 10 days (f) Fermented hairy root in liquid medium

2.2 丹参毛状根的 PCR 检测

为了确定通过发根农杆菌介导产生的七个品系丹参的根状材料是否为丹参毛状根, 随机选取了 Ds3、Ds5 的根状材料各 4 株进行 PCR 阳性检测, 扩增 *RolC* 基因片段, 扩增片段为 267 bp, PCR 结果见图 2。

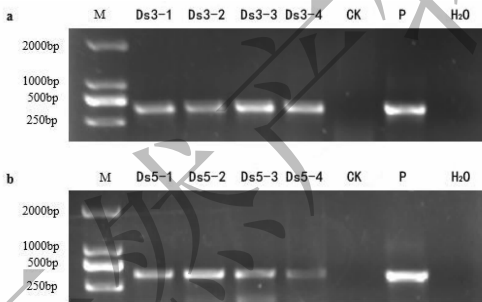


图2 Ds3 和 Ds5 丹参毛状根 PCR 阳性检测电泳图

Fig. 2 PCR positive detection electrophoretic map of *Salvia miltiorrhiza* hairy root of Ds3 and Ds5

注: (a) Ds3 品系丹参阳性检测 PCR 电泳图; (b) Ds5 品系丹参阳性检测 PCR 电泳图

Note: (a) PCR positive detection electrophoretic map of Ds3; (b) PCR positive detection electrophoretic map of Ds5

注: M; 2000bp DNA marker; 1-4: 4 株丹参根状材料; CK (阴性对照); 丹参组培养苗叶片; P (阳性对照); C58C1 菌株中的质粒

Note: M; 2000bp DNA marker; 1-4: 4 root material of *Salvia miltiorrhiza*; CK (negative control); leaves of tissue culture seedlings of *Salvia miltiorrhiza*; P (positive control); plasmids in C58C1 strain

从图 2 可以看出, 随机选取的两个品系丹参根状材料的阳性转化率均为 100%, 结果表明, 通过根癌农杆菌 C58C1 诱导出的丹参状材料全为毛状根。

2.3 不同品系丹参毛状根诱导效应的综合比较

2.3.1 比较诱导培养阶段各品系的诱导率

如图 3 所示, 七个不同品系丹参在诱导培养阶段的毛状根诱导率存在差异, 其中 Ds2 诱导率最低, 且显著低于其他 6 个品系; Ds4 诱导率最高, 但与 Ds5、Ds7 差异不显著; Ds1、Ds3、Ds5、Ds6、Ds7 五个品系之间诱导率差异也不显著; 据此, 我们先将诱导率最低的 Ds2 淘汰, 其余六个品系进入下一阶段比较。

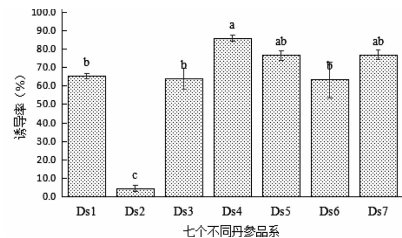


图3 七个品系丹参在毛状根诱导培养阶段的诱导率情况 ($n=3, P=0.05$)

Fig. 3 The induction rate of seven strains of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root induction culture stage ($n=3, P=0.05$)

2.3.2 比较筛选培养阶段各品系的生长率

由表 1 六个品系丹参筛选培养阶段的生长率一览表可见,将诱导率较高的六个丹参品系 Ds1、Ds3、Ds4、Ds5、Ds6、Ds7 叶盘上切取的毛状根进行筛选培养,各品系毛状根生长率存在差异。其中 Ds6 生长率最低,与 Ds3、Ds4 之间差异明显;Ds3 生长率最高,且与 Ds5、Ds6、Ds7 之间存在显著差异,但与 Ds1、Ds4 差异不显著,因此,根据筛选培养阶段的毛状根生长率,淘汰生长率较低的 Ds5、Ds6、Ds7,将生长率较高的 Ds1、Ds3、Ds4 三个品系进行发酵培养。

2.3.3 比较发酵培养阶段各品系毛状根中次生代谢产物含量

通过 HPLC 测定经过发酵培养的 Ds1、Ds3、Ds4 三个品系丹参毛状根中含有的水溶性酚酸类化合物(主要是迷迭香酸、丹酚酸 B)和脂溶性二萜类化合物(丹参酮 I、丹参酮 II_A),结果(见表 2、3)表明,Ds1 丹参毛状根中的迷迭香酸含量最高,达到 82.045 mg/g,显著高于 Ds3,但与 Ds4 差异不显著;Ds4 丹参毛状根中的丹酚酸 B 含量最高,达到 48.892 mg/g,并与 Ds1、Ds3 差异显著;Ds3 丹参毛

状根丹参酮 I 的含量最高,达到 1.8019 mg/g,显著高于 Ds1、Ds4;Ds1 丹参毛状根丹参酮 II_A 的含量最高,达到 0.4374 mg/g,与 Ds3、Ds4 存在显著差异。同时比较各品系的增大倍数,发现四类化合物中,三个品系之间水溶性酚酸类化合物的差异较小,脂溶性二萜类化合物的差异较大,其中迷迭香酸的差异最小。

表 1 六个品系丹参在筛选培养阶段的生长率一览表

Table 1 The growth rate of six strains of *Salvia miltiorrhiza* in screening culture stage

品系 Strains	生长率 Growth rate (cm/d)
Ds1	0.089 ± 0.016 ^{XabcY}
Ds3	0.112 ± 0.029 ^a
Ds4	0.100 ± 0.011 ^{ab}
Ds5	0.077 ± 0.016 ^{bed}
Ds6	0.061 ± 0.021 ^{cd}
Ds7	0.052 ± 0.019 ^d

注: X: 平均值 ± 标准误差; Y: 邓肯氏多重比较 ($n=3; P=0.05$)。
Note: X: Mean ± Standard Error; Y: Duncan's new multiple range test ($n=3; P=0.05$).

表 2 三个品系丹参毛状根中水溶性酚酸类成分的含量比较

Table 2 Comparison of the contents of water-soluble phenolic acids in three strains of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots

品系 Strains	迷迭香酸 Rosemary acid (mg/g)	增大倍数 Increase multiples (与最低含量品系相比)	丹酚酸 B Salvianolic acid B (mg/g)	增大倍数 Increase multiples (与最低含量品系相比)
Ds1	82.045 ± 3.562 ^{XaY}	1.40	11.482 ± 0.438 ^c	-
Ds3	58.691 ± 1.311 ^b	-	21.087 ± 0.352 ^b	1.84
Ds4	75.976 ± 0.302 ^a	1.29	48.892 ± 0.235 ^a	4.26

注: X: 平均值 ± 标准误差; Y: 邓肯氏多重比较 ($n=3; P=0.05$)。
Note: X: Mean ± Standard Error; Y: Duncan's new multiple range test ($n=3; P=0.05$).

表 3 三个品系丹参毛状根脂溶性二萜类成分的含量比较

Table 3 Comparison of the contents of fat-soluble diterpenes in three strains of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots

品系 strains	丹参酮 I Tanshinone I (mg/g)	增大倍数 Increase multiples (与最低含量品系相比)	丹参酮 II _A Tanshinone II _A (mg/g)	增大倍数 Increase multiples (与最低含量品系相比)
Ds1	1.3520 ± 0.06201 ^{XbY}	6.29	0.4374 ± 0.0342 ^a	7.28
Ds3	1.8019 ± 0.0402 ^a	8.39	0.3214 ± 0.0107 ^b	5.35
Ds4	0.2148 ± 0.0075 ^c		0.0601 ± 0.0043 ^c	

注: X: 平均值 ± 标准误差; Y: 邓肯氏多重比较 ($n=3; P=0.05$)。
Note: X: Mean ± Standard Error; Y: Duncan's new multiple range test ($n=3; P=0.05$).

由此可见,三个优良丹参品系毛状根合成次生代谢产物的能力存在差异显著,但综合评比,四类化合物的合成各品系之间各有优势,可根据具体生产需要选择由 Ds1、Ds4 生产迷迭香酸,由 Ds4 生产丹酚酸 B, Ds3 生产丹参酮 I, 由 Ds1 生产丹参酮 II_A。

3 讨论

丹参环境适应性强,资源分布广泛,我们南北都有野生资源及人工栽培,有研究发现丹参不同居群之间存在较高的多态性及丰富的遗传多样性,作为

道地药材,不同产地丹参的药用成分含量差别很大,严重影响丹参药材质量的稳定性^[8,9]。如果不同遗传背景丹参材料的毛状根诱导效应存在较大差异,将对丹参毛状根技术的实际应用造成困难。本试验对七个不同遗传背景的丹参无菌苗,利用根瘤农杆菌 C58C1 诱导,建立了毛状根诱导体系,进而比较其丹参毛状根诱导率、生长速率、有效成分含量等诱导效应,结果表明不同品系的丹参材料其毛状根诱导效应均存在差异,其中 Ds2 的诱导率最低,与诱导率最高的 Ds4 相差达 20 倍;比较诱导率较高的 6 个不同品系丹参毛状根的生长速率,其中 Ds3 生长率最高,与 Ds1、Ds4 差异不明显,但与 Ds5、Ds6、Ds7 之间存在显著差异;比较生长速率较高的 Ds1、Ds3、Ds4 三个品系的毛状根有效成分含量,也存在差异,且各有优势。通过试验首次验证了不同遗传背景的丹参材料,其毛状根的诱导效应存在差异,其差异大小可能与各品系丹参材料的遗传差异性有关,需要进一步验证。

有研究者发现,不同产地丹参水溶性酚酸类化合物差异较小,脂溶性丹参酮类化合物差异显著^[4]。本试验也发现丹参毛状根合成的四类化合物中,不同品系之间存在的差异不同,其中水溶性酚酸类化合物的差异较小,脂溶性二萜类化合物的差异较大,说明产地不同对丹参毛状根次生代谢产物的影响作用也有一定差异。

综上,要促进丹参毛状根的工业化应用,应选择诱导效应高的丹参品系建立良好的毛状根培养体系,才能高效生产丹参有效成分。本试验综合评价了 7 个不同品系丹参毛状根的诱导效应后,最终筛选出了适宜丹参毛状根高效发酵生产的 3 个优良丹参品系 Ds1、Ds3、Ds4,并发现生产不同的有效成分可选用不同的丹参品系,生产迷迭香酸选用 Ds1、Ds4,生产丹酚酸 B 选用 Ds4,生产丹参酮 I 选用 Ds3,生产丹参酮 II_A 选用 Ds1,为丹参毛状根技术的进一步推广应用提供实验依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the people's republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 70-71.
- 2 Hu ZB, Alfermann AW. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32: 690-703.
- 3 Chen H, Chen F, Zhang YL, et al. Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Ind Microbiol Biot*, 1999, 22: 133.
- 4 Zhao HZ (赵洪芝). Study on quality evaluation method of *Salvia miltiorrhiza* and the quality of *Salvia miltiorrhiza* from different habitats [D]. Tianjin: Tianjin university (天津大学), 2006.
- 5 Guo BL (郭宝林), Feng SX (冯毓秀), Zhao YJ (赵杨景), et al. Review of germplasm resources studies on *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27: 492-495.
- 6 Wang C (王晨), Li J (李佳), Zhang YQ (张永清). Research progress of germplasm resources and breeding of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2012, 14: 37-42.
- 7 Zhang LL (张琳琳), Wang C (王淳), Song ZQ (宋志前), et al. Simultaneous determination of tanshinone II_A, tanshinone I, cryptotanshinone and dihydrotanshinone I in *Salviae albae radix* by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21: 62-65.
- 8 Wang B (王冰), Zhang Y (张勇), Chen CB (陈成彬), et al. Analysis on genetic diversity of different *Salvia miltiorrhiza* geographical populations in China [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32: 1988-1991.
- 9 Wen CX (温春秀), Wu ZM (吴志明), Tian W (田伟), et al. AFLP analysis of genetic diversity of *Salvia miltiorrhiza* bge [J]. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2007, 22: 122-125.