# 紫草组织培养中细胞发育时期与紫草宁形成关系的研究

严海燕 曹日强*
(南京大学生命科学院生物系,江苏 南京 210093)

摘 要: 目的 植物细胞初生代谢是次生代谢的基础,与细胞的发育状态有关。从几个方面探讨细胞发育状态与色素形成能力的关系。方法 研究了接种量对营养生长期间细胞生长的影响,比较了营养生长阶段不同生长时期细胞的色素形成能力,并检查了各发育时期细胞的分裂指数,同时测定了紫草宁合成阶段色素合成的时间进程。结果 接种量约每毫升培养基 0.083~ 0.117 g愈伤组织时,细胞生长良好。营养生长阶段细胞的发育时期和生理生化状态与色素合成的能力密切相关。细胞分裂高峰期以后,细胞合成紫草宁的能力开始增加,细胞营养生长静止期色素合成能力达到饱和。色素形成时期色素合成曲线同细胞生长曲线一样呈 S型。以上结果揭示,细胞首先满足自身基本的生命活动,在此基础上才能积累中间或次生代谢物,因而细胞的发育时期与色素的形成能力密切相关。结论 本研究为紫草组织培养工业化生产紫草宁提供了基本数据。

关键词: 紫草;紫草宁;细胞培养;细胞发育
中图分类号: S567 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2001)- 03- 0264- 03

## Relationship between cell developmental stage and shikonin formation in cell culture of *Lithospermum erythrorhizon*

YAN Hai-yan, CAO Ri-qiang
(Department of Biology, College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing Jiangsu 210093, China)

**Key words** *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.; shikonin; cell culture; cell development

紫草宁是多年生中草药紫草根中形成的次生代谢产物。植物的次生代谢产物在植物发育到一定程度才形成。在紫草组织培养生产紫草宁时,细胞的发育、分化状态对色素的形成及产量有很大影响。虽然对紫草组织培养的研究已有多年历史,但迄今在细胞发育方面的研究未见报道。我们在这里探讨了紫草细胞的发育状态对色素形成的影响,为优化生产工艺提供基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料: 紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 采自山东,取茎尖诱导愈伤组织。

1.2 方法: 愈伤组织诱导培养基为 LS+ IAA 0.5 mg/L+ 2,4-D 0.35 mg/L。色素生产采用两步法: 营养生长阶段和色素形成阶段。营养生长阶段采用改良 B5培养基,色素形成阶段采用改良 M9培养基 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 减半, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 为 3倍)[1]。M9培养基见 Fujita等人[2]。所有培养物都在含有 30 mL培养基的 100 mL三角瓶中,25 ℃下培养。接种量均为 2 g 营养生长在光下进行,继代周期为 21 d。色素形成在暗中进行。所有处理为 3个重复。

色素含量测定: 材料在 60 ℃ 下烘干,研磨,用石油醚反复提取至无色。提取液在 520 nm下测光吸收。之后在标准曲线上查出浓度,求出材料的色素含量(g% 材料干重 g)。

有丝分裂指数的测定: 有丝分裂指数为有丝分裂相细胞数/细胞总数× 100%,细胞用碱性品红法染色。

## 2 结果

2.1 营养生长阶段,愈伤组织接种量与生长的关系: 图 1的结果表明,愈伤组织生物产量(21 d)随接种量的增加而增加,但接种量在 3.5 g以上时,由于培养基量与空间有限,愈伤组织很早就出现褐色,即老化。

鲜重的绝对增加量最高点在接种量为 3.5 g处。接种量小于 3.5 g时,鲜重的绝对增加量随接种量的增加而增加。接种量大于 3.5 g时,绝对增加量有所下降。鲜重的相对增加量在接种量小于 2.0 g

* 收稿日期: 2000-03-17
作者简介: 严海燕,1983年获武汉大学生物系遗传专业学士学位。1983~ 1986,河南师范大学生物系遗传教研室助教。1986~ 1989,南京大学生物系植物专业硕士研究生,从事国家七。五攻关项目紫草组织培养形成色素的研究,1989年获硕士学位。1989~ 1992年,中国科学院植物研究所助理研究员,继续从事紫草组织培养的工作,及芦苇抗盐、芹菜体细胞胚发生和人工种子的研究。1992~ 1997,美国阿肯色大学园艺系攻读博士学位,从事淀粉合成及淀粉合酶的研究。1997~ 1999,中国农业大学园艺系博士后。1998~ 2000,北京大学生物技术系讲师。发表文章 4篇。

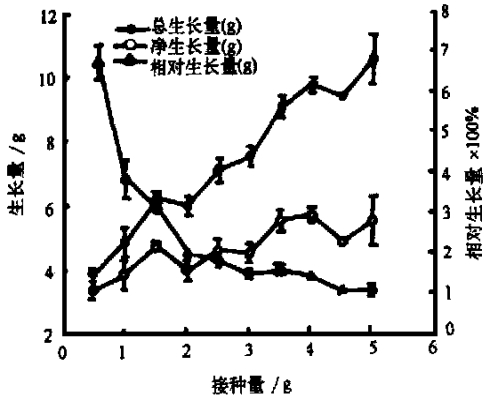



图 1 营养生长培养基上愈伤组织接种量与生长量的关系

时呈急剧下降的趋势,而在接种量 2.0~ 4.0 g 间呈十分缓慢的下降。结果表明,接种量小于 2.0 g 时,由于营养供给充分,愈伤组织能充分的生长,但绝对鲜重的增加未达到高峰,养料未能充分利用。接种量在 2.5~ 4.0 g 范围内,营养利用较为充分,同时生物量也有较大增加,此时平均每毫升培养基供应 0.083~ 0.117 g 愈伤组织生长。接种量在 4.0 g 以上时,养料供给不足,生物量的绝对增加量下降。

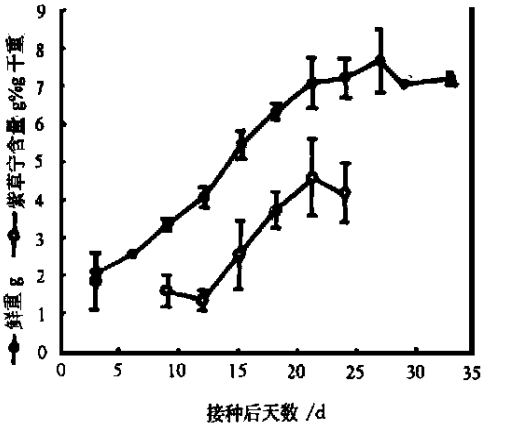
2.2 愈伤组织营养生长阶段的生长时间与色素产量的关系:愈伤组织形成色素能力与其所处的营养生长阶段有关。图 2中的生长曲线表明,营养生长期间,接种后 0~ 3 d 中,愈伤组织鲜重没有增加,细胞处于延迟期; 3~ 21 d,鲜重近似直线地增加,处于对数生长期: 21 d 后,鲜重增加缓慢,细胞进入稳定期。因此,在我们的培养条件下,21 d 为继代周期较为合适。图 2中与生长曲线相对应的色素形成曲线表明,营养生长阶段第 12~ 21天的细胞色素合成能力随着在营养培养基上生长时间的延长而增加;在营养培养基上培养 21 d 以上的细胞,其色素合成能力随时间的延长而下降。

2.3 愈伤组织营养生长过程中有丝分裂指数的变化:营养生长期间愈伤组织在转入生长培养基后的 0~ 8 d 处于活跃分裂状态 (图 3),8~ 10 d 细胞分裂急剧下降,10 d 以后愈伤组织的细胞分裂维持在少量水平。

2.4 色素形成培养基上色素形成的时间进程:在色素形成培养基上,在营养培养基上生长了 21 d 的细胞移入后的 24 d 内,色素的产量随时间的增加而增加,24 d 以后,产量趋于稳定 (图 4)。因而愈伤组织收获时间在 24 d 较为合适。

## 3 讨论

愈伤组织对培养基的充分利用及生长状态与接种量有关。在本文的结果中,接种量不足,虽然生长充分,但生物产量也不足。接种量过大,养料供给不足,生物量的绝对增加量下降,同时愈伤组织的生理




* 所有用于色素测定的愈伤组织都是在色素形成培养基上培养 33 d 后收取测定的,0 d 时生长量为 0

图 2 营养生长阶段愈伤组织所处的阶段与其色素形成能力的关系*

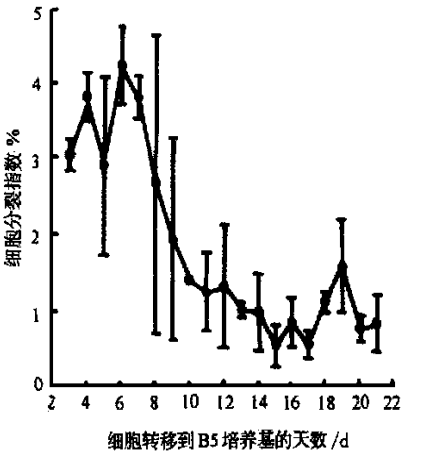



图 3 营养生长期间有丝分裂指数变化的时间进程

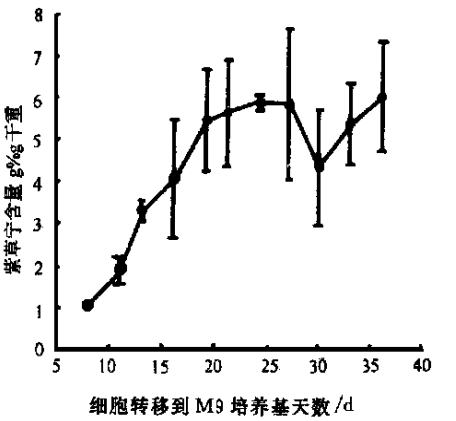



图 4 色素形成培养基上色素形成的时间进程

生化状态趋于老化,形成的次生代谢物对营养生长和色素的形成均不利。

愈伤组织在色素形成培养基上形成色素的能力与转入色素形成培养基时细胞的分化状态有密切关系。综合图 2~ 4的结果,在营养培养基上生长了 12 d以前的愈伤组织,处于活跃的分裂和细胞增殖状态,转入色素形成培养基后,色素形成很少。表明这些细胞的能量及代谢集中于新细胞的建成活动,形成色素的生理生化条件尚未成熟。在营养培养基上生长 12~ 21 d的细胞,其色素形成的能力与其在生长培养基上的生长曲线类似,随着在生长培养基上生长的时间而提高。这意味着细胞分裂高峰期后的一段时间里,细胞在生长的同时,为色素的形成准备着必要的生理生化条件。而在营养生长阶段处于生长静止期的细胞,其色素形成能力也处于稳定。表明静止期的细胞形成色素的能力达到饱和。由此,在生产工艺上,营养生长阶段为 21 d较为合适。

细胞在色素形成培养基上形成色素,也有类似于生长曲线的时间过程。色素形成达到饱和的起始时间是 21 d,因而愈伤组织的收获时间选为 21 d。在工艺上营养生长和色素形成的时间均为 21 d,整个周期共计 42 d。

虽然我们对固体培养基中紫草宁的生产工艺进行了研究,但液体培养基中细胞的生长和色素形成条件又有不同,因而细胞生长和色素形成的规律也会有区别。另外,营养生长期间,在不同时期长期继代培养的细胞,如果再进入色素生产周期,是否对色素形成有影响? 营养生长阶段对形成色素有利的生理生化因子是那些? 都有待于进一步探讨。

致谢: 王纯波同志在有丝分裂指数方面所做的工作。

参考文献:

[1] 严海燕. 紫草愈伤组织形成色素初探 [D]. 南京: 南京大学生物系, 1989.

[2] Fujita Y, Hara Y, Suga C, *et al*. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. Plant Cell Reports, 1981(1): 61-63.

# 豆蔻内掺杂物的鉴别

包 霞*

(内蒙赤峰天奇制药有限责任公司,内蒙古 赤峰 024000)

中图分类号: 282.5 文献标识码: B 文献编号: 0253- 2670(2001)- 03- 0266- 01

豆蔻为 2000年版《中国药典》一部收载的原豆蔻 *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep的干燥或熟果实。我们发现有不法商贩利用白矾水浸泡后干燥而成的豆蔻。鉴别如下,应引起注意。

**1** 性状

具有原豆蔻的性状特征,只是光照药材表面有闪烁的亮点,剥开果实,有的种子表面有明显的白霜,口尝均有白矾的酸、微甘及涩味。

**2** 鉴别

剥开果皮,选种子附着白霜多者,一部分用适量水浸泡,浸泡液作为供试液;另一部分刮取种子附着的白霜粉末,作为供试品,进行铝盐、钾盐与硫酸盐的鉴别反应。

2.1 钾盐的鉴别反应:① 取铂丝,用盐酸湿润后,蘸取供试品,在无色火焰中燃烧,火焰即显紫色。② 供试品,加热炽灼除去铵盐,放冷后,加热溶解,再加 0.1% 四苯硼钠溶液与醋酸,即生成白色沉淀。

2.2 铝盐的鉴别:① 供试液加氢氧化钠试液,即生成白色胶状沉淀;沉淀能在过量的氢氧化钠试液中溶解。② 供试液加氨试液至生成白色胶状沉淀,滴加茜素磺酸钠指示液数滴,沉淀即显樱红色。

2.3 硫酸盐的鉴别:① 供试液加氯化钡试液,即生成白色沉淀;沉淀在盐酸或硝酸中不溶解。② 供试液加醋酸铅试液,即生成白色沉淀;沉淀在醋酸铵试液或氢氧化钠试液中溶解。③ 供试液加盐酸,不生成白色沉淀。

* 收稿日期: 2000- 11- 15

作者简介: 包 霞 (1967-),女,执业药师。主管药师,内蒙古锡林浩特人,1989年毕业于沈阳药科大学中药系,获药学学士学位。现在内蒙赤峰天奇制药有限责任公司工作,主要从事质量监督管理及技术管理工作。