

药用植物基因工程的研究进展

胡 忠 李庆云 曹 军

(汕头大学生物学系, 广东 汕头 515063)

摘要:从农杆菌诱导的转基因器官的培养、模式基因工程、目的基因的遗传转化等方面概述了药用植物基因工程研究及应用中的最新进展,并展望了今后发展的方向及前景。

关键词:药用植物; 基因工程; 农杆菌

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2002)04-0371-10

Advances in Gene Engineering of Medicinal Plants

HU Zhong LI Qing-yun CAO Jun

(Dept. of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: This paper reviews the latest studies and application of gene engineering for medicinal plants on the following aspects: transgenic organ culture, transfer and expression of model genes, and specific genes mediated by *Agrobacterium*.

Key words: Medicinal plant; Gene engineering; *Agrobacterium*

最近二十多年来,伴随着高等植物的离体培养、植株再生和基因重组技术的日趋成熟,许多带抗性基因的植物如抗病毒的烟草、抗虫害的番茄和棉花、抗除草剂的大豆和玉米都已培育出来^[1]。同时,科学家还利用植物转基因的方法来研究和探索植物细胞内的一些机能和调控机制。所有这些显示出植物转基因研究的广阔应用前景。

目前用于植物细胞外源基因导入的方法和技术很多,其中土壤农杆菌介导的转化系统是研究最多、机理最清楚、技术方法最成熟的基因转化途径。据报道,迄今所获得的约200种转基因植株中80%以上是利用根癌农杆菌转化系统产生的^[2,3]。到目前为止,药用植物转基因研究中除了农杆菌介导的转化系统之外,利用其他方法转化成功的报道还比较少。药用植物有别于农作物,它们的有效成分是植物细胞的次生代谢产物,这一特点决定了药用植物与农作物的遗传转化有着不同的侧重点。尽管药用植物遗传转化的研究起步较晚,但自二十世纪八十年代以来,也取得了显著的进展,主要集中在转基因器官的培养、模式基因工程、目的基因的遗传转化等几个方面。

收稿日期: 2001-10-09 接受日期: 2002-04-12

1 转基因器官培养

利用发根农杆菌 Ri 质粒转化形成的发状根和根癌农杆菌 Ti 质粒转化形成的冠瘿瘤组织作为培养系统来生产有用的植物活性成分是当今药用植物生物技术研究的热点之一。

1.1 发状根培养

发状根是植物受发根农杆菌感染后产生的。在感染过程中,发根农杆菌把自身 Ri 质粒的 T-DNA 上的基因转移并整合入植物基因组,这些基因表达后即产生发状根。近十几年来发状根培养已发展成为继细胞培养后又一新的培养系统,这一培养系统对传统中药材来讲更为重要,因为约三分之一的传统药材是植物的根部。据不完全统计,药用植物发状根培养已在 26 个科 100 多种植物获得了成功。

利用发根农杆菌转化产生的发状根培养物具有生长速度快、合成次生代谢产物的能力强并可以向培养液中分泌一定的产物以及无需添加外源激素等特点。与目前广泛应用的 Ti 质粒转化系统相比,Ri 质粒转化系统还具有几个方面的优点^[3,4]:对单个根尖培养系的研究表明,一个发状根是单个转化细胞的克隆体,即使它们含有多个独立的转化发状根,每个发状根的 T-DNA 结构是非常稳定的,并且单个根尖的分枝也常具有与亲本根系一样的 T-DNA 组成。发状根的这种克隆性质有利于筛选和转化机制的研究。此外,利用 Ri 质粒转移外源基因容易从发状根或愈伤组织上产生再生植株,不必除去象 Ti 质粒内的一类致癌基因。目前,采用 Ri 质粒转化药用植物已有不少再生植株的例子^[5-7]。

自二十世纪八十年代中期发状根培养技术应用于次生代谢产物生产以来,许多有开发价值的次生代谢产物已从不同植物的发状根培养物中提取出来,有的化合物已通过发状根培养法得以工业化生产或中试生产,其中药用价值较高的有喹啉生物碱、吲哚生物碱、托品烷生物碱、喹啉生物碱等,此外,噻吩、多炔、葱醌、糖苷等次生代谢产物也是重要的药用化合物^[8]。

通常情况下,发状根培养生产的次生代谢产物仅限于那些正常植物的根中能够合成的物质,而对于那些由植物绿色部分所合成的次生物质而言,绿色发状根就具有十分重要的意义。有些植物的发状根培养物在光照下能变成绿色,绿色发状根具有正常的根器官构造,而在皮层细胞中含有叶绿体能进行光合作用,CO₂ 的固定能力和核酮糖二磷酸化酶的活性可达到叶片的水平。现在,一些植物已成功诱导出绿色发状根,并且发现这些发状根合成的某些次生物质与植物绿色部分合成的次生物质成分相同^[9]。Sauerwein 等^[10]在翻过江藤 (*Lippia dulcis*)发状根培养物中分离到 0.25 mg g⁻¹(干重)的 *hernandulcin*(一种倍半萜化合物)和另外 20 种单萜类或倍半萜类化合物,在 16 h d⁻¹ 光照的条件下能使发状根变绿,而在未转化根培养物中却没有发现这些萜类化合物。另外绿色发状根生长速度和次生产物积累增加,表明培养物中的发状根可能有一种生物合成潜力,而通常根生长在地下未能显现出来。这对利用发状根培养生产更多的次生代谢产物也许十分有利。洋地黄含有强心苷活性成分,利用绿色洋地黄发状根培养物不仅增殖速度快而且还提高了强心苷的产量^[11]。

1.2 冠瘿瘤(crown galls)和畸状茎(shooty teratomas)培养

有些药用植物的活性成分仅在叶片和茎中合成, 自然不能利用发状根培养获得活性成分, 而利用冠瘿瘤或畸状茎的形成和培养则能达到这一目的。

根癌农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 片段(含 *tms* 基因、*tmr* 基因)通过根癌农杆菌感染植物并整合进入植物细胞的基因组, 诱导冠瘿瘤组织的形成。冠瘿瘤离体培养时, 具有激素自主性、增殖速率较常规细胞培养快等特点, 其次代谢产物合成的稳定性与能力较强, 对生产有用次生代谢产物有着良好的开发前景, 目前已经用来生产一些特殊次生产物(表 1)。宋经元等^[23]利用诱导的丹参冠瘿瘤培养生产丹参酮, 筛选出高产株系, 丹参酮的含量已超过生药的含量。Hank 等^[24]报道用根癌农杆菌 B0542 和 C58 感染成年短叶红豆杉和欧洲红豆杉幼茎切段, 诱导出了可在不含植物激素培养基上快速生长的冠瘿瘤。经质谱和酶联免疫证明瘤状组织中含有紫杉醇及其类似物, 紫杉醇含量为干重的 0.00008%–0.0004%。在一些药用植物中, 转化的畸状茎可以通过几种根癌农杆菌菌株诱导形成(表 1), 这些菌株包括一种缺失生长素生物合成基因的 Ti 质粒突变体和芽形成 Ti 质粒 pTiT37。这些转基因器官培养对于那些通常在叶片和绿色茎秆中形成和生物转化的特异次生产物也十分有用。与发状根相比, 利用畸状茎进行有用产物合成的成功报道还比较少, 这可能是由于建立快速生长的畸状茎的液体培养体系十分困难。

表 1 Ti 质粒转化药用植物形成的冠瘿瘤和畸状茎
Table 1 Crown galls and shooty teratomas induced with Ti plasmid

植物种类 Plant species	农杆菌/Ti 质粒 <i>Agrobacterium</i> / Ti plasmid	培养物 Cultures	代谢产物 Metabolites	参考文献 Reference
石刁柏 <i>Asparagus officinalis</i>	C58C1	冠瘿瘤 Gall		[12]
颠茄 <i>Atropa belladonna</i>	pGV2215 (<i>aux</i>)	畸状茎 Shooty teratoma	天仙子胺到莨菪胺的生物转化 Biotransformation of hyoscyamine into scopolamine	[13]
鬼针草 <i>Bidens</i> sp.	Ti plasmid	冠瘿瘤 Gall	多炔类 Polyines	[14]
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	Ti plasmid	冠瘿瘤细胞系 Gall cell suspension	生物碱 Alkaloids	[15]
金鸡纳树 <i>Cinchona ledgeriana</i>	A6	冠瘿瘤细胞系 Gall cell suspension	喹啉生物碱 Quinoline alkaloids	[16]
毛地黄 <i>Digitalis lanata</i>	pTiC58, pTiB6S3	冠瘿瘤 Gall	强心甙 Cardenolides	[17]
羽扇豆 <i>Lupinus polyphyllus</i> , <i>L. bartwegii</i>	DSM30151	冠瘿瘤细胞系 Gall cell suspension		[18]
柠檬留兰香 <i>Mentha citrata</i>	pTiT37	畸状茎 Shooty teratoma	薄荷油三萜 Mint oil terpenes	[19]
辣薄荷 <i>M. piperita</i>	pTiT37	畸状茎 Shooty teratoma	薄荷油三萜 Mint oil terpenes	[20]
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	C58	冠瘿瘤 Gall	丹参酮 Tanshinone	[21–23]
短叶红豆杉 <i>Taxus brevifolia</i>	B0542, C58	冠瘿瘤 Gall	紫杉醇及其类似物 Taxol and its analogue	[24]
欧洲红豆杉 <i>T. baccata</i>	B0542, C58	冠瘿瘤 Gall	紫杉醇及其类似物 Taxol and its analogue	[24]

某些次生代谢产物在植物的特定器官内合成后再运输到其它器官中贮藏, 这种生理特

性在培养条件下也能表明出来。对烟草和颠茄的冠瘿组织、簇芽和发状根中生物碱合成和贮藏的研究表明,二者的发状根均可合成原植物固有的生物碱,而簇芽则不能合成。若在二者的簇芽培养基中分别加入烟碱和莨菪碱,簇芽可将它们分别转化为去甲烟碱和东莨菪碱^[25]。

在植物体内许多次生物质的合成需要地上部分(叶、茎)和地下部分(根)的共同参与,而酶的表达具有器官特异性,因此离体培养生产这些代谢产物无论是发状根还是冠瘿瘤组织均不能达到这一目的。最近,Subroto 等^[26]为了提高颠茄器官培养物中莨菪胺的产量,在离体条件下效仿完整植株,在无激素培养基中共培养遗传转化的颠茄畸状茎和发状根,获得了较好的结果。通常植物中天仙子胺主要是由根产生,然后被转运到植物的地上部分,在那里由 6-羟化酶催化转变为莨菪胺。发状根培养物可以产生与完整植株产量相似的天仙子胺,但仅有非常少量的莨菪胺。共培养的茎产生的莨菪胺(0.84 mg g⁻¹DW)是完整植株叶片中的 3-11 倍,莨菪胺与天仙子胺在共培养物中的比率高达 1.9,比在颠茄发状根中所见的比率 0-0.03 有显著提高^[26]。他们认为发状根合成的天仙子胺能通过培养基转移,类似于植物体中维管束运输,被畸状茎吸收并转变为莨菪胺。Mahagamasekera 等^[27]利用颠茄发状根与 *Duboisia hybrid* 的冠瘿组织进行不同属间的组织共培养,也显著提高了莨菪胺的含量。转基因器官的利用使根与茎共用相同的培养基且不需要外源激素进行共培养成为可能。

2 药用植物模式基因工程

植物基因工程的最终目的是把有用的基因转移到受体基因组,并在受体中能稳定表达和遗传。研究遗传转化技术体系及外源目的基因的表达和调控机制,需要一类具有选择标记的基因,称为模式基因(model gene)或报道基因(reporter gene)。根据基因编码产物的特点,大致可分为两类:抗性基因和编码催化人工底物产生颜色变化的酶的基因,前者常用的有新霉素磷酸转移酶 II 基因(*nptII*)、氯霉素乙酰转移酶基因(*CAT*)、潮霉素磷酸转移酶基因(*hpt*),以及 *phosphinotricine* 乙酰转移酶基因(*bar*)等;后者有 β -葡萄糖醛苷酶基因(*GUS*)、萤火虫荧光素酶基因(*Luc*)、绿色荧光蛋白基因(*gfp*)等。由于在转化植物组织中表达的产物相当稳定并且容易检出,*nptII* 基因和 *GUS* 基因是广泛用于植物遗传转化的模式基因^[2]。近些年来,这些模式基因已用于研究甘草、颠茄、黄花蒿、宁夏枸杞、枳壳等药用植物的遗传转化过程,有的已在植株水平得到表达(表 2)。在农杆菌转化成功的报道中,外植体选择非常广泛,其中茎和叶是使用最多的外植体,也最容易转化成功。同样地,受体植物发育年龄和生理状态也十分重要。为了提高转化效率,许多研究中采用乙酰丁香酮活化菌液、选择合适菌株、菌液浓度和共培养时间、外植体预培养一定时间等转化条件。总之,利用模式基因可以优化农杆菌感染外植体及整合入植物染色体组的最佳条件,从而建立良好的转化系统,以便将一些有用的外源目的基因转移到这些植物中表达。

石刁柏是第一个用根癌农杆菌转化并得到再生的单子叶植物。Hernalstenns 等^[12]用野生型的根癌农杆菌 C58 感染石刁柏嫩茎,对瘤组织进行培养,经继代的愈伤组织仍能合成胭脂碱和农杆菌碱。Bytebier 等^[28]重复了这一工作,并证实石刁柏的细胞核基因组内有 Ti 质粒的 T-DNA 区段。此后将含有 *NOS-APH* 基因的重组质粒 C58C1 转化石刁柏愈伤组织,经卡那霉素筛选获得了再生植株;分子杂交证明外源基因已整合到石刁柏核基因组上。

表2 利用模式基因转化的药用植物

Table 2 Some transgenic medicinal plants that have been reported

植物种类 Plant species	模式基因 Model gene	载体 Vector	代谢产物 Metabolite	植株再生 Plant regeneration	参考文献 Reference
蒿 <i>Artemisia annua</i>	<i>Pnos-kan</i>	Ri (pRiA46)	青蒿素 Artemisinin	+	[5]
石刁柏	<i>Nos-APH</i>	Ti	未确定 Not determined	+	[28]
<i>Asparagus officinalis</i>					
颠茄	<i>TR1'-kan, TR2'-gus</i> (<i>pGSGluc1</i>)	Ri (pRi15834)	莨菪烷生物碱 Tropane alkaloids	+	[6]
<i>Atropa belladonna</i>					
甜菜 <i>Beta vulgaris</i>	<i>Pnos-kan (pBin19),</i> <i>Pnos-hyg (pAGS125)</i>	Ri (pRi1855)	Betalain pigments	+	[7]
毛地黄 <i>Digitalis lanata</i>	<i>Pnos-kan 35S-gus</i> (<i>pBI121</i>)	Ti (pGV2260)	未确定 Not determined	-	[29]
洋地黄 <i>D. purpurea</i>	<i>TR1'-kan, TR2'-gus</i> (<i>pGSGluc1</i>) <i>Pnos-kan,</i> <i>35S-gus (pBI121)</i>	Ri (pRi15834)	强心甙 Cardenolides	+	[30]
甘草 <i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Pnos-kan 35S-gus</i> (<i>pBI121</i>)	Ri (pRi15834)	甘草甜素 Glycyrrhizin	-	[31]
乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>	<i>TR1'-kan, TR2'-gus</i> (<i>pGSGluc1</i>)	Ri (pRi15834)	甘草甜素 Glycyrrhizin	-	[32]
宁夏枸杞 <i>Lycium barbarum</i>	<i>Pnos-kan</i>	Ti (pGV3850, neo1103)	未确定 Not determined	+	[33,34]
黄花烟草 <i>Nicotiana rustica</i>	<i>Pnos-kan(pBin19),</i> <i>Pnos-hyg(pAGS125)</i>	Ri (pRi1855)	烟碱生物碱 Nicotine alkaloids	+	[28]
枳壳 <i>Poncirus trifoliata</i>	<i>Pnos-kan, 35S-gus</i>	Ti(pGA482GG)	未确定 Not determined	+	[35,36]
黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i>		Ri (pRi15834)	黄酮类 Flavonoids	-	[37]

3 通过转基因改良药用植物的遗传特性

将一些有用的目的基因导入药用植物中, 可望在短时间内实现药用植物某些遗传特性的定向改良。这些研究主要包括三个方面。

3.1 提高抗性(包括抗病虫害、抗除草剂、抗逆性等)

药用植物的平均产量远低于其潜在的最高值, 其原因之一是它们并不总是生活在最适宜的环境中, 且经常受到各种逆境条件及病毒、虫害等的影响。因此, 应用基因工程的手段提高药用植物的抗性具有十分重要的意义。目前, 已被鉴定和克隆的可供植物遗传操作的有益基因多达几百个, 它们分别来自微生物、植物、动物和人体, 其中有一大类与植物的抗病、抗虫、抗盐碱、抗旱、抗寒、抗除草剂等抗逆性有关。通过遗传转化, 将这些基因导入宿主植物以增强其抗性, 这方面的研究工作已经取得了很大进展^[1]。为了增强颠茄对除草剂的抗性, Saito 等^[29]将构建好的嵌合载体 pARK5(含有 35s-*bar* 基因)转入发根农杆菌 15834 菌株中, 进而感染颠茄叶盘。转基因植株和其后代均显示了对除草剂 phosphinothricin 和 bialaphos 的抗性, 而其颠茄碱的合成不受任何影响。同样地, Yamazaki 等^[30]利用 Ri 双元载体转化系统, 将编码 phosphinothricin 乙酰转移酶的 *bar* 基因成功地导入到莨菪(*Scoparia dulcis*)基因组中, 转基因植物及其子代表现出对除草剂具有明显的抗性, 而次生代谢途径仍能正常进行。

目前,我国科学工作者已利用 Ti 转化系统介导获得了抗 CMV/TMV 病毒的番茄和抗 BNYVV 病毒的甜菜^[40]。枳壳生产中面临一种由病毒引起的衰退病,贺红等^[41]以枳壳实生苗上胚轴为材料进行遗传转化,成功地获得了转柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因的植株。宁夏枸杞为名贵的中药材,又是良好的滋补品。然而,病原菌 *Glomerella cingulata* 可侵染宁夏枸杞的花蕾、青果、叶,导致黑果病的发生,使其品质下降,大幅度减产;此外危害枸杞的病虫种类也很多。目前,我们已经建立了以发根农杆菌和根癌农杆菌介导的宁夏枸杞离体转化和植株再生系统,现正在利用基因工程技术培育抗病、抗虫新品种^[34,42]。

3.2 代谢途径

药用植物中有效成分(如生物碱、皂甙、黄酮、甙类、萜类等)含量甚微,利用栽培措施大幅度地提高有效成分的含量往往难度很大。已有的研究表明,次生代谢产物是药用植物特殊分化细胞在酶的作用下,经多个反应步骤合成的,而酶的合成受基因调节控制。因此在掌握次生产物代谢途径的分子机制的基础上,借助转基因技术来调节基因的表达和酶的合成,可以提高目标产物的含量。

莨菪碱 6- β -羟化酶是莨菪烷生物碱生物合成途径中催化莨菪碱合成 6- β -莨菪碱、再经环氧化作用合成东莨菪碱的关键酶。Hashimoto 等^[43]以发根农杆菌作载体,将天仙子胺 6- β -羟化酶转入到富含天仙子胺的颠茄发状根中,结果羟化酶活性增强,6- β -羟化莨菪碱含量比用野生型发根农杆菌诱导出来的发状根高,东莨菪碱的含量提高了 5 倍。一种来源于酵母的鸟氨酸脱羧酶基因也成功地转入烟草发状根并得以表达,使烟草中的尼古丁含量增加 2 倍^[44]。通过转移细菌的赖氨酸脱羧酶基因也使烟草发状根中尸胺和霉藜碱的含量增加^[45]。

紫杉醇是一类结构异常复杂的新型抗癌药物,1988 年 Denis 等^[46]报道了以 10-deacetylbaicatin III 为原料半合成紫杉醇,但该原料要从红豆杉属植物中提取。目前,全合成工作虽已完成^[47],但由于合成路线比较复杂尚无商业应用价值。最近 Croteau 等^[48]从短叶红豆杉茎提取物中获得紫杉醇生物合成途径中关键的二萜环化酶-紫杉二烯合成酶的 cDNA 克隆物,并进行了测序和氨基酸序列分析。胡国武等^[49]以东北红豆杉愈伤组织为材料,采用 RT-PCR 技术也获得了紫杉烯合成酶基因片段,并转化到大肠杆菌 JM109。这些结果为研究紫杉醇合成代谢相关的一系列催化酶的基因表达及调控打下了基础。

在了解青蒿素生物合成途径后,陈晓亚等^[50]将源于棉花基因组的(+)-8-杜松烯合成酶(*Cad*)基因和法呢棋焦磷酸(*FPP*)合成酶基因分别插入到植物表达载体 pBI121 和 pBI101.2 系列中,再通过根癌农杆菌和发根农杆菌分别介导转化青蒿叶片,已获得转基因的发状根、愈伤组织和不定芽。青蒿素检测结果表明,与对照相比转 *Cad* 发状根系中青蒿素含量平均提高 80%;转 *Cad* 愈伤组织中青蒿素含量达到发状根的水平,提高 2-3 倍;而在转 *FPP* 合成酶基因的根系中,其青蒿素含量未见有明显的差异。近些年,一些研究者对吲哚碱生物合成的关键酶—strictosidine 合成酶产生了浓厚的兴趣,该酶可以催化 secologanine 和色胺缩合反应生成 strictosidine。目前,来源于植物中的 strictosidine 合成酶基因已在大肠杆菌^[51]、昆虫培养细胞^[52]和番茄^[53]中表达。Okada 等^[54]从黄连细胞中分离了编码(S)-四氢小檗碱氧化酶的基因,进行序列分析,克隆到质粒 PTVB2 中,再转化到大肠杆菌 *DH-5 α* 中。在培养的大肠杆

菌的上清液中,检测到了该酶活性,从而为通过直接培养转化细菌或真菌而获得次生产物奠定了基础。由于大部分药用植物的次生代谢途径仍不十分清楚,但利用转基因技术获得药用植物的次生产物已显示出十分诱人的发展前景,并成为众多学者关注的焦点。

3.3 其它相关基因工程

在进行外源基因的植物次生代谢产物的遗传操作中,许多研究者对细胞色素 P-450 基因的研究兴趣与日俱增。细胞色素 P-450 位于某些细胞的光滑内质网上,是多功能氧化酶系的重要组成部分,具有底物广泛性和功能多样性的特点,在许多内源性和外源性化合物的氧化、过氧化和还原代谢中起重要的作用。在哺乳动物肝细胞中,一些内源激素及药物被体内的酶氧化为具更高生物活性的代谢物,有毒物质被 P-450 的氧化反应所分解。外源 P-450 基因在宿主细胞中的表达可以影响细胞器膜上的电子转移活动,导致转基因植物的表型及代谢模式的变化。Saito 等^[55]将从兔肝细胞分离的细胞色素 P-450 基因经农杆菌介导转入烟草细胞并得到了表达,还改变了烟草生物碱生物合成的类型。植物细胞色素 P-450 广泛参与次生代谢,产生有植保素功能的物质和对除草剂、杀虫剂等外毒素的生物转化解毒代谢。目前,已分离纯化了一些植物细胞色素 P-450,在基因克隆和表达调控上取得了一些进展,但在抗虫和抗除草剂的农作物基因工程方面尚处于起步阶段^[56]。半胱氨酸合成酶在植物细胞硫同化中起一个中心的作用,这一重要的磷酸盐依赖酶催化 L-半胱氨酸的合成。在植物细胞中,存在有两种形式的半胱氨酸合成酶,半胱氨酸合成酶 A 存在于细胞质中,而半胱氨酸合成酶 B 则存在于叶绿体中。编码半胱氨酸合成酶 A 的 cDNA 基因已经克隆,并且经 pCSK3F 介导在植物细胞中得到了表达^[57]。

利用基因工程手段,赵亚华等^[58]已将小鼠金属硫蛋白基因通过根癌农杆菌介导整合到枸杞细胞染色体上并使之表达,希望从转基因后代中培育出集枸杞的药用价值与锌元素的营养价值于一身的优良枸杞品种。由于绞股蓝入口时有苦涩味,人们对其服用口感不好。目前,国内的一些科学家期望将甜蛋白 Thaumatin 基因转入绞股蓝并使之表达,利用极甜的 Thaumatin 蛋白遮掩苦涩味^[59]。

利用基因工程的方法和技术,广泛挖掘和充分利用我国的药用植物资源,对发展我国的医药事业、保障人们的健康有重要意义。进入 21 世纪,伴随着“人类回归大自然”的潮流,药用植物在保护人类的健康方面将受到更多的青睐和关注。药用植物的基因工程起步较晚,当前已取得了一些令人兴奋的进展,但还有很大的差距,我们认为今后应加强以下几方面的工作:

- 1) 进一步完善药用植物的基因转移和离体植株再生体系,尤其是单子叶植物和裸子植物,以便于进行目的基因的转移;
- 2) 加强大规模生产工艺的优化研究,为药用成分工业化生产奠定基础;
- 3) 进一步分离和鉴定出更多的影响特定有效成分生物合成的关键酶及其基因,并研究有效成分生物合成的生物调控机制;
- 4) 分离和研究那些具有组织特异性功能的启动子,实现目的基因在特定组织或细胞中的定向表达。

可以相信,随着生物化学、分子生物学、生物工程学等多学科科研工作者的密切配合和共同努力,基因工程技术在药用植物领域已经取得的成就及其巨大的潜能必将进一步推动药用植物生物技术的研究,以实现药用植物的合理开发和利用。

参考文献:

- [1] Birch R G. Plant transformation: problems and strategies for practical application [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48:297-326.
- [2] 贾士荣. 转基因植物概述 [A]. 贾士荣. 农业生物技术进展与展望 [M]. 合肥:中国科学技术大学出版社, 1993. 17-24.
- [3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京:科学出版社, 1998. 194-195.
- [4] 周达峰, 卜学贤, 陈维纶. 发根农杆菌 Ri 的分子生物学及其应用前景 [J]. *植物学通报*, 1993, 10(2):24-34.
- [5] 蔡国琴, 李国珍, 叶和春, 等. Ri 质粒转化的青蒿发状根培养的生物合成 [J]. *生物工程学报*, 1995, 11(4):315-320.
- [6] Yamazaki M. Transfer and Expression of Foreign Genes into Medicinal Plants and Production of Secondary Metabolites [D]. Ph. D Thesis, Chiba: Chiba University, 1991.
- [7] Hamill J D. New routes to plant secondary products [J]. *Biotechn*, 1987, 5:800-804.
- [8] 常振战, 果德安, 郑俊华. Ri 质粒转化植物生产天然活性成分的研究进展(II) [J]. *中草药*, 1998, 29(11):775-777.
- [9] 邢更妹. 红芪、黄芪细胞培养与次生代谢产物关系的研究 [D]. 兰州:兰州大学硕士论文, 1996.
- [10] Sauerwein K, Ishimaru K, Shimomura K. Indole alkaloids in hairy roots of *Amsonia elliptica* [J]. *Phytochem*, 1991, 30:1153-1155.
- [11] Flores H E. Secondary metabolites from root cultures [J]. *Trends Biotechn*, 1987, 5(3):64-69.
- [12] Hernalstenns J P. An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis* [J]. *EMBO J*, 1984, 3:3039-3042.
- [13] Saito K, Yamazaki M, Kawaguchi A, et al. Metabolism of solanaceous alkaloids in transgenic plant teratomas integrated with genetically engineered genes [J]. *Tetrahydron*, 1991, 47:5955-5968.
- [14] Kurz W G W. Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures [M]. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. 260-265.
- [15] 王宁宁, 王淑芬, 田俊英, 等. 土壤农杆菌转化的长春花冠瘿细胞培养 [J]. *生物工程学报*, 1994, 10(3):244-249.
- [16] Payne J, Hamill J D, Robin R J, et al. Production of hyoscyamine by root cultures of *Datura stramonium* [J]. *Plant Med*, 1987, 53:474-478.
- [17] Moldenhauer D, Furst B, Dietrich B. Cardenolides in *Digitalis lanata* cells transformed with Ti-plasmids [J]. *Planta Med*, 1990, 56:435-438.
- [18] Berlin J, Rippert M, Mollenschott C. Formation of isoflavonoid glucosides in normal and transformed cell cultures of *Lupinus* [J]. *Planta Med*, 1989, 55:685-686.
- [19] Spencer A, Hamill J D, Rhodes M J C. Production of terpenes by differentiated shoot cultures of *Mentha citrata* transformed with *Agrobacterium tumefaciens* T37 [J]. *Plant Cell Rep*, 1990, 8:601-604.
- [20] Nijkamp H J J, Van Der Plas L H W, Van Aartrijk J. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. 619-624.
- [21] 张荫麟, 宋经文, 赵保华, 等. 丹参的冠瘿组织培养和丹参酮的产生 [J]. *生物工程学报*, 1995, 11(2):150-152.
- [22] 张荫麟, 宋经文, 祁建军, 等. 农杆菌转化后丹参植物再生 [J]. *中国中药杂志*, 1997, 22(5):274-276.
- [23] 宋经文, 张荫麟, 祁建军, 等. 丹参冠瘿组织高产株系选择和丹参酮的产生 [J]. *生物工程学报*, 1997, 13(3):317-319.
- [24] Hank H, Fleming P, Walker K, et al. Genetic transformation of mature *Taxus*: An approach to genetically control the *in vitro* production of anticancer drug: taxol [J]. *Plant Sci*, 1994, 95:187-196.
- [25] 第十一回植物组织培养学会大会准备委员会. 第十回植物组织培养学大会シンポジウム講演要旨集 [C]. 日本, 岡山, 1989.

- [26] 孙盈盈. 离体培养生产次级代谢产物[J]. 生物技术通报, 1997, (2):36-37 [译自 "Agricell Report", 1996, 27(2-3):11].
- [27] Mahagamasekera M G P, Doran P M. Intergeneric co-culture of genetically transformed organs for the production of scopolamine [J]. Phytochem, 1998, 47(1):17-25.
- [28] Bytebier B, Deboeck F. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of monocotyledon *Asparagus officinalis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84:5344-5349.
- [29] Lehmann U, Moldenhauer D, Dietrich B. Introduction of reporter genes in the medicinal plant *Digitalis lanata* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Planta Med, 1990, 56:635-636.
- [30] Saito K, Yamazaki M, Shimomura K. Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides [J]. Plant Cell Rep, 1990, 9:121-124.
- [31] Yoshikawa T, Inoue K, Furuya T. In: "Abstract." 110th Annual Meeting [C]. Pharmaceutical Society of Japan, Sapporo, 1990. Vol. 2: 187.
- [32] Saito K, Kaneko H, Yamazaki M. Stable transfer and expression of chimeric genes in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) using a Ri plasmid binary vector [J]. Plant Cell Rep, 1990, 8:718-721.
- [33] 王慧中, 杜立, 黄发灿, 等. 根癌农杆菌介导的枸杞转化及转化植株的获得 [J]. 中国科学(C 辑), 1993, 23(2):391-395.
- [34] Hu Z, Guo G Q, Zhao D L, et al. Shoot regeneration from leaf explant of *Lycium barbarum* and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation [J]. Russ J Plant Physiol, 2001, 48(4):453-458.
- [35] 贺红, 李耿光. 根癌农杆菌对枳壳遗传转化的影响因素 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3):140-143.
- [36] 贺红, 韩美丽. 农杆菌介导 *GUS* 在枳壳中的转移 [J]. 中草药, 2000, 31(4):295-297.
- [37] Zhou Y, Hirotsu M, Yoshikawa T, et al. Flavonoids and phenylthanoids from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* [J]. Phytochem, 1997, 44(1):83-87.
- [38] Saito K, Yamazaki M, Anzai H, et al. Transgenic herbicide-resistant *Atropa belladonna* using an Ri binary vector and inheritance of the transgenic trait [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11:219-224.
- [39] Yamazaki M, Lin S, Hayashi T, et al. Transgenic fertile *Scoparia dulcis* L., a folk medicinal plant, conferred with a herbicide-resistant trait using an Ri binary vector [J]. Plant Cell Rep, 1996, 15(5):317-321.
- [40] 莽克强. 我国农业生物工程的进展 [J]. 生物工程学报, 1996, 12(增刊):1-9.
- [41] 贺红, 韩美丽, 李耿光. 农杆菌介导转化法构建转 *CTV-cp* 的枳壳植株 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(1):21-23.
- [42] 胡忠, 杨军, 郭先沁, 等. 宁夏枸杞发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.
- [43] Hashimoto T, Yun D J, Yamada Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures [J]. Phytochem, 1993, 32:713-718.
- [44] Hamill J D, Robins R J, Parr A J, et al. Over-expressing a yeast ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *Nicotiana rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation [J]. Plant Mol Biol, 1990, 15:27-38.
- [45] Fesker L F, Rugenhagen C, Berlin J. Increased production of cadaverine and anabasine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* expressing a bacterial lysine decarboxylase gene [J]. Plant Mol Biol, 1993, 23:11-21.
- [46] Denis J N, Greene A E, Guenard D, et al. A highly efficient practical approach to natural taxol [J]. J Amer Chem Soc, 1988, 110:5917-5921.
- [47] Nicolaou K C, Veno H, Liu J J, et al. Total synthesis of taxol: the final stages and completion of the synthesis [J]. J Amer Chem Soc, 1995, 117:653-658.
- [48] Wildung M R, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis [J]. J Bio Chem, 1996, 271(16):9201-9204.
- [49] 胡国武, 温正益, 元英进. 紫杉醇合成代谢途径中紫杉烯合成酶 cDNA 的克隆 [J]. 生物工程学报, 2000, 16(2):158-160.
- [50] 陈晓亚, 叶和春. 植物次生代谢及其调控 [A]. 李承森. 植物科学进展 (第一卷) [C]. 北京: 高教出版社, 1998. 293-304.

- [51] Kutchan T M. Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauwolfia serpentina* in *Escherichia coli* [J]. FEBS Lett, 1989, 257:127-130.
- [52] Kutchan T M, Bock A, Dittrich H. Heterogenous expression of the plant proteins strictosidine synthase and berberine bridge enzyme in insect cell culture [J]. Phytochem, 1994, 35:353-360.
- [53] Mc-Knight T D, Bergy D R, Burnett R J, et al. Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in tobacco plants [J]. Planta, 1991, 185:148-151.
- [54] Okada Naosuke, Koizumi N, Tanaka T, et al. Isolation, sequence and bacterial expression of a cDNA for (s)-tetrahydroberberine oxidase from cultured berberine-producing *Coptis japonica* cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:534-538.
- [55] Saito K, Noji M, Chmori S, et al. Integration and expression of a rabbit liver cytochrome P-450 gene in transgenic *Nicotiana tabacum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:7041-7045.
- [56] 赵剑, 杨文杰, 朱蔚华. 细胞色素 P-450 与植物的次生代谢 [J]. 生命科学, 1999, 11(3):127-131.
- [57] 唐巍. 药用植物基因工程研究进展 [J]. 生物技术通报, 1991, (6):6-7.
- [58] Saito K, Miura N, Yamazaki M, et al. Molecular cloning and bacterial expression of cDNA encoding a plant cysteine synthase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(17):8078-8082.
- [59] Noji M, Saito M, Nakamura M, et al. Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutants [J]. Plant Physiol, 2001, 126(3):973-980.
- [60] 赵亚华, 何平, 高向阳. 根癌农杆菌介导的 mMT-cDNA 转化枸杞及其表达的研究 [J]. 中国农业科学, 2000, 33(2):92-97.
- [61] 杨成丽, 刘德立. 植物甜蛋白 Thaumatin 研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(2):153-157.