

月季功能基因研究与应用进展

谢吉容^{1,3}, 程再全², 唐开学², 黄兴奇², 梁国鲁³

(1. 重庆文理学院 生命科学系, 重庆 永川 402160; 2. 云南省农科院 云南 昆明 650223;

3. 西南大学园艺园林学院 重庆 北碚 400715)

摘要: 月季是花中皇后。为了充分利用月季优良农艺性状的相关基因来培育具有新奇花色、浓郁芳香、瓶插期长、抗逆性强的新品种, 对月季功能基因研究方法、花色代谢相关基因、花香相关基因、乙烯信号传导相关基因、抗根癌病和白粉病基因的研究进展加以综述; 对月季转基因育种发展前景做了评价。

关键词: 月季; 花色基因; 花香基因; 抗病基因; 衰老基因

中图分类号: S 685.12; Q 754 **文献标识码:** A

文章编号: 1001-0009(2007)08-0065-05

月季有花中皇后之称, 是当今世界上最重要的观赏植物种类之一(四大鲜切花之首)。月季是蔷薇科月季属植物的总称, 包括大约 100 个野生种, 主要分布在北半球的温带、亚热带地区。野生月季多是二倍体 ($2n=2x=14$), 而几乎所有栽培品种都是四倍体 ($2n=4x=28$)。现代月季都不是单一一个种, 而是 7~8 个种的杂交后代, 大约有 18 000 个商业品种^[1]。月季的基因组较小, 只有拟蓝芥 4 倍大, 大约有 600 Mb^[2]。月季巨大的经济价值(每年有 10 亿美元的产值)吸引了众多科学家对其新品种培育、花卉生产管理技术、花卉采收保鲜技术

等方面开展了深入的研究。月季的四季开花、丰富的花色花香使月季成为研究开花机理、花色花香代谢分子控制机制的模式植物。月季功能基因研究为培育具有新奇花色、芳香四溢、瓶插期长、抗逆性强的品种开辟了新的途径。虽然像月季之类的木本植物功能基因研究相对于拟蓝芥、水稻等模式植物来说起步较晚, 但与月季农艺性状相关的一些基因分离与功能验证已经完成。现将对月季功能基因研究现状、功能基因种类及其研究进展加以综述。

1 月季功能基因克隆方法进展

植物基因工程研究的首要目标是把特定的靶基因从植物基因组分离出来, 只有把基因分离并克隆, 才有可能了解其遗传信息, 然后进行分子操作。基因的分离方法都是根据基因的基本特性创建的, 包括基因特定的核苷酸顺序、基因在染色体上的位置、基因编码的 mRNA 的特性和基因的功能等。目前已经分离到的月季功能基因主要采用功能克隆和 PCR 同源克隆方法而获得的, 而图位克隆和表型差异克隆有望在月季基因分离鉴定中发挥越来越突出的作用。

1.1 功能克隆在月季功能基因分离上的应用

功能克隆是一种经典的基因克隆策略, 很多基因的分离利用这种策略。功能克隆就是根据基因的功能加

以分离, 即主要通过生物化学研究分离鉴定有关基因的蛋白产物, 并对蛋白质氨基酸顺序进行分析, 推断出编码该蛋白质的核苷酸序列, 然后根据情况可采用不同的办法进行: ①将纯化的蛋白质进行氨基酸测序, 据此合成寡核苷酸探针从 cDNA 库或基因组文库中筛选编码基因; 例如 Noa Lavid 等先用双向电泳分离 OMMT 酶, 再设计兼并引物, 通过同源搜索 (*Rosa hybrida* cv *Fragrant Cloud* and cv *Golden Gate*) EST 数据库分离了 OOMT1 和 OOMT2^[3]。②将纯化的蛋白质进行氨基酸测序, 据此合成简并引物, 对基因组 DNA 通过 PCR 扩增得到基因的部分序列, 再通过筛选全长 cDNA 文库或者运用 RACE-PCR 得到基因的全长 cDNA 序列; 如 Shuiqin Wu 等采用这种策略分离了 *Rosa chinenses* 的 POMT 酶, 根据其氨基酸序列设计兼并引物, 用 RACE 技术克隆了 POMT 基因 cDNA 全长^[4]。③将相应的编码蛋白制成相应抗体探针, 从 cDNA 表达文库中筛选相应基因。例如 Wang D 等运用免疫血清筛选到了 *Rosa hybrida* cv *Kardinal* 的 ACC 基因^[5]。功能克隆的特点是用基因表达的产物蛋白来克隆基因。虽然某一性状的编码基因是未知的, 如果对其生理生化及代谢途径研究得比较清楚, 就可以分离和纯化控制该性状的蛋白质。功能克隆的关键是分离出一个纯度很高的蛋白质, 只要有一个纯的蛋白质, 得到特异的探针, 这一方法是行之有效的。

1.2 同源克隆法在月季功能基因分离上的应用

1.2.1 PCR 扩增克隆 当已知目的基因的序列时, 通常采用 PCR 的方法来克隆基因。基本策略是利用已知目的基因的序列, 设计并合成一对寡核苷酸引物, 提取所要从中分离基因的染色体 DNA (RNA 需要在逆转录

第一作者简介: 谢吉容(1966-), 女, 重庆永川人, 副教授, 西南大学在读博士, 从事花卉种质资源和育种研究。E-mail: xiejirong@tom.com。

通讯作者: 梁国鲁。

基金项目: 云南省农业科技攻关资助项目 (2003NG05)。

收稿日期: 2007-04-02

酶的作用下合成 cDNA 的第 1 条链), 通过 DNA 模板的变性、复性以及引物在耐热的 DNA 聚合酶的作用下延伸, 经过多次循环, 目的基因即被扩增。扩增的片段经过纯化后, 连接到合适的载体上, 用酶切分析和序列分析测定所得到的重组子, 并与已知基因的序列进行比较。Iwata H 等根据月季 18S rRNA 和 16S rRNA 的保守序列设计的 ITS 的两端引物, 直接 PCR 扩增其得到月季的 ITS^[6]。此方法简便快速, 已被广泛应用于各种分子生物学实验中。利用此法分离植物基因时, 引物的设计往往以该基因的两末端序列为依据。但许多基因两末端不具保守序列, 或两末端虽具有保守序列却不适宜设计为 PCR 引物。在这种情况下, 可以从基因内部寻找保守序列并设计引物, 通过 PCR 扩增出基因的部分序列, 再以此序列标记探针筛选核 DNA 或 cDNA 文库获得完整基因。

1.2.2 根据跨种序列同源性克隆基因 植物的种属之间, 基因编码序列的同源性高于非编码区的序列。在某种植物的同源基因被克隆的条件下, 可先构建 cDNA 文库或基因组文库, 然后直接用这些已知的基因片段作探针, 对未克隆到该基因的植物基因文库进行筛选, 就可分离到未知的新基因。例如 Moshe Shalit 等通过同源搜索 Rosa hybrida 的 EST 数据库分离了 AAT 基因^[18]。

1.3 作图克隆在月季功能基因分离上的应用

作图克隆就是根据连锁图谱定位基因来克隆植物基因。以图谱为基础的定位克隆技术在分离未知产物的基因方面有广阔的应用前景。该法的基本前提是基因定位, 然后以紧密连锁的分子标记如 RFLP 等为起点, 通过染色体步移逐步向目标基因靠近, 最终克隆基因。其主要步骤包括: ①将目标基因定位在高密度的分子标记连锁群上; ②利用 PFGE 将连锁标记的遗传图距转换成物理距离; ③构建 YAC 文库, 找到含连锁标记的 YAC 克隆, 并通过克隆的排序获得目标基因 DNA 片段; ④通过转化和功能互补试验验证基因所在的 DNA 片段。Debener 和 Mattiesch 利用 RAPD 和 AFLP 标记对二倍体月季 (Rosa multiflora hybrids.) 作出了第一张月季遗传图谱^[7], 定位了粉红色花基因 (Blfa) 和重瓣花基因 (Blfo); Debener 等在此基础上用 SSR、RFLP、SCAR 标记定位了黑斑病抗性基因 (Rdr1)^[8]; Rajapakse 等对四倍体月季建立遗传连锁图, 定位了多刺基因和苹果酸脱氢酶基因^[9]; Crespel 等发表的单倍体月季的 AFLP 图谱, 定位了多刺、重瓣花、四季开花基因^[10]。应用 AFLP、SSR、PK、RGA、RFLP、SCAR 结合形态标记, 采用上述步骤有望克隆月季的经济性状相关基因^[11]。

1.4 表型差异克隆在月季功能基因分离上的应用

表型克隆法是根据表型差异或组织器官特异表达产生的差异来克隆基因, 既以 mRNA 为起始材料, 利用

RT-PCR 和接头技术, 对差异显示的基因带纹进行回收后作探针, 在 cDNA 或基因组 DNA 文库中扫描筛选新的基因。表型差异克隆方法很多: 有消减杂交法 (Subtractive hybridization)、DNA 标签法 (DNA tagging)、差别显示技术 DDRT-PCR (Differential display)、cDNA 差分分析法 (RDA)、标签接头竞争 PCR 技术 (ATAC-PCR)、抑制消减杂交法 (suppression subtractive hybridization, SSH)、基因表达连续分析法 (SAGE)、cDNA 3' 端限制酶切片显示法 (RFD)、基因表达指纹 (gene expression fingerprinting, GEF)、缺陷互补和反义 mRNA 技术等等。这些技术省去了分子标记定位分析的繁琐程序, 并同时能分离多个未知产物的差异表达基因。谢吉容等利用抑制消减杂交技术分离到月季花色苷调控基因 RhMYB1 基因 (待发表)。

1.5 cDNA 微阵列和基因芯片在月季功能基因分离上的应用

cDNA 微阵列和基因芯片是用 Reverse Northern 斑点杂交来检测基因表达差异的技术, 它把代表不同的待测基因的 cDNA 或特异的寡聚核苷酸固定在固相支持物上, 并与来自不同细胞、组织或同一细胞不同状态下的 DNA 探针或 cDNA 探针进行杂交, 然后用特殊的检测系统对每个杂交点进行定量分析, 杂交信号的有无或强弱反映了其所代表的基因在不同细胞、组织或器官中的表达状况。这样就可以以定量的方式同时对大量基因的表达差异进行对比分析, 筛选出差异表达基因。cDNA 微阵列和基因芯片技术的优越性是十分明显的, 它解决了表达差异克隆方法所面临的富集与扣除之间的矛盾, 目前已经在文库筛选、转录调控、植物抗逆性研究等领域得到了越来越广泛的应用并获得了巨大成功, 将来必将成为该领域的技术主流。Guterman Inna 等运用基因芯片分析了浓香型月季 Fragrant Cloud 与 Golden Gate 花香基因表达差异, 筛选出了 GhMYB26-like、GhMYB9-like 转录因子和倍半萜合成酶基因的 EST^[12], 为其全长克隆奠定基础。

植物基因克隆已经发展起来许多成熟的方法和技术, 这些方法和技术都有各自独特的优点和局限性, 所以将不同方法有机地结合起来不失为一种良策。现在已有实验室将 cDNA 微阵列技术与 RDA 或 SSH 相结合, 作为 RDA 及 SSH 产物的鉴定技术, 为筛选差异表达基因提供了快速有效的方法。

2 月季功能基因研究

在月季上采用不同的技术已经克隆了 18 个基因的编码区 (cds) 全长 (见表 1), 253 个功能基因片段。这些基因主要是与月季花色花香代谢、衰老、抗病相关的基因。这些基因的克隆为进一步利用基因工程技术改良月季的观赏性状、延长瓶插时间奠定了基础。

2.1 月季花色代谢基因研究

花色与花瓣细胞中的色素种类、色素含量、花瓣内部或表面构造引起的物理性状等多种因素有关,但色素起主要作用。与花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,其中叶绿素的含量很少,类胡萝卜素或水溶性类黄酮含量很高,水溶性的类黄酮类花色苷可产生从浅黄到蓝紫的全部颜色范围。

已克隆的具有 CDS 全长的月季基因表

| 功能类型 | 缩写名和登陆号 | 功能基因名 |
|------|------------------|---|
| 花色 | CHS (AB038246) | 苯基苯乙酮合成酶(R. hybrid cultivar Cardinal'CHS mRNA for chalcone synthase) |
| 相关 | RhGT1(AB201048) | 月季花色素葡萄糖转移酶基因 RhGT1 (R. hybrid cultivar RhGT1 for UDP-glucose: anthocyanidin 5, 3-O-glucosyltransferase) |
| 基因 | RhGT2(AB201049) | 月季花色素葡萄糖转移酶基因 RhGT2 (R. hybrid cultivar RhGT2 mRNA for UDP-glucose: anthocyanidin 5, 3-O-glucosyltransferase) |
| | RhGT3(AB201050) | 月季花色素葡萄糖转移酶基因 RhGT3 (R. hybrid cultivar RhGT3 mRNA for UDP-glucose: anthocyanidin 5, 3-O-glucosyltransferase) |
| | RhGT4(AB201051) | 月季黄酮醇葡萄糖基转移酶基因 (Rosa hybrid cultivar RhGT4 mRNA for UDP-glucose: flavonol 3-O-glucosyltransferase) |
| | NHX (AB199912) | 月季液泡膜 Na ⁺ /H ⁺ 通道蛋白基因(Rosa hybrid cultivar NHX mRNA for vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter) |
| | FLS(AB038247) | 月季黄酮醇合成酶(Rosa hybrid cultivar Cardinal'FLS mRNA for flavonol synthase) |
| | DFR(D85102) | 月季二氢黄酮醇 4 还原酶(Rosa hybrid mRNA for dihydroflavonol 4-reductase DFR) |
| 花香 | PAAS (DQ192639) | 月季苯乙醛合成酶基因 PAAS(Rosa hybrid cultivar Fragrant Cloud phenylacetaldhyde synthase) |
| 相关 | oomt4 (AJ439744) | 月季甲基间苯二酚-O-甲基转移酶基因 oomt4(Rosa hybrid mRNA for orcinol O-methyltransferase oomt4) |
| 基因 | oomt3 (AJ439743) | 月季甲基间苯二酚-O-甲基转移酶基因 oomt3(Rosa hybrid mRNA for orcinol O-methyltransferase oomt3) |
| | AAT1(AY850287) | 月季甲基间苯二酚-O-甲基转移酶基因 OOMGT2(Rosa hybrid cultivar orcinol O-methyltransferase (OOMGT2)) |
| | OOMT2(AF502434) | 月季甲基间苯二酚-O-甲基转移酶基因 OOMGT1(Rosa hybrid cultivar orcinol O-methyltransferase (OOMT1)) |
| | OOMT1(AF502433) | |
| 衰老相关 | CTR1 (AY032953) | 月季乙烯受体基因 Rh-ETR1(Rosa hybrid cultivar CTR1-like protein kinase (CTR1)) |
| 基因 | ACS(AY378152) | 月季乙烯合成酶(Rosa hybrid cultivar Cardinal'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) |
| 抗性相关 | RAG (U43372) | 月季白粉病抗性基因(Rosa hybrid AGAMOUS protein (RAG)) |
| 基因 | COP1 (AF394913) | 月季广谱抗性基因 锌指蛋白 COP1(Rosa hybrid cultivar photoregulatory zinc-finger protein COP1) |
| 反转座子 | RhTIR5(AY860315) | 月季反转座子(Rosa hybrid cultivar terminal-repeat retrotransposon in miniature Frodo) |
| 保守基因 | ATS(AF394915) | 月季 α -微管蛋白亚单位基因(Rosa hybrid cultivar alpha tubulin subunit Mrna) |

月季花色素生物合成前体为苯丙氨酸,经苯丙氨酸裂解酶(PAL)裂解成对香豆酰-CoA。对香豆酰-CoA与三分子的丙二酰-CoA 由苯基苯乙炔酮合成酶(CHS)催化形成黄色的苯基苯己烯酮。Tanaka Y 和 Yonekura K 克隆了 CHS,其全长 cDNA 有 1 474 bp,与矮牵牛的 CHS 基因的全长 cDNA 的核酸序列有 82% 的同源性^[13]。黄色苯基苯己烯酮异构化形成无色的黄烷酮。此步骤可缓慢自发进行,但在苯基苯乙炔酮—黄烷酮异构酶(CHI)催化下可加速完成。Liu Q L 等同源克隆了月季 CHI 的部分片段,其全长 CDS 还没有成功分离。在黄烷醇合成酶催化下,黄烷酮在 3' 位置羟基化形成无色的二氢黄酮醇。Tanaka Y 和 Yonekura K 分离了黄烷醇合成酶基因 FLS^[13]。二氢黄酮醇由二氢黄酮醇还原酶(DFR)催化进一步还原形成无色花色素。月季 DFR 全长 cDNA 有^[14]。无色花色素转变成有色的花色素,目前在月季上催化这一步的花色素合成酶基因 ANS 还未成功分离。花色素在液泡中不稳定,在经过糖基化修饰后就相对稳定。月季糖基化修饰不同于其他植物花色苷的形成,只需要一个 GT 基因编码的葡糖基转移酶就能完成两个不同位点的糖基化修饰。而 Kanno Y 等发现月季有 RhGT1、RhGT2、RhGT3 等位基因编码花色素-5', 3'-O-葡糖转移酶和 RhGT4 编码的黄烷醇-3'-O-葡糖转移酶转移酶分别在不同位点完成糖基化^[15]。花色苷与助色素一起在不同 pH 值的液泡液中,使月季呈现

从红到紫红到兰色的一系列花色。较低 pH 时花趋向于显红色, pH 较高时趋向于白色, pH 接近于 7 时则显蓝色。Kagami T 和报道 pH 月季液泡值受液泡膜 Na⁺/H⁺ 通道蛋白基因 RhNHX 的表达差异调控。月季液泡膜 Na⁺/H⁺ 通道蛋白基因 RhNHX1cDNA 有 2 080bp,编码 543 个氨基酸的肽链,与拟蓝芥 AtNHX1 的氨基酸具有 74.1% 的同源性。NaCl 能诱导月季 RhNHX1 的表达,有利于花色素的积累^[6]。

2.2 月季花香代谢基因研究

月季的香味源于 400 多种挥发性的物质,这些香味物质有酚、醇、酯、芳香醚和其他的醇、醛等的衍生物。用 GC 及 GC/MS 法分析不同的香月季品种,花香成分有差异。总的来说被识别的挥发性酯主要有乙酸苯乙酯、乙基乙酸酯、香叶醇乙酸酯、香茅醇乙酸酯等,其中诸如乙酸酯香叶醇乙酸酯、乙酸苯乙酯这样的挥发性酯是月季的重要组成部分;醇类有苯甲醇、苯乙醇等芳香醇和芳樟醇、香叶醇、橙花醇等萜烯醇;还有玫瑰醚。苦水玫瑰油还含有较多的 2—十二烷酮、2—十三烷酮、2—十四烷酮、2—十五烷酮,使之显油脂气。芳香醇和萜烯醇类化合物分别来源于莽草酸和甲瓦龙酸途径。但是月季花香具体的代谢步骤还不清楚,相关的功能基因研究也初浅。

Kaminaga Y 等分离了月季苯乙醛合成酶基因 PAAS,它与矮牵牛的 PAAS 具有很高的同源性。月季苯乙醛合成酶具有双生化功能,专一性地催化苯基丙

氨酸脱羧和氧化生成芳香物质苯乙醛^[7]。

Shalit M 等分离了月季的苯甲醇乙酰转移酶基因 BAAT 和香叶醇/香茅醇乙酰转移酶基因 RhAAT, 其编码乙醇乙酰转移酶(AAT)将乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到醇上, 催化各种醇形成各种芳香酯^[18]。

月季甲基间苯二酚-O-甲基转移酶基因 OOMT 是一个基因家族, Lavid N 等在月季中分离到 OOMT1 和 OOMT2, 与罗勒、苜蓿的 IOMT 有较高的同源性。该基因编码的 O-甲基转移酶能催化多种酚类底物, 生成多种挥发性诸如间苯二酚双甲酯的苯酚类衍生物, 例如能催化多种现代月季的重要香气成分酚甲醚-3,5-二甲氧基砜的形成^[1]。Salliet G 等发现 OOMT 基因存在于产和不产酚甲醚的月季品种中, 但只在产酚甲醚的月季品种的花瓣表皮细胞中表达, 说明 OOMT 基因的上调表达是月季花香形成的关键步骤。另外, 间苯三酚-O-甲基转移酶基因 POMT 编码的酶催化间苯三酚形成 3,5-二羟基苯甲醚, 再经 OOMT 催化生成 3,5-二甲氧基酚最后生成具有芳香的 1,3,5-三甲氧苯^[19]。

2.3 月季衰老相关基因研究

植物衰老是一种程序化器官死亡过程, 涉及许多基因的关闭与表达。月季品种也是易于衰老的切花品种, 观赏寿命较短, 易发生花头下垂、花瓣变色等现象。虽然月季乙烯代谢类型和乙烯敏感性比较复杂, 但在衰老过程都伴随着乙烯合成酶基因(ACS)和乙烯氧化酶基因(ACO)表达增加, 内源乙烯含量上升。ACS 基因 cDNA 全长 1750bp, 编码 480 个氨基酸的多肽, 具有 5-磷酸吡哆醛结合位点, 与其他植物的 ACC 合成酶有相同的功能域, ACS 随花的成熟和衰老表达增加^[5]。乙烯诱导一系列与花开放和植物衰老的生理反应。月季不同品种瓶插寿命差异的原因, 既与现代月季的杂交起源及其复杂的品种基因型的差异有关, 还可能与不同品种的乙烯受体基因家族的不同成员对乙烯的不同响应有关。Ma N 等发现在月季切花中不仅存在乙烯受体基因 ETR1, 还可能存在着 ETR1 家族其它成员(如 ETR2)^[20]。乙烯诱导其受体基因 Rh-ETR1/Rh-ETR3 和 tRh-CTR1/Rh-CTR2 的表达, 再通过信号传导引发与衰老相关的生理反应。Fukuchi-Mizutani M 等发现月季 δ -9 脱饱和酶基因在月季花瓣衰老过程中降解膜脂饱和脂肪酸起重要作用^[21]。

2.4 月季抗病基因研究

月季易感根腐病、黑斑病、白粉病等病害。野生月季资源中有许多抗病基因, 从抗性种质中分离抗病基因是抗病机理研究和抗病品种培育的基础。Chmelnitsky I 等克隆了白粉病抗性基因 RAC^[22]。Owen C A 和 Mueller R 克隆了广谱抗性基因锌指蛋白 COP1^[23]。Hattendorf A 和 Debener T 分离了月季抗黑斑病基因 brp41 的 664bp 的

DNA 片段, 为以后克隆其全长奠定了基础。

3 月季转基因育种现状和前景

月季转基因的研究水平相对较低, 但在很多品种都成功诱导愈伤组织, 建立了完善的遗传转化体系; 在新西兰、美、法、日本等国已经得到了转基因植株。Firoozabady 等(1991)首次成功地进行了农杆菌介导的月季转化。他们以 *R. hybrida* CV. Royal — y 为供试材料, 将其胚性愈伤与含有 pnos NPT II/p35S LUC 质粒的致瘤农杆菌 LBA4404 或与含有 pnos NPT II/p35SGUS 质粒的发根农杆菌 15834 共培养, 得到了很高转化愈伤频率, 即约产生 40~60 个/g 独立的抗卡那霉素愈伤, 通过 LUC 或 GUS 和 PCR 技术检测, 几乎 100% 的抗性愈伤为转化愈性^[24]。Firoozabady 等(1994)又报道, 这些转化的胚性愈伤转移到成熟培养基后产生转基因植株, 约 100 多株转基因植物移植温室, 生长正常, 能开花^[25]。Vander Salm 等(1996)成功地进行 *R. hybrida* cv. Moneyway 的基因转化, 根、茎与致瘤农杆菌 GV3101(与含有 npt II 基因)或与发根农杆菌(含有 rol 基因)共培养, 结果得到再生的转基因植株^[27]。Marchant 等(1998 年)通过基因枪法转化 *R. hybrida* cv. Glad Tidings 的胚性愈伤的体系, 得到转基因株^[28]。同年, Marchant 等(1998b)成功地将几丁质酶基因导入月季, 减少黑斑病发生率 13%~43%^[28]。Li X 等以农杆菌介导的实现了广谱抗性 Ace-AMP1 基因转化, 获得了抗白粉病的阳性转化苗^[29]。Forigene 公司曾计划于 1994 年 8 月至 1995 年 8 月向大田投放 150 株转编码查尔酮酶基因的杂交茶香月季植株, 计划在 1994 年或 1995 年的秋天至 1997 年年底向大田投放 1200 株转蓝色基因的月季(*Rosa hybrida*)植株, 可能由于商业上的秘密, 有效的月季转基因方法还处于保密状态。直到 2004 年 6 月 30 日, Florigene 公司和 Suntory 公司才联合发布了真正的蓝色玫瑰品种培育成功的消息, 这是世界上第一个通过转化矮牵牛的 F3'/5'H 基因技术培育的真正蓝色玫瑰。中国月季转基因研究才刚刚起步, 高莉萍、李敬蕊等建立了萨曼莎的转化体系^[30,31]。郑玉梅通过转化 ETR1 反义基因干扰乙烯信号传导, 获得培育瓶插期长品系的转基因材料^[32]。

近年来在月季的组培和转化方面取得了很大的进展, 但从中也可看到, 月季的再生受基因型的影响很大, 不同的品种在愈伤诱导、胚状体发及芽器官等的发生方面差异很大, 且只有少数的品种能获得相对高频率的再生植株, 然而作为月季抗性育种重点的抗病、抗旱、抗盐碱是多基因控制, 需转入多个基因才可能得到较满意的结果, 加大了转基因成功的难度。

总之, 随着功能基因研究技术的发展, 月季功能基因研究会不断深入, 会有越来越多功能基因被分离和鉴定, 对其在月季发育中的时空表达特点有更细致的研

究。随着越来越多品种愈伤组织的成功诱导,遗传转化体系的不断完善,转基因研究在月季育种中将会有较大的突破。

参考文献

- [1] Gudín S. Rose genetics and breeding[J]. Plant Breed Rev, 2000, 17: 159-189.
- [2] Yokoya K, Roberts A V, Mottley J et al. Nuclear DNA amounts in roses[J]. Ann of Bot 2000 85: 557-561.
- [3] Lavid N, Wang J H, Shalit M, et al. O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals[J]. Plant Physiol. 2002 129(8): 1899-1907.
- [4] Wu S Q, Watanabe N, Mita S, et al. The Key role of phloroglucinol O-Methyltransferase in the biosynthesis of Rosa chinensis volatile 1, 3, 5-trimethoxybenzene[J]. Plant physiol. 2004, 135(5): 95-102.
- [5] Wang D, Fan J, Ranu R S. Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA from rosa(Rosa hybrida)[J]. Plant Cell Rep., 2004, 22(6): 422-430.
- [6] Iwata H, Kato T, Ohno S. Triparental origin of Damask roses[J]. Genes 2000, 259(12): 53-61.
- [7] Debener T, Mattiesch L. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 891 - 899.
- [8] Debener T, Mattiesch L, Vosman B. A molecular marker map for roses[J]. Acta Hortico 2001, 547: 283-287.
- [9] Rajapakse S, Byrne D H, Zhang L et al. Two genetic linkage maps of tetraploid roses[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 575-583.
- [10] Crespel L, Chirillet M, Durel E, et al. Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in Rosa using AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2002 105: 1207-1214.
- [11] Yan Z, Denneboom G, Hattendorf A, et al. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers[J]. Theor Appl Genet, 2005 110: 766-777.
- [12] Guterman I, Shalit M, Menda N, et al. Rose Scent: Genomics approach to discovering novel floral fragrance Related Genes[J]. The Plant Cell. 2002, 14(10): 2325-2338.
- [13] Tanaka Y, Yonekura K. Rose flavonoid biosynthesis genes[M]. Published Only in NCBI Database, 2003.
- [14] Tanaka Y, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani, et al. Molecular cloning and characterization of Rosa hybrida dihydroflavonol 4-reductase gene[J]. Plant Cell Physiol, 1995, 36(6): 1023-1031.
- [15] Ogata J, Kanno Y, Itoh Y. Plant biochemistry: Anthocyanin biosynthesis in roses[J]. Nature, 2005, 435(9): 757-758.
- [16] Kagami T, Suzuki M. Molecular and functional analysis of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene(RhNHX1) of Rosa hybrida[J]. Genes Genet

Syst. 2005, 80(2): 121-129.

- [17] Kaminaga Y, Schnepf J, Peel G, et al. Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation[J]. J Biol Chem., 2006, 281(33): 23357-23366.
- [18] Shalit M, Guterman I, Volpin H, et al. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A: geraniol/ citronellol acetyltransferase in developing rose petals[J]. Plant physiol. 2003, 131(4): 1868-1876.
- [19] Scalliet G, Journot N, Jullien F, et al. Biosynthesis of the major scent components 3, 5-dimethoxytoluene and 1, 3, 5-trimethoxybenzene by novel rose O-methyltransferases[J]. J Exp Bot., 2006, 57(11): 2763-2773.
- [20] Muller R, Owen C A, Xue Z T. Characterization of two CTR-like protein kinases in Rosa hybrida and their expression during flower senescence and in response to ethylene[J]. J Exp Bot., 2002, 53(371): 1223-1228.
- [21] Ma N, Tan H, Liu X, et al. Transcriptional regulation of ethylene receptor and CTR genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (Rosa hybrida) cv. Samantha[J]. J Exp Bot., 2006, 57(11): 2763-2773.
- [22] Fukuchi-Mizutani M. Senescence-induced expression of a homologue of delta 9 desaturase in rose petals[J]. Plant Mol Biol., 1995 29(4): 627-635.
- [23] Chmelitsky I., Zieslin N., Khayat E., et al. Complete cDNA sequence encoding AGAMOUS gene (RAG) from Rosa x Hybrida cv. Ilseta [M]. Published Only in NCBI Database, 1999.
- [24] Firoozabady E, Lemieux C S, Moy Y S, et al. Genetic engineering of ornamental crops[J]. In Vitro 1991, 27: 96.
- [25] Firoozabady E, Moy Y S, Courtney-gutterson N, et al. Regeneration of transgenic rose (Rosa hybrida) plants from embryogenic tissue[J]. Biotechnology, 1994 12: 609-613.
- [26] Marchant R, Power J B, Lucas A, et al. Biolistic transformation of rose (Rosa hybrida L.) [J]. Ann Bot., 1998, 81: 109-114.
- [27] Marchant R, Davey M R, Lucas J A, et al. Expression of a chitinase transgene in rose (Rosa hybrida L.) reduces development of blackspot disease (Diplocarpon rosae Wolf.) [J]. Mol Breeding, 1998(4): 187-194.
- [28] Van der Salm TPM, Bouwer R van Dijk AJ, et al. Stimulation of scion bud release by rol gene transformed rootstocks of Rosa hybrida L. [J]. J Exp Bot, 1998, 49: 847-852.
- [29] Li X, Gasic K, Cammue B, et al. Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene Ace-AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (Sphaerotheca pannosa) [J]. Planta., 2003, 218(2): 226-232.
- [30] 郑玉梅. 月季再生体系与 pBinETR1 转化初探[D]. 北京: 中国农业大学 2004 76.
- [31] 高莉萍. 月季品种 萨蔓莎 植株再生体系的建立和根癌农杆菌介导的遗传转化研究[D]. 武汉: 华中农业大学 2005: 79.
- [32] 李敬蕊. 月季再生体系的建立及叶盘法转化月季 萨蔓莎 的研究[D]. 武汉: 华中农业大学 2006 : 85.

Reviews on Functional Genes of Rosa

XIE Ji-rong^{1,3}, CHENG Zai-quan², TANG Kai-xue², HUANG Xing-q², LIANG Guo-lu³

(1. Department of Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences Yongchuan 402168, China; 2. Yunnan Academy of Agricultural Sciences Kunming 650223, China; 3. College of Horticulture and Gardens Southwest University, Chongqing, 400715, China)

Abstract: Rose is the queen of flowers and one of the economically most important groups of ornamental plants. Research works on identification methods of functional genes of rose have been reviewed. Advance of genes involved in rose floral color and fragrance metabolism and genes related to senescence and resistance have been analyzed. This review aims to use these agronomic genes to breed novel cultivars with variety of color and fragrance and longevity and adversity resistance. The development prospect for rosa gene transformation has been estimated.

Key words: Rose; Floral color gene; Floral fragrance gene; Senescence gene; Resistance gene