

宁夏枸杞的转基因研究进展

马俊^{1,2}, 吴祖河², 唐劲天² (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102, 2. 清华大学工程物理系, 北京 100084)

摘要 宁夏枸杞的转基因研究发展已有 20 多年, 文中通过文献整理, 对其方法和应用进行了分析总结。目前, 转基因枸杞的系统研究只限于中国, 应用领域包括抗性研究和植物疫苗制备。文中主要对以上不同应用的研究方法和发展现状进行了综述, 提出转基因枸杞应用的广阔前景和需要解决的问题, 为学习研究植物工程在中药领域的应用奠定基础。

关键词 枸杞; 转基因; 植物抗性; 植物疫苗

中图分类号 S567.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)10-04262-02

The Research Progress of Transgenic of *Lycium barbarum* L.

MA Jun et al (Traditional Chinese Medicine College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102)

Abstract Studies on transgenic *Lycium barbarum* L. have been carried out for more than 20 years. By reviewing previous literatures, its methods and applications were summarized. At present, a system for the transformation and regeneration of *L. barbarum* has been developed only in China which is used for the resistance research and preparation of plant-based vaccines. The approaches and development status of variety transgenic *L. barbarum* systems were reviewed, problems need to be resolved and broad prospects were put forward, which could lay a foundation for research the application of plant engineering in traditional Chinese medicine.

Key words *Lycium barbarum* L.; Transgenic; Plant resistance; Plant vaccine

枸杞(*Lycium Chinense*)为茄科枸杞属落叶灌木植物,是我国传统的名贵中药材。其中宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)被认为是道地药材,是唯一被载入《中国药典》的枸杞品种^[1]。构建宁夏枸杞转基因系统,常用方法大同小异:将外源基因利用农杆菌转化法导入枸杞外植体,经过无性繁殖后得到试管小苗。根据实际需要,外源基因导入受体细胞的方法或无性繁殖的过程有所不同。目前,利用该技术已获得了抗虫、抗高渗、抗重金属、抗肝炎、可分泌 HIV 壳蛋白的转基因枸杞试管植株,但只有抗蚜虫转基因枸杞在试验园区有较大面积种植。笔者在文中对宁夏枸杞的转基因研究进展进行综述,旨在为植物工程技术在中药领域的应用提供基础资料。

1 研究情况

1.1 转基因枸杞系统的建立 Wang 等^[2]1991 年首次建立了转基因枸杞再生系统,后由 Du 等^[3]优化。用叶盘法将含有新霉素磷酸转移酶-II(NPT-II)基因的根癌农杆菌导入枸杞离体组织,经过愈伤组织、生芽生根过程后可形成完整植株。NPT-II 酶的活性检测和 DNA 杂交表明,外源基因已整合到枸杞基因组,并可以表达。

Zhong 等^[4]提出了比较高效的试验条件:选择 3 周龄籽苗的枸杞叶片,在愈伤组织诱导培养基上预培养 3 d,与农杆菌在愈伤组织诱导培养基上共培养 3 d,温度 24 ℃,再转移到含有 50 mg/ml 卡那霉素的再生培养基上。共培养时加入乙酰丁香酮或超声波处理可以提高转化率。

无性繁殖过程, Hu 等^[5-6]提倡采用胚状体发生途径,不用诱导根,无需复杂多变的培养基,提高了植株的再生能力,试管苗经驯化后更接近野生型枸杞的生长状态。Li 等^[7-8]研究发现,用浓度低于 50 mg/L 的 Ag⁺可加速体细胞胚胎发

生过程细胞生长和分化。Ca²⁺ 的加入也可加快体细胞胚发生过程。

直到 2000 年,胡忠等^[9]才首次提出发根农杆菌 A4 介导的枸杞转基因方法。利用发状根培养系转基因易积累植物次生代谢产物且植株生长快,但影响因素较多,条件有待进一步优化。

1.2 不同领域的应用

1.2.1 抗蚜虫转基因枸杞。罗青等^[10-11]首次将对蚜虫有明显抗性的雪花莲外源凝集素酶基因,利用根癌农杆菌转化至枸杞细胞,并获得完整的抗蚜虫转基因枸杞植株。PCR 分析检测,确认雪花莲外源凝集素酶基因整合成功,转化率为 65.1%。

何军等^[12]发现转基因枸杞株系的果实与对照组相比,总体质量有所提高。曲玲等^[13]就抗蚜虫转基因枸杞对土壤微生物的影响做了初步研究,证明转基因枸杞对土壤微生物系统未产生显著影响。

宁夏回族自治区科学技术厅网上报道称,通过连续 2 年对 41 个转基因枸杞株系进行的抗虫试验,使平均蚜口密度抑制率达 80% 以上。抗蚜虫转基因枸杞新品系的应用推广,将在改善枸杞品质、降低生产成本、减少环境污染等方面起重要作用。

1.2.2 抗高渗转基因枸杞。植物适应干旱、高盐和低温等胁迫条件引起的水分亏缺机制,是由细胞内双组分信号系统调控,该系统由组氨酸蛋白激酶(HK)和响应调节蛋白(RR)组成^[14]。ATHK1 是拟南芥 HK 家族成员之一,可能是水分亏缺引起的渗透势变化的感受器^[15]。

Chen 等^[16-17]首次通过农杆菌转化法,将拟南芥的 ATHK1 基因引入枸杞离体叶片,经 RT-PCR 检测证明基因成功引入并表达;经过离体培养得到成熟的试管小苗后,转入正常土壤条件与同龄野生型枸杞共同培育 8 周,在高渗(PEG6000)、高盐(NaCl)和干旱试验中,转基因枸杞均表现

出抗盐抗旱特性,生长状态优于野生型,并且在恢复正常培养条件后,转基因枸杞能更快的适应环境,恢复正常生长。ATHK1 在转基因枸杞中的作用途径及其高效表达的基因改造还需继续研究,该试验只是在实验室条件下对高盐、干旱状态分别做出模拟,而如何培育出在自然环境中抗盐抗旱的综合性转基因枸杞,是他们接下来的任务。

1.2.3 抗重金属转基因枸杞。赵亚华等^[18]利用农杆菌转化法,将带有小鼠金属硫蛋白-I(MT)的外源基因导入枸杞幼茎外植体中,并在含卡那霉素和镉离子(Cd^{2+})的培养基上进行筛选和无性繁殖,得到再生植株。为证实转基因枸杞组织富集了培养环境中的 Cd^{2+} ,他们先用原子吸收光谱法对转基因枸杞组织的研磨液进行了 Cd^{2+} 总含量的测定,又采用镉-血红蛋白饱和法测定研磨液的上清液中结合态 Cd^{2+} 含量,经一步证明 MT 能牢固结合 Cd^{2+} ,而不被血红蛋白所夺取。

继该研究之后,赵亚华等^[19]用相似的方法又构建了能富集锌离子(Zn^{2+})的转基因枸杞,希望得到富含锌和药用价值兼备的新型枸杞子品种。该试验为转基因植物富集土壤重金属的尝试提供了一定的经验,可通过这种办法缓解土壤重金属污染。但笔者认为这种富集了有害重金属的植物果实会对人体健康产生不良影响,应选择其他模式植物。

1.2.4 抗肝炎转基因枸杞。顾海燕等^[20]利用基因枪轰击法将抗肝炎病毒基因(HisE)转入枸杞叶绿体基因组,经壮观霉素筛选获得了完整的再生植株,且 PCR 扩增初步证明操作成功。将外源目的基因导入叶绿体基因组的技术,与常规基因转化相比,具有高表达的优点,叶绿体母系遗传的特点可使转基因植物的安全性得到提高。

Mason 等^[21]首次将编码 HBsAg 的结构基因导入烟草并成功表达,并在 1995 年^[22]提出,由于转基因植物疫苗有可在食物中表达等众多优点,因此可能进而代替一般工业发酵生产疫苗的方法。而枸杞本身就有疏肝解郁的功能,若能通过进食枸杞达到预防肝炎的作用,则有利于提高枸杞的药用价值,降低肝炎疫苗的成本。

1.2.5 表达 HIV 壳体蛋白的转基因枸杞。动物及 I 期临床试验中已证实 HIV 病毒样颗粒(VLP)能刺激机体产生有效的细胞和体液免疫反应,且有良好安全性。VLP 由衣壳(CA)蛋白、核壳蛋白和 RNA 组成。研制 CA 蛋白的 VLP 疫苗已成为生产 HIV 疫苗的又一途径^[23]。

Du 等^[24]利用 PCR 扩增出人免疫缺陷病毒 HIV-1MA₄-CA 融合基因,与分泌型表达载体 pCAMBIA1305.2 连接,将源于水稻的一个富含甘氨酸序列的信号肽(GRP)连接在融合基因的 3'端,构建植物分泌表达载体,通过根癌农杆菌对枸杞进行转化,酶联免疫法检测证明转化成功。刘丹如等^[25]将上述方法得到的抗性苗诱导生根,切取根尖培养,待新根长出后转入液体培养基,振荡培养。该系统可使转基因枸杞表达的 CA 蛋白被引导进入根系,并分泌到培养液中,有利于今后高纯度 CA 蛋白的大量生产。刘宁等^[26]将上述方法得到的愈伤组织进行悬浮细胞培养,获得转基因枸杞悬浮

细胞系,且 HIV 壳体蛋白可在转基因枸杞悬浮细胞中表达。此法可缩短生产时间。

转基因植物生产疫苗外源蛋白在植物体内表达量很低,可能与泛素-蛋白酶体系统参与的蛋白降解有关。该系统中的糜蛋白酶样蛋白酶是蛋白降解的限速酶,也是蛋白酶体抑制的靶点,抑制糜蛋白酶样活性就可阻断蛋白酶体的催化活性^[27]。刘宁等^[28]对转基因枸杞和野生型枸杞中蛋白酶体活性开展了研究,首次证实了转基因枸杞和野生型枸杞的蛋白酶体活性存在显著性差异,表达 HIV 壳体蛋白的转基因枸杞蛋白酶体活性明显增高,且抑制剂 MG115 对其抑制作用明显,对野生型枸杞抑制不明显。该研究为下一步提高 CA 疫苗在转基因枸杞中的含量奠定基础。

2 展望

诸多外源基因已被成功导入枸杞细胞,但当前每种转基因枸杞只可转入一种功能基因,除上述每项研究分别涉及的发展前景,未来还会得到例如抗虫抗旱抗肝炎的多功能转基因枸杞植株。朱永兴等^[29]利用农杆菌介导技术,将构建有 4 个基因 GUS、BAR、KCI、CAF1 的表达载体 KCTB 转化宁夏枸杞,获得的抗性植株经检测证明,多基因表达载体已整合到了宁夏枸杞的基因组中。但该研究只对 GUS 基因的表达进行了检测,而对 BAR、KCI、CAF1 基因只证明了它们已整合到了枸杞的基因组中,对于它们是否能表达还需进行更深入的研究。

转基因宁夏枸杞的研究已取得了一定成功,但筛选出能够推广种植或生产的品种还需进一步探索,研究者可借鉴在中国已取得商品化许可证的转基因作物的研究经验,如北京大学的转基因抗病毒番茄等。同时,转基因技术在中药种植的应用安全也应给予关注。

笔者认为,对于一些实际经济价值较低的转基因枸杞品种,应该适当中止研究;而转基因植物的产业化种植不宜急于求成,毕竟其对遗传或环境的长久安全性问题还未得到解决。随着科技的进一步发展,希望在不久的将来能够得到安全的多功能转基因枸杞。

参考文献

- [1] 董静洲,杨俊军,王瑛.我国枸杞属物种资源及国内外研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(18):2020-2027.
- [2] WANG H,HUANG F,LI A,et al. Regeneration of transgenic *Lycium barbarum* L. [J]. Chin J Biotechnol,1991,7(3):185-189.
- [3] DU L Q,WANG H Z,HUANG F C,et al. Genetic transformation of *Lycium barbarum* L. via *A. tumefaciens* [J]. Sci China B,1994,37(3):286-292.
- [4] ZHONG H,WU Y R,WEI L,et al. Factor affecting agro bacterium tumefactions-mediated genetic transformation of *Lycium barbarum* L. [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant,2006,42:461-466.
- [5] HU Z,DING H B,WANG X,et al. A comparative study on the syntheses of DNA,RNA and protein during in vitro organogenesis and somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. [J]. Acta Biol Exp Sin,1998,31:403-411.
- [6] HU Z,HU Y,GAO H H,et al. Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explants [J]. Biological Plantarum,2008,52(1):93-96.
- [7] 邢更妹,茹茹芳,李杉,等.枸杞体细胞胚发生中外源 Ca^{2+} 的作用[J].植物生理与分子生物学报,2004,30(3):261-268.
- [8] LI S,DAI R L,SHEN Z H. Effect of Ag^{+} concentration on the uptake rate of tracer elements during the somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. [J]. J Radio anal Nucl Chem,2001,250(3):599-602.

h,然后洗净沥干,用湿毛巾包好放入 28~30℃的温箱内催芽。每隔 24 h 清洗 1 次种子表面的黏液,待种子“露白”后即可播种。浇透水后每个营养钵平播 1 粒种子,播后覆土约

1 cm,早春季节要搭建小拱棚做好保温防寒工作。出苗后,及时揭膜以通风炼苗,培育叶片厚实、茎秆粗壮、无病感染的壮苗。

表 1 徐深绿 1 号主要植物学性状及产量

苦瓜品种名称	瓜纵径 cm	瓜横径 cm	瓜肉厚 cm	单果重 kg	单株结果 数/个	小区产量 kg	产量 kg/hm ²	比 CK ± %	瓜色	瓜型	瓜肉特征	瓜表面特征
徐深绿 1 号	30.3**	4.8**	1.0*	0.386	125.67**	18.080**	32 301.90	45.2	深绿,有光泽	纺锤形	肉质致密、脆嫩、微苦	表面呈不规则瘤状突起,瘤粒较粗
常丰新长绿(CK)	37.3	4.0	0.9	0.344	90.0	12.449	22 240.95		翠绿	圆筒形	肉质致密、脆嫩、苦味重	表面呈规则棱瘤突起

注: *、** 表示与对照品种的差异显著、极显著。

4.3 定植 当幼苗长至 3 叶 1 心时,选择晴天无风的下午定植。定植前施腐熟农家肥 3.0 万~4.5 万 kg/hm²、过磷酸钙 375 kg/hm²、硫酸钾三元复合肥 750 kg/hm² 作基肥。定植株行距为 0.70 m × 0.75 m,定植单株,密度 1.65 万~1.80 万株/hm²。定植后浇足定根水。

4.4 田间管理

4.4.1 苗期。定植成活后及时施提苗肥,施尿素 75~120 kg/hm²。整好大垄后,搭上“人”字形架。当瓜蔓长至 50~60 cm 后,开始引蔓上架。引蔓时,摘除主蔓基部 50 cm 以内的所有侧蔓,并将瓜蔓均匀分布在瓜架上。整个苗期要掌握好肥水管理,促进植株健壮生长,为结瓜打好基础。

4.4.2 花期。花期辅以人工授粉,能有效提高坐果率,增产效益显著。在授粉的同时,摘除畸形花和畸形果,有利于提高果实商品性。在此期间,重点防治瓜实蝇的危害。

4.4.3 坐果期。当第 1 批瓜横径长至 2~3 cm 时,根据植株长势重施 1 次壮果肥,一般施硫酸钾复合肥 300~450 kg/hm²、尿素 75~150 kg/hm²。果实开始采收后,每隔 5~7 d 结合灌水追肥 1 次,每次施硫酸钾复合肥 150~300 kg/hm²、尿素 75~150 kg/hm²。由于徐深绿 1 号苦瓜单株结果力强、

产量高,果实膨大期间植株对肥水需求量很大,因此坐果期要确保肥水均衡供给,才能充分发挥该品种的丰产潜力。结果后,及时摘除老叶和多余的弱枝,以减少病虫害滋生。

4.5 病虫害防治 发生细菌性角斑病时,可用氢氧化铜可湿性粉剂 1 000 倍液喷洒防治;瓜绢螟可用阿维菌素 1 500 倍液防治;白粉病及蚜虫也要及时防治。

4.6 采收 一般花后 15 d 为采收适期,采收标准是果实表面瘤状凸起膨大,瘤沟变浅,瓜的顶端平滑,果实颜色发亮。采收宜在清晨用剪刀将瓜从蒂部剪下,轻拿轻放,防止机械损伤。

参考文献

- 王杰,张名位,刘兴华,等. 苦瓜的保健功能及其应用研究进展[J]. 湖北农学院学报,2004,24(4):321-325.
- 陈小凤,黄如葵,黄玉辉,等. 苦瓜育种及相关基础研究进展[J]. 南方农业学报,2011,42(3):246-249.
- 张长远,罗剑宇,何晓莉,等. 苦瓜新品种‘长绿’[J]. 园艺学报,2009,36(10):1151-1152.
- 高山,林碧英,许端祥,等. 苦瓜新品种佳玉的选育[J]. 中国蔬菜,2010(18):89-90.
- 周胜军,朱育强,陈丽萍,等. 耐热抗病苦瓜新品种‘浙绿 1 号’[J]. 园艺学报,2011,38(11):2233-2234.
- 赵建锋,孙玉东,王伟中,等. 淮农长绿 1 号苦瓜[J]. 蔬菜,2012(1):26-27.
- 顾海燕,马昕,王仙琴,等. 抗肝炎转基因枸杞新品种培育的初步研究[J]. 宁夏农林科技,2007(4):3-4.
- MASON H S, LAM D M, ARNTZEN C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1992,89:11745-11749.
- THANAVALA Y, YANG Y F, LYONS P, et al. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92:3358-3361.
- DOAN L X, LI M, CHEN C. Virus-like particles as HIV-1 vaccines[J]. Rev Med Virol,2005,15(2):75.
- DU G L, SONG C Z, ZHANG C L. Transgenic Lycium barbarum L. Established as HIV Capsid Protein Expression System[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2005,23:411-416.
- 刘丹如,宋长征,张更林,等. 重组 HIV-1 壳体蛋白在转基因枸杞根系中的分泌表达[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(2):53-57.
- 刘宁,宋长征. 表达 HIV 壳体蛋白转基因枸杞悬浮细胞的培养与鉴定[J]. 生物学通报,2008,43(11):47-49.
- 刘宁,宋长征. 转基因枸杞中蛋白酶体糜蛋白酶活性的研究[J]. 生物学杂志,2009,26(6):1-4.
- 朱永兴,曹鹏,许兴,等. 多基因表达载体 KCTB 转化宁夏枸杞的研究[J]. 中国农学通报,2010,26(9):74-77.
- SI B B, WANG Z. Identification of No. 1 and Male Sterility of Lycium barbarum L. by ISSR-PCR Molecular Marker Technique [J]. Medicinal Plant,2011,2(3):17-18.
- 王慧中,黄发灿,李安生,等. 枸杞转基因植株的再生[J]. 生物工程学报,1991(3):220-223,294.

(上接第 4263 页)

- 胡忠,杨军,郭光沁,等. 宁夏枸杞发状根农杆菌转化系的建立及影响转化因素的研究[J]. 西北植物学报,2000,20(5):766-771.
- 罗青,曲玲,曹有龙,等. 抗蚜虫转基因枸杞的初步研究[J]. 宁夏农林科技,2001(1):1-3.
- 曲玲,吴博,曹有龙,等. 转基因枸杞研究中的获得问题探讨[J]. 宁夏农学院学报,2001,22(2):25-27.
- 何军,曹有龙,罗青,等. 抗蚜虫转基因枸杞果实质量初步研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(5):662-664.
- 曲玲,甘晓燕,罗青,等. 抗蚜虫转基因枸杞对土壤微生物影响的初步研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(30):13283-13286,13422.
- JIN H C, SUN Y, YANG Q C, et al. Screening of genes induced by salt stress from Alfalfa[J]. Mol Biol Rep,2010,37:745-753.
- 郝岗平,吴忠义,陈茂盛,等. ATHK1 基因调节拟南芥渗透胁迫信号转导过程[J]. 植物生理与分子生物学报,2004,30(5):553-560.
- CHEN N, LIU Y, CHAI J. Enhanced Tolerance to Water Deficit and Salinity Stress in Transgenic *Lycium barbarum* L. Plants Ectopically Expressing ATHK1, an Arabidopsis thaliana Histidine Kinase Gene [J]. Plant Mol Biol Rep,2009,27:321-333.
- CHEN N, LIU Y, CHAI J. Erratum to: Enhanced Tolerance to Water Deficit and Salinity Stress in Transgenic *Lycium barbarum* L. Plants Ectopically Expressing ATHK1, an Arabidopsis thaliana Histidine Kinase Gene [J]. Plant Mol Biol Rep,2010,28:363.
- 赵亚华,茹炳根. 转小鼠金属硫蛋白 cDNA 枸杞的获得及其检测[J]. 西北植物学报,1998,18(2):229-236.
- 赵亚华,何平,高向阳. 根瘤农杆菌介导的 mMT-1cDNA 转化枸杞及其表达的研究[J]. 中国农业科学,2000,33(2):92-97.