

矮牵牛花色遗传研究进展

杨慧 (哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江哈尔滨 150025)

摘要 经过对植物花色在生物化学和遗传学 2 个方面近 1 个世纪的研究以及遗传学的不断发展, 证实矮牵牛也许可以为花色分析提供最好的遗传体系, 连同基因工程学的应用, 可以对许多影响花色改变的基因进行分离和分子特性分析。该研究主要讨论了影响矮牵牛花色的因素、矮牵牛花色的遗传调控、矮牵牛花色的改良方法以及应用前景。

关键词 矮牵牛; 花色素; 遗传调控

中图分类号 S681.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)27-10907-02

Research Advance of *Petunia hybrida* Flower Color Genetic

YANG Hui (School of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract Nearly a century research about flower color in both biochemistry and genetics, as well as the continuous development of genetics, confirmed the petunia could provide a best genetic analysis systems, together with application of genetic engineering, have allowed for the isolation and characterization of a large number of genes affecting flower color. The factors affecting petunia color, genetic regulation of petunia color, improvement method and application prospect of petunia color were discussed.

Key words *Petunia hybrida*; Flower pigment; Genetic regulation

矮牵牛植物的研究历史与植物的花色研究是紧密相连的。阿姆斯特丹自由大学收集矮牵牛花属植物的突变异种长达 25 年之久。大多数的突变异种包括花朵颜色的改变, 带来了令人印象深刻的花朵颜色和样式。1980 年, 在阿姆斯特丹自由大学和法国农业科学研究院, 一些主要影响花颜色的突变异种被识别。

1 影响矮牵牛花色的因素

通常, 将花色理解为花朵中颜色最鲜明和鲜艳的花瓣部分。花朵颜色成分中物质分为 2 种, 一种是水溶性的, 另一种是非水溶性的^[1]。水溶性的包括蓝、紫、红等色素物质, 且大多数是溶解在细胞液中的花色素类或 β -花青苷类的物质。非水溶性的包括黄、橙等色素物质。植物之所以会呈现出这种颜色, 是由于在有色体中含有类胡萝卜素类。花色的不同主要是受到 3 类物质的影响, 因此相比于其他性状来说花色是一个较复杂的性状。这 3 类色素物质分别是生物碱、类黄酮、类胡萝卜素^[2]。生物碱类色素家族的成员包含小檗碱、罂粟碱、甜菜碱。在石竹属植物中普遍存在的是甜菜碱。它是酪氨酸衍生出来的氮化合物, 颜色由黄色渐变为红色。使罂粟属和绿绒蒿属的植物呈现黄色的色素物质是罂粟碱。促使小檗属植物呈现深紫色的原因是其植株内含有小檗碱^[3]。液泡中广泛存在的色素物质是类黄酮。类黄酮可以分为花青素、异黄酮和黄烷醇。花中大部分的红、蓝、紫和红紫等颜色种类是由于花青素的存在^[4]。质体中广泛存在的是类胡萝卜素。花的橙色和黄色等颜色种类是由类胡萝卜素控制的。

植物体内有七大类基因控制着花的颜色。这些基因相互协同来控制花的颜色。这些基因包括控制色素深浅的基因、调节花朵结构相关基因、花色控制基因、花色细胞形成、分布调控基因、结构基因、修饰基因、调节基因^[5]。这些基因

的功能不同, 如花朵常常有褶皱存在, 这些褶皱会与花瓣部分产生颜色深浅相间的不同颜色区域。这有可能与控制色素深浅以及调节花朵结构和花色细胞形成和分布调控的相关基因有关。绿化观赏植物矮牵牛中已分离、克隆出一些调控基因。研究表明, 它们对花色素苷生物合成途径中早期调控的作用十分微弱, 但是在后期阶段起主要的调控作用。这些调控基因间接影响花色的改变^[6]。

花瓣细胞浆中 pH 浓度也会影响花色的变化。研究人员从矮牵牛中分离出 6 个调控 pH 的相关基因。这些基因相互协调, 控制了矮牵牛胞液中的 pH, 从而控制矮牵牛的花色变化^[7]。当细胞液的 pH 较低时, 花朵的颜色会趋向于显现为红色; 当 pH 越接近或大于 7 时, 花瓣会呈现出蓝色。

2 矮牵牛花色的遗传调控

影响花色的代谢途径是一个复杂的过程, 需要多种关键基因编码的关键酶的参与。研究表明, 对花色素苷的生物合成途径研究得较清楚。通过大量生化研究可以得出, 花色素的生物合成是一系列的结构基因起主要调控作用。这些结构基因编码了一系列的关键酶, 其中一个结构基因的改变, 会导致关键酶的作用发生改变, 调控作用随之改变, 导致花色的改变^[8]。目前, 花色素合成途径中编码关键酶的基因已在多种植物中克隆出来。植物基因组是不断进化的, 在进化的过程中会存在一些不确定的因素, 例如基因的重复事件会导致植物基因组中的大多数基因是多拷贝的, 不同的拷贝会影响器官的特异性表达, 在表达时间等方面也会有明显的分化现象。

研究表明, 矮牵牛基因组中存在查尔酮合酶(CHS)基因。CHS 是黄酮类合成途径中的关键酶。在矮牵牛的基因组中有 12 个 CHS 基因的家庭成员^[9]。这些 CHS 基因的家庭成员并不是全部都参与查尔酮的生物合成途径, 只有部分家族基因参与查尔酮的生物合成反应。不同家族基因的催化底物不尽相同, 催化所得到的产物功能尚不明确, 少数几个 CHS 家族基因因缺少起始密码子而被称为假基因, 因此基

因功能尚未确定。当基因复制后,不同拷贝的基因功能便开始分化。所以,关键酶基因在不同植物基因组中的变化是很丰富的。

除了结构基因自身突变之外,许多花色变化是由转座子插入引起的。结构基因在表达过程中会受到一系列连续的调控,最为普遍的调控现象是转录、翻译后的加工、上位互作以及顺式调控结合序列等。研究表明,表型变化与分子进化速率相关性一般不强。因此,与适应性相关的表型变化可能更多归因于调控基因变化而非结构基因变化^[10]。对矮牵牛花色表达调控的研究表明,类黄酮代谢途径的调控大部分发生在转录水平上,至少有 3 类转录因子参与花青素的表达调控,这些转录因子间通过协同与互作来控制类黄酮代谢途径中结构基因的时空表达^[11]。

3 利用基因工程方法改变矮牵牛花色的策略

矮牵牛的再生体系容易建立,并且它的遗传器官较大,易于操作,因此矮牵牛常被作为研究花色变化以及改造花色的模式植物。国际上第一例应用基因工程改变花色的试验采用外源基因导入法^[12]。有研究使得原本开白花的矮牵牛变成了开砖红色花的矮牵牛,将玉米中编码二氢栎皮黄酮-4-还原酶的 A1 基因导入目的矮牵牛植株内。这种目的受体矮牵牛为 RLO1 突变体。导入的玉米 A1 基因可以将矮牵牛植株中二氢槲皮醇被还原为花色素,最终使矮牵牛的花色发生改变。其他的改变花色的生物工程方法包括以下几种。

3.1 反义抑制法 这种方法与花色的特异性息息相关,又称为反义 RNA 技术。研究表明,花色具有特异性,这种特异性是由植物体内特异的生化物质所决定的。首先,要了解这种特异的生化物质代谢途径中催化各个反应步骤所需的酶以及编码这些关键酶的关键基因,进而克隆这些关键基因,将其反向转入受体植株体内,后转入受体植株体内的外源 DNA 的转录产物会与受体植株体内的内源互补的 mRNA 结合后抑制决定花色特异性的特异生化物质的合成,导致花色的改变。利用这项技术,已成功修饰矮牵牛、菊花等观赏性植物花朵的颜色。Van der krol 等^[13]利用反义 RNA 技术将内源基因反向拷贝插入矮牵牛中,证实编码类黄酮、查尔酮生物合成的合成酶基因。插入基因的表达形成一条 mRNA 互补或反义 mRNA 链,与有义链形成双螺旋,但双螺旋不稳定,又不能有效翻译,加之 CHS 酶底物无色和酶活性的降低使得矮牵牛花表现为无色或纯白色。研究表明,矮牵牛 CHS 反义基因在茄科其他植物如烟草、马铃薯中同样有效。

3.2 共抑制法 通过导入一个或多个目的植株体外的外源基因。这些外源基因与受体植物基因组重新整合。这些外源基因的作用在于抑制植株自身内源基因的表达,影响某些代谢途径的反映过程,使得代谢产物发生改变,从而影响花色,也将这种方法称为有义抑制(Sense suppression)。以观赏植物矮牵牛为例,研究人员将外源的 CHS 基因多拷贝导入矮牵牛受体,导入后外源基因与基因组的整合使得植物体内内源 CHS 基因不能表达或表达不彻底,使得 CHS 合成反应过

程发生变化,导致产生多种多样的代谢产物,最终花的颜色丰富起来,证明外源基因抑制自身基因的正常表达。该技术在矮牵牛^[14]、菊花、玫瑰、康乃馨等花卉花色修饰方面取得成功。

3.3 新目的基因导入法 将受体植物自身没有的外源基因导入到目的植株中,外源基因经整合表达出不同于自身的新的性状特点。这种方法是最接近定向改变花色的方法之一。运用这种方法,荷兰的 S&G 种子已经培育出花朵颜色为橙色的矮牵牛植株^[15]。研究人员将来自玉米中的外源 DFR 基因导入矮牵牛受体植株内,通过转基因植株自交系,得到花朵颜色为橙色的矮牵牛品种。

3.4 导入调节基因 植物体内含有的结构基因有时不能够很好地表达。这可能是由 2 种原因导致的,其一是目的植株体内缺少组织特异性,其二是植株体内缺乏调节基因表达产物,因而不能激活结构基因的表达。解决这一问题可以通过导入调节基因来增加组织特异性或增加调节基因的表达产物,使结构基因得以表达,从而改变花色。矮牵牛形成的健康的愈伤组织是绿色的,但是通过研究已获得分化出红色愈伤组织的矮牵牛和粉红色花冠的矮牵牛植株。这是通过导入调节基因的方法,将控制花色素代谢的调节基因导入矮牵牛受体植株中。

3.5 辅助基因以及多基因导入法 花色形成需要多种关键基因的参与,也有许多作用相关的辅助基因的协同作用,与花色形成作用相关的辅助基因有调控 pH 基因、辅助色素形成基因等。这些辅助基因功能的增强或减弱会影响关键基因的功能,导致花色的变化。采用多基因导入法,向矮牵牛受体植株中导入调控花色形成的多种基因。包满珠^[16]将 *ci* 和 *lc* 2 个基因同时转入目的植株矮牵牛中,未经多基因导入的矮牵牛花冠筒颜色为白色,多基因转化后的矮牵牛植株花冠筒颜色由白色变成粉红色。

3.6 核酶抑制 核酶(Ribozym)是一种具有酶活性 RNA 分子物质,可以特异性地切断 mRNA,从而阻断蛋白质的生物合成。这项技术特异性地抑制了类胡萝卜素和类黄酮等物质生物合成基因的表达,达到改变花色的目的。

4 展望

作为观赏植物的矮牵牛,其花色决定了它的观赏价值。同时,人们正通过各种基因工程的方法来改良花色,因此运用基因工程手段来改良花色成为分子生物学的研究热点之一。自 1987 年第 1 例利用基因工程技术改造花色的试验成功距今已有 20 多年,期间研究人员尝试新的方法,但有时效果难免会不尽人意。这是因为花色的改变还不能得到完全控制,花色的形成是一个复杂的过程。未来通过对结构基因和调控机理的深入研究,相信一定会让花色的变化更加地随心所欲的。而矮牵牛作为花色研究的模式植物,对于它的花色研究必将呈现出更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 张和臣,王利民,孟月娥.植物花朵呈色的分子机制[J].分子植物育种:网络版,2011(9):1818-1823.

分组	数据
1.000	.689
1.000	.730
1.000	.560
1.000	.707
1.000	.459
1.000	.680
1.000	.808
1.000	.436
1.000	.452
2.000	.925
2.000	.850
2.000	.736
2.000	.906
2.000	.639
2.000	.968
2.000	.818
2.000	.754
2.000	.736
2.000	.821

图2 数据输入格式



图3 2个独立样本主对话框

0.05, 可以认为应该拒绝两独立样本总体均值无显著性差异的零假设, 即认为不同品种鸭的受精蛋孵化率存在显著性的差异 ($P < 0.05$)。

(上接第 10908 页)

- 王霜, 侯学文, 郭勇. 谈谈转基因植物中生物合成途径的调控策略[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(6): 458-461.
- 赵昶灵, 郭维明, 陈俊愉. 植物花色形成及其调控机理[J]. 植物学通报, 2005, 22(1): 70-81.
- 郑志亮. 花卉作物的花色基因工程[J]. 北方园艺, 1994(3): 37.
- BAUMANN K, PEREZ-RODRIGUEZ M, BRADLEY D, et al. Control of cell and petal morphogenesis by R2R3 MYB transcription factors[J]. Development, 2007, 134: 1691-1701.
- 祝钦尧. 转查尔酮异羟酶(CHI)基因矮牵牛花色改变及其花器官变异的研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2004: 44-47.
- CHUCK G, ROBBINS T. Tagging and cloning of a petunia flower color gene with them aize transposable element activator[J]. The Plant Cell, 1993, 5: 371-378.
- MOLJ N M, HOLTOM T A, KOES R E. Genetic engineering of commercial traits of floral crops[J]. Trend Biotech Chnology, 1995, 13: 350-355.
- QUATTROCCHIO F, WANG J F, LEOPON H T C, et al. Regulatory gene controlling anthocyanin in pigmentation are functional conserved among plant species and have distinct sets of target gene[J]. Plant Cell, 1993, 5:

表2 受精蛋孵化率 Mann-Whitney 检验

品种	N	秩均值	秩和
1.000	9	5.89	53.00
2.000	10	13.70	137.00

表3 非参数检验统计量^b

类别	受精蛋孵化率
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	53.000
Z	-3.022
渐近显著性(双侧)	0.003
精确显著性[2*(单侧显著性)]	0.001 ^a

注: a. 没有对结进行修正。b. 分组变量: 不同鸭品种。

3 讨论

SPSS 软件简单易行, 具有较强的实用性, 在畜牧业中使用参数检验较普遍^[5], 而使用非参数检验相对较少。该研究主要介绍了 SPSS 软件中的 Mann-Whitney 检验方法。该方法的适用面较参数检验广, 假设条件少, 并不要求总体分布服从什么具体形式, 更适用于一般的情况。但是, 由于非参数检验对数据的限制较宽松, 没有充分利用数据, 因而只能从中提取一般的信息。由于在畜牧试验或生产中, 所获得的数据资料可能是非正态分布, 各组例数不同, 也可能存在方差不齐, 若仍采用参数检验的方法来分析数据, 易造成分析结果失真, 因此选用非参数检验方法更有效。该研究介绍的不用编程直接用 SPSS 菜单进行 Mann-Whitney 检验方法的分析, 快捷方便, 计算准确, 避免了手工计算繁杂、易错的缺点, 对一线畜牧工作者或科研人员具有指导意义。

参考文献

- MANN H B, WHITNEY D R. On a test of whether one of two random variable is stochastically larger than the other[J]. The Annals of Mathematical Statistic, 1947, 18(1): 50-60.
- 刘顺忠, 荣丽敏, 景丽芳. 非参数检验和 SPSS 软件应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2008: 96-106.
- 张勤. 生物统计学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 214-215.
- 谢庄. 兽医统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 110.
- 张玉. SPSS 软件和成分分析法在牧草营养价值评价中的应用[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(12): 7186-7188.

1497-1512.

- FORKMANN G, MARTENS S. Metabolic engineering and applications of flavonoids[J]. Curr Opin Biotech, 2001, 12: 155-160.
- 郑亚东, 郭余龙, 陈旭. GhMADS3 基因组成型表达对矮牵牛花形和花色的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 985-990.
- KITAMURA S. Transport of Flavonoids[M]//GROTEWOLD E. The Science of Flavonoids. NY: Springer, 2006: 123-146.
- VAN DER KROL A R, MUR L A, BELD M, et al. Flavonoid genes in *Petunia*: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression[J]. Plant Cell, 1990, 2: 291-299.
- BAUMANN K, PEREZ-RODRIGUEZ M, BRADLEY D, et al. Control of cell and petal morphogenesis by R2R3 MYB transcription factors[J]. Development, 2007, 134(9): 1691-1701.
- KOSEKI M, GOTO K, MASUTA C, et al. The star-type color pattern in *Petunia hybrid* a "Red Star" flowers is induced by sequence-specific degradation of chalcone synthase RNA[J]. Plant Cell Physiol, 2005, 6: 1879-1883.
- 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.