

# 丹參多倍體毛狀根誘導研究

夏奇鈺<sup>1,\*</sup> 陳威臣<sup>2</sup> 曹進義<sup>3</sup> 李秋儀<sup>4</sup> 吳姿穎<sup>4</sup>

## 摘要

夏奇鈺、陳威臣、曹進義、李秋儀、吳姿穎。2013。丹參多倍體毛狀根誘導研究。台灣農業研究 62(3):280–288。

丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 為唇形科多年生草本植物，其根部含有脂溶性之丹參酮，是中醫治療心血管疾病的重要藥材。多倍體毛狀根具有快速生長以及二次代謝物含量較高之特性，具有大量生產植物二次代謝物之潛力。本研究的目的是在建立一個高效率的丹參多倍體毛狀根誘導方法，進而從中篩選出高丹參酮產量之多倍體毛狀根系，作為離體培養大量生產丹參藥用成分之用。本研究以二倍體之丹參轉殖毛狀根為材料，培養於含有 2.5 mM 秋水仙素之 1/2 MS 鹽類固態培養基中，進行 2、4 及 6 d 不同天數的培養，結果顯示毛狀根之新根再生率以秋水仙素處理 2 d 者最高，達 80%；取再生新根以流式細胞儀進行染色體倍數檢測，並以 2N 丹參植株之葉片作為參考值，標示為 2C (complement quantity)，結果顯示以 2 d 及 4 d 處理得到之 4C 毛狀根誘導率較高，在 52.4–55% 之間。此外，將毛狀根區分為根尖與根段兩種培植體，培養於含有 1.25 mM 及 2.5 mM 秋水仙素之液體培養基中，分別震盪培養 1、2 及 3 d，結果顯示根尖培植體之新根再生率及 4C 毛狀根誘導率皆顯著高於根段培植體；秋水仙素 1.25 mM 及 2.5 mM 兩種濃度對毛狀根再生率之影響差異不顯著；但秋水仙素處理天數對新根再生率、4C 毛狀根誘導率皆有顯著影響，新根再生率以 2 d 處理最佳，4C 毛狀根誘導率則以 2 d 或 3 d 處理最佳。綜合以上之結果，顯示以二倍體丹參毛狀根之根尖作為多倍體誘導材料，在含有 2.5 mM 秋水仙素之固態或 1.25 mM 秋水仙素之液態培養基中培養 2 d，可得到平均高於 55% 之 4C 毛狀根誘導率。進一步將為數 33 個之 4C 毛狀根系進行 8 wk 培養，初步結果顯示，4C 毛狀根系之平均生質量僅及 2C 毛狀根之 0.49 倍，但 4C 丹參毛狀根之隱丹參酮、丹參酮 I 與丹參酮 II A 的平均含量均較 2C 毛狀根為高，隱丹參酮增加最高達 11.2 倍，丹參酮之總產量則提高至 2.6 倍。

**關鍵詞：**丹參、毛狀根、秋水仙素、多倍體、丹參酮。

## 前言

基因轉殖技術已普遍應用於作物的改良，其中利用農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 轉殖育成之毛狀根 (hairy root) 被認為是離體培養 (*in vitro culture*) 生產植物二次代謝物之新工具 (Zhou *et al.* 2011)。綜觀毛狀根培養之優點包括：毛狀根具有轉入之外源生長素基因，可以自發性的快速繁殖，因此培養

毛狀根時毋須添加生長調節劑；毛狀根與懸浮細胞相較，為一完整之根部器官，而器官培養 (organ culture) 較細胞培養 (cell culture) 具有較高的遺傳穩定性 (Flores *et al.* 1999)；再加上許多藥用植物的根部本來即為植物二次代謝物的儲存之處，因此根部的二次代謝物含量常較其他組織或器官為高；此外，與基轉植物相較，毛狀根須仰賴人工培養方能成活，並無生態安全與基因流佈之疑慮，因此利用毛狀根大

投稿日期：2013 年 6 月 28 日；接受日期：2013 年 8 月 9 日。

\* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

量生產植物二次代謝物的可行性逐漸受到重視 (Guillon *et al.* 2006; Ono & Tian 2011)。

利用轉殖毛狀根取代全株植物，以產業化方式大量生產高價之植物二次代謝物的生產策略，首先必須先確認毛狀根的生產效率，而毛狀根的生產效率可以從多方面去改進，例如高產根系的篩選、優化培養條件、添加誘引劑提高成分含量以及利用生物反應器大量培養等 (Kim *et al.* 2002; Georgiev *et al.* 2007; Srivastava & Srivastava 2007)。其中藉由提高毛狀根之遺傳倍體數，得到二次代謝物含量較高之多倍體毛狀根系即為生產改進的策略之一。多倍體主要是指相對正常染色體數目 (2N) 倍加之植株，多倍體植株與二倍體植株相較，在外在型態上可以觀察到有葉面積增加、氣孔變大、根數目增加、植物總體積變大、花瓣數與花朵大小增加等改變，以及內在營養成分、二次代謝物成分及含量不同等改變。一些中草藥植物亦有利用多倍體化來提高藥用成分含量的育種策略 (Dhawan & Lavania 1996)。例如 De Jesus-Gonzalez & Weathers (2003) 將治療瘧疾之重要中藥—青蒿 (*Artemisia annua*) 的毛狀根多倍體化，發現這些多倍體毛根系在成分含量及生長表現上與二倍體毛狀根有相當的差異，其中四倍體毛狀根之青蒿素產量最高者為二倍體毛狀根的 6 倍，顯示多倍體毛狀根與多倍體植物同樣具有二次代謝物含量較高之特性，亦即利用多倍體化篩選成分含量提高之多倍體毛狀根系具有可行性，很可惜的是這篇研究只得到 4 個四倍體毛狀根系作為調查之用，這也凸顯想要篩選得到特殊的多倍體毛狀根系，首先必須先建立數量足夠的多倍體毛狀根系族群，以便從中選拔出具有目標特性之毛根系，因此建立一個高效率之多倍體毛狀根誘導方法為此一策略的基本要務。

在我們過去丹參毛狀根的研究中已經證實丹參毛狀根培養具有生產丹參酮之潛力，並可透過培養基調整與誘引劑的添加來提高丹參酮的產量 (Chen *et al.* 2008, 2010; Chan *et al.* 2012)。本研究利用二倍體之丹參毛狀根為材料，探討影響丹參多倍體毛根誘導之各種因素，用以建立一個高效率之多倍體毛狀根誘導

技術，再由所得之多倍體丹參毛狀根系中篩選出高丹參酮產量特性之根系；此一技術除可利用於丹參多倍體毛狀根的誘導外，亦可做為其他藥用植物誘導多倍體毛狀根生產高價值植物二次代謝物之參考。

## 材料與方法

### 二倍體丹參毛狀根培養條件

丹參毛狀根為丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 葉片經由農桿根群菌 R1601 感染所得 (Lin 2006)，毛狀根培養於含有 B5 鹽類配方 (Gamborg *et al.* 1968)、3% 蔗糖與 0.9% Bacto agar 之培養基。上述基本培養基並作為秋水仙素處理後之恢復培養基。培養容器為直徑 9 cm 培養皿，每皿含 25 mL 培養基，毛狀根於黑暗環境中培養，每 4 wk 繼代一次。

### 秋水仙素誘導多倍體毛狀根試驗

**固態培養基誘導：**誘導培養基之成份為 1/2 MS 鹽類配方 (Murashige & Skoog 1962) 添加 2 mg L<sup>-1</sup> benzyladenine (BA)、0.2 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA)、3% 蔗糖與 0.9% Bacto agar，培養基於高壓滅菌後膠體未凝固前加入秋水仙素溶液，使培養基中秋水仙素濃度為 2.5 mM，再將培養基分裝於培養皿。誘導多倍體毛狀根所使用之材料為切取自於基本培養基中生長 2 wk 之二倍體毛狀根，長約 1–1.5 cm 之新根尖，每皿接種 10 條培植體，每一處理共接種 8–10 皿。毛狀根於含有秋水仙素之誘導培養基中分別培養 2、4 及 6 d 後，繼代於基本培養基中觀察新根的長出，每 4 wk 繼代一次。

**液態培養基誘導：**切取於固態基本培養基中生長 2 wk，長約 2–3 cm 之毛狀根作為接種材料，但將接種之毛狀根區分為根尖及其後之根段兩種培植體，根尖與根段培植體皆各長約 1–1.5 cm。液體培養基之成分同上述之基本培養基但未加入凝膠物質，培養基在滅菌後再加入秋水仙素溶液，使培養液中秋水仙素濃度為 1.25 mM 及 2.5 mM。培養容器為 125-mL 三角瓶，內裝有 10 mL 培養液，每瓶接種 20 條培植體，每一處理共培養 3 瓶。培養瓶於

25°C 黑暗環境中利用往復式震盪培養器以 70 rpm 分別震盪培養 1、2 及 3 d 後，將培植體繼代回固態之基本培養基中。

### 流式細胞儀 (Flow cytometry) 檢測倍體數

切取於固態基本培養基中培養 4 wk 後之再生新根，根長約 1 cm，加入 0.4 mL UV CyStain Precise T 萃取緩衝液 A (Partec, Germany)，再以解剖刀將組織切碎，切碎後以過濾膜過濾，於過濾液中添加 0.8 mL Partec Cystain Precise T 緩衝液 B 進行 3 min 染色，每一毛狀根取樣兩次，以流式細胞儀 (Partec, Germany) 分析系統分析 5,000 個細胞核 DNA 量。流式細胞儀數據以 2 N 丹參植株之葉片作為參考值標示為 2 C (complement quantity)。

將流式細胞儀檢測為 4 C 之根系分別編號，並重新接種於基本培養基中，每一編號毛狀根共接種兩皿，每皿接種 6 個根尖，8 wk 後調查毛狀根之鮮、乾重與丹參酮成分含量。

### 丹參酮成分萃取與含量分析

將乾燥之毛狀根磨碎，以二氯甲烷：甲醇 = 1：4 溶劑進行超音波震盪萃取 30 min 後收集濾液，殘渣再萃取一次後將兩次濾液合併濃縮，以甲醇定容後以 0.45  $\mu$ m 濾膜過濾。HPLC 分析之條件為流動相甲醇：四氫呋喃：冰醋酸：水 = 18：35：1：46，流速 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ，吸收波長 254 nm，分別檢測隱丹參酮 (cryptotanshinone; Crypto)、丹參酮 I (totanshinone I; Tan I)、丹參酮 IIA (totanshinone IIA; Tan IIA) 之含量，丹參酮類標準品購自中國藥品生物製品檢定所 (大陸)，純度為 98.7% 以上。

### 統計分析方法

試驗採用完全隨機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析，若處理間差異顯著 ( $P < 0.05$ )，則利用 Least Significant Difference test (LSD) 比較各處理平均值間之差異。

## 結果

丹參毛狀根於含有 2.5 mM 秋水仙素之固態培養基中分別培養 2、4 及 6 d 後繼代至基本培養基中培養，每 2 wk 調查一次新根長出之比率持續至第 8 wk，結果如表 1，顯示秋水仙素處理天數對於新根再生率、每個培植體長出的根數皆有顯著之影響 ( $P < 0.01$ )，新根再生率及平均新根數均以 2 d 處理為最佳，處理天數超過 2 d 之新根再生率及新根數皆明顯降低；但 4 d 與 6 d 秋水仙素處理間在新根再生率及新根數上並無明顯差異。此外藉由每 2 wk 調查一次持續至第 8 wk 的數據，可以觀察到新根長出之速率會隨著秋水仙素處理時間的延長而有差異，秋水仙素處理 2 d 之毛狀根在處理後 2 wk 內即長出新根者，佔總新根數的 71.3%；但處理 4 d 者則延至第 4 wk 才有較高比率之新根長出 (76.2%)；處理 6 d 之新根亦同樣有延遲長出之情形，亦即在第 4 wk 後才有較高比率之新根長出，但僅達 58.8%，再生新根延滯長出之情況更為嚴重，至第 8 wk 時仍有 29.4% 比率之新根長出 (圖 1、表 1)。再生之新根以流式細胞儀進行倍體數分析，結果如表 2，顯示多倍體之誘導率受到處理天數的影響顯著 ( $P < 0.01$ )，4 C 毛狀根產生之比

表 1. 以秋水仙素 2.5 mM 濃度處理不同天數對丹參毛狀根再生新根之影響。

**Table 1.** Effect of 2.5 mM colchicine incubation time on hairy root formation of *Salvia miltiorrhiza*.

Incubation of colchicine (d)	Total treated roots	Root formation (%)	No. of roots/explant	% of root formation		
				2 wk	4 wk	8 wk
2	100	80.0 a <sup>z</sup>	0.80 a	71.3 ± 0.08	18.8 ± 0.12	10.0 ± 0.04
4	100	21.0 b	0.21 b	19.1 ± 0.09	76.2 ± 0.08	4.8 ± 0.04
6	80	21.3 b	0.21 b	17.7 ± 0.10	58.82 ± 0.03	29.4 ± 0.12

<sup>z</sup> Means in the column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

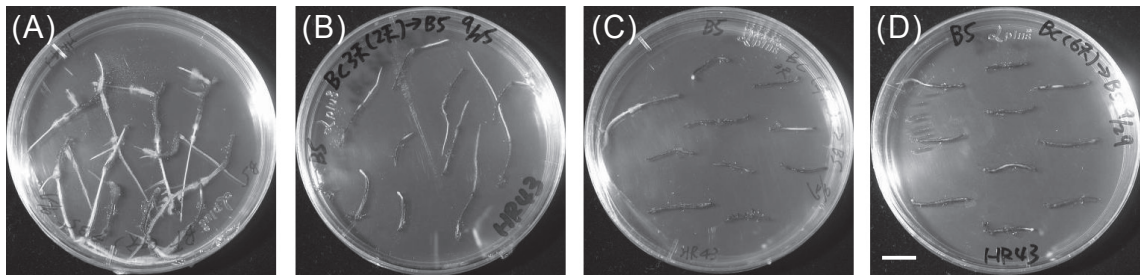


圖 1. 丹參毛狀根以 2.5 mM 秋水仙素處理不同天數，3 wk 後新根生長之情形。秋水仙素處理天數分別為 (A) 對照組 0 d；(B) 2 d；(C) 4 d 及 (D) 6 d。

**Fig. 1.** Growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots three weeks after 2.5 mM colchicine treatment. Incubation days for colchicine treatment is (A) control, 0 day; (B) 2 days; (C) 4 days and (D) 6 days. Bar = 1 cm.

表 2. 以秋水仙素 2.5 mM 濃度不同天數處理對丹參毛狀根誘導多倍體之影響。

**Table 2.** Effect of 2.5 mM colchicine incubation time on polyploidy hairy root induction of *Salvia miltiorrhiza*.

Incubation of colchicine (d)	Total roots examined	Ploidy (%)		
		2 C	4 C	Stop growth
2	80	36.3 a <sup>2</sup>	55.0 a	8.8 b
4	21	33.3 a	52.4 a	14.3 b
6	17	41.2 a	17.6 b	41.2 a

<sup>2</sup> Means with different letters in the column are significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

率在秋水仙素 2 d 及 4 d 處理間差異並不顯著 (55% 及 52.4%)，但 6 d 處理之多倍體毛狀根誘導比率僅 17.6% 則明顯降低。此外，隨著秋水仙素處理天數增加，再生新根停止生長的比率亦隨之增高，再生新根在繼代後如停止生長，則未檢測其倍體數，三種天數處理中以處理 6 d 之新根停止生長比率最高，達 41.2%。長出之新根經檢測為 4 C 者在繼代培養後亦發現部分根系有停止生長之情形，分別佔 2、4、6 d 處理之 4 C 毛狀根的 20.4、52.4、66.7% (資料未顯示)。

進一步將接種之毛狀根區分為根尖及根段兩種培植體，於含有 1.25 mM 及 2.5 mM 兩種濃度秋水仙素之液態培養基分別處理 1、2、3 d，試驗結果之 ANOVA 分析顯示如表 3。秋水仙素濃度、處理天數及根培植體三種因子中，以處理天數、根培植體以及兩者之間的交感作用對再生新根的形成有極顯著之影響 ( $P < 0.01$ )；2 C 根系比率則分別受到處理天數 ( $P < 0.01$ )、以及秋水仙素與天數之交感 ( $P < 0.05$ ) 顯著影響；4 C 根系比率則受到根培植體之顯

著影響 ( $P < 0.01$ )。秋水仙素濃度在各項調查數據之主效應影響皆不顯著，僅在 2 C 毛狀根比率中顯示與天數具有交感效應 ( $P < 0.05$ )。將各種因子對多倍體毛狀根形成之結果列於表 4，整體而言，在再生新根的形成方面，根尖培植體較根段有較高之新根再生率，因根尖與根段之表現差異大，因此將根尖與根段之結果分別比較，根尖或根段培植體兩者之新根再生率及平均新根數皆明顯受處理天數之影響。比較兩種培植體產生 4 C 毛狀根的比率，根尖培植體明顯受到秋水仙素處理天數的影響，但根段則否。根段培植體在不同天數處理中其多倍體誘導率僅介於 13.1–24.7% 之間；但以根尖為培植體配合秋水仙素 2 d 或 3 d 處理，可獲得最高之 4 C 毛狀根誘導率 (30.4–59.4%)。在新根停止生長方面，秋水仙素處理天數及根培植體兩因子皆無顯著之影響，此點與固態培養 2–4 d 新根停止生長比率差異不顯著之結果相當吻合，推論秋水仙素處理時間若未長於 4 d 對新根停止生長比率不至造成影響。

丹參多倍體毛根系在外觀上大多具有較粗

表 3. 秋水仙素濃度、處理天數及不同根培植體對多倍體毛狀根誘導影響之變異數分析。

Table 3. ANOVA of explant types of root, concentration of colchicine and its incubation time on polyploidy induction of *Salvia miltiorrhiza* hairy root.

Source	DF	Mean Square				
		Root formation (%)	No. of roots/explant	Ploidy (%)		Stop growth
				2 C	4 C	
Day for colchicine (D)	2	12,912.5**	2.503**	4,826.1**	1,076.2	371.05
Con. of colchicine (C)	1	138.9	0.117	1,953.1	67.1	830.40
Explant type (E)	1	14,450.0**	0.087	1,509.3	4,908.5**	58.38
D × C	2	476.4	0.115	2,750.3*	303.3	159.85
D × E	2	1,287.5**	0.055	574.4	1,228.3	80.76
C × E	1	200.0	0.007	1,099.4	284.1	265.76
D × E × C	2	29.2	0.014	401.6	1,217.8	241.20

\*, \*\*significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

表 4. 秋水仙素處理天數及不同根培植體對多倍體丹參毛狀根形成之影響。

Table 4. Effect of colchicine incubation time and types of root explants on polyploidy induction of *Salvia miltiorrhiza* hairy root.

Root explant Colchicine (mM)	Treatment (d)	Root Formation (%)	No. root /explant	Roots analyzed	Ploidy (%)		
					2 N	4 N	Retardant
Tip							
1.25	1	98.3 a <sup>z</sup>	0.98 a	59	74.3 a	17.0 c	8.7 a
	2	66.7 c	0.67 c	40	34.0 bc	59.4 a	6.6 a
	3	36.7 d	0.37 d	22	50.2 bc	40.9 abc	8.9 a
2.5	1	85.0 ab	0.85 ab	51	64.9 a	23.5 bc	11.6 a
	2	71.7 bc	0.72 bc	43	62.1 ab	30.4 bc	7.5 a
	3	26.7 d	0.27 d	16	23.6 abc	45.8 ab	13.9 a
Section							
1.25	1	53.3 a	1.08 a	65	75.3 a	24.7 a	0.0 a
	2	30.0 bcd	0.48 bcd	29	70.2 a	13.1 a	0.0 a
	3	23.3 cd	0.30 cd	18	63.9 a	18.1 a	18.1 a
2.5	1	51.7 ab	0.8 ab	48	63.3 a	15.5 a	21.3 a
	2	40.0 abc	0.57 bc	34	64.4 a	23.6 a	12.0 a
	3	16.7 d	0.20 d	12	27.1 a	22.9 a	16.7 a

<sup>z</sup> Means with different letters in the same explant type are significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

之根徑、較少支根或較少之分支性，部分根系在培養後會呈現明顯之紅色，顯示其丹參酮含量的累積 (圖 2)。將流式細胞儀檢測為 4 C 之共 33 個多倍體毛根系重新繼代新培養基，培養 8 wk 後調查各根系之生質量及丹參酮含量，將對照組二倍體毛狀根與多倍體毛狀根系之平均值列於表 5。結果顯示多倍體毛狀根之

生質量明顯較二倍體毛根為低，33 個 4 C 毛根系之平均生質量僅為對照組 2 C 毛狀根之 48.9%；但在丹參酮含量方面則發現 4 C 毛根系較對照 2 C 毛狀根明顯增加，其中以隱丹參酮含量增加最多，平均增加達 11.2 倍；丹參酮 I 與丹參酮 II A 含量方面平均皆增加達 2.6 倍，整體丹參酮產量則增加了 2.6 倍。

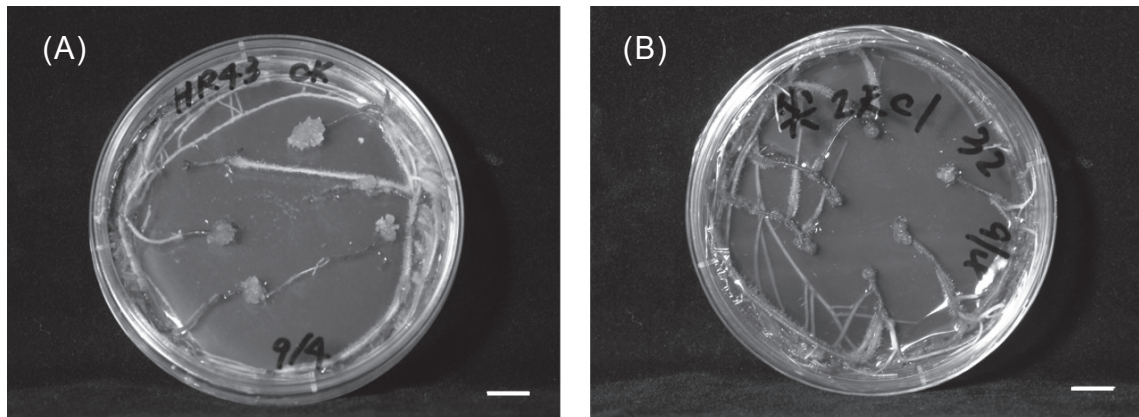


圖 2. 二倍體及四倍體丹參毛狀根繼代培養後 8 wk 生長之情形。(A) 二倍體；(B) 四倍體。

Fig. 2. Growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots 8 weeks after subculturing. (A) 2 C; (B) 4 C. Bar = 1 cm.

表 5. 不同倍體數丹參毛狀根系培養 8 wk 後之平均生質量與丹參酮含量比較。

Table 5. Comparison of 2 C and 4 C hairy root lines of *Salvia miltiorrhiza* on biomass and tanshinone production.

Ploidy of hairy root	Dry weight (g L <sup>-1</sup> )	Tanshinone <sup>z</sup> (mg g <sup>-1</sup> )				Productivity (mg L <sup>-1</sup> )
		Crypto	Tan I	Tan IIA	SUM	
2 C	6.40 ± 0.80	0.19 ± 0.03	0.33 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.60 ± 0.00	3.83
4 C <sup>y</sup>	3.13 ± 1.00	2.13 ± 1.09	0.87 ± 0.40	0.18 ± 0.12	3.18 ± 1.52	9.98

<sup>z</sup> Tanshinones include cryptotanshinone (Crypto), totanshinone I (Tan I) and totanshinone IIA (Tan IIA).

<sup>y</sup> Total 33 lines analyzed.

## 討論

已有許多報告指出多倍體植物可以增加二次代謝物的生產 (Dhawan & Lavania 1996)，但多倍體毛狀根是否能提高二次代謝物產量的影響，相關研究數量相當少，De Jesus-Gonzalez & Weathers (2003) 在青蒿 (*Artemisia annua*) 多倍體毛狀根的研究則指出，四倍體毛狀根產出之 artemisinin 是二倍體毛狀根的 6 倍，但上述兩研究對於如何有效誘導多倍體毛狀根皆無詳述，僅 De Jesus-Gonzalez & Weathers (2003) 提到利用 0.25% 或 0.5% (6.25 mM 或 12.5 mM) 濃度之秋水仙素處理 7 d 效果最佳，但其 4 C 毛狀根誘導率只有 10% (4/40)，亦即僅獲得 4 個多倍體毛根系，推測可能與秋水仙素濃度過高以及處理時間過久有關，因此較不具作為多倍體毛狀根誘導方法之參考價值。

一般而言，離體培養多倍體誘導效果會受到培植體、秋水仙素濃度與處理時間的共同影

響 (Dhooghe *et al.* 2011)。綜合丹參多倍體毛狀根誘導之結果顯示，秋水仙素濃度影響並不顯著，這可能與本研究使用之濃度 1.25 mM 及 2.5 mM 差異不大有關；新根再生率及多倍體的誘導率主要是受到秋水仙素處理時間的影響，在表 2 中雖然顯示四倍體毛狀根誘導率在處理 2 d 與 4 d 間無明顯差異，以及在表 4 中顯示根尖培植體 2 d 與 3 d 處理間亦無明顯差異，但若將新根再生率計入，則各處理間之差異擴大，兩試驗皆以較短處理時間 2 d 最適當，可得到較多之 4 C 毛狀根數並有建立較大之多倍體族群進行選拔。此外在誘導多倍體化的研究報告中鮮少比較在收穫時間上之差異，本研究經由持續追蹤秋水仙素處理後 8 wk 間新根長出之分佈比例，發現到秋水仙素處理時間延長會延滯新根長出時間，推測可能為秋水仙素藥劑處理對新根的生長造成抑制作用，因此建議秋水素處理時間較長時，應該適當的延後新根收穫的時間，方可增加再生新根之獲

得。此外亦發現延長秋水素處理時間，再生新根停止生長之比例會增加。在離體培養誘導多倍體所使用的培植體方面，一般建議以具有高度分化能力者最佳，如金線連誘導多倍體的研究指出，以無菌播種後快速生長之根莖以及瓶苗之頂芽較莖節培植體有較高之多倍體誘導率 (Hsia *et al.* 2009, 2010)；本試驗比較根尖與根段兩種培植體，亦發現根尖之新根再生率及 4 C 毛狀根誘導率均明顯較根段培植體為高，顯示培植體本身之細胞分裂能力與染色體加倍成功的比例有相關，因此在材料來源充足情況下，建議以切取根尖作為多倍體誘導之材料較為適當。

將流式細胞儀確認之 33 個 4 C 毛狀根系繼代於新培養基中，進行 4 C 毛狀根系第一次的 8 wk 固態培養，調查數據顯示 4 C 毛狀根在同樣培養期間內所收穫之生質產量明顯較 2 C 毛狀根為低 (49%)，推測原因有二，一為與 4 C 毛狀根生長速率較慢有關，此點可藉由延長培養時間確認多倍體毛狀根到達最高產量所需之時間來證實；二為秋水仙素藥劑處理抑制根生長之效果仍持續影響，此點可經由多代培養後，比較各代間之生長差異是否不同得到解答，且如果秋水仙素對生長抑制的影響持續存在，則 4 N 毛狀根系的產量選拔應該經由多代培養後，亦即毛狀根系生長穩定後再加以選拔。從成分含量來看，4 C 毛狀根在三種丹參酮的含量上皆明顯較 2 C 毛狀根系為高，或謂秋水仙素處理本身即具有誘引劑之效果，因此多倍體毛狀根二次代謝物含量得以提高，表 5 中之數據為 4 C 毛狀根系繼代於不含秋水仙素培養基中之第一次培養，雖然培養基中已不含秋水仙素，但仍不能排除秋水仙素仍具有持續影響之效果，但在誘引劑不存在之培養基中經過多代培養後在進行成分選拔，理論上則可排除誘引劑影響之推論，若證實二次代謝物含量在多代培養後仍可維持不降，則可推論成分含量的提高為染色體組遺傳改變所造成，而非秋水仙素的類誘引劑效果。在丹參 4 C 毛狀根系之二次代謝物含量提高方面，顯示丹參酮 I 與丹參酮 II A 以及隱丹參酮含量皆有增加，但以隱丹參酮含量增加最多，此結果與前人研究由

二倍體及四倍體曼陀羅 (*Datura stramonium*) 植株誘導而來之不同倍體數毛狀根，在生物鹼頻譜分佈上與累積量上顯示有相當程度之不同的結果相類似 (Berkov *et al.* 2003)，亦即未來可藉由篩選特定成分表現較佳之根系作為生產之用。目前 4 C 毛狀根的培養及篩選仍持續進行中，除比較各根系之生質產量與成分產率的不同外，並追蹤同一毛根系經多次繼代培養後其生長及各成分含量的穩定性之變化，結果將另行發表。

歸納丹參多倍體毛狀根誘導之結果，建議使用毛狀根之根尖做為誘導培植體，以 1.25 mM 及 2.5 mM 濃度之秋水仙素處理 2 d，在處理後較短時間內即可獲得較多之再生新根數，以及較高之 4 C 毛狀根比率，且再生新根後續停止生長之比率亦較低，此一模式可做為其他藥用植物誘導多倍體毛狀根之參考。

## 引用文獻

- Berkov, S., A. Pavlov, P. Kovatcheva, P. Stanimirova, and S. Philipov. 2003. Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Z. Naturforsch.* 58:42–46.
- Chen, U. C., H. S. Chan, C. Y. Lee, C. Y. Tsao, J. C. Liu, Y. C. Lee, and C. N. Hsia. 2008. Production of tanshinones of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root culture. *J. Taiwan Agric. Res.* 57: 305–326. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., C. Y. Lee, H. S. Chan, C. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2010. Influence of metal ion and elicitor on hairy root growth and production of tanshinones of *Salvia miltiorrhiza*. *J. Taiwan Agric. Res.* 59: 49–60. (in Chinese with English abstract)
- Chan, H. S., T. T. Lo, U. C. Chen, C. N. Hsia, and H. S. Tsay. 2012. Effect of nitrogen source on biomass and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root culture. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:100–111. (in Chinese with English abstract)
- De Jesus-Gonzalez, L. and P. J. Weathers. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep.* 21:809–813.
- Dhawan, O. P. and U. C. Lavania. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. *Euphytica* 87:81–89.
- Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tissue*

- Organ Cult. 104:359–373.
- Flores, H. E., J. M. Vivanco, and V. M. Loyola-Vargas. 1999. Radicle biochemistry: The biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.* 4:220–226.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Rep.* 50:151–158.
- Georgiev, M. I., A. I. Pavlov, and T. Bley. 2007. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1175–1185.
- Guillon, S., J. Trémouillaux-Guiller, P. K. Pati, M. Rideau, and P. Gantet. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: Dawn of a new era. *Trends Biotechnol.* 24:403–409.
- Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2009. *In vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. *J. Taiwan Agric. Res.* 58:302–309. (in Chinese with English abstract)
- Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and H. S. Tsay. 2010. *In Vitro* induction of polyploidy from nodal explants of *Anoectochilus formosanus*. *J. Taiwan Agric. Res.* 59:165–176. (in Chinese with English abstract)
- Kim, Y., B. Wyslouzil, and P. J. Weathers. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38:1–10.
- Lin, J. F. 2006. Development of hairy root transformation system and its secondary metabolites production of *Salvia miltiorrhiza*. Master thesis, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 76 pp. (in Chinese with English abstract)
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Ono, N. N. and L. Tian. 2011. The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. *Plant Sci.* 180: 439–446.
- Srivastava, S. and A. K. Srivastava. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27:29–43.
- Zhou, M. L., X. M. Zhu, J. R. Shao, Y. X. Tang, and Y. M. Wu. 2011. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl. Microbiol. Biot.* 90:1229–1239.

## Polyploidy Hairy Roots Induction of *Salvia miltiorrhiza*

Chi-Ni Hsia<sup>1,\*</sup>, Uei-Chern Chen<sup>2</sup>, Chin-Yi Tsao<sup>3</sup>, Choi-Yi Lee<sup>4</sup>, and Tzu-Ying Wu<sup>4</sup>

### Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, C. Y. Lee, and T. Y. Wu. 2013. Polyploidy hairy roots induction of *Salvia miltiorrhiza*. *J. Taiwan Agric. Res.* 62(3):280–288.

*Salvia miltiorrhiza* Bunge is a perennial herb of Labiatae Family. Its roots contain rich tanshinones and have been used for long history in traditional Chinese medicine to cure cardiologic disease. Using fast growth hairy roots is becoming a new strategy for production of valuable secondary metabolites. Application of polyploidy hairy roots may provide an advanced approach to enhance *in vitro* secondary metabolite production. The objective of this study was to establish an efficient polyploidy induction method for *S. miltiorrhiza* to generate sufficient amounts of polyploidy hairy roots for selection of high medicinal content hairy root lines. Hairy roots induced from *in vitro* leaves of diploid *S. miltiorrhiza* plants were used as induction explants. Ploidy of regenerated roots derived from colchicine treatments were analyzed using a flow cytometry. A leaf from a 2N plant was used as the control for flow cytometry which would indicate as 2C (complement quantity). Root explants were cultured in a solid medium containing with 2.5 mM colchicine for 2, 4 and 6 days to induce polyploidy hairy roots. Treatment of 2-day-exposure colchicines had the highest root formation rate of 80%. The highest polyploidy induction rate of 52.4–55% was obtained from 2- and 4-day-exposure of colchicine. Furthermore, root explants of tips and sections were used as induction explants incubated in a liquid medium containing 1.25 mM and 2.5 mM colchicine for 1, 2 and 3 days to induce polyploidy. It was found that explant type and exposure duration of colchicine had significant effects on root formation and polyploidy induction rate however effect of colchicine concentration was found not significantly. The highest root formation rate was found from root tip explant for 2-day-exposure. The highest 4C induction rates were found from either 2- or 3-day-exposure of the tip explant. In conclusion, root tips are more suitable explants than that of root sections for *in vitro* polyploidy induction. Root tip explant incubated in a solid medium containing 2.5 mM colchicines or in a liquid medium containing 1.25 mM colchicines for 2-day-exposure had the 4C hairy root induction rate higher than 55%. A total 33 lines of 4C hairy roots were subcultured to a new medium for 8 weeks of culture. The average biomass obtained from 4C hairy root lines showed only in 49% of the diploid hairy roots. In contrast, the average contents of cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone IIA obtained from 4C hairy root lines were all found higher than that of the diploid hairy roots. Moreover, an 11.2 folds increasing of the cryptotanshinone contents obtained from 4C hairy root lines and making a 2.6 folds increasing for the total tanshinone production than that of the 2C hairy roots.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* Bunge, Hairy root, Colchicine, Polyploidy, Tanshinone.

---

Received: June 28, 2013; Accepted: August 9, 2013.

\* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.