

拟南芥植物硫肽激素基因在玫瑰茄细胞中的表达

谢秀祯^{1,3}, 林俏慧^{2,3}, 郭勇^{3*}

(1. 海南师范大学 生物系, 海口 571158; 2. Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, Iowa State University, Ames, Iowa 50011; 3. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510640)

摘要: 利用玫瑰茄愈伤组织遗传转化体系, 通过根瘤农杆菌将 *AtPSK2* 基因导入玫瑰茄细胞, 并获得了功能性表达。研究表明, 所获得的转基因玫瑰茄细胞系的临界植板细胞密度和临界起始细胞密度分别降低了 60% 和 50%, 悬浮细胞培养周期由 16 d 缩短到 12 d, 转化愈伤组织的比生长速率比对照提高了 75%, 转基因玫瑰茄细胞和愈伤组织中的花黄素含量与对照相比没有发生明显变化。本研究所获得的转基因玫瑰茄细胞系不仅为花青苷和花黄素等次生代谢产物高产细胞株的选育提供出发材料, 而且为 PSK- α 作用机理的深入研究提供一个有用的模型。

关键词: 拟南芥植物硫肽激素基因; 玫瑰茄; 根瘤农杆菌介导的遗传转化系统; 转基因细胞; 植物细胞增殖
中图分类号: Q812, Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)04-0521-06

Expression of *AtPSK2* gene in roselle cells

XIE Xiu-Zhen^{1,3}, LIN Qiao-Hui^{2,3}, GUO Yong^{3*}

(1. Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158, China; 2. Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, Iowa State University, Iowa 50011, USA; 3. College of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: By using *A. tumefaciens*-mediated genetic transformation system of Roselle callus, *AtPSK2* gene was introduced into and expressed functionally in Roselle cells. The results demonstrated that, by comparison with un-transgenic Roselle cell or callus, the critical plating cell density and critical initiating cell density of transgenic cell line were cut down 60% and 50%, respectively, the growth cycle of transgenic cell in suspension culture was shortened from 16 days to 12 days, and the specific growth rate of transgenic Roselle callus was raised 75%, the content of flavonoid compounds in transgenic Roselle cell line or callus was hardly altered. The obtained transgenic Roselle cell line in this study not only provides an initial material for selection and breeding of Roselle cell line with high-yield anthocyanin, but also gives a useful research model for further investigation in the mechanism of PSK- α action.

Key words: *AtPSK*; Roselle (*Hibiscus sabdariffa*); *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system; transgenic cell; plant cell proliferation

玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa*) 是锦葵科木槿属一年生草本植物, 原产非洲苏丹, 广泛分布于全世界各热带、亚热带地区。玫瑰茄是一种具有多种经济用途的作物, 在我国广东、广西、云南、浙江、江西、福建、台湾等地均有栽培。玫瑰茄的花萼不仅是食品和时兴饮料的原料, 所含的花青苷色素是一种天然

红色食用色素, 在国内外已广泛应用于食品及饮料工业(李玉萍, 2003); 而且也是常用的中草药, 在临床上用于治疗高血压、心脏病、发烧、发炎、肝脏机能障碍和免疫系统紊乱等 (Pi-Jen 等, 2002; Dafallah & al-Mustafa, 1996) 疾病。玫瑰茄细胞产生的花青苷具有抗氧化、抗突变作用 (Haji FM & Haji TA,

收稿日期: 2007-04-08 修回日期: 2007-08-11

基金项目: 广东省重点科技攻关项目 (A301020201) [Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangdong Province (A301020201)]

作者简介: 谢秀祯 (1960-), 男, 海南儋州市人, 博士, 教授, 主要从事基因工程的研究, (E-mail) xiexiuzhen@sina.com.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: btyguo@scut.edu.cn)

1999),其抗氧化性能已受到医学界的普遍重视。据 Chen 等(2003)报道,玫瑰茄的提取物具抗肿瘤、抗白血病和抑制由胆固醇引起的动脉粥样硬化的效果。Chang 等(2005)及 Lin 等(2005)通过研究初步揭示了玫瑰茄提取物诱导人前髓白血病细胞、胃癌细胞发生细胞凋亡的机理,从而为将玫瑰茄提取物开发成肿瘤预防和治疗药物奠定了理论基础。20 世纪 90 年代以来,国内外学者对利用玫瑰茄细胞培养技术生产花青苷进行了广泛研究,并取得可喜的成果(阮茜等,1999;朱新贵等,1998;郑穗平等,1998),但从目前研究结果看,生产周期长(约 16 d)已成为制约这一技术走向产业化的瓶颈之一。因此,如何获得快速增殖的玫瑰茄细胞系已成为一个急需研究的课题。

植物硫肽激素- α (*phytosulfokine- α* , PSK- α)是在植物中鉴定到的第一个肽类生长因子,是一种硫酸酯化的五肽分子,它以很低的浓度就能强烈刺激低密度培养的植物细胞的增殖(Yang 等,2000a; Matsubayashi 等,1997)。Yang 等(2000b)用带肌动蛋白启动子的 *OsPSK* 基因转化水稻细胞的结果表明,转化子细胞的分裂速度比野生型细胞(对照)快 1 倍左右。Yang 等(2001)用拟南芥 *AtPSK2* cDNA 转化拟南芥,得到的转化愈伤组织比对照大 1 倍。Yang 等(1999)研究结果还表明,PSK 基因是通过它的产物 PSK- α 促进植物细胞分裂的。本研究通过将拟南芥 PSK- α 的基因导入玫瑰茄细胞,以期获得快速增殖的细胞系,在此基础上筛选花青苷高产细胞株。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa*)种子来源于华南植物园引种部,消毒后播于不加激素的 B₅ 固体培养基(附加 3%蔗糖)上,于 25±1℃ 培养箱中萌发,取 10~12 d 龄幼苗为实验材料。

1.1.2 农杆菌菌株和质粒 试验所用的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 LBA4404 (*str^r*),植物表达载体为 pBI121。重组质粒 pUC-PSK2 由作者构建(谢秀祯等,2005a)。

1.1.3 酶和试剂 *Taq* DNA 聚合酶购自大连宝生物公司;PCR 引物由上海 Bioasia 生物技术有限公司合成;卡那霉素(Km, Sigma 公司)、硫酸链霉素

(Str, Amresco 公司)、乙酰丁香酮(AS, Aldrich 公司)、X-Gluc(Genview 公司)、质粒快速提取试剂盒和核酸纯化/回收试剂盒购自北京鼎国生物技术有限责任公司;槲皮素购自百灵威化学技术有限公司;头孢霉素(Cefo)、氯霉素(Cm)及其他试剂为国产或进口分装分析纯。

1.1.4 培养基 愈伤组织继代培养基的组成为 B₅ 培养基附加 2 mg/L 2,4-D、0.1 mg/L KT、3%蔗糖和 0.8%琼脂,pH5.8。细胞悬浮培养基组成为 B₅ 培养基附加 1 mg/L 2,4-D、0.1 mg/L KT 和 2%蔗糖,pH5.8。条件培养基:取培养 8 d 的悬浮细胞培养液,于 5 000 r/min 离心 10 min,取上清于灭菌的带盖离心管中,封口膜密封后置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 重组植物表达载体的构建及检测 用 *Xba* I 和 *Sac* I 分别对 pBI121、pUC-PSK2 进行双酶切,然后用试剂盒从琼脂糖凝胶中回收并纯化目标酶切片段。体外重组及大肠杆菌转化的操作按常规方法进行,农杆菌感受态细胞的转化采用王关林等(2002)的冻融法,阳性重组质粒采用 *Xba* I、*Sac* I 双酶切和 PCR 检测。

1.2.2 转基因玫瑰茄细胞系的获得及检测 (1)农杆菌介导的玫瑰茄愈伤组织的遗传转化:按谢秀祯(2005b)的方法进行。(2)转基因玫瑰茄细胞系的获得:将经 2 次继代培养的适量抗性愈伤组织转接到含 100 mg/L Kan 和 300 mg/L Cefo 的悬浮细胞培养基中,25℃,100 r/min,微光照培养,2~3 周继代 1 次。(3)转基因玫瑰茄细胞系的检测:玫瑰茄细胞总 DNA 的小量提取参照王关林等(2002)的方法进行。PCR 检测所用的三对引物分别是:根据 *At-PSK2* 基因序列设计合成的引物:P1:5'-TATCTCTAGAATGGCAAACGTCTCCGCT-3'; P2:5'-GTATGAGCTCTCAAGGATGCTTCTTCTTCTGG-3'。根据 pBI121 质粒上 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子序列设计合成的引物:P3:5'-ATGACGCACAATCCCACTATCCTTCG-3'; P4:5'-GATAATCATCGCAAGACCGGCAACAG-3';根据 *nptII* 基因设计合成的引物:P5:5'-GACTGGGCACAACAGACAATCGG-3'; P6:5'-AGCAATATCACGGGTAGCCAACG-3'。三对引物预期扩增片段大小分别为 432bp、585bp 和 621bp。

1.2.3 最低有效植板细胞密度和最低有效起始细胞密度的测定 取悬浮培养至对数生长期(约 8 d)的

玫瑰茄细胞培养液过 300 μm 和 98 μm 无锈钢筛网,低速离心收集细胞,用适量培养基重悬,血球计数板计数后作梯度稀释。从每一稀释度各取 6 mL 细胞悬液与 24 mL 冷却至 45 $^{\circ}\text{C}$ 的平板培养基混匀,取 10 mL 铺于直径为 9 cm 的平板。用 Parafilm 膜封口后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养,21 d 后计算细胞克隆数。另取每一稀释度细胞悬液 14 mL 于 25 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min, 微光照培养。12 d 后滤纸过滤收集细胞,60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 12 h,干燥器中冷却后称细胞干重。

1.2.4 悬浮培养及生长曲线的测定 取悬浮培养至对数生长期(约 8 d)的玫瑰茄细胞培养液 10 mL 接种到 90 mL 新鲜的悬浮培养基中,充分混匀后分装到 50 mL 三角瓶中,每瓶 10 mL。25 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min, 微光照培养。每隔 2 d 取出一瓶用滤纸过滤,60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 12 h,干燥器中冷却后称细胞干重,绘制细胞生长曲线。

1.2.5 花黄素的测定 按杜金华(1997)的方法进行。

1.2.6 愈伤组织培养 将经 3 代悬浮培养(25 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min, 微光照)的细胞培养液过 300 μm 无锈钢筛网(60 目),取细胞团置于固体培养基上培养至获得愈伤组织。培养条件为 25 $^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 25.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光周期为 16/8 h $\cdot \text{d}^{-1}$, 每隔 2~3 周继代一次。

1.2.7 细胞平板培养 取悬浮培养至对数生长期(约 8 d)的玫瑰茄细胞培养液过 300 μm 和 98 μm 无锈钢筛网,滤液用血球计数板计数后,用培养基调整细胞密度至终密度的 5 倍。取 6 mL 细胞悬液与 24 mL 冷却至 45 $^{\circ}\text{C}$ 的平板培养基混匀,取 10 mL 铺于直径为 9 cm 的平板。用 Parafilm 膜封口后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养,21 d 后计算细胞克隆数。

2 结果与分析

2.1 重组植物表达载体的构建及鉴定

在本试验中,用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 从 pUC-PSK2 质粒上切下编码 PSK- α 前体原的全长 DNA 片段,插入到双元表达载体 pBI121 的 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子之间的 *Xba* I/*Sac* I 位点上。重组质粒转化 *E. coli* JM109 菌株后,随机挑选 3 个重组子用 *AtPSK2* 基因的特异引物作 PCR 扩增,均得到预期的 430bp 产物(图 1)。用 *Xba* I 和 *Sac* I 对重组子 DNA 进行双酶切,电泳检查发现都能切出一个约 430 bp 的插入片段(图 2)。

进一步用 *Hind* III 和 *Eco* R I 对质粒 DNA 进行双酶切,也能切出一个长约 1 600 bp 的片段,这个片段包含了完整的 CaMV35S 启动子、Nos 终止子和 *AtPSK2* 基因。以上结果表明,我们已经成功地构建了含有 *AtPSK2* 基因及其完整的表达调控元件的重组植物表达载体,将其命名为 pBI-PSK2。

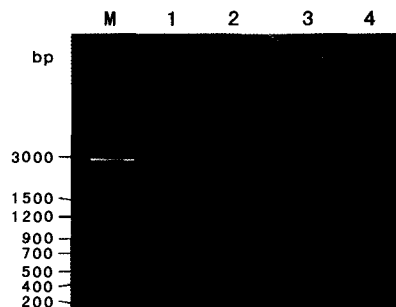


图 1 pBI-PSK2 重组质粒的 PCR 检测
Fig. 1 PCR detection of pBI-PSK2 plasmid
M: DNA Marker 100bp DNA Ladder; 1-3: 用 pBI-PSK2 质粒作模板; 4: 用 pBI121 质粒作模板。

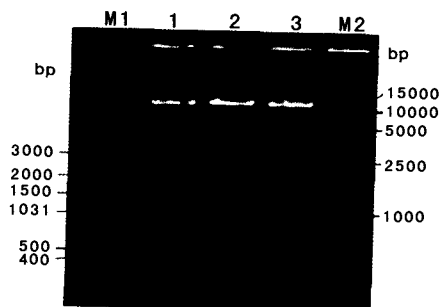


图 2 pBI-PSK2 重组质粒的双酶切检测
Fig. 2 Detection of pBI-PSK2 with double digestion of *Xba* I / *Sac* I
M1: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus; M2: DNA Marker DL15000; 1-3: pBI-PSK2 + *Xba* I / *Sac* I.

随后通过冻融法将重组植物表达载体 pBI-PSK2 转化根瘤农杆菌株 LBA4404, 用附加链霉素和卡那霉素的选择平板进行筛选。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d 后长出菌落, 用试剂盒快速抽提质粒, 进行 PCR 扩增鉴定。用 *AtPSK2* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 得到预期的约 430 bp 产物(图 3), 而用 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子的特异性引物进行 PCR 扩增, 也能得到 585 bp 的预期产物(图 4)。这些结果说明, 转化到农杆菌中的表达载体含有 *AtPSK2* 基因及其完整的表达调控元件, 可以用来转化植物组织和细胞。

2.2 转基因玫瑰茄细胞系的获得及 PCR 检测

用经鉴定的农杆菌转化子转化玫瑰茄愈伤组

织,通过选择培养获得抗性愈伤组织。后者经 2 次继代培养后转入悬浮培养基进行选择培养。再经 3 次继代培养后获得抗性细胞系。少量提取细胞核 DNA,分别用 3 对引物进行 PCR 扩增鉴定(图 5)。结果显示,用 3 对特异性引物均能扩增出与预期目标片段大小一致的产物,说明所获得的抗性细胞系的基因组中不仅整合有完整的 *npt II* 基因和 *AtPSK2* 基因,而且 *AtPSK2* 基因是置于 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子的控制之下。这样就为 *AtPSK2* 基因在玫瑰茄细胞中的表达提供了保障。

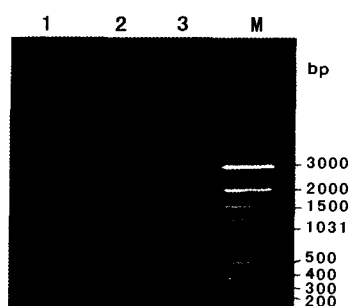


图 3 农杆菌转化子的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of transformants of *A. tumefaciens*

M: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus; 1-2: 用农杆菌转化子质粒作模板; 3: 用 pBI121 质粒作模板。

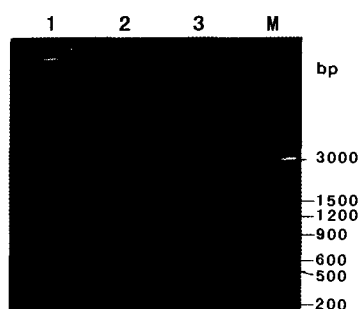


图 4 农杆菌转化子的 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of transformants of *A. tumefaciens*

M: DNA Marker 100bp DNA Ladder V; 1: 用 pBI121 质粒作模板; 2-3: 用农杆菌转化子质粒作模板。

将转化愈伤组织和未转化的愈伤组织在加有 400 mg/L Kan 的培养基上培养 14 d 后,发现转化愈伤组织能正常生长,而未转化的愈伤组织(对照)的生长几乎完全被抑制(图 6)。这就说明作为选择标记和报告基因的 *npt II* 基因在转化愈伤组织中得到了正确和充分的表达。

2.3 *AtPSK2* 基因促细胞分裂活性的检测

2.3.1 临界植板细胞密度和临界起始细胞密度的测定 利用梯度稀释法,并以未转化的玫瑰茄细胞作

对照,测定转化细胞系在平板培养时的临界植板细胞密度和悬浮培养时的临界起始细胞密度,结果表明,*AtPSK2* 基因转化的玫瑰茄细胞系的临界植板细胞密度由 5×10^3 细胞/mL 降低到 2×10^3 细胞/mL;临界起始细胞密度由 4×10^3 细胞/mL 降低到 2×10^3 细胞/mL,分别降低了 60% 和 50%。说明转化细胞在低密度条件下的分裂活性比非转化细胞有了较大的提高。临界植板细胞密度的降低,有利于单细胞的培养和细胞株的筛选,特别是对利用原生质体融合进行细胞育种产生积极的促进作用。

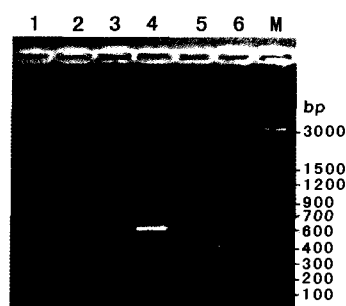


图 5 转基因玫瑰茄细胞系的 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection of transgenic Roselle cell line

M: DNA Marker 100bp DNA Ladder V; 1,3,5: 用 pBI121 质粒作模板; 2,4,6: 用转基因玫瑰茄细胞总 DNA 为模板; 1,2: 用 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子特异引物; 3,4: 用 *npt II* 基因特异引物; 5,6: 用 *AtPSK2* 基因特异引物。

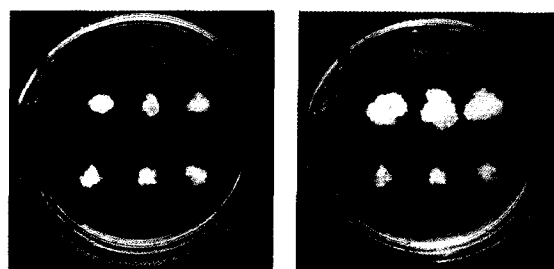


图 6 转基因愈伤组织在选择培养基上的生长情况

Fig. 6 The growth of transgenic callus on selection medium

1,2,3: 转基因愈伤组织; 4,5,6: 对照。

利用低密度悬浮培养的玫瑰茄细胞作为分析系统,我们观察到在起始密度为 3×10^3 细胞/mL 时,非转化细胞即使培养 16 d 也没有发生细胞分裂,但当加入终浓度为 30% 的条件培养基时,培养到第 3~4 天,细胞就开始进入对数生长期,而转化细胞在这样的起始密度下,不需要添加条件培养基也能在培养的第 10 天进入对数生长期,且生长速度跟添加了条件培养基的非转化细胞相比没有明显差别(表 1)。这就间接地证明了在转化细胞中 *AtPSK2* 基

因得到了表达,细胞培养到第 10 天时,培养液中积累的 PSK- α 的浓度可能接近了添加 30% 条件培养基的培养液中 PSK- α 的浓度,从而能有效地启动细胞分裂和增殖。

2.3.2 细胞生长曲线的比较 通过对生长曲线的比

较,还可以看到,转化细胞的延滞期从 8 d 缩短到了 4 d,达到稳定期的时间也相应地从 16 d 缩短到 12 d。这也说明在转化细胞中由于 *AtPSK2* 基因的表达,使悬浮培养所需要的延滞时间缩短,从而使整个培养周期也相应地缩短(图 7)。在本试验中,转化

表 1 低密度条件下培养细胞的生物量增长倍数

Table 1 Increasing multiples of cell biomass cultured at a low density

培养细胞及其条件 Cell and its culturing conditions	培养天数 Cultivation days (d)					
	2	4	6	8	10	12
转化细胞 Transgenic cell	0	0.25	0.25	0.25	0.50	2.75
非转化细胞+30% CM Non-transgenic cell+30% CM	0	0.40	3.33	9.67	14.00	16.00
非转化细胞 Non-transgenic cell	—	0.25	—	0.25	—	0

—:没有试验 non-test; CM:conditioned medium.

细胞的临界植板细胞密度和临界起始细胞密度比非转化细胞明显降低,并且延滞期也显著缩短,这就反映出在转化细胞内 PSK- α 合成能力比非转化细胞有了较大的提高。也就是说,外源 *AtPSK2* 基因在玫瑰茄转化细胞内得到了较好的表达。

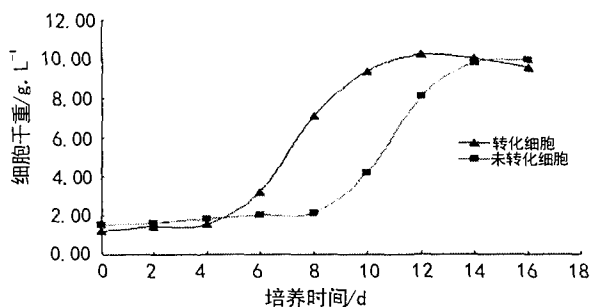


图 7 转化细胞和非转化细胞生长曲线的比较

Fig. 7 Comparison of growth curve of transformed cell with non-transformed cell

2.4 *AtPSK2* 基因促愈伤组织生长活性的检测

将来自转化细胞和非转化细胞、大小相近的愈伤组织接种于固体培养基上,培养 14 d 后,观察两者的大小差别,结果显示,转基因愈伤组织的大小是对照的 1.77 倍。另外,还测得转基因愈伤组织的比生长速率为 0.186 g/g·d,而对照为 0.106 g/g·d,前者是后者的 1.75 倍,说明外源 PSK 基因已经在玫瑰茄细胞中得到表达,并表现出其促进愈伤组织生长的活性。

2.5 转基因玫瑰茄细胞中花黄素含量的测定

在玫瑰茄细胞中槲皮素是花青素合成途径的中间产物,在它们之前的苯丙氨酸解氨酶和查尔酮合成酶是整条合成途径的关键酶。农杆菌介导的植物细胞的遗传转化,是以 T-DNA 左右边界序列引导目的基因整合到染色体而告终。由于这种整合是随

机的,因此所获得的转基因细胞系有可能出现诸如基因沉默、生长速度下降或目标代谢产物产量降低甚至消失等负效应。测定结果表明,转基因玫瑰茄细胞(转化细胞 101.8 $\mu\text{g/g}$)或愈伤组织的花黄素含量(转化愈伤组织 162.0 $\mu\text{g/g}$)与对照(未转化细胞 102.9 $\mu\text{g/g}$,未转化愈伤组织 160.0 $\mu\text{g/g}$)没有明显差别,因此,可用于花青素、花黄素高产细胞株的筛选。

3 讨论与结论

在构建重组表达载体的过程中,我们采用定向克隆策略,即在设计 *AtPSK2* 基因的特异引物时,根据表达载体和中间克隆载体上都可利用的酶切位点,人为地在引物的 5' 端引入两个非同裂酶或同尾酶的酶切位点,这样不仅能避免载体的自身环化,便于进行连接操作,提高重组率,而且确保插入方向正确。用牙签法对蓝—白筛选到的转化子进行检测,没有发现假阳性菌落,也说明了定向克隆策略的可靠性和有效性。

利用我们建立的玫瑰茄愈伤组织遗传转化体系,通过根癌农杆菌介导将体外构建的、含 *AtPSK2* 基因的重组植物表达载体导入玫瑰茄细胞,所获得的转基因玫瑰茄细胞系的临界植板细胞密度由 5×10^3 细胞/mL 降低到 2×10^3 细胞/mL;临界起始细胞密度由 4×10^3 细胞/mL 降低到 2×10^3 细胞/mL,分别降低了 60% 和 50%。在起始密度为 3×10^3 细胞/mL 时,转化细胞培养到第 10 d 时,就能有效地启动细胞分裂和增殖。在悬浮培养中,转化细胞的延滞期从 8 d 缩短到了 4 d,达到稳定期的时间也相应地从 16 d 缩短到 12 d。平板培养的转基因

愈伤组织的大小是对照的 1.77 倍,比生长速率是对照的 1.75 倍。所有这些结果都说明了外源 PSK 基因已经在玫瑰茄细胞中得到表达,并表现出其促细胞生长的活性。

根据现有研究结果(Matsubayashi 等,1999),人们推测,在细胞脱分化和促进细胞分裂的过程中,PSK- α 可能介导了与生长素和细胞分裂素密切相关的信号转导途径,而 PSK 与 PSK 受体的结合是一个涉及到植物细胞脱分化以及保持细胞脱分化状态的级联信号调节机制(Matsubayashi 等,2002)。因此,本试验结果间接证明,玫瑰茄细胞能够识别和正确加工拟南芥 PSK2 基因的内含子序列、信号肽和 PSK- α 前体;另一方面说明了在玫瑰茄细胞中表达的拟南芥 PSK2 基因产物——PSK- α 能与玫瑰茄细胞的 PSK 受体特异性结合,并按细胞中特定的级联信号调节机制发挥作用。在这之前还没有相关的报道。这将为 PSK- α 的生物合成和作用机理的深入研究提供一个新的模型。

由于转基因玫瑰茄细胞和愈伤组织中的花黄素含量没有受转基因的影响,故可用作花青苷和花黄素等次生代谢产物高产细胞株选育的出发材料。本研究结果对于单细胞的培养和细胞株的筛选,特别是对利用原生质体融合进行细胞育种将产生积极的促进作用。

参考文献:

- 王关林,方宏筠. 2002. 植物基因工程(第 2 版)[M]. 北京: 科学出版社,739—740,776—777,742
- Chang YC, Huang HP, Hsu JD, et al. 2005. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 205: 201—212
- Chen CC, Hsu JD, Wang SF, et al. 2003. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits[J]. *J Agric Food Chem*, 51: 472—477
- Dafallah AA, al-Mustafa Z. 1996. Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa* [J]. *Am J Chin Med*, 24: 263—269
- Du JH(杜金华), Guo Y(郭勇). 1997. The selection of anthocyanins high production cell lines from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) cell cultures(高产花色苷玫瑰茄细胞系的筛选)[J]. *Chin J Biotech*(生物工程学报), 13(4): 437—439
- Haji FM, Haji TA. 1999. The effect of sour tea(*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension[J]. *J Ethnopharmacol*, 65: 231—236
- Lin HH, Huang HP, Huang CC, et al. 2005. Hibiscus polyphenol-rich extract induces apoptosis in human gastric carcinoma cells via p53 phosphorylation and p38 MAPK/FasL cascade pathway[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 43(2): 86—99
- Li YP(李玉萍). 2003. *Hibiscus sabdariffa* and its utilizations(玫瑰茄及其利用)[J]. *Trop Agric Information World*(世界热带农业信息), (11): 24—26
- Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y. 1997. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13 357—13 362
- Matsubayashi Y, Takagi L, Omura N, et al. 1999. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of *Zinnia* [J]. *Plant Physiol*, 120: 1 043—1 048
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, et al. 2002. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine[J]. *Sci*, 296(5572): 1 470—1 472
- Pi-Jen Tsaia, John McIntoshb, Philip Pearceb, et al. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle(*Hibiscus sabdariffa*) extract[J]. *Food Res International*, 35: 351—356
- Ruan Q(阮茜), Guo Y(郭勇). 1999. Dynamics on the growth of *Hibiscus sabdariffa* cell and the formation of anthocyanin in phosphorus-limited culture(磷限制培养中玫瑰茄细胞生长及花青苷形成动力学)[J]. *J South China Univ Tech (Nat Sci)*(华南理工大学学报·自然科学), 27(1): 86—90
- Xie XZ(谢秀祯), Lin QH(林俏慧), Guo Y(郭勇). 2005a. Molecular cloning and sequencing of *Arabidopsis* gene AtPSK2 encoding a precursor of phytosulfokine- α (拟南芥植物硫肽激素- α 前体基因 AtPSK2 的克隆及序列分析)[J]. *Life Sci Res*(生命科学研究), 9(1): 49—54
- Xie XZ(谢秀祯). 2005b. Cloning of AtPSK genes and expression of AtPSK2 genes in roselle cell(拟南芥植物硫肽激素基因的克隆及其在玫瑰茄细胞中的表达)[C]. A dissertation submitted to South China University of Technology for the doctor's degree(华南理工大学博士论文), 38—40
- Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, et al. 1999. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(9): 13 560—13 565
- Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H, et al. 2000a. Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors[J]. *Plant Cell Physiol*, 41(7): 825—830
- Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, et al. 2001. Diversity of *Arabidopsis* genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor[J]. *Plant Physiol*, 127: 842—851
- Yang H, Morita A, Matsubayashi Y, et al. 2000b. A rapid efficient system of *Agrobacterium* infection-mediated transient gene expression in rice Oc cells and its application for analysis of the expression and antisense suppression of preprophytosulfokine, a precursor of phytosulfokine- α , encoded by OsPSK gene[J]. *Plant Cell Physiol*, 41(6): 811—816
- Zheng SP(郑穗平), Guo Y(郭勇). 1998. Effects of staple nutrient on cell growth and anthocyanin production in suspension culture of *Hibiscus sabdariffa* L.(主要营养成分对悬浮培养玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), 18(1): 70—74
- Zhu XG(朱新贵), Guo Y(郭勇). 1998. Monochromatic effects on anthocyanin synthesis in roselle(*Hibiscus sabdariffa* L.)(单色光对玫瑰茄悬浮细胞合成花青素的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), 18(4): 322—324