

pH值、激素对新疆紫草悬浮培养 细胞生长及紫草宁衍生物合成的影响

方德秋 侯嵩生 李新明

叶和春 李国凤

(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

(中国科学院植物研究所 北京 100044)

提要 报道了不同pH值、激素对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物合成的影响。结果表明,新疆紫草细胞具有自我调节其培养液pH值的功能。适合于细胞生长及紫草宁衍生物形成的pH值为 5.6 ± 0.40 。BAP、2,4-D、NAA或IBA对细胞生长无显著的促进作用,且都会抑制紫草宁衍生物的形成。在生长培养基中添加 1.0mg/l IAA和 0.5mg/l KT可促进细胞生长,而在生产培养基中附加 0.1mg/l KT和 $0.75-1.0\text{mg/l}$ IAA则有利于紫草宁衍生物含量及产量的提高。

关键词 新疆紫草, 细胞悬浮培养, pH值, 激素, 细胞生长, 紫草宁衍生物

紫草是常用中草药,药用部位为根。其有效成分是紫草宁及其衍生物。由于紫草资源的迅速减少,近年来,科学家们试图通过生物工程方法生产紫草宁及其衍生物。早在1974年,日本Tadata等人就成功地诱导获得了硬紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)愈伤组织^[1],并研究了影响愈伤组织生长及紫草宁衍生物合成的因子^[2]。Fujita则对细胞悬浮培养的条件进行了研究^[3,4]。国内李国凤等^[5]诱导获得了临床药效最佳的新疆紫草的愈伤组织。之后,叶和春等^[6,7]则研究了不同理化因子对愈伤组织生长及紫草宁衍生物合成的影响。但是迄今,有关pH值、激素对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物合成的影响方面的报道却十分鲜见。而细胞悬浮培养则是过渡到工业化生产的关键培养方式。为此,本试验系统地研究了pH值、不同激素对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物合成的影响,为培养条件的进一步优化打下基础。

1 试验材料及方法

1.1 试验材料

新疆紫草(*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst)愈伤组织系由中国科学院植物研究所提供。

1.2 培养基

生长培养基为改良的LS^[8]液体培养基。即将LS培养中的 NH_4NO_3 改为 463mg/l (NH_4)₂ SO_4 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 以及 KH_2PO_4 的含量分别改为 2830mg 、 166mg 、 185mg 和 400mg/l 。生产培养基为M-9培养基^[4]。灭菌前,在培养基中添加不

本文于1992年7月17日收到,1993年8月31日收到修改稿

本文所用缩写符号: BAP, 6-苄氨基嘌呤; IAA, 吲哚乙酸; IBA, 吲哚丁酸; NAA, 莢乙酸; KT, 6-糠基氨基嘌呤; 2,4-D, 2,4-二氯苯氧乙酸。

同的激素及其浓度，并用 1mol/l NaOH 或 1mol/l HCl 调节pH值至所需要求。之后在 120°C 下灭菌15分钟。

1.3 培养方法

将生长旺盛的愈伤组织接入到附加有 $0.2\text{mg/l IAA} + 0.5\text{mg/l KT}$ 的生长培养基中培养3代(每代14天)。之后，将细胞分别接种至不同的培养基中。在生长培养基中的接种量为4g鲜细胞/瓶(250ml三角瓶中盛70ml培养基)。而在生产培养基中的接种量则为8g鲜细胞/瓶。在 $20-25^\circ\text{C}$ 黑暗条件下进行悬浮培养，摇床转速为 $100-110\text{rpm}$ ，重复3次。

1.4 细胞生物量及紫草宁衍生物含量的测定

在生长培养基中培养了16天，或在生产培养基中培养了23天后，收获细胞。用40目筛过滤，收取鲜细胞，称重，并用便携式酸度计测定培养液的pH值。细胞在 60°C 下烘干至恒重，碾碎，称干重。根据叶和春等所述方法^[6]测定干细胞中紫草宁衍生物含量。

2 结果与讨论

2.1 pH值对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物合成的影响

2.1.1 pH值对细胞生长的影响

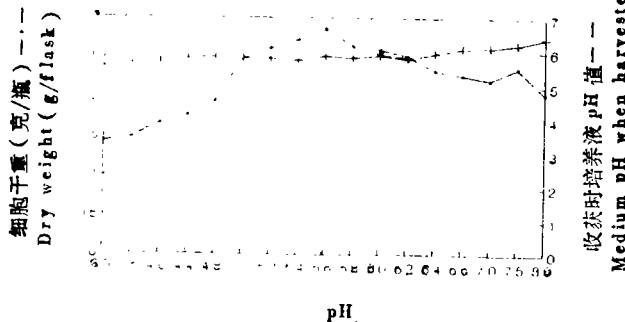


图1 pH值对细胞生长的影响(生长培养基)

Fig. 1 Effects of pH on cell growth in suspension cultures of *A. euchroma* cells (growth medium, $1.0\text{mg/l IAA} + 0.5\text{mg/l KT}$)

2.1.2 pH值对紫草宁衍生物合成的影响

表1所示的是pH值对紫草宁衍生物合成的影响结果。从此表中可见，当 $\text{pH} \leq 4.4$ 或 $\text{pH} \geq 6.4$ 时，对细胞生长不利，这与前述结果一致。紫草宁衍生物的合成则受pH值的影响较小，当 $\text{pH} > 4.0$ 时，各处理间的干细胞中紫草色素含量无明显差异。这与叶和春等^[6]的研究结果不同。他们报道认为，当pH小于5.8时，新疆紫草愈伤组织中的紫草色素含量明显下降。这可能是因为固体培养时，愈伤组织很难对培养基的pH值产生太大的调节作用，因而pH值的影响比较明显。而在悬浮培养时，细胞可以自我调节培养液的pH值。这从表1中可明显看出。不论初始pH值如何，收获时，培养液的pH值多在 5.4 ± 0.1 之间，且这种调节作用在接种后的10天内就可完成，此时正处于紫草宁衍生物迅速合成的前期(数据未列出)。因此，在一定的pH值范围内，生产培养基的初始pH值对悬浮培养细胞中紫草宁衍生物含量的影响不大。但由于pH值过高或过低不利于细胞生长，致使色素产量不高。因此，我们认为，新疆紫草细胞第二步悬浮培养时，适宜的pH值

从图1中可见，在 $\text{pH} = 5.0-6.2$ 范围内，新疆紫草细胞生长旺盛，细胞色红，干重显著高于此范围外的各处理，其中以 $\text{pH} 5.6$ 的处理效果为最佳。此外，从此图中还可看出，不论培养基起始pH如何，经细胞悬浮培养16天后，培养液的pH值都处于 5.8 ± 0.4 范围内(个别情况除外)。这表明新疆紫草细胞具有自我调节其生活环境的功能。

表1 pH值对紫草宁衍生物合成的影响

(生产培养基, 附加0.75mg/l IAA和0.1mg/l KT)

Table 1 Effects of pH on shikonin derivative formation in suspension cultures of *A. euchroma* cells (production medium, 0.75mg/l IAA+0.1mg/l KT)

pH	3.0	3.5	4.0	4.4	4.8	5.0	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	7.0	7.5	8.0
色素含量 (%DW) Pigment content	10.28	10.85	11.56	15.56	14.52	15.56	16.72	15.95	15.82	15.69	17.02	15.72	17.25	13.11	16.60	16.21	15.50
色素产量 (毫克/瓶) pigment yield (mg/flask)	62.5	70.9	79.7	117.8	156.4	165.1	154.3	165.0	173.2	161.4	181.3	147.9	139.8	114	127.9	131.6	121.8
收获时, 培养液 pH Medium pH when harvested	5.05	5.40	5.42	5.42	5.46	5.40	5.39	5.39	5.45	5.46	5.38	5.46	5.47	5.42	5.43	5.51	

范围应为5.0—6.0。

2.2 不同激素对新疆紫草悬浮培养细胞生长及紫草宁衍生物合成的影响

2.2.1 不同激素对细胞生长的影响

试验比较了不同生长素类与细胞分裂素类的组合对新疆紫草细胞生长的影响。结果见表2。此表结果表明, 2,4-D严重抑制细胞生长。在所有加入2,4-D的处理中, 细胞干重皆显著低于对照, 而且颜色变白, 色素合成受阻。在与KT的组合中, NAA或IBA对细胞生长有较小的促进效应, 而在与BAP的组合中, 则表现为抑制效应。IAA对细胞生长有明显的促进作用, 其中与KT组合的促进效果显著水平。高浓度(1.0, 2.0mg/l)的BAP不利于细胞生长; 而在0.1或0.5mg/l水平下, BAP能促进细胞生长, 但未达显著水平。当KT浓度达0.5mg/l以上时, 细胞干重显著高于对照。

表2 不同激素对细胞生长的影响

(生长培养基pH=5.6)

Table 2 Effects of hormones on cell growth in suspension cultures of *A. euchroma* cells (growth medium, pH 5.6)

激素组合 Phytohormone composition	细胞干重(克/瓶) Dry weight (g/flask)											
	KT(mg/l)						BAP(mg/l)					
	0	0.1	0.5	1.0	2.0	平均 mean	0.1	0.5	1.0	2.0	平均 mean	
对照 control	1.21	2.21	2.43	2.73	2.44	2.20	2.86	2.47	1.62	1.87	2.20	
2, 4-D (0.2mg/l)	1.58	1.42	1.67	1.85	1.74	1.65	1.59	1.60	1.16	1.17	1.38	
NAA(0.2mg/l)	1.69	1.73	2.73	2.81	2.57	2.31	2.13	2.01	1.55	7.2	1.60	
IAA(0.2mg/l)	2.31	2.85	2.73	2.85	2.87	2.72*	2.65	2.46	2.26	1.68	2.26	
IBA(0.2mg/l)	1.16	1.88	2.89	2.75	3.03	2.48	2.63	2.56	2.24	1.34	2.19	
平均 Mean	1.75	2.03	2.47*	2.6*	2.53*	2.27	2.37	2.22	1.76	1.35	1.93	

p=0.05

2.2.2 不同浓度的IAA和KT对细胞生长的影响

为确定最适于细胞生长的IAA浓度, 我们又作了进一步的比较试验, 结果见表3。当IAA浓度为1.0mg/l时, 细胞干重最高。而其余6种浓度间的影响差异不大。当KT浓度达0.5mg/l时, 再增加浓度, 对细胞生长的促进效果不明显。

表3 不同浓度IAA与KT组合对细胞生长的影响

(生长培养基, pH 5.6)

Table 3 Effects of IAA and KT on cell growth in suspension cultures of *A. euchroma* cell (growth medium, pH 5.6)

激素组合 Phytohormone composition	细胞干重(克/瓶) DW(g/flask)							
	IAA(mg/l)							
	0	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.5	平均 Mean
KT (mg/l)								
0.5	2.30	2.36	2.01	2.18	2.64	3.18	2.82	2.50
1.0	2.47	2.23	2.31	2.80	2.32	2.80	2.43	2.48
1.5	2.42	2.48	2.58	2.49	2.45	3.17	2.74	2.60
2.0	2.48	2.73	2.40	2.58	2.50	2.80	2.51	2.57
平均 Mean	2.42	2.45	2.32	2.51	2.45	2.99*	2.63	2.54

$p=0.1$

综上所述, 我们认为, 在生长培养基中添加0.5mg/l KT和1.0mg/l IAA有利于新疆紫草细胞生长。

2.2.3 不同激素对紫草宁衍生物合成的影响

不同激素对新疆紫草悬浮培养细胞中紫草宁衍生物合成的影响效果列于表4。从此表中可见, 细胞分裂素类对紫草宁衍生物的合成有抑制作用, 且这种作用随使用浓度的增加而加强。比较而言, BAP的抑制效果强于KT。虽然KT会抑制色素的形成, 但由于一定浓度的KT对细胞生长有促进作用, 所以在含0.1mg/l KT的处理中, 色素产量仍高于不加KT的处理。因此, 我们认为添加0.1mg/l KT于生产培养基中有利于色素产量的提高。

NAA和IBA会明显地抑制

紫草宁衍生物的合成。IAA对紫草宁衍生物的合成有一定的促进作用, 例如在0.5mg/l IAA+0.0mg/l KT的处理中, 细胞色素含量最高(17.4%)。

2.2.4 不同浓度IAA对紫草宁衍生物合成的影响

结果见图2。当KT浓度为0.1mg/l时, 在0.1—1.0mg/l范围内, 随IAA浓度的增加, 细胞中色素含量也逐渐增加, 这表明低浓度的IAA既能

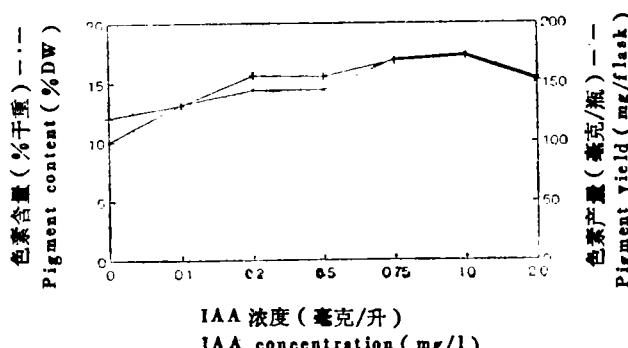


图2 不同IAA浓度对紫草宁衍生物合成的影响
(生产培养基, pH=5.6, KT=0.1mg/l)

Fig. 2 Effects of IAA concentrations on shikonin derivative formation in suspension cultures of *A. euchroma* cells (production medium, pH 5.6, 0.1mg/l KT)

表4 不同激素对紫草宁衍生物合成的影响

(生产培养基, pH5.6)

Table 4 Effects of hormones on shikonin derivative formation in suspension cultures of *A. euchroma* cells (production medium, pH 5.6)

	KT(mg/l)							BAP(mg/l)						
	0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	平均 Mean	0.1	0.5	1.0	2.0	平均 Mean		
对照	色素含量 PC	16.49	16.08	15.36	14.16	12.00	10.68	14.13	14.04	10.29	9.16	7.25	10.16	
CK	色素产量 PY	148.0	182.0	150.5	147.2	124.8	108.9	143.6	134.7	99.9	87.0	87.0	102.2	
IAA (0.5 mg/l)	色素含量 PC	17.40	14.40	13.44	13.68	12.72	11.39	13.84	72.12	8.95	16.46	7.44	9.74	
	色素产量 PY	180.9	155.5	138.4	146.9	127.2	97.9	140.1	126.0	80.5	189.8	74.4	97.6	
NAA (0.5 mg/l)	色素含量 PC	9.33	9.56	9.41	9.41	7.25	6.28	8.54	7.50	7.13	7.08	10.5	8.05	
	色素产量 PY	98.9	99.4	92.2	103.1	65.2	70.3	88.2	78.7	75.6	74.3	73.5	75.5	
IBA (0.5 mg/l)	色素含量 PC	13.92	14.24	14.00	12.24	11.69	10.56	12.78	13.30	7.91	5.51	7.73	8.54	
	色素产量 PY	129.4	136.7	140.0	112.6	110.0	95.0	120.6	113.1	84.6	66.1	71.1	83.7	
平均 Mean	色素含量 PC	14.29	13.57	13.05	12.37	10.91	9.72	12.32	11.67	8.55	8.05	8.23	9.00	
	色素产量 PY	139.3	143.3	130.2	125.9	107	93.0	123.1	113.1	85.17	84.3	76.5	89.75	

* PC=Pigment content (%DW), PY=Pigment yield (mg/flask)

促进细胞生长又有利于紫草宁衍生物的合成。这与 Tabata等^[1]的研究结果基本一致。

总之, 在生产培养基中加入0.1mg/l KT和0.75—1.0mg/l IAA, 有利于细胞中紫草色素含量及产量的提高。

通过以上研究, 我们认为适合于新疆紫草悬浮培养细胞生长的pH值为5.6±0.4, 激素为1.0mg/l IAA和0.5mg/l KT, 而0.1mg/l KT和0.75—1.0mg/l IAA以及pH=5.6±0.4, 则有利于紫草宁衍生物含量及产量的提高。

参考文献

- 1 Tabata M, Mizukami H, Hiroaka N et al. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry*, 1974; 13: 927—932
- 2 Mizukami H, Konoshima M, Tabata M. Effects of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochemistry*, 1977; 16: 1183—1186
- 3 Fujita Y, Hara Y, Ogino T et al. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. I. effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Report*, 1981; 1: 59—60
- 4 Fujita Y, Hara Y, Suga T C et al. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. II. A new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant cell Report*, 1981; 1: 61—63

- 5 李国凤, 伍正蓉, 叶和春等. 离体培养的新疆紫草素醌色素的诱导形成. 植物学通报, 1988; 5: 84—86
 6 叶和春, 尹作鸿, 李国凤等. 不同理化因子对新疆紫草素伤组织生长及紫草宁衍生物合成的影响. 植物学报, 1991; 33(12): 927—931
 7 叶和春, 李国凤, 董教望等. 新疆紫草细胞大量培养生产紫草宁衍生物的研究. 植物学集刊, 第六集. 1992: 1—3—173
 8 Linsmaier E M, Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 1965; 18: 100—127

EFFECTS OF PH VALUE AND HORMONES ON CELL GROWTH AND SHIKONIN DERIVATIVE FORMATION IN SUSPENSION CULTURES OF *ARNEBIAS EUCHROMA* CELLS

Fang Deqiu Hou Songsheng Li Xinming

(*Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Wuhan 430074*)

Ye Hechun Li Guofeng

(*Instisute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Beijing 100044*)

Abstract A study on the effects of pH value and hormones on cell growth and shikonin derivative formation in the suspension cultures of *Arnebia euchroma* cells was carried out. Suspension cultured cells have potential to regulate pH of the media. The favourable initial pH of the media for cell growth and shikonin derivative synthesis is 5.2—6.0. 2,4-D, NAA, IBA or BAP has no positive effects on cell growth and strongly inhibits the biosynthesis of shikonin derivatives. The natural auxin IAA promotes not only cell growth but also shikonin derivative synthesis at concentrations between 0.5 and 1.0 mg/l. An addition of 0.5 mg/l and 0.1 mg/l KT to growth medium and production medium, respectively, is helpful to increase cell weight and shikonin derivative yield.

Key words *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst, Cell suspension culture, pH value, Hormones, Cell growth, Shikonin derivatives