

红花的组织培养及基因工程研究进展

王岩军

(新疆农科院核生所,乌鲁木齐 830091)

摘要:红花是传统的药用植物,也是一种新型的油用和工业资源植物,在其组织培养过程中,试管苗的再生不仅与植株的基因型、苗龄及组织的来源、状态等有关,还受许多外界因素如盐浓度及激素的种类与配比的影响。在红花的基因工程研究过程中,农杆菌介导法较为常用。组织培养及外源基因转化技术的日趋成熟,为红花基因工程奠定了良好基础。对红花组织培养、DNA 转化方法及其基因工程进行了较为系统的概述。

关键词:红花;组织培养;基因工程

中图分类号:S567

文献标识码:A

文章编号:1001-4330(2008)S1-0237-05

Advance of Research on Tissue Culture and Gene Engineering of Safflower

WANG Yan-jun

(Institute of Nuc-tech and Bio-tech, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, 830093)

Abstract: Safflower is a new oil and industrial resource as well as a traditional Chinese medicinal plant which possesses great potentiality for development. In its tissue culture, the regeneration of tube shoots was associated with plant genotype, explant day age and resources, and also with salt concentration, auxin types and so on. In the studies of gene engineering of safflower, Agrobacterium-mediated transformation was generally used. With the development of technology of plant tissue culture and transformation of foreign genes, good basis was founded for gene engineering of safflower.

Key words: safflower (*Carthamus tinctorius* L.); tissue culture; gene engineering

红花(*Carthamus tinctorius* L.)为一年生草本植物,属菊科红花属,约由 20~25 种组成。红花分布较广,在很多国家均有栽培。全世界红花年种植面积约 $110 \times 10^4 \text{ hm}^2$,籽粒产量约 $89 \times 10^4 \text{ t}$ 。我国红花栽培历史悠久,汉代就有关于红花栽培和药用的记载。近年来,我国红花栽培面积在 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4 \text{ hm}^2$,主要是药用,部分油药兼用。我国红花产区主要集中在新疆,其次为四川、云南、河南、河北、山东、浙江、江苏等省^[1]。红花具有活血通经,去瘀疗伤,宣毒透疹等功效,药用有效成分为红花黄色素和红花红色素。红花种子含油率高,尤其是亚油酸含量很高,油质好,用途广。红花油大量用来制作油漆和染料。红花适应性强,抗旱、耐寒、耐盐碱,是一种用途广泛的经济植物^[2]。近来研究临床上常用来治疗子宫充血、心血管、血栓形成等疾病,也作止痛,消炎剂等应用^[3]。在选育新的高产优质、抗病等品种方面仍然以常规选育为主,也尚未取得突破性进展。红花组织培养和基因工程改良品种方面的研究,国内亦仅刚刚起步。国外虽然开展了一些研究,但还不够深入,有待继续加深研究。随着红花综合利用的开发和研究的深入以及基因工程高新技术的应用,必将促进红花生产的迅速发展^[4]。

1 红花的组织培养

1.1 组织培养在红花上的应用

1.1.1 通过细胞培养生产次生代谢产物

生育酚(Tocopherols)是制药工业中的有用成分之一,也是食品工业中的抗氧化剂。它能保护不饱和脂肪酸使其不被氧化成脂褐色素(Lipofuscin)及其自由基,从而维护细胞的完整和功能,有一定的抗衰老作用。生育酚有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种异构体,主要存在于植物油中。其中以 α 型的生理功效最高^[5]。天然存在的生育酚是 d 构型,化学合成的为 dl 构型,活性比前者低。因此,应用生物技术制备天然生育酚已

引起关注^[6]。通过红花细胞培养来生产高活性的生育酚已有报道。Furuya 等^[7]从红花花蕾的愈伤组织中分离到了生育酚,并且主要是 α 型。甘烦远等^[8]也作了报道,其主要操作程序和实验结果与 Furuya 等相一致。这些报道表明,通过细胞培养来大量生产高活性的生育酚是可行的。

王锴等^[9]研究表明,添加 11% 酪蛋白对生育酚的合成具有明显的促进作用,这与 Furuya 等和甘烦远等的报道是一致的。最佳的激素组合是第 2 组,即添加 130 mg/L 2,4-D 和 1 180 mg/L 6-BA,收获的 α -生育酚含量达 411 706 $\mu\text{g/g}$ 鲜重, β -生育酚含量达 13 120 $\mu\text{g/g}$ 鲜重, γ -生育酚含量 11 650 $\mu\text{g/g}$ 鲜重,有效生育酚含量 414 091 $\mu\text{g/g}$ 鲜重,远远超过其它各组及对照组,更加适合于生育酚的积累。合理地优化培养基,的确能大大提高产物得率。因此,经优化后的培养基,所收获的红花细胞中有效生育酚含量是对照培养基的 57 倍。采取组合试验的设计方案,所取的几个实验点都具有代表性。既减少了实验的工作量,也减小了盲目性。

20 世纪 90 年代初期日本一些科学家利用组织培养技术对红花进行了生产红色素的研究。Wakayama 等^[10,11]对 MS 培养基进行改良,通过两步培养法生产出红色素。Hanagata 等^[12-14]通过 MS 培养基添加高浓度的植物激素刺激细胞生长的两步培养法以及对 White 培养基进行修饰添加高浓度的细胞激动素生产色素都获得成功^[15]。

1.1.2 种质保存

运用组织培养的方法,控制植株的生长速度,不仅能避免种质资源受病虫害的侵袭,还能节省人力和空间。此外,红花组织培养系统可作为一种模式体系,来分析基因转移、体细胞变异和种质保存等方面存在的问题,研究其生长、分化及幼嫩、成熟和药物作用的分子机制。

1.2 影响红花组织培养的因素

从理论上讲,每一个植物细胞都具有再生完整植株的能力,即细胞全能性。但在实际研究中,由于红花的组织培养工作不像其他植物一样开展的广泛和深入。到目前为止,对在其他植物中影响组织再生的因素如基因型、性别及年龄、组织来源、生理状态等多种因素的影响在红花中并不是很清晰,根据现有不多的研究资料发现下列影响。

1.2.1 苗龄对组织再生频率的影响

Nikam(1999)等^[16]研究发现,4 到 7 d 苗龄的外植体产生幼苗的再生频率高于 2~3 d 比较幼嫩和 8~15 d 比较老的苗的外植体。

1.2.2 同一植株上不同器官的再生能力有所不同

研究表明同一植株上不同器官的再生能力有所不同,即使同一器官的不同部位,再生能力也有差异。靳占忠等^[17]研究发现,在 3 种外植体的生根效应中,根(75%)远比子叶和胚轴(33%)高。说明虽然不同器官均可诱导产生愈伤组织,但其后的分化与原器官仍有着密切的联系。红花的胚根、胚轴、子叶、花蕾、花瓣诱导的愈伤组织均具合成 α -生育酚的能力^[8,18],以胚轴产生的愈伤组织和悬浮培养细胞的生长速率及 α -生育酚含量高。细胞生长适宜的培养基为 MC 培养基^[19],培养基中附加 10% 椰子汁或 0.1% 酪蛋白水解氨基酸可使细胞生长显著提高^[20]。加入前体,特别是加入植物醇,能显著提高 α -生育酚含量。培养基添加 30 g/L 蔗糖有利于细胞生长,30 g/L 葡萄糖有利于 α -生育酚积累。0.55% 肌醇可促进细胞生长及增加 α -生育酚含量。细胞接种量为 0.035~0.067 g 干重/瓶(50 mL)时,细胞生长最快。高浓度 CO_2 (5%)可明显促进 α -生育酚积累。培养基中加入 0.44%~0.55% 肌醇, α -生育酚含量和产率均成倍提高。添加植醇和人参寡糖能促进红花培养细胞生长及提高 α -生育酚含量^[21,22]。

红花的胚轴、子叶和子叶节,在 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.4 mg/L 的培养基中均可诱导产生愈伤组织,诱导率达 89%~100%。生长一个月产生丛生芽。将芽切割转入 MS+IBA 0.5mg/L 的生根培养基中,生根率达 67%^[17]。红花愈伤组织的过氧化物酶和脂酶同工酶,其品种间的差异不小于不同器官间的差异。随外植体的子叶脱分化过程的进行,过氧化物酶谱带增多,而酯酶则减少,并出现特异的诱导酶带^[23]。超微结构显示,红花子叶脱分化过程中的细胞代谢极其活跃,贮藏的脂类在愈伤组织诱导的初期被利用。叶绿体也产生质体分裂或出芽增殖的脱分化过程^[24]。

2.1 基于组织培养的遗传转化

2.1.1 农杆菌介导法

目前应用的生物介质主要是根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*Agrobacterium*

rhizobium)。根癌农杆菌和发根农杆菌的转化原理分别是通过活化 Ti 质粒和 Ri 质粒的 *vir* 区基因,达到对 T-DNA 转移的目的。农杆菌介导的油菜遗传转化过程中,众多因素如外植体的再生能力、农杆菌的侵染能力、外植体与农杆菌的共培养时间、以及选择压的高低等都会影响遗传转化效率。

农杆菌介导的遗传转化是建立在组织培养的基础之上的,由于不同品种或同一品种的不同器官或组织的再生能力的不同,因此利用农杆菌进行遗传转化之前,首先需要根据不同的外植体建立相应的高效再生体系。贾士荣等^[25]认为用于遗传转化的外植体的再生率应在 80%~90% 以上。

2.1.2 病毒介导法

病毒载体是最近新出现的一种用于植物转化的载体。植物病毒转基因系统是将外源基因插入到病毒基因组中,通过病毒对植物细胞的感染而将外源基因导入植物细胞^[26]。目前正在研究发展的植物病毒载体系统有 3 种:①单链 RNA 植物病毒载体系统,是以单链 RNA 为模板经反转录酶作用合成双链的 cDNA,将其克隆到质粒或粘粒载体上,把外源基因插入到病毒的 cDNA 部分,通过体外转录,将带有外源基因的病毒 DNA 感染并进入植物寄主细胞。Kozic 和 Siegal 于 1984 年首先应用烟草脆裂病毒 (TRV) 这种病毒载体系统。②单链 DNA 植物病毒载体系统,是由单链环状 DNA 分子组成,一般存在成对的 2 个病毒颗粒。这种二连基因组可以把外源基因插入其中 1 种 DNA 上而不影响另 1 种 DNA 基因组的复制。Ugaki 等利用小麦矮缩病毒 (WDV) 的基因组为基础构建了穿梭质粒,转到玉米胚乳原生质体中,检测到报告基因的表达。③双链 DNA 植物病毒载体系统,是将其病毒基因组中对病毒繁殖非必需的 1 段核苷酸序列去掉,换上 1 小段外源 DNA 而不影响病毒基因组正常包装。用这样重组的病毒载体感染植物细胞以获得外源基因的转移。目前研究和应用主要集中在花椰菜花叶病毒 (CaMV),把二氢叶酸还原酶基因插入 CaMV 构建稳定重组病毒载体侵染芜菁后,使芜菁产生氨甲喋呤的抗性^[27]。

2.2.2 PEG 介导法

该法由 Davey 等和 Krens 等首先建立,主要原理是借助细胞融合剂诱导原生质体摄取外源 DNA。在添加 PEG 和外源 DNA 时,人们已成功地将外源基因整合到原生质体基因组,并得到表达^[28]。利用原生质体的全能性,目前此种方法已在多种禾谷类作物如水稻、大麦、玉米及一些双子叶植物中获得了转基因植株^[29]。

2.2.3 电激法

利用高压电脉冲作用,造成外植体穿孔而摄取外源 DNA。我国科学家李宝健等首先将其应用于植物的遗传转化。自 1986 年 Fromm 等首次使用电击法进行植物转化以来,国内外已在水稻、马铃薯、番茄、甜菜、大豆、甘蔗、小麦、油菜等作物上获得成功^[30]。

最初转化的受体多为原生质体和植物分离细胞,后来又将受体扩展到叶片组织、体细胞及合子胚、悬浮细胞等完整细胞中。

2.2.4 显微注射法

显微注射法是使用毛细微管在显微镜下将外源 DNA 注射入植物细胞或原生质体的一种直接而完善的方法。这种方法最先用于动物细胞的遗传转化。由于植物细胞的细胞壁和原生质体的弹性,通常将细胞用琼脂糖多聚赖氨酸固定,也可用吸管吸取单个细胞固定,然后将外源 DNA 通过特制的毛细微管注入细胞、原生质体或直接注入核内。1984 年,Steinbiss 等最早应用该方法将外源 DNA 注入植物原生质体并实现了转化^[31]。现已用于多细胞系统,如未成熟胚、悬浮细胞和分生组织等。

2.2.5 基因枪法

基因枪法是 1987 年由美国康奈尔大学生物化学系 Sanford 提出,是指用钨粉或金粉包裹外源 DNA,而后依靠基因枪装置,利用高压氦气冲击波加速微弹去穿透植物细胞壁和细胞膜,使外源 DNA 进入植物细胞并整合到植物细胞染色体组中,从而达到稳定遗传和表达的目的。该方法对受体材料、靶细胞来源基本不受限制,细胞、组织、器官等均可作为受体用以转化。目前通过基因枪技术,很多植物都可以得到转化,如小麦^[32]、水稻^[33]、玉米^[34]、大豆^[35]、棉花^[36]等。

2.2.6 激光微束法

利用激光造成细胞形成能自我愈合的小孔,从而让外源 DNA 进入细胞,实现基因转移。到目前为止,仅有 Weber 等^[37,38]利用此方法将外源 GUS 基因导入油菜的叶绿体中并获得转化体。

2.2 影响农杆菌转化的因素

植物转基因的过程,不仅仅是外源 DNA 转移到植物细胞中去的过程,而是项综合性的工作,包括外

源基因的分离和克隆,外源基因导入植物细胞和在植物细胞中外源基因的表达及稳定遗传。由于要考虑到各种因素,选择转基因方法时必须仔细考虑。目前对红花外源基因转化研究都是利用农杆菌为转化外源基因的载体。从报道的研究资料分析,影响农杆菌转化的因素主要有:

根癌农杆菌有三大菌系,即胭脂碱型、章鱼碱型和琥珀碱型。不同菌系的根癌农杆菌具有不尽相同的寄主范围,对同一植物的转化效率存在差别。Damgaard 等^[39]用 5 种带有不同染色体毒性位点及质粒毒性区的农杆菌菌株转化 8 个甘蓝型油菜品种,发现章鱼碱型菌株 LBA4404 的转化效果差,该菌株仅在品种“Falcon”中得到转化植株,而胭脂碱型菌株 C58C1 在 8 个品种中都得到转化植株。

外植体的类型、年龄、极性、部位和接种方法影响农杆菌的转化效率。目前应用最多的外植体有无菌苗的子叶、下胚轴、根段以及大田植株的花茎切段等。有研究表明,以下胚轴和花茎为外植体时,极性是影响芽再生的重要因素。一般认为,近根端容易产生根,远根端容易产生芽。一般下胚轴的上部芽再生能力强,而下部再生能力弱。接种方法也影响转化效率,插根较平放芽再生率要高得多。插植的方向对芽再生也有显著影响。

对根癌农杆菌及 Ti 质粒进行改造,可扩展根癌农杆菌的宿主范围和提高转化率。利用根癌农杆菌毒力基因 *virG* 的突变体 *virGN54D* 造成其他 *vir* 基因的组成性表达,将其转入 LBA4404 中,能提高菌株对玉米的转化率。也有利用 35S 启动子和 HSP70 内含子构建农杆菌表达载体在小麦上得到高的转化频率。另外,在启动子附近插入增强子也能提高表达效率。

诱导物质的应用及合适的 pH 值。酚类化合物是 Vir 区基因的诱导激活物,对于单子叶植物,由于其自身产生很少的酚类化合物,因而在培养时,加入酚类化合物尤为重要。在大麦、小麦等作物的转化中发现酚类物质对农杆菌介导的遗传转化有促进作用,现在报道的主要应用的酚类物质是乙酰丁香酮。Vir 基因活化还要求 pH 值为 5.0~5.5,同时培养基中的糖以及高浓度的肌醇亦可促进 *vir* 基因活化。

3 存在问题

转基因红花的育种研究一开始就应向着应用化的方向进行,育种目标主要包括红花品质改良(改变脂肪酸组分、提高含油量、改良油的品质和改良籽饼品质、种子贮藏蛋白等)、抗性改良(如除草剂抗性、真菌抗性、病毒抗性、抗虫性)和适应性改良等。虽然红花的基因工程研究因为高效再生体系的困难建立而限制了研究工作的开展,但是,随着红花综合利用的开发和研究的深入以及基因工程等高新技术的应用,必将促进药用红花生产的迅速发展。借鉴其他植物外源基因转化的研究,发现红花的基因工程研究中存在着:

(1)最佳外植体再生体系的建立。需要从外植体种类、培养基配方等方面着手建立最佳再生体系。

(2)遗传转化技术中存在的问题。方法单一、转化频率低和实验重复性差也是转化过程中的突出问题。

(3)转基因的安全性。尽管现在尚没有转基因红花被应用于实际种植,但同其他转基因植物一样,应考虑到它的未来生物安全性问题。转基因植物对人与环境可能的危害有:打破生态平衡,转入的基因有可能导致有害的新型的生物类型产生;基因污染,转基因植物携带的基因通过花粉传播给其野生种或其它植物种,减少了遗传多样性;产生新的毒性或过敏原。转化的基因由于是随机整合到植物染色体中,“位置效应”可能打破转基因植物正常的生理代谢,产生新的代谢产物,这种物质有可能是毒素或过敏原。

参考文献:

- [1]赵钢,王安虎.红花的资源及药用价值[J].中国野生植物资源,2004,23(3):24-25.
- [2]李隆云,周裕书.近年来红花栽培育种研究概况[J].中草药,1990,21(7):41-44.
- [3]杨晓君,吴桂荣.红花的现代研究[J].农垦医学,2004,26(4):301-304.
- [4]李隆云,付善全.近年来药用红花栽培和组织培养研究进展[J].特产研究,1997,(4):29-30.
- [5]郑集,陈灼辉.普通生物化学(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1998:220.
- [6]国家自然科学基金委员会.自然科学学科发展战略调研报告·植物科学[M].北京:科学出版社,1993:59.
- [7]Tsutomu Furuya et al. Phytochemistry, 1987, 26 (10): 2 741-2 747.
- [8]甘炳远,郑光植.植物学报,1991,33(7):516-522.
- [9]王铮,邵鸥,岑沛霖.红花细胞培养条件的优化及其胞内产物生育酚的积累[J].生物工程学报,1999,15(4):444-449.
- [10]Wakayama S, Kusaka K & Kanehira T, Kinobeon A, a novel red pigment produced in Safflower tissue culture systems. Z. Naturforsch. 1994, 49c: 1-5.

- [11]Wakayama S, . A novel red pigment, kinobion A produced by the culture of composite plants[J]. Shokubutsu Soshiki Baiyo 1995, 12:297 - 302.
- [12]Hanagata N, Ito A, Fukuju Y & Murata K, Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus tinctorius* L. Biosci[J]. Biotechnol. Biochem. 1992, 56:44 - 47.
- [13]Hanagata N, Ito A & Uehara H, Behavior of cell aggregate of *Carthamus tinctorius* L. cultured cells and correlation with red pigment formation[J]. J. Biotechnol. 1993, 30: 259 - 269.
- [14]Hanagata N & Karube I Red pigment production by *Carthamus tinctorius* L. cells in a two - stage culture system[J]. J. Biotechnol. 1994, 31:59 - 65.
- [15]Gao W. Y., L. Fan & K. Y. Paek. Yellow and red pigment production by cell cultures of *Carthamus tinctorius* in a bioreactor[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 60:95 - 100.
- [16]Nikam, T. D. & M. G. Shitole, In vitro culture of Safflower L. cv. Bhima: initiation, growth optimization and organogenesis[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 55:15 - 22.
- [17]靳占忠, 侯占铭, 韩碧文. 红花的愈伤组织诱导及其与过氧化物酶和酯酶同工酶的关系[J]. 植物生理学通讯, 1989, (8): 15 - 18.
- [18]甘烦远, 郑光植. 提高植物培养细胞中次级代谢产物含量的途径[J]. 植物学通报, 1991, 8(4): 14 - 20.
- [19]周平, 郑光植. 红花单细胞克隆的建立[J]. 植物学报, 1989, 31(9): 661.
- [20]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[J]. 云南植物研究, 1991, 13(2): 189 - 195.
- [21]甘烦远, 郑光植, 王世林, 等. 诱导子人参寡糖对红花培养细胞的生理效应[J]. 植物学报, 1992, 34 (3): 208.
- [22]甘烦远, 郑光植, 彭丽萍, 等. 云南红豆杉细胞的悬浮培养[J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 45 - 46.
- [23]侯占铭, 韩碧文. 红花组织培养中细胞分化的超微结构研究[J]. 植物学报, 1994, 36(增刊): 61
- [24]廖系哈. 培养红花细胞产生红色色素[J]. 四川中草药研究, 1992, (33-34): 85.
- [25]贾士荣, 曹冬孙. 转基因植物[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 3 - 15.
- [26]卢雄斌, 龚祖坝. 植物转基因方法及进展[J]. 生命科学, 1998, 10(3): 125 - 131.
- [27]高俊山, 林毅, 叶兴国, 等. 植物转基因技术和方法概述[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(5): 802, 805.
- [28]Datta S K, Datta K, Soltanifar N, et al. Herbicide - resistant India rice plants from IRR1 breeding line IR72 after PEG - mediated transformation of protoplasts [J]. Plant Mol Biol, 1992, 20 : 619 - 629.
- [29]薛红卫, 卫志明. 通过 PEG 法转化甘蓝获得转基因植株[J]. 植物学报, 1997, 39(1): 28 - 33.
- [30]傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [31]褚启人, 叶承道. 禾谷类作物外源基因导入及表达的研究进展[J]. 上海农学院学报, 1991, 7(1): 90 - 96.
- [32]Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by micro - projectile bombardment of regenerable embryogenic callus[J]. Bio/ Tech, 1992, 10 : 667 - 674.
- [33]许新萍, 卫剑文, 范云六, 等. 用基因枪法转化水稻胚性组织获得可育的转基因植株[J]. 植物学报, 1999, 26(3): 219 - 227.
- [34]王国英, 杜天兵, 张宏, 等. 用基因枪法将 Bt 毒蛋白基因转入玉米及转基因植物再生[J]. 中国科学(B), 1995, 25(1): 71 - 76.
- [35]McCabe D E, Swain WF, Martinell BJ, et al. Stable transformation of soybean (glycine max) by particle acceleration[J]. BioTechnology, 1988, (6): 923 - 926.
- [36]Finer J J, Vain P, Jones MW, et al. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells[J]. Plant Cell Rep, 1992, (11): 323 - 328.
- [37]Weber G, Monajembashi S, Greulich K O, Wofrum J. Genetic manipulation of plant cells and organelles with a laser microbeam[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1988, 12(2): 219 - 222.
- [38]Weber G, Monajembashi S, Wofrum J. Genetic changes induced in higher plant cells by a laser microbeam[J]. Physiol Plant, 1990, 79(1): 190 - 193.
- [39]Damgaard, D. Jensen, L.H., Rasmussen, O. S. . Agrobacterium tumefaciens - mediated transformation of Brassica napus winter cultivars[J]. Transgenic Research, 1997, 6: 279 - 288