

毛喉鞘蕊花愈伤组织的诱导 及其活性成分的产生

甘烦远 郑光植 沈月毛
(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

摘 要 本文简要报道了毛喉鞘蕊花(*Coleus jorshkohlii*)无菌苗愈伤组织的诱导,初步培养及细胞悬浮培养,同时对培养细胞中的有效成分进行了初步分析。

关键词 毛喉鞘蕊花,愈伤组织,活性成分

毛喉鞘蕊花(*Coleus jorshkohlii*)为唇形科鞘蕊花属植物,主要分布于南亚的印度、斯里兰卡及尼泊尔等地,我国直至最近才在云南省东北部地区发现并采集到。其所含的活性成分二萜化合物具有强降压和强心作用,是一种高效低毒的新型心血管药物^[1],有关单位和科研人员正在进行新药的临床研究及开发。但其化学成分的研究表明,其活性成分在原植物中含量极低,得率仅为 0.001%—0.05%^[1],并且野生资源有限,栽培方法及条件尚有不少困难。虽然也有过组织培养的报告^[2,3],但着重点在快速繁殖方面。国外学者已对其进行过细胞培养的研究,但培养物中有效成分含量仍然太低^[4]。为了保护野生资源及生态环境,提高活性成分的含量,本文应用植物细胞工程技术,对毛喉鞘蕊花进行了组织及细胞培养的初步研究,为将来应用于工业化大量生产其有效活性成分打下基础。

材 料 和 方 法

愈伤组织的诱导

取毛喉鞘蕊花的种子,用 0.2%升汞减压消毒 15 分钟,然后接种于含 0.8%琼脂的培养基上进行无菌苗的诱发。在 26℃下种子大约 15 天左右即萌发,发芽率为 56%左右。取无菌苗的不同器官部位即胚根、胚轴及子叶三部分进行愈伤组织的诱导,方法是将不同器官的外植体剪成长约 0.5—1.0mm 左右的切段,在无菌条件下接种到培养基上进行愈伤组织的诱导。诱导愈伤组织的基本培养基为 MS+2.5mg/L 2,4-D+0.1mg/L KT+0.8%琼脂,并进行了其它不同培养的比较。26±1℃暗中培养。

愈伤组织培养及细胞悬浮培养

将诱导出的愈伤组织与母体分离,然后接种到与诱导愈伤组织相同的培养基上进行

继代培养,后来对培养基进行了改进,愈伤组织培养于 MS+1.0mg/L IBA+0.8%琼脂的培养基上,培养条件与方法同上。每 50ml 三角瓶分装 25ml 的培养基,每次断代的愈伤组织接种量大约为 0.02g(干重)左右。细胞悬浮培养的培养基与愈伤组织培养的相同,但去掉琼脂。摇床转速 120rpm,其它条件同上。每 250ml 三角瓶分装 65ml 的液体培养基,细胞悬浮培养的接种量在约为 0.08g(干重)左右。培养时间均为 30 天。

细胞生长速率的测定

收获的培养细胞冰冻干燥后称重,以每天每升培养基增加的细胞干重克数表示培养细胞的生长速率(g/L·day),每处理至少重复三次,结果取其平均值。

培养细胞中活性成分的初步鉴定

培养细胞收获后,冰冻干燥至恒重,取 10g 干重细胞,无水乙醇 80℃回流提取三次,每次 4 小时,合并回流液,减压蒸干,得棕黑色提取物 2.5g,提取物丙酮定量溶解。进行 TLC 分析,硅胶 G 板,以石油醚:丙酮=8:2 作展开剂,10%硫酸乙醇溶液显色。同时与原植物提取液进行对比。三个标准有效成分分别为: triacetyl-coleoneol-B (I), acetyl-forskolin (II), coleoneol-B (III)^[1]。

结果与讨论

愈伤组织的诱导

我们对毛喉鞘蕊花无菌苗的不同器官部位进行了愈伤组织的诱导。道先把切段接种到不同的培养基上,结果表明,并不是所有供试的培养基都适合于毛喉鞘蕊花愈伤组织的诱导。供试的几种培养基如 MS、6,7-V 等中只有 MS 培养基较适合,其它的培养基如 6,7-V 培养基,切段接种后 20 天左右两端开始变褐色,只有极少胚轴切段中央稍微变粗,到 30 天后,绝大部分切段变黑死亡,在接种到 6,7-V 培养基的 30 块切段中,最后只有 4 块胚轴切段未死亡并长出褐色粘稠的愈伤组织,诱导率仅为 13%左右。

接种到 MS 培养基上的切段,培养 10 天后,胚轴切段中央开始膨大,25 天后整个胚轴切段明显变大,两端开始增厚,30 天后胚轴切段开始全身长出白色、粘稠状的愈伤组织,40 天后愈伤组织长满并包围切段全身,诱导率为 44%左右,但非常粘稠,极不容易与母体分离。胚根切段由于太小,接种后 20 天死亡,子叶切段的诱导率也不高,仅为 5%。因此,在以后的愈伤组织继代培养中,我们只进行了由胚轴诱导而来的愈伤组织的培养,其它切段诱导的愈伤组织已弃去。

愈伤组织培养及细胞悬浮培养

上面已提到,从毛喉鞘蕊花无菌苗胚轴诱导得到的愈伤组织非常粘稠,很不成形,为了改变愈伤组织的这种特性,我们对愈伤组织培养的培养基进行了选择,在供试的几种培养基中,也只有 MS 培养基较为合适,但生长并不快。培养在 6,7-V 及其它培养基上的愈伤组织 20 天以后便变黑死亡。那么愈伤组织生长缓慢并粘稠的原因是什么呢? 因此,我们对培养基中的激素进行选择,结果见表 1。从表 1 可以看出,IBA 最适合于愈伤组织的生

长,特别是浓度为 1.0mg/L 的 IBA,可使愈伤组织迅速生长,其生长速率可与其它的植物愈伤组织如红花等^[5]相近。但愈伤组织仍不很疏松,还偶有不定根分化。其它植物激素或组合都不很适合其生长。在以后的断代培养中,我们进一步对培养基进行了优化,包括添加有机复合物、各种培养基的配比等。最后得到了一种理想的培养基配方,即 MS+1.0mg/L IBA+0.8%琼脂。在这种培养基条件下,愈伤组织生长迅速,灰白色,疏松,不结块,也没有不定根分化。其生长速率可达 0.35g/L. day,而细胞悬浮培养的生长速率可达 0.50g/L. day 以上。

表 1 植物激素对毛喉鞘蕊花愈伤组织生长的影响

Table 1 The effect of plant hormones on the callus growth of *Coleus prskobii*

plant hormones*	concentrations (mg/L)	callus growth**
2,4-D	0.5	+
	1.0	++
	2.0	++
	2.5	+
IBA	0.1	+
	0.5	+++
	1.0	++++
	2.0	+++
NAA	1.0	+
IAA	2.0	+
2,4-D+IBA	1.0+0.5	++
	0.5+1.0	++

* the base medium was MS+0.1mg/L KT+0.8% Agar.

** + callus growth was very slowly, and ++ was slowly, +++ was fast, ++++ was very fast

一些培养因素对愈伤组织生长的影响

愈伤组织培养于光照条件下(每天光照 12 小时, 1000lx)会变为绿色、结块、变硬,有不定根长出。其它的物理因素试验表明,较适合的 pH 值为 5.5—5.8,较合适的培养温度为 20—30℃。添加有机附加物(如椰子汁、水解酪蛋白等)可以使愈伤组织生长更快,但不到收获时间愈伤组织便会变黑死亡。因此,毛喉鞘蕊花愈伤组织的培养条件是:26℃暗中培养,培养基的 pH 为 5.6 左右。

愈伤组织中有效成分的初步鉴定

TLC 层析结果表明,愈伤组织乙醇提取物的成分与原植物根的乙醇提取物的成分相似,均含有与标准品(I、II、III)相对应的点,在用石油醚:丙酮=8:2 作展开剂时,标准品 I、II、III 的 R_f 值分别是:0.47、0.36、0.29。从 TLC 层析图上可以看出,愈伤组织乙醇提取物中与三种标准品对应的斑点要比

原植物根的乙醇提取物的相对应的斑点大(在相同重量及相同定容体积情况下),说明愈伤组织中这几种有效成分的含量要比原植物高。但由于我们对其含量分析方法还未成熟,因此,准确的含量分析要在另文中介绍。

致谢 金歧端先生提供毛喉鞘蕊花种子及标准品。

参 考 文 献

- [1] 金歧端、谢显厚、木全章,毛喉鞘蕊花的化学成分研究,天然产物研究与开发,1990,2(3),69
- [2] 罗桂芬,鞘蕊花的组织培养,植物生理学通讯 1992,(2),132
- [3] 黄仕周、熊德华,滇毛喉鞘蕊花叶片培养成再生植株及其无性系的繁殖,植物生理学通讯,1991,(5),373
- [4] Kromholz R et al. ,The root cultures from *Coleus jorskohlii*. *Plania Med*,1990,56(6):629—630.
- [5] 甘烦远、郑光植,红花愈伤组织诱导、生长及其 α -生育酚的产生,云南植物研究,1991,13(2),189—195

CALLUSINDUCTION AND ITS ACTIVE COMPONENT PRODUCTION FROM *COLEUS JORSKOHLLII*

Can Fanyuan, Zheng Guangzhi, Shen Yuemao
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204*)

Abstract

This paper reported briefly that the callus induction preliminary culture and cell suspension culture from *Coleus jorskohlii*. At the same time reported the preliminary identification by TLC of the active compounds from the culture cells.

Key words *Coleus jorskohlii*, Callus, Active compounds