

茶树细胞与基因工程研究进展

孟令峰 齐桂年

(四川农业大学茶学系 雅安 625014)

摘要: 综述了近年来茶树细胞与基因工程的研究进展, 包括组织培养、次生物质的生产、原生质体培养、分子标记及基因的克隆与转移等方面, 并分析了在这方面今后的研究方向。

关键词: 茶树; 组织培养; 分子标记; 基因克隆; 遗传转化

茶树细胞和基因工程属于茶树生物技术的范畴, 近年来在茶树细胞工程和基因工程的研究主要包括以下几个方面: 茶树细胞与组织培养、茶叶次生物质的生产、原生质体培养及其细胞融合、分子标记以及基因的克隆与转移。本文就以上几点进行了综述:

1 茶树细胞工程的研究进展

1.1 茶树组织培养技术

1.1.1 生殖器官的培养

吴振铎^[1]首次以茶树子叶为外植体成功获得再生植株。刘德华^[2-4]对薷北种自然杂交种子的子叶柄进行培养, 用带有少量子叶的子叶柄, 不经愈伤组织直接形成植株。1988至1989年又以茶籽下胚轴为外植体, 不同处理诱导分化芽, 并且获得了植株。认为子叶柄在微繁殖中是保持种性的较好材料, 下胚轴分化芽的能力比较强, 容易形成“丛生芽”, 且易继代培养, 繁殖系数大。肖海军对茶树子叶的分化进行了研究, 认为芽对不定胚的发生具有抑制作用, 畸形胚分化率从子叶柄到子叶片依次增高; 畸形胚增殖能力强, 能分化成正常胚并且分化成植株。胜尾清^[6]、土井芳憲^[8、9]最早对花药进行培养, 但只分化出根。陈振光^[11]等首次从花药培养中获得了植株。其中25%为单倍体, 具有15条染色体; 75%的为亚倍体, 具有18~22条染色体^[10]。郭玉琼等试验了不同培养基与附加物对花药愈伤组织的影响, 并且花药愈伤组织具备合成茶多酚的能力。

1.1.2 营养器官的培养

茶树茎外植体的组织培养最早见于土井芳憲^[12]茶树茎切片愈伤组织的诱导。Sudripta Das^[13]应用茶树茎段三种不同处理的外植体进行培养, 结果表明: 横切茎端的诱导频率最高, 达90%。Akulaetal^[14]用茶树茎节诱导体细胞胚状体的发生, 从而建立了茶树再生体系。在MS+0.5mg·L⁻¹BAP+0.1mg·L⁻¹IBA+10.0mg·L⁻¹GA培养基上诱导了不定胚; 然后在1/2浓度大量元素、完全浓度微量元素和维生素的MS培养基上诱导出了体细胞胚状体, 诱导率达60%。刘德华^[15]研究: 茎段产生分化后在不同组分的培养基上交叉培养, 维持分化能力的时间比在单一培养基上的时间长。张娅婷^[16]等应用薷北种带腋芽的茎段进行组培研究, 并建立了无性繁殖系。周建^[17]采用100mg·L⁻¹IBA短时浸沾温室组培苗70天以后, 小苗成活率66.7%, 生根率60%。

土井芳憲^[18]诱导出了茶树叶片愈伤组织并且分化出了根, 但是其诱导率和分化率都非常低。Sarathchandraetal^[19]

将叶片培养在MS+10mg·L⁻¹2,4-D+1.0mg·L⁻¹KT+6% (体积分数) 蔗糖培养基上培养, 产生黄绿色、松软易碎的愈伤组织以及类胚状体; 继代培养于MS+2.0mg·L⁻¹2, 4-D+10.0mg·L⁻¹BAP培养基上的愈伤组织, 可诱导生根。刘德华^[20]研究: 添加1mg/kgNAA, 5mg/kgAde, 3mg/kgGA₃的1/2MS是促进叶胚状体形成较好的预培养基; 添加4mg/kgBA, 2mg/kgIBA, 5mg/kgAde, 1mg/kgGA₃的MS培养基能促进胚性愈伤组织的形成。添加4mg/kgBA, 2mg/kgIBA, 1mg/kgGA₃的MS培养基, 能诱导不定芽和胚状体的形成和生长; 试管苗不完全叶形成愈伤组织比完全叶要快; 添加1mg/kgNAA, 5mg/kgAde的1/2MS培养基、1/2ER培养基能促进根的形成。Kato^[22]以幼叶为外植体, 将其置于不同2, 4-D浓度的培养基中培养, 在叶的基部能直接或通过胚性愈伤组织诱导出体细胞胚状体^[21]。暨淑仪等对叶片诱导的愈伤组织的形成作了细胞组织学观察, 结果表明: 愈伤组织形成于叶外植体叶肉中的小叶脉周围以及主脉中的薄壁细胞。

1.2 茶树次生物质的生产

茶树次生物质生产的研究是茶树生物工程的重要方面。近几年来, 研究比较多的为茶多酚和氨基酸的合成。小林利彰^[23]、Matsuura^[24、25]等早期研究了各种条件对茶氨酸细胞合成的影响。钟俊辉^[26]等对愈伤组织培养中茶氨酸的积累进行了研究, 合成茶氨酸的含量最高达170mg·g⁻¹。成浩^[27]研究表明: 在一个培养周期中, 培养细胞的茶氨酸累积高峰出现在第11d左右。在以每10d更新一次培养基的条件下, 培养细胞茶氨酸的合成能力可维持至第30d左右, 达到细胞干中的近20%。吕虎^[28、29]对于发酵罐放大培养合成氨基酸进行了研究, 并取得了与摇床悬浮培养类似的效果。袁弟顺^[30]则研究了不同品种对茶氨酸积累量的影响。成浩^[31-35]进行了一系列的细胞培养生产儿茶素的研究: 通过对材料的选择和培养基组成的调节, 使愈伤组织儿茶素的含量从不足1mg·g⁻¹FW提高至16~20mg·g⁻¹FW。大量元素中全硝态氮对合成儿茶素最为有利, Ca²⁺、SO₄²⁻对儿茶素的合成影响也较大, 细胞儿茶素的形成能力与对环境的适应性也有关。成浩通过添加前体物质研究对合成儿茶素产生的影响, 结果表明: 当外源饲喂1000μmol·L⁻¹苯丙氨酸时, L-表儿茶素与D, L-儿茶素的含量比对照增加了40%, 儿茶素总量增长了66%, ¹⁴C标记研究发现, 儿茶素在细胞内形成后, 又进一步聚合为其他物质。

1.3 茶树原生质体培养技术

原生质体是指通过质壁分离可以和细胞壁分开的细胞部

分。原生质体不仅具有活细胞的性质,而且可以融合形成杂种细胞。原生质体由于没有细胞壁,所以易摄取外来遗传物质、细胞器以及病毒、细菌等微生物。离体的原生质体和其起源细胞一样,具有全能性,即在适宜的无菌条件下可以生长、分化、再生成完整植株。原生质体作为基因转化的受体在于它是一个细胞,减少了嵌合体的发生,再者就是可以获得许多来自一个细胞的克隆转化细胞。Kuboi et al.^[36]采用“二步法”从叶片上分离到原生质体,以温室水培植株的幼叶为材料,在培养液中添加 Al^{3+} ,混合酶液(pH为5.8~6.0的 $0.6mol \cdot L^{-1}$ 甘露醇溶液)中附加1.0% (体积分数)的果胶酶、1% (体积分数)的纤维素酶及0.5% (体积分数)的硫酸糖苷,原生质体得率最高。赖钟雄^[37]从铁观音花粉中分离到亚原生质体。但是目前还没有茶树原生质体培养成植株的报道。

2 茶树基因工程的研究进展

2.1 茶树的分子标记

DNA分子标记技术对揭示茶树遗传变异规律、茶树种质资源的亲缘关系、起源、进化和分类等都具有重要的意义。自从RFLP作为遗传图谱以来,相继发展了10多种DNA分子标记:限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单重复序列(SSR)、表达序列标签(EST)、简单序列重复区间扩增多态性分子标记(ISSR)等。

Matsumoto et al.^[38]运用RFLP技术对日本绿茶栽培种和463个本地茶树的遗传分化进行分析,表明绿茶栽培种和本地茶树具有相同的起源。由于RFLP技术要求大量的具有纯度较高的基因组DNA,技术要求高且费时。Williams et al.^[39]创建了RAPD技术,只要用少量的基因组DNA作模板就可以扩增出大量的多态性DNA片段。黎星辉^[40]等利用RAPD标记技术对云南大叶茶与汝城白毛茶人工杂交获得的 F_1 代植株进行了亲子鉴定,结果表明3个供试杂交后代确实来源于供试亲本云南大叶茶和汝城白毛茶。AFLP是RFLP与PCR结合发展而来的,它提供了更多的共显性标记。Paulet al.^[41]利用AFLP分子标记技术将所研究的材料分为中国型、阿萨姆型和禅叶型三个群体,所得结果与现有分类系统、一些基因型的家谱及它们的地理起源相一致。近几年,SSR、EST等也得到了应用,Modal^[42]从Biotech公司的45个引物中,选出了12个对25份茶树资源DNA进行SSR-PCR,所扩增出的130个条带中有108个条带具有多态性。用UPGMA构建进化树,所有资源分为禅叶型、阿萨姆型和中国型。金基强^[43]等根据现有的茶树EST资源,首次明确了茶树EST中的SSR信息并建立了EST-SSR标记,同时对基因组DNA进行PCR扩增并检测多态性。在设计19对引物中,有84.2%的引物能扩增出产物,且有效扩增率达100%;对10个茶树品种扩增,有62.5%的引物显示出多态性。姚明哲^[44]等利用筛选出的8个ISSR引物对六个茶树品种的基因组DNA进行扩增,共扩增出99条带,多态性平均为79.6%。根据Nei-Li系数将六个品种聚为两类,从而显示ISSR应用于茶树品种鉴别和亲缘关系分析是非常有效的。

2.2 茶树基因的分离克隆与转移

基因的分离与克隆是植物转基因技术的第一步,目前已经克隆的基因有儿茶素有关代谢关键酶的基因,咖啡碱合成有关酶的基因,氨基酸合成有关酶的基因以及香气相关基因等^[45]。例如已经克隆的咖啡碱合成有关酶的基因有两种,即S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAM)、咖啡碱合成酶(CS)。冯艳飞^[46]等从茶树总RNA反转录合成cDNA,并以此为模板分别用3对PCR引物扩增SAM合成酶基因的中间主片断、3'端和

5'端片断,最后经BLAST比较及重叠区域拼接得到完整SAM序列。Kato^[47]等首次对咖啡碱合成酶(CS)进行了纯化,随后他们以茶树嫩叶为材料,提取总RNA,并获得了cDNA,利用RACE技术以咖啡碱合成酶的N端氨基酸序列设计简并特异引物,PCR扩增获得了CS的cDNA,测得序列为1438bp,编码369个氨基酸。

基因的转化方法很多,在茶树中的应用有报道的有:农杆菌介导的遗传转化、基因枪转化、花粉管通道法等。Mondale et al.^[48]利用根癌农杆菌(EHA105和LBA4404)感染茶树体细胞胚,将双质粒上携带的nptII和具有内含子的gus基因导入茶树体细胞胚的核基因组中,筛选出既有Kan抗性又有GUS活性的体细胞胚转入分化培养基中长出嫩梢,再将转基因嫩梢嫁接到同种茶树的茎上,获得了转基因植株。这是第一个有关转基因茶树的成功报道。骆颖颖^[49]等以茶树叶片、愈伤组织为转化的受体材料,用农杆菌介导法将Bt基因转入茶树中,获得了GUS瞬时表达。吴珊^[50]等研究:农杆菌与基因枪结合使用比两种方法单独使用更有助于提高茶树转化效率。张广辉^[51]等以两种野生型发根农杆菌菌株、三种共培养培养基和六种外植体为试材,建立了茶树发根高频诱导体系,最高发根诱导频率达30%以上。确定最佳发根诱导体系为:OD₆₀₀为0.5~0.8的发根农杆菌菌液侵染已培养60~70d苗龄无菌苗茎段10~15min,添加100mmol·L⁻¹乙酰丁香酮的YMB固体培养基。李玲玲^[52]等以花粉管通道法对茶树进行dsTCS基因转化的初步研究,对随机选取15株处理后的茶苗HPLC检测,其平均咖啡碱含量均低于对照茶苗,初步表明花粉管通道法导入的dsTCS部分抑制了茶树体内的咖啡碱的合成。虽然茶树的组织培养研究已经取得了很大的进展,但是要真正建立芽的分化率高、易于离体培养、细胞无性系变异小的高频受体系统还需要继续研究。

3 展望

综上所述,笔者认为在茶树细胞工程与基因工程今后发展的方向重点应在以下几点:(1)由于现在组织培养技术重现性差,不同地域、不同品种差异很大,应重视组织培养在这方面的研究。(2)茶树次生物质的生产的研究应注重规模化、高纯化方面的研究。(3)继续寻找与茶叶品质密切相关的基因。(4)茶树属于木本植物,其遗传转化技术和组织培养技术还不完善,应积极寻找适合茶树的遗传转化和组织培养方法。

参考文献

- [1]成浩,李素芳.茶树组织培养再生技术的研究[J].中国茶叶,1996,18(3):28-30.
- [2]刘德华.茶籽子叶柄直接分化芽[J].中国茶叶,1987,(6):15-17.
- [3]刘德华,廖利民,李娟等.茶籽下胚轴组织培养的研究[J].福建茶叶,1988,(2):13-15.
- [4]刘德华,廖利民.茶籽子叶柄下胚轴组织培养的研究[J].茶叶通讯,1990,(3):6-11.
- [5]肖海军,刘德华,彭正云等.茶籽子叶分化研究[J].福建茶叶,2005,(4):11-13.
- [6]胜尾清.茶樹の药培養について(予報)[J].茶業研究报告,1968,(31):1.
- [7]土井芳憲.茶樹花药培養中の根の分化率[J].茶業技術研究,1981,(60):1-3.
- [8]土井芳憲.茶樹花药培養中愈伤组织诱导率及根分化率的品种间差异[J].茶業研究报告,1983,(57):13-17.

- [10]陈振光,廖惠华.茶树花药培养诱导单倍体植株的研究[J].福建农业学院学报,1988,17(3):185-190.
- [11]郭玉琼,陈财珍,赖钟雄等.茶树花药愈伤组织诱导及茶多酚含量的测定[J].福建茶叶,2001(4):7-10
- [12]土井芳惠.茶树茎切片愈伤组织诱导的适宜条件极其在花药培养上的应用[J].茶业技术研究,1980,(58),1-6.
- [13]Sudripta Das, Timir B. Organogenesis and regeneration from pigmented callus in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Nandadevi, an elite Darjeeling tea clone. [J]Plant Science,1996,121(2):207-212.
- [14]Akula A,Dodd W.A. Direct somatic embryogenesis in a selected tea clone, 'TRI-2025' (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) from nodal explants. [J] Plant Cell Reports. 1998. 17(10):804-809.
- [15]刘德华,周带娣,肖文军.茶树茎段培养胚性状态的调控及其分化[J].湖南农业大学学报,2000,(26)2:110-112.
- [16]张娅婷,张伟.藏北茶的组织培养[J].周口师范学院学报,2004,21(5):74-76.
- [17]周建,成浩,王丽鸳.激素处理对茶树组培苗温室直接诱导生根的影响[J].茶叶科学,2005,25(4):265-269.
- [18]土井芳惠.茶树茎、叶切片培养中愈伤组织的诱导及根的分化[J].茶业研究报告,1983,(57):7-11.
- [19]Sarathchandra T.M,Upalip D,Wijewardene R.G.A.Studies on the tissue culture of tea [*Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze].4.Somatic embryogenesis in stem and leaf callus cultures [J].S L J Tea Sci,1988,57(2):50-54.
- [20]刘德华,廖利民,周带娣.茶树组织培养的研究II:腋芽微繁殖和叶微繁殖技术的研究学报[J].湖南农学院学报,1991,17(增刊):589-599.
- [21]Kato M. Somatic embryogenesis from immature leaves of in vitro grown tea shoots[J].Plant Cell Report,1996,(15):920-923.
- [22]暨淑仪,严学成,王毅军.茶树叶片愈伤组织形成的细胞组织学观察[J].茶叶,1995,21(2):11-13.
- [23]小林利彰,森田明雄,中村顺行.茶茎组培脱分化及再分化过程中氨基酸组成的变化[J].茶业研究报告,1989,70(增刊):9-10.
- [24]Matsuura T,Kakuda T.Effects of precursor,temperature,and illumination on theanine accumulation in tea callus [J].Agric Biol Chem,1990,54(9):2283-2286.
- [25]Matsuura T,Kakuda T,Kinoshita T,et al.Production of theanine by callus culture of tea [A].The organizing committee of ISTS.Proceedings of International Symposium on Tea Science[C]. Shizuoka,The organizing committee of ISTS,1992.432-435.
- [26]钟俊辉,陶文沂.茶愈伤组织培养及茶氨酸的积累[J].无锡轻工大学学报,1997,16(3):1-7.
- [27]成浩,高秀清.茶树悬浮细胞茶氨酸生物合成动态研究[J].茶叶科学,2004,24(2):115-118.
- [28]吕虎,华萍,余继红.ZnNH₂-HCl和剪切力对茶叶细胞悬浮培养中茶氨酸合成的影响[J].西北植物学报.2005,25(7):1472-1476.
- [29]吕虎,华萍,孔庆友等.茶叶细胞悬浮培养中茶氨酸生物合成工艺研究[J].广西农业生物科学,2005,24(2):136-139.
- [30]袁弟顺,林丽明,孙威江等.不同品种茶树愈伤组织的培养与茶氨酸的积累[J].福建农林大学学报,2006,33(2):198-181.
- [31]成浩,杨素娟,王玉书等.茶树愈伤组织培养及儿茶素的积累[J].茶叶科学,1993,13(2):109-114.
- [32]成浩,王玉书,杨素娟等.大量元素对茶愈伤组织生长及儿茶素积累的影响[J].茶叶科学,1994,14(1):31-36.
- [33]成浩,杨素娟,王玉书等.茶树培养细胞儿茶素形成能力的品种间差异[J].茶叶科学,1996,16(1):75-76.
- [34]成浩,李素芳,沈星荣等.外源苯丙氨酸对茶树培养细胞儿茶素合成的影响[J].农业生物技术学报,2001,9(2):132-135.
- [35]成浩,李素芳,沈星荣等.利用外源前体饲喂生物合成¹⁴C-儿茶素的研究.茶叶科学,2003,23(增):82-87.
- [36]Kuboi T,Suda M ,Konishi S .Preparation of protoplasts from tea leaves [A].The organizing committee of ISTS.Proceedings of interational Symposium on Tea Science [C].Shizuoka:The Organizing Committee of ISTS,1992.427-431.
- [37]赖钟雄,何碧珠,陈振光.茶树花粉管亚原生质体的分离[J].福建农业大学学报,1998,27(增刊):41-44.
- [38]Matsumoto S,Kiriwa Y,Takeda Y.Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA[J].Theor Appl Genet.2002,104:998-1002.
- [39]Williams J K G,Kubelik A R,Livak K L,et al.DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J].Nucleic Acids Research,1990,18(22):6531-6535.
- [40]黎星辉,施兆鹏,刘春林等.云南大叶茶与汝城白毛茶杂交后代的RAPD亲子鉴定[J].茶叶科学,2001,21(2):99-102.
- [41]Paul S,Wachire F N,Powell W,et al.Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea [*Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze]revealed by AFLP marks [J].Theor APPL Gent,1997,94(2):255-263.
- [42]Mondal T K.Assessment of genetic diversity of tea [*Camellia sinensis*(L.)O.Kuntze] by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction[J].Euphytica,2002,128:307-315.
- [43]金基强,崔海瑞,陈文岳等.茶树EST-SSR的信息分析与标记建立[J].茶叶科学,2006,26(1):17-23.
- [44]姚明哲,黄海涛,余继忠等.ISSR在茶树品种分子鉴别和亲缘关系研究中的适用性分析[J].茶叶科学,2005,25(2):153-157.
- [45]马春雷,陈亮.茶树功能基因分离与克隆研究进展[J].分子植物育种,2006,4(3):16-22.
- [46]冯艳飞,梁月荣.茶树S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的克隆和序列分析[J].茶叶科学,2001,21(1):21-25.
- [47]Kato M,Mizuno K,Crozier A,et al.Caffeine synthase gene from tea leaves[J].Nature,2000,406:956-957.
- [48]Mondal T K,Bhattacharya A,Ahuja P S,et al.Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze cv Kangral Jat]plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos [J]. Plant Cell Rep,2001,20:712-720.
- [49]骆颖颖,梁月荣.Bt基因表达载体的构建及对茶树遗传转化的研究[J].茶叶科学,2000,20(2):141-147.
- [50]吴珊,梁月荣,陆建良等.基因枪及其与农杆菌相结合的茶树外源基因转化条件的优化[J].茶叶科学,2005,25(4):255-264.
- [51]张广辉,梁月荣,陆建良.发根农杆菌介导的茶树发根高频诱导与遗传转化[J].茶叶科学,2006,26(1):1-10.
- [52]李玲玲,江昌骏,房婉萍等.花粉管通道法对茶树进行dsTCS基因转