

· 综述 ·

丹参组织培养研究进展

单成钢^{1,2}, 王志芬^{1,2}, 苏学合^{1,2}, 闫树林^{1,2}, 孙宏春²

(1. 山东农业科学院中草药核技术与航天育种研究中心, 山东 济南 250100;

2. 山东农业科学院原子能农业应用研究所, 山东 济南 250100)

摘要:本文综述了国内外丹参组织培养的研究进展, 包括离体培养增殖丹参试管苗、人工诱导丹参多倍体、组织培养物中有效成分产生、农杆菌介导丹参的转化等内容, 力图阐述丹参组织培养技术的研究现状和应用前景。

关键词:丹参; 组织培养; 农杆菌; 转化

中图分类号: S567

文献标识码: A

文章编号: 1673-6427(2007)03-0054-04

Study Advance in *Salvia miltiorrhiza* Tissue CultureSHAN Cheng-gang^{1,2}, WANG Zhi-fen^{1,2}, SU Xue-he^{1,2}, YAN Shu-lin^{1,2} SUN Hong-chun²

(1. Research Center for Nuclear Technique and Space Breeding of Chinese Herb, Shandong Academy of

Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. Institute for Application

of Atomic Energy, Shandong Academy of Agriculture Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: This paper reviewed the advance in tissue culture of *Salvia miltiorrhiza* in the world, including in vitro culture and plantlet regeneration of *S. miltiorrhiza*, induction of polyploidy, production of active compounds by cell culture and transformed organs culture, obtainment of transformed plants of *S. miltiorrhiza* and so on. The situation and prospect of tissue culture studies on *S. miltiorrhiza* were also described.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; tissue culture; agrobacterium; transformation

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科鼠尾草属多年生草本植物, 以干燥根及根茎入药, 是我国传统大宗药材, 具有祛瘀止痛, 活血通经, 清心除烦之功效。临床上用于月经不调, 经闭痛经, 癥瘕积聚, 胸腹刺痛, 热痹疼痛, 疮疡肿痛, 心烦不眠, 肝脾肿大, 心绞痛^[1]。自上世纪 70 年代以来, 临床上主要用于治疗冠心病、心绞痛、心肌梗塞等心血管疾病^[2]。由于大量采挖和生态环境的改变, 野生丹参资源逐渐减少, 远远不能满足人们需求。临床上常

以人工栽培丹参替代野生丹参, 但由于长期人工栽培生产中只种不选, 品种退化、混杂严重, 药材产量和质量下降。利用组织培养技术改良丹参品质、提高丹参产量, 利用细胞、器官培养直接获得丹参的有效成分, 是目前解决丹参栽培中面临的问题和进行质量控制的有效途径。本文综述了国内外丹参组织培养的主要研究成果, 为丹参资源的进一步可持续利用提供参考依据。

1 离体培养丹参试管苗的增殖

利用组织培养技术, 首先获得愈伤组织和植物细胞, 在一定的条件下进行培养, 使植物细胞分化为植株^[3]。可以快速有效地进行植物繁殖, 并且不受地理环境和气候条件的影响。

1991 年, 蔡朝晖等^[4]报道不同的外植体最适的基本培养基有所不同。其中以 B5 培养基萌发腋芽

收稿日期: 2006-10-31

基金项目: 山东省良种产业化工程项目和山东农科院博士基金项目资助

作者简介: 单成钢(1970-), 博士, 副研究员, 主要从事药用植物遗传改良与规范化种植研究。Tel: 0531-83179290, E-mail: shanchenggang@126.com

和产生丛生芽比例较高,效果较好。以叶为外植体则以 MS 为基本培养基时诱导丛生芽最快,可以达到快速繁殖的目的。有的学者^[5,6]采用 67-V 培养基配方,在添加蔗糖、琼脂和生长调节剂的条件下也能产生愈伤组织。

大量研究集中在植物生长调节剂对组织培养各阶段的调节作用,如 2,4-D 对丹参不同外植体愈伤组织均有较强的诱导作用,2,4-D 和 6-BA 搭配可使丹参茎、叶的愈伤组织的诱导率最高^[7]。NAA 对诱导愈伤组织也具有较强的作用,但不及 2,4-D 效果明显^[8]。比较三种细胞分裂素对丹参叶片脱分化率的影响得出:4PU-30 > 6-BA > KT,4PU-30 的诱导效率达到后二者的 10 倍以上^[9]。在研究生长调节物质对诱导芽分化的效应中,细胞分裂素低浓度促进芽形成,而较高浓度则有一定的抑制作用。2,4-D 和 NAA 均不利于芽的产生^[4,10],而且发现 2,4-D 对 6-BA 诱导形成芽有拮抗作用^[9]。冯玲玲等确定了诱导初代培养的芽产生大量丛生芽的最佳培养基和最佳增殖培养基,以及诱导大量不定芽的最佳培养基和最佳增殖培养基^[11]。低浓度的 IBA 有促进生根的作用,不添加任何生长素也能取得 70% 左右的生根效果^[4]。适量 6-BA 能解除 2,4-D 对愈伤组织根分化的抑制作用^[9]。

另外,2005 年,客绍英等比较了不同温度、不同 pH 值对愈伤组织诱导的影响,确定以 MS 为基本培养基,温度 25℃,pH 5.8 对丹参茎尖愈伤组织的诱导效果最好^[12]。赵洁等进一步研究了不同光质和温度对丹参叶片丛生芽形成的影响^[13]。冯玲玲等以丹参幼嫩叶片为外植体进行诱导,测定了在黑暗和光照条件下愈伤组织培养增殖过程中的生长曲线,并测定了其中可溶性蛋白含量、过氧化物酶活性(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化,表明在光照条件下细胞生长和分化速度较快^[14]。

2 丹参多倍体的人工诱导

药用植物多倍体一般具有根、茎、叶、花、果实的巨型性,抗逆性强,有效成分含量高特性,这正是药材优质、高产育种所希望达到的目标。

高山林等报道,在组织培养条件下添加 10 ~ 50 ppm 秋水仙碱,是诱发丹参多倍体的行之有效的办法。对试管苗根尖染色体进行显微鉴定,确证所获得的多倍体为同源四倍体。进一步进行了移栽、田间农艺性状初步鉴定和主要化学成分测定。结果表

明所获四倍体植株均不同程度表现出多倍体植株的典型特征,主要化学成分含量亦大多高于原植株^[15,16]。进一步育成的多倍体新品系 61-2-22 的有效成分明显高于其它产地丹参的有效成分含量;初步药理试验结果表明,61-2-22 具有更好的药理活性^[17]。

将类似的染色体加倍方法应用于南丹参 *Salvia bowleyana* 的多倍体研究,以 15 mg/L 秋水仙碱处理叶片和愈伤组织可使加倍率达 33.33%,且多为整株加倍,应用过氧化物酶和酯酶同功酶技术分析表明,变异植株与未加倍植株同功酶谱存在明显差异,并对变异加倍的南丹参作了初步鉴定和筛选^[18]。

3 丹参组织培养物中有效成分的生成

丹参主要含两类有效成分:一为脂溶性的二萜醌类化合物丹参酮 I、丹参酮 II A、丹参酮 II B、隐丹参酮等;二为水溶性的多聚酚酸类成分原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸等。和从植物中提取分离这些物质相比,植物组织培养生产有效成分、次级代谢产物具有产率、缩短周期、提高产品质量等优点。

黄秀兰等初步确定丹参愈伤组织中含有活性成分原儿茶醛和白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge var. *alba* C. Y. Wu et H. W. Li 的愈伤组织中含有多种二萜醌类化合物^[19]。日本学者 Nakanishi 等在固定培养基上建立的 6 个丹参细胞系,其中只有一个细胞系(A)可产生两种萜类物质隐丹参酮和铁锈醇,其它细胞系(B-F)仅产生可观数量的铁锈醇^[20]。

Miyasaka 等 1985 年用细胞系 B 进一步研究了铁锈醇的生产,2,4-D 能促进细胞生长却显著抑制铁锈醇的产生。而 IAA 则能促进铁锈醇的生产,却不能促进细胞生长^[6]。从细胞系 B 获得了一个驯化细胞系,其生长仅需激动素,不需要 2,4-D,但铁锈醇只在延迟期产生,并非在整个培养期间一直增加,当向悬浮培养物中加入蔗糖后,在静止期也恢复了铁锈醇的生产^[21]。Miyasaka 等在丹参细胞固定化培养研究中,发现固定化培养细胞可连续产生隐丹参酮和铁锈醇。约 74% 隐丹参酮分泌到培养基中,仅有约 38% 的铁锈醇分泌到培养基中,大约 47% 的铁锈醇则留在细胞中。固定化培养产生的隐丹参酮和铁锈醇分别为悬浮培养细胞的 39% 和 61%。随着固定化细胞使用次数的增多,次生代谢物的合成能力逐渐下降,其原因并不是因为固定细

胞的死亡,可能是积累亲脂性代谢物引起的负反馈效应^[22],这说明连续培养对生产隐丹参酮和铁锈醇的效率并不高。1987 年 Miyasaka 等报道了营养元素对隐丹参酮和铁锈醇生产的影响。研究表明,MS 培养基中大多数成分对生产隐丹参酮和铁锈醇是非必需或有抑制作用的,其中蔗糖、氮源和硫胺素(VB₁)对这些化合物的产生是必需的,磷酸盐、Mn-SO₄和激动素表现出轻微的有益影响。据此设计出一种简化的隐丹参酮生产培养基^[23]。

1991 年 Shimomura 等报道了丹参不定根培养物中丹参酮的生产和丹参苗的再生。不定根培养在 B₅ 附加 IBA0.5 的液体培养基上生长缓慢,但丹参酮含量高,超过 80 mg/g 干重,是原植物根中丹参酮含量的 6 倍。朱蔚华等通过诱变、驯化与选择,获得含丹参酮的红色愈伤组织的新无性系,在无性系组织培养物中,总丹参酮含量存在着差异,最高含量可达 5.07%,比原植物丹参药材中高 3.6 倍^[24]。

王康才等^[25]将丹参外植体培养在含不同激素配比的诱导培养基上,并对其愈伤组织中所含次生代谢产物进行分析,结果表明 2,4-D 抑制水溶性总酚的形成,KT 能提高总丹参酮的含量。胡月红等^[26]证实从丹参的根、茎、叶、叶柄等部位诱导的愈伤组织中均含有因丹参酮、丹参酮 I A、丹参酮 II A,他们的百分含量及产率以根诱导的愈伤组织中为最高,达原植物的 4.1 倍。陶璐璐等^[27]用海藻胶包埋丹参愈伤组织细胞,在 LS + KT 0.1 + NAA 培养液中常温震荡培养一个月左右,对培养液抽提物进行 TLC 和 HPLC 分析,表明该系统可连续分泌丹参的主要成分为丹参酮和隐丹参酮。另外通过比较认为固定化细胞的稳定性、产量的含量以及下游工艺的可行性等明显优于悬浮细胞培养。束昱等^[28]从丹参组织培养物中首次分离得到 2 个二萜类成分,经理化常数测定、光谱分析,确定为丹参新醌乙和 Ro-09-0680。

4 农杆菌介导丹参转化组织培养与活性成分的产生

农杆菌遗传转化方法具有简单易行,成本低,转化率高,拷贝数少,遗传表达稳定性较好的优点,是一种很有潜力的转化方法。在丹参研究中,利用转化的组织和器官培养生产丹参中的活性成分是近年来丹参组织培养的新亮点。

1993 年, Hu 等用不同发根农杆菌菌株感染无

菌苗建立了丹参的毛状根培养方法,经 HPLC 分析表明,毛状根和培养基均含有七个主要的丹参酮和铁锈醇成分,毛状根株系在不含铵盐的 MS 培养基上培养总丹参酮含量大于 43 mg/g 干重,其中隐丹参酮含量为 20 mg/g 干重^[29]。1995 年,张荫麟等在丹参毛状根培养过程中,研究了 4 种真菌诱导子对毛状培养物中丹参酮含量的影响,证实蜜环菌诱导效果最好,并能促使丹参毛状根向培养基中分泌红色色素,经 TLC 分析红色色素是隐丹参酮^[30]。2006 年,晏琼等利用生物诱导子 yeast extract 和不同的非生物诱导子组合不仅可以有效地提高丹参毛状根生产个丹参酮的能力,而且各诱导子组合表现出了对不同丹参酮的诱导选择性。诱导子之间发生协同作用的可能原因是那些非生物的成分激活了毛状根的系统抗性,诱发根处于易感染状态,此时受到生物诱导子的刺激时,毛状根内一系列与细胞病原反应相关的生理生化过程被强化,次生代谢途径活化程度被提高,次生代谢物或植保素等防御性物质积累量增加。而不同诱导子组合之间的诱导选择性可能是由于不同诱导子对次生代谢合成途径的作用位点不同所致^[31]。1997 年,张荫麟等用发根农杆菌和根癌农杆菌感染丹参无菌苗,完成质粒转化后诱导出毛状根和冠瘿瘤^[32]。1999 年,应佩青等研究了丹参冠瘿组织悬浮培养过程的培养特性及细菌的生长和丹参酮的合成规律,并建立了丹参冠瘿组织生长、底物消耗和产物积累的分相动力学模型,模型计算结果与实验值吻合较好^[33]。1997 年,黄炼栋等^[34]用发根农杆菌诱导丹参叶片形成毛状根,经 HPLC 分析,证实其中含有原儿茶醛、丹酚酸 A、丹酚酸 B 等酚酸类活性成分,其中丹酚酸 A 的含量为生药的 2.17 倍。宋经文等^[35]通过实验研究了丹参冠瘿组织株系在不同培养基上的生长曲线及总丹参酮的积累动态的规律性,给采取适当调控措施获取最大量的活性成分提供了依据。

5 结论与展望

综上所述,利用组织培养技术对保存丹参稀有种质、快速繁殖、多倍体育种、单倍体育种以及与其它遗传改良技术结合创新种质等方面具有重要的实践意义。随着生物技术的深入研究,组织培养技术将作为其不可或缺的一个技术环节而得到进一步发展。由于农杆菌转化和诱导子技术的应用,通过丹参组织和器官进行有效成分的人工大规模工业化生

产显示出巨大的发展潜力。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005. 53.
- [2] 徐任生. 丹参生物学及其应用[M]. 北京:科学出版社,1990, 158.
- [3] 张颖,夏锦明,康廷国. 丹参细胞培养工程的研究概况[J]. 中医药学刊,2005,23(8):1450-1451.
- [4] 蔡朝晖,高山林,徐德然. 丹参组织培养快速繁殖技术的研究[J]. 中国药科大学学报,1991,22(2):65-68.
- [5] 朱蔚华,胡秋,朱兆仪,等. 丹参组织培养研究[J]. 中药材,1994,17(4):3-5.
- [6] Miyasaka H, Nasu M, Yamamoto T, et al. Production of ferruginol by cell suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1985, 24(9):1931-1933.
- [7] 柳福智,董娟娥,梁宗锁. 不同生长调节物质对丹参愈伤组织的诱导效应[J]. 中国农学通报,21(11):202-204,275.
- [8] 田宇红,王喆之. 丹参组织培养及植株再生研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2003,31(1):99-102.
- [9] 梁红,何宇清,赵洁. 生长调节物质对丹参叶片脱分化及根芽分化的效应[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),1997,31(3):328-331.
- [10] 解晓红,李江辉,冯文龙,等. 丹参组培快繁技术研究[J]. 中药材,2004,27(7):474-475.
- [11] 冯玲玲,周诗毅,范美华,等. 不同生长调节剂对丹参快速繁殖的影响[J]. 中国野生植物资源,2004,23(6):54-57.
- [12] 客绍英,石洪波,马作东,等. 利用正交试验优化丹参愈伤组织培养[J]. 中药材,28(2):82-83.
- [13] 赵洁,陈志胜,万钧. 丹参叶片无性系快速繁殖及植株再生研[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),1999,33(1):108-111.
- [14] 冯玲玲,周诗毅,杨春艳,等. 黑暗和光照对丹参培养细胞生长和生理生化特性的影响[J]. 生物学杂志,2005,22(2):24-26.
- [15] 高山林,徐德然,蔡朝晖,等. 丹参同源四倍体新物种的培育[J]. 中国药科大学学报,1992,23(4):224-228.
- [16] 艾建国,高山林. 丹参同源四倍体的诱导、鉴定及有效成分的含量测定[J]. 药物生物技术,2003,10(6):372-376.
- [17] 朱丹妮,高山林,卞云云,等. 丹参四倍体优良品系有效成分的含量测定及药理学试验[J]. 植物资源与环境学报,2001,10(2):7-10.
- [18] 段英姿,客绍英,曹静,等. 秋水仙碱诱导南丹参多倍体的研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(3):445-448.
- [19] 黄秀兰,杨宝津,黄慧珠,等. 丹参愈伤组织中二萜醌成分的初步研究[J]. 药学通报,1981,16(9):22-30.
- [20] Nakanishi T, Mivasaka H, Nasu M, et al. Production of cryptotanshinone and ferruginol in cultured cells of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(3):721-722.
- [21] Miyagka H, Nasu M, Yamamoto T, et al. Regulation of ferruginol and cryptotanshinone biosynthesis in cell suspension cultures of *salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1986, 25(3):637-640.
- [22] Miyagka H, Nasu M, Yamamoto T, et al. Production of cryptotanshinone and ferruginol by immobilized cultured cells of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1986, 25(7):1621-1624.
- [23] Miyagka H, Nasu M, Yamamoto T, et al. Effect of nutritional factors on cryptotanshinone and ferruginol production by cell suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1987, 26(5):1421-1424.
- [24] Shimomura K, Kitazawa T, Okamura N, et al. Tanshinone production in adventitious roots and regenerates of *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Nat Prod, 1991, 54(6):1583-1587.
- [25] 王康才,罗庆云,陈红霞. 丹参愈伤组织中次生代谢产物形成的研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(10):592-594.
- [26] 胡月红,张瑞,胡之璧,等. 丹参愈伤组织的培养及其有效成分(简报)[J]. 植物生理学通讯,199228(6):424-425.
- [27] 陶璐璐,袁静明,徐锦堂. 丹参愈伤组织细胞固定化及其转化产物的特征[J]. 生物工程学报,1990,6(3):218-223.
- [28] 束昱,朱蔚华,胡秋. 丹参组织培养物种二萜类成分的研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(3):166-167.
- [29] Hu ZB, Alfermann AW. Diterpenoid production in hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1993, 32(3):699-703.
- [30] 张荫麟,宋经元,吕桂兰,等. 丹参毛状根培养的建立和丹参酮的产生[J]. 中国中药杂志,1995,20(5):269-271.
- [31] 晏琼,胡宗定,吴建勇. 生物与非生物诱导子协同作用对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J]. 中国中药杂志,2006,31(3):188-191.
- [32] 张荫麟,宋经元,祁建军,等. 农杆菌转化后丹参植株再生[J]. 中国中药杂志,1997,22(5):274-275.
- [33] 应佩青,许建峰,苏志国. 丹参冠瘿组织培养特性及培养动力学研究[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(5):478-482.
- [34] 黄炼栋,胡之璧,刘涤. 丹参毛状根中水溶性酚酸类化合物的产生(简报)[J]. 植物生理学通讯,1997,42(3):259-261.
- [35] 宋经元,祁建军,雷和天,等. 蜜环菌诱导子对丹参冠瘿组织积累丹参酮的影响[J]. 植物学报,2000,42(3):316-320.