

【生物技术】

## 观赏植物花色基因转化的研究进展

徐纪尊<sup>1</sup>, 王丽辉<sup>2</sup>, 潘庆玉<sup>3</sup>

(1. 山东省东营职业学院, 东营 257091; 2. 内蒙古农业大学生物工程学院, 呼和浩特 010018;

3. 山东烟台福山高级职业学校, 烟台 265500)

**摘要:**从花的成色作用和花色素种类入手,介绍了主要色素类黄酮色素、胡萝卜素的生物合成,并从花色基因的种类、花色基因转化的方法等角度出发,综述了近年来观赏植物花色转化的研究进展,同时对我国观赏植物花色基因转化和基因工程的前景作了展望。

**关键词:**观赏植物;基因转化;花色;花色苷

中图分类号:Q343.1+5 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2006)05-0056-05

## Advances in the Transformation of Flower Color Gene in Ornamental Plant

XU Ji-zun<sup>1</sup>, WANG Li-hui<sup>2</sup>

(1. Dongying Vocational College, Dongying 257091, China; 2. Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

3. Yantai Fusshan Senior Vocational school, Yantai 265500, China)

**Abstract:** Starting with formative principles of flower color and kinds of pigmentation, this paper presented biosynthetic pathways of flavonoid and carotenoid and summarized the advance of flower color transformation from kinds of flower color genes and their ways of transformation in ornamental plants. At the same time, the author elucidated perspectives of the genetic transformation of flower color and genetic engineering in China.

**Key words:** ornamental plant; gene transformation; flower color expression; anthocyanin

花色是观赏植物重要的农艺性状之一。花色的优劣直接关系到观赏植物的观赏价值和商业价值。传统的育种方法不但育种周期长、效率低、而且很难在花色上得到新的突破;分子育种可以克服上述缺点。在分子遗传的基础上,通过基因转化,可定向修饰观赏植物的特定性状而不表失原有的其他性状,进而改变观赏植物的花色,甚至创造该物种所不具有的花色,实现在较短的时间内培育出稳定遗传的新品种、新类型<sup>[1]</sup>。

### 1 花色形成的机理

#### 1.1 花的成色原理

观赏植物的花色是光线照射到花瓣上穿透色

素层时,部分被吸收,部分被海绵组织反射折回,再度通过色素层而进入我们眼帘所产生的色彩,它与花瓣细胞中的色素种类、色素含量(包括多种色素的相对含量)、花瓣内部或表面构造引起的物理性状等多种因素有关,但花色素起主要作用。与花成色有关的色素包括叶绿素、类胡萝卜素、类黄酮、水溶性生物碱及其衍生物四大类群<sup>[2]</sup>,这些色素通常是小于300 u的次生物质,是决定观赏植物花色的主要色素<sup>[3]</sup>。植物的花色有时不仅由一种花色素所决定,而往往有多个色素共同参与,如郁金香的黄色就是由花青素和类胡萝卜素组合而成,有时甚至还受助色素及液泡液 pH 值的影响。

#### 1.2 花色素的生物合成途径

目前,了解得比较清楚的是类黄酮和类胡萝卜

素二者的生物合成途径,至于生物碱类色素的生物合成则研究的相对比较少<sup>[4]</sup>。通过大量生化实验手段,目前人们已将花色素苷的合成代谢途径研究得较为深入。

花色素苷(anthocyanins)是类黄酮中一类主要色素,控制着花的粉红色、红色、砖红色、蓝色、紫色等花色,植物中基本的花色素苷有3种,即花葵素、花青素、花翠素,以及这些色素的甲基化衍生物等。花色素苷合成的前体为丙二酰 CoA 和香豆酰 CoA (p-coum atoyl-CoA)。由查尔酮合酶(chalconesynthase, CHS)催化二者形成黄色的查尔酮(chalcone)。查尔酮异构化形成无色的黄烷酮(flavanone)。此步骤可缓慢自发进行,但在查尔酮-黄烷酮(chalcone-flavanone)异构酶(CHI)催化下可加速完成。在黄烷酮羟基化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)的催化下,黄烷酮在 C<sub>3</sub> 位置羟基化形成无色的二羟黄酮醇(dihydroflavonol)。进一步还原成无色花色素,由二羟黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)催化完成。无色花色素转变成有色的花色素 anthocyanidin,然后糖基化形成花色素普苷(anthocyanin),由 UDP-葡萄糖类黄酮-3-氧-葡萄糖转移酶(UDP-glucoseflavonoid 3-oxy-g lucosyltransferase, UFGT)催化完成。控制花色的代谢途径是非常复杂的,在确定色素合成途径中各个环节关键酶的编码基因后,才能通过对这些

### 1.3 花色基因

花色基因包括花色素基因、花色素量基因,花色素分布基因、辅助色素基因、转座子基因、控制花瓣内部酸度的基因等。Forkmann 将这些花色基因分为以下几类<sup>[6]</sup>:①控制类黄酮生物合成单个步骤的基因;②与类黄酮修饰有关的基因;③开关全部或部分合成途径的调节基因;④影响类黄酮浓度的基因;⑤与花朵结构有关的基因;⑥影响花色的基因或因子;⑦控制花瓣毛、乳突、色素细胞的形状和分布、角质层类型等形态特征的基因。

目前研究和应用最多的是花色素苷的相关基因,影响花色素苷代谢的基因分为结构基因和调节基因。结构基因即是直接编码生物合成酶的基因,调节基因则是控制结构基因表达强度和程式的基因。第一例分离得到的类黄酮生物合成基因 CHS 是在 1983 年采用鉴别筛选与杂交筛选相结合的方法从欧芹中获得的,其后又以欧芹 CHS 基因为探

针分离出矮牵牛 CHS 基因。1987 年 *chi* 基因由法国豌豆中利用抗体技术分离出来,同理采用抗血清方法分离出矮牵牛 CHS 基因。1991 年先后从金鱼草和矮牵牛中分离得到 *βh* 基因,后以矮牵牛 *βh* 基因为探针从香石竹、翠菊以及紫罗兰中分别获得该种植物的 *βh* 基因。除此以外,又有大批花色素苷合成基因得到分离,它们包括 *β'5'h* 基因、*dfr* 基因、ANS 基因及 3GT 基因等,这些基因大多是从矮牵牛、玉米、金鱼草中分离得到的。与此同时,利用转座子标签技术以已有的基因为探针也获得了许多花色素苷调节基因,如从玉米中获得的 *r*、*s*、*sn*、*lc*、*b*、*ci*、*pl*、*vpl* 基因等,此外还有从金鱼草中获得的 *del*、*def* 基因,从矮牵牛中克隆的 *an2*、*an4* 基因,百日草中的 *ted3* 基因及龙胆中获得的 *uchsi* 基因等。随着克隆得到的花色素苷相关基因的增多,人们可供利用以进行花色基因工程的候选基因也更加丰富,实现花色遗传操作可能性也在增大。

花瓣表皮细胞液胞 pH 值发生变化,常引起花色的改变,通常随着 pH 值上升,颜色逐渐由红变蓝<sup>[18]</sup>。1993 年 Chuck 等<sup>[8]</sup>报道了从矮牵牛中分离到一个能调控花卉 pH 值的基因(pH6),通过突变使该基因失活,能使花瓣细胞提取物的 pH 值增加到 6.4 左右。花色素苷调节基因 *an1*、*an2*、*an11* 也影响花瓣汁液的 pH 值,突变体的细胞内 pH 值也发生了变化<sup>[9]</sup>。

## 2 花色基因转化的方法和应用

### 2.1 花色基因的克隆

花色基因转化的第一步是花色苷生物合成途径结构基因的克隆。目前,利用转座子标签、PCR、蛋白质纯化与差异筛选等方法,已分离、克隆了多种花色苷结构基因(表 1),矮牵牛编码 *β'5'h* 的基因 *hf1*、*hf2* 的表达均能使花色苷生物合成途径趋向于产生蓝色的花翠素-3-葡萄糖苷,从而使花趋于显蓝色。澳大利亚 Florigene 公司和日本 Sandory 公司的研究人员将矮牵牛 *β'5'h* 和 DFR 基因导入人缺乏 DFR 的白色香石竹,培育出紫色品种'Moon-dust',现已在 2 个国家销售,成为第一例上市的转基因花卉作物。

### 2.2 反义 RNA 法

又称反义抑制法(Antisense suppression)该法首先明确决定花色的特异生物物质,然后分析该生

表 1 部分已克隆的花色基因

Table 1 Some cloned genes related to flower color

类型 Type	基因名称 Name of gene	功能 Function	来源 Source
结构基因 Structural gene	CHS	编码 CHS	翠菊、非洲菊、拟南芥、紫罗兰、香石竹
	CHI	编码 CHI	法国碗豆、矮牵牛、翠菊
	<i>βh</i>	编码 <i>βh</i>	金鱼草、矮牵牛、香石竹、紫罗兰、翠菊
	<i>hf1</i> 、 <i>hf2</i>	编码 <i>β<sup>5h</sup></i>	矮牵牛、茄子、龙胆、草原龙胆
	DFR	编码 DFR	玉米、金鱼草、矮牵牛、拟南芥、水稻、西红柿、玫瑰、三叶草、紫苏、紫苑、紫色甘薯、草莓、连翘、翠菊
调节基因 Regulatory gene	ANS	编码 ANS	玉米、金鱼草、矮牵牛、翠菊
	3GT	编码 3GT	玉米、金鱼草
	<i>r</i>	调控 3-羟基花色苷的合成,与糊粉层色素沉积有关	玉米
	<i>sn</i> 、 <i>lc</i>	编码 bHLH 转录激活子,调控叶缘、叶片、中胚轴的色素合成	玉米
	<i>delila</i>	调节红色花色苷生物合成基因的表达	金鱼草
	<i>b</i>	调控 3-羟基花色苷的合成,与成熟植物叶鞘、苞叶的广谱颜色有关	玉米
	<i>cl</i> 、 <i>pi</i>	调控 3-羟基花色苷的合成,与光调控花色苷合成有关	玉米
	<i>p</i>	调控 3-脱氧花色苷的生物合成途径较普遍的调节作用	玉米
	<i>vp1</i>	较普通的调节作用	玉米
	<i>an1</i>	编码激活 DFR 基因和 <i>pmyb27</i> 蛋白基因表达的转录因子	矮牵牛
	<i>an2</i>	编码 MYB 区的转录激活子	矮牵牛
	<i>an4</i>	编码一种与 AN2 近源的 MYB 蛋白	矮牵牛
	<i>an11</i>	编码与结构基因转录有关的 WD40 蛋白	矮牵牛
	<i>an9</i>	编码谷胱甘肽-S-转移酶和类黄酮载体蛋白,与花色苷整合作用和运输有关	矮牵牛
	其他基因 Other related gene	<i>3at</i>	编码花青素-3-葡萄糖苷-6-酰基转移酶,与花色苷的结构修饰有关
<i>fl</i>		编码辅助色素黄酮醇合酶	矮牵牛
<i>ph1</i> ~6		控制花瓣细胞液 pH 值	矮牵牛
<i>mixta</i>		控制花瓣表皮细胞形状	金鱼草

化物质代谢途径中催化各反应步骤的酶,克隆编码这些酶的基因,反向转入到目的植株中,外源 DNA 转录产物与内源的互补 mRNA 结合,从而抑制目的植株中这些生化物质的合成,产生花色突变。利用该技术已在矮牵牛、菊花等几种观赏植物中进行了成功的花色修饰。Van-der Krol 等首次将反义 *chs* 基因导入矮牵牛中,可抑制花色苷的形成,引起花色改变。反义 CHS 基因导入非洲菊,导致花瓣着色异常。Gutterson 等通过根瘤农杆菌介导转化法,将一个从菊花中分离到的 CHS 基因,以反义和

正义方向分别导入开粉红色花的菊花中,获得开浅红色和白色花的转基因植株,对照组没有白色花,进一步研究表明,转基因植株的开白花性状通过营养繁殖绝大多数能稳定遗传。Aida 等 2000 年用相同的方法将 CHS 或 DFR 基因导入蓝猪耳 (*Torenia hybrida*),结果反义方向导入的转化株花色均一变亮,而正义方向导入的转化株花色不均一变亮。目前反义 RNA 技术的机理尚未明了,可能是作用于基因的转录、翻译水平。使观赏植物花色基因改变所采用的方法和技术主要是反义 RNA 技

术,此外,也有采用共抑制法和导入受体植物中原来没有的目的基因等方法。

### 2.3 共抑制

又称有义抑制法,即正向导入一个(或几个)内源基因的额外拷贝,反而抑制该内源基因转录产物 mRNA 的积累,进而抑制该内源基因的表达。该技术在矮牵牛<sup>[8]</sup>、菊花、懒猪耳等花卉的花色修饰方面取得成功。共抑制与反义 RNA 的作用机制可能有些共同之处,即都存在基因互作效应。

### 2.4 新目的基因导入法

即将欲修饰的受体植株中原来没有的基因导入其中,从而使该受体植株增加新的性状。世界上第一例基因工程改变矮牵牛的试验是: Meyer 等<sup>[10]</sup>将玉米 DFR 基因导入矮牵牛 RI01 变体后,使二氢黄酮醇还原花葵素,转化后的矮牵牛花色由白色转为砖红色。荷兰 S&G 种子公司将玉米的 DFR 基因导入矮牵牛之后,将转基因植株自交,培育出了橙色矮牵牛<sup>[11]</sup>。蔷薇缺乏编码合成蓝色色素——花翠素的关键酶  $\beta^5h$  的基因,1992 年,澳大利亚 Calgene Pacific 公司与日本 Sundoiy 公司合作向蔷薇中导入该基因获得成功。

### 2.5 导入调节基因

当植物体内含有结构基因,但由于没有组织特异性或缺乏调节基因表达产物的激活而不能表达,可通过导入调节基因改变花色。Lloyd 等<sup>[12]</sup>将玉米的调节基因 *r* 和 *c* 导入拟南芥和烟草,2 种植物转化的花色由白色变为不同深浅的粉红色,证明调节基因也可以改变花色。Kuattrocchio 等<sup>[13]</sup>将花色素苷代谢的调节基因导入矮牵牛,得到红色愈伤组织和粉红色花冠。

### 2.6 辅助基因、多基因导入

与花成色作用有关的辅助基因有:pH 基因、辅助色素基因、细胞性状基因等,也可导入进行基因特化,另外也可以同时导入与某种花色有关的多种基因:包满珠<sup>[14]</sup>将 *ci* 和 *lc* 基因转入矮牵牛之后,部分转基因植株的花冠筒由白色变为粉红色。多基因同时导入对培育蓝色月季具有重要价值,因为蓝色月季必须具备 3 个条件:花翠素、辅助色素黄酮醇、较高的 pH 值,目前 Sun tory 公司和 Calgene Pacific 公司等正在进行这项工作。

### 2.7 核酶抑制

核酶(ribozym)是具有酶活性的 RNA 分子,能够特异性地切断 mRNA,从而阻止其蛋白质的合成。该技术可以特异性的抑制类黄酮或类胡萝卜素等生物合成基因的表达,从而改变花卉的颜色。

## 3 问题及展望

近 10 多年来,花卉基因工程的发展正日益加快,花卉业发展水平高的国家早已意识到要占领国际市场就必须不断地培育出更新颖、更美丽的花卉品种,观赏植物的基因工程为此带来希望和契机。发达国家已在观赏植物的花色基因工程上开展了大量的基础应用研究,并取得了有效的成绩,具备明显的竞争优势。

我国在观赏植物基因工程上也开展了一些工作,在金鱼草、丝石竹、矮牵牛、蝴蝶兰、二月兰等花卉上均进行了有益的探索,尤其在花色基因工程上也取得了一定的进展。我们应抓住基因工程带来的发展机遇,充分利用我国植物种质资源丰富的优势和该领域基础研究的优势(如观赏植物组织培养、植物转化技术等),结合我国花卉育种现状,集中力量在小范围内进行,从基础工作做起(如建立转化受体系统、摸索转化方法、研究基因对性状的控制、分离结构基因),另外,通过基因工程,已经获得大量的转基因花卉,由于外源基因的插入是随机的,往往存在着不稳定表达的问题,而这方面的研究目前甚少,今后应该加强这方面的研究。逐步开展本国的观赏植物花色及其他各种性状的基因转化、基因工程的研究,发展和振兴我国花卉业。

### 参 考 文 献

- [1] 杨静慧,张伟亚,郭秀民,等.观赏植物的花色基因工程育种[J].天津农林科技,2002,169:14~16
- [2] 赵云鹏,陈发棣,郭维明.观赏花卉花色基因工程研究进展[J].植物学通报,2003,20(1):51~58
- [3] 刘志祥,洪亚辉,莫爱华,等.观赏植物花色分子遗传学及其基因工程进展[J].湖南农业大学学报,2002,28(6):531~534
- [4] 李晓东.观赏植物花色期基因工程研究进展[J].花色,2003(2):19~28
- [5] 刘石全,余庆波,李晓军,等.观赏植物花色基因工程的研究进展[J].贵州林业科技,2004,32(2):13~18
- [6] Forkmann G, Flavonoids as flower Pigment the information of nature spectrum and its extension by genetic engineering[J]. Plant Breeding, 1991, 106(1):90~96
- [7] Ho/tom T A, Cornish E C, Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7:1071~1083
- [8] Chuck G, Robbins T, Nijjar C, et al. Tagging and Cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element activator [J], The Plant Cell, 1993, 5: 371~378
- [9] Mol J N M, Holtom T A, Koes R E. Genetic engineering of commercial traits of floral crops [J]. Trend biotechnology, 1995, 13:350~355

- [10] Meyer P, Heidmann I, Forkmann G. A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with maize gene [J]. *Nature*, 1990, 330(6149): 677 ~ 678
- [11] Mol J N M, Holtom T A, Koes R E. Genetic engineering of commercial traits of floral crops [J]. *Trend biotechnology*, 1995, 13: 350 ~ 355
- [12] Floyd A M, Walbot V, Davis R W, Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production cultivated by maize regulators R and Cl [J]. *Science*, 1992, 258: 1773 ~ 1775
- [13] Quattrocchio F, Wang J F, Leonpon H T C et al. Regulatory gene controlling anthocyanin pigmentation are functional conserved among plant species and have distinct sets of target gene [J]. *Plant cell*, 1993, 5: 1497 ~ 1512
- [14] 包满珠, 植物花青素基因的克隆和应用 [J]. *园艺学报*, 1997, 24(5): 279 ~ 284

(责任编辑 王燕华)

## 生物技术与转基因动植物(一)

**植物生物技术** 2003年2月,美国科学家培育出一种呈现奇异紫色的新型基因番茄,兼具预防癌症和心肌梗塞功能。美国农业研究局(ARS)培育出一种新的小粒谷子品种,这种谷子富含蛋白质和钙,可在炎热、干旱地区生长。4月,美国国家植物园培育成功一种命名为 Betsy Ross 的紫丁香新品种,该品种具有耐寒性和抗白粉病,可在热带、温带、寒带地区旺盛生长。5月,美国科学家发现控制花瓣产生的基因,命名为 *Ultrapetala*。这项研究有助于产生不同寻常的新花卉, *Ultrapetala* 也可用于玉米、大豆等作物。6月,美国加州大学首次分离并克隆出一个能控制小麦开花的基因——VRN1,有望用于更有效地调节小麦花期和开发更高产的农作物品种。美国科学家完成国际水稻基因组计划第十染色体精确序列图的绘制工作,从这条由2 200万个碱基对组成的染色体上,共识别出3 471个基因,比此前根据水稻基因组草图估算出的基因数约多1 700个。美国科学家从一种与卷心菜有亲缘关系的植物中提取出抗盐基因,并导入西红柿中,培育出一种口味与普通西红柿相同、能在含盐量为正常情况50倍的土壤中生长的转基因西红柿。11月,美国科内尔大学研究人员成功培育出一种新型转基因水稻,能比普通水稻更有效抵御干旱、多盐和寒冷,且优异特性至少可以维持5代。美国科学家还培育出2个小麦耐盐新品系,即 W4909 和 W4910,可造福于富盐的野地生态系统,也可用于恢复牧场、路边、过火场地或易侵蚀斜坡的植被。10月,美德科学家发现一种名叫微甘酸(miRNAs)的基因。该基因能够调控植株叶子的形态,对植物吸收更多的太阳光能和结出更多的果实具有重要意义。

2003年,英国环境部公布了一份迄今规模最大、内容最详尽的转基因作物研究报告——《耕种评估报告》。此项“耕种评估”的研究始于1999年,耗资550万英镑。对英格兰和苏格兰的数百块农田进行了4 000次考察,采集了50万粒草子,收集了150万个无脊椎动物,旨在证实生物技术界认为转基因作物和传统作物对生态影响无差别的“零假设”。该《报告》认为,德国拜耳公司培育的代号为“沙尔东LL号”的具有抗除草剂能力的转基因玉米比传统玉米更有利于环境。3月9日,英国政府正式批准在国内大面积种植转基因农作物,但规定了苛刻的限制条件。

2003年4月,澳大利亚基因技术管理办公室批准棉花种植者从下一季开始种植新品种的转基因棉花。初期,将在新南威尔士和昆士兰州限种5 000 hm<sup>2</sup>,但南纬22°以上的地区暂时不会批准进行转基因棉花的商业化种植。

2003年,俄罗斯科学家在实验室中利用禾本植物细胞工程技术方法,培育出了能够在炎热干旱、水涝和盐碱化等极端生态条件下生存的小麦、玉米等植物。科学家还发现,菊花生长基因有助于培育转基因菊科植物。

2003年初,日本农业生物资源研究所培育出了一种能降血压、降血脂、降胆固醇的水稻新品种。这种水稻是利用DNA重组技术,把能抑制胆固醇的大豆球蛋白基因与能产生卵分裂素成分的基因结合而移植到稻株内形成的。食用这种稻米后,大豆球蛋白和卵分裂素在人体内互相分离,从而抑制人体内的胆固醇和高血压及血液中的大分子脂肪。7月,日本东京大学利用转基因技术抑制茎部赤霉素发挥作用,培育出一种抗伏的矮秆水稻品种,株高比普通水稻低10%~20%,但分蘖不受影响。这种技术可广泛运用于小麦、玉米等作物以及蔬菜和开花观赏植物。同月,日本农业生物资源研究所等机构完成了对水稻中3.2万个基因的碱基对序列分析。查明这些基因碱基对序列将对研究水稻蛋白质的功能、开发抗病能力强的水稻新品种大有帮助。10月,日本产业技术综合研究所开发出能把激活型转录因子转变为抑制型转录因子的植物基因新技术,对改良农作物品种大有帮助;日本东京大学利用一种细菌作为中介体,把大豆基因注入水稻的DNA中,培育出含铁量很高的水稻亲品种。

2003年,韩国庆尚大学的研究人员探明了植物体内NPK遗传因子对环境刺激加以传递的机理,进而成功培育出一种能够耐受干旱、霜冻、盐碱地等多种极其恶劣环境的“极限植物”。这项技术可很快用来改造所有植物,特别是粮食作物。

2003年12月18日,国际水稻基因组测序工程结束纪念仪式在东京举行。这次国际水稻测序计划始于1998年,由中国、日本、美国等10个国家和地区参加,测序对象为日本粳米,解析完毕92%的碱基对。解析结果表明,粳米有4亿碱基对,基因为4万~6万个。

摘自《中国农村科技发展报告2004》第16页