

青蒿发根生长及青蒿素生物合成动态的研究

刘本叶 叶和春* 李国凤 陈大华 耿 飒 张艳萍 陈建林

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘 要 从 747 条发根农杆菌 ATCC15834 转化的青蒿株系 025 发根中,筛选出 7 个生长较快的发根系,这 7 个系在生长速度和青蒿素含量上均有显著差异,其中发根系 HR-9 青蒿素产率最高,达到每月 33.25mg/L。青蒿发根的生长量和青蒿素含量极显著高于未转化根和愈伤组织。青蒿发根在分批培养中没有明显的迟滞期,接种后第 7 天进入指数生长期,第 11 天生长最快,第 20 天进入稳定期。青蒿发根中青蒿素含量呈明显的'与生长相关'特性,在指数生长期,青蒿素含量缓慢下降,生长速度减缓后,青蒿素含量上升,发根生长停止后,继续延长培养时间,青蒿素含量也不再提高。在分批培养中,青蒿发根适宜的培养时间为 21d。

关键词 青蒿,发根,发根农杆菌,青蒿素

学科分类号 Q946

发根农杆菌 Ri 质粒转化的青蒿(*Artemisia annua* L.)发根培养是利用生物技术工业化生产抗疟新药青蒿素的很有希望的途径之一^[1,2],我们已经成功地建立青蒿发根培养系统^[3],本文报道在分批培养中青蒿发根生长及青蒿素生物合成动态,为建立适宜的发根培养程序和进行理化因子调控研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 青蒿未转化根的诱导及培养

剪取青蒿试管苗叶片,接种在含 NAA 0.5mg/L 的改良 MS 固体培养基上,25℃ 暗培养。3~4 周后,剪取叶片切口处长出的不定根,在相同成分的液体培养基中,100r/min 摇床上继代培养。

1.2 青蒿愈伤组织的诱导及培养

将青蒿试管苗叶片剪成小块,接种在含 BA 0.2mg/L, NAA 0.5mg/L 的 MS 固体培养基上,25℃ 暗培养,3 周后在叶片伤口处产生愈伤组织。将大块的愈伤组织从叶片上切下,在相同培养基中继代培养。

1.3 青蒿发根培养及生长量的测定

用发根农杆菌(*Agrotacterium rhizogenes*)ATCC15834 转化青蒿株系 025 诱导发根^[3],经除菌培养建立起 7 个无菌发根系,均保存在改良 MS+3% 蔗糖液体培养基中,每

国家自然科学基金(No.39470847)资助项目。

* 通讯联系人。

收稿日期:1997-11-26,修回日期:1998-05-10。

2 周继代 1 次。

在盛有 50ml 改良 MS 培养液的 250ml 三角瓶中, 接种 0.1g 鲜重 2~4cm 长的发根根尖, 在转速为 100r/min 摇床上、16h 光周期, 光照强度 2000lx 条件下培养 3 周, 测定生长曲线时, 每隔 4d 取样 1 次, 培养 5 周。将发根取出, 吸干培养液, 在 60℃ 烘箱中烘干至恒重, 测定干重和青蒿素含量, 试验重复 2 次。

1.4 青蒿素含量的测定

1.4.1 青蒿素提取: 将烘干的青蒿发根研成细粉, 准确称取 0.25g 细粉置于提取瓶中, 加入 10ml 30~60℃ 石油醚, 在超声波浴中提取 30min, 过滤, 减压回收溶剂, 将残渣用 1ml 甲醇重新溶解, 12000r/min 下离心 10min, 以沉淀不溶部分, 上清液用于测定青蒿素含量。

1.4.2 高压液相检测样品及标准品的制备: 取青蒿素甲醇溶液 200 μ l 于 10ml 试管中, 加入 800 μ l 甲醇、4ml 0.2% NaOH 溶液, 混匀, 在 50℃ 水浴中反应 30min, 冷却至室温, 取 0.5ml 反应液于 1.5ml 塑料离心管中, 加入 100 μ l 甲醇、400 μ l 0.05mol/L 醋酸, 混匀, 过 C₁₈ 预分离小柱纯化。按照同样方法制备用于高压液相分析的青蒿素标准品溶液, 标准品浓度分别为每 10ml 溶液中含青蒿素标准品 0、40、80、120、160、200、240 μ g。

1.4.3 高压液相检测条件: 色谱柱为 C₁₈ 柱, 150mm \times 4.6mm, 流动相为 0.01mol/L 磷酸缓冲液: 甲醇(55:45), pH7.0, 流速 1ml/min, 紫外检测器检测波长设在 258nm, 注射体积 10 μ l。在上述条件下, 青蒿素出峰时间大约在 4min(图 1 A)。

2 结果与分析

表 1 青蒿发根^a、未转化根^b和愈伤组织生长量^c比较

Table 1 Comparison of growth of hairy root^a, untransformed root^b and callus^c

2.1 青蒿发根与未转化根及愈伤组织的比较

青蒿发根生长量显著地高于未转化根和愈伤组织, F 值高达

Materials	Mairy root	Untransformed root	Callus
Dry weight(g/flask)	0.77 ^a	0.41 ^b	0.35 ^c

1027, 愈伤组织和未转化根生长量之间没有显著差异(表 1)。在青蒿愈伤组织中, 没有检测到青蒿素, 在青蒿未转化根中只检测到微量青蒿素, 而在青蒿发根中却检测到了较高含量的青蒿素(图 1 B)。

2.2 青蒿发根高产系的筛选

共剪取 747 条发根进行除菌培养, 从中筛选出 53 个生长较快的无菌发根系。又经过 3 代继代培养, 进一步筛选出 7 个系。它们均是由发根农杆菌 ATCC15834 从青蒿株系 025 诱导出来的。这 7 个发根系在生长量和青蒿素含量上都有极显著差异, F 值分别为 30.52 和 33.01(图 2), 其中发根系 HR-9 的青蒿素产率最高, 达到每月 33.25mg/L。

2.3 青蒿发根生长与青蒿素生物合成动态

为了确定适宜的培养时间, 测定了选择出的高产发根系 HR-9 的生长和青蒿素生物合成动态。对试验结果进行 Marquardt 法迭代拟和, 得出回归方程:

$$Y = 0.8334(1 + 52.3839 \times \text{EXP}(-0.3595t)) \quad \gamma_y/t = 0.9838$$

由图 3 可以看出, 青蒿发根生长呈“S”形曲线。该曲线有两个拐点:

$$t_1 = a/b - (1/b) \times \ln(2 + \sqrt{3}) \approx 7d; t_2 = a/b + (1/b) \times \ln(2 + \sqrt{3}) \approx 15d$$

即接种后第 7~15d 是对数生长期, 其中生长最快的时间是 $a/b \approx 11d$ 。可见, 青

蒿发根在分批培养中没有明显的迟滞期,第 20 天进入稳定期(图 3),最大生长量为每月 25.85g/L。

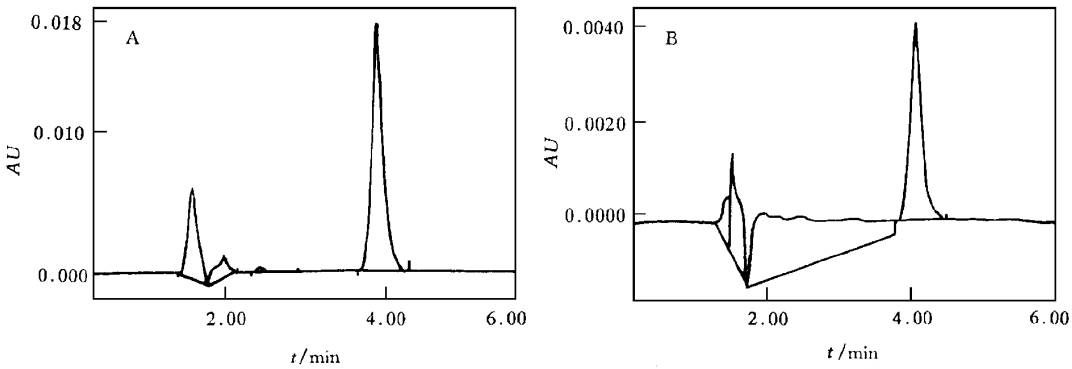


图 1 青蒿素标准品溶液和青蒿发根提取液的色谱图

Fig.1 Chromatograms of artemisinin standard solution and a hairy root extract

A. Artemisinin standard ;B. Hairy root extract

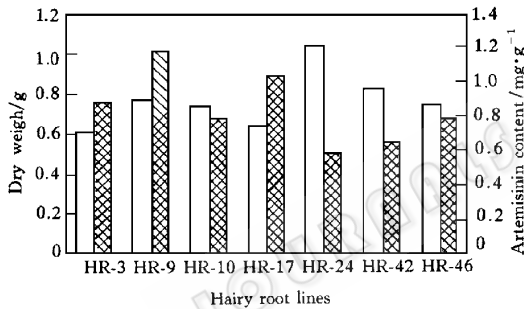


图 2 不同发根系生长量和青蒿素含量的比较

Fig.2 Comparison of growth and artemisinin contents among different hairy root lines

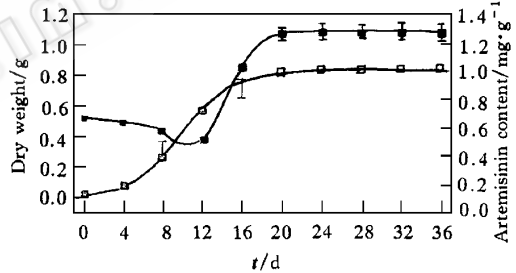


图 3 青蒿发根生长及青蒿素生物合成动态曲线

Fig.3 Curve of growth and artemisinin contents of artemisinin of hairy root in liquid medium

青蒿发根中青蒿素含量呈明显的“与生长相关”特性,在指数生长期,青蒿素含量缓慢下降,生长速度减缓后,青蒿素含量上升,发根生长停止后,继续延长培养时间,青蒿素含量也不再提高(图 3)。培养 21d 时,青蒿素产率达到每月 33.25mg/L。根据青蒿发根生长和青蒿素生物合成动态特性,青蒿发根适宜的培养时间是 21d。

3 讨论

3.1 青蒿发根的筛选

发根农杆菌转化植物诱导出的发根之间,存在很大的异质性^[4,5]。我们筛选出 7 的个系,这 7 个系之间在生长量和青蒿素含量上也存在着显著差异。

3.2 青蒿发根生长及青蒿素生物合成特性

天然生长青蒿植株根中不含青蒿素,而在发根中却检测到较高含量的青蒿素,这说明

发根与正常的未转化根是有差异的。Sauerwein 等(1991)报道,在甜过江藤(*Lippa dulcis*)发根中检测到 20 多种未转化根中检测不到的萜类化合物^[6]。这与本试验结果一致。

许多报道指出,离体培养的青蒿不定芽上生根对青蒿素生物合成有促进作用^[7~10]。这也许是由于青蒿素是在根中合成,运输到芽中储存。

青蒿发根在试验的接种密度(2mg/ml)下没有明显的生长迟滞期,生长速度很快。发根中青蒿素含量在培养过程中变化不大,特别是生长停止后,继续延长培养时间,青蒿素含量也不再增加,因此进行发根大量培养生产青蒿素时,发根生长停止后就可以立即收获提取青蒿素。

参 考 文 献

- 1 Weathers P J, Cheetham R D, Follansbee E *et al.* Biotechnology Letter, 1994, **16** (12):1281~1286
- 2 蔡国琴, 李国珍, 叶和春等. 生物工程学报, 1995, **11** (4):315~320
- 3 刘本叶, 叶和春, 李国凤等. 应用与环境生物学报, 1998, 待发表
- 4 Maldonado-Mendoza I E, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas V M *et al.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, **33**:321~329
- 5 Yoshikawa T, d Furuya T. Plant Cell Rep, 1987, **6**:449~453
- 6 Sauerwein M, Yamazaki T, Shimomura K. Plant Cell Rep, 1991, **9**:579~581
- 7 Nair M S R, Acton N, Klayman D L *et al.* J Natural Products, 1986, **49** (3):504~507
- 8 Fulzele D P, Sipahimalani A T, Heble M R. Phytotherapy Research, 1991, **5**:149~153
- 9 Elhag H M, El-Domiati M M, El-Ferally F S *et al.* Photother Res, 1992, **6**:20~24
- 10 Martinez B C, Stana E J. Adv Cell Cult, 1988, **6**:69~87

Studies on Dynamic of Growth and Artemisinin Biosynthesis of Hairy Root of *Artemisia annua* L.

Liu Benye Ye Hechun Li Guofeng Chen Dahua Geng Sa Zhang Yanping Chen Jianlin
(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract Seven hairy root lines with fast growing and high artemisinin contents properties were selected from 747 hairy roots of *Artemisia annua* L. strain 025 transformed by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. The differences of growth rate and artemisinin contents among the 7 selected hairy root lines were extremely significant. In which HR-9 gave the highest artemisinin productivity reached 33.25 mg/month·L. The differences of growth rate and artemisinin contents among hairy root, untransformed root and callus were also significant. There were no obvious lag stage in batch culture of *Artemisia annua* L hairy root, 7~15 days after inoculation was the exponential stage, the growth rate of 11th day was the highest, and the cultures reached stationary stage at 20th day. The properties of artemisinin content of hairy root were obviously "related to growth". The artemisinin content decreased slowly during exponential stage and increased while the growth slowed down and kept consistent after the growth stopped. The optimum culture interval of hairy root of *Artemisia annua* L. was 21 days.

Key words *Artemisia annua* L. hairy root, *Agrobacterium rhizogenes*, artemisinin