

四倍體丹參毛狀根系之時序培養及其丹參酮生產篩選

夏奇鈺¹ 曹進義² 吳姿穎³ 陳威臣^{4*}

摘要

夏奇鈺、曹進義、吳姿穎、陳威臣。2018。四倍體丹參毛狀根系之時序培養及其丹參酮生產篩選。台灣農業研究 67(1):94-105。

丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 為唇形科多年生草本植物，是中醫治療心血管疾病的重要藥材。4 倍體 (4N) 毛狀根與其 2 倍體 (2N) 相較，具有二次代謝物含量較高之特性，是離體培養大量生產植物二次代謝物的良好工具。本研究利用秋水仙素誘導所得之 4N 丹參毛狀根群，探討從中篩選出高丹參酮產量毛狀根系 (以下簡稱根系) 的可行性。首先以固體培養基進行連續 3 次、每次 8 wk 的根系培養，並依據丹參酮產量從 103 個 4N 根系中篩選出前 32 名，繼續進行連續 3 次、每次 8 wk 的液體培養；同時從 32 個 4N 根系中挑選出 2 個根系與 2N 根系一起進行時序培養。固體培養的結果顯示，4N 根系群的平均生質量較 2N 根系低，僅達 2N 根系的 67.2%，但 4N 根系群的平均總丹參酮含量較 2N 根系為高，是 2N 根系的 4.66 倍，且 4N 根系群的平均丹參酮產量為 2N 根系的 3.29 倍。檢視 4N 根系群丹參酮含量比例的變化，以隱丹參酮含量之比例增加最多，丹參酮 I 含量之比例減少最多，丹參酮 IIA 含量之比例減少其次。在固體培養中丹參酮產量表現最佳之前 10 名 4N 根系，在液體培養篩選後僅餘 2 根系仍保持於前 10 名，顯示 4N 根系在固、液體培養中的表現並非完全一致，建議在固體培養篩選階段保留較多的根系，作為後續液體培養篩選之用。時序培養結果顯示，4N 根系的生長速度較 2N 根系慢，2 個 4N 根系的生長模式亦存有差異；2 個 4N 根系之丹參酮含量皆於第 8 週達到最高，較 2N 根系於第 12 週達到最高明顯提早。綜合來看，雖然 4N 根系之生質量平均較 2N 根系為低，但因 4N 根系具有丹參酮含量較高，且丹參酮產量累積較快之特性，因此在丹參酮的生產效率上，4N 根系仍較 2N 根系為高，且透過篩選機制可將高產之 4N 根系選拔出來，作為大規模培養之基礎。

關鍵詞：丹參、毛狀根、多倍數、丹參酮、離體培養。

前言

丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 為唇形科 (Labiatae) 鼠尾草屬 (*Salvia*) 多年生草本植物，其乾燥根具有活血化癥之功效，列為神農本草經上品，是治療心血管疾病的之重要中藥。丹參中萃取出之化學成分包含脂溶性的二萜醌類和水溶性酚酸類，其中脂溶性成分有丹參酮 I (tanshinone I)、丹參酮 IIA (tanshinone IIA)、丹參酮 IIB (tanshinone IIB)、

隱丹參酮 (cryptotanshinone) 等 (Takahashi *et al.* 2002)，這些脂溶性化合物具有高度的抗氧化活性及強大的自由基清除能力 (Wang *et al.* 2003)。其中，丹參酮 I 與隱丹參酮能夠抑制 interleukin-12 (IL-12) 和 interferon-gamma (IFN- γ) 的產生，具有抗發炎與減緩免疫反應產生 (Kang *et al.* 2000)；丹參酮 IIA 具抗腫瘤活性，對急性骨髓型血癌 (acute promyelocytic leukemia) 細胞能產生誘導分化作用，使癌細胞分化為正常細胞，亦能誘導人類鼻咽癌

投稿日期：2017 年 7 月 4 日；接受日期：2017 年 9 月 14 日。

* 通訊作者：UCChen@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

² 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。

³ 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

細胞與肺腺癌細胞走向細胞凋亡 (Yuan *et al.* 2003)。隱丹參酮則被認為對革蘭氏陽性菌具有抗菌能力 (Lee *et al.* 1999) 外，並可抑制基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases)，具有抗血管內膜增生和抗動脈粥狀硬化等效用 (Suh *et al.* 2006)。

利用農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 轉殖育成之毛狀根 (hairy root)，因轉入之外源生長基因，與不定根相較，具有無須添加生長調節劑即可快速生長之優勢。毛狀根與懸浮細胞相較，除了遺傳穩定性較高外，還有二次代謝物含量較高之優點，具有以產業化方式大量生產高價值之植物二次代謝物的可行性 (Flores *et al.* 1999; Guillon *et al.* 2006; Ono & Tian 2011; Zhou *et al.* 2011)。過去的研究證實丹參毛狀根具有生產丹參酮之潛力，可藉由調整培養基成分與添加誘引劑來提高丹參酮的產量 (Chen *et al.* 2008, 2010; Chan *et al.* 2012)。此外，利用多倍體化來提高二次代謝物的含量亦為有效策略之一 (Dhawan & Lavania 1996)。4 倍體 (4N) 毛狀根系 (以下簡稱根系) 與其 2 倍體 (2N) 相較，在二次代謝物含量方面有提高之情形，例如生產治療瘧疾之青蒿素的黃花蒿 (*Artemisia annua*) 其 4N 根系之青蒿素產量是 2N 根系的 6 倍 (De Jesus-Gonzalez & Weathers 2003)，但這篇研究報告僅以 4 個 4N 根系作為調查基礎，顯示多倍體毛狀根需要更多的研究以釐清相關論點。Berkov *et al.* (2003) 利用 2N 及 4N 曼陀羅 (*Datura stramonium*) 植株之葉片，以農桿根群菌進行誘導分別得到 2N 及 4N 之毛狀根並加以比較，結果顯示在各自最佳培養條件下，以 4N 根系之莨菪鹼 (hyocyanine) 產量最高。本研究藉由前期誘導所得之丹參 4N 根系群 (Hsia *et al.* 2013)，總共 103 個 4N 根系以連續多批次的固體培養及液體培養，篩選丹參酮含量及產量較高之 4N 根系，並經由時序培養瞭解 4N 根系之生長與其二次代謝物含量變化間的關係，探討利用 4N 根系作為提高丹參酮產量策略的可行性。

材料與方法

毛狀根材料

2N 毛狀根係以丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 葉片經由農桿根群菌 R1601 感染所得並經長期篩選之根系 (Lin 2006)，4N 根系群為上述 2N 根系經由秋水仙素處理並以流式細胞儀確認之 103 個 4N 根系 (Hsia *et al.* 2013)。

固體培養篩選 4N 根系

以 103 個 4N 根系及 2N 根系進行固體培養，培養基含有 B5 鹽類配方 (Gamborg *et al.* 1968)、3% 蔗糖與 0.9% Bacto agar。培養容器為直徑 55 mm、高 15 mm 培養皿，每皿裝填 12.5 mL 之培養基。培養方式為每皿接種長約 1 cm 之根尖共 6 根，每個根系接種 2 皿，於 25°C 黑暗環境中培養 8 wk 後，將毛狀根取出調查其生質量並分析丹參酮含量後計算其產量。共進行連續 3 批次之培養。

液體培養篩選與時序培養 4N 根系

取於固體培養基中生長 4 wk 後之毛狀根作為接種材料，切取長約 1–1.5 cm 之根尖為培植體。液體培養基之成分與固體培養基相同但未加入凝膠物質，培養容器為 125 mL 三角瓶，內裝有 20 mL 培養液，每瓶接種 5 條根尖。液體培養共有 32 個參試之 4N 根系，每一根系共培養 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 震盪培養，培養 8 wk 後將毛狀根取出，調查之項目與固體培養試驗相同，共進行連續 3 批次之培養。

時序培養的培養方式與液體培養相同，接種材料為 4N-16 號與 30 號之根系以及作為對照組之 2N 根系，分別於培養 6、8、10 及 12 wk 後，各取樣 3 瓶進行與固體培養相同之調查。

丹參酮萃取與含量分析

將於 45°C 烘箱乾燥 2 d 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 μm 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 min^{-1} ，吸收波長 254 nm ，分別檢測隱丹參酮 (cryptotanshinone; Crypto)、丹參酮 I (tanshinone I; Tan I)、丹參酮 IIA (tanshinone IIA; Tan IIA) 之含量。總丹參酮含量 (mg g^{-1}) = 隱丹參酮含量 (mg g^{-1}) + 丹參酮 I 含量 (mg g^{-1}) + 丹參酮 IIA 含量 (mg g^{-1})。總丹參酮產量 (mg L^{-1}) = 丹參毛狀根生質量 (g L^{-1}) \times 總丹參酮含量 (mg g^{-1})。

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 Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc. 2014) 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

利用固體培養篩選 4N 根系

以 103 個 4N 根系進行連續三批次的固體培養，分別調查各根系之生質量、丹參酮含量 (包括隱丹參酮、丹參酮 I、丹參酮 IIA)，並計算總丹參酮含量及總丹參酮產量，將 103 個 4N 根系 3 批次培養之平均值以頻度分布方式表示於圖 1。在生質量方面，4N 根系群之生質量分布在 $3.2\text{--}4.0 \text{ g L}^{-1}$ 之間最多 (圖 1A)，平均為 3.54 g L^{-1} ，低於 2N 根系之平均值 5.27 g L^{-1} ，僅為 2N 根系的 67.2%。隱丹參酮含量方面，4N 根系群含量分布以 $2.4\text{--}3.6 \text{ mg g}^{-1}$ 之間最多 (圖 1B)，平均為 3.50 mg g^{-1} ，是 2N 根系平均值 0.52 mg g^{-1} 的 6.73 倍，103 個 4N 根系中只有 1 個根系 (0.97%) 之隱丹參酮含量低於 2N 根系。丹參酮 I 含量方面，4N 根系群含量分布以 $1.0\text{--}1.8 \text{ mg g}^{-1}$ 之間最多 (圖 1C)，平均為 1.51 mg g^{-1} ，是 2N 根系平均值 0.48 mg g^{-1} 的 3.15 倍，103 個 4N 根系中只有 2 個根系 (1.94%) 之丹參酮 I 含量低於 2N 根系。丹參酮 IIA 含量方面，4N 根系群含量分布以 $0.3\text{--}0.6 \text{ mg g}^{-1}$ 之間最多 (圖 1D)，平均為 0.53 mg g^{-1} ，

是 2N 根系平均值 0.19 mg g^{-1} 的 2.79 倍，103 個 4N 根系中只有 5 個根系 (4.85%) 之丹參酮 IIA 含量低於 2N 根系。總丹參酮含量方面，4N 根系群分布在 $3.75\text{--}5.25 \text{ mg g}^{-1}$ 之間最多 (圖 1E)，平均值為 5.55 mg g^{-1} ，是 2N 根系平均值 1.19 mg g^{-1} 的 4.66 倍，103 個 4N 根系中只有 1 個根系 (0.97%) 之總丹參酮含量低於 2N 根系。在總丹參酮產量方面，4N 根系群分布以 $16\text{--}24 \text{ mg L}^{-1}$ 之間最多 (圖 1F)，平均值為 20.07 mg L^{-1} ，是 2N 根系平均值 6.10 mg L^{-1} 的 3.29 倍，103 個 4N 根系中只有 4 個根系 (3.88%) 之總丹參酮產量低於 2N 根系。檢視 3 個批次 4N 根系群之平均隱丹參酮、丹參酮 I 及丹參酮 IIA 含量所占比例，如圖 2 所示。2N 根系之 3 種丹參酮的比例依序為 43.7、40.3 及 16.0%；而 4N 根系群之 3 種丹參酮含量的比例依序為 63.2、27.1 及 9.7%，顯示 4N 根系群以隱丹參酮含量比例增加最多，達 19.5%，以丹參酮 I 含量比例減少 13.2% 最多，丹參酮 IIA 含量比例減少 6.3% 其次。

利用液體培養篩選 4N 根系

依據固體培養 4N 根系之總丹參酮產量，在 103 個 4N 根系中挑選出前 32 名之根系，分別進行連續 3 批次的液體培養，將 32 個 4N 根系 3 批次培養之平均值以頻度分布方式表示於圖 3。在生質量方面，4N 根系群生質量分布以 $3.75\text{--}5.25 \text{ g L}^{-1}$ 之間最多，平均為 5.28 g L^{-1} ，僅及 2N 根系平均值 8.54 g L^{-1} 的 61.8%，32 個 4N 根系中只有 1 個根系 (3.13%) 之生質量高於 2N 根系 (圖 3A)。隱丹參酮含量方面，32 個 4N 根系群含量分布以 $1.8\text{--}4.2 \text{ mg g}^{-1}$ 之間最多 (圖 3B)，平均為 2.87 mg g^{-1} ，是 2N 根系平均值 0.24 mg g^{-1} 的 12.0 倍，32 個 4N 根系之隱丹參酮含量全部高於 2N 根系。丹參酮 I 含量方面，4N 根系群分布以 $0.6\text{--}1.8 \text{ mg g}^{-1}$ 之間最多 (圖 3C)，平均為 1.38 mg g^{-1} 是 2N 根系平均值 0.75 mg g^{-1} 的 1.84 倍，32 個 4N 根系中有 5 個根系 (15.63%) 之丹參酮 I 含量低於 2N 根系。丹參酮 IIA 含量方面，4N 根系群含量分布以 $0.3\text{--}0.9 \text{ mg g}^{-1}$ 之間最多 (圖 3D)，平均為 0.68 mg g^{-1} ，是 2N 根系平均值

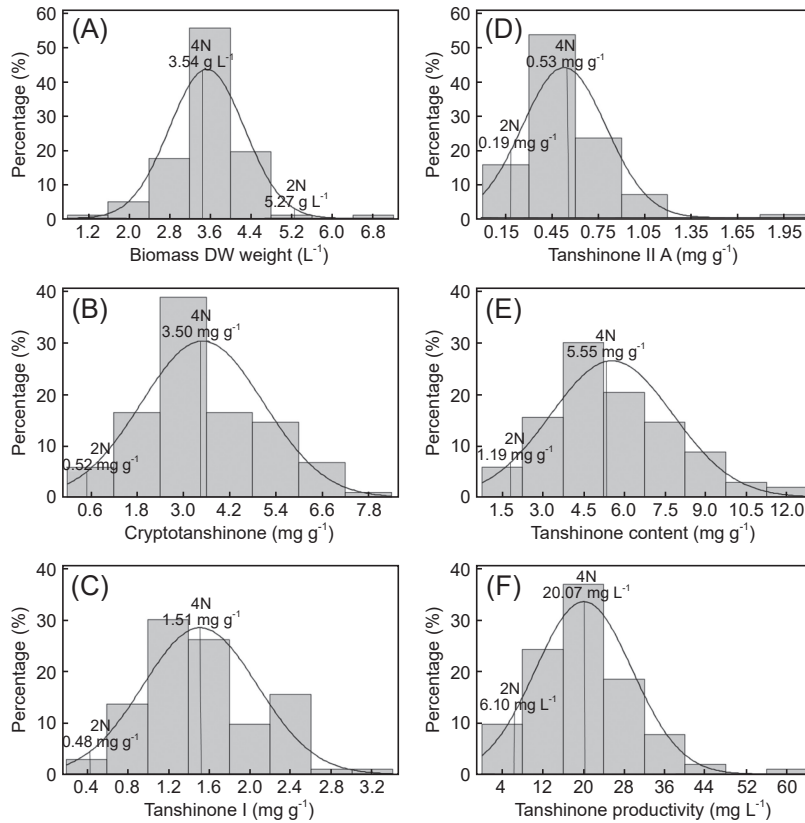


圖 1. 103 個 4N 丹參毛狀根系連續 3 批次固體培養之平均值頻度分布情形。生質量 (A)、隱丹參酮含量 (B)、丹參酮 I 含量 (C)、丹參酮 IIA 含量 (D)、總丹參酮含量 (E) 及丹參酮產量 (F)。

Fig. 1. Mean distributions from 103 lines of 4N hairy roots of *S. miltiorrhiza* on biomass (A), content of cryptotanshinone (B), tanshinone I (C), tanshinone IIA (D), total tanshinone (E), and production of tanshinones (F) after three consecutive cultures on the solid medium.

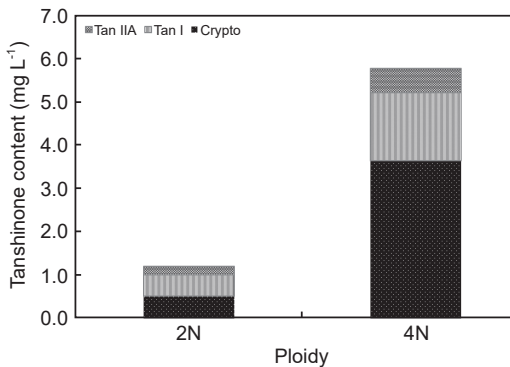


圖 2. 固體培養之 2N 及 103 個 4N 毛狀根系所含丹參酮之比較。

Fig. 2. Tanshinone compositions of 2N and 103 lines of 4N hairy roots of *S. miltiorrhiza* cultured on the solid medium. Tan I: tanshinone I, Tan IIA: tanshinone IIA and Crypto: cryptotanshinone.

0.41 mg g⁻¹ 的 1.66 倍，32 個 4N 根系中有 6 個根系 (18.75%) 之丹參酮 IIA 含量低於 2N 根系。總丹參酮含量方面，4N 根系群分布在 4.0–6.0 mg g⁻¹ 之間最多 (圖 3E)，平均值為 4.93 mg g⁻¹，是 2N 根系平均值 1.41 mg g⁻¹ 的 3.50 倍，32 個 4N 根系中僅有 1 個根系 (3.13%) 之總丹參酮含量低於 2N 根系。在總丹參酮產量方面，4N 根系群以 15–35 mg L⁻¹ 之間最多 (圖 3F)，平均值為 26.65 mg L⁻¹，是 2N 根系平均值 12.66 mg L⁻¹ 的 2.11 倍，32 個 4N 根系中有 5 個根系 (15.63%) 總丹參酮產量低於 2N 根系。

4N 根系之時序培養

選取在固體培養篩選中總丹參酮產量最高

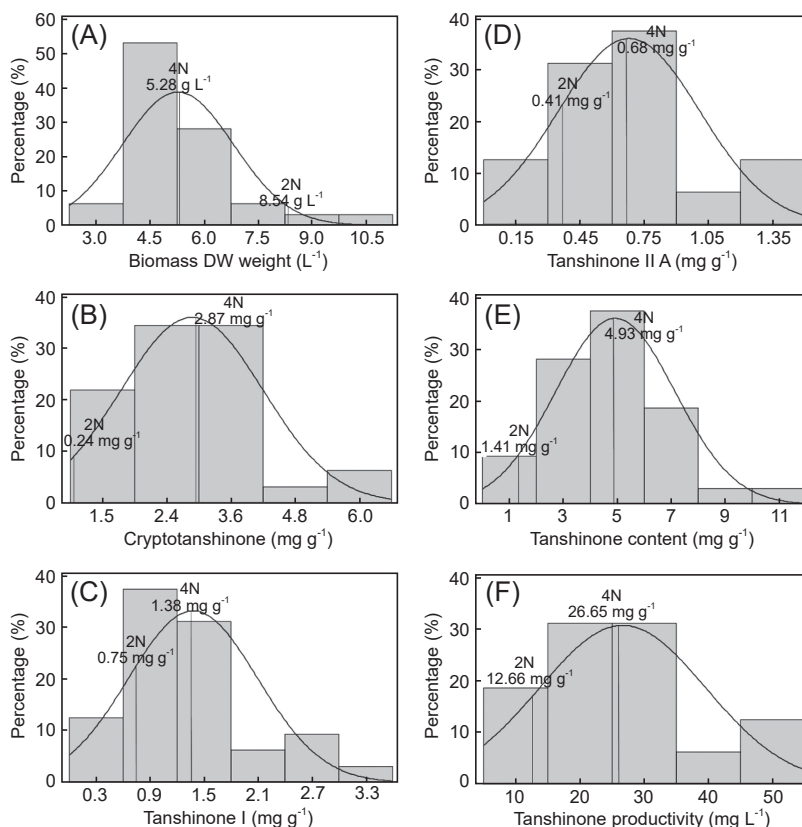


圖 3. 32 個 4N 丹參毛狀根系連續三批次之液態培養之平均值頻度分布情形。生質量 (A)、隱丹參酮含量 (B)、丹參酮 I 含量 (C)、丹參酮 IIA 含量 (D)、總丹參酮含量 (E) 及丹參酮產量 (F)。

Fig. 3. Mean distributions from 32 lines of 4N hairy roots of *S. miltiorrhiza* on biomass (A), content of cryptotanshinone (B), tanshinone I (C), tanshinone IIA (D), total tanshinones (E), and production of tanshinone (F) after three consecutive cultures on the liquid medium.

之 4N-16 號根系，以及生質量高但丹參酮含量偏低之 4N-30 號根系與 2N 根系同時進行時序培養，分別於培養 6、8、10 及 12 wk 後取樣進行調查，結果如圖 4 及圖 5 所示。對照組之 2N 根系於 8 wk 培養後生質量達到最高，並維持至 10 wk 後略微下降，其隱丹參酮、丹參酮 I 及丹參酮 IIA 皆持續增加至第 12 週；4N-16 號與 2N 對照組相較，生長明顯較慢，生質量於第 12 週時方達最高，但其隱丹參酮、丹參酮 I 及丹參酮 IIA 則於第 8 週皆達到最高，之後明顯下降；4N-30 號根系於 8–10 wk 間生質量明顯增加，於第 10 週時達到最高，但其隱丹參酮、丹參酮 I 及丹參酮 IIA 亦於第 8 週即達最高，之後亦明顯下降；總丹參酮含量方面，2N 根系於第 12 週達最高，但 4N-16 號

及 30 號根系皆在第 8 週達到高點後下降。丹參酮產量方面，2N 根系於第 12 週達最高，4N-16 號及 30 號根系皆在第 8 週達最高後下降，雖然 4N-16 號根系在第 10 週後有回升之趨勢，但並未超過第 8 週之高點（圖 4）。從 2N 及 2 個 4N 根系的生長情形來看，可明顯看出 2N 較 4N 根系生長情形較佳，4N-30 號根系並合併有癒傷組織狀態之細胞增生（圖 5）。

討論

利用轉殖毛狀根取代細胞在離體 (*in vitro*) 環境中培養，能夠避開自然環境中的各種不利因子，猶如化學工廠 (chemical factories) 以產業化方式大量生產高價之植物二次代謝物，是

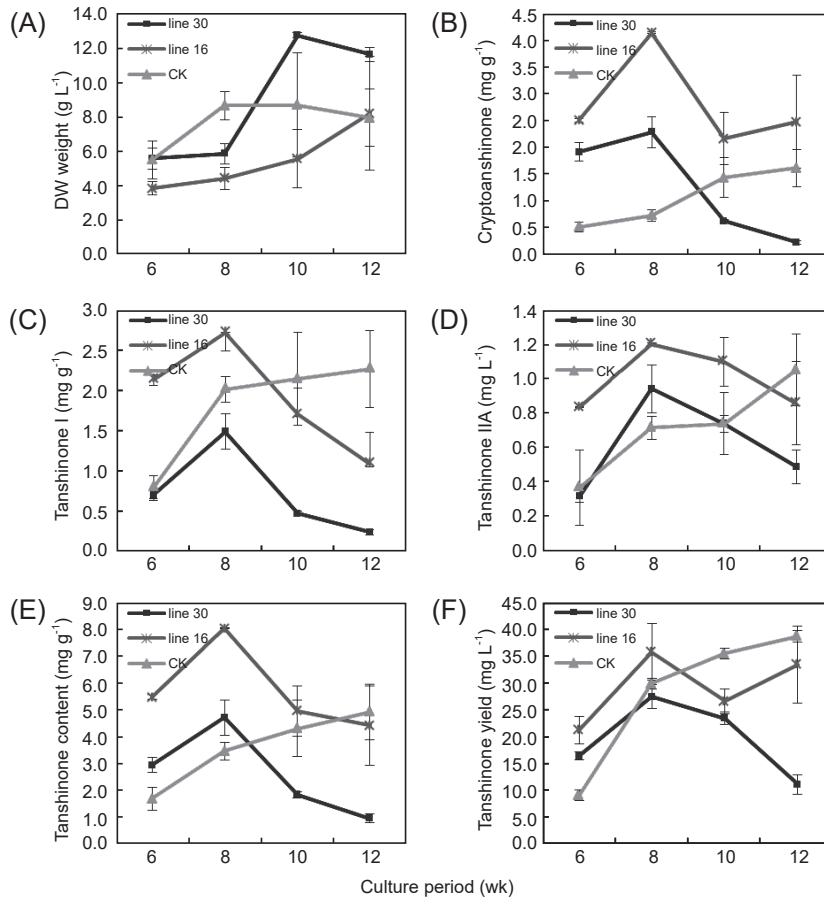


圖 4. 2N (CK) 及 4N (16、30 號) 丹參毛狀根系時序培養之表現。生質量 (A)、隱丹參酮 (B)、丹參酮 I (C)、丹參酮 IIA (D)、總丹參酮含量 (E) 及丹參酮產量 (F)。

Fig. 4. Time course for 2N (CK) and 4N hairy root lines (line 16 and 30) of *S. miltiorrhiza* on biomass (A), content of cryptotanshinone (B), tanshinone I (C), tanshinone IIA (D), total tanshinone (E), and production of tanshinone (F).

近年來生技產業發展的新趨勢 (Guillon *et al.* 2006; Georgiev *et al.* 2007; Ono & Tian 2011; Zhou *et al.* 2011; Habibi *et al.* 2017)。針對提高毛狀根的生產效率可以從多方面來改進，包括選用高產根系、優化培養條件、添加誘引劑提高二次代謝物含量以及利用生物反應器放大培養規模等 (Georgiev *et al.* 2007; Srivastava & Srivastava 2007)。此外，利用多倍體化來提高二次代謝物含量亦為有效策略之一。在本研究中以秋水仙素處理丹參 2N 毛狀根得到之 103 個 4N 根系進行培養，在固體培養階段的結果顯示，99.03% 之 4N 根系其總丹參酮含量皆較 2N 根系為高，證實多倍體對二次代謝物

含量具有提升之效果。此外，本研究中之 103 個 4N 根系群誘導自同一 2N 根系 (Hsia *et al.* 2013)，誘導所得之 4N 根系理論上其遺傳表現應具有一致性，但觀察這些 4N 根系的個別表現，卻發現個別根系從生長量到丹參酮的含量以及產量都有相當幅度的差異。例如，本研究在固體培養階段，4N 根系生質量最高與最低者相較，差異可達 5.9 倍 (10.40 DW g L⁻¹/1.76 DW g L⁻¹)，總丹參酮含量最高與最低者相較，差異可達 66.1 倍 (12.56 mg g⁻¹/0.19 mg g⁻¹)，總丹參酮產量最高與最低者相較，差異可達 48.4 倍 (40.20 mg L⁻¹/0.83 mg L⁻¹) (數據未顯示)，足見 4N 根系間在二次代謝物的生產上具

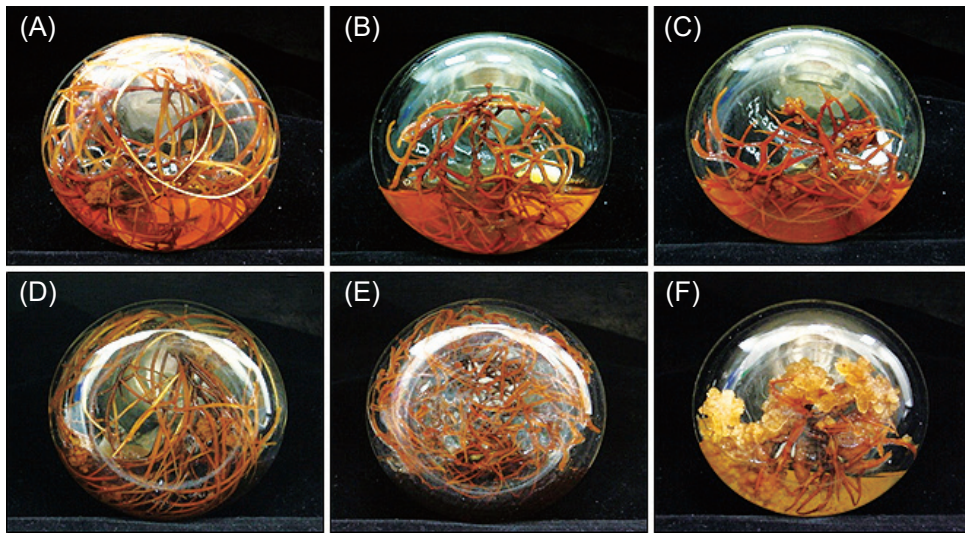


圖 5. 2N 及 4N 毛狀根系於液體培養 8 wk (上排) 及 12 wk (下排) 之生長情形。2N 根系 (A)、(D); 4N-16 號 (B)、(E) 及 4N-30 號根系 (C)、(F)。

Fig. 5. Root growth of 2N and 4N hairy root lines of *S. miltiorrhiza* at various culture times. Upper row: 8-wk-culture, lower row: 12-wk-culture. 2N (A), (D), 4N-16 (B), (E), and 4N-30 (C), (F).

有相當大之差異性。

Lavania (2013) 指出多倍體毛狀根與 2N 毛狀根雖然所含有之二次代謝的主要產物相同，但其含量多寡會產生變化，且伴隨一些次要產物的增減與改變。過去多倍體化的研究指出，藉由多倍體化提高二次代謝物產量的機制可能與數量調控基因劑量的改變、基因調控交互作用的複雜化，以及 DNA 甲基化造成表觀遺傳現象 (epigenetic phenomena) 等有關 (Lavania 2005, 2013)。一般認為染色體倍加主要是誘導基因及基因體數量的增加，在過程中可能會導致基因體的不穩定、染色體的不平衡，最終導致基因體結構、基因表現以及發育特性的改變。因此，雖然同源多倍體 (autopolyploidy) 在 DNA 的變化很小，但仍會因上述原因以及 DNA 甲基化伴隨表觀遺傳的改變，而產生許多複雜的變化。由此推測，本研究中 2N 根系之每一根尖在多倍體化誘導的過程中，雖然其基因組成相同，但因每一根尖其染色體細胞週期的不一致，可能導致不同程度之 DNA 甲基化，造成 4N 根系群在丹參酮的合成上有相當大的差異性。

此外，Berkov *et al.* (2003) 由 2N 及 4N 曼

陀羅 (*Datura stramonium*) 植株誘導而來之 2N 及 4N 毛狀根，顯示兩者在生物鹼頻譜分布與累積量上有相當程度之不同。本研究中僅檢測 3 種丹參酮的含量，並未檢測其他二次代謝物種類及含量的變化，因此無法加以比較。但本研究的結果亦顯示，4N 根系與 2N 根系相較，在 3 種丹參酮含量比例的增減亦具有差異性，以隱丹參酮含量比例增加最多、丹參酮 I 含量比例減少最多，而丹參酮 IIA 含量比例減少其次。換言之，雖然 4N 根系之 3 種丹參酮含量雖然皆有增加，但 3 種丹參酮之含量並非以相同比例增加。此外，雖然 4N 根系群之總丹參酮含量皆明顯提高，卻伴隨著生質量普遍較 2N 根系為低之情形，平均生質量僅及 2N 根系之 67.2%。

Lavania (2013) 以多種藥用及香草植物進行多倍體化研究，結果顯示通過多倍體化雖能提高植物二次代謝物的含量，但未能保證植物體積 (body size) 的增大。原因在於多倍體化雖能造成細胞體積 (cell size) 的增加，但整體植物體積的增大主要取決於二次代謝物生產路徑的複雜程度，亦即二次代謝物複雜度越高，則植物體積減少的機率亦增加。亦由此推測，

丹參 4N 根系細胞在提高二次代謝物合成的同時，可能導致生長所需之一次代謝物合成量的相對減少，造成生長的緩慢，此結果並反應在 4N 根系群生質量的降低。

利用離體培養生產植物二次代謝物的研究，早期大都以細胞培養系統進行，細胞培養系統在長期培養後，常有二次代謝物含量過低或是生產不穩定等問題。推測其原因，可能與細胞在多次培養後，因培養條件產生了篩選作用，不同細胞族群間因此產生消長。其中，二次代謝物含量較高的細胞株，因為在生長及繁殖競爭上居弱勢，其族群在所有培養細胞中所占的比例會隨著細胞繁殖代數的增加而逐漸下降，因而造成生產系統中二次代謝物產量的下降 (Yesil-Celiktas *et al.* 2010)。惟植物細胞株的篩選有其難度，因植物細胞有集結 (aggregate) 之特性，單一細胞分離不易，且單細胞培養的條件亦較嚴苛。相對於單一細胞的逐一篩選有其困難度，毛狀根系的育成則可利用根尖為單位進行篩選，甚至對來自同一根系但不同分支間的生長差異，藉由毛狀根在固體培養基中之生長型態加以判斷選別，達到篩選高產根系的目的。

Mallol *et al.* (2001) 在人參毛狀根中觀察到 3 種不同形態之毛狀根，分別為標準、癒傷組織狀及缺乏分支等 3 種，但高生質量及高人參皂苷產量之特性則只存在於標準毛狀根。在本研究中亦有相似之觀察，例如在 4N-30 號根系觀察到癒傷組織狀的生長 (圖 5)，其丹參含量與標準毛狀根形態之 4N-16 號根系相較偏低。在本研究中由秋水仙素誘導所得之 103 個 4N 根系，以接種單一根系於固體培養中進行連續 3 批次篩選，在固體培養第二批時發現有 6 個根系因生長勢差無法進行分析，第 3 批次培養時又增加 2 個生長勢差之根系。足見不同根系間之生長穩定性並不相同，篩選初期使用固體培養有助於觀察毛狀根之生長模式 (分支性及生長形態)，達到早期篩選並淘汰生長不良根系之目的。

Georgiev *et al.* (2007) 指出利用離體培養大量生產具經濟價值之二次代謝物需配合擴大培養規模，以及後續產品純化與回收等流程，

藉以達到經濟上的成本考量。液體培養即為擴大培養規模之第一步，因此本研究在固體培養後接續以液體搖瓶培養進行第二階段的 4N 根系篩選。在本研究所以未用液體培養作為第一階段篩選的原因，在於毛狀根在液體培養中無法避免根系間的纏繞糾結，造成繼代時所取之根尖培植體無法清楚回溯其原始接種根尖之生長表現。因此，無法藉由生長模式來淘汰不良根系及其分支，故第一階段採取固體培養篩選。然而，因大量培養時需藉由液體培養來擴大培養規模，故以液體培養進行第二階段篩選，觀察 4N 根系在液體培養中之生產潛力。

圖 3 為 32 個 4N 根系在液體培養 3 批次之表現，其中在固體培養中排名前 10 名之根系，在液體培養後僅存 2 個根系 (16 號與 42 號) 仍保持在前 10 名。而在固體培養名列第 1、31 及 32 之根系，在液體培養時排名分別為第 11、第 7 及第 10 (資料未顯示)，亦即液體培養與固體培養篩選的結果有相當大的差異性。為避免表現優異之根系因篩選制度而被錯誤淘汰，建議在第一階段之固體培養篩選應儘量保留較多的根系進入第二階段之液體培養篩選，可以避免一些在液體培養中具有生長潛力之根系，因為篩選制度的不適當而提早被淘汰。

Pavlov *et al.* (2009b) 指出，高產根系的篩選是最基本且在研究初期即應進行之事項，但其重要性卻常被忽略。此一研究利用 2N 及 4N 曼陀羅花 (*Datura stramonium*) 植株之葉片，以農桿根群菌誘導所得之 2N 及 4N 毛狀根各 20 個根系，以固體培養每 3 wk 繼代 1 次，連續培養 24 wk 後，篩選出生長最快速之 10 個根系。再從 2N 及 4N 根系中，各選出 1 個莖若鹼產量最高之根系，進行後續之營養條件測試。本研究在固體培養階段之篩選率為 31.1% (32/103) 低於 Pavlov *et al.* (2009b) 使用之 50% (10/20) 篩選率。由本研究之結果來看，建議可適度提高第一階段固體培養之篩選率；但本研究之優點為具有較大之備選族群 (103 根系)，較 Pavlov *et al.* (2009b) 僅以 20 根系作為備選族群為佳。此外，本研究比較 2N 及 4N 根系在固、液體培養中的表現，觀察到對照組之 2N 根系在液體培養時有較佳的表現。

以生質量、丹參酮含量及產量三方面來看，2N 根系由固體轉為液體培養後，分別增加 1.61 倍、1.18 倍及 2.08 倍，但 32 個 4N 根系由固體轉為液體培養後，僅分別增加為 1.47 倍、0.86 倍及 1.27 倍。推測原因，為本研究使用之 2N 根系是過去長時間培養所篩選出來之優良根系 (Lin 2006)，對液體培養已具有良好之適應力，因此在液體培養中的表現相對較佳。

時序培養是進行大量培養前必須建立的基本資訊，主要為瞭解毛狀根於液體培養中之生長、養分吸收與其二次代謝物累積在時間軸上的變化及關聯性，作為監測二次代謝產物收穫時間的依據。我們過去在丹參 2N 毛狀根的研究顯示，2N 根系的丹參酮是在毛狀根生長進入定常期 (stationary phase) 後才開始大量累積 (Chen *et al.* 2008)，本研究中 2N 根系的表現亦符合此觀察。此外，本研究之結果顯示 4N 根系的生長速度較 2N 根系慢，但其丹參酮的累積卻較 2N 根系提早，亦即 4N 根系的生理老化時間可能較 2N 根系提早。在實務上雖然延長 4N 根系培養時間有助生質量的提升，但必須考慮此舉伴隨著丹參酮含量降低的影響。綜合從生質量到各種丹參酮含量累積的表現來看，顯示 4N 根系的生長及丹參酮的累積模式與 2N 根系並不相同，在本研究中固、液體培養篩選皆以培養 8 wk 後作為調查時間，依照時序培養結果所示，在 8 wk 時 4N 根系的生質量尚未達最高點，但丹參酮含量已達最高，在此時間點收穫之 4N 根系其丹參酮產量仍優於 2N 根系。也就是說 4N 根系因具有丹參酮累積所需時間較短的特性，在培養時間的效率上優於 2N 根系，亦即培養所需時間越短，在相同培養時間內可增加培養的批數。以一年 52 wk 為計算基準，8 wk 收穫的 4N 根系可培養批次為 6.5 次，10 wk 收穫之 2N 根系培養批次為 5.2 次，若延至 12 wk 收穫則培養批次降為 4.3 次。

以離體培養方式生產植物二次代謝物，與以生產種苗為目標的培養方式相較，前者在優化培養條件的判定上較為複雜，因為培養系統的好壞不能以單一因子表現來評斷。例如，單純以培植體生質量或單純以二次代謝物的含量

高低來判斷，尤其當提高生質量與提高二次代謝物含量所需之培養條件有拮抗或競爭時，或兩者所需培養條件不一致時，必須以二次代謝物的產量為終極目標來調整生產策略，亦即理想中的高產丹參毛狀根的定義應為丹參酮總產量的提高。在過去的研究中對 2N 丹參毛狀根培養條件的最佳化，已累積有相當多之資料 (Chen *et al.* 2008, 2010; Chan *et al.* 2012)，但對於 4N 毛狀根培養條件最佳化的研究則相對缺乏，因此以 2N 根系的培養條件套用於 4N 根系是否適當必須檢討。

Pavlov *et al.* (2009b) 以曼陀羅 (*Datura stramonium*) 葉誘導所得之 2N 及 4N 毛狀根，比較兩者培養所需營養條件之差異。結果顯示，2N 毛狀根以 3% 蔗糖培養時，有最高之生質量及莨菪鹼產量，蔗糖濃度繼續增加不利生質量及莨菪鹼的生成；而 4N 毛狀根之生質量及莨菪鹼產量，則隨著蔗糖濃度增加而提高，至 7% 達最高，其生質量及莨菪鹼分別為 2N 毛狀根的 2.75 倍及 2.5 倍。其他營養成分之差異如 PO_4^{3-} 濃度，2N 毛狀根培養之最佳濃度為 1.25 mM，4N 毛狀根則為 0.63 mM，其生質量及莨菪鹼產量分別是 2N 毛狀根的 2 倍及 1.35 倍。此外，Pavlov *et al.* (2009a) 以 MS 培養基為基礎，進行主要營養成分最佳化研究，結果顯示 2N 及 4N 根系獲得莨菪鹼最高產量之培養基 C/N 比值，分別從原本 MS 培養基的 10.7 增加至 17.2 (2N) 及 21.5 (4N)。在最佳化的培養條件下，4N 根系之莨菪鹼產量要比 2N 根系為高。本研究中 4N 根系使用之培養基及培養週期等條件，皆沿用過去 2N 根系培養之資料，未來將針對優良之 4N 根系優化其培養條件以確認其生產潛力。

過去發表的報告指出，4N 毛狀根有較高的二次代謝物含量 (De Jesus-Gonzalez & Weathers 2003; Dehghan *et al.* 2012)，本研究亦顯示相同之結果。但進一步分析 4N 之個別根系，發現個別根系在生質量及二次代謝物含量方面的表現具有相當大之差異性，必須經由篩選來確認優秀之高產根系。惟篩選策略會影響優良根系的選出，例如本研究中液體培養之 32 個根系是固體培養後依據其總丹參酮產量所選出，

3種丹參酮產量中又以隱丹參酮所占比例最高。因此，液體培養中4N根系之隱丹參酮含量在32個根系中表現相當一致，皆明顯較2N根系為高。相較於4N根系隱丹參酮的絕對偏高，4N根系的丹參酮I與丹參酮IIA含量雖然普遍亦較2N根系為高，但比例上不如隱丹參酮含量表現之一致。這個現象主要是受到篩選時以總丹參酮含量為依據，而總丹參酮含量中又以隱丹參酮為最高所致。這也提示我們未來可針對特定二次代謝物的種類及其含量對個別根系加以篩選，達到客製化之目的。離體毛狀根培養系統的建立，係為配合產業化方式大量生產高價之植物二次代謝物，許多基本之培養條件必須在放大培養前逐一加以確認，高產根系的篩選即為其基礎，但卻最易為人們所忽略。本篇研究的結果，亦證實此一觀點的正確性。未來將針對目前篩選所得之高產4N根系進行培養條件之最佳化，讓優良4N根系達到其最佳之生產狀態，充分發揮其高產之優勢。

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. C.* 58:42–46.
- 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)
- 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)
- Dehghan, E., S. T. Häkkinen, K. M. Oksman-Caldentey, and F. S. Ahmadi. 2012. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 110:35–44.
- 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.
- 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 Res.* 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.
- Habibi, P., M. F. G. De Sa, A. Makhzoum, S. Malik, A. L. L. da Silva, K. Hefferon, and C. R. Soccol. 2017. Bioengineering hairy roots: Phytoremediation, secondary metabolism, molecular pharming, plant-plant interactions and biofuels. p.213–251. *in: Sustainable Agriculture Reviews*. Vol. 22. (Lichtfouse, E., ed.) Springer. Cham, Switzerland. 328 pp.
- Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, and T. Y. Wu. 2013. Polyploidy hairy roots induction of *Salvia miltiorrhiza*. *J. Taiwan Agric. Res.* 62:280–288. (in Chinese with English abstract)
- Kang, B. Y., S. W. Chung, S. H. Kim, S. Y. Ryu, and T. S. Kim. 2000. Inhibition of interleukin-12 and interferon- γ production in immune cells by tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Immunopharmacology* 49:355–361.
- Lavania, U. C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genet. Resour.* 3:170–177.
- Lavania, U. C. 2013. Polyploidy, body size, and opportunities for genetic enhancement and fixation of heterozygosity in plants. *Nucleus* 56:1–6.
- Lee, D. S., S. H. Lee, J. G. Noh, and S. D. Hong. 1999. Antibacterial activities of cryptotanshinone and dihydrotanshinone I from a medicinal herb, *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:2236–2239.
- 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)
- Mallol, A., R. M. Cusidó, J. Palazón, M. Bonfill, C. Morales, and M. T. Piñol. 2001. Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry* 57:365–371.
- Ono, N. N. and L. Tian. 2011. The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. *Plant Sci.* 180:439–446.
- Pavlov, A. I., V. G. Georgiev, A. S. Marchev, and S. H. Berkov. 2009a. Nutrient medium optimization for hyoscyamine production in diploid and tetraploid *Datura stramonium* L. hairy root cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:2239–2245.
- Pavlov, A., S. Berkov, J. Weber, and T. Bley. 2009b. Hyoscyamine biosynthesis in *Datura stramonium* hairy root *in vitro* systems with different ploidy levels. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157:210–225.
- Srivastava, S. and A. K. Srivastava. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27:29–43.
- Suh, S. J., U. H. Jin, H. J. Choi, H. W. Chang, J. K. Son, S. H. Lee, S. J. Jeon, K. H. Son, Y. C. Chang, Y. C. Lee, and C. H. Kim. 2006. Cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* Bunge has an inhibitory effect on TNF- α -induced matrix metalloproteinase-9 production and HASMC migration via downregulated NF- κ B and AP-1. *Biochem. Pharmacol.* 72:1680–1689.
- Takahashi, K., X. Ouyang, K. Komatsu, N. Nakamura, M. Hattori, A. Baba, and J. Azuma. 2002. Sodium tanshinone IIA sulfonate derived from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) attenuates hypertrophy induced by angiotensin II in cultured neonatal rat cardiac cells. *Biochem. Pharmacol.* 64:745–750.
- Wang, A. M., S. H. Sha, W. Lesniak, and J. Schacht. 2003. Tanshinone (*Salviae miltiorrhiza* extract) preparations attenuate aminoglycoside-induced free radical formation *in vitro* and ototoxicity *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1836–1841.
- Yesil-Celiktas, O., A. Gurel, and F. Vardar-Sukan. 2010. Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors. *Transworld Research Network. Kerala, India.* 54 pp.
- Yuan, S. L., X. J. Wang, and Y. Q. Wei. 2003. Anticancer effect of tanshinone and its mechanisms. *Chin. J. Cancer* 22:1363–1366.
- 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. Biotechnol.* 90:1229–1239.

Screening on Tanshinone Production and Time Course Culture of Tetraploidy Hairy Roots of *Salvia miltiorrhiza*

Chi-Ni Hsia¹, Chin-Yi Tsao², Tzu-Ying Wu³, and Uei-Chern Chen^{4,*}

Abstract

Hisa, C. N., C. Y. Tsao, T. Y. Wu, and U. C. Chen. 2018. Screening on tanshinone production and time course culture of tetraploidy hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*. J. Taiwan Agric. Res. 67(1):94–105.

Salvia miltiorrhiza Bunge, a perennial herb of Labiatae Family, has been used to cure cardiology disease in traditional Chinese medicine for long history. Polyploidy hairy roots containing higher concentration of secondary metabolites than its diploidy are considered as better explants for *in vitro* production of valuable secondary metabolites. The objective of this study was to establish a selection strategy on tanshinone production of tetraploidy hairy root lines (4N lines) which were induced from the diploid hairy root line (2N line) by colchicine treatment. Three consecutive cultures in solid medium were first conducted on 103 lines of 4N. Among them, 32 lines with the highest tanshinone production were selected for another 3 consecutive liquid medium culture. Meanwhile, two 4N lines and the 2N line were used to conduct the time course culture in liquid medium for 12 wk span. Screening results from solid cultures showed that the average biomass of 103 lines of 4N was only counted 67.2% of the 2N line. However, average total tanshinone contents and productivity of 4N lines were counted 4.66 times and 3.29 times higher than that of the 2N line, respectively. Composition ratios of cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone IIA contents on 4N lines and 2N line were compared. It was found ratio of cryptotanshinone increasing the most in contrast decreasing ratios of tanshinone I and tanshinone IIA. The ten best lines of 4N selected from solid medium on production of tanshinones were found having only 2 lines remaining in the best ten after liquid medium selection. In order not to miss elite lines, lower selection strength was recommended in the stage of solid culture on 4N lines. Results of time course culture showed that lagging growth of 4N lines than that of 2N line. Moreover, two 4N lines had slightly different growth rates. The highest tanshinone contents were found after 8 wk of culture on 4N lines which was much earlier than that of 12 wk of culture on 2N line. In conclusion, although 4N lines have lower biomass than that of the 2N line, 4N lines have higher tanshinone contents and shorter culture period on tanshinone accumulation which would provide better efficacy on tanshinone production than that of 2N lines. It is thought that selection of elite 4N lines will provide a good foundation for *in vitro* production secondary metabolites.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, Hairy root, Polyploidy, Tanshinone, *In vitro* culture.

Received: July 4, 2017; Accepted: September 14, 2017.

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

¹ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.