

新疆紫草愈伤组织培养及紫草素比较

汪 骅 (杭州市第七人民医院, 杭州 310013)

任 静 (杭州市第三人民医院, 杭州 310009)

新疆紫草 (*Amebia enchroma*) 是我国的传统中药之一, 根部入药, 具抗菌、消炎、抗肿瘤作用等, 是具

有药用价值的天然色素, 且于丝制品印染, 化妆品及食品工业有广泛的应用前景。由于长期以来其天然

植物被大量挖掘，资源日趋枯竭，而人工栽培较困难。因此，利用植物的细胞培养技术生产紫草素，将是一个有希望的途径。要使细胞培养生产紫草素达到工厂化生产水平，关键^[1]在于提高细胞的生长速率和紫草素含量。所以，除筛选高产细胞株提高细胞生长速率外，选择适宜的培养条件，也是提高细胞生长速率和紫草素含量的必要措施之一。

本文将对影响细胞生长速率和紫草素含量的因素作一初步探讨。

1 材料

选用经筛选的新疆紫草愈伤组织，每月继代一次。接种 2g 鲜重/瓶。

2 方法

2.1 愈伤组织的生长及测重

愈伤组织经 25℃±1℃暗培养，30d 后收获称出鲜重和干重。干重为收取培养后的愈伤组织于 40℃烘箱烘干至恒重，称重即得。

2.2 紫草素的含量测定

最大吸收波长的选择：取紫草根粉末乙醇提取物，以乙醇作空白，于 7230 分光光度计（上海分析仪器厂生产，波长范围 330~900nm）上测定不同波长下的吸收度。可知最大吸收波长在 517±1nm 处。

标准曲线的制备：取 shikonin 标准品（日本京都大学提供）5.0mg，用无水乙醇溶解置 100ml 容量瓶中，加无水乙醇至刻度。分别取 1，2，3，4，5ml，稀释至 10ml。以无水乙醇作空白，测定吸收值，得回归方程：C=40.9169A+0.7527 r=0.9992。

紫草素测定方法：紫草素的含量测定^[2]，是以每克干重愈伤组织中所含紫草素的毫克数表示。将干燥的愈伤组织研碎，取一定重量 10mg，用无水乙醇定容为 50ml，提取 12 小时，取滤液于 517±1nm 波长处测吸收度，计算出紫草素含量。计算公式：紫草素含量% = $\frac{C \times 50 \times 10^{-3}}{W} \times 100\% = \frac{(40.9169A + 0.7527) \times 50 \times 10^{-3}}{W} \times 100\%$

2.3 选择几组影响组织细胞生长速率和紫草素含

量的不同因素，用以组织细胞培养且测定培养物中紫草素含量。

3 结果与讨论

3.1 基本培养基的影响：基本培养基的优劣对新疆紫草愈伤组织细胞的生长和紫草素产生有重要影响。结果见表。（数据都为平均值）

培养基	LS	GP	M-9	White
鲜重 (g/瓶)	23.118	13.011	4.583	4.454
干重 (g/瓶)	0.503	0.560	0.260	0.224
紫草素含量 (%)	0	0.043	0.032	0.022

由表中可知，LS、GP 培养基培养的组织细胞干重要大于 M-9、White 培养基，具有较高的生长量。然而，以 LS 培养基培养的组织细胞，虽生长良好，但几乎未产生紫草素，可见此培养基是与要求不符的。四种培养基，只有 GP 培养基最为理想，既有较高的生长量，又有较高的紫草素含量。

3.2 不同蔗糖浓度的影响：蔗糖作为培养基中唯一碳源，对组织细胞生长和次生代谢物产生有重要影响。结果见表。（数据为平均值）

蔗糖浓度 (%)	1	3	5	7
鲜重 (g/瓶)	12.908	15.465	15.363	13.873
干重 (g/瓶)	0.249	0.625	1.031	1.228
紫草素含量 (%)	0.007	0.041	0.040	0.113

在我们的蔗糖浓度试验范围内，对于愈伤组织干重增加和紫草素的产生以 7% 蔗糖浓度为最好。据文献报道，蔗糖浓度与紫草细胞生长和紫草素产生不是永远成正比的，而有一个最适的浓度。Mizuakami^[3]等报道，蔗糖浓度 5% 时，紫草素含量和鲜重为最高。而周立刚等报道^[1]，浓度为 6% 时紫草素含量最高，9% 时细胞干重为最高。由于时间有限，我们未作进一步的实验。

3.3 植物激素的影响：植物激素对细胞的生长起重要调节作用。选用不同浓度的植物生长素 IAA 和 2，4-D，及细胞分裂素 KT 和 BA，观察其对紫草组织细胞生长影响。见表。（数据平均值）

激素 (ppm)	IAA 0.5	IAA 1	IAA 1.5	2.4-D 0.5	KT 0.5	BA 0.5
鲜重 (g/瓶)	11.373	12.306	12.325	8.233	13.137	14.794
干重 (g/瓶)	0.519	0.551	0.549	0.391	0.585	0.620
紫草素含量 (%)	0.090	0.097	0.088	0	0.051	0.057

在具有 IAA 的培养基上的愈伤组织生长较好，且以 1ppm 浓度的产量最高。而在 2.4-D 组生长最

差,几乎未产生紫草素。正如 Inouye^[4]等报道的,用同位素示踪法证明了 2,4-D 能阻断紫草素合成过程中的中间代谢物,从而抑制紫草素合成。

3.4 Cu^{2+} 浓度的影响:不同的 Cu^{2+} 浓度对紫草组织生长及紫草素产生有一定的影响。见表。(数据为平均值)

$[\text{Cu}^{2+}]$ (ppm)	0	0.025	0.25	0.50
鲜重 (g/瓶)	12.095	15.780	16.811	16.135
干重 (g/瓶)	0.521	0.603	0.615	0.625
紫草素含量 (%)	0.013	0.016	0.040	0.052

由表可知,适宜的 $[\text{Cu}^{2+}]$ 对紫草组织生长及紫草素产生有促进作用。在所试 $[\text{Cu}^{2+}]$ 范围内,浓度越高,组织生长愈好,紫草素含量愈高。

3.5 不同光照条件的影响:选用光照和黑暗两种培养条件,对紫草愈伤组织进行对比培养,结果见表。(数据为平均值)

照明情况	光 照	黑 暗
鲜重 (g/瓶)	15.413	15.672
干重 (g/瓶)	0.585	0.646
紫草素含量 (%)	0	0.057

光照和黑暗两种条件,对于细胞组织生长物良

好,但在光照条件下,组织不能产生紫草素,黑暗条件下紫草素产生良好。这与传统用药中,紫草为根部入药相一致。所以,在培养紫草愈伤组织时宜选黑暗为外界培养条件。

紫草素的生物合成受到许多因素的影响。本文选择的几种适宜培养条件,都不同程度地提高了紫草素的含量,使我们为进一步提高紫草素含量,实现工业化生产打下了理论基础。

参 考 文 献

- 1 周立刚,郑先植等. 滇紫草愈伤组织培养与紫草素产生. 云南植物研究, 1991; 13 (3): 315~320
- 2 张 敏等. 紫草的总色素含量测定. 中草药, (1983) 10
- 3 Mizuakami H, Ronoshima M, Iabata M, Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in Lithospermum callus cultures, Phytochemistry 1977; 18 (8): 1183
- 4 Inouye H, Ueda S, Inoue K, et al, Biosynthesis of shikonin in culture of Lithospermum erythrorhizon. Phytochemistry 1979; 18: 1301

收稿日期: 1996--08--10