

445-450

6249(13)

云南植物研究 1996; 18 (4): 445~450
Acta Botanica Yunnanica

毛喉鞘蕊花毛状根培养及二萜化合物的形成*

周立刚² 胡虹¹ 杨崇仁¹⁺ 王君健²¹中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)²华中理工大学药物研究所, 武汉 430074)

Q949.777.6

A

摘要 发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) pRi 15834 菌株感染毛喉鞘蕊花 (*Coleus forskohlii* Briq.) 的根、茎、叶及小苗, 均诱导出毛状根。通过纸电泳, 在毛状根中检测到甘露碱。该毛状根不仅具有典型的形态特征, 并能合成二萜化合物, 对其中 3 个主要成分 forskolin, 1,9-dideoxyforskolin 和 coleol 分别进行了定量测定。MS 培养基有利于 forskolin 和 coleol 的合成, 而 B₅ 培养基促进 1,9-dideoxyforskolin 的合成。

关键词 毛喉鞘蕊花, 二萜化合物, 毛状根, 发根农杆菌, 高效薄层层析

唇形科

FORMATION OF LABDANE DITERPENOIDS BY HAIRY ROOT CULTURES OF COLEUS FORSKOHLII

ZHOU Li-Gang², HU Hong¹, YANG Chong-Ren¹⁺, WANG Jun-Jian²¹Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)²Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract Hairy root cultures of *Coleus forskohlii* Briq. were established from intact plant or explants of roots, stems and leaves by infecting with *Agrobacterium rhizogenes* strain pRi 15834. Transformation was confirmed by paper electrophoresis with mannopine detection. These cultures displayed the typical characteristics of hairy roots. All examined roots formed labdane diterpenoids. Three main identified diterpenoids were forskolin, 1,9-dideoxyforskolin and coleol which were measured quantitatively. MS medium favours forskolin and coleol formation, and B₅ medium enhances 1,9-dideoxyforskolin formation.

Key words *Coleus forskohlii* Briq., Labdane diterpenoids, Hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, HPTLC

毛喉鞘蕊花 (*Coleus forskohlii* Briq.) 系唇形科 (Labiatae) 鞘蕊花属植物, 为印度民间重要药用植物 (Sen 等, 1992), 具有降压和强心作用。其中的活性成分 forskolin 具有直接促进环腺苷酸酶的活性, 导致“第二信使”cAMP 的增加, 此外还具有抗炎活性等 (Sen 等, 1992)。虽然 (±) forskolin 的化学合成得以成功 (Corey 等, 1988; Hashimoto 等, 1988), 但由于成本太高, 加之副产物多, 其商业化生产始终未能实现。我所曾在云南东北部的东川市发现国产毛喉鞘蕊花, 经鉴定为同一种,

*国家自然科学基金资助课题 (29272071)

通讯联系人 Author to whom correspondence should be addressed

1995-04-07 收稿, 1995-06-15 修回

由于生态环境的差异,导致植株的大小与形态,以及花的颜色与印度产的毛喉鞘蕊花有着一定的差异,化学成分的组合亦有所差别。从国产的毛喉鞘蕊花中分离到的主要成分为 2-acetylforskolin (金歧端等, 1990)。利用生物技术离体生产该类二萜化合物,是一个很有价值的研究工作。近年来,国外已有细胞培养方面的研究报道 (Sen 等, 1988; Mersinger 等, 1988)。

本文报告印度产毛喉鞘蕊花毛状根的诱导、培养以及二萜化合物的生产。

材料和方法

植物材料

印度北部邦勒克璃 (Lucknow) 附近产的毛喉鞘蕊花种子在无菌条件下萌发成苗,幼苗在无激素的 MS 琼脂培养基上继代培养,温度 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 60%, 光照 10h/d , 光强 $57 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

毛状根的诱导和鉴定

细菌的培养 发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) pRi 15834 菌株在 YEB (Hooykass 等, 1977) 液体培养基中, 28°C 培养 48 h, 即可用于感染植物材料。

植物材料的感染 毛喉鞘蕊花的根、茎、叶外植物体浸入含有农杆菌的 MS 培养基中 10 min, 用无菌滤纸吸干放于含 10g/L acetosyringone 的 MS 琼脂培养基上, 连续培养两天, 然后转入附加头孢噻肟钠 (cefotaxime) (200mg/L) 的 MS 培养基上, 21°C 暗培养。亦可刺伤无菌苗的茎节, 小心涂上含有农杆菌的 MS 培养液, 将幼苗植入原培养基上继续培养。

毛状根的鉴定 将诱导出的毛状根, 培养于含有头孢噻肟钠的 MS 培养基上, 并逐渐减少抗菌素的用量, 至细菌除去为止, 即可进行毛状根的鉴定。用纸电泳检测培养根中是否含有甘露碱 (mannopine), 具体方法参见另文 (周立刚等, 1996)。

毛状根的培养

固体培养 毛状根在无激素的 MS 琼脂培养基上继代培养, 每 30~40 d 继代培养一次。

摇瓶培养 用体积不等 (从 100 mL 到 5000 mL) 的摇瓶进行毛状根的悬浮培养, 每 7 d 更换一次培养基。

生物反应器培养 体积 2600 mL 液升式生物反应器 (liquid-lift bioreactor) 用来培养毛喉鞘蕊花毛状根, 接种量为 20g FW/L , 氧溶浓度保持在最大饱和度的 90%。

二萜化合物的分析

二萜化合物的提取 将毛状根干燥至恒重, 取 1 g 样品, 用醋酸乙酯在室温下超声波提取 3 次 ($40 \text{mL} \times 3$), 每次 20 min, 提取液减压浓缩后, 用甲醇溶解, 过滤, 即可进行定量分析。

标准曲线的制作 对毛状根中的 forskolin, 1,9-dideoxyforskolin 和 coleol 的含量进行定量分析, 采用 AMD-HPTLC 薄层层析扫描法。用标准对照品制作标准曲线。

仪器设备及试剂

旋转式摇床振幅 2.0 cm (Setric genie Industriel, 法国); 升液式生物反应器 (Setric genie Industriel, 法国); HPTLC, 60F254 硅胶板 (Merck); 加样器 (CAMAG automatic TLC Sampler III, 瑞士); AMD, 多步骤层析仪 (CAMAG automatic multiple development system, 瑞士); 薄层扫描仪 (CAMAG Scanner III, 瑞士); 标准样品购自 Sigma 公司。

结果与讨论

forskolin, 1,9-dideoxyforskolin 和 coleol 的标准曲线

Forskolin 在 200~1000 ng 范围内, 其光吸收值与浓度呈线性关系, 线性方程为 $Y=0.442523X+50.4012$, $r=0.972375$; 1,9-dideoxyforskolin 在 200~500 ng 范围内, 其光吸收值与浓度呈线性关系, 线性方程为 $Y=1.29291X+127.557$, $r=0.964507$; coleol 在 40~100 ng 范围内, 其光吸收值与浓度呈线性关系, 线性方程为 $Y=2.99407X+58.0215$, $r=0.950629$ 。

毛状根的诱导和培养

以发根农杆菌感染植物材料 3 周后, 均诱导出毛状根。这些根转移至含有抗菌素的 MS 培养基上, 表现出典型的毛状根性状特性 (图 1); 生长迅速, 分枝多, 失去向地性生长等。根的提取物, 经纸电泳检查, 含有甘露碱。



图 1 毛喉鞘蕊花毛状根的诱导和培养

Fig. 1 Induction and cultivation of the hairy roots of *Coleus forskohlii* Briq. 1. node inoculated with only fresh medium; 2. node inoculated with bacteria, 3. hairy roots subcultured on MS hormone free agar medium.

毛状根中的二萜化合物

有些植物的培养细胞不需要器官化即可产生次生物质, 但在通常情形下, 植物组织的形态分化更有利于次生产物的形成和积累。实验表明毛喉鞘蕊花诱导培养的毛状根中含有一系列的二萜化合物, 而且, 很少分泌到培养液中。毛状根中二萜化合物的组成和原植物差别较大, 经与标准品 coleol, 1-deoxyforskolin, 1,9-dideoxyforskolin, 6 β -hydroxy-9-dexoy-9-deoxy-coleol, 7-deacetyl-1-deoxy-forskolin, 7-deacetyl-1,9-dedexoyforskolin, forskolin, deacetylforskolin 和 6-acetyl-7-deacetyl-forskolin 对照, 并用多种层析系统的 AMD-HPTLC 检测, 毛状根中主要含有 forskolin, 1,9-dideoxyforskolin 和 coleol。似乎可以认为, 毛喉鞘蕊花毛状根培养系统的二萜化合物生产和代谢较培养细胞更具有优越性。

培养基的选择

为了兼顾毛状根的生长和二萜化合物的生产, 采用 5 种不同的培养基培养毛喉鞘蕊花毛状根, 结果如

表 1 不同培养基对毛状根生长和二萜化合物形成的影响

Table 1 Effects of different liquid medium on *C. forskohlii* Briq hairy root growth and diterpenoid formation.

medium	root yield (g DW / L)	diterpenoid	content of diterpenoid (mg / g DW)	yield of diterpenoid (mg / L)
MS	6.95 ± 0.21	forskolin	0.2142	1.4887
		1,9-dideoxyforskolin	0.0563	0.3913
		coleol	0.2319	1.6117
MS+ IBA 1 mg / L	7.23 ± 0.15	forskolin	0.2745	1.9846
		1,9-dideoxyforskolin	0.0635	0.4591
		coleol	0.1663	1.2023
B ₅	5.19 ± 0.21	forskolin	0.2823	1.4651
		1,9-dideoxyforskolin	0.1713	0.8891
		coleol	0.0841	0.4365
B ₅ + IBA 1 mg / L	4.87 ± 0.32	forskolin	0.2899	1.3857
		1,9-dideoxyforskolin	0.2206	1.0545
		coleol	0.0858	0.4101
B ₅ + IBA mg / L+ HC600 mg / L	3.41 ± 0.16	forskolin	0.1259	0.4293
		1,9-dideoxyforskolin	0.3902	0.3306
		coleol	0.1765	0.6020

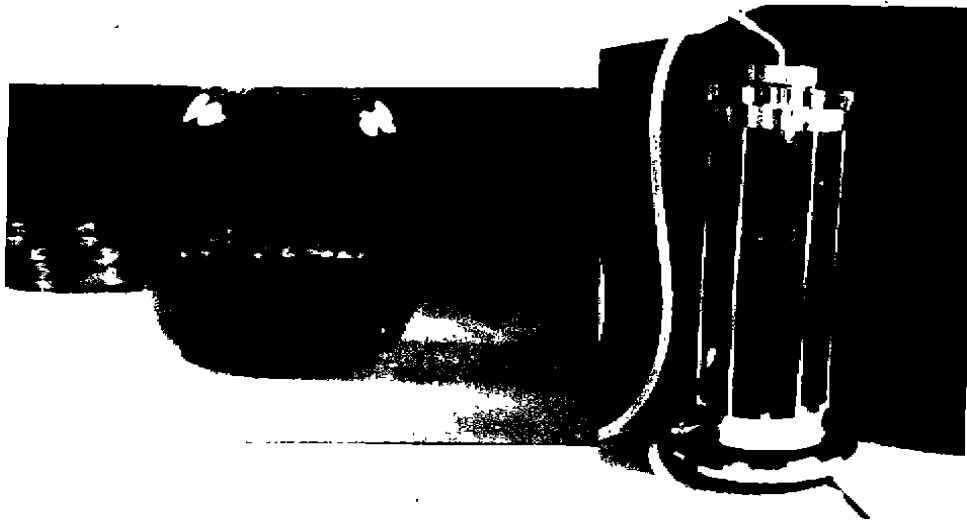


图 2 大体积摇瓶 (A) 和生物反应器 (B) 中生长的毛状根

Fig. 2 Cultivation of the hairy roots of *C. forskohlii* Briq in shake flask and liquid-lift bioreactor.

A: shake flask, B: liquid-lift bioreactor.

表 1 所示。对于根的生长, MS 培养基优于 B₅ 培养基。激素 IBA 对根的生长没有明显的影响, 在 MS 培养基 (含有激素或不含激素) 中, 1,9-dideoxyforskolin 含量较低, 而 forskolin 和 coleol 含量较高。在 B₅

培养基中, coleol 的产率为 0.4365 mg/L , 得率最低; 当 B_5 培养基附加 IBA 1 mg/L 和水解酪蛋白 (HC) 600 mg/L 时, forskolin 的形成受到抑制, 而其它两种主要二萜成分的产率均得到提高。显然, 随着培养基的不同, 二萜化合物的形成是有区别的, 从而提示有可能通过系统筛选设计某一培养基, 使某特定的化合物具有较高的产率, 该项研究在进一步进行中。

毛状根的大量培养

毛喉鞘蕊花毛状根在摇瓶中生长良好, 在培养体积为 3000 mL (总体积为 5000 mL) 的培养瓶中, 生长速率为 0.155 g DW/L.d 。经过 60 d 的连续培养后, 毛状根的产率为 10 g DW/L , 培养物中的 forskolin, 1,9-dideoxyforskolin 和 coleol 的含量分别为 0.2012 mg/g , 0.0834 mg/g 和 0.2513 mg/g 。在升液式生物反应器中培养 (图 2), 其 $p\text{CO}_2$ 和 pH 值的变化如图 3 所示, 毛状根在 2600 mL 的升液式生物反应器中生长良好, 经 3 周的连续培养后, 毛状根产率达到 4.615 g DW/L , forskolin, 1,9-dideoxyforskolin 和 coleolo 的含量分别为 0.1643 mg/g , 0.6215 mg/g 和 0.1535 mg/g 。以上提示, 毛喉鞘蕊花的毛状根不仅能产生二萜化合物, 而且有可能在一定条件下进行大量培养。

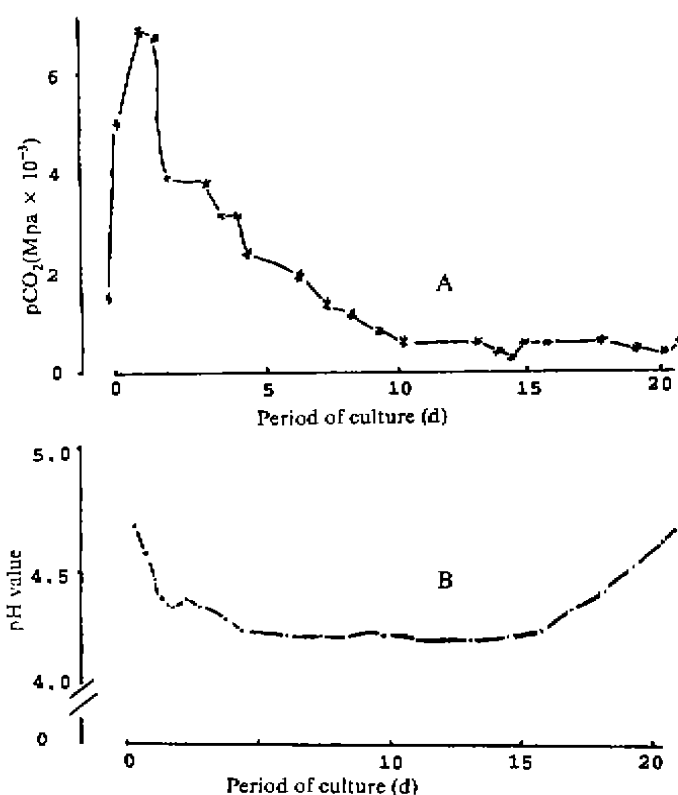


图 3 毛状根在升液式生物反应器中培养的时间进程 A: $p\text{CO}_2$ 的变化; B: pH 值的变化

Fig. 3 Time course of hairy root culture of *C. forskohlii* Briq in liquid-lift bioreactor.

A: Time course of $p\text{CO}_2$, B: Time course of pH value

致谢 本文的部份工作是在法国 LVMH RECHERCHE 完成的, 得到该研究所 Dr. A. Meybeck, Dr. M. Boulay, Dr. F. Bonte 等诸位先生的大力支持协助。

参 考 文 献

- 金歧端, 谢显厚, 木全章, 1990 毛喉鞘蕊花的化学成分研究. 天然产物研究与开发, 2: 61~64
- 周立刚, 杨崇仁, 1996 露水草毛状根的诱导和鉴定. 云南植物研究, 1996; 18(3): 336~340
- Corey E J, Jardine P D S, Rohloff J C, 1988. Total synthesis of (±)-forskolin. *J Am Soc*, 110: 3672~3673
- Hashimoto S, Sakata S, Sonogawa M, 1988. A total synthesis of (±)-forskolin. *J Am Soc*, 110: 3670~3672
- Hooykass P J J, Klaspoijk P, Nutt M P *et al.* 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* T1 plasmid to a virulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium* ex planta. *J Gen Microbiol*, 98: 477~484
- Mersinger R, Dorauer H, Reinhard E, 1988. Formation of forskolin by suspension cultures of *Coleus forskohlii*. *Planta Medica*, 54: 200~204
- Sen J, Sharma A K, Sahu N P *et al.* 1992. Production of forskolin *in vitro* cultures of *Coleus forskohlii*. *Planta Medica* 1992; 58: 324~327

* * * * *

欢迎投稿、欢迎订阅《应用与环境生物学报》(季刊)

《应用与环境生物学报》是由国家科委批准, 中国科学院主管, 由中国科学院成都生物研究所主办并由科学出版社出版的全国性学术性科技期刊(学报级)。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果, 包括研究论文、研究简报和本刊特约的综述。《应用与环境生物学报》是我国科学研究所、研究所、各大专院校以及各科技情报所、图书馆必备的科技刊物, 是我国科学工作者、大专院校师生以及有关科技工作者进行科学交流的良好园地。《应用与环境生物学报》为季刊, 每期96页, 每期定价11.00元。全国各地邮局均可订阅。

刊号: ISSN 1006-687X CN 51-1482/Q

邮发代号: 62-15

刊址: 成都 610041 中国科学院成都生物研究所内