

何首乌毛状根培养及其活性成分的产生

王 莉¹ 于荣敏^{1*} 张 辉¹ 程克棣²

¹(沈阳药科大学生物技术研究室,沈阳 110016)

²(中国医学科学院药物研究所生物合成实验室,北京 100050)

摘 要 利用发根农杆菌 LBA9402 诱导药用植物何首乌产生毛状根。PCR 扩增和 Southern 印迹杂交实验证实发根农杆菌中 Ri 质粒的 T-DNA 片段已整合进入植物核基因组中。经过基本培养基的筛选和毛状根生长动力学的考察,确立了何首乌毛状根在 MS 培养基中的最佳继代时间为 30d 左右。HPLC 实验测定结果显示,毛状根培养物中大黄酸的含量是原植物的 2.85 倍。

关键词 何首乌,发根农杆菌,毛状根培养,蒽醌类化合物

中图分类号 Q945 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0069-05

药用植物何首乌,又名首乌,赤首乌,为蓼科植物何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 的干燥块根。具有解毒、消疮痍、润肠通便等功能^[1]。现代药理学研究表明,何首乌具有抗衰老、抗菌和增强机体免疫功能等作用,其中蒽醌类成分具有上皮生长因子受体酪氨酸蛋白激酶抑制剂活性,是目前抗癌药物研究的热点之一^[2]。

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 中含有致使植物产生毛状根的 Ri 质粒,在 vir 区基因产物协助下,Ri 质粒中的 T-DNA 片段转移进植物核基因组中,就导致了毛状根的大量出现^[3]。毛状根具有生长迅速、生长和遗传稳定、以及在无激素的培养基上生长等特点,它能够合成与原植物含量相当或高于原植物含量的次生代谢产物。

1 材料与方 法

1.1 何首乌毛状根的诱导

1.1.1 诱导材料的选择与培养:何首乌带芽茎切段,经 0.1% HgCl₂ 消毒后,用无菌水冲洗干净,无菌滤纸擦干,置于无激素的 MS 固体培养基上。2 星期后从芽尖处长出新的幼嫩的无菌小植株。分别将小植株的叶柄、茎切成 1.5cm 长的小段,叶片在垂直于叶脉处刻痕,造成伤口。以上用于毛状根诱导的外植体。

1.1.2 菌种的保藏与活化培养:发根农杆菌

LBA9402 在 YMB 培养基中 4℃ 斜面保存。感染前划线接种在 YMB 固体培养基上,27℃ 培养 24h,活化 2~3 次后,挑取单菌落转接在 YMB 液体培养基中,27℃,110r/min 振荡培养 16h,即可用于毛状根的诱导。

1.1.3 毛状根的诱导:用接种感染法转化何首乌外植体。叶、叶柄、茎与活化好的菌液共培养 20min,取出,无菌水冲洗 3 次,无菌滤纸擦干后置于 MS 固体培养基上,25℃,暗培养。待根长到 1.5cm 左右时,从外植体上切下,转移至含 500mg/L 头孢噻肟钠的 MS 固体培养基上除菌,每 7d 重复操作 1 次,3 次后转移到无抗生素的 MS 液体培养基中以建立毛状根离体培养体系。

1.2 何首乌愈伤组织的诱导及培养

切取何首乌无菌小植株的叶片,接种在含 NAA 1.0mg/L,KT 0.1mg/L 的 MS 固体培养基上,25℃,暗培养。2 周后在叶片伤口处产生愈伤组织。将愈伤组织从叶片上切下,在相同的培养基上培养,每 3 周继代一次。

1.3 何首乌毛状根的鉴定

1.3.1 PCR 扩增:按 CTAB 法提取植物基因组总 DNA^[4],碱解法提取质粒 DNA^[5]进行 PCR 扩增。阳性对照为质粒 DNA 扩增产物,阴性对照为无菌小植株 DNA 扩增产物。PCR 扩增产物为 862bp 片段的序列。扩增反应条件为 94℃ 10min 1 个循环,94℃

1min, 50℃ 1min, 72℃ 1min 30 个循环, 最后 72℃ 10min 1 个循环。

1.3.2 Southern 杂交:植物 DNA 及质粒 DNA 的提取方法同上, 以何首乌无菌小植株 DNA 为阴性对照, 质粒 DNA 为阳性对照, 分别经 *EcoR* I 和 *Hind* III 完全酶切后进行 Southern 杂交。以质粒 DNA 的 PCR 产物为探针, 采用辣根过氧化物酶的生物素标记法标记该探针。预杂交、杂交、洗膜及显影均按 ECL DNA labelling & detection systems 试剂盒提供的方法进行。

1.4 何首乌毛状根基本培养基的筛选及生长动力学考察

1.4.1 基本培养基的筛选:将由 LBA9402 诱导产生的毛状根优良离体培养体系 PC9e, 分别继代于 MS、1/2MS、B₃ 和 White 液体培养基中。250mL 三角瓶中装培养液 100mL, 25℃, 100r/min 条件下暗培养 40d, 测定毛状根的鲜重增长率, 其计算公式为:

$$\text{增长倍数 (g/g)} = (\text{收获后鲜重} - \text{接种鲜重}) / \text{接种鲜重}$$

1.4.2 生长动力学考察:将毛状根优良离体培养体系 PC9e 继代于优化的 MS 液体培养基中。在 100mL/250mL 的三角瓶中, 接种鲜重为 2.00g 1.5cm 左右的毛状根, 25℃, 100r/min 条件下暗培养 40d, 每 5d 取一次样, 每次至少取 3 瓶。将收获后的毛状根经过滤称鲜重, 50℃ 烘干后称干重, 滤液直接用于 pH 和蔗糖、NH₄⁺、NO₃⁻、PO₄³⁻ 的测定, 分别取平均值, 制成代谢曲线。蔗糖、NH₄⁺、NO₃⁻、PO₄³⁻ 的测定分别采用苯酚-浓硫酸法^[6], 苯酚-次氯酸盐法^[7]、水杨酸-浓硫酸法^[8] 和磷钼蓝法^[9]。

生长曲线中的计算公式:

$$(1) \text{相对生长速率} = 1/T \lg W_2 / W_1 (d^{-1}) \quad T: \text{生长时间 (d)}; W_2: \text{收获重量 (g)}; W_1: \text{接种量 (g)}$$

$$(2) \text{消耗速率} = \text{消耗量} / \text{消耗天数 (g/L} \cdot \text{d)}$$

1.5 蒽醌类化合物的 HPLC 检测

1.5.1 总蒽醌类化合物的提取:称取干燥至恒重的无菌小植株、愈伤组织以及毛状根各 2.00g, 用滤纸包好, 分别在 100mL 4mol/L H₂SO₄ 中浸泡过夜, 除去酸水层后, 原材料用蒸馏水洗至中性, 置于索式提取器中, 90℃ 150mL 氯仿回流 6h, 回收氯仿即得总蒽醌类成分。样品经提取后, 甲醇溶解备用。

1.5.2 HPLC 色谱条件:色谱柱: ODS-C₁₈ 柱 4.6 × 250mm; 流动相: 82% 甲醇 + 0.2% 磷酸; 流速: 0.9mL/min; 检测波长: 289nm; 柱温: 室温; 进样量: 20μL。

1.5.3 测定与分析:在以上色谱条件下, 用 HPLC 测定各样品的峰面积, 以外标工作曲线法根据回归

方程式计算大黄酸、大黄的含量。

2 结果与分析

2.1 何首乌毛状根的诱导及培养

无菌小植株不同部位与发根农杆菌 LBA9402 共培养 5d 后, 叶脉处的愈伤组织上长出白色的毛状根, 毛状根根毛多而密, 向上生长。感染 10d 后, 叶柄和茎的形态学下端也有根长出。没有感染菌的外植体 20d 后从伤口处褐化, 直至最后死亡。不同部位对毛状根诱导率的影响见表 1。

表 1 何首乌无菌苗不同部位毛状根的诱导率

Table 1 Inductive rates of hairy root for different parts of aseptic seedling

Explants	Number of inoculum	Number of induction	Rate of induction/%
Stems	30	14	46.7
Leaves	30	30	100
Petioles	30	20	66.7
Control (stems, leaves, petioles)	30	0	0

由表 1 可知, 无菌小植株叶的诱导率最高, 达到 100%, 其诱导的根较粗, 向地性明显, 且培养后期根尖的生长点变为黑色。叶诱导率高的原因是因为它属于比较幼嫩的器官, 在感染农杆菌后, 感受态细胞较其它部位增多, 从而易于进行遗传转化。

当诱导产生的毛状根长到 1.5cm 左右时, 从外植体上切下进行除菌。在加 500mg/L 头孢噻肟钠的 MS 培养基中连续除菌 3 代后, 农杆菌基本被除尽。转入无抗生素的培养基上继续培养, 毛状根能够逐渐恢复其快速、稳定繁殖的特性。经除菌, 筛选得到毛状根优良离体培养品系 PC9e。

2.2 毛状根的鉴定

经 PCR 扩增和 Southern 杂交证实, 由 LBA9402 诱导的毛状根整合了 Ri 质粒的 T-DNA 片段, 而未转化的原植物材料中没有扩增条带和杂交斑点出现。鉴定结果如图 1, 2 所示。

2.3 毛状根基本培养基的筛选及生长动力学考察

2.3.1 基本培养基的筛选:由图 3 可知, 不同的基本培养基对毛状根生物量的累积有不同的影响。其中, 毛状根在 MS 培养基中的增长倍数最高, 40d 收获时达到 11.03 倍。4 种培养基中 B₃、White 和 1/2MS 均属于低盐浓度培养基, 而 MS 是高盐浓度的培养基。由此可知何首乌毛状根适合在高盐浓度的

培养基上生长。这可能是因为生长旺盛的根器官需要更充足的营养供应。

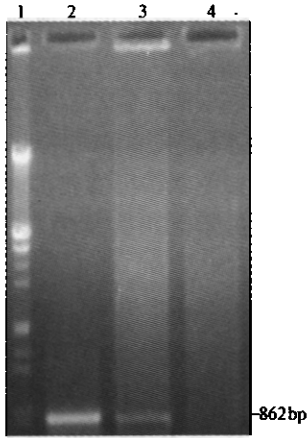


图1 毛状根的 PCR 扩增图谱

Fig.1 PCR amplification of hairy root cloned genome

- 1. Molecular weight marker λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III ;
- 2. PCR product of plasmid of LBA9402;
- 3. PCR product of hairy root induced with LBA9402;
- 4. PCR product of natural plant

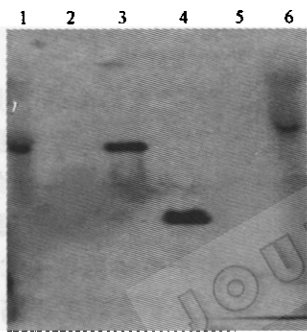


图2 毛状根的 Southern 杂交图谱

Fig.2 Southern blot hybridization result of the transformed roots

- 1. Digested hairy root with *Eco*R I ;
- 2. Digested natural plant (Pm) with *Eco*R I ;
- 3. Digested plasmid of LBA9402 (pL9) with *Eco*R I ;
- 4. Digested pL9 with *Hind*III ; 5. Digested Pm with *Hind*III ;
- 6. Digested hairy root with *Hind*III

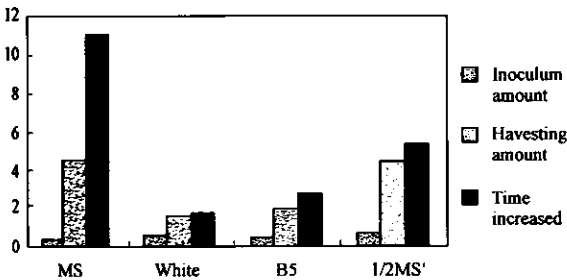


图3 比较毛状根在不同培养基中的增长倍数

Fig.3 Comparison of growth times of hairy root in different media

2.3.2 毛状根的生长动力学曲线:由图4毛状根生物量的累积和蔗糖的消耗代谢曲线可知。何首乌毛

状根呈缓慢上升式的“S”型曲线,迟滞期较长,25d后才进入对数生长期,35d后进入稳定期。鲜重和干重的加倍时间大致相同,它们的相对生长速率分别为 $0.024d^{-1}$ (鲜重)和 $0.022d^{-1}$ (干重)。由此确定毛状根较适合的继代时间为 30 ~ 35d 之间。

在各种营养元素的消耗代谢中,蔗糖的消耗代谢是比较缓慢的。最初蔗糖浓度为 28.3g/L,到 40d 结束生长时仍有 1.8g/L 的剩余,其平均消耗速率为 $0.66g/L \cdot d$ 。蔗糖的这种缓慢利用方式是与毛状根生物量的累积密切相关的,当生物量急剧增加时,也正是蔗糖的快速消耗期。

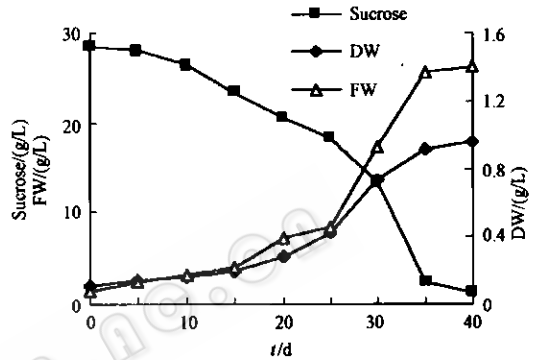


图4 何首乌毛状根生长量的累积和蔗糖的消耗代谢曲线
Fig.4 Time course of hairy root growth of *P. multiflorum* and sucrose consumption

PO_4^{3-} 作为细胞合成和分解代谢过程中能量的来源,它的利用较彻底,25d 之内就全部消耗完;而 30d 之后,又有微量的 PO_4^{3-} 检出,这可能是因为在毛状根中的有机成分在酸性磷酸酯酶的作用下,释放 PO_4^{3-} 的缘故^[10]。毛状根在整个生长过程中,pH 始终在 3.8 ~ 5.2 之间波动,这种波动性说明培养基的缓冲能力较好,能够满足毛状根在生长过程中对酸碱度的需求。 PO_4^{3-} 的消耗代谢曲线和 pH 的变化曲线如图 5 所示。

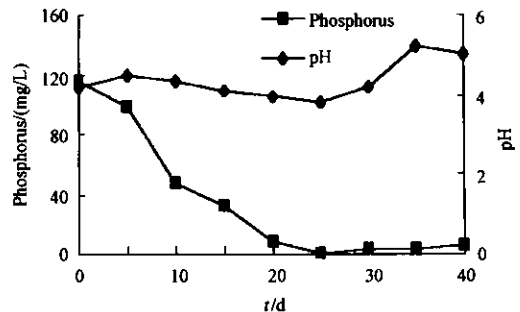


图5 PO_4^{3-} 消耗代谢曲线和 pH 的变化曲线
Fig.5 Time course of PO_4^{3-} concentration and pH value

NH_4^+ 与 NO_3^- 的消耗代谢曲线相比, NH_4^+ 的利用在最初 25d 之内比 NO_3^- 的利用要快, 而 NO_3^- 在 25~30d 之间还有大量消耗, 这说明毛状根在生长过程中优先利用氨态氮进行蛋白质的合成, 而硝态氮的利用则主要与硝酸还原酶与亚硝酸还原酶的活性有关。 NO_3^- 和 NH_4^+ 的消耗代谢曲线如图 6 所示。

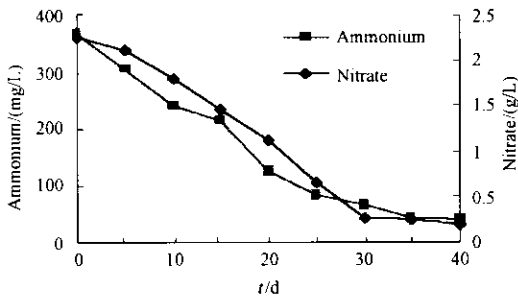


图 6 NH_4^+ 和 NO_3^- 的消耗代谢曲线

Fig. 6 Time course of ammonium and nitrate

2.4 毛状根、原植物及愈伤组织中大黄素、大黄素含量的测定

将收获后的何首乌毛状根、无菌小植株及愈伤组织烘干后, 在上述分析条件下检测大黄酸和大黄素的含量。测定结果如表 2 所示。

表 2 三种材料中大黄素、大黄酸含量的比较

Table 2 Content of rhein and emodin from three different materials ($\mu\text{g/g DW}$)

Materials	Emodin	Rhein
Hairy root	79.600	2.490
<i>Polygonium multiflorum</i> Thunb.	312.000	0.875
Callus	0.447	2.945

结果显示, 毛状根中大黄酸的含量为 2.49 $\mu\text{g/g DW}$, 是原植物的 2.85 倍, 与愈伤组织的含量相近; 大黄素的含量为 79.6 $\mu\text{g/g DW}$, 为原植物的 25.5%, 但仍为愈伤组织含量的 178.1 倍。

3 讨 论

本实验用含 pRiA4b 质粒的发根农杆菌 LBA9402 转化何首乌产生毛状根。毛状根的诱导率相对较高, 不仅无菌小植株叶的诱导率高达 100%, 而且叶柄和茎的诱导率也在 50% 左右。这表明何首乌对发根农杆菌 LBA9402 较敏感, 易于形成感受态细胞。

经 LBA9402 诱导产生的毛状根有明显的向地性、侧枝上的生长点逐渐变为黑色以及高度分枝的

特性。向地性使毛状根深深插入固体培养基中, 到 40d 结束培养时几乎将培养基全部消耗, 因此向地性不能作为转化根和正常根的区别; 高度分枝的出现不仅与毛状根生物量的高产有关, 有些还与植物的耐寒性和芳香性的增加有关^[11, 12]; 另外黑色生长点的出现似乎与蒽醌类化合物的释放相关, 常振战等曾报道, 天山大黄毛状根随着培养时间的增长, 发根颜色开始变黄, 提示天山大黄毛状根中积累了一定量的蒽醌类化合物^[13]。

毛状根优良离体培养体系 PC9e 在 MS 培养基中的增长倍数为 11.03 倍, 这虽然远远低于一些植物的毛状根培养(如金荞麦毛状根 3 周后增长了 1000 倍^[14], 曼佗罗毛状根 10d 内就增长了 80 倍^[15]), 但与人参的转化根相比^[16], 其增长倍数仍属正常。因此不同植物有不同的形态, 因而也就会有不同的生长状况。

本实验测定了何首乌毛状根中大黄素、大黄酸的含量, 并与原植物和愈伤组织中相应化合物的含量进行了比较。根据目前含量测定的结果, 可以推测, 如果改变一些外在的条件或加入某些特殊基因, 就可以使预期的化合物产量提高或产生原植物根中没有的化合物, 如 M. J. C. Rhode 等人通过加大外源生长素和生长分裂素的比例使茄科植物莨菪中天仙子胺的含量增加了 40%^[17]; Steven 等通过添加生物诱导子-酵母提取物和非生物诱导子 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} , 使烟草毛状根中烟碱的含量大幅度提高^[18]; 而 Victor 等用导入 rolC 基因的质粒 T-DNA 转化人参形成毛状根, 人参皂甙的含量是非转化根的 1.8~3.0 倍^[19]。另外通过诱导包括叶绿素在内的有光合活性的毛状根的生成, 则能够在有用物质的生成过程中连续供给其前体物质及糖类物质, 从而降低有用物质的生成成本^[20]。这些技术的成功使用将为提高何首乌毛状根中蒽醌类化合物的含量提供有益的借鉴。

REFERENCES(参考文献)

- [1] LI Y F(李玉芳), HE X H(何玄华). Progress on the study of *Polygonium multiflorum* Thunb. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 1997, 19(5): 37~38
- [2] SU W(苏玮), GUO Q(郭群). Progress on pharmacological development of *Polygonium multiflorum* Thunb. *Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药), 1997, 28(2): 119~121
- [3] Chilton M D, Tepfer D A, Petit A et al. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 1982, 295: 432~434

- [4] Clark M S *et al.* *Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual*. Beijing:China Higher Education Press, 1998
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [6] Dubois M. Colormetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal chem*, 1956, **24**: 235
- [7] Weatherburn M W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem*, 1967, **39**(8): 971 ~ 974
- [8] Hecht U, Mörth H. Factors controlling nitrate and ammonium in mustard *Isinapsis alba* seedling. *Physiol Plant*, 1990, **78**: 379
- [9] Chen P S, Toribara T Y, Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal chem*, 1956, **28**(11): 1756 ~ 1758
- [10] Endress R. *Plant Cell Biotechnology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag press, 1994
- [11] Sukhapinda K, Spivey R, Shahin E A. Ri-plasmid as a helper for introducing vector DNA into alfalfa plants. *Plant Molecular Biology*, 1987, **8**: 209 ~ 216
- [12] Pellegrineschi A, Damon J P, Valtorta N *et al.* Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Bio/technology*, 1994, **12**(1): 64 ~ 67
- [13] CHANG Z Z (常振战), SHEN X (沈昕), GUO D A (果德安) *et al.* Anthraquinone production in hairy root cultures of *Rheum wittrochii* Lundstr. *Journal of Beijing Medical University* (北京医科大学学报), 1998, **30**(5): 413 ~ 415
- [14] ZHANG Y L (张荫麟), LU G L (吕桂兰), ZHOU X H (周新华) *et al.* Study on hairy root cultures of *Fagopyrum cymosum*. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1992, **34**(8): 603 ~ 608
- [15] Dupraz J M, Christen P, Kapetanidis I. Tropane alkaloids in transformed roots of *datura quercifolia*. *Planta med*, 1994, **60**: 158 ~ 162
- [16] Yoshikawa T, Furiya T. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Report*, 1987, **6**: 449 ~ 453
- [17] Rhodes M J C, Parr A J, Giulietti A *et al.* Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, **38**: 143 ~ 151
- [18] Neill S J, Lenton J R, Wibberley M S. Elicitors in plant and microbial metabolism. *Biochemical society transactions*, 1994, **22**: 383 ~ 388
- [19] Bulgakov V P, Khodakovskaya M V, Labetskaya N V *et al.* The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry*, 1998, **49**(7): 1929 ~ 1934
- [20] Saito K, Yamazaki M, Murakoshi I. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. *Journal of Natural Products*, 1992, **55**(2): 149 ~ 162

Hairy-root Culture of *Polygonium multiflorum* Thunb. and the Production of Its Active Constituents-anthraquinones

WANG Li¹ YU Rong-Min^{1*} ZHANG Hui¹ CHENG Ke-Di²

¹(Laboratory of Biotechnology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

²(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100050, China)

Abstract Transformed hairy roots of *Polygonium multiflorum* Thunb. were obtained by the transformation of *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402. It was clearly demonstrated that T-DNA of *A. Rhizogenes* Ri plasmid was integrated into the cells of hairy roots by the experiments of PCR and Southern hybridization. Through the screen of basic medium and the research of growth curve of hairy roots, the optimum inoculum time was selected in 30 days or so in the optimum condition-MS medium. On the condition, the content of rhein was 2.85 folds higher in hairy roots than that of natural plants by means of HPLC.

Key words *Polygonium multiflorum* Thunb., *Agrobacterium rhizogenes*, hairy-root culture, anthraquinone