

中国水仙花基因工程的研究现状

马传营 潘东明 钟凤林 郭志雄

(¹福建农林大学园艺学院, 福州 350002 ²福建农林大学园艺产品贮藏保鲜研究所, 福州 350002)

摘要: 重点综述了中国水仙花香、花色、花发育、抗性和遗传转化等方面基因的研究现状; 探讨了基因调控和改善花观赏价值的方法; 简要指出了在研究中存在的问题及展望了其应用前景。

关键词: 中国水仙 花香 花色 花发育 遗传转化 基因工程

Advances in Genetic Engineering Research on *Narcissus tazetta* var *chinensis*

Ma Chuanying Pan Dongming Zhong Fenglin Guo Zhixiong

(¹ College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

² Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract The present situation of genes of floral fragrance, floral color, flower development, resistance and *Agrobacterium tumefaciens* in *Narcissus tazetta* var *chinensis* were summarized. The methods of improving flower appreciation value by genetic engineering were discussed. Finally, Problems and perspectives of genetic engineering on research were also pointed out.

Key words *Narcissus tazetta* var *chinensis* Floral fragrance Floral color Flower development *Agrobacterium tumefaciens* Genetic engineering

水仙 (*Narcissus*) 是石蒜科水仙属, 多年生宿根草本, 原分布在中欧、地中海沿岸和北非地区, 其中多花水仙具有最多的变种和栽培品种, 大多已广为种植。中国水仙 (*Narcissus tazetta* L. var *chinensis* Roem.) 属于多花水仙亚种的一个变种, 是我国著名的传统名花。虽然传统悠久, 但长期以来, 中国水仙品种稀少, 花色单一, 品质下降, 生产上栽培的中国水仙为同源三倍体, 利用有性杂交或实生育种很难实现品种创新。

基因工程的发展和不断成熟为解决中国水仙目前存在的问题提供了新途径, 本研究主要从花香、花色及花发育等方面就中国水仙花朵基因工程的研究进展进行综述, 为进一步研究提供技术参考。

1 花香物质生物合成的相关酶及编码基因

黄巧巧等^[1-3]报道过中国水仙花的香气组成, 其主要成分是苯甲醛、芳樟醇、乙酸苄酯、柠檬烯、β-

月桂烯、苏合香烯和乙酸苯乙酯等, 其中萜类化合物是花香物质中最大的类群, 也是许多植物香味物质的主要成分, 如芳樟醇、柠檬烯、β-月桂烯和苏合香烯等单萜类。大多数萜类化合物是由异戊烯二磷酸在单萜或倍半萜合成酶的作用下合成^[4]。LIS基因可编码 S-萜烯醇 (S-linalool) 合成酶, 该酶可将牻牛儿焦磷酸 (GPP) (类萜合成的共同成分) 一步转化成 S-萜烯醇。柠檬烯合酶、β-月桂烯合酶和苏合香烯合酶相应的编码基因目前未见报道。现已被克隆的 1-脱氧木糖-5-磷酸合成酶 (1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase, DXPS) 和 1-脱氧木糖-5-磷酸还原酶 (1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR) 是萜类物质的前体异戊烯二磷酸 (isopentenyl diphosphates, IPP) 合成的关键酶 (GenBank 登录号分别为 GU574804 和 GU574805)。它们也是甲基赤藓糖醇 (methylerythritol) 途径中的重要酶。据此可

收稿日期: 2010-03-29

作者简介: 马传营, 男, 硕士研究生, 研究方向: 花卉分子生物学; E-mail: mcy198261@126.com

通讯作者: 潘东明, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 园艺产品采后贮运保鲜研究; E-mail: pdm666@126.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以认定在中国水仙中也存在此条合成路径。

在中国水仙花香物质合成途径中,苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine PAL)发挥重要作用,它是肉桂酸(cinnamic acid)合成途径中的关键酶^[5](GenBank登录号为GU574806),现已被克隆。该途径形成的反式肉桂酸(amic acid)经过甲基化或酰化,形成一系列的挥发性化合物,催化这些反应的酶是一些甲基转移酶和酰基转移酶。中国水仙花中,在乙酰辅酶A:苯甲醇乙酰转移酶[acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase (BEAT)]的作用下合成乙酸苜酯,而编码此酶基因的cDNA全长的克隆还未见报道,目前此cDNA的全长在山字草中被克隆^[6]。

2 花色物质生物合成的相关酶及编码基因

在水仙属中,色素的主要成分为类胡萝卜素^[7]。类胡萝卜素与花香物质的合成前体是一样的,都为IPP,只是在合成的后期由于不同酶的作用,最后生成不同的物质。目前有关花色的研究要比花香更为透彻,很多花色物质合成中的酶和相应的编码基因被克隆。江琳玉^[8]克隆了 ζ 胡萝卜素脱氢酶基因(ZDS)和番茄红素 ϵ 环化酶基因(LYCE)。ZDS催化 ζ 胡萝卜素向番茄红素转化,现已从苹果(GBAN AF429983)、温州蜜柑(GBAN DQ309869)、葡萄柚(GBAN AF372617)、番茄(GBAN AF195507)^[9]、辣椒(GBAN X89897)^[10]、黄水仙(GBAN AJ224683)、甘薯^[11]、龙胆草^[12]等植物中分离出来。LYCE是番茄红素 ϵ 环化酶,现已从拟南芥(GBAN U50738)和番茄(GBAN Y14387)等植物中分离得到。陈段芬等^[13]克隆了NTPDS1基因的全长,NTPDS1是类胡萝卜素合成的一个重要限速酶,其基因与八氢番茄红素合酶基因(PSY)、 ζ 胡萝卜素脱氢酶基因(ZDS)等基因协调作用,在转录水平上调节类胡萝卜素的积累^[14]。黄胤怡等^[15]克隆得到查尔酮合成酶基因(CHS-A)的全长,此基因只是CHS基因家族的一员。CHS基因家族共有8-10个成员,其中只有CHS-A和CHS-J均在花组织里表达^[16-17],是类黄酮合成途径中的一个关键酶。这些功能基因的克隆为花色的改造研究奠定了基础。

3 花发育基因的研究

目前中国水仙仅有‘玉玲珑’、‘金盏银台’等少数几个品种,因此花型改造是育种工作的重要目标。

传统植物形态学的研究认为在进化上,花器官与叶属于同源器官。遗传学分析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。通过对模式植物拟南芥和金鱼草花同源异形突变体的分离和研究,克隆了一系列调控花发育的同源异形基因,为花型的改造奠定了基础。

Coen等^[18]构建了花器官发育过程ABC模型之后,Theissen等^[19]又构建了ABCDE模型。在ABCDE模型中,A类基因控制萼片和花瓣的发育,B类基因控制花瓣和雄蕊的发育,C类基因控制雄蕊和雌蕊的形成,D类基因控制胚珠的发育,E类基因则是与A、B、C三类共同对特定的花器官的发育进行调控。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^[20]。A、B、C这三类基因均包含由56-58个氨基酸残基组成的高度保守区,称之为MADS结构域,属于MADS-box基因家族,编码转录因子。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^[21]。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^[22]。

鞠玉栋等^[23]采用同源克隆的方法首次克隆了中国水仙花发育基因NMADS,同源性分析表明该基因可能是与拟南芥PI基因同源的B类功能基因,它参与花瓣和雄蕊的发育。Wang等^[24]和高志民等^[25]分别克隆NTAG和NMADS1两个中国水仙花发育基因,两个基因一致性高达99.1%,同属于C类功能基因。

现已经在中国水仙和其他植物上克隆出的大量与花发育有关的基因,如TEL、CEN、EMF、FCA、AP1、AP2和AG等基因,为花型改造提供了新途径,为进一步从花发育上解释水仙花的不育性奠定了理论基础。

4 中国水仙抗性方面的研究

抗性基因工程是植物基因工程的研究热点。中国水仙在栽培过程褐斑病和病毒病尤其严重,花期短,品质退化,抗性减弱。目前国内外对中国水仙抗病、抗衰老等基因的研究还不多。曾荣华^[26]开展中

国水仙转 IPT 基因的研究, 目的是延缓水仙花的衰老。Hunter 等^[27]以水仙花的一个栽培品种 (*Narcissus pseudonarcissus* 'Dutch Master') 为研究材料, 应用 PCR 技术研究衰老相关基因在水仙花中的表达。目前还没有报道获得具有抗性的转基因水仙。

5 中国水仙遗传转化的研究

中国水仙分子生物学研究的深入, 尤其是组培技术的应用, 为遗传转化奠定了理论基础。叶祖云^[28]及曾荣华等^[29]对农杆菌介导的中国水仙遗传转化体系进行了初步探索, 利用根癌农杆菌介导将 GUS^[30] 等外源基因导入中国水仙, 通过 GUS 基因的报告作用, 建立和优化水仙的遗传转化条件, 但并没有得到抗性植株。蔡文燕^[31]在根癌农杆菌介导人乳铁蛋白基因转化中国水仙的初步研究中, 以福建漳州水仙鳞茎盘为外植体, 对遗传转化的各个环节进行优化, 经卡那霉素筛选和 PCR 检测, 初步确定获得两株转基因植株。邹清成等^[32]构建了水仙花花色基因八氢番茄红素合成酶 (*Psy*) 的反义表达载体, 对中国水仙进行了遗传转化, 获得了抗性芽, 并进行了初步的分子验证, 对中国水仙的遗传转化和花色改良进行了有益的探索, 不仅有助于揭示中国水仙花色形成的分子生物学机理, 而且对中国水仙花色育种具有现实的应用价值。

6 中国水仙花基因调控和改善花观赏价值的策略

虽然中国水仙花香、花色和花型等基因的改造工程取得一定的突破, 但进展比较缓慢。现在运用比较多的基因调控的技术有以下几种: (1) 反义 RNA 技术利用反义基因转录产生的反义 RNA 来抑制目的性状基因的表达, 进而修饰目标性状的方法^[33]。目前水仙花花型控制基因 *Agamous* 已被克隆, 利用该技术将其它植物的花型控制基因 *Agamous* 构建成反义 RNA 表达质粒转化到水仙中, 控制水仙的 B 功能基因异位表达达到 III, IV 轮, 即可形成重瓣水仙。(2) 共抑制法是通过转入一个或者几个目的基因的额外拷贝来达到抑制内源基因转录的方法。随着水仙花中各种生物合成途径研究的深入, 会有更多的基因被克隆, 此方法的运用会成为可能。目前应用该技术已经在玫瑰、香石竹、矮牵牛和

菊花等花卉的花色修饰中取得成功。(3) 引入外源基因。在国际上, 第一个成功进行基因工程改变花色的试验就是应用转入外源结构基因的方法。将玉米 DFR 基因转入白花的矮牵牛 RCO1 突变体后, 得到了淡砖红色植株。向辣薄荷 (*Mentha piperita*) 中转入萜类代谢途径上游的 DXR 基因, 转化植株中挥发油的产量比野生型植株增加了 50%^[34]。(4) 引入外源转录因子也是基因调控的方法。目前在水仙花花香、花色和花型及抗性的改造上的运用还较少。

7 存在的问题及展望

目前利用基因工程手段来改善花的观赏价值是花卉基因工程研究的中心, 其它的工作仍处于起步阶段。目前存在的主要问题: (1) 中国水仙的挥发性物质的生物合成途径研究的还不够清楚, 在一定程度上限制了芳香基因的改良。(2) 现在芳香植物的研究主要集中在双子叶植物上, 对单子叶植物的研究还是比较少, 这样亲缘关系比较远, 采用同源性克隆方法对中国水仙的花香基因进行克隆在引物设计上有一定的难度。(3) 三类色素共同着色的机理以及调节因子对花色的影响等问题了解的较少, 因此花色形成的遗传规律的研究, 尤其是黄酮类与类胡萝卜素共同着色的遗传机理研究是目前基因工程育种工作中需要解决的问题。(4) 中国水仙遗传转化体系的建立以及水仙转基因已有研究报道, 但由于水仙是单子叶植物, 对农杆菌不甚敏感, 目前尚未建立成熟的遗传转化体系, 给验证中国水仙基因的功能带来了不便。在这方面还需进一步研究。

随着基因工程的不断发展和成熟, 中国水仙花香、花色、花型、抗性和遗传转化等方面的研究会更加深入。更多水仙花相关目的基因的克隆, 将有利于不同基因型水仙花丰富的基因资源进一步开发与利用。应用基因工程进行新品种的研发将是以后的研究方向, 为水仙花产业化发展开辟更为广阔的途径。

参考文献

- [1] 黄巧巧, 冯建越. 水仙花开放期间香气组分变化的研究. 分析测试学报, 2004, 23(5): 110-113
- [2] Antoni S, Danuta P. *Narcissus* in perfumer and cosmetics. J Dug Cosmet Ind 1983, 133 (1): 34-38, 77-78.

- [3] 戴亮, 杨兰苹. 漳州水仙花头香的化学成分分析. 色谱, 1992, 10(5): 280-284.
- [4] Dudareva N, Pichersky E. Biochemistry and molecular aspects of floral scent. *Plant Physiol* 2000(122): 627-634.
- [5] Ross JR, Nan KH, D'Auria JC, Pichersky E. S-Adenosyl-L-methionine salicylic acid carboxylmethyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Arch Biochem Biophys* 1999, 367(1): 9-16.
- [6] Dudareva N, D'Auria J, Nan KH, Raguso RA, Pichersky E. Acetyl CoA: benzyl alcohol acetyltransferase—an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J* 1998, 14(3): 297-304.
- [7] Schledz M, al-Babili S, von Liting J et al. Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in thymoplasts and induction during flowering. *Plant J* 1996, 10: 781-792.
- [8] 江琳玉. 中国水仙花色相关基因 ZDS, LYCE 的克隆[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [9] Bartley GE, Ishida BK. Zeta-carotene desaturase from tomato. *Plant Physiol* 1999, 121(4): 1383.
- [10] Albrecht M, Klein A, Hugueney P, et al. Molecular cloning and functional expression in *E. coli* of a novel plant enzyme mediating zeta-carotene desaturation. *FEBS Lett* 1995, 372(2-3): 199-202.
- [11] 陈选阳, 林世强, 袁照年, 等. 甘薯 ZDS 基因的克隆与植物表达载体构建. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005(34): 473-477.
- [12] 季静, 山村三郎, 西源昌宏, 等. 通过转基因提高 β -胡萝卜素生物合成量. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(8): 440-444.
- [13] 陈段芬, 彭镇华, 高志民. 中国水仙八氢番茄红素脱氢酶基因(PDS)的克隆及表达分析. 分子植物育种, 2008, 6(3): 574-578.
- [14] Kato M, Komai Y, Matsumoto H, et al. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol* 2004, 134(2): 824-830.
- [15] 黄胤怡, 沈明山, 陈亮, 李鹏, 陈睦传. 中国水仙查尔酮合酶 CDNA 的克隆及序列分析 (简报). 实验生物学报, 2002, 35(3): 195-197.
- [16] Koes RE, Spelt CE, Mol JNM. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*: differential light induced expression during flower development and UV light induction. *Plant Mol Biol* 1989, 12: 213-257.
- [17] Koes RE, Spelt CE, van den Elzen C. Isolation and characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene* 1989, 81: 245-257.
- [18] Coen ES, Meyerowitz EM. The war of the whorls: genetic interaction controlling flower development. *Nature* 1991, 353: 31-37.
- [19] Theissen G, Becker A, Riera-Rosa A, et al. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 2000, 42(1): 115-149.
- [20] Hajime S, Leonard JM, Elliott MM. Role of superman in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature* 1995, 378(2): 199-203.
- [21] 刘良武, 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.
- [22] Muster T, Pahnke J, Dirr, et al. Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of fern and seed plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 2415-2420.
- [23] 鞠玉栋, 郑回勇, 吴维坚, 等. 中国水仙 MADS-box 基因克隆及其序列分析. 安徽农学通报, 2008, 14(21): 47-48.
- [24] Wang ZK, Gao J, Li LB, et al. Isolation and characterization of the AGAMOUS homologous gene NTAG in Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem.). *Forestry Studies in China* 2006, 8(1): 21-26.
- [25] 高志民, 陈段芬, 李雪平, 等. 一个中国水仙 MADS-box 基因的克隆与分析. 园艺学报, 2008, 35(2): 295-300.
- [26] 曾荣华. 中国水仙转 IPT 基因的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2001.
- [27] Hunter DA, et al. Identification of genes associated with perianth senescence in Daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* L. 'Dutch Master'). *Plant Science* 2002, 163(1): 13-21.
- [28] 叶祖云, 郑丽屏, 贺静, 张云孙. 中国水仙 (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) 基因转化受体系统的建立. 云南大学学报, 2001, 23(3): 235-237.
- [29] 曹荣华, 陈亮, 沈明山, 等. 农杆菌介导的中国水仙遗传转化体系的建立. 厦门大学学报, 2001, 40(5): 1145-1150.
- [30] Mascareñas JP, Hamilton DA. Artifacts in the localization of GUS activity in anthers of petunia transformed with a CaMV 35S-GUS construct. *Plant J* 1992, 2: 405-408.
- [31] 蔡文燕. 根癌农杆菌介导人乳铁蛋白基因转化中国水仙的初步研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2005.
- [32] 邹清成, 庄晓英, 卢钢, 江鸿飞. 反义 PSY 基因植物表达载体的构建及其对中国水仙的转化. 浙江林业科技, 2006, 26(3): 25-30.
- [33] Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, et al. A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 1987, 330: 677-678.
- [34] Wang C, Xing J, Chin CK, et al. Modification of fatty acid changes the flavor volatiles in tomato leaves. *Phytochemistry* 2001(58): 227-232.