

## 滇紫草培养细胞中色素合成的代谢调节

周立刚 郑光植 王世林 甘烦远

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

培养基中分别加入浓度为  $10^{-5}$  mol/L 的铜离子, 滇紫草愈伤组织中色素含量提高了5.5倍, 悬浮细胞中色素含量提高8.1倍。细胞培养第21天, 加入浓度为  $10^{-5}$  mol/L 的 L-Phe, 色素的合成量最大。浓度为  $10^{-6}$  mol/L 的抗坏血酸, 能明显地促进培养细胞中色素的合成。

**关键词** 滇紫草; 培养细胞; 色素; 代谢

滇紫草 (*Onosma paniculatum* Bur. et Fr.) 系紫草科的一种常用中草药, 主产云南, 药理研究表明, 其主要有效成分为萘醌色素, 具有抗炎、抗肿瘤等多种作用, 此外还广泛应用于染料、食品和化妆品中。应用现代生物技术, 借助植物细胞培养的方法工业化生产紫草色素, 具有许多优越性。日本已成功地进行了与上述滇紫草同科不同属植物紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) 细胞培养工业化生产色素的研究<sup>[1]</sup>。我们从1988年着手进行滇紫草细胞培养与色素生产的研究<sup>[2-6]</sup>。本文是在过去的研究基础上, 首次报道滇紫草培养细胞中色素合成的代谢调节, 探讨适合于滇紫草细胞培养与色素生产的最佳条件, 为将来大量培养创造条件。

### 材料与方 法

#### (一) 实验材料

供试材料为云南产滇紫草茎愈伤组织无性系<sup>[2]</sup>。

#### (二) 培养方法

愈伤组织培养同前文<sup>[8]</sup>。细胞悬浮培养采用旋转式摇床, 转速 110r/min, 振幅 2.0cm。细胞暗培养于添加吡啶乙酸

(IAA)  $10^{-6}$  mol/L、细胞激动素(KT)  $10^{-6}$  mol/L 的 LS<sup>[7]</sup> 液体培养基中。250ml 三角瓶内装培养液 50ml。愈伤组织培养 40 天, 悬浮细胞培养 30 天收获。

#### (三) 培养物产量、色素含量和产量的测定

愈伤组织或悬浮细胞培养一段时间后, 收获, 经冰冻干燥至恒重, 以培养物(包括愈伤组织和悬浮细胞)产量代表其生长, 单位为 g(d.w.)/L。将培养物粉碎, 色素含量测定同 Mizukami 等<sup>[8]</sup>的方法, 将色素含量乘以培养物产量即得色素产量, 单位为 mg/L。本文所得结果均为四次重复平均值。

### 结果与讨论

#### (一) 铜离子的影响

据报道, 铜离子在合适浓度下能明显地促进烟草 (*Nicotiana tabacum*) 细胞中生物碱、黄连 (*Coptis japonica*) 细胞中小藜碱的形成<sup>[9,10]</sup>。由此可见, 铜离子能激活次级代谢过程中某些酶系统。在生长培养基中, 分别加入不同浓度的铜离子

本文于1991年10月10日收到。

作单一因子试验,培养滇紫草愈伤组织和悬浮细胞,结果如图1和图2所示。对于愈伤组织培养(图1),所试验的五个浓度梯度,对色素合成均有不同程度的促进作用。铜离子浓度为 $10^{-5}$ mol/L时,对愈伤组织生长和色素合成的促进作用最为明显,色素产量为161.29mg/L,是对照

(24.78mg/L)的6.5倍,愈伤组织产量为19.65g(dwt)/L,是对照的2倍。铜离子浓度大于 $10^{-5}$ mol/L,愈伤组织产量和色素含量将不再继续增加。铜离子对悬浮细胞影响的结果与愈伤组织大体一致(图2), $10^{-5}$ mol/L时,色素产量达最大值,为321.68mg/L,是对照(35.28mg/L)的

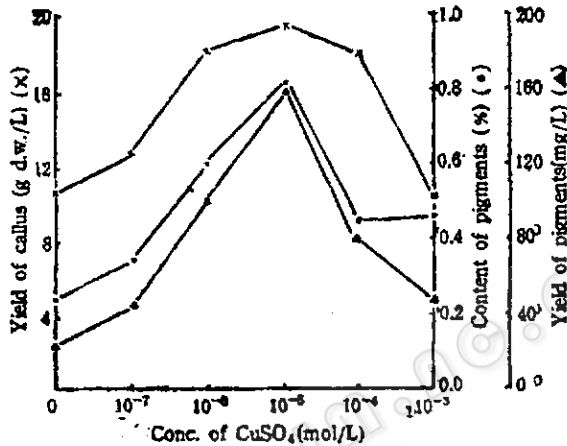


图1 铜离子对滇紫草愈伤组织培养的影响

Fig. 1 Effects of copper ion on callus culture of *O. paniculatum*

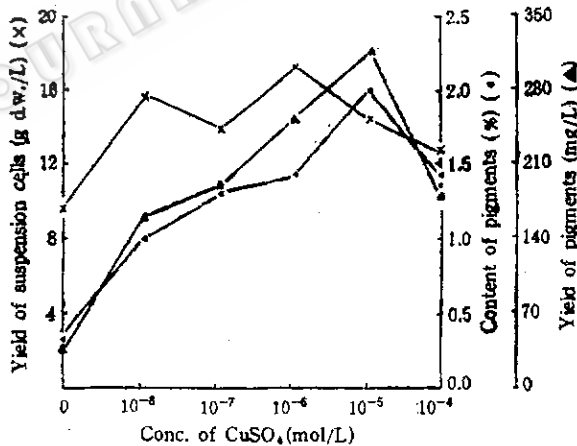


图2 铜离子对滇紫草细胞悬浮培养的影响

Fig. 2 Effects of copper ion on cell suspension culture of *O. paniculatum*

9.1倍。从图1和图2可以看出,铜离子浓度虽然成百倍的增加(小于 $10^{-5}$ mol/L),但培养物产量、色素含量和产量均呈上升的趋势,这说明铜离子作用的浓度范围很大,对愈伤组织和悬浮细胞色素合成的最

适作用浓度均为 $10^{-5}$ mol/L,此外,铜离子对滇紫草悬浮细胞的影响效果要比愈伤组织明显。关于铜离子对色素合成的具体作用机理还有待于进一步研究。

## (二) 苯丙氨酸的影响

DL-苯丙氨酸(Phe)加入 *Plagiobotrys arizonicus* 细胞中培养, 能有效地促进阿卡宁(Alkanin) 的形成<sup>[11]</sup>, 这说明 Phe 可能是萘醌化合物合成的前体。培养不同时间后, 分别加入浓度为  $10^{-4}$  mol/L 的 L-Phe, 结果如表 1 所示。不同时期加入 L-Phe 对细胞生长均无明显影响, 培养第 1、7、14、21 天加入 L-Phe, 色素含量和产量依次增加, 培养第 21 天加入 L-Phe 色素含量和产量达最大值。这是由于在培养开始时, 培养液中生长素和氮源较高, 从而导致 L-Phe 转化成

表 1 不同时期加入 L-Phe 对滇紫草细胞悬浮培养的影响

Table 1 Effects of L-Phe addition time after a period of suspension culture on *O. paniculatum* cells\*

Adding time of L-Phe	Yield of cultures (g d.w./L)	Content of pigments (%)	Yield of pigments (mg/L)
No addition	12.35	0.505	62.39
1st day	11.44	0.567	64.88
7th day	12.54	0.628	78.77
14th day	11.19	0.823	92.13
21st day	11.11	0.888	98.62
28th day	12.39	0.523	64.79

\*L-Phe concentration was  $10^{-4}$  mol/L

表 2 不同浓度的 L-Phe 对滇紫草细胞悬浮培养的影响

Table 2 Effects of L-Phe with different concentration on suspension culture of *O. paniculatum* cells\*

L-Phe (mol/L)	Yield of cultures (g d.w./L)	Content of pigments (%)	Yield of pigments (mg/L)
0	13.47	0.816	109.98
$10^{-5}$	12.53	1.408	176.39
$10^{-4}$	13.05	1.208	157.36
$10^{-3}$	12.10	0.900	108.80
$10^{-2}$	12.97	0.698	90.29

\*L-Phe was added into medium when the cells was cultured for 21 days

蛋白质。到培养后期, 生长素和氮源一旦消耗殆尽, 则蛋白质合成终止, L-Phe 便向生成萘醌色素的方向进行转化。到培养末期(第 28 天)加入 L-Phe, 色素含量和产量并没有增加, 是由于加入 L-Phe 后培养时间太短(第 30 天收获)。以上结果表明, 加入 L-Phe 亦能有效地促进滇紫草培养细胞中色素的合成, 培养第 21 天加入 L-Phe, 色素合成量最大。

培养第 21 天分别加入不同浓度的 L-Phe, 结果如表 2 所示。L-Phe 浓度为  $10^{-5}$ — $10^{-4}$  mol/L 时, 对色素合成有明显

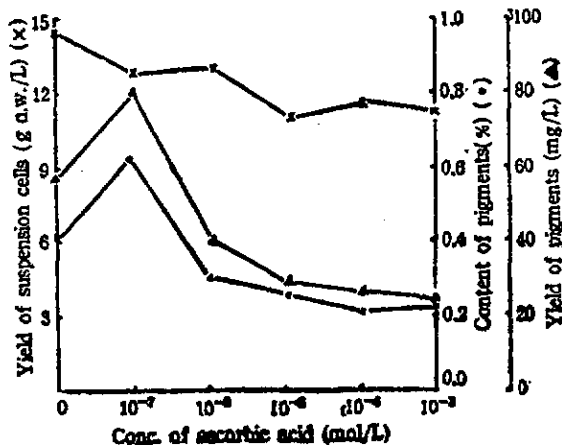


图 3 抗坏血酸对滇紫草细胞悬浮培养的影响

Fig. 3 Effects of ascorbic acid on cell suspension culture of *O. paniculatum*

的促进作用,浓度为 $10^{-6}$ — $10^{-7}$  mol/L,色素含量并没有增加。综合表1和表2,第3组加入 $10^{-6}$  mol/L的L-Phe能较好地促进色素的合成。

### (三) 抗坏血酸的影响

加入不同浓度的抗坏血酸,对滇紫草悬浮细胞培养的影响,结果如图3所示。 $10^{-7}$ — $10^{-8}$  mol/L的抗坏血酸,能不同程度地促进色素的合成,浓度继续加大时则抑制色素的合成。由于抗坏血酸参与细胞

的氧化还原反应,这表明它在类胡萝卜素生物合成途径的氧化还原过程中,起着较为重要的作用。

综上所述,培养液中加入适宜浓度的铜离子、L-Phe和抗坏血酸,均能有效地影响滇紫草培养细胞中色素的合成,这为建立滇紫草细胞两步培养系统,选择合适的生长和生产培养基提供了可靠的科学依据。

### 参 考 文 献

- [1] Fujita, Y. and Tabata, M., In "Plant Tissue and Cell Culture", pp. 167—185, New York, Alan R. Liss, Inc., 1987.
- [2] 周立刚等: 云南植物研究, 13(2):237—240, 1991.
- [3] 周立刚等: 云南植物研究, 13(3):315—320, 1991.
- [4] 周立刚等: 云南植物研究, 14(2):193—197, 1992.
- [5] 周立刚等: 天然产物研究与开发, 2(2):22—25, 1990.
- [6] 周立刚等: 天然产物研究与开发, 3(2):34—38, 1991.
- [7] Linsmaier, E.F. and Skoog, F.: *Physiologium Plantarum*, 18(1):100—127, 1965.
- [8] Mizukami, H. et al.: *Phytochemistry*, 18(8):1183—1186, 1977.
- [9] Tso, T. C. et al.: *Plant Physiology*, 51(4): 805—816, 1973.
- [10] Morimoto, T.: *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(7):1835—1836, 1988.
- [11] Schmidt, H.V. and Zenk, M.H.: *Tetrahedron Letters*, 44:4151, 1971.

## Metabolic Regulation of Pigment Formation of *Onosma paniculatum* Cultured Cells

Zhon Ligang Zheng Guangzhi Wang Shilin Gan Fanyuan  
(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

The pigment yield of *Onosma paniculatum* callus and suspension cultured cells was increased 5.5 and 8.1 fold of that of the control respectively when  $10^{-5}$  mol/L copper ion was added into the medium. The pigments synthesis was stimulated greatly if  $10^{-5}$  mol/L L-phenylalanine was added into medium when the cells were cultured for twenty-one days. The pigments reached the maximum yield when  $10^{-8}$  mol/L ascorbic acid was added into the medium.

### Key words

*Onosma paniculatum*; cultured cells; pigment; metabolism