

· 技术方法 ·

## 怀牛膝细胞悬浮培养条件的优化

李萍<sup>1,2</sup>, 董亚辉<sup>1</sup>, 李成龙<sup>1</sup>, 何雨龙<sup>1</sup>, 李明军<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007; <sup>2</sup>郑州澍青医学高等专科学校, 郑州 450064

<sup>3</sup>河南省道地中药材保育及利用工程技术研究中心/绿色药材生物技术河南省工程实验室, 新乡 453007

**摘要** 为进一步优化怀牛膝(*Achyranthes bidentata*)细胞悬浮培养条件, 对接种量、继代周期、pH、光照及Cu<sup>2+</sup>等多种影响因子的作用效果进行了研究, 以提高怀牛膝细胞生长量及牛膝多糖含量。结果显示, 接种量50 g·L<sup>-1</sup>、继代周期14天, pH5–6和光照培养可以使细胞保持良好的生长状态及多糖合成能力; 添加50 μmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>, 细胞的干重最大, 可达44.63 g·L<sup>-1</sup>, 多糖含量也最高, 为4.02 mg·g<sup>-1</sup>。

**关键词** 怀牛膝, 细胞悬浮培养, 细胞生长, 多糖

李萍, 董亚辉, 李成龙, 何雨龙, 李明军 (2020). 怀牛膝细胞悬浮培养条件的优化. 植物学报 55, 90–95.

中药材牛膝为苋科植物牛膝(*Achyranthes bidentata*)的干燥根。性味苦、甘、酸, 平, 归肝、肾经, 可用于经闭、腰膝酸痛、筋骨无力、淋证、水肿和头痛等疾病治疗(国家药典委员会, 2015)。因以河南省温县、武陟及博爱一带(古称怀庆府)为道地产区, 故又称怀牛膝。牛膝含有多种化学成分, 如皂苷类、甾酮类、糖类及氨基酸、生物碱和香豆素(付国辉等, 2018)。牛膝多糖(*Achyranthes bidentata* polysaccharides, ABPS)是具有免疫活性的小分子多糖, 与一些已知多糖相比, 具有无抗原性、易溶于水、人体易吸收和化学提取质量稳定等特点, 在抗肿瘤、降血糖、降血脂和抑菌抗炎等方面效果显著(胡婷婷和张振凌, 2016)。一方面其可作为药物治疗免疫功能低下引发的疾病(如肿瘤和肝炎); 另一方面也可作为一种免疫增强剂, 应用于保健品开发领域。

植物细胞培养是在离体条件下, 将愈伤组织或其它易分散的组织置于液体培养基中进行振荡培养, 得到分散游离的悬浮细胞, 再通过继代培养使细胞增殖, 从而获得大量细胞群体的一种技术。目前, 细胞培养在人参(*Panax ginseng*)、三七(*P. notoginseng*)、

红豆杉(*Taxus chinensis*)、雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)、白木香(*Aquilaria sinensis*)以及冬凌草(*Rabdosia rubescens*)等多种中药材中均有研究(李铁军等, 2013; 王娟等, 2017; 孟婷和陈随清, 2017; 赵爽等, 2017; 吴燕燕等, 2018; 王一惠等, 2018)。近些年的研究主要集中在生产活性成分、遗传转化以及诱导子等方面。迄今为止, 通过细胞培养生产代谢产物的植物将近1 000种。许多学者对影响植物细胞生长和代谢产物含量的因素(如培养基种类、组成、植物生长调节剂、培养温度、光照、pH和诱导子)进行了探索。调控培养条件是使现有细胞系获得最佳产物含量的基本方法之一(陈月华等, 2016; 别振宇等, 2017)。在前期研究基础上(李明军等, 2008; 李萍等, 2015, 2017), 我们进一步探讨了不同物理和化学因子对怀牛膝悬浮细胞生长和多糖积累的影响, 以期为利用细胞培养技术生产牛膝多糖提供参考。

### 1 植物材料

怀牛膝(*Achyranthes bidentata* Blume.)悬浮培养细胞。

收稿日期: 2019-08-27; 接受日期: 2019-11-13

基金项目: 国家中医药行业科研专项子课题(No.201407005-08)、河南省创新型科技人才队伍建设工程(No.C20130037)和河南省高等学校青年骨干教师培养计划(No.2018GGJS293)

\* 通讯作者。E-mail: limingjun2002@263.net

## 2 培养基成分与培养条件

悬浮培养细胞的培养基成分为B<sub>5</sub>培养基添加2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D、0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA、30 g·L<sup>-1</sup>葡萄糖和1 g·L<sup>-1</sup>水解酪蛋白。培养条件为120 ×g振荡悬浮培养, 温度为(25±2)°C (李萍等, 2015)。在此基础上进行以下实验。

### 2.1 接种量和继代周期对怀牛膝细胞悬浮培养的影响

分别以接种量10、30、50、70和90 g·L<sup>-1</sup>接种怀牛膝细胞于上述培养基中, 培养18天收获细胞, 测定细胞干重(李明军等, 2008)和细胞中的多糖含量(张纯等, 2003) (下同)。

分别以7、14和21天为继代周期对细胞进行继代培养, 2代后收获细胞。

### 2.2 pH与光照对怀牛膝细胞悬浮培养的影响

将怀牛膝细胞分别接种于初始pH值为3、4、5、6、7和8的培养液中, 置于光照(光照强度为36.0 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间为每天14小时)或黑暗下, 培养18天收获细胞。

### 2.3 Cu<sup>2+</sup>对怀牛膝细胞悬浮培养的影响

在怀牛膝细胞接种12天时, 分别加入浓度为0、0.1、1、5、10、30、50和100 μmol·L<sup>-1</sup>的Cu<sup>2+</sup>溶液(CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O母液浓度为1 mmol·L<sup>-1</sup>), 培养18天收获细胞。

### 2.4 数据处理

采用SPSS软件对实验数据进行统计分析, 采用LSD法进行多重比较检验。

## 3 结果与讨论

### 3.1 接种量对细胞悬浮培养的影响

以不同接种量(10、30、50、70和90 g·L<sup>-1</sup>)接种18天后, 怀牛膝细胞干重和细胞中多糖含量的测定结果见图1A, B。接种量为50 g·L<sup>-1</sup>时, 怀牛膝细胞干重及细胞中多糖含量均最高, 分别为35.38 g·L<sup>-1</sup>和3.82 mg·g<sup>-1</sup>; 其中, 细胞干重与其它接种量相比差异显著。接种量过少, 达不到细胞生长所需的最低密度, 细胞生长量

降低, 多糖积累减少; 接种量过大, 单位培养空间内营养有限, 通气量下降, 不利于细胞生长和多糖积累。因此, 我们选择50 g·L<sup>-1</sup>作为怀牛膝细胞悬浮培养适宜的接种量。

### 3.2 继代周期对细胞悬浮培养的影响

分别以7、14和21天为继代周期, 培养2代后怀牛膝细胞干重和多糖含量的测定结果见图1C, D。继代周期为14天的怀牛膝细胞生长最好, 细胞干重及细胞中多糖含量均显著高于7和21天的继代周期。7天的继代周期细胞干重和多糖含量均较低, 可能是由于细胞生长还未完全启动, 此时继代对细胞生长不利。21天的继代周期细胞干重和多糖含量也明显低于14天的继代周期, 可能是因为细胞培养时间太长, 培养基中营养消耗过多, 一部分细胞由于营养不足而死亡。因此, 14天是怀牛膝细胞适宜的继代周期。

### 3.3 pH和光照对细胞悬浮培养的影响

将接种怀牛膝细胞的不同初始pH值(3、4、5、6、7和8)培养基, 分别置于光照和黑暗下, 培养18天时细胞干重和多糖含量的测定结果见图1E, F。在光照和黑暗条件下, pH值为6时怀牛膝细胞的干重最大, 过酸或过碱均不利于细胞的生长; 与黑暗下相比, 光照下细胞的干重均较大。光照下, pH值为3、4、5和6的培养基中怀牛膝多糖含量均较高, 但pH值为5时多糖含量最高; 黑暗条件下, pH值为6时多糖含量最高; pH值为5和6时黑暗条件下细胞的多糖含量均较光照下高。综上, 光照更有利于怀牛膝细胞的生长, 黑暗则对细胞多糖的合成有利。对细胞生长及其多糖合成均有利的pH值为5–6。培养18天后测定培养液的pH值, 均在5.1–5.8之间, 说明怀牛膝细胞有自我调节pH的能力。

### 3.4 Cu<sup>2+</sup>对细胞悬浮培养的影响

在Cu<sup>2+</sup>浓度(0、0.1、1、5、10、30、50和100 μmol·L<sup>-1</sup>)不同的培养基中, 培养18天时怀牛膝细胞干重和多糖含量的测定结果见图1G, H。Cu<sup>2+</sup>浓度为50 μmol·L<sup>-1</sup>时, 怀牛膝细胞的干重最大, 达44.63 g·L<sup>-1</sup>, 多糖含量也最高, 为4.02 mg·g<sup>-1</sup>, 与其它Cu<sup>2+</sup>浓度的培养基相比差异显著。其它各Cu<sup>2+</sup>浓度的培养基对细胞生长的影响不大; 较高Cu<sup>2+</sup>浓度的培养基多糖含量比低浓

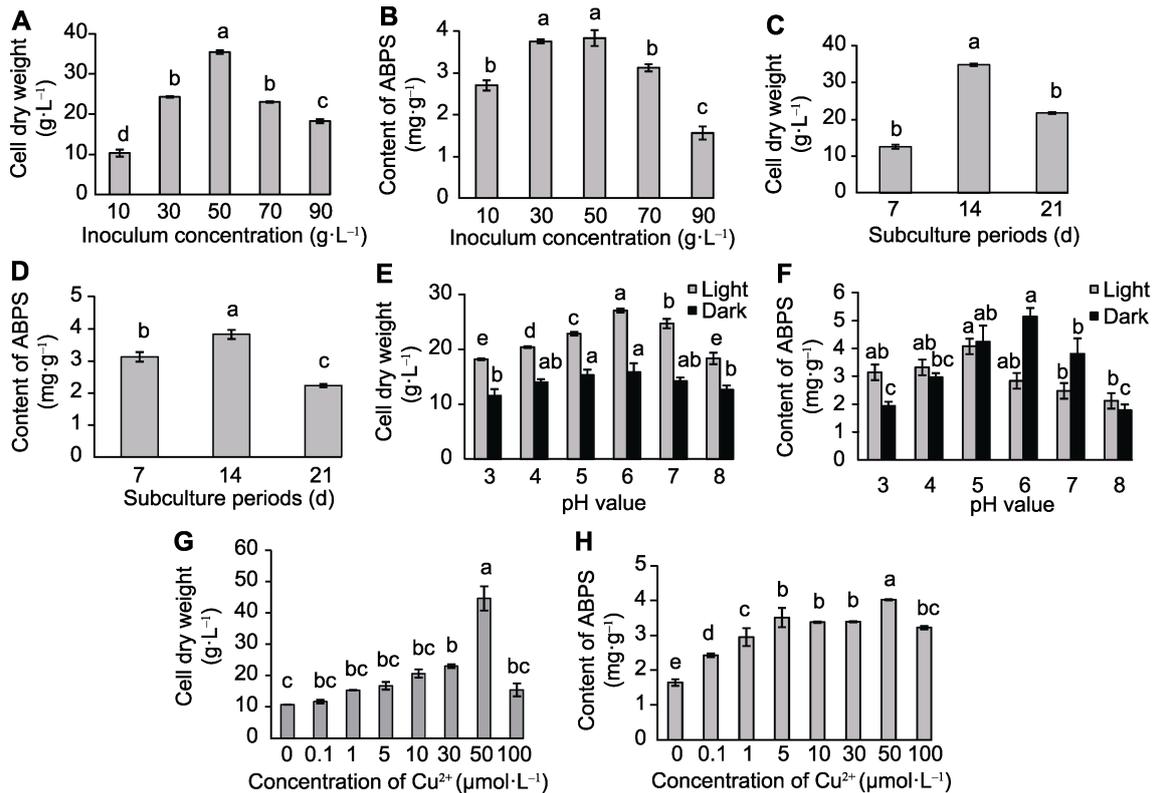


图1 不同因子对怀牛膝细胞悬浮培养的影响

(A) 接种量对细胞生长量的影响; (B) 接种量对细胞中多糖积累的影响; (C) 继代周期对细胞生长量的影响; (D) 继代周期对细胞中多糖积累的影响; (E) pH和光照对细胞生长量的影响; (F) pH和光照对细胞中多糖积累的影响; (G) 不同浓度 $\text{Cu}^{2+}$ 对细胞生长量的影响; (H) 不同浓度 $\text{Cu}^{2+}$ 对细胞中多糖积累的影响。不同字母表示各处理间差异显著( $P < 0.05$ )。ABPS: 牛膝多糖

Figure 1 Effect of different factors on the cell suspension culture of *Achyranthes bidentata*

(A) Effect of inoculum concentrations on the cell growth; (B) Effect of inoculum concentrations on the contents of ABPS; (C) Effect of subculture cycle on the cell growth; (D) Effect of subculture cycle on the contents of ABPS; (E) Effect of pH and light on the cell growth; (F) Effect of pH and light on contents of ABPS; (G) Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration on the cell growth; (H) Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration on the contents of ABPS. The different letters indicate significant differences at the 0.05 level. ABPS: *Achyranthes bidentata* polysaccharides

度 $\text{Cu}^{2+}$ 的培养基高,但二者(含较高和低浓度 $\text{Cu}^{2+}$ 的培养基)与未添加 $\text{Cu}^{2+}$ 的对照相比均差异显著。因此,适宜怀牛膝细胞培养的 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 3.5 讨论

为进一步提高怀牛膝细胞的生长量及细胞中的多糖含量,我们基于前期的研究着重从接种量、继代周期、光照、pH和铜离子等方面对怀牛膝细胞的培养条件进行优化。结果表明,适宜的接种量、继代周期和铜离子浓度可显著提高怀牛膝细胞的生长量和多糖含量。较低的pH值和适当的光照对细胞生长及多糖积累均有一定的促进作用。

接种量是影响悬浮培养细胞生长的生物学因子之一。悬浮培养细胞生长受密度效应的制约,细胞分裂的启动需要达到最低的起始密度(Ozeki and Komamine, 1985)。巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)的最适初始接种量为 $1.2 \text{g}\cdot 50 \text{mL}^{-1}$ (栾林莉等, 2019)。金银花(*Lonicera japonica*)细胞的最适接种量为 $60 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (祖恩凡等, 2019)。玉竹(*Polygonatum odoratum*)根状茎愈伤组织细胞悬浮培养的最佳接种量为 $80 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (王争艳等, 2017)。红花(*Carthamus tinctorius*)的最适宜接种量为 $0.02 \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (郭丹丹等, 2016)。本研究中,怀牛膝以 $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的接种量接种时细胞几乎不分裂, $50 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的接种量对细胞生长和多

糖含量的提高最为有利。在高细胞接种密度下, 细胞生长会迅速启动。Zhang和Zhong (1997)在对人参细胞培养中, 成功运用高密度培养实现了积累代谢产物的目的。但接种密度过高, 单位培养空间内通气量会下降, 营养不足, 有害物质积累, 进而对细胞生长和代谢产物合成产生不利影响, 引起密度抑制效应。因此, 选择合适的接种量, 对提高细胞生长量和代谢产物的含量均有重要意义。

适宜的继代周期对维持悬浮细胞的正常生长也起着关键作用。长春花(*Catharanthus roseus*)发根培养中, 分别以14、21和28天为继代周期, 结果表明, 14天的继代周期细胞生长快并且洛柯辛碱的产量最高, 表现出与细胞生长很强的相关性(Rijhwani and Shanks, 1998)。巴西橡胶树的最适继代周期为7–8天(栾林莉等, 2019)。本研究中, 怀牛膝细胞最适继代周期为14天。此外, 对草莓(*Fragaria × ananassa*)的研究表明, 接种对数期的细胞可较快地再次进入旺盛期, 而接种缓慢生长期的细胞进入下一个快速生长期的时间加长; 对继代周期过长的草莓细胞观察发现, 细胞内含物少, 液泡变大, 表明悬浮细胞处于极度“饥饿”状态, 培养基中的营养成分已消耗殆尽(周春江等, 2002)。Huntley和Murray (1999)研究表明, 植物细胞的分裂与细胞周期依赖性激酶A (cyclin-dependent kinases A, CDKA)有关。CDKA受外源信号生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸和糖等的影响, 在细胞周期调控中起作用。随后, Harashima等(2007)在烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞培养的研究中发现, 细胞循环生长过程中, 添加生长素(如2,4-D)对CDKA的积累和细胞生长非常必要。因此, 在大规模植物细胞培养中, 可考虑添加合适的外源物质, 以缩短其继代周期。

培养液的pH值是影响细胞生长的一个重要参数。徐志荣等(2019)对南方红豆杉(*Taxus mairei*)进行了研究, 发现其细胞培养基最佳初始pH值为5.8。红花细胞生长的最适pH值为5.5–6.0 (郭丹丹等, 2016)。梔子(*Gardenia jasminoides*)悬浮细胞生长的最适pH值为6; 梔子多糖的合成以pH值为5时最高(石若夫, 2002)。莪术(*Curcuma zedoaria*)细胞对培养液pH的适应能力较强, pH值在5–8之间均可保持良好的生长状态, 但pH5更有利于细胞的生长, pH7–8则有利于多糖的合成(罗红梅, 2003)。本研究发现, 怀牛膝细胞

生长与多糖合成的最佳pH值在5–6之间。pH值的升降直接影响细胞质膜的电位, 进而影响其通透性, 并且最终影响细胞的生长。Santarem等(1997)对大豆(*Glycine max*)和豌豆(*Pisum sativum*)的研究表明, pH值水平影响生长素的吸收。多数2, 4-D在相对较低的pH下是关联的, 经由被动扩散更容易被植物细胞吸收, 因此利于细胞的快速生长。

光是植物进行光合作用的能量来源。对于离体生长的植物, 在糖作为培养基成分之一的条件下, 光照也为某些特定的光化学代谢反应产物的合成提供能量, 以维持细胞的正常生长。因此, 光照对于完整植株的生长或是细胞培养均是一种重要的因素。有研究表明, 光照有利于半夏(*Pinellia ternata*)细胞的生长(范美华等, 2004)。本研究中, 光照有利于怀牛膝细胞的生长, 但黑暗对于多糖含量的提高有利。廖斌等(2019)发现黑暗有利于龙眼(*Dimocarpus longan*)胚性悬浮细胞的生长及细胞内柯里拉京的积累。红豆杉细胞培养中, 黑暗条件下仅有阿玛碱的合成被诱导, 其它代谢物(如蛇根碱和酚醛树脂)的合成均被抑制(Pestchanker et al., 1996)。黑暗对紫草细胞中乙酰基紫草素的积累也有一定的促进作用(Gaissner and Heide, 1996)。由此可见, 不同代谢产物的合成对光照的要求有差异, 应根据目的产物的不同选择有利的光照条件。

铜离子作为一种非生物诱导子, 对一些代谢产物的合成具有促进作用。有研究表明,  $\text{Cu}^{2+}$ 浓度为 $24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有利于人参细胞的生长及其多糖的合成(Zhong and Wang, 1996)。 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuCl}_2$ 对红豆杉细胞中紫杉醇的合成影响作用最大(李家儒等, 1999)。提高 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度, 芸薹属植物细胞中的吲哚类植保素的产量大幅提高(Rouxel et al., 1991)。我们的研究发现,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ 对怀牛膝细胞的生长及其多糖积累比较有利。Morimoto等(1989)推测适宜的 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度可能提高线粒体活性, 因线粒体电子传递链末端氧化酶是铜酶(cytaa2Cu:cytaa3), 但具体分子机制尚不清楚, 需进一步探索。

## 参考文献

- 别振宇, 李兴林, 汪珊英 (2017). 诱导子对蜀葵悬浮细胞、不定根培养的影响. 天津科技大学学报 32(3), 23–28.

- 陈月华, 朱艳, 张翔, 秦民坚 (2016). 植物细胞悬浮培养中次生代谢产物积累的研究进展. 中国野生植物资源 **35**(3), 41–47, 57.
- 范美华, 刘树楠, 张国彬, 周吉源 (2004). 半夏细胞悬浮培养中生理生化指标的测定. 生物技术 **14**(5), 78–81.
- 付国辉, 陈随清, 刘嘉, 马蕊, 杨国静, 杨慧辛 (2018). 牛膝化学成分及等级分类研究. 海峡药学 **30**(2), 29–32.
- 郭丹丹, 刘飞, 涂燕华, 高越, 郭美丽 (2016). 红花悬浮细胞体系的建立及其化学成分的UPLC-Q-TOF/MS分析. 中草药 **47**, 4439–4444.
- 国家药典委员会 (2015). 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社. pp. 38.
- 胡婷婷, 张振凌 (2016). 中药牛膝化学成分、药理作用及储藏保管. 中国老年学杂志 **36**, 3321–3322.
- 李家儒, 管志勇, 刘曼西, 吴振斌, 王君健 (1999).  $\text{Cu}^{2+}$ 对红豆杉培养细胞中紫杉醇形成的影响. 华中农业大学学报 **18**, 117–120.
- 李明军, 李萍, 赵喜亭, 张晓丽, 周娜, 王凤娟 (2008). 怀牛膝细胞悬浮培养及多糖含量变化的研究. 西北植物学报 **28**, 494–500.
- 李萍, 许言, 张晓丽, 李炯, 赵喜亭, 李明军 (2017). 不同诱导子对怀牛膝细胞生长及多糖含量的影响. 植物学报 **52**, 615–621.
- 李萍, 赵喜亭, 李明军, 周彩云 (2015). 怀牛膝悬浮培养细胞生理生化特性研究. 河南农业科学 **44**, 106–110.
- 李铁军, 廉美兰, 于丹, 邵春绘, 朴炫春 (2013). 几种因素对悬浮培养人参细胞生长和皂苷积累的影响. 中国中药杂志 **38**, 4047–4051.
- 廖斌, 李汉生, 徐小萍, 董浩, 吴宇函, 梁梓豪, 李珊珊, 屈蒙蒙, 林玉玲, 赖钟雄 (2019). 不同光照条件对龙眼胚性悬浮细胞培养及柯里拉京合成的影响. 福建农业学报 **34**, 27–34.
- 栾林莉, 宋玉凤, 侯辛辛, 陈健妙 (2019). 巴西橡胶树体胚性愈伤组织悬浮系的建立和植株再生. 分子植物育种 **17**, 2614–2621.
- 罗红梅 (2003). 莪术细胞悬浮培养, 挥发油、多糖分离及其多糖生物学活性研究. 硕士论文. 大连: 辽宁师范大学. pp. 20–21.
- 孟婷, 陈随清 (2017). 冬凌草细胞悬浮培养技术研究. 河南中医 **37**, 1107–1110.
- 石若夫 (2002). 椴子组织和悬浮细胞培养及其多糖的分离纯化和生物学活性的研究. 博士论文. 大连: 大连理工大学. pp. 57–58.
- 王娟, 李金鑫, 李建丽, 高文远 (2017). 植物组织培养技术在中药资源中的应用. 中国中药杂志 **42**, 2236–2246.
- 王一惠, 孙睿, 宋萍, 封磊, 吴承祯, 洪伟, 宋欢 (2018). 内生细菌及其组合对雷公藤悬浮细胞生长及生化特性的影响. 热带作物学报 **39**, 1947–1954.
- 王争艳, 王霞, 王欢 (2017). 玉竹愈伤组织诱导及其细胞悬浮培养体系的建立. 福建农业学报 **32**, 963–968.
- 吴燕燕, 李明, 马婷玉, 段修冉, 潘丽萍 (2018). 白木香悬浮细胞培养的研究. 中药材 **41**, 1044–1047.
- 徐志荣, 王婷, 姜佳兰, 魏赛金 (2019). 南方红豆杉细胞悬浮培养体系优化及动力学研究. 林业科学研究 **31**(21), 8–14.
- 张纯, 郭文彪, 王雯佳, 陈爱华, 郭澄 (2003). 改良硫酸蒽酮比色法测定牛膝多糖的含量. 中华临床医药 **4**(19), 17–18.
- 赵爽, 刘颖, 王加利, 袁将, 姬瑞芳, 全庆华, 王贝贝, 董洁, 冀娇娇, 刘永刚 (2017). 利用植物悬浮细胞体系对骆驼蓬碱进行生物转化. 中医学报 **32**, 103–105, 123.
- 周春江, 李卫东, 葛会波 (2002). 草莓悬浮细胞系的建立及某些影响因素. 植物生理学通讯 **38**, 22–24.
- 祖恩凡, 赵晨晨, 张凌霄, 钱晶晶 (2019). 金银花细胞悬浮培养体系的建立研究. 现代园艺 (6), 5–6.
- Gaisser S, Heide L (1996). Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*. *Phytochemistry* **41**, 1065–1072.
- Harashima H, Kato K, Shinmyo A, Sekine M (2007). Auxin is required for the assembly of A-type cyclin-dependent kinase complexes in tobacco cell suspension culture. *J Plant Physiol* **164**, 1103–1112.
- Huntley RP, Murray JAH (1999). The plant cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 440–444.
- Morimoto T, Hara Y, Kato Y, Hiratsuka J, Yoshioka T, Fujita Y, Yamada Y (1989). Berberine production by cultured *Coptis japonica* cells in a one-stage culture using medium with a high copper concentration. *Agric Biol Chem* **52**, 1835–1836.
- Ozeki Y, Komamine A (1985). Effects of inoculum density, zeatin and sucrose on anthocyanin accumulation in a carrot suspension culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **5**, 45–53.
- Pestchanker LJ, Roberts SC, Shuler ML (1996). Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor. *Enzyme Microb Technol* **19**, 256–260.
- Rijhwani SK, Shanks JV (1998). Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by *Catharanthus*

roseus hairy root cultures. *Enzyme Microb Technol* **22**, 606–611.

**Rouxel T, Kollmann A, Boulidard L, Mithen R** (1991). Abiotic elicitation of indole phytoalexins and resistance to *Leptosphaeria maculans* within Brassiceae. *Planta* **184**, 271–278.

**Santarem ER, Pelissier B, Finer JJ** (1997). Effect of ex-plant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev*

*Biol Plant* **33**, 13–19.

**Zhang YH, Zhong JJ** (1997). Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Enzyme Microb Technol* **21**, 59–63.

**Zhong JJ, Wang DJ** (1996). Improvement of cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Cu<sup>2+</sup> effect. *J Biotechnol* **46**, 69–72.

## Optimization of Cell Suspension Culture Conditions of *Achyranthes bidentata*

Ping Li<sup>1,2</sup>, Yahui Dong<sup>1</sup>, Chenglong Li<sup>1</sup>, Yulong He<sup>1</sup>, Mingjun Li<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; <sup>2</sup>Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China; <sup>3</sup>Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs in Henan Province/Engineering Laboratory of Biotechnology for Green Medicinal Plant of Henan Province, Xinxiang 453007, China

**Abstract** To optimize the suspension culture conditions of *Achyranthes bidentata* cells, effect of different factors like inoculum concentrations, subculture cycles, pH, light and Cu<sup>2+</sup> on cell growth and polysaccharides contents was studied. The results showed that, cells grew well with a good ability for polysaccharides synthesis under 50 g·L<sup>-1</sup> inoculum concentration, 14 d subculture cycle, pH5–6 and light. In the presence of 50 μmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>, the cell dry weight could be the maximum with 44.63 g·L<sup>-1</sup>, and polysaccharides contents reached the peak at 4.02 mg·g<sup>-1</sup>.

**Key words** *Achyranthes bidentata*, cell suspension culture, cell growth, polysaccharides

**Li P, Dong YH, Li CL, He YL, Li MJ** (2020). Optimization of cell suspension culture conditions of *Achyranthes bidentata*. *Chin Bull Bot* **55**, 90–95.

\* Author for correspondence. E-mail: limingjun2002@263.net

(责任编辑: 孙冬花)