

软紫草愈伤组织的初步培养

王黎 张治国 蔡志光 韩献忠 刘骅

(浙江省医学科学院, 杭州 310013)

Q949.777.4

A

摘要 外植体来源不同的软紫草愈伤组织产生紫草色素的能力各异。⁶⁰Co- γ 射线辐照处理后的H₂无性系愈伤组织生长量和色素产生均属上乘。改良MS基本培养基添加1毫克/升KT, 0.5毫克/升IAA, 5% (W/V)蔗糖对愈伤组织培养较为适宜。马铃薯提取液对愈伤组织生长有明显的促进作用。

关键词 软紫草; 愈伤组织; 紫草素 组织培养

PRELIMINARY STUDY ON CALLUS CULTURE OF ARNEBIA EUCHROMA

Wang Li, Zhang Zhiguo, Cai Zhiguang, Han Xianzhong and Liu Hua

(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013)

Abstract Callus of various explants of *Arnebia euchroma* had different ability to produce shikonin. H₂ clone which was treated by ⁶⁰Co- γ rays had higher production in both callus yield and shikonin than the others. A modified MS medium with 1 mg/l KT, 0.5 mg/l IAA, 5% sucrose stimulated production of callus and shikonin. Potato extract was benefit to callus production.

Key words *Arnebia euchroma*; callus; shikonin

软紫草(新疆紫草) *Arnebia euchroma* 为传统中药, 根入药, 主要成分为紫草素, 具抗菌、消炎、抗癌、治疗外伤等作用。紫草素又是贵重的天然色素, 可广泛地应用于印染、化妆品、食品工业中^[1,2]。由于紫草资源日益枯竭, 利用植物细胞培养技术生产紫草素, 将是一个有希望的途径。目前, 国内对紫草属植物细胞培养的研究已有报道^[1-4], 集中采用改变培养基成分, 筛选高产细胞株等措施以提高培养细胞的生长速率及紫草素含量。本文就基本培养基、激素组合、蔗糖浓度、有机添加物等对软紫草愈伤组织生长的影响和产生紫草素的能力作一报道。

1 材料和方法

1.1 材料 软紫草 (*Arnebia euchroma*) 胚轴、子叶、根愈伤组织为中国科学院植物所赠送。作者经1年多驯化, 继代后的无性系。其中胚轴愈伤组织H₂经⁶⁰Co- γ 射线辐照处理,

选择出二个无性系为H₂和H₃。

1.2 方法

(1) 愈伤组织培养:
采用Ls基本培养基^[6]添加1mg/l KT和0.5mg/l IAA, 5%蔗糖, 0.8%琼脂, pH5.8。接种量2克·鲜重/瓶, 25±1℃下暗培养, 30天后收获。

(2) 愈伤组织生长和紫草素含量的测定: 愈伤组织收获后分别测定每瓶的鲜重和干重。紫草素含量测定同Mizunakmi^[6], 含量以每克干重愈伤组织中所含紫草素的毫克数表示。

2 结果与讨论

2.1 不同外植体来源的愈伤组织培养比较

来源于胚轴、子叶、根的愈伤组织在含KT和IAA的L^S培养基上培养, 结果表明(表1), 不同外植体来源的愈伤组织均能产生紫草素, 这与李国风等^[1]在对软紫草(新疆紫草)愈伤组织培养的结果一致。但是, 各种来源愈伤组织的生长量、产色素能力差异明显。愈伤组织生长量为胚轴>子叶>根; 色素含量以根最高, 子叶最低, 分别为2.551mg/g和0.2mg/g, 两者差13倍。3种胚轴愈伤组织色素含量以H₂为最高, 约2.23mg/g, 近于根愈伤组织, 且其生长量高于根愈伤组织, 故H₂为较佳的无性系。

表1 不同外植体来源的软紫草愈伤组织培养比较
Table 1 Growth comparison of callus from different explants of *A. euchroma*

外植体 Explant	胚 轴 Hypocotyl			子叶 Cotyledon	根 Root
	H ₁	H ₂	H ₃		
愈伤组织鲜重 Fresh weight (g/flask)	26.3±1.3	22.2±3.4	27.2±2.6	16.1±2.1	6.6±2.5
愈伤组织干重 Dry weight g/flask	0.57±0.04	0.49±0.08	0.59±0.08	0.55±0.02	0.36±0.11
紫草素含量 Shikonin content (mg/gDW)	1.56	2.23	1.27	0.2	2.55

表2 基本培养基对软紫草愈伤组织生长的影响
Table 2 Effects of basal medium on callus culture of *A. euchroma*

基本培养基 Basal medium	B ₁	N ₁	MG ₁	Ls	MS
愈伤组织鲜重 Fresh weight of callus (g/flask)	14.8±3.9	11.5±3.6	12.1±1.7	12.8±4.4	14.7±1.2
愈伤组织干重 Dry weight of callus (g/flask)	0.50±0.10	0.38±0.07	0.53±0.07	0.49±0.13	0.67±0.03
紫草素含量 Shikonin content (mg/gDW)	1.65	0.1	0.9	1.43	18.59

表3 不同激素组合对软紫草愈伤组织培养的影响
Table 3 Effects of different combination of phytohormone on callus culture of *A. euchroma*

植物激素 Phytohormone		愈伤组织鲜重 Fresh weight of callus (g/flask)	愈伤组织干重 Dry weight of callus (g/flask)
细胞分裂素 Cytokinin (mg/l)	生长素 Auxin (mg/l)		
	IAA 0.5	17.4±1.0	0.51±0.02
	NAA 0.5	13.7±0.9	0.41±0.02
	2.4-D 0.5	12.0±1.4	0.40±0.03
BA 1	IBA 0.5	16.26±2.44	0.49±0.07
	IAA 0.5	16.73±3.08	0.58±0.05
	NAA 0.5	17.2±2.78	0.52±0.11
	2.4-D 0.5	13.6±1.7	0.47±0.06
KT 1	IBA 0.5	18.0±0.7	0.55±0.08

2.2 基本培养基对软紫草愈伤组织培养的影响

基本培养基对细胞生长和次生产物的形成有重要影响。朱蔚华等^[2]曾报道改良 MS 培养基更适于滇紫草 (*Onosma paniculatum*) 愈伤组织的生长。在软紫草愈伤组织继代培养 1 年后, 以 H₂ 无性系为材料, 观察其在 B₆、N₆、MG₆、Ls、改良 MS 基本培养基上的生长情况, 结果表明, 改良 MS 培养基较其它基本培养基更适于软紫草愈伤组织的生长和色素产生 (表 2)。培养后期, B₆ 培养基上的愈伤组织出现褐化。愈伤组织在 Ls、MG₆ 培养基上生长量近似, 但 MG₆ 培养基上启动快、易老化、故 Ls 培养基适于软紫草愈伤组织的继代与保存。

2.3 不同激素组合对软紫草愈伤组织培养的影响

植物激素对植物组织和细胞培养中细胞的生长和次生代谢产物产生起着重要的调节作用。当分别用 KT 和 BA 与不同生长素 (IAA、NAA、2.4-D、IBA) 组合, 观察对软紫草愈伤组织生长的影响, 结果如表 3 所示。在 1mg/l IBA 或 KT 分别与 0.5mg/l 的 IAA 或 IBA 组合的培养条件下, 愈伤组织具较高的生长量。愈伤组织在 NAA 组上生长略好, 而在 2.4-D 组, 生长则差。NAA 和 2.4-D 不仅影响愈伤组织的生长, 且抑制次生代谢产物的产生。Inouye 等^[7]曾用同位素示踪法证明了 2.4-D 能阻断紫草素生物合成过程中的中间代谢产物, 从而抑制紫草素的合成。因此, 我们采用 KT 或 BA 与 IAA 或 IBA 激素组合, 进行软紫草愈伤组织培养。

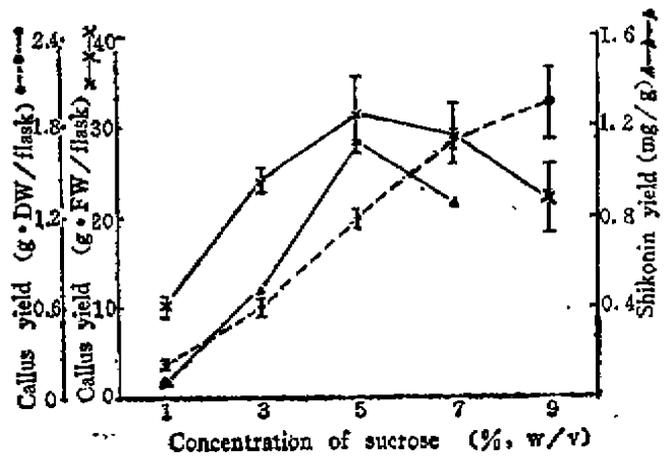


图 1 蔗糖浓度对软紫草愈伤组织培养的影响
Fig. 1 Effects of sucrose on callus culture of *A. euchroma*

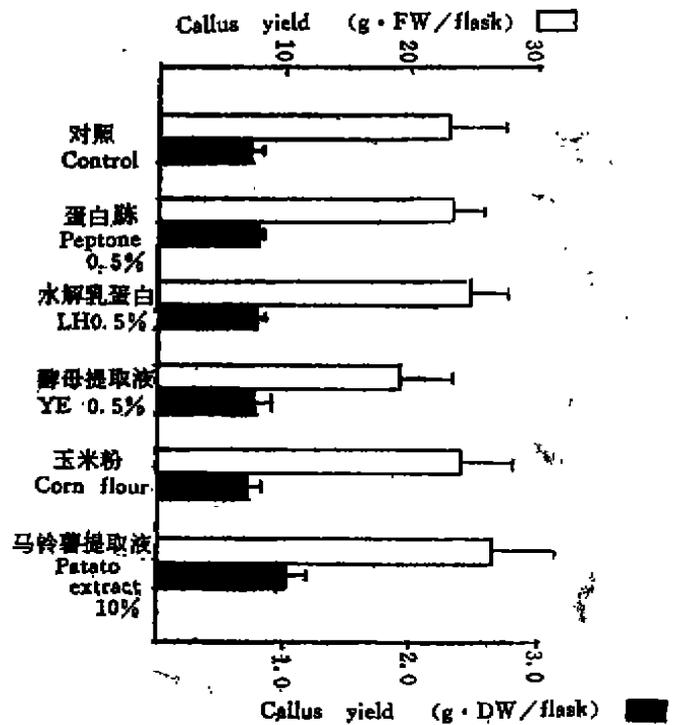


图 2 不同有机添加剂对软紫草愈伤组织培养的影响
Fig. 2 Effects of different additive on callus culture of *A. euchroma*

2.4 蔗糖对愈伤组织培养的影响

Mizuakmi 等^[6]报道紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) 愈伤组织培养中加入蔗糖 5% 时紫草素含量和细胞生长鲜重为最高。而周立刚等^[3]报道培养滇紫草 (*Onosma paniculatum*) 愈伤组织以蔗糖 6% 时紫草素含量达最高值, 蔗糖 9% 时, 细胞干重生长量最高。为了确定适合于软紫草愈伤组织生长和紫草素产生的适宜蔗糖浓度, 我们采用了 1—9% 的蔗糖添加在 Ls 培养基中, 结果如图 1。当蔗糖浓度为 5% 愈伤组织鲜重产量和紫草素的含量为最高。蔗糖浓度为 9% 时愈伤组织干重达最高值, 培养后期, 愈伤组织呈灰褐色。因此, 软紫草愈伤组织培养的合适蔗糖浓度为 5%, 我们的结果与 Mizuakmi 等在紫草愈伤组织培养的结果相符^[6]。

2.5 有机添加物对愈伤组织培养的影响

用蛋白胨、水解乳蛋白 (LH)、酵母提取液 (YE)、玉米粉、马铃薯提取液加入到培养基中, 对软紫草愈伤组织培养的影响。结果如图 2 所示。蛋白胨、LH、玉米粉对愈伤组织生长影响不显著。YE 抑制愈伤组织生长。Mizuakmi 等^[6]报道蛋白胨促进愈伤组织生长, YE 对生长不明显。这与我们的结果不同。本项试验还表明, 马铃薯提取液能促进愈伤组织生长。这种促进作用可能为马铃薯提取液提供了软紫草愈伤组织生长所需的碳源和植物激素。

参 考 文 献

- 1 李国凤, 伍正容, 叶和春等。离体培养的新疆紫草素酮色素的诱导形成。植物学通报, 1968, 5 (2), 64—66
- 2 朱蔚华, 樊红霞, 胡秋等。滇紫草愈伤组织的诱导培养及优良无性系的筛选。中药材, 1990, 13 (1), 6—9
- 3 周立刚, 郑光植, 王世林。滇紫草愈伤组织培养与紫草素生产。云南植物研究, 1991, 13 (8), 315—320
- 4 周立刚, 郑光植, 王世林等。多糖对滇紫草培养细胞的影响。天然产物研究与开发, 1991, 8 (2), 34—38
- 5 Linsmaier E F, Skoog F. Organic growth factor of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1965, 18 (1): 100—127
- 6 Mizuakmi H, Konoshima M, Tabata M. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formatoin in *Lithospermum callus* cultures. *Phytochemistry*, 1977, 16 (6): 1183—1186
- 7 Inouye H, Ueda S, Inoue K et al. Biosynthesis of shikonin in culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry*, 1979, 18: 1301—1306