

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.04.006

# 铃铛子发根诱导体系及培养条件的优化<sup>①</sup>

赵凯辉<sup>1,2</sup>, 范雨芳<sup>1</sup>, 徐元江<sup>2</sup>,  
曹芳<sup>1</sup>, 兰小中<sup>2</sup>, 廖志华<sup>1</sup>

1. 西南大学 生命科学学院/三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 西藏农牧学院/西南大学-西藏农牧学院药用植物联合研发中心, 西藏 林芝 860000

**摘要:** 铃铛子(*Anisodus luridus*)是西藏特有的托品烷生物碱药源植物. 利用农杆菌 C58C1(pRiA4)侵染铃铛子不同器官考察发根诱导频率, 并考察了 7 种培养基(1/2MS, MS, 1/2B5, White, WPM, B5 和 N6)对发根生物量和托品烷生物碱质量分数的影响. 真叶和茎段的发根诱导频率分别为 53.33%和 60.00%, 子叶不能诱导出发根. PCR 表明 *rolB* 和 *rolC* 基因已整合到发根的基因组中. B5 培养基最适于铃铛子发根生物量和托品烷生物碱积累, 发根鲜质量和干质量分别达到  $6.9 \pm 0.94$  g/瓶和  $0.44 \pm 0.06$  g/瓶; 发根中莨菪碱质量分数为  $3.49 \pm 0.13$  mg/g. B5 和 1/2B5 培养基中发根的东莨菪碱质量分数高于其他的培养基, 分别为  $1.37 \pm 0.06$  mg/g 和  $1.43 \pm 0.22$  mg/g, 二者之间差异无统计学意义. 在 B5 培养基中发根总生物碱产量也是最高的, 为  $2.1 \pm 0.29$  mg/瓶. 研究结果为利用发根规模化生产莨菪碱和东莨菪碱奠定了基础.

**关键词:** 铃铛子; 发根; 莨菪碱; 东莨菪碱; 培养

**中图分类号:** Q943

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2017)04-0040-06

铃铛子(*Anisodus luridus*)为茄科多年生宿根草本植物, 藏语名为“唐冲那薄”, 主要分布在西藏等海拔在 2 500~4 000 m 的山坡草地、林缘及田地宅旁. 铃铛子根和种子可供药用, 有抗痉挛和止痛作用, 医药上常用其根提取莨菪碱类生物碱<sup>[1]</sup>.

托品烷生物碱(tropane alkaloids, TAs)是一类来自茄科植物的生物碱, 是副交感神经系统的有效抑制剂, 主要药用成分为莨菪碱和东莨菪碱<sup>[2]</sup>. 由于托品烷生物碱的化学合成成本较高, 目前其供应仍然依赖于从植物中提取. 托品烷生物碱在野生茄科植物中质量分数很低, 故而寻求新途径来提高托品烷生物碱的产量尤为重要. 铃铛子作为托品烷生物碱的药源植物之一, 其野生资源正在逐渐枯竭, 目前发根培养成为研究药用植物次生代谢产物的有效手段, 而关于铃铛子发根培养条件的优化尚未有报道. 本研究建立了铃铛子发根的转化体系, 并对最适于铃铛子发根生长和生物碱积累的培养基进行优化筛选, 为获得托品烷生物碱提供了新的途径, 具有重要的理论意义和应用价值.

① 收稿日期: 2015-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370333); 国家 863 计划项目(2011AA100605); 新世纪优秀人才支持计划(NCET-12-0930); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2013A024).

作者简介: 赵凯辉(1990-), 男, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事植物基因工程与遗传育种的研究.

通信作者: 廖志华, 博士, 教授, 博士研究生导师.

## 1 材 料

### 1.1 植 物

铃铛子种子由西藏农牧学院兰小中教授鉴定并提供。

### 1.2 菌 株

农杆菌 C58C1 (pRiA4)由西南大学天然产物与代谢工程实验室保存。

## 2 方 法

### 2.1 铃铛子发根的获得

分别剪取约 1 cm 见方的叶片, 1.5 cm 长的茎段, 0.5 cm 长的子叶放入已活化好的菌液中, 振荡浸泡约 10 min 后, 用无菌滤纸吸干多余菌液. 将叶片、茎段和子叶分别平铺在 MS(含 100  $\mu\text{mol/L}$  的乙酰丁香酮)固体培养基上, 于  $25\pm 1.0$   $^{\circ}\text{C}$  恒温暗培养 48 h 后转入含抗生素 400 mg/L 头孢噻肟钠的 MS 固体培养基上除菌培养, 待发根生长到 2 cm 左右时剪下, 转移到新的含 400 mg/L 头孢噻肟钠的 MS 固体培养基中培养, 每 20 d 继代 1 次, 直至除菌完全。

### 2.2 发根 *rolB* 基因和 *rolC* 基因的 PCR 检测

取 200 mg 除菌彻底的发根应用 CTAB 法<sup>[3]</sup>提取基因组 DNA, 同时提取铃铛子无菌苗的根 DNA 作为阴性对照. 另取 200  $\mu\text{L}$  活化的农杆菌 C58C1 菌液, 12 000 r/min 离心 2 min, 去上清, 20  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 悬浮, 沸水煮 5 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 上清作为阳性模板. 所用 *rolB* 基因和 *rolC* 基因引物参照 Zhang 等<sup>[4]</sup>.

### 2.3 发根生长最优培养基的筛选

选取长势较好、分支较多的真叶上诱导出的发根 T3 株系, 作为铃铛子发根生长研究的实验对象. 为找出铃铛子发根生长的最适培养基, 本文选取了 7 种不同培养基作为测试培养基: N6, 1/2B5, B5, WPM, MS, 1/2MS 和 White, 蔗糖作为碳源, 质量浓度为 30 g/L. 将各培养基 pH 调至 5.8, 分装于 250 mL 的广口三角瓶中, 每瓶 100 mL, 121 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min. 每瓶发根的接种量为 10 根 2 cm 左右的发根, 鲜质量大约为 100 mg, 每种培养基 3 瓶重复, 于 110 r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$  摇床暗培养。

### 2.4 托品烷生物碱的提取和高效液相色谱 HPLC 分析

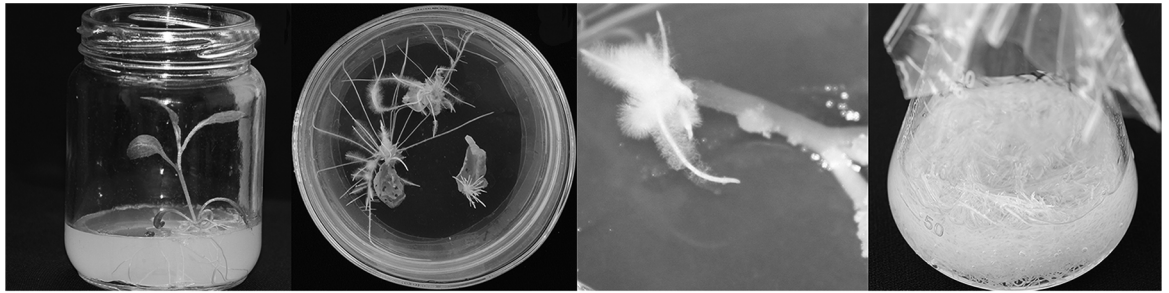
托品烷生物碱的提取及 HPLC 分析参照 Wang 等<sup>[2]</sup>的方法。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同类型外植体对诱导频率的影响

本实验用农杆菌 C58C1 侵染铃铛子不同的外植体, 在 25d 后统计生根外植体的个数, 真叶中出根外植体的个数是 16 个, 诱导率达到了 53.33%, 茎段中出根外植体的个数是 18 个, 诱导率达到了 60.00%(表 1)。

外植体的类型不同, 农杆菌侵染后的反应也不同(图 1). 真叶上生出的发根较粗壮, 分支较多, 根毛更发达, 长势较快, 而且单片真叶上诱导出发根数量比茎段多, 但诱导率与茎段相比要略低. 茎段的诱导率最高. 茎段上长出的发根与真叶上诱导出的发根相比不够粗壮, 分支较少. 子叶不能诱导出发根, 原因是子叶分化程度比真叶低, 维管束发育不完善. 综上所述, 铃铛子真叶是农杆菌诱导发根的最佳外植体。



(a) 铃铛子无菌苗

(b) 从真叶诱导出的发根

(c) 从茎段诱导出的发根

(d) B5培养基中培养的发根

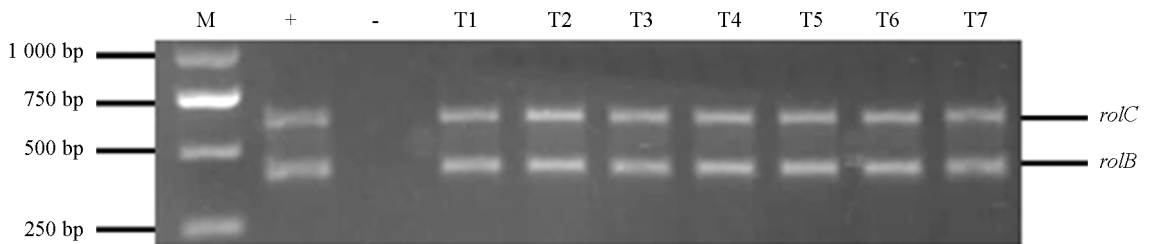
图 1 铃铛子发根诱导与培养

表 1 不同外植体对发根诱导率的影响

外植体类型	农杆菌浸染外植体/个	出根外植体/个	诱导率/%
真叶	30	16	53.33
茎	30	18	60.00
子叶	30	0	0

### 3.2 PCR 进行铃铛子发根阳性株系的鉴定

植物细胞产生发根是由于 Ri 质粒上携带有致发根相关的 *rol* 基因, Ri 质粒通过转化进入植物细胞并将 *rol* 基因整合进入植物核基因组, 从而使得植物细胞获得发根这种新的遗传属性, *rolB* 和 *rolC* 基因是最为常用的鉴定发根真实性的基因<sup>[5]</sup>. PCR 结果证明培养的铃铛子发根是真正的转化发根.



M: DNA 分子量; +: 阳性对照 pRiA4; -: 野生型铃铛子根; T1~T4: 真叶上诱导出的部分发根单克隆; T5~T7: 茎段上诱导出的部分发根单克隆.

图 2 铃铛子发根 *rolB*, *rolC* 基因的 PCR 检测

### 3.3 发根生长最优培养基的筛选

对不同培养基之间的生物量进行分析(表 2), 结果显示: 发根在 B5 培养基中生长最快, 鲜质量和干质量都达到最大值, 1/2B5 培养基中发根鲜质量和干质量也较大. B5 和 1/2B5 培养基与 WPM, MS, 1/2MS 培养基相比, 含有较低浓度的  $\text{NH}_4^+$ , 低浓度的  $\text{NH}_4^+$  有利于铃铛子发根的生长. N6, White 培养基中发根几乎不生长, N6, White 成分简单, 微量元素不仅种类少而且质量分数也很低, 抑制了发根的生长. 综上所述 B5 培养基是最适合铃铛子发根生长的培养基.

表 2 不同培养基发根生物量测定 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

培养基	发根鲜质量/g	发根干质量/g	培养基	发根鲜质量/g	发根干质量/g
White	0.10 ± 0.01	0.02 ± 0.00	1/2MS	1.26 ± 0.63	0.05 ± 0.03
WPM	3.12 ± 1.02	0.18 ± 0.05	MS	2.24 ± 0.23	0.12 ± 0.01
1/2B5	5.82 ± 0.83	0.40 ± 0.04	N6	0.26 ± 0.05	0.02 ± 0.01
B5	6.90 ± 0.94	0.44 ± 0.06			

### 3.4 铃铛子发根中东莨菪碱和莨菪碱的 HPLC 质量分数测定

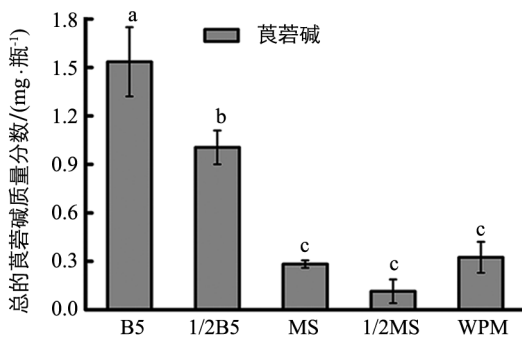
发根 T3 株系在 7 个培养基中培养后, 用 HPLC 测定莨菪碱和东莨菪碱的质量分数(表 3). 在 N6 和 White 培养基中发根的生物量较少, 全部研磨后混合称质量和测定, 仍然检测不到莨菪碱和东莨菪碱的存在. 在 B5 液体培养基中铃铛子发根的莨菪碱质量分数最高, 达到了  $3.49 \pm 0.13$  mg/g, 其次是 1/2B5, 1/2MS, MS 和 WPM. 而对于东莨菪碱, 1/2B5 液体培养基中培养的发根中质量分数最高, 达到了  $1.43 \pm 0.22$  mg/g, 其次是 B5, MS, 1/2MS 和 WPM. 从表 3 中可见在 B5 液体培养基中培养的发根的东莨菪碱质量分数与 1/2B5 液体培养基的相比差异无统计学意义.

表 3 不同培养基中铃铛子发根莨菪碱和东莨菪碱质量分数测定

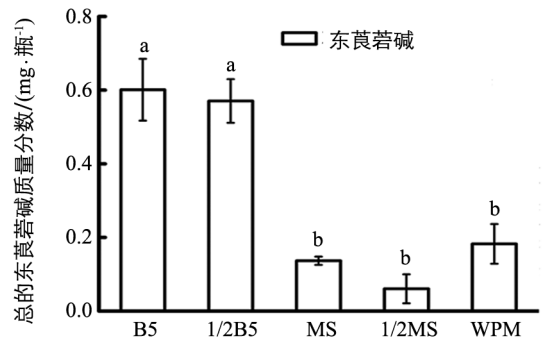
培养基	莨菪碱/(mg · g <sup>-1</sup> )	$\alpha=0.05$	东莨菪碱/(mg · g <sup>-1</sup> )	$\alpha=0.05$
B5	$3.49 \pm 0.13$	a	$1.37 \pm 0.06$	a
1/2B5	$2.52 \pm 0.17$	b	$1.43 \pm 0.22$	a
1/2MS	$2.34 \pm 0.06$	c	$1.13 \pm 0.19$	b
MS	$2.26 \pm 0.01$	c	$1.20 \pm 0.01$	b
WPM	$1.78 \pm 0.01$	d	$1.00 \pm 0.10$	b

注:  $\alpha=0.05$  时, 相同字母表示样品间差异无统计学意义, 不同字母表示样品间差异有统计学意义.

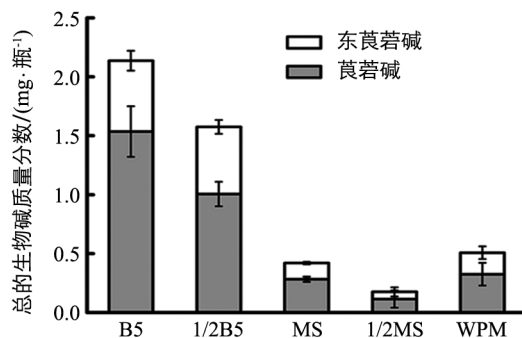
仅根据生物碱质量分数并不能确定最终收获的生物碱的总量, 根据东莨菪碱(莨菪碱)产量为发根的干质量总量与发根中东莨菪碱(莨菪碱)质量分数的乘积, 可计算出每种培养基发根中东莨菪碱(莨菪碱)的产量(图 3).



(a) 在不同培养基中培养的铃铛子发根中总的莨菪碱质量分数



(b) 在不同培养基中培养的铃铛子发根中总的东莨菪碱质量分数



(c) 在不同培养基中培养的铃铛子发根中总的生物碱质量分数

图 3 不同培养基中铃铛子发根总的生物碱质量分数测定

从图 3 可见, 在 B5 液体培养基中培养的发根中莨菪碱和东莨菪碱的产量要高于其他种类的培养基. 综合发根生物量和生物碱产量两个方面分析, B5 液体培养基中培养得到的铃铛子发根, 莨菪碱和东莨菪碱总

量都是最高的,分别达到了  $1.5 \pm 0.21$  mg/瓶和  $0.6 \pm 0.08$  mg/瓶. 根据总生物碱产量为总的莨菪碱产量与总的东莨菪碱产量之和,可统计出铃铛子发根在不同培养基中的总生物碱产量,在 B5 培养基中总的生物碱产量达到了最高,为  $2.1 \pm 0.29$  mg/瓶,其次是 1/2B5, WPM, MS 和 1/2MS.

## 4 讨 论

农杆菌种类、被感染部位细胞类型以及生理状况等因素的不同,使 T-DNA 插入植物基因组的位置、长度和拷贝数千差万别<sup>[5]</sup>. 本实验分别选取了真叶、茎段和子叶作为外植体,其受到农杆菌 C58C1 (pRiA4) 侵染后的反应有很大的差异,子叶对于侵染完全没有反应,茎段上诱导出的发根生长状态较弱,从而选取无菌苗的真叶作为最佳的外植体.

各种培养基由于所含的成分和比例不同,因此对发根的生物量、生长状态和次生代谢产物的形成有不同的影响<sup>[6-10]</sup>. 将真叶上诱导的发根转接到 N6, 1/2B5, B5, WPM, MS, 1/2MS 和 White 7 种不同的液体培养基中,以 B5 液体培养基中培养的发根生物量积累速度最快,莨菪碱质量分数最高,总生物碱产量最高,最适宜培养铃铛子发根. 这是由于 B5 液体培养基中含有较低浓度的铵态氮和较高浓度的硝态氮,而培养基中铵态氮和硝态氮之间的比例会影响发根生长和次生代谢产物的合成<sup>[11]</sup>,硝态氮比例高,铵态氮的浓度低,有利于铃铛子发根生物量的积累和生物碱的合成,具体的原因还需要进一步研究.

本实验成功建立了铃铛子发根诱导和培养体系,同时对铃铛子发根的培养条件及其次生代谢产物累积进行了初步研究. 结果表明铃铛子无菌苗的真叶为农杆菌诱导发根的最佳外植体,铃铛子发根在 B5 液体培养基培养时生物量积累最多,托品烷生物碱合成最多,对进一步规模化生产莨菪碱和东莨菪碱奠定了基础.

## 参考文献:

- [1] 吴征镒. 西藏植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 229-231.
- [2] WANG X R, CHEN M, YANG C X, et al. Enhancing the Scopolamine Production in Transgenic Plants of *Atropa Belladonna* by Overexpressing *Pmt* and *G*[J]. *Physiol Plant*, 2011, 143(4): 309-315.
- [3] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue [J]. *Focus*, 1990, 12: 13-15.
- [4] ZHANG L, YANG B, LU B B, et al. Tropane Alkaloids Production in Transgenic *Hyoscyamus Niger* hairy Root Cultures Over-Expressing Putrescine N-Methyltransferase is Methyl Jasmonate-Dependent [J]. *Planta*, 2007, 225(4): 887-896.
- [5] PISTELLI L, GIOVANNINI A, RUFFONI B, et al. Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 698: 167-184.
- [6] DAVID C, PETIT A, TEMPE J. T-DNA Length Variability in Mannopine Hairy Root: More than 50 Kilobasepairs of pRi T-DNA Can Integrate in Plant Cells [J]. *Plant Cell Rep*, 1988, 7(2): 92-95.
- [7] 孙 敏, 汪 洪, 王 颖, 等. 长春花转化毛状根诱导及培养条件的优化 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 27(4): 499-522.
- [8] 姜伊娜, 武天龙. 发根的研究进展及应用 [J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(1): 27-32.
- [9] 孙际薇, 张 鸿, 王凤英, 等. 茉莉酸甲酯对曼陀罗发根中主要莨菪烷类生物碱成分积累和释放的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(11): 1712-1718.

- [10] 王淑芳, 张仁波, 窦全丽. 外界因子对粘毛黄芩发根生长和黄酮类化合物合成的影响 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2012, 40(4): 124—126.
- [11] 张 兴, 刘晓娟, 吕巧玲. 发根生产次生代谢产物的研究进展 [J]. 化工进展, 2007, 26(9): 1228—1232.

## Optimization of Induction and Culture Conditions for Hairy Roots of *Anisodus luridus*

ZHAO Kai-hui<sup>1,2</sup>, FAN Yu-fang<sup>1</sup>, XU Yuan-jiang<sup>2</sup>,  
CAO Fang<sup>1</sup>, LAN Xiao-zhong<sup>2</sup>, LIAO Zhi-hua<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. TAAHC-SWU Medicinal Plant Joint R&D Center, Tibetan Collaborative Innovation Center of Agricultural and Animal Husbandry Resources, Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi, Tibet 860000, China

**Abstract:** *Anisodus luridus*, belonging to the Solanaceae family, is a Tibetan endemic plant species producing pharmaceutical tropane alkaloids. In order to provide a theoretical basis for the scale production of tropane alkaloids with *A. luridus* hairy roots as the raw material, a study was conducted in which *Agrobacterium* C58C1 (pRiA4) was used to infect the cotyledon, leaf or stem of *A. luridus*, and its hairy root induction was recorded. High frequencies of hairy root induction were obtained from stem (60.00%) and leaf (53.33%); while cotyledon produced no hairy roots. Then, the typical hairy root line was used to screen the optimal medium for root culture growth and alkaloid production. Of the seven types of liquid media used in this study (1/2MS, MS, 1/2B5, White, WPM, B5 and N6), B5 was the best one for both biomass accumulation and TA production. The fresh weight of hairy root cultures in B5 was  $6.9 \pm 0.94$  g/flask (or  $0.44 \pm 0.06$  g/flask dry weight). Further, HPLC analysis results showed that hairy root cultures in B5 produced hyoscyamine ( $3.49 \pm 0.13$  mg/g) at a higher level than that in other media. The highest scopolamine contents were detected in hairy root cultures in B5 and 1/2B5, which were respectively  $1.37 \pm 0.06$  mg/g and  $1.43 \pm 0.22$  mg/g. However, there was no significant difference in scopolamine contents between hairy root cultures in B5 and that in 1/2B5. Finally, it was found that hairy root cultures in B5 produced total TAs at the highest level ( $2.1 \pm 0.29$  mg/flask).

**Key words:** *Anisodus luridus*; hairy root; hyoscyamine; scopolamine; culture

