

基于响应面法对丹参毛状根诱导条件的优化研究

蔡媛, 钟灿, 谢芳一, 沈冰冰, 张水寒

(湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南长沙, 410013)

[摘要] 目的:应用响应面法优化丹参毛状根诱导条件,提高其诱导率。方法:采用发根农杆菌 ATCC15834 侵染丹参无菌苗获得毛状根,在单因素实验的基础上,利用 Box - Benhnken 设计和响应面分析方法对丹参毛状根诱导过程的培养条件(叶片大小、农杆菌活力、侵染时间、共培养时间、抗生素浓度)进行分析,优选最佳培养条件。结果:丹参毛状根在无外源激素的 MS 培养基上自主生长,表现出典型的发根特征。毛状根的最优培养条件为:叶片大小 0.8cm^2 ,农杆菌 OD_{600} 为 1.0,共培养时间 2d,农杆菌侵染时间 5min,头孢噻吩浓度 400ng/L 。在此条件下,丹参毛状根的诱导率为 69.8%。结论:该研究优化了丹参毛状根的培养条件,为丹参的进一步开发利用提供了依据。

[关键词] 丹参;发根农杆菌;毛状根;响应面法;实验研究

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.11.068

Optimization of induction conditions of *Salvia miltiorrhiza* hairy root based on the response surface method

CAI Yuan, ZHONG Can, XIE Fang - yi, SHEN Bing - bing, ZHANG Shui - han

(Institute of Material Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To optimize the induction conditions of *Salvia miltiorrhiza* hairy root using the response surface method, and to improve induction rate. Methods: The aseptic seedlings of *Salvia miltiorrhiza* were infected with *Agrobacterium rhizogene* ATCC15834 to obtain hairy root. On the basis of single - factor experiment, the Box - Benhnken design and the response surface analysis were used to analyze the culture and induction conditions of *Salvia miltiorrhiza* hairy root (leaf size, *Agrobacterium rhizogene* activity, co - culture time, and antibiotic concentration) and screen out the optimal conditions. Results: *Salvia miltiorrhiza* hairy root had an autonomous growth on MS medium without exogenous hormone and showed the typical rooting features. The optimal culture conditions of hairy root were a leaf size of 0.8cm^2 , an *Agrobacterium rhizogene* OD_{600} of 1.0, a co - culture time of 2 days, an *Agrobacterium rhizogene* infection time of 5 minutes, and a cefalotin concentration of 400ng/L . Under these conditions, the induction rate of *Salvia miltiorrhiza* hairy root was 69.8%. Conclusion: This study optimizes the culture conditions of *Salvia miltiorrhiza* hairy root and provides a basis for further exploitation and utilization of *Salvia miltiorrhiza*.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; *Agrobacterium rhizogene*; hairy root; response surface; experimental study

药用丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)的干燥根及根茎,具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功效,是治疗心血管系统疾病最常用的中药之一。中成药复方丹参滴丸丹(天士力)已通过(FD 美国食品药品监督管理局 A)Ⅱ期临床试验,并已进入Ⅲ期临床研究,表明丹参作为治疗心血管疾病的药物已引起了全球医药界的重视和支持。丹参的药用量逐年上升,导致丹参有限的野生资源遭到了掠夺性采挖,不利于丹参资源的可持续发展。采用现代生物技术如组织培养技术、药用植物细胞悬浮培养生产次生代谢产物被认为是解决资源紧迫的问题,是我国中药可持续发展的有效途径。毛状根具有生长快、有效

成分含量高、易于大量培养和不需要加入激素便能自主生长等优点。本研究利用发根农杆菌 ATCC15834 菌株侵染丹参无菌苗外植体获得丹参毛状根,同时运用 Box - Benhnken 设计和响应面分析法对叶片大小、农杆菌浓度、侵染时间、共培养时间、抗生素浓度等因素进行优化,以期获得最佳的诱导培养条件,为丹参毛状根的大规模培养和产业化应用奠定基础。

1 实验材料

1.1 材料 丹参种子(中国中医科学院中药资源中心馈赠),经鉴定为丹参(*S. miltiorrhiza*)的成熟种子。发根农杆菌 ATCC15834,购自中国普通微生物菌种保藏中心。

1.2 主要仪器与试剂 灭菌锅,全智能人工气候植物箱,精密 pH 计,光照培养箱,摇床,生物净化工作台;MS 培养基,头孢噻肟钠。

2 实验方法

2.1 无菌再生苗的培育 选取颗粒饱满的丹参种子,流水冲洗 3h,75% 乙醇浸泡 30s,无菌水冲洗 3 次,0.1% 的升汞浸泡 10min,无菌水冲洗 5 次,放到无菌滤纸上吸干,接种到 MS 培养基上,选取有顶芽分枝的丹参苗,每 10d 继代 1 次,获得丹参无菌苗。

2.2 丹参毛状根的诱导培育 将发根农杆菌侵染丹参无菌苗的外植体(叶片)接种于 MS 培养基上并进行共培养,然后转接到不同浓度头孢噻肟的 MS 培养基上进行培养。培养 1 周左右,有的外植体开始膨大,在伤口处陆续长出白色的毛状根,无向地性。未转化外植体或者侵染过度的外植体在 MS 培养基上培养一段时间后,褐化致死。

2.3 单因素设计实验筛选诱导过程中的各关键因素

2.3.1 叶片大小 选取长势良好的丹参无菌苗,将其叶片分别剪成 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、1.8、2.0cm²。用 OD₆₀₀ 为 1.0 的发根农杆菌侵染 5min,接种于 MS 培养基上共培养 2d,转接到头孢噻肟浓度为 400ng/L 的 MS 培养基上进行培养。

2.3.2 农杆菌浓度 将农杆菌挑取单菌落于 YEP 液体培养基中进行培养,25℃,115rpm 培养至其 OD₆₀₀ 分别为 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5。选取长势良好的丹参无菌苗,将其叶片剪成 1.2cm²。用不同活力的发根农杆菌侵染 5min,接种于 MS 培养基上共培养 2d,转接到头孢噻肟浓度为 400ng/L 的 MS 培养基上进行培养。

2.3.3 共培养时间 选取长势良好的丹参无菌苗,将其叶片剪成 1.2cm²。用 OD₆₀₀ 为 1.0 的发根农杆菌侵染 5min,将农杆菌侵染外植体后转接至 MS 培养基上共培养 1、2、3、4d 后转接到头孢噻肟浓度为 400ng/L 的 MS 培养基上进行培养。

2.3.4 农杆菌侵染时间 选取长势良好的丹参无菌苗,将其叶片剪成 1.2cm²。用 OD₆₀₀ 为 1.0 的发根农杆菌侵染将外植体分别侵染 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10min。将农杆菌侵染外植体后转接至 MS 培养基上共培养 1、2、3、4d 后转接到头孢噻肟浓度为 400ng/L 的 MS 培养基上进行培养。

2.3.5 头孢噻肟浓度 选取长势良好的丹参无菌苗,将其叶片剪成 1.2cm²。用 OD₆₀₀ 为 1.0 的发根农杆菌侵染 5min,将农杆菌侵染外植体后转接至 MS 培养基上共培养 2d 后转接到含有头孢噻肟 100、200、300、400、500、600、700、800ng/L 的 MS 培养基中进行培养。

2.4 实验设计 Box - Behnken 实验设计优化农杆菌诱导丹参毛状根萌发生长。在单因素水平分析的基础上,根据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理,以毛状根诱导萌发率为响应值,设计五因素三水平响应面分析实验,因素水平编码见表 1,数据用 Design expert 软件分析确定最优培养条件参数。

表 1 因素水平编码

因素	编码值	-1	0	1
叶片大小(cm ²)	X ₁	0.5	1	2
共培养时间(d)	X ₂	1	2	3
农杆菌浓度(OD ₆₀₀)	X ₃	0.5	1	1.5
头孢噻肟浓度(ng/L)	X ₄	200	400	800
农杆菌侵染时间(min)	X ₅	2	5	10

3 实验结果

3.1 单因素优化毛状根诱导

3.1.1 叶片大小的影响 图 1 表明,叶片过小会导致毛状根诱导萌发率低,其主要原因可能是叶片太小会导致叶片与农杆菌共培养时叶片褐化现象,所以选择最适的叶片大小范围为 1.0 ~ 1.2cm²。

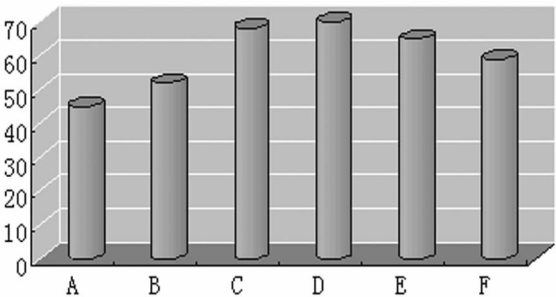


图 1 叶片大小对丹参毛状根萌发率的影响

3.1.2 农杆菌 OD₆₀₀ 的影响 图 2 表明,在农杆菌浓度达到 1.0 时丹参毛状根萌发率最高。农杆菌浓度过高或者过低,对毛状根的萌发都不利,可能是由于农杆菌在 1.0 浓度的时候其活力最强,处于对数生长阶段。所以选择最适宜的农杆菌浓度为 OD₆₀₀ 在 0.8 ~ 1.2。

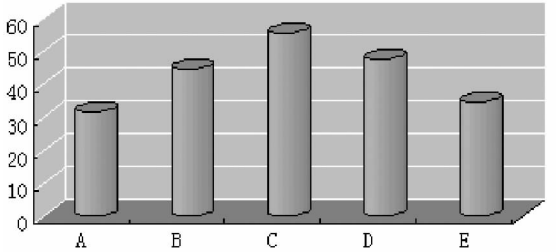


图 2 农杆菌 OD₆₀₀ 对丹参毛状根萌发率的影响

3.1.3 共培养时间的影响 图 3 表明,共培养对丹参毛状根的萌发率影响比较大。当共培养时间为 2d 时,其萌发率达到最大值,随着共培养时间的延长,其萌发率显著下降,当共培养时间为 4d 时,其萌发率为 15%,叶片基本上处于褐化。所以最适合的共培养时间为 2d。

3.1.4 农杆菌侵染时间的影响 图 4 表明,在 1 ~ 3min 的侵染时间里,毛状根萌发率很低,可能是因为侵染时间短,农杆菌与叶片伤口接触不够充分,侵染不够彻底,当侵染时间为 4 ~ 7min 时,诱导萌发率达到一个较高的水平,其最大值在侵染 5min 的时候为 58%。其后随着侵染时间的延长,其萌发率呈下降趋势。

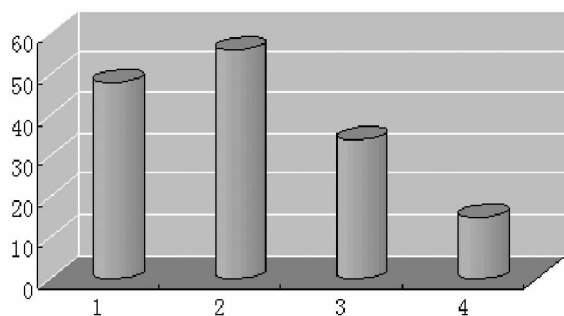


图3 共培养时间对丹参毛状根萌发率的影响

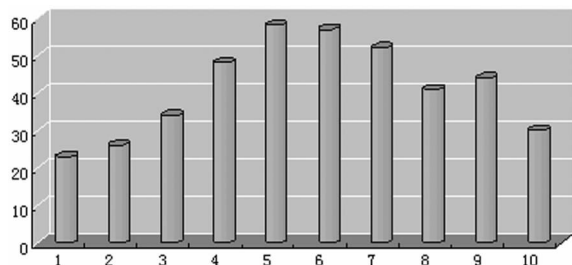


图4 农杆菌侵染时间对丹参毛状根萌发率的影响

3.1.5 头孢噻吩浓度的影响 图5表明,头孢噻吩对丹参毛状根影响在低浓度范围内不是特别明显,在头孢噻吩浓度为400ng/L时其萌发率达到最大值,而当其浓度达到800ng/L的时候,其诱导萌发率显著下降,可能是其抑制了农杆菌的生长。

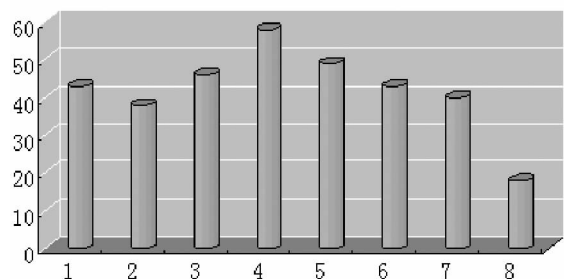


图5 头孢噻吩浓度对丹参毛状根萌发率的影响

3.1.6 响应面法优化毛状根诱导条件 回归方程的建立与方差分析,将数据通过 Design expert 软件进行回归分析,计算得二次回归方程为: $Y = 69.1666667 + 9.56875 \times X_1 - 20.175 \times X_2 - 13.69166667 \times X_3 + 14.425 \times X_4 - 12.525 \times X_5 - 13.25 \times X_6$,对回归方程进行方差分析可知,多元相关系数 $R^2 = 0.83$, $F = 32.1$,说明该回归方程的拟合性较好,模型可行,数据分析是准确可靠的。响应面图是响应值在各试验因子交互作用下得到的结果构成的一个三维空间曲面。根据回归方程,采用 Design expert 软件绘制响应曲面图(见图6~15),考察所拟合的响应曲面的形状。为了确定最佳点的值,采用 Design expert 软件对实验数据进行模型分析,得到丹参毛状根最佳诱导培养条件:叶片大小为 0.84cm^2 ,农杆菌 OD_{600} 为 0.98,共培养时间 1.86d,农杆菌侵染时间 4.62min,头孢噻吩浓度 367.5ng/L,

其预期诱导萌发率为 72.6%。

3.1.7 最优条件的验证 为检验实验的可靠性,采用上述最优培养条件进行毛状根诱导实验,同时考虑到实际操作的便利,将最佳条件修正为叶片大小 0.8cm^2 ,农杆菌 OD_{600} 为 1.0,共培养时间为 2d,农杆菌侵染时间为 5min,头孢噻吩浓度为 400ng/L。得到的丹参毛状根的诱导萌发率为 69.8%,与预期值比较可知,曲面响应分析所得的优化模型是可靠的,试验优化得到的诱导培养条件具有实用价值。

4 讨论

丹参作为我国一味传统中药,在临床治疗心脑血管疾病方面发挥着举足轻重的作用。丹参主要活性分子为丹参酮类和丹酚酸类化合物,其在丹参根部含量比较低,通过大量挖掘丹参植物药材进行有效成分提取不利于丹参资源的可持续发展利用。应用毛状根培养技术生产次生代谢产物如蒽类、黄酮类、生物碱类已经成为次生代谢物生产应用中的一条可靠有效的途径。利用发根农杆菌侵染植物的因素很多,本实验在单因素试验的基础上,经响应面法对丹参毛状根诱导过程中的关键因素进行优化,确定其最佳诱导培养条件为:叶片大小 0.8cm^2 ,农杆菌 OD_{600} 为 1.0,共培养时间为 2d,农杆菌侵染时间为 5min,头孢噻吩浓度为 400ng/L。在此条件下,毛状根的诱导率为 69.8%。本研究为中药丹参的现代化应用提供了理论依据。

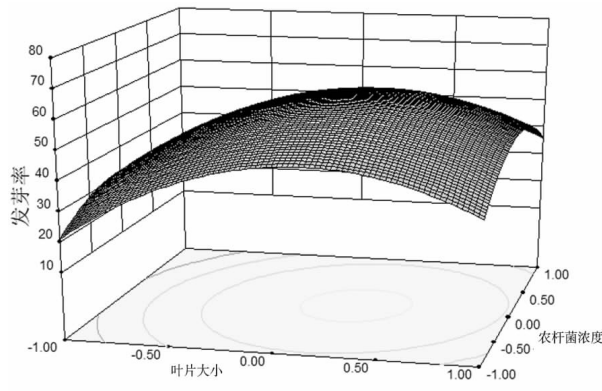


图6 叶片大小和农杆菌浓度对丹参毛状根萌发率的影响

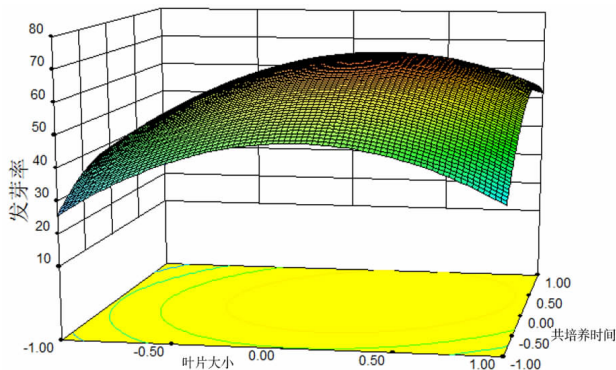


图7 叶片大小和共培养时间对丹参毛状根萌发率的影响

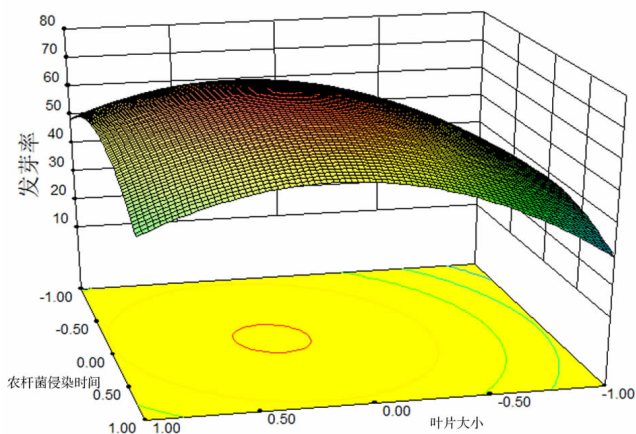


图 8 叶片大小和农杆菌侵染时间对丹参毛状根萌发率的影响

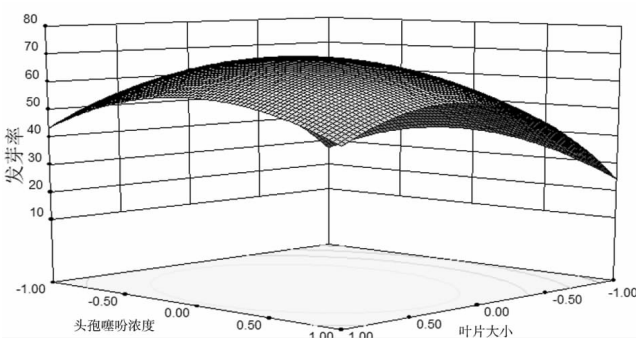


图 9 叶片大小和头孢噻吩浓度对丹参毛状根萌发率的影响

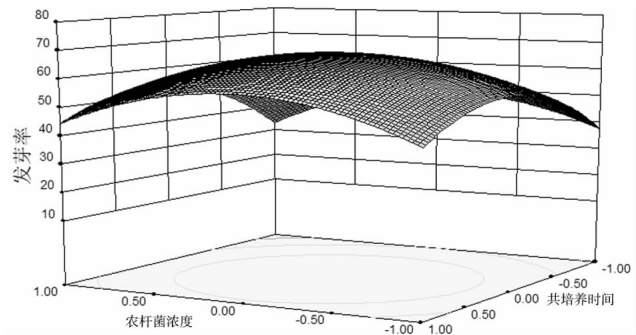


图 10 农杆菌浓度和共培养时间对丹参毛状根萌发率的影响

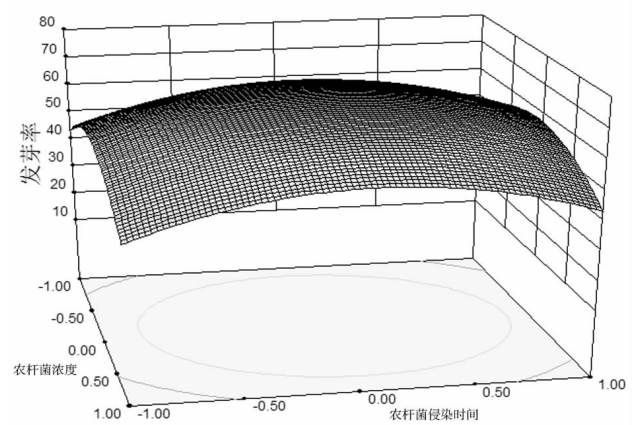


图 11 农杆菌浓度和农杆菌侵染时间对丹参毛状根萌发率的影响

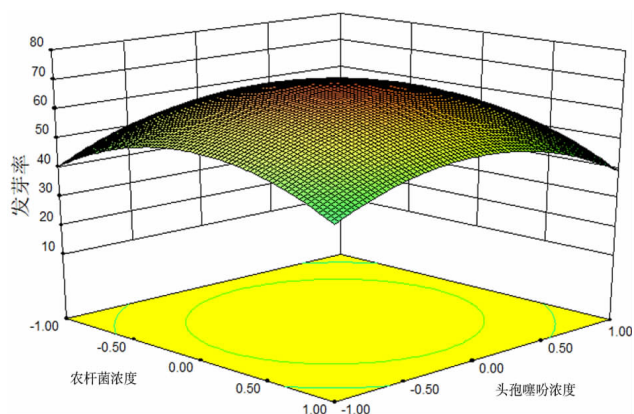


图 12 农杆菌浓度和头孢噻吩浓度对丹参毛状根萌发率的影响

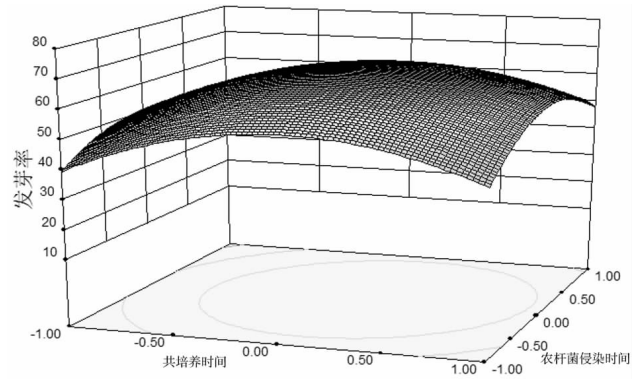


图 13 农杆菌浓度和共培养时间对丹参毛状根萌发率的影响

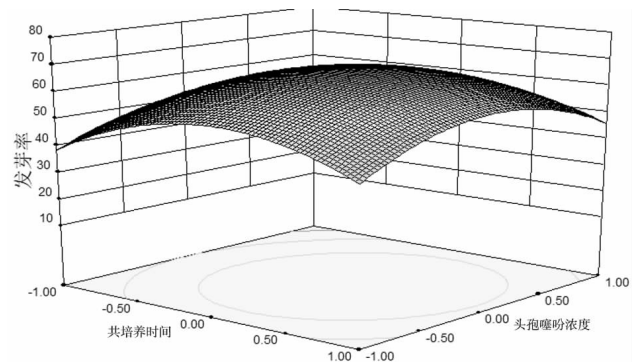


图 14 共培养时间和头孢噻吩浓度对丹参毛状根萌发率的影响

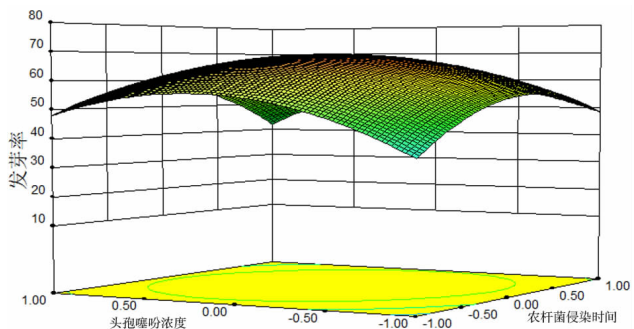


图 15 农杆菌侵染时间和头孢噻吩浓度对丹参毛状根萌发率的影响

(收稿日期: 2018-04-20)