

理化条件对新疆紫草毛状根培养及紫草素含量的影响

芦韦华 陈永芳 王芳 代宁波 郝爱花 李翠芳 嘉素尔

新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052

摘要 以发根农杆菌诱导的新疆紫草毛状根为试验材料, 采用二阶段培养法, 分别考察了 NH_4NO_3 、培养基、转速、温度、蔗糖对毛状根生长的影响及培养方式、酸水解酪蛋白对毛状根生产的影响。结果表明: 毛状根在 MS 无铵液体培养基中生长速度较 MS 快了近 1 倍, 第 15 天时毛状根的生长量达峰值, 增殖 8 倍; 在 SH 无铵培养基、转速为 (120 ± 5) r/min、温度为 (25 ± 1) °C 时毛状根增殖倍数最大, 为 9.34 倍。蔗糖质量浓度对毛状根的生长增殖影响不大; 液体培养方式的紫草素及其衍生物含量 (1.05%) 远远高于固体培养 (0.33%), 是后者的 3 倍; 添加 0.5 g/L 的酸水解酪蛋白的其紫草素及衍生物含量为 1.29%, 较对照 (1.17%) 增加了 10.3%。本研究为今后利用新疆紫草毛状根规模化生产提供了理论依据。

关键词 新疆紫草; 毛状根; 紫草素及其衍生物; 培养条件

中图分类号 Q 943.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0050-05

新疆紫草 (*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston) 是我国传统药用紫草类植物中临床药效最好的一种, 其中的主要成分紫草素及其衍生物广泛用于医药、食品、化妆品和高级印染等行业^[1-2]。新疆紫草主要分布于新疆, 随着人们的大量采集, 野生资源已接近枯竭, 采用常规育种方式进行品种改良周期较长, 因此给人工种植带来了较大的困难, 到目前为止人工大面积有效栽培还未成功^[3]。多年来利用细胞培养生产紫草素及其衍生物的研究报道很多^[3-6], 毛状根培养生产植物次生代谢产物将是一种有效途径, 这方面的研究已经取得了可喜的成就^[7-10], 如青蒿 (青蒿素)、雪莲 (芸香苷)、红豆杉 (3, 4-二羟基苯丙氨酸)、长春花 (长春碱) 等。毛状根作为营养器官较细胞培养有其优越性, 比如生长速度快且不依赖激素, 次生代谢产物较稳定等。目前未见有关利用新疆紫草毛状根合成紫草素及其衍生物的报道。本研究旨在利用发根农杆菌转化获得的新疆紫草毛状根^[11], 优化其培养条件, 使毛状根在液体培养中既能迅速生长增殖, 又能提高紫草素及其衍生物的含量, 从而为新疆紫草毛状根规模化培养提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新疆紫草毛状根 Aehrf07 株系 (发根农杆菌 MSU440 诱导产生) 由笔者所在的课题组提供。

1.2 试验方法

由于紫草素及其衍生物的合成呈非偶联型, 即紫草素及其衍生物是在毛状根生长停止后才进行合成的, 因此, 新疆紫草毛状根的液体培养采用“二阶段培养法”: 第一阶段以毛状根生物学产量的增殖为目的, 第二阶段以毛状根生产紫草素及其衍生物为目的。

1) 毛状根生长阶段。称取生长一致的毛状根 0.5 g, 接种于装有 50 mL 液体培养基的 100 mL 锥形瓶中, 培养液灭菌前调 pH 值至 5.8, 在温度 (25 ± 1) °C、转速 (120 ± 5) r/min 条件下暗培养, 培养 15 d 后, 取出用滤纸吸干表面水分称取鲜质量, 计算增殖倍数。

$$\text{增殖倍数} = (m_2 - m_1) / m_1$$

m_1 为接种时毛状根鲜质量, m_2 为培养一定时间后毛状根鲜质量。将毛状根置于 80 °C 条件下

收稿日期: 2010-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30560059, 31060205)、新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (200821170)

芦韦华, 硕士研究生。研究方向: 植物细胞工程。E-mail: lwh19830822@qq.com

通讯作者: 王芳, 教授。研究方向: 植物细胞工程。E-mail: Wangfang1hao@126.com

1 h, 再于 60 °C 下干燥至质量恒定后称取干质量。

① NH_4NO_3 试验。毛状根接种于 MS、MS 无铵(去除 NH_4NO_3)液体培养基中, 分别培养 3、6、9、12、15 d。

② 转速和培养基组合试验。毛状根接种于 MS 无铵、B₅ 无铵、SH 无铵、LS 无铵液体培养基中, 摇床转速分别为 (100 ± 5)、(120 ± 5)、(140 ± 5) r/min。

③ 温度和培养基组合试验。毛状根接种于 MS 无铵、B₅ 无铵、SH 无铵、LS 无铵液体培养基中, 培养温度分别为 (23 ± 1)、(25 ± 1)、(27 ± 1) °C。

④ 蔗糖试验。蔗糖添加量为 15、30、45、60 g/L。

2) 毛状根生产阶段。称取 3 g 由 SH 无铵液体培养基中培养 12 d 的毛状根, 接种于装有 50 mL M-9 液体培养基的 100 mL 锥形瓶中, pH 值为 5.8, 培养温度 (25 ± 1) °C, 转速 (120 ± 5) r/min, 除特别说明外均添加酸水解酪蛋白(CH) 1 g/L。培养 30 d 后测定紫草素及其衍生物的含量(包括毛状根和培养液)。

① 培养方式试验。毛状根接种于 M-9 液体培养基、B₅ 无铵固体培养基中。

② 酸水解酪蛋白试验。毛状根接种于添加 0.25、0.50、1.00、2.00 g/L 酸水解酪蛋白的 M-9 液体培养基中。

③ 毛状根中紫草素及其衍生物的提取及含量测定。采用中国药典中记载的测定羟基萘醌总色素的方法测定紫草素及其衍生物的含量。具体方法: 取培养一定时间的毛状根适量, 于 50 °C 烘箱中干燥 3 h, 粉碎, 精密称取 0.500 g, 置 100 mL 容量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 4 h 内不断振摇, 过滤, 精密吸取滤液 5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀。采用分光光度法测定吸收度 A_{516} , 按左旋紫草素及其衍生物($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$)的吸收系数为 242 计算, 毛状根紫草素及其衍生物含量/% = $(A_{516}/242) \times 10$ 。

④ 培养液中紫草素及其衍生物的萃取及含量测定。将培养一定时间的毛状根培养液与等体积的石油醚混合, 在分液漏斗中振荡, 静置, 分液, 反复萃取至无色, 合并萃取液, 测定萃取液体积, 采用分光光度法测定萃取液 A_{516} , 培养液中紫草素及其衍生物含量/% = $(A_{516}/242) \times 10 \times V \times n$, 其中, V 为培养液的体积(mL); n 为稀释倍数。

紫草素及其衍生物含量 = 毛状根紫草素及其衍生物含量 + 培养液紫草素及其衍生物含量。

2 结果与分析

2.1 NH_4NO_3 对新疆紫草毛状根生长的影响

图 1 结果显示, 毛状根在 MS 无铵液体培养基中生长速度较 MS 快了近 1 倍, 毛状根生长量随培养时间的推移而逐渐增加, 第 15 天时毛状根的生长量达峰值, 增殖 8 倍, 表明铵离子不利于毛状根的生长, 这与许铁峰等^[12]报道的商陆毛状根培养一致。试验发现接种 3~12 d 的毛状根的韧性及活力较强, 培养超过 12 d 的毛状根松软易断, 继代后长势较差。因此, 毛状根的液体培养继代周期为 12 d, 此期内应及时将毛状根进行继代培养以维持不断生长的营养需求。

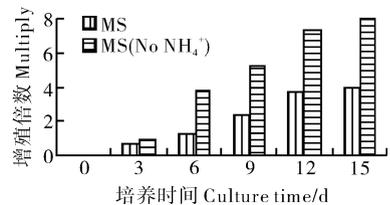


图 1 NH_4NO_3 对毛状根生长的影响

Fig. 1 Effect of NH_4NO_3 on hairy roots growth

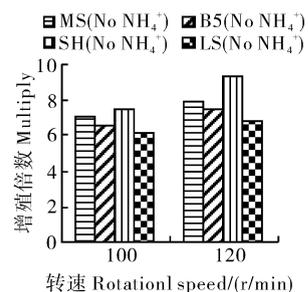


图 2 转速和培养基对毛状根生长的影响

Fig. 2 Effects of shaker revolutions rate and different media on hairy roots growth

2.2 转速和培养基对新疆紫草毛状根生长的影响

摇床转速影响毛状根液体培养过程中氧气的传递。图 2 结果显示, 在 (140 ± 5) r/min 下由于摇床的转速过快, 毛状根的剪切力增大, 导致接种 1 d 后多数毛状根断裂, 几天后褐化, 甚至死亡; 在 (100 ± 5)、(120 ± 5) r/min 中均可正常生长, 尤其在 SH 无铵培养基中, 转速为 (120 ± 5) r/min 时毛状根增殖倍数最大, 为 9.34 倍, 较 (100 ± 5) r/min 时 (7.46 倍) 增加了 1.88 倍。

2.3 温度和培养基对新疆紫草毛状根生长的影响

图 3 结果显示,在同为 (120 ± 5) r/min 的摇床中培养,在 (27 ± 1) °C 条件下,由于温度较高,毛状根变为褐色,很快死亡,而在 (23 ± 1) °C、 (25 ± 1) °C 下均可正常生长。 (25 ± 1) °C 是毛状根生长培养的最适温度,尤其在 SH 培养基中毛状根的增殖倍数最大,较 (23 ± 1) °C 时增加了 2.84 倍。方差分析结果表明,4 种不同液体培养基中培养的毛状根在 (25 ± 1) °C 条件下的增殖倍数均较 (23 ± 1) °C 有显著提高,表明温度是影响毛状根生长的重要因子。

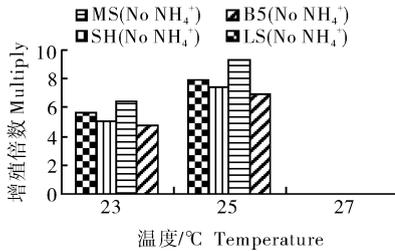


图 3 温度和培养基对毛状根生长的影响
Fig. 3 Effects of temperature and different media on hairy roots growth

2.4 蔗糖对新疆紫草毛状根生长的影响

蔗糖是离体培养物生长不可缺少的碳源和能源。图 4 结果显示,随着培养液中蔗糖质量浓度的增加,毛状根的生长增殖变化不大。表明低质量浓度蔗糖完全可以满足毛状根生长需求,而高浓度质量蔗糖也没有抑制毛状根生长。因此,从经济角度考虑,在 SH 无铵培养基中只需添加 15 g/L 蔗糖,既不影响毛状根产量,又可节约成本。

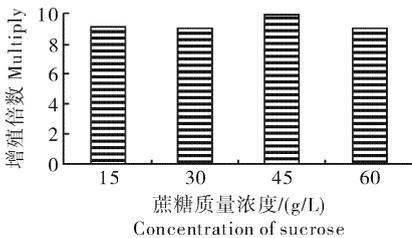


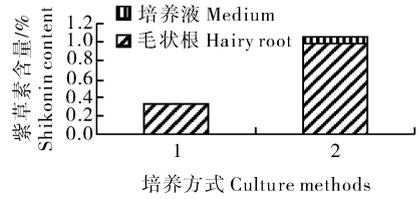
图 4 蔗糖对毛状根生长的影响

Fig. 4 Effect of sucrose on hairy roots growth

2.5 培养方式对紫草素及其衍生物合成的影响

毛状根在液体培养基中的生长量明显多于固体培养方式,且毛状根的颜色明显较固体培养方式的红。图 5 结果显示,毛状根在液体培养基中的紫草素及其衍生物含量达到 1.05%,远远高于固体培养基中的含量(0.33%),是后者的 3 倍。方差分析结果表明二者之间差异显著,表明液体培养方式对毛

状根的生长与紫草素及其衍生物合成具有明显促进作用。此外,毛状根中的紫草素及其衍生物有外泌至培养液中现象,培养液颜色由淡红至深红程度不等,为总含量的 7.60%。



1: 固体培养 Solid culture medium;
2: 液体培养 Liquid culture medium.

图 5 培养方式对紫草素及其衍生物合成的影响

Fig. 5 Effects of culture methods on shikonin production

2.6 酸水解酪蛋白对紫草素及其衍生物合成的影响

图 6 结果显示,添加 0.5 g/L 的酸水解酪蛋白效果最好,紫草素及其衍生物含量为 1.29%,较对照(1.17%)增加了 10.3%。随酸水解酪蛋白含量的继续增加,紫草素及其衍生物含量呈下降趋势。添加量为 2.0 g/L 时紫草素及其衍生物含量明显降低(0.68%)。说明添加 0.5 g/L 的酸水解酪蛋白可以提高紫草素及其衍生物含量,过量则产生抑制作用,但方差分析结果表明,与对照的差异不显著。

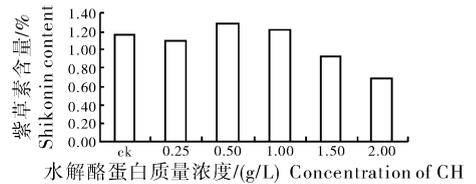


图 6 酸水解酪蛋白对紫草素及其衍生物合成的影响

Fig. 6 Effect of CH on shikonin production

3 讨论

许多研究认为氮源影响培养物的生长量及生长环境如培养基中的 pH 值。商陆的毛状根培养不同氮源对其生长有显著影响,酸水解酪蛋白最好,其次为 NH_4NO_3 和酵母浸膏,蛋白胨效果最差^[12]。四倍体菘蓝毛状根生长需要 1.0 g/L 水解酪蛋白或水解乳蛋白作为氮源,毛状根分枝多、产量高^[13]。雷公藤不定根生长进入对数期以前,氮元素开始大量消耗,进入对数生长期后,培养基中的氮源 90% 被消耗,表明氮是毛状根生长的必要条件^[14]。长春花毛状根培养用水解乳蛋白作为氮源较 NH_4NO_3 的

每瓶增长量提高了50%以上^[15],说明在毛状根的培养中,不同植物对氮源反应不同,因而需求也不尽相同,有些植物可以通过 NH_4NO_3 替换成有机氮的方法提高产量。黄芪毛状根的生长量在MS无 NH_4NO_3 培养基中增加20%以上^[16]。本研究与前人研究结果相似,添加酸水解酪蛋白、去除 NH_4NO_3 对毛状根生长有利,但新疆紫草毛状根的生长是否完全不需要 NH_4^+ 或如果需要则与 NO_3^- 之间的比例应为如何,相关研究正在进行中。

在液体培养基中植物组织对剪切力较为敏感。摇瓶培养过程中转速升高,瓶内的传质效果好,溶氧相对提高,但转速过高,剪切力变大,容易引起培养物的损伤及次生代谢产物合成量的降低。不同植物毛状根培养时,最适转速因植物种类而异。水母雪莲毛状根培养中,转速在100 r/min时,剪切力对水母雪莲毛状根影响小,具有好的传质和氧传递,毛状根生长量及总黄酮合成量均达到最大^[17]。青蒿毛状根培养中,转速在130~150 r/min时剪切力对其影响小,同时具有好的传质和氧传递^[18]。本试验新疆紫草毛状根液体培养中,转速在(120±5) r/min时,剪切力对新疆紫草毛状根影响小,具有好的传质和氧传递,毛状根增殖最快。

30、50 g/L的蔗糖对三裂叶野葛毛状根的生长有促进作用,10 g/L时毛状根生长缓慢,毛状根细小且侧根较少^[19];当蔗糖质量浓度为90 g/L时,毛状根生长很慢,侧根少而短粗,脆而易断。人参毛状根培养4周的生物量结果为蔗糖含量30 g/L的处理优于15 g/L的处理^[20]。在一定范围内提高蔗糖质量浓度能促进青蒿毛状根的生长,当蔗糖质量浓度达到80 g/L时,毛状根的形态发生明显的改变,生长受到严重抑制^[21]。本研究中毛状根在蔗糖质量浓度为15~60 g/L范围内增殖倍数差异不大,这与前人研究结果不太一致。主要原因可能是毛状根培养周期相对较短,低质量浓度蔗糖(15 g/L)完全可以满足其生长需求,而60 g/L的蔗糖质量浓度对新疆紫草毛状根没有抑制作用,这一点与前人研究结果一致。

植物的细胞培养中添加活性炭可吸附酚类物质,防止褐化,避免对植物产生毒害作用,影响其生长^[22]。本研究分别在SH毛状根生长培养基和M-9紫草素及其衍生物生产培养基中添加1 g/L的活性炭,结果表明在SH中毛状根生物学产量的增殖倍数平均为7.05倍,产量并无提高,反而有所下降。在M-9中添加活性炭后毛状根紫草素及其衍生物

含量也未增加。此外,笔者还进行了L-苯丙氨酸、琼脂糖、油菜素内酯等的试验,与对照相比,毛状根的生长、紫草素及其衍生物含量均较低,表明这些物质对毛状根的生长及生产有抑制作用,这与紫草细胞培养^[23-24]的研究结果不一致,主要原因可能是植物种类及培养体系不同所致。

本研究结果表明,采用SH无铵液体培养基、转速为(120±5) r/min、温度为(25±1)℃时毛状根增殖倍数最大,紫草素及其衍生物含量较固体培养增加了3倍。此结果为今后利用新疆紫草毛状根规模化培养生产紫草素及其衍生物奠定了技术基础。

参 考 文 献

- [1] 肖洁,杨映根,郭奕明,等.新疆紫草组织培养的研究[J].西北植物学报,2004,24(8):1560-1564.
- [2] 葛锋,王晓东,王玉春.药用紫草的研究进展[J].中草药,2003,34(9):6-10.
- [3] TABATA M, MIZUKAMI H, HIRZOKA N, et al. Pigment formation in callu cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. Phytochemistry, 1974, 13: 927-932.
- [4] FUJITA Y, HARA Y, SUGA C, et al. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. II. A new medium for the production of shikonin derivatives [J]. Plant Cell Reports, 1981(1): 61-63.
- [5] 李国风,伍正蓉,叶和春,等.离体培养的新疆紫草萘醌色素的诱导形成[J].植物学通报,1988,5(1):84-86.
- [6] 叶和春,尹作鸿,李国风,等.不同理化因子对新疆紫草愈伤组织生长及紫草甙衍生物合成的影响[J].植物学报,1991,33(12):927-931.
- [7] WEATHERS P J, BUNK G, MCCOYM C. The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots [J]. *in vitro* Cell Dev Biol Plant, 2005, 41(1): 47-53.
- [8] FU C X, XU Y J, ZHAO D X, et al. A comparison between hairy root cultures and wild plants of *Saussurea involucreta* in phenylpropanoids production [J]. Plant Cell Rep, 2006, 24(12): 750-754.
- [9] SUNG L S, HUANG S Y. Lateral root bridging as a strategy to enhance L-DOPA production in *Stizolobium hassjoo* hairy root cultures by using a mesh hindrance mist trickling bioreactor [J]. Biotechnol Bioeng, 2006, 94(3): 441-447.
- [10] MAGNOTTA M, MURATA J, CHEN J X, et al. Expression of deacetylcholine-4-O-acetyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots [J]. Phytochemistry, 2007, 68(14): 1922-1931.
- [11] 陈永芳,芦韦华,王芳,等.新疆紫草毛状根的诱导及培养[J].西北植物学报,2008,28(2):2423-2428.
- [12] 许铁峰,张磊,张汉明,等.药用植物商陆毛状根培养系统的建立[J].第二军医大学学报,2003,24(10):1112-1115.
- [13] 李博华,张汉明,丁如贤,等.四倍体慈蕊毛状根培养系统的建立及外界因子对其生长的影响[J].中草药,2000,31(2):132-

- 134.
- [14] 李琰,杨钰琪,冯俊涛,等. 离体条件下雷公藤不定根生长与营养成分消耗动态研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(11):134-138.
- [15] 孙敏,汪洪,王颖,等. 长春花转化毛状根诱导及培养条件的优化[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2002,27(4):549-552.
- [16] 胡之璧,郑志仁,李幸平,等. 膜荚黄芪毛状根培养系统的建立和外界因子对其生长的影响[J]. 植物学报,1998,40(5):448-452.
- [17] 杨睿,付春祥. 不同理化因子对雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响[J]. 生物工程学报,2005,21(2):233-238.
- [18] 刘春朝,王玉春,欧阳藩. 青蒿毛状根合成青蒿素的培养条件研究[J]. 植物学报,1998,40(9):831-835.
- [19] 何含杰,梁朋,施和平. 蔗糖和光对三裂叶野葛毛状根生长及次生物质产生的影响[J]. 生物工程学报,2005,21(6):1003-1008.
- [20] 赵寿经,李昌禹,钱延春,等. 人参发根的诱导及其适宜培养条件的研究[J]. 生物工程学报,2004,20(2):215-220.
- [21] YU S X, KWOK K H, DORAN P M. Effects of sucrose, exogenous production concentration and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots[J]. Enzyme Microbiol Technol, 1996, 18:238-243.
- [22] 崔堂兵,郭勇,张长远. 植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J]. 广东农业科学,2001(3):16-18.
- [23] 方德秋. 不同营养因子对新疆紫草悬浮培养细胞及紫草宁衍生物的影响[J]. 武汉植物学研究,1994,12(4):348-354.
- [24] 韩雨辰,杨永华,张华. BR 促进滇紫草培养细胞生长和色素形成的研究[J]. 南京大学学报:自然科学版,2000,36(2):233-234.

Effects of physical and chemical conditions on culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst hairy roots and content of shikonin and its derivatives

LU Wei-hua CHEN Yong-fang WANG Fang
DAI Ning-bo HAO AI-hua LI Cui-fang JIA Su-er

College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

Abstract Using the *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* as a testing material, the culture system with two-stage culture method of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst hairy roots was established for the first time. Factors influencing hairy roots growth such as NH_4NO_3 , different media, speed, temperatures, content of sucrose and factors on hairy roots producing such as method of culture, casein hydrolysate were investigated. The results showed that under the conditions which hairy roots inoculated with MS (no NH_4^+) liquid medium, the biological production of hairy roots proliferation was doubled that of MS solid medium, and it increased by 8 times cultivated every 15 d. Under the conditions which hairy roots inoculated with 50 mL SH (no NH_4^+) liquid medium, at $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, (120 ± 5) r/min, the biological production of hairy roots proliferation increased by 9.34 times. The content of sucrose was not critical for hairy roots proliferation. The content of hairy roots shikonin from solid culture and the growth stage could be promoted from about 0.33% to 1.05%. Adding 0.5 g/L casein hydrolysate into the hairy roots, the biological production of hairy roots proliferation could be promoted from about 1.17% to 1.29%, providing a theoretical basis for cultivating large-scale production by applying *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst hairy roots.

Key words *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst; hairy roots; shikonin and its derivatives; culture conditions

(责任编辑:杨锦莲)