

# 基因转移技术在观赏植物抗性育种中的应用

赵宏波, 陈发棣\*, 房伟民

(南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 各种病虫害、杂草、逆境胁迫等不仅会大大降低观赏植物品质,同时也限制了不同类型观赏植物在世界范围内的分布和应用。综述了抗虫、抗病、抗除草剂、抗寒、抗冻、抗旱等抗性基因在观赏植物抗性育种的应用,提出了当前观赏植物转基因抗性育种中存在的问题并展望了今后的工作重点。

**关键词:** 基因转移; 观赏植物; 抗性育种

**中图分类号:** Q943.2    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3142(2006)03-0289-08

## Application of transgenesis technology in resistance breeding of ornamental plants

ZHAO Hong-bo, CHEN Fa-di\*, FANG Wei-min

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Weed, adversity, plant diseases and insect pests will not only debase the quality of ornamental plants but also limit the distribution and application of them. The transgenesis technology plays a key role in resistance breeding of plants including ornamental plants. We summarized the evolution of resistance breeding including insects, diseases, herbicide and abiotic stress resistance of ornamental plants using transgenesis technology. Some questions at present and the further work in the process of resistance breeding of ornamental plants by transgenesis technology were put forward.

**Key words:** transgenesis; ornamental plants; resistance breeding

观赏植物和其他作物相比在栽培方式、栽培周期等方面有较大差别,要求周年生产全年供应,且生产地和原产地基本不一致,因此发生各种病虫害和不适环境造成伤害的可能性相对较大,而仅仅依靠防治措施不但无法保证产品的质量和良好的效果,而且会对环境造成污染和提高生产成本。观赏植物被视为流动性最大的一类植物,在人为作用下,从一个地区转移到另一个环境相差迥异的地区。由于不同地区气候条件的差异,观赏植物的适应性受到很大考验,而抗性育种是提高其抗耐性、适应性的最重

要和有效的手段之一(滕年军等,2002)。常规抗性育种在抗性新品种选育中作出了很大贡献,但存在育种时间长、难以引入亲缘性较远种的优良种质,难以定向单一地引入某一优良性状等方面的缺陷。转基因技术就可以克服这些缺点,与常规育种相比更具有目的性、预见性和可控性。采用转基因技术,将抗虫、抗病、抗除草剂、抗逆等抗性基因导入观赏植物中,育成稳定遗传的抗性品种是观赏植物抗性育种的一条很有前途的途径。本文对基因转移在观赏植物抗性育种的应用做简单的综述,以期对今后研

收稿日期: 2005-02-24    修回日期: 2005-08-19

**基金项目:** 江苏省高技术研究项目(BG2003305); 江苏省教育厅高技术产业化项目(JH02-086); 江苏省农业三项工程项目(SX2003065); 上海农委重点攻关项目(2004D3-1)[Supported by Jiangsu Provincial High-Tech Research Project(BG2003305); High-Tech Industrialization Research Project of Education Department(JH02-086); Jiangsu Provincial Agricultural Tri-item Project(SX2003065); Sci-Tech Project of Shanghai Agricultural Committee(2004D3-1)]

**作者简介:** 赵宏波(1979-),男,浙江武义人,博士生,主要从事观赏植物遗传育种研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: chenfd@njau.edu.cn)

究有一定的参考作用。

和模式植物转基因研究基础之上的,在上世纪 90 年代才逐渐开展起来,初期主要在菊花、矮牵牛、金鱼草等离体再生容易的观赏植物上。后来,随着转基因技术的发展和观赏植物细胞、组织培养再生体系的建立,在很多观赏植物上都展开了转基因抗性育

# 1 研究进展

观赏植物转基因抗性育种研究是建立在农作物

表 1 观赏植物抗性遗传转化概况  
Table 1 Transformation in resistance breeding of ornamental plants

抗性 Resistance	植物材料 Plants	基因 Genes	受体 Receptor	方法 Method	转化结果 Results of transformation	参考文献 References
抗虫 Insect resistance	菊花 <i>Dendranthema</i> × <i>grandiflora</i> cv. Parliament	Bt	叶片	农杆菌	抗性植株	Wordragen 等, 1993
	菊花 'Boruholm' 'White Harricon'	Bt		农杆菌	抗扁虱再生植株	Dolgov 等, 1995
	菊花	Cvrylc			抗甜菜夜蛾再生植株	Jong 等, 1999
抗真菌病 Fungi disease resistance	毛白杨 <i>Populus tomentosa</i>	Bt	叶片	农杆菌	再生植株	郑均宝等, 1995
	毛白杨	CpTI	叶片	农杆菌	再生植株	郝贵霞等, 2000
	月季 <i>Rosa hybrida</i>	Chitinase	胚性愈伤组织		转化植株黑斑病发生率大大降低	Marchant 等, 1998
	月季	Ribosome inhibiting protein, chitinase	体胚	农杆菌	再生抗性植株, 再生抗黑斑病植株	Cao 等, 1998; Dohm 等, 2001
	菊花	RCC2	茎段	农杆菌	抗灰霉病再生植株	Takatsu 等, 1999
	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	Dihydroflavonol reductase			转化植株对真菌病原菌抗性大大提高	Saedler 等, 1992
	天竺葵 <i>Pelargonium hortorum</i> 天竺葵 <i>P. sp.</i>	Ceropin B Antimicrobial protein	叶柄	农杆菌	抗黄单胞菌再生植株 灰霉病发生率显著降低	Renou 等, 2000 Bi 等, 1999
抗病毒 Virus resistance	菊花 'Blush, Iridon, Tara'	TAMV	叶片, 茎段	基因枪	再生抗性植株	Yepes 等, 1995
	菊花 'Polaris, Golden Polaris, Iridon'	TMSV-cp, INSV-cp, GRSV-cp			再生抗性植株	Yepes 等, 1999
	菊花 'Polaris'	TSMV		农杆菌	再生抗性植株	Sherman 等, 1998
	唐菖蒲 <i>Gladiolus grandaevensis</i>	BYMV-cp	悬浮细胞		再生抗性植株	Kamo, 1995
	百合 <i>Lilium longiflorum</i>	CMV			再生抗性植株	Lipsky, 2000
	燕子海棠 <i>Kalanchoe blossfeldiana</i>	PR-1a	叶片	农杆菌	再生抗性植株	Aida 等, 1998
抗除草剂 Herbicide resistance	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i>	bar	叶片	农杆菌	再生抗性植株	Hoshino 等, 1998
	萱草 <i>Hemerocallis sp.</i>	bar	愈伤组织	基因枪	再生抗性植株	Aziz 等, 2003
	唐菖蒲	bar	胚性愈伤组织		再生细胞系	Kamo 等, 2000a, b
	唐菖蒲	PAT	悬浮细胞, 愈伤组织	基因枪	再生抗性植株	Kamo 等, 1995
	杂种杨 <i>P. alba</i> × <i>P. grandidentata</i> cv. Crandon	EPSP		农杆菌	再生抗性植株	Donahue 等, 1994
	银白杨 <i>Populus alba</i> cv. Villafranca	bar	茎段	农杆菌	再生抗性植株	Confalonieri 等, 2000
	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	bar		基因枪	再生抗性植株	Cabrera 等, 1997
	<i>Brassia</i>	bar	原球茎、类原球茎	基因枪	再生抗性植株	Knapp 等, 2000
	<i>Cattleya</i>	bar	原球茎、类原球茎	基因枪	再生抗性植株	Knapp 等, 2000
	<i>Doritaenopsis</i>	bar	原球茎、类原球茎	基因枪	再生抗性植株	Knapp 等, 2000
	狗牙根 <i>Cynodon dactylon</i>	bar	茎段	农杆菌	再生抗性植株	Li 等, 2004
	匍匐剪股颖 <i>Agrostis palustris</i>	bar	原生质体	基因枪	再生抗性植株	Asano 等, 1998
	高羊茅 <i>Festuca arundinacea</i>	bar	原生质体		再生抗性植株	Wang 等, 1992
抗冻 Freezing tolerance	毛白杨	激素合成基因	叶柄	农杆菌	再生抗性植株	温尚昆等, 1997
	白三叶 <i>Trifolium repens</i>	BADH	子叶	农杆菌	再生抗性植株	陈传芳等, 2004

种研究,取得了一系列成功。方法主要以农杆菌介导转化法和基因枪法为主。

## 1.1 抗虫基因及其应用

目前,抗植物虫害的基因有几十种,根据其来源

可分为 3 类: 第一类是 Bt 杀虫蛋白基因, 来自苏云金杆菌, 形成孢子细菌, 在芽孢形成过程中, 生成杀虫结晶蛋白(Insecticidal crystal protein, ICP), 这类蛋白具有高度特异性杀虫活性, 根据其抗虫谱及它们的序列同源性, ICP 分成 4 个主要类型: 类型 I (Cry I) 抗鳞翅目, 类型 II (Cry II) 抗鳞翅目和双翅目, 类型 III (Cry III) 抗鞘翅目, 类型 IV (Cry IV) 抗双翅目。最近又有一些新类型的 ICP 被发现, 例如既抗鳞翅目又抗鞘翅目的、抗膜翅目的和抗线虫的 ICP 相继被报道。第二类抗虫基因是昆虫蛋白酶抑制剂基因, 其产物与昆虫消化道内的蛋白消化酶结合形成酶抑制剂复合物 EI, 从而抑制蛋白酶活性, 干扰害虫消化作用而导致其死亡。其中应用最广泛的是豇豆胰蛋白酶抑制剂基因。蛋白酶抑制剂基因来源于植物本身, 对人畜无毒副作用, 而且抗谱广泛, 主要有丝氨酸类、半胱氨酸类、含金属类、天冬氨酸类。现已克隆了近十个蛋白酶抑制剂基因, 分别特异地抑制 4 种不同作用机理的蛋白酶。第三类抗虫基因是植物凝集素基因(Lectin gene)。植物凝集素能聚集和沉淀糖蛋白, 它主要存在于细胞的蛋白体中。其抗虫原理是当被昆虫取食后, 外源凝集素在昆虫的消化道中与肠道围食膜上的糖蛋白结合, 从而影响营养的吸收; 这种结合具有专一性, 同时外源凝集素还可能在昆虫的消化道内诱发病灶, 促进消化道中细菌的繁殖, 这些作用对害虫造成伤害从而达到杀虫目的(王关林等, 2002)。目前都已经将这些抗虫基因应用到作物上, 而观赏植物上的应用还主要以 Bt 基因为主。

自从 1987 年 Veck 等获得第一例转 Bt 基因抗虫烟草以来, 现已经把 Bt 基因转入了许多观赏植物中。1988~1989 年, 美国衣阿华大学成功地将 Bt 基因和从马铃薯中提取的蛋白酶抑制剂(TI)基因, 以根癌农杆菌 Ti 质粒为载体对杨树杂种进行了转化并获得了转基因植株。Wordragen 等(1993)以离体叶片为材料将 Bt 基因转入到菊花‘Parliament’中, 获得了抗虫植株。Dolgov 等(1995)将 Bt 基因转入到菊花‘Bornholm’和‘White Harricon’中, 转化株在不喷施任何化学药剂的条件下, 表现出对扁虱良好的抗性。郑均宝等(1995)用含有完全改造的 Bt 基因表达载体 pB48.7 和部分改造的 Bt 基因表达载体 pB48.6 转雄性毛白杨, 均获得了转基因植株。Jong 等(1999)将 CryIc 基因转入到菊花中, 该基因编码的蛋白对甜菜夜蛾幼虫有毒害作用, 对转

CryIc 基因的菊花抗虫性鉴定发现, 用转基因叶片喂养幼虫, 幼虫重量比对照要轻, 而且幼虫在未成熟前就死亡。郝贵霞等(2000)已成功将豇豆胰蛋白酶抑制剂(CPTI)基因导入毛白杨得到了转基因植株。

另外, 还有一些抗虫基因已被克隆, 如淀粉酶抑制剂基因、系统肽基因、核糖体失活蛋白基因、异戊烯转移酶基因、营养杀虫蛋白基因、胆固醇氧化酶基因、蝎子毒蛋白基因等等。英国爱丁堡大学将水母发光基因导入烟草、芹菜等作物中, 获得发光作物, 当害虫侵害时就发光驱赶。英国科学家从雪花莲中克隆出了雪花凝集素基因, 它对稻飞虱、叶蝉、蚜虫等都有毒害作用(Hilder 等, 1999)。这些基因的获得都为观赏植物抗性基因工程奠定了基础。每一个抗虫基因其抗虫谱和抗虫机制各有不同, 不可能抵御所有的害虫, 而任何一种作物都会受到多种害虫的侵害, 因此通过将多个抗虫基因联合导入同一植物中, 可拓宽转基因植物抗虫谱和延缓害虫产生抗、耐药性。

## 1.2 抗病基因及其应用

### 1.2.1 抗真菌 植物感染真菌病害后, 其防卫反应主要表现在增强细胞壁结构和诱导产生或激活抗菌物质两方面, 具体表现在: 植物受病原体感染和损伤的情况下, 富含羟脯氨酸糖蛋白和富含甘氨酸蛋白合成增加以巩固细胞壁的结构, 过氧化物酶催化苯基类丙烷醇(Phenylpropanoid alcohol)脱氧聚合, 最终生成木质素, 并催化细胞壁蛋白与多糖分子之间的交联, 木质素由多种苯基类丙烷醇缩合而成, 可抵抗微生物降解, 在植物受病原物侵染时合成增加, 可增强细胞壁强度; 诱导产生或激活抗菌物质, 如硫堇(Thionin)、植物抗毒素(Phytoalexin)、几丁质酶(Chitinase)、 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶( $\beta$ -1, 3-glucanase)等, 硫堇是存在于植物种子胚乳中的偏碱性蛋白, 能抑制植物生长, 植物抗毒素是一类低分子质量的抗菌化合物, 几丁质酶和 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶特别是在两种酶共同作用下可在体外抑制真菌生长; 此外 PR 蛋白(Resistance protein)、植物凝集素(Lectin)、PGIP、羟脯氨酸糖蛋白等都与植物防卫反应有关(王关林等, 2002)。几丁质酶和 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶都属于 PR 蛋白。PR 蛋白不仅参与植物局部的诱导抗病性, 而且还参与植物的系统诱导抗病性, 这种抗性在植物再次被感染时, 不仅对与初次感染相同的病原菌表现出抗性, 而且往往对其他类型的病原菌也起作用。植物在长期进化过程中逐渐获得一系列

复杂的防御机制来保护自己,近年来已克隆到一些植物自身的抗病基因,例如 rs-afp 基因、番茄 cf-2,9 基因等(Punja,2001)。这一系列基因的获得将大大推动观赏植物抗病育种的进程。

真菌病害是观赏植物最主要的病害,其造成的损失很大,因此抗性育种也主要围绕着真菌病害展开。Marchant 等(1998)将几丁质酶基因转入现代月季,获得抗黑斑病的转基因植株。Takatsu 等(1999)将水稻几丁质酶基因导入菊花‘Yambiko’品种,获得了抗灰霉病(*Botrytis cinera*)的转基因植株。Yamagami 等(2000)在郁金香中克隆到了几丁质酶基因,有望将该基因导入郁金香的各种品种中,而获得抗真菌植株。Malek 等(2000)对四倍体月季中与抗黑斑病基因 Rdr1 紧密连锁的分子标记进行了分离鉴定,从而将推进月季的抗黑斑病分子育种。Iwate 生物技术研究中心把从根霉菌中得到的几丁质酶基因和大豆的葡聚糖酶基因分别导入草原龙胆(*Eustoma grandiflorum*),获得抗灰霉病的转化植株;另外,他们从山萼菜属植物(*Eutrema japonica*)中分离纯化了两个抗灰霉病、苹果叶斑病、草原龙胆枯萎病的抗菌蛋白(Wj AFP-1,2),从龙胆中分离纯化了三个抗灰霉病、苹果叶斑病、草原龙胆枯萎病的抗菌蛋白(Gt AFP-1,2,3),正着手将其转入飞燕草、菊花、百合等观赏植物中。

1.2.2 抗细菌 利用病原菌自身的抗性基因转入植物使其具有抗性是抗细菌病害的一种重要方法。其依据是病原菌基因组中必定存在某一基因,其表达产物,在病原菌与宿主的相互作用时,起到不可缺少的功能;一旦这些功能之一遭到破坏,病原菌的致病过程即停止发生,因此,将病原菌基因导入植物细胞,使其过量表达或表达失去原有功能的蛋白,或表达失去原有的时空性,从而干扰病原菌的正常生理代谢,以致寄主植物表现出抗性。抗菜豆毒素(Phaseolotoxin)的鸟氨酸氨甲酰基转移酶基因(Ornithine carbamyltransferase)和抗毒素(Tabtoxin transferase)的乙酰转移酶基因就属于病原菌自身的抗性基因。此外,还有很多类型的基因已被克隆并利用到植物的抗细菌病害育种中,例如抗菌肽基因、溶菌酶基因、病原相关蛋白基因(如 PR 蛋白、番茄 *pto* 基因、番茄 *ptil* 基因等)、防御素基因、保卫素及其合成酶基因、TLP(Thaumatin like proteins)蛋白基因、水稻 *xa21* 基因、拟南芥 *rps2*、*rpm1* 基因等。赵世民等(1999)将兔防御素 NP-1 基因导入毛

白杨,转基因植株组织提取液对枯草杆菌、农杆菌和立枯病原菌等多种微生物的生长都有抑制作用。

1.2.3 抗病毒 病毒病在观赏植物中发生很普遍,其极大地降低了观赏植物的品质,使生产造成很大的损失。抗病毒基因工程主要是利用病毒自身基因进行转基因抗病毒育种。迄今,提出和已经应用的技术路线有:导入病毒外壳蛋白基因、利用病毒的卫星 RNA、反义 RNA、和有义缺陷 RNA、利用病毒非结构蛋白基因、利用人工构建的缺损干扰颗粒(Defective interfering particle)、利用自身编码的抗病毒基因、利用动物中的干扰素(Interferon)、利用中和抗体法技术、设计核酶剪切病毒 RNA 等等,这些技术中,导入 cp 外壳蛋白基因是目前最为成功的一种方法,而利用病毒的复制酶基因是一种很有前途的方法。

Yepes 等(1995)将含有马铃薯环斑萎蔫病毒 TSWV(N)核壳基因和 NPTII 的二等分质粒 pBIN19 裹在微粒表面轰击菊花‘Blush’、‘Iridon’、‘Tara’等品种的叶片和茎段外植体,获得了转化株。Copper 等(1993)成功克隆到杨树花叶病毒的外壳蛋白基因 PMV-cp 并导入杨树,在杨树体内产生的 cp 蛋白对杨树 PMV 的侵染起到一种类似免疫学的交叉保护作用。Kamo 等(1995)将菜豆黄斑病毒外壳蛋白基因(BYMV CP)和 Gus 基因转入唐菖蒲的悬浮细胞中,获得了转基因植株。Sherman 等(1998)将从大丽花中克隆到的番茄斑萎病毒外壳蛋白基因分别以有义全长片段、有义核心片段和反义全长片段形式导入菊花‘Polaris’品种,转入反义全长植株对 TSWV 有明显抗性,而转入有义核心片段、有义全长片段的植株也表现出对 TSWV 一定的抗性,发病比对照推迟。Yepes 等(1999)将编码番茄斑萎病毒、凤仙坏死斑病毒和花生环斑病毒外壳蛋白的基因导入菊花‘Polaris’、‘Golden Polaris’、‘Iridon’品种中,分别获得了转基因植物。我国观赏植物工作者成功获得了香石竹叶脉斑病毒外壳蛋白基因 cDNA,并测定了序列。病毒病严重影响球根花卉的品质,是导致其品质退化的主要原因之一,利用转基因技术培育抗病毒材料已经在百合、郁金香等上展开(Ziv,1997)。

植物的致病性极其复杂,而且病原菌极易产生抗性,有的转基因植株只能抗某种病原菌,或某种病原菌的某个生理小种,所以为克服这些问题,有必要进行抗病聚合育种,即将抗几种病原菌或一种病原

菌的几个生理小种的基因整合到一个植株中,从而创造出多抗品种。

### 1.3 抗除草剂基因及其应用

观赏植物要求一种精细的栽培模式,杂草防除工作量大,费人力物力,而除草剂防除高效、方便、快捷。因此抗除草剂基因工程今后将是观赏植物转基因育种的主要方向之一。近年来,关于除草剂作用的生化模式和生物中存在的对除草剂的抗性机理的研究,为植物抗除草剂的基因工程奠定了坚实的基础。目前,抗除草剂基因工程主要有两种策略:①修饰除草剂作用的靶蛋白(Herbicide target),使其对除草剂不敏感,或促其过量表达以使植物吸收除草剂后仍能进行正常代谢。例如草甘膦的靶酶是5-烯醇吡草酸-3-磷酸合成酶(EPSES),属于芳香族氨基酸衍生物,位于质体上,它阻断莽草酸合成;而草丁膦的靶酶是谷氨酰胺合成酶(GS),它在植物中调节铵的吸收、消化和氮代谢;对靶蛋白的修饰就是对靶酶特定位点进行修饰,即改变靶酶特定位点相应的氨基酸残基,这种修饰不影响其二级结构和功能,却阻断了除草剂的结合。②引入酶和酶系统,在除草剂发生作用前将其降解或解毒,解毒酶可使除草剂硝基水解、乙酰化、去除硝酸根支链而使除草剂失活。分离对除草剂有降解作用的基因比分离靶位点突变抗性基因要困难得多,但靶位点突变抗性可能会使转基因植物其他性状发生改变,而降解抗性产生的这种负效应要小得多。由降解系统产生的对除草剂的抗性的专一性很强,且效率很高。抗 EPSES 抑制剂基因、抗乙酰乳酸合成酶(Acetolactate synthetase)(磺酰脲类除草剂抑制其活性而表现出除草作用)抑制剂基因、抗光系统II除草剂基因等属于第一个策略,而乙酰 CoA 转移酶基因、水解酶基因、超氧化物歧化酶基因等属于第二类策略(王关林等,2002)。

Hoshino 等(1998)以根瘤农杆菌 Ri 质粒为载体往金鱼草中导入了 pARK5 基因,该基因的 T-DNA 区段包含有编码新霉素磷酸转移酶的 NPTII 基因,由此获得了抗除草剂的转基因植株。Aziz 等(2003)用携带 bar 基因的金粒子轰击萱草由胚珠诱导而来的愈伤组织,获得抗 PPT(Phosphinothricin)的转化植株。Kamo 等(2000a, b)将 bar、PAT 基因导入唐菖蒲获得抗除草剂的再生植株。Knapp 等(2000)用基因枪法将 bar 基因导入三种兰属植物的原球茎和类原球茎中,均获得再生转化植株。草坪草的抗除草剂基因工程也取得了很多成功,例如将

bar 基因导入高羊茅(Wang 等,1992)、狗牙根(Li 等,2004)、匍匐剪股颖(Asano 等,1998)等获得抗除草剂转化植株。

### 1.4 抗其他非生物胁迫基因及其应用

目前,导入植物中以提高植物抗逆境胁迫的基因根据其编码产物的作用和作用方式可分为以下两类(王关林等,2002)。第一类基因其编码产物是在植物抗性中直接起保护作用的蛋白质,这些蛋白质可细分为五类:①合成渗透调节物质的关键酶类,如脯氨酸合成酶、甜菜碱合成酶、海藻糖合成酶、果聚糖合成酶、甘露醇合成酶等,这些基因与植物的抗旱性和耐高盐胁迫等有关;②具有解毒作用的酶类,如抗氧化防御系统中的各种酶如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶和抗坏血酸氧化酶,他们协同作用共同抵抗胁迫诱导的氧化伤害,清除细胞中的活性氧;③保护生物大分子及膜的蛋白质,如抗冻蛋白(Antifreeze protein)、胚胎发生后期富集蛋白(Late embryogenesis abundant proteins)、提高生物膜流动性的蛋白、调渗蛋白(Osmotin)等,这些蛋白与植物的抗冻性和耐低温能力相关;④具有保护作用的蛋白酶类,如巯基蛋白酶可降解变性蛋白质,为新蛋白质的合成储备原料;⑤水通道蛋白,如主要内在蛋白(Major intrinsic protein)等。第二类基因编码的产物是在信号转导和逆激基因表达过程中起调节作用的蛋白质因子,主要包括以下3种:①传递信号和调控基因表达的转录因子,如 DREB 转录因子(Dehydration responsive element),只要使已知的5个 DREB 基因中的一个在正常条件下表达,或在胁迫条件下进一步增强表达,其编码的转录因子就能同时促使启动子调控区域含 DRE 顺式作用元件的多个基因的表达,这些基因编码的产物与干旱、高盐及低温胁迫耐性有关;②感应和转导胁迫信号的蛋白激酶,如 MVP 激酶等;③与第二信使生成有关的酶类,如磷脂酶等。

1.4.1 抗寒 抗寒基因工程可以基于两种机制:在低温条件下,植物诱导表达一些基因如拟南芥冷诱导基因,从而表现出对低温一定的抗性;也可以从低温中植物细胞损伤机理来探讨:低温造成细胞内膜流动性减弱,最终导致膜结构的损伤,脂肪酸去饱和酶可以使细胞中的不饱和脂肪酸含量增加,使膜的流动性增加,因而抗性增强。目前,观赏植物的抗寒转基因育种方面的报道还较少,但我国观赏植物学家已着手将抗寒基因转入菊花、水仙、山茶等观赏植物中。

1.4.2 抗冻 抗冻基因工程中应用较多的是抗冻蛋白基因 AFP,它是一类具有降低冰点和减少冰晶生长速度的蛋白质。从南极鱼中克隆得到抗冻糖蛋白 (AFGP),已成功转入番茄、玉米等植物中。美国学者 Thomashow 等发现调节蛋白(如各种反式作用因子)在反应低温的基因表达调控中起重要作用,这些反式作用因子基因,能诱导许多抗低温蛋白的表达。他们将转录因子 CBF1 基因导入拟南芥,转录因子 CBF 能与 COR 基因中的 C-重复序列识别结合,CBF 作为 COR 基因表达的开关,诱导一系列 COR 基因的表达,从而使未受低温驯化的植株就有很高的抗冻性。北京林业大学从耐极低温(-20℃)的甜杨中诱导出了与抗冻有关的特异蛋白,正着手分离克隆相关基因,这将推进观赏植物的抗冻育种。Lise 等(1998)将查尔酮合成酶(CHS)基因导入杨树,降低了转基因植株对低温的敏感性。

1.4.3 抗旱 脯氨酸合成酶和甜菜碱合成酶基因是目前抗旱分子育种研究较多的,它们在干旱条件下能诱导脯氨酸、甜菜碱等渗透调节物质迅速合成并大量积累。而调渗蛋白 DSM 是和脯氨酸等小分子物质作用机理不同的另一条渗透调节物质产生方式,在高盐条件下或 ABA 含量增加时 DSM 大量积累,参与细胞的脱水保护作用,使细胞膜在无水时形成新的结构形式,以适应干旱条件。温尚昆等(1997)用根瘤农杆菌介导毛白杨导入与抗旱有关的激素合成基因,建立了转化系统,获得了再生植株。

1.4.4 其他抗逆性 抗逆分子育种还涉及其他许多方面,比如抗涝、抗热、耐铝盐、耐盐碱、抗氧化、抗二氧化硫等。近年来我国在抗逆基因的分离、克隆和转化等方面的研究有较大进展,已成功克隆了与抗涝有关的乙醇脱氢酶基因,它由两个不连锁的 Adh1 和 Adh2 基因编码。在抗热方面也已经克隆到编码苯丙氨酸裂解酶等的热激蛋白基因。从土壤菌中克隆了与耐铝寒相关的柠檬酸合成酶基因,并已转入烟草获得了转基因植株。我国科学家克隆到了耐盐碱相关基因,通过遗传转化获得了耐 1% NaCl 的苜蓿,耐 0.8% NaCl 的草莓,耐 2% NaCl 的烟草(邓定辉,2000)。通过转移山菠菜碱脱氢酶基因(BADH)、磷酸山梨醇脱氢酶(gutD)基因获得耐盐植物的研究目前也正在进行之中。陈传芳等(2004)用农杆菌法将甜菜碱脱氢酶(Betaine Aldehyde Dehydrogenase)基因导入白三叶草中,获得耐 0.5% NaCl 的转化植株。1996 年日本报道,把从大肠

杆菌中获得的谷胱甘肽还原酶基因导入杂种杨,已培育出抗活性氧的转化体。南京林业大学与日本合作开展了抗二氧化硫和臭氧污染的转基因杨树的研究。

植物的抗逆性常受多基因控制,所以须继续深入研究植物对逆境反应,研究抗性遗传机理,逆境时的生理生化变化过程等,从而搞清抗性分子机理,推进观赏植物抗性基因工程。

## 2 存在的问题

### 2.1 抗性基因的抗谱较窄和可利用抗性基因较少

目前,所获得的抗性基因在某些植物中表现出较好的抗性,但在转入其它一些植物时,往往存在抗性范围窄、抗性不强等问题,例如转移的各种胰蛋白酶抑制剂基因在转化植株中表达量不够等,这很大程度限制了转基因植物的利用。进行抗性聚合育种可以有效地解决这个问题,通过构建双抗、三抗甚至多抗基因转化植物,当然这也增加了技术上的难度。将转不同抗性基因的植物结合常规育种进行抗性聚合育种也是一种策略。

转入观赏植物中的抗性基因多从农作物、微生物中得到,这些基因的获得都是围绕农作物展开的,但观赏植物与农作物相比,在病虫害类型、栽培方式等方面存在较大不同。因此,仅利用现有的基因进行观赏植物抗性育种远远不够,必须从观赏植物自身出发,利用现有基因的同时,发掘和克隆抗性基因(特别是从观赏植物中)。

### 2.2 害虫、病原菌等抗性的产生

观赏植物和农作物在栽培方式上有很大的差别,许多要求周年栽培、四季供应,通常在设施条件下栽培,不受季节和气候的限制。在这种频繁的栽培模式下,害虫和病原菌对抗性基因更容易产生抗性。在这种情况下,我们需利用抗性基因的互补性来提高转基因观赏植物的抗性;另一方面,我们要结合栽培措施,利用感、抗品种交替种植、轮作等方式防止害虫和病原菌产生抗性。

### 2.3 基因转化受体系统和转移技术的限制

高频的基因转化频率主要依赖于高频再生的植物受体系统。目前虽然建立了一部分重要观赏植物的离体再生体系,但还有相当多的观赏植物离体再生存在困难或者技术不成熟,而且一般的组织培养和高频的基因转化受体系统还有较大差别,这很大程度限制了观赏植物转基因抗性育种的开展。因

此,需继续深入研究观赏植物的离体培养与高效再生技术,建立成熟的基因转化受体系统。同时,基因转移技术也从一定程度上限制了观赏植物抗性基因工程的进程,因为基因转移技术是围绕农作物或模式植物开展的,应用到观赏植物中,在很多方面有较大差异,因此摸索适合观赏植物的基因转移方法和技术是我们今后工作的又一重点。

#### 2.4 生态和安全性问题

观赏植物由于其大多可进行无性繁殖,生活力强健,与农作物相比更容易从人为控制栽培状态转化为自然繁衍、近野生状态,这样发生基因漂移或逃逸的可能性更大。抗虫、抗病、抗除草剂等抗性基因被其他植物俘获之后,这类植物的抗逆境能力将大大增强,其对环境的适应性和生存竞争能力也将大大提高,这将严重威胁同种植物及其近缘植物的遗传多样性;另外,俘获了毒蛋白基因的植物,一方面其取食动物或昆虫难以伤害他,其他植物也许会由于竞争替代而消亡,另一方面其取食动物或昆虫的生存就受到威胁,而这类昆虫或动物的天敌的生存也将受到威胁,另外如果其取食动物或昆虫的取食倾向发生改变,那么对其他植物将产生很大的威胁。总之,抗性基因的漂移或逃逸将对整个生态系统的平衡造成很大的威胁。当然,采用时间隔离、空间隔离和遗传隔离等方法是可以基本控制抗性基因的逃逸和降低其对环境生态所带来的危害机率。同时,在转基因抗性观赏植物进行应用之前,必须对这类植物进行严格的安全性评价,以确保不会威胁生态系统中的其它生物。

### 3 展望

观赏植物抗性分子育种是吸取了其它作物上取得的成果,结合观赏植物的特点展开工作的。当前,利用转基因技术进行观赏植物抗性育种主要集中在几种离体再生容易的观赏植物上如菊花、矮牵牛、金鱼草等,在技术方面主要用农杆菌法或基因枪法,而应用的基因也主要是 Bt、bar、TAMV 等在其他作物上应用很娴熟的基因,存在一定的局限性。但是观赏植物抗性分子育种也有很大的优势,主要在以下几个方面:①很多观赏植物其主要繁殖方式是无性繁殖或可以用无性繁殖;②对转化植株的选择要求较低,只要主要观赏性状良好,其他一些性状(如育性、结实性等)的改变将不会影响转化植株的价值,

而这些性状对农作物来讲是非常关键和致命的;③不存在食用安全性问题。今后观赏植物抗性基因工程应重点开展以下几个方面的研究:①特定基因的克隆,在观赏植物中有很多特异、优良的抗性基因,这类基因由于来自于观赏植物,将更易进行转化;②摸索适合观赏植物的转基因技术和高频的基因转化受体系统;③将分子手段与常规育种有机地结合起来;④制定严格的安全性评价体系,特别是针对环境的安全性。总之,我们要合理有效地利用转基因技术,进行观赏植物抗性育种,以期育出更多优良的新品种。

#### 参考文献:

- 王关林,方宏筠. 2002. 植物基因工程[M]. 第2版. 北京:科学出版社.
- Aida R, Shibata M. 1998. Constitutive expression of  $\beta$ -glucuronidase gene fused with stress-inducible promoter of the pathogenesis-related 1a protein gene of tobacco in transgenic *Kalanchoe blossfeldiana*[J]. *Acta Hort*, **454**:373-376.
- Asano Y, Ito Y, Fukami M, et al. 1998. A. Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer[J]. *Plant Cell Reports*, **17**:963-967.
- Aziz AN, Sauve RJ, Zhou S. 2003. Genetic transformation of Stella De Oro daylily by particle bombardment[J]. *Canadian J Plant Sci*, **83**:873-876.
- Bi YM, Cammue BPA, Goodwin PH, et al. 1999. Resistance of *Botrytis cinerea* in scented geranium transformed with a gene encoding the antimicrobial protein Ace-AmP1 [J]. *Plant Cell Reports*, **18**:835-840.
- Cabrera Ponce JL, Lopez L, Assad GN. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, **16**(5):255-260.
- Cao H, Li X, Dong X. 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**:6 531-6 536.
- Confalonieri M, Belenghi B, Balestrazzi A, et al. 2000. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance[J]. *Plant Cell Reports*, **19**(10):978-982.
- Chen CF(陈传芳), Li YW(李义文), Chen Y(陈 豫), et al. 2004. Saline tolerance white clover transformed with the Betaine Aldehyde Dehydrogenase gene by *Agrobacterium tumefaciens*(通过农杆菌介导法获得耐盐甜菜碱脱氢酶基因白三叶草)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), **31**(1):97-101.
- Deng DH(邓定辉). 2000. Resistance gene engineering breeding (抗性基因工程育种)[J]. *World Agri*(世界农业), **9**:27-28.
- Dohm A, Ludwig C, Schilling D. 2001. Transformation of roses with genes for antifungal proteins[J]. *Acta Hort*, **547**:27-33.
- Dolgov SV, Mityshkina TU, Rukavtsova EB. 1995. Production



- of transgenic plants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat with the gene of *Bac. thuringiensis* delta-endotoxin[J]. *Acta Hort*, **420**:46—47.
- Donahue RA, Davis TD, Michler CH, et al. 1994. Growth, photosynthesis and herbicide tolerance of genetically modified hybrid poplar[J]. *Canadian J For Res*, **24**(12):2 377—2 383.
- Hilder VA, Boulter D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance—critical review[J]. *Crop Prot*, **18**(3):177—191.
- Hoshino Y, Turkan I, Mii M. 1998. Transgenic bialaphos-resistant snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) produced by *Agrobacterium rhizogenes* transformation[J]. *Sci Hort*, **76**(1—2):37—57.
- Hao GX(郝贵霞), Zhu Z(朱 祯), Zhu ZD(朱之帝). 2000. Obtaining of cowpea proteinase inhibitor transgenic *Populus tomentosa*(转 CpTI 基因毛白杨的获得)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **36**(1):116—119.
- Jong J, Fischer G, Angarita A. 1999. Genetics, breeding and biotechnology of cut flowers[J]. *Acta Hort*, **482**:287—290.
- Kamo K, Blowers A, Smith F, et al. 1995. Stable transformation *Gladiolus* using suspension cell and callus[J]. *American Society Hort Sci*, **120**(2):347—352.
- Kamo K, Blowers A, McElroy D. 2000a. Effect of the cauliflower mosaic virus 35S, actin, and ubiquitin promoters on uidA expression from a Bar-uidA fusion gene in transgenic *Gladiolus* plants[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology(Plant)*, **36**(1):13—20.
- Kamo K, McElroy D, Chamberlain D. 2000b. Transforming embryogenic cell lines of *Gladiolus* with either a Bar-uidA fusion gene or cobombardment[J]. *In Vitro Cellular and Development Biology(Plant)*, **36**(3):182—187.
- Knapp JE, Kausch AP, Chandler JM. 2000. Transformation of three genera of orchid using the bar gene as a selectable marker[J]. *Plant Cell Reports*, **19**:893—898.
- Li L, Qu R. 2004. Development of highly regenerable callus lines and biolistic transformation of turf-type common bermudagrass(*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) [J]. *Plant Cell Reports*, **22**:403—407.
- Lipsky A, Cohen A, Gaba V, et al. 2000. Transformation of *Lilium longiflorum* plants for cucumber mosaic virus (CMV) resistance by particle bombardment. 10th International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants [M]. Annapolis, MD, USA.
- Malek B von, Weber W E, Debener T. 2000. Identification of molecular markers linked to Rdr1, a gene conferring resistance to blackspot in roses[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**(5—6):977—983.
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, et al. 1998. Expression of a chitinase transgene in rose(*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease(*Diplocarpon rosae* Wolf.) [J]. *Molecular Breeding*, **4**:187—194.
- Punja ZK. 2001. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens—a review of progress and future prospects[J]. *Can J Plant Pathol*, **23**:216—235.
- Renou J P, Mary I, Hanteville S, et al. 2000. Evaluation of the protection against *Xanthomonas* in transgenic *Pelargonium* containing a chimaeric cecropin gene[J]. *Acta Hort*, **508**:323—325.
- Saedler H, Gieffers W, Meyer P. 1992. Design of horizontal disease resistance in *Petunia* by transferring the A1 gene of *Zea mays*[J]. *Vortraege Fuer Pflanzenzuechtung*, **25**:228—241.
- Sherman JM, Moyer JW, Daub ME. 1998. Tomato spotted wilt virus resistance in chrysanthemum expressing the viral nucleocapsid gene[J]. *Plant Disease*, **82**(4):407—414.
- Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, et al. 1999. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) [J]. *Sci Hort*, **82**(1—2):113—123.
- Teng NJ(滕年军), Chen FD(陈发棣). 2002. Advances of genetic improvement for ornamental plants through genetic engineering(基因工程在观赏植物遗传改良中的应用)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **19**(5):538—545.
- Wen SK(温尚昆), Dong CH(董春海), Yi CQ(伊承俏). 1997. Introduction of phytohormone biosynthetic genes to *Populus tomentosa* and establishment of genetic transformation system(由根癌农杆菌介导向毛白杨导入激素合成基因建立遗传转化系统)[J]. *Biotechnology(生物技术)*, **7**(2):11—14.
- Wang ZY, Takamizo T, Iglesias VA, et al. 1992. Transgenic plants of tall fescue(*Festuca arundinacea* Schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts[J]. *Bio/Technology*, **10**:691—696.
- Wordragen MF van, Honee G, Dons HJM, et al. 1993. Insect-resistant chrysanthemum calluses by introduction of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene[J]. *Transgenic-Research*, **2**(3):170—180.
- Yamagami T, Tsutsumi K, Ishiguro M. 2000. Cloning, sequencing, and expression of the tulip bulb chitinase-1 cDNA[J]. *Bio-science, Biotechnology and Biochemistry*, **64**(7):1 394—1 401.
- Yepes LM, Mittak V, Pang SZ, et al. 1995. Biolistic transformation of chrysanthemum with the nucleocapsid gene of tomato spotted wilt virus[J]. *Plant Cell Reports*, **14**(11):694—698.
- Yepes LM, Mittak V, Slightom JL. 1999. *Agrobacterium tumefaciens* versus biolistic-mediated transformation of the chrysanthemum cvs. Polaris and Golden Polaris with nucleocapsid protein genes of three tospovirus species[J]. *Acta Hort*, **482**:209—218.
- Ziv M. 1997. The contribution of biotechnology to breeding, propagation and disease resistance in geophytes[J]. *Acta Hort*, **430**:247—258.
- Zhao SM(赵世民), Zu GC(祖国诚), Liu GQ(刘根齐). 1999. Introduction of rabbit defensin NP-1 gene into poplar(*Populus tomentosa*) by *Agrobacterium*-mediated transformation(通过农杆菌介导法将兔防御素 NP-1 基因导入毛白杨)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), **26**(5):711—714.
- Zheng JB(郑均宝), Zhang YM(张玉满), Yang WZ(杨文芝). 1995. Plant regeneration of excised leaf from 741 plpor and transformation with insect resistance B. t. toxin gene(714 杨离体叶片再生及抗虫基因转化)[J]. *J Agric Univ Hebei*(河北农业大学学报), **18**(3):20—25.