

文章编号: 1001-1498(2000) 01-0097-06

观赏植物基因工程研究进展

汪政科, 彭镇华

(中国林业科学研究院花卉研究与发展中心, 北京 100091)

摘要: 评述了近 10 a 来有关植物花青素、花器官发育基因克隆、花衰老机理的研究进展及其应用前景。植物花青素代谢途径及其主要酶类的作用之研究已较为成熟, 一大批调控植物花色的结构基因与调节基因已被克隆。利用反义基因及共抑制原理导入外源基因已培育出了新的观赏植物品种。控制植物的花器官发生的基因也被克隆, 通过对花器官基因的改变, 可以改变植物花器官模式。切花衰老有些是受乙烯的控制, 有些则与 ABA 有关。利用基因工程手段为创造新花色、花型和花期延长等开辟了广阔前景。

关键词: 观赏植物; 花青素; 花器官; 基因克隆; 基因工程

中图分类号: S68.036

文献标识码: A

花是高等植物繁衍生命的重要器官, 不同植物的花大小、形态、色彩各异。传统的杂交育种及定向选择育种培育了大量观赏植物的新品种, 但也有其局限性: 在自然条件下, 植物变异频率比之人类的需要要小得多; 人工诱变虽然提高了变异频率, 但仍不够高, 且盲目性比较大。杂交育种虽然能弥补两者的不足, 却也面临着远缘杂交不亲和, 难以打破物种生殖隔离, 在有性生殖过程中, 重组时染色体的交换量很小, 难以打破某些基因连锁, 杂交育种周期长, 一个新品种的育成, 往往经过多年多次杂交, 且会使某些优良性状难以保持, 这就给改良某一单一性状带来极大不便。在传统育种基础上采用基因工程技术可以对植物的基因进行修饰, 获得某些运用传统育种方法所不能达到的性状改良效果。基因工程技术为花卉改良开辟了一条全新的途径。80 年代以来, 基因工程技术在遗传转化观赏植物花色、花形、花香及延长瓶插寿命等方面取得了重要进展^[1-3]。现在植物的分子生物学研究进展迅速, 本文就 90 年代以来的最新进展及其应用前景作一评述。

1 花卉花色基因研究

花的颜色主要受两大类化合物决定, 即类黄酮和胡萝卜素, 类黄酮有 3 000 种, 是普遍分布于植物体内的次生代谢物, 参与植物许多功能, 如防止紫外光、抵御病原、诱导病原和使花粉保持活力等。花色素苷(类黄酮一个亚类) 主要积累在花瓣表皮细胞的液泡内, 是花和果实的主要色素。通过应用花色素苷色素形成障碍突变体的研究, 花色素的代谢途径是受一系列酶控制的, 存在有两类影响花色素苷生物合成的基因。一类是不同植物种类共同具有的结构基因, 第二类是调节生物合成基因活性、色素空间和时间积累的基因。类黄酮生物合成似乎受发育、组

收稿日期: 1999-03-08

基金项目: 中国林业科学研究院基金项目“百合花色素与花型相关基因的遗传转化系统研究”资助, 并为博士学位论文的一部分

作者简介: 汪政科(1967-), 男, 安徽黄山市人, 助理研究员。

织专一性调节,而且也受光、真菌引发物、紫外辐射、创伤等环境因素的诱导。

查尔酮合成酶是花色素合成过程中的一个重要的关键性酶,而且研究最为深入。金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)和矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm)^[4]的CHS基因都是一个由多个成员组成的多基因家族,杂种扶郎菊(*Gerbera hybrida* L.)花冠发育时活化的3个基因相应的酶的结构、表达模式和催化特性表明gCHS1和gCHS3为典型的CHS酶编码,其基因表达模式在时间上与黄酮酶(gCHS1,gCHS3)和花色素苷(gCHS1)在花冠发育时的合成相关。gCHS2则不同,其表达模式与色素形成模式不相关,氨基酸序列也不同于典型的CHS,并且催化特性也不同,它是CHS和CHS相关基因大的亚家族的一个新成员^[5]。通过对花色研究模式植物金鱼草进行查尔酮合成酶转基因研究,发现金鱼草的花色和育性都发生了变化^[6]。

花序发育过程中,二氢黄酮-4-还原酶(DFR)基因在花器官、花类型和花冠内的表达是依照品种花色素苷颜色而变化。而CHS表达在花序发育过程中虽然是组织专一性调节的,但变化是偶然的。在品种间DFR表达的变化显示有空间上专一性基因调节。

花色素苷-3-葡萄糖是花色素合成途径中第一个稳定的化合物,尽管花色素苷的芳环乙酰化作用非常重要,但其研究得较少。在紫苏(*Perilla frutescens* L.)^[7]红色叶片、三色堇(*Viola trinervata* Howell)^[8]的花中分离了花色素苷-5-芳香基乙酰转移酶(5AT),并认为在龙胆苷翠雀素合成途径中,5AT催化了翠雀素-3,5-羟基葡萄糖到翠雀素-3-羟基葡萄糖-5-咖啡酰葡萄糖,在糖基转移酶的作用下,进一步在B-环的羟基上进行糖基化,通过建立cDNA文库克隆了全长5AT基因^[9]。它与其它乙酰-CoA转移酶一样都具有一个保守序列,是乙酰-CoA转移酶家族的一个成员。该基因只在花瓣的外表皮细胞中表达,在时间上受其它基因所控制。

基因工程技术可以从两个方面来改变花的颜色。第一,抑制类黄酮生物合成基因的活性,从而导致中间产物的积累和花色的改变;对基因的沉默有不同的理论假说,如DNA的异位配对,DNA的甲基化,染色质的改变,反义RNA的抑制^[10,11]和共抑制^[12]。反义RNA技术已被成功地用来抑制CHS基因的活性,在CHS基因反义链转基因的植物中,CHS的mRNA活性都有所降低,从而造成CHS无色底物的积累,使花颜色变浅或成白色,如利用单链DNA的烟草黄化矮化病毒(TYMV)改造成一个载体,构建成一个35S启动子:查尔酮合成酶的表达质粒转化到矮牵牛中,可以获得多种随机有白色花斑模式且可遗传的转基因植株。白色花斑随机分布在花瓣上。经研究发现RNA的转录没有受到影响,但CHSA稳定态的mRNA水平降低了。也就是说转录后CHSA的活性受到了影响,且与CHSA的拷贝数有关^[13]。另一种抑制基因活性的方法是利用具有酶活性的RNA分子,能特异地切断mRNA,从而阻止其编码蛋白的合成。第二,引入新基因来补充某些品种缺乏合成某些颜色的能力。Meyer^[14,15]等将玉米(*Zea mays* L.)的DFR基因导入白色矮牵牛植株中,单拷贝的转基因矮牵牛的花色表现为红色,而多拷贝的转基因矮牵牛的花色表现为白色。

2 花型研究

传统植物形态学的研究早已推断:在进化上,花器官与叶属同源器官。遗传学分析的结果也表明叶是各类花器官的“基础形态”。花发育的研究属于基础理论研究,同时它也为遗传操作改变花的形态开辟了广阔的应用前景。从研究的角度可把植物花的发育划分为4个阶段:花序发育、花芽发育、花器官发育和花型发育。由于拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)

和金鱼草花器官简单、易栽培和诱导操作及获得大量突变体, 尤其是遗传背景清楚。花发育的研究在拟南芥和金鱼草上取得了很大进展, 花发育的遗传学研究分为两种基因类型: 花分生组织的基因和花器官类别的基因。花分生组织的基因对整个植物的生长都有影响, 而花器官类别的基因更专一影响花原基的产生。通过 DNA 序列分析发现相当一部分花器官特异性基因都属于 MADS 基因族, MADS 基因族的蛋白产物均为转录因子, 序列分析表明在 5 种蛋白中都有一个由 56 ~ 58 个氨基酸残基组成的高度保守区, 称之为 MADS 盒, MADS 盒具有 DNA 结合能力的区域, 具有调控其它基因表达的能力^[16]。大多数维管束植物都有一个 MADS 盒基因家族, 它们可能是由维管束植物共同祖先进化而来^[17]。

花序发生是植物从营养生长过渡到生殖生长的重要标志, 通过对拟南芥的深入研究, 找到了拟南芥的 emf 突变体^[18], 它丧失了营养生长阶段, 直接形成单朵花, 另一个突变体 tf1 则引起植株营养叶片数目减少和花序发育提前, 但同时又使花序形态从无限花序变成有限花序^[19, 20], 金鱼草的 cen 突变体与 tf1 表型类似。作为控制拟南芥分生组织特异性基因之一的 leafy^[21, 22]的表型正好与 tf1 的表型相反, 它的突变会导致花部分逆转为花序枝。

在花发育的分子遗传学研究中, 对花器官的发育研究最为深入, 花器官的发育是以轮为单位, 在野生型的花器官中由外向内分别为: 轮为萼片, 轮为花瓣, 轮为雄蕊, 轮为心皮。同源异型突变体通常引起器官的错位发育。Coen^[23]等人先后提出了“ABC 模型”, 认为 A 类基因在 1 轮起作用, B 类基因在 2、3 轮起作用, C 类基因在 4、5 轮起作用。花萼的形成需 APETALA1(AP1) 基因, 花瓣和雄蕊的形成需 APETALA2(AP2) 基因, 雄蕊和心皮的形成需 APETALA3(AP3)、PISTILLATA(PI)、AGAMOUS(AG)、SUPERMAN 基因^[24]。大量研究验证了该模型的正确性。矮牵牛的 AGAMOUS 同源基因与拟南芥的 AGAMOUS 基因不同, 拟南芥的雄蕊和心皮只受 AGAMOUS 基因控制, 而矮牵牛中有两个同源基因 pMADA3 基因和花结合蛋白 FBP6 基因, 但只有 pMADA3 基因起作用^[25]。利用拟南芥、矮牵牛和金鱼草的 AGAMOUS、GLOBOSA、DEFICIENS 基因作探针, 克隆了扶郎菊相关的同源基因^[26], 分析发现, 它们属于 MADS 盒基因, 其中多数基因都与花发育有关。扶郎菊的 2 个 AGAMOUS 基因、2 个 GLOBOSA 基因和 1 个 DEFICIENS 与矮牵牛和金鱼草相关基因功能一样, 分别参与了花瓣(B 功能)和雄蕊雌蕊(C 功能)的发育, 但扶郎菊的第二个 DEFICIENS 与 B 功能无关, 扶郎菊的 SQUAMOSA 基因与金鱼草的 SQUAMOSA 基因功能不同, 与 A 功能无关。扶郎菊的冠毛是一种进化的花萼。

植物的花序发生与花器官发生的基因有时候在时间上同时起作用, 在拟南芥的花分生区 LFY 和 AP1 功能相互重叠^[27], 但它们与 AG 基因并不重叠。花序发生与花器官发生基因都与开花时期基因 FCA 有关^[28]。拟南芥的花瓣和雄蕊形成时 AP3 和 PI 基因同时起作用, 启动了它们的下游基因 NAP, NAP 对于花分生组织分化和花器官分离是必须的, 并能控制细胞的分裂与延长^[29]。现已经克隆出的大量与花发育有关的基因(TEL, CEN, EMF, FCA, AP1, AP2, AG 等基因)为花型改造提供了新途径。

3 花衰老机理基因

乙烯是一种植物内源成熟激素, 花卉中的麝香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)、兰科(Orchidaceae)植物、满天星(*Gypsophila elegans* Bieb.)、金鱼草、百合属(*Lilium* L.)石蒜属

(*Lycoris* Herb.) 等对乙烯比较敏感, 浓度低时就能造成危害。控制切花在储存、运输过程中的乙烯合成对于延长保鲜期, 提高切花品质至关重要。控制乙烯的方法有很多, 目前以采用银盐拮抗为主, 利用乙烯合成抑制剂 aminooxyacetic acid (AOA) 预处理切花则降低了花对乙烯的敏感性^[30], 延长了花卉的观赏期。近几年来, 对控制乙烯合成的基因和衰老过程中基因的表达进行了深入研究, 在矮牵牛花上发现授粉能诱导花合成乙烯而衰老^[31]。植物在机械伤害、生物胁迫的条件下, 均能引起叶片和花的衰老, 而衰老往往与乙烯合成有关, 因此可通过导入反义 ACC 合成酶基因及反义 ACC 氧化酶基因阻止乙烯生化合成, 延长花期。

有些植物花的衰老与乙烯的关系不明显, 但与脱落酸有关, 如杂种萱草(*Heimerocallis hybrida* L.) STELLA DIORA 品种的花开后, 24 h 就衰败死亡了, 外源的脱落酸处理也加速花的衰亡, 其主要原因是使细胞膜的通透性丧失, 促进了脂类的完全氧化, 诱导了细胞膜的通透性。未成熟的花经脱落酸处理 10 min 与自然开放 18 h 后的花在细胞膜的通透性上表现一致。花开之前内源脱落酸也在逐步增加, 这与脱落酸对杂种萱草花瓣程序化死亡时的信号传导有关^[32]。

4 今后的研究方向

传统育种方法与基因工程各有所长, 传统育种方法不是其它技术短期内所取代的, 然而基因工程在花卉及其它植物的改良中的作用和地位日显重要。在建立转化受体系统(如基因定点整合)、控制目的性状的基因分离等及表达质粒的构建都是花卉基因工程的重要内容。

基因定点整合: 基因的定点整合技术, 即外源基因与植物基因组的 DNA 发生双交换, 外源基因正好整合到植物所需要的特定位置而对植物的某个性状进行改良。目前通过基因工程的方法已获得了大量的植株, 但由于转化方法是將外源基因随机插入到植物的基因组 DNA 中, 在植物中一直表达, 利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Towns.) Conn.) 进行遗传转化发现 T-DNA 的定点整合不稳定^[33], 因此利用基因的定点整合技术, 对植物的基因进行修饰时, 正好改变植物基因的某一位置并在需要时进行表达。稳定的定点整合是基因工程的一个重要研究和应用的领域。

目的基因的分离: 一般先建立植物的 cDNA 文库或基因组文库, 再采用不同的方法分离基因。当基因产物未知时, 用基因标签法或作图克隆法进行基因分离, 或利用 cDNA 文库的差示筛选法直接分离组织或发育特异表达的基因。当某一种植物的基因被克隆, 则可利用该基因作探针, 对目的植物的 cDNA 进行印迹杂交, 克隆出目的植物的基因。当基因的蛋白产物已知时, 则可利用抗体, 寡核苷酸作探针, 进行文库杂交而分离目的基因。

本身基因的修饰与新基因的引入: 有些植物缺少某一代谢途径中的一种或多种酶时, 可将其它植物该代谢途径中的一系列的酶转入该植物中, 使该植物具有这个性状而得到改良。如对 670 个玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.) 栽培种分析后, 没有发现 B 环 5 羟化的花色素苷的存在。因此用传统的育种法不可能培育蓝色玫瑰。合成蓝色色素所需的 F3'5'H 酶的基因已被克隆^[34], 如将 F3'5'H 基因引入合成花葵素苷和花青素苷的玫瑰栽培品种里, 可促使花色素苷的合成传向翠雀素苷的合成方向, 从而使花变为蓝色; 又如花卉的香味物质合成途径中的基因的研究相对滞后, 许多花卉如中国兰花(*Cymbidium* Sw.) 和中国水仙(*Narcissus tazetta* var *chinensis* Roem.) 花小、颜色简单但具有浓郁的芳香, 附生兰类(热带兰花)和水仙属其它植物

的花大、色泽鲜艳,但大多没有芳香,通过对某些花型较差但有香味的植物的花器官进行改造,使这些植物既具有香味花型又美观,将是花卉未来分子生物学研究的一个重要课题。

参考文献:

- [1] 包满珠. 植物花青素基因的克隆及应用——文献综述[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 279~284.
- [2] 傅荣昭, 马江生, 曹光诚等. 观赏植物色形基因工程研究进展[J]. 园艺学报, 1995, 22(4): 381~385.
- [3] Mol J N M, Holton T A, Koes R E. Genetic engineering of commercial traits of floral crops [J]. Trend Biotechnology, 1995, 13(3): 350~355.
- [4] Koes R E, Spelt C E, Mol J N M. The chalcone synthase multigene family of *petunia hybrida*. Gene: Differential light-regulated expression during flower development and UV light induction [J]. Plant Molecular Biology, 1989, 30(12): 213~225.
- [5] Helariutta Y. Chalcone synthase like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 28(1): 47~60.
- [6] 邵莉, 李毅, 陈章良. 查酮合成酶基因对转基因植物花色和育性的影响[J]. 植物学报, 1996, 38(7): 517~524.
- [7] Fuliwara H, Tanaka V, Fukui V, et al. Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perola frutescens* [J]. Plant Science, 1998, 137(1): 87~94.
- [8] Fuliwara H, Tanaka V, Fukui V, et al. Anthocyanin S-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*, purification, characterization and its role in anthocyanin biosynthesis [J]. Europe Journal Biochemistry, 1997, 249(1): 45~51.
- [9] Fujiwara H, Yoshikazu T, Keiko V, et al. cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora* [J]. The Plant Journal, 1998, 16(4): 421~431.
- [10] English J J, Mueller E, Baulcombe D C. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes [J]. Plant Cell, 1996, 8(1): 179~188.
- [11] Ross G A, Lara R F B, Andrew P G, et al. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *petunia* using a geminivirus-based episomal vector [J]. The Plant Journal, 1998, 15(5): 593~604.
- [12] Que Q, Wang H, English J J, et al. The frequency and degree of co-suppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence [J]. Plant Cell, 1997, 9(8): 1357~1368.
- [13] Ross G A, Lara R F, Andrew P, et al. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *petunia* using a geminivirus-based episomal vector [J]. The Plant Journal, 1998, 15(5): 593~604.
- [14] Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, et al. A new *petunia* flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene [J]. Nature, 1985, 330: 667.
- [15] Meyer P, Heidmann I. Epigenetic variants of a transgenic *petunia* line show hypermethylation in transgene DNA: An indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plant [J]. MGG, 1994, 234(3): 390.
- [16] 刘良式, 李菁菁, 俞皓等. 植物分子遗传学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1997. 399.
- [17] Muster T, Pahnke J, Di R, et al. Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of fern and seed plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 2415~2420.
- [18] Sung R, Belachew A, Shunong B, et al. EMF, an Arabidopsis gene required for vegetative shoot development [J]. Science, 1992, 258(11): 1645.
- [19] Shannon S, Meeks-Wagner D R. A mutation in the Arabidopsis TFL1 gene affects inflorescence meristem development [J]. Plant Cell, 1991, 3(5): 877~892.
- [20] Schults E A, Haughn G W. LEAFY, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1991, 3(7): 1221~1237.
- [21] Huala E, Sussex IM. LEAFY interacts with floral homeotic gene to regulate *Arabidopsis* floral development [J]. Plant Cell, 1992, 4(6): 901.
- [22] Schmaltz E A, Haughn G W. LEAFY, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis* [J].

Development, 1991, 3(4): 771.

- [23] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions control flower development [J]. Nature, 1991, 353(1): 31 ~ 37.
- [24] Hajime S, Leonard J M, Elliot M M. Role of superman in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries [J]. Nature, 1995, 378(2): 199 ~ 203.
- [25] Kater M M, Colombo L, Franken J, et al. Multiple AGAMOUS Homologs from Cucumber and petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate [J]. Plant Cell, 1998, 10(2): 171 ~ 182.
- [26] Yu D, Mika K, Eija P, et al. Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gebera hybrida* (Asteraceae) [J]. The Plant Journal, 1999, 17(1): 51 ~ 62.
- [27] Mizukami Y, Hong M. Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by AGAMOUS [J]. The Plant Cell, 1997, 9(3): 393 ~ 408.
- [28] Pagel T, Macknight R, Yang C, et al. Genetic interactions of the *Arabidopsis* flowering time gene FCA with genes regulation floral initiation [J]. The Plant Journal, 1999, 17(3): 231 ~ 239.
- [29] Sablowski W, Meyerowitz E. A homolog of no apical meristem is an immediate target of floral homeotic genes APETALA 3/PISTILLATA [J]. Cell, 1998, 92(1): 93 ~ 103.
- [30] 姜微波, Shim on M, Araham H H. 香石竹花瓣对乙烯的敏感性与蛋白质合成 [J]. 植物学报, 1997, 39(11): 991 ~ 997.
- [31] Wang H, Woodson W R. Nucleotide sequence of a cDNA encoding the ethylene-forming enzyme from *Petunia* corollas [J]. Plant Physiology, 1992, 100(4): 535 ~ 536.
- [32] Panavas T W, Rubinstein B. Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petal [J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49(12): 1987 ~ 1997.
- [33] Risseuw R, Dijk M, Hooykaas P. Gene targeting and instability of *Agrobacterium* t-DNA loci in the plant genome [J]. The Plant Journal, 1997, 11(4): 717 ~ 728.
- [34] Holton T A. Cloning and expression of cytochrome-P450 genes -controlling flower colour [J]. Nature, 1993, 366(2): 276 ~ 279.

Advances in Genetic Engineering of Ornamental Plant

WANG Zheng-ke, PENG Zheng-hua

(Flower Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: The cloning and applications of the plant anthocyanin biosynthetic genes, flower organ identity genes and flower senescence genes were reviewed. Plant anthocyanin biosynthetic pathways and involved enzymes were well characterized. Many structural and regulatory genes controlling flower color were cloned. Using direct gene introduction, anti-sense RNA and co-suppression techniques, some flower plant cultivars with different colors were obtained. Flower pattern can be changed from modifying the genes controlling flower organ identity. The cloned genes opened up a wide range of application in plant science research, such as create cultivars with new flower color, new leaf color, new flower form, and postpone cutting flower period.

Key words: ornamental plant; anthocyanin; flower organ; gene cloning; gene engineering