

植物花香的基因工程研究进展

张 晶¹, 武荣花^{1*}, 张和臣²

(1. 河南农业大学 林学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 园艺研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 花香作为植物的一种重要性状, 不仅能提高植物的观赏价值, 而且在引导昆虫授粉、抵御各种生物胁迫和非生物胁迫中也具有重要作用。通过对花香挥发物种类、合成途径、合成相关基因及转基因研究等方面的简要综述, 分析了花香基因工程的研究现状与发展前景。

关键词: 花香挥发物; 合成途径; 合成基因; 基因工程

中图分类号: S336 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)04-0011-06

Research Advance in Genetic Engineering of Floral Fragrance

ZHANG Jing¹, WU Rong-hua^{1*}, ZHANG He-chen²

(1. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Horticulture Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Floral fragrance is one of the most important characters of plants, it not only increases the ornamental value of plants, but also plays an important role in guiding the insect pollination, resisting all kinds of biotic stress and abiotic stress. This paper summarized the kinds, biosynthetic pathway, synthesis-related genes, genetic modification of aroma volatiles in flower, and analyzed the research status and development prospect of genetic engineering of floral fragrance.

Key words: aroma volatiles in flower; biosynthetic pathway; synthesis-related genes; genetic engineering

花香物质是由部分挥发性次级代谢物组成的混合物, 这些挥发性化合物 (volatile organic compound, VOC) 是一类具有芳香气味且分子量低 (一般小于 300 Da) 的亲脂性物质, 能刺激人类的嗅觉细胞产生愉悦感, 提高植物的观赏价值^[1-2]。植物体的部分营养器官及花器官的各个部分都可以散发芳香物质, 但对于大多数植物来说花瓣是主要的散发芳香源^[3]。花香也是一种重要的化学信号, 对于虫媒植物而言, 花香比花色更有助于昆虫甄别植物的所处位置^[2], 植物通过产生不同的花香挥发物形成各自独特的香味, 吸引特定的昆虫前来授粉^[4]。花香除了具有吸引和引导传粉者的主要功能外^[5-9], 也用于防护和抵御来自生物与非生物的胁迫 (如食草性动物的伤害、病原体侵袭、高温及氧化胁迫等)^[10-11]。

1 花香物质的种类及生物合成途径

由于花香挥发物种类较多, 生物合成途径较为复杂, 因此对花香物质成分的检测具有重要意义。目前, 已有多种技术手段应用于花香混合物的检测, 其中顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联检 (HS-SPME-GS-MS) 技术是最流行的测定方法^[12], 但也有研究指出其不够准确^[13]。红外光谱 (IR) 和核磁共振 (NMR) 也常被用于花香挥发物的检测。近年来, 人们开始应用一种新的检测装置“电子鼻” (electronic nose) 对花香物质进行定性定量辨识^[14]。

目前, 已有 2 000 多种花香物质从 90 个属 991 种植物类群中被鉴定出来^[2, 15], 其中, 主要包括烷烃类、烯类、醇类、醛类、酮类、醚类、脂类及芳香族化合

收稿日期: 2013-11-16

作者简介: 张 晶 (1987-), 女, 河南上蔡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 园林植物遗传育种。E-mail: xiamu1231@126.com

* 通讯作者: 武荣花 (1964-), 女, 河南叶县人, 副教授, 博士, 主要从事花卉栽培生理方面的研究。

E-mail: wuronghua06@126.com

物等,依据生物合成途径将它们分为萜类化合物、芳香族化合物(苯基/苯丙烷类)、脂肪酸衍生物 3 类,这 3 类物质分别由不同的酶催化完成相应的合成途径。

萜类化合物是一类以异戊二烯单元为基本骨架组成的天然烃类化合物^[16],是第一大类花香物质。根据所含异戊二烯的数目,萜类物质被分为单萜、倍半萜、双萜、三萜、四萜、多萜及不规则萜^[17]。其中,单萜和倍半萜是植物中最常见的萜类花香挥发物。萜类化合物的合成通过类异戊二烯途径完成,单萜与倍半萜合成前体分别是来自质体与细胞质的异戊烯基二磷酸(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)。然后,IPP 和 DMAPP 分别在质体和细胞质中进一步合成单萜底物牻牛儿基二磷酸(GPP)和倍半萜底物法尼基二磷酸(FPP),最后,在多种萜类合成酶的催化作用下生成各种萜类物质^[18]。

芳香族化合物的合成,先由底物苯丙氨酸在苯丙氨酸裂解酶(PAL)催化作用下形成肉桂酸,然后经过甲基转移酶和酰基转移酶的甲基化和酰化作用,形成一系列的挥发性化合物^[19]。

脂肪酸衍生物作为又一种花香物质,其研究相对较少。在脂肪酸衍生物的合成途径中,主要的调控酶是脂肪氧化酶(LOX),其作为脂肪酸代谢的关键酶,通过催化以亚油酸、亚麻酸等 C16、C18 不饱和脂肪酸等为底物的异构过氧化反应,生成短链烃类。

萜类、苯基/苯丙烷类不仅是植物主要的花香物质,且与类胡萝卜素、花青素等其他次生代谢产物具有相似的合成途径,只在各自关键酶合成最终产物时才分开进行。因此,在底物含量一定的条件下,可以直接引入催化花香物质合成的酶基因,通过提高产物的合成速率来增加花香物质的产量^[20],即增强花香物质在合成途径中的竞争力度。

2 花香物质的合成基因

植物的花香物质是由多种挥发性化合物混合形成的,但不同植物花香混合物的成分及含量各不相同,受到各自基因型的调控。植物体中,花香挥发物的形成是由调节基因通过调控结构基因编码相应的合成酶,来完成不同挥发性物质的生物合成。因此,花香挥发物不仅存在种、属和品种的差异性,且同一植物的不同器官之间也存在化合物种类和含量的差异。

2.1 花香物质合成的结构基因

结构基因是指不同植物共同具有的直接编码物质代谢中生物合成酶的基因。近年来,对花香物质形成的生物化学和分子生物学的研究主要围绕着金

鱼草(*Antirrhinum majus*)、仙女扇(*Clarkia breweri*)、月季(*Rosa hybrida*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)这几个花香成分主要由萜类和苯丙烷类化合物组成的植物种类开展^[2]。因此,在结构基因的分离和克隆上主要以合成这两大类物质的合成酶基因为主。

Knudsen 等^[2]构建的植物列表中,70%的植物花香混合物都含有芳樟醇、 β -罗勒烯及月桂烯这 3 种单萜类花香化合物。它们分别是在 S-芳樟醇合成酶(LIS)、 β -罗勒烯合成酶(β -ocimene synthase)及月桂烯合成酶(myrcene synthase)的作用下以 GPP 为底物催化合成的。柳叶菜科仙女扇中分离出的芳樟醇合成酶是第 1 个被分离出的与花香合成相关的酶^[21]。随后,Dudareva 等^[22]根据纯化出的该酶克隆出了 S-芳樟醇合成酶基因。在拟南芥和金鱼草中发现了属于萜烯合成酶家族 Tps-g 亚家族的罗勒烯合成酶和月桂烯合成酶,并已运用功能基因组学的方法成功分离克隆了金鱼草中的 β -罗勒烯合成酶基因和月桂烯合成酶基因的全长 cDNA^[23]。这 2 个合成酶基因不仅在氨基酸序列上具有较高的同源性^[24],且在表达上也符合单萜合成酶基因表达受生物钟调节的特点,其表达量和产物都呈现午后高、夜间低的昼夜交替规律^[25-26]。此外,利用功能基因组学的方法从现代月季(*Rose hybrida*)中克隆出了大牻牛儿烯 D 合成酶基因,该基因通过编码大牻牛儿烯 D 合成酶,控制倍半萜大牻牛儿烯 D 的合成^[27]。

矮牵牛的花香混合物由多数苯基/苯丙烷类挥发性有机化合物组成。*phBSMT1*、*phBSMT2*、*ph-BPBT*、*phIGS1*、*phCFAT* 等是矮牵牛中已鉴定出的与苯基/苯丙烷类化合物合成相关的结构基因^[28]。其中,*phBSMT1* 和 *phBSMT2* 属于 BSMT 基因家族,其编码一种多底物合成酶苯甲酸/水杨酸羧基位甲基转移酶(BSMT),该酶分别以苯甲酸和水杨酸为前体,合成苯甲酸甲酯和水杨酸甲酯这 2 种挥发物^[29-30]。在野生烟草中也克隆出了这种多底物合成酶基因(BSMT)^[31]。从仙女扇和多花黑蔓藤中克隆的 *SAMT* 基因^[32-33]以及金鱼草中克隆的 *BAMT* 基因^[34]与 BSMT 基因在氨基酸序列上有一定的同源性^[31,34],但不同的是前两者所编码的酶均为单底物酶,只能催化单一的底物合成相应的挥发物。从矮牵牛中克隆的 *phIGS1* 基因可以编码异丁子香酚合成酶合成异丁子香酚^[35],异丁子香酚不仅是一种花香挥发物,也是甲基异丁子香酚的合成前体,在 *IEMT* 基因编码的异丁子香酚-O-甲基转移酶的催化作用下进行甲基异丁子香酚的合成^[36]。

Wang 等^[36]利用纯化出的 IEMT 酶的氨基酸序列筛选 cDNA 文库得到了完整的 IEMT 基因。挥发性脂类是虫媒花的主要组成成分,有助于吸引昆虫帮助植物授粉。从仙女扇、啤酒花中克隆出的 BEAT 基因,编码催化挥发性乙酸苄酯合成的苯甲醇乙酰转移酶^[37-38]。此外,还有 BEBT、POMT、OOMT1、OOMT2 等与苯基/苯丙烷类化合物合成相关的结构基因从仙女扇、月季中分离克隆出来^[39-41]。随着模式植物仙女扇、月季、金鱼草、矮牵牛中花香物质合成关键酶基因的克隆及其表达研究的深入,已知结构基因的同源克隆也逐渐在各种植物中展开。

2.2 花香物质合成的调节基因

花香物质的合成除了受到结构基因的直接作用外,还受到调节基因的调控。调节基因主要通过调节结构基因的表达来影响花香物质的合成,如转录因子类。转录因子也称反式作用因子,是能够与基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用,从而调控基因特定表达的蛋白质分子^[42]。转录因子在植物次生物质代谢方面具有重要的调控作用,合成酶基因的转录激活是最重要的调节环节之一。转录因子通过激活植物次生代谢物合成途径中多个合成酶基因的表达,可有效启动次生代谢物合成途径,从而调节特定次生代谢物质的合成^[43]。Verdonk 等^[44]在矮牵牛中发现了一个属于 R2R3-type MYB 转录因子家族的基因 ODORANT1 (ODO1),其调节苯型烃类挥发性物质的生物合成,其表达受抑制时能明显降低苯型烃类花香成分的释放水平。Spitzer-Rimon 等^[45]近期发现了另一个类 R2R3-MYB 的转录因子基因 EMISSION OF BENZENOIDES II (EOB II),与 ODO1 功能类似参与调节苯丙酸类物质生物合成酶的表达。

3 花香基因工程研究

3.1 花香基因的分离

3.1.1 功能克隆 功能克隆是根据基因的功能加以分离,即通过对基因蛋白产物的氨基酸序列分析,利用反向遗传技术筛选出目标基因的核苷酸序列^[46]。早期对模式植物结构基因的克隆多采用此方法,如 Wu 等^[40]采用这种方法分离了 *Rosa chinenses* 的 POMT 酶,根据氨基酸序列设计兼并引物,用 RACE 技术克隆了 POMT 基因 cDNA 全长。类似的方法也被应用于 OOMT1 和 OOMT2 的分离^[41]。

3.1.2 同源克隆 基于目的基因的保守序列设计兼并引物,从植物中分离染色体 DNA(RNA)进行

PCR 特异性扩增,该方法多被运用于不同植物中已知花香基因的克隆。张雪荣^[47]利用 RACE 法克隆出了薰衣草 (*Lavandula pedunculata*) 中的 Llis 基因,该基因属于芳樟醇合酶基因家族。矮牵牛 (*Pe-tunia hybrida*) 花香基因 BSMT3 和腊梅 (*Chimonanthus praecox*) 花香基因 SAMT 的克隆均是根据已知目的基因片段设计兼并引物,通过 RT-PCR 的方法获得^[48-49]。

3.1.3 表型差异克隆 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。表型差异克隆的方法包括:mRNA 差异显示技术 (DDRT-PCR)、抑制性消减杂交 (SSH)、基因表达序列分析法 (SAGE)、cDNA 扩增片段长度多态性技术 (cDNA-AFLP) 等。张园^[50]利用 cDNA-AFLP 技术分离桂花花香形成过程中的差异基因,获得 6 个花香合成酶基因表达片段 (TDFs),分别是 AACT、CCD4、2OGox2、C4H1、CFAT、LOX。谢吉荣等^[46]利用抑制消减杂交技术分离调控月季次级代谢的 *RhMYBI* 基因。

3.2 花香基因工程育种

随着花香物质相关基因的分离和克隆,通过基因工程育种(包括外源基因的导入和内源基因的调控),改良观赏植物由于花色、花型及切花采后保鲜方面的研究所造成的花香的缺失,成为植物育种的新方向。

3.2.1 导入外源基因 直接引入外源基因是基因工程的一种方式。主要通过引入外源相关合成酶基因使受体植物合成本身不具有的花香挥发物,或促使基因超表达提高花香挥发物的合成量。Pellegrineschi 等^[51]利用发根农杆菌将 LIS 基因转化到柠檬天竺葵中,对转基因植株中芳香物质含量进行测定,发现转化株中芳香物质含量均有增加,其中牻牛儿醇的含量是非转化株的 2.0~4.4 倍。在康乃馨及矮牵牛的 LIS 基因转化试验中发现,LIS 基因虽然在转基因植株中得到表达,但转基因植株本身气味变化不大^[52-53]。在洋桔梗的转化试验中,将外源 BETA 基因导入洋桔梗,得到的转基因洋桔梗在外施苯甲醇的条件下,其花和叶子中释放出的乙酸苄酯量与非转基因洋桔梗相比提高了 5~7 倍。而在不施加苯甲醇时,二者皆无乙酸苄酯产生,说明当底物存在且 BETA 超量表达时,有助于洋桔梗花香物质乙酸苄酯的产生^[54]。上述结果表明,直接引入外源基因可在一定程度上改变植物香味,但有时易出现外源基因表达但无挥发物产生,或挥发物的产生需要辅助施加外源底物的现象。

除了直接引入外源结构基因外,还可以引入调节基因来改变受体植物的花香组成。MYB 类转录因子作为一种重要的转录因子,调控着植物体中多种代谢途径。Ben Zvi 等^[55]将克隆的拟南芥 MYB 类转录因子 pap1 (production of anthocyanin pigment 1) 导入矮牵牛中,获得的转基因植株不仅花色加深,且挥发性苯丙酸类化合物的含量增加了 10 倍。同时,还发现转基因植株中苯丙酸类化合物合成前体的利用率也有所增加。说明过表达转录因子 pap1 对苯丙酸的调控产生叠加作用,从而提高挥发物的合成量。

3.2.2 调控内源基因表达 通过抑制目的性状基因的表达来调节花香物质的生成,是基因工程的另一种方式。抑制目的性状基因表达的常用方法有反义 RNA 技术和共抑制法。如 Underwood 等^[56]利用 RNA 干扰技术使矮牵牛中的 BSMT 基因沉默,在转基因植株中能够明显检测到主要花香物质苯甲酸甲酯的缺少,而且这种变化能被嗅觉轻易捕捉到。Kaminaga 等^[57]利用该技术使苯乙醛合成酶基因 (PAAS) 沉默,不仅抑制了终产物苯乙醛的产生,还引起作用底物 2-苯乙醇的消失。在留兰香 (*Mentha spicata*) 4S-柠檬烯合成酶基因 (4S-LS) 转化田野薄荷 (*Mentha arvensis*) 和辣薄荷 (*Mentha piperita*) 的试验中,发现获得的 2 株转基因田野薄荷中出现单萜含量降低的现象,说明 4S-LS 基因的引入抑制了内源基因的转录,出现了共抑制现象^[58]。将矮牵牛的 ODO1 转录调控子引入矮牵牛品种 Mitchell 中,在对转基因植株的检测中发现苯型烃类芳香化合物的释放量不仅没有增加,反而降低^[44]。这些试验结果表明,转基因试验中可以引入同源基因,利用共抑制现象控制相关基因的表达。除此之外,通过抑制其他竞争性生物合成途径,也可以有效促进植物花香化合物的合成,如花青素与苯甲酸同属于苯丙氨酸合成途径,将花青素合成途径关键酶黄酮 3-羟化酶 (F3H) 的反义序列转入康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*),得到的转基因植株中 F3H 基因的表达和酶活性大大降低,不仅改变了转基因植株的花色,还提高了花香化合物苯甲酸的合成量^[59]。

4 展望

花香的基因工程研究相对于植物其他性状(如花色、花型、抗病性)在此方面的研究起步较晚。近年来,随着花香物质代谢途径的逐渐清晰及相关合成基因的分离和克隆,花香基因工程育种也取得了部分成就。由于花香化合物种类众多且合成途径复杂,不同种属之间又存在代谢特异性,使得花香基因工程的发

展存在许多问题。比如,异源基因的表达未促使植株产生相应的花香挥发物,或合成非目标的不挥发的其他物质。说明单一基因的引入不适于复杂的代谢途径,易引起非目标代谢合成的进行。而引入转录因子调控花香物质的合成虽具有可行性,但转录因子往往对多个代谢途径都具有调节作用,易引起多个代谢途径的同步进行,从而造成植物其他性状的改变。因此,对花香物质代谢途径及其调控的深入研究将成为今后花香基因工程发展的重点。

参考文献:

- [1] 陈秀中,王琪. 中华民族传统赏花理论探微[J]. 北京林业大学学报,2001,23(增刊 1):16-21.
- [2] Knudsen J T, Eriksson R, Gershenzon J, *et al.* Diversity and distribution of floral scent[J]. The Botanical Review, 2006,72(1):1-120.
- [3] Pichersky E, Raguso R A, Lewinsohn E, *et al.* Floral scent production in *Clarkia* (Onagraceae) (I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity)[J]. Plant Physiology, 1994,106(4):1533-1540.
- [4] Raguso R A, Light D M, Pichersky E. Electroantennogram responses of *Hyles lineate* (Sphingidae; Lepidoptera) to volatile compounds from *Clarkia breweri* (Onagraceae) and other moth-pollinated flowers [J]. Journal of Chemical Ecology, 1996,22(10):1735-1766.
- [5] Dobson H E M. Floral volatiles in insect biology[J]. Insect-Plant Interactions, 1994,5:47-81.
- [6] Raguso R A. Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior[M] // Chittka L, Thomson J D. Cognitive ecology of pollination: Animal behavior and floral evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 2001:83-105.
- [7] Metcalf R L, Kogan M. Plant volatiles as insect attractants [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1987,5(3):251-301.
- [8] Robacker D C, Meeuse B J D, Erickson E H. Floral aroma: How far will plants go to attract pollinators? [J]. BioScience, 1988,38(6):390-398.
- [9] Williams N H. Floral fragrances as cues in animal behavior[M] // Jones C E, Little R J. Handbook of experimental pollination biology. New York: Van Nostrand Reinhold, 1983:50-72.
- [10] Delfine S, Csiky O, Seufert G, *et al.* Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): Monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures[J]. New Phytologist, 2000,146(1):27-36.

- [11] Loreto F, Pinelli P, Manes F, *et al.* Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves [J]. *Tree Physiology*, 2004, 24(4):361-367.
- [12] Matich A J, Rowan D D, Banks N H. Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(23):4114-4118.
- [13] Van Beek T A. Modern methods of secondary product isolation and analysis[M] // Walton N J, Brown D E. *Chemicals from plants: Perspectives on plant secondary products*. London: Imperial College Press, 1999:91-186.
- [14] Rakow N A, Suslick K S. A colorimetric sensor array for odour visualization[J]. *Nature*, 2000, 406:710-713.
- [15] Dunkel M, Schmidt U, Struck S, *et al.* SuperScent—A database of flavours and scents[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl 1):291-294.
- [16] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991:323-374.
- [17] Lichtenthaler H K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants [J]. *Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50:47-65.
- [18] Trapp S C, Croteau R B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications[J]. *Genetics*, 2001, 158(2):811-832.
- [19] Dixon R A. Natural products and plant disease resistance[J]. *Nature*, 2001, 411:843-847.
- [20] 孙明, 吕晋慧, 张启翔, 等. 花香基因工程研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(11):3169-3171.
- [21] Croteau R, Karp F. *Elsevier applied sciences*[M]. New York: Art, Science and Technology, 1991:101-126.
- [22] Dudareva N, Cseke L, Blanc V M, *et al.* Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(7):1137-1148.
- [23] Dudareva N, Martin D, Kish C M, *et al.* (E)- β -Ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new TPS-subfamily [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15:1227-1241.
- [24] 向林, 陈龙清. 花香的基因工程研究进展[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(6):2076-2084.
- [25] Chen F, Tholl D, D'Auria J C, *et al.* Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flower[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(2):481-494.
- [26] Lu S, Xu R, Jia J, *et al.* Cloning and functional characterization of a β -pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1):477-486.
- [27] 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.
- [28] Colquhoun T A, Verdonk J C, Schimmel B C J, *et al.* Petunia floral volatile benzenoid/phenylpropanoid genes are regulated in a similar manner[J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2/3):158-167.
- [29] Negre F, Kish C M, Boatright J, *et al.* Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(12):2992-3006.
- [30] Underwood B A, Tieman D M, Shibuya K, *et al.* Ethylene-regulated floral volatile synthesis in petunia corollas[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(1):255-266.
- [31] Pott M B, Hippauf F, Saschenbrecker S, *et al.* Biochemical and structural characterization of benzenoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens*[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(4):1946-1955.
- [32] Ross J R, Nam K H, D'Auria J C, *et al.* S-adenosyl-L-methionine:Salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 367(1):9-16.
- [33] Pott M B, Pichersky E, Piechulla B. Evening specific oscillation of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159(8):925-934.
- [34] Dudareva N, Murfitt L M, Mann C J, *et al.* Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(6):949-961.
- [35] Koeduka T, Fridman E, Gang D R, *et al.* Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(26):10128-10133.
- [36] Wang J, Dudareva N, Bhakta S, *et al.* Floral scent pro-

- duction in *Clarkia breweri* (Onagraceae) (II. Localization and developmental modulation of the enzyme S-adenosyl-L-methionine: (Iso) eugenol O-methyltransferase and phenylpropanoid emission)[J]. *Plant Physiology*, 1997, 114(1): 213-221.
- [37] Dudareva N, D'Auria J C, Nam K H, *et al.* Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase—An enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 14(3): 297-304.
- [38] Xie Z, Lu Y, Ge S, *et al.* Clonality in wild rice (*Oryza rufipogon*, Poaceae) and its implications for conservation management[J]. *American Journal of Botany*, 2001, 88(6): 1058-1064.
- [39] D'Auria J C, Chen F, Pichersky E. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1): 466-476.
- [40] Wu S, 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 Physiology*, 2004, 135(1): 95-102.
- [41] Lavid N, Wang J, Shalit M, *et al.* O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1899-1907.
- [42] 刘强, 张贵友, 陈受宜, 等. 植物转录因子的结构与调控作用[J]. *科学通报*, 2000, 45(14): 1465-1474.
- [43] 陈霞, 罗世巧, 段翠芳, 等. 高等植物转录因子研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2008, 14(9): 48-52, 65.
- [44] Verdonk J C, Haring M A, Tunen A J, *et al.* ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(5): 1612-1624.
- [45] Spitzer-Rimon Ben, Marhevka Elena, Barkai Oren, *et al.* *EOB II*, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in *Petunia* [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(6): 1961-1976.
- [46] 谢吉荣, 程再全, 唐开学, 等. 月季功能基因研究与应用进展[J]. *北方园艺*, 2007(8): 65-69.
- [47] 张雪荣. 薰衣草芳樟醇合成酶的基因克隆、功能鉴定及转基因技术的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- [48] 张海英. 矮牵牛花香基因 *BSMT3* cDNA 克隆与原核表达[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [49] 马蕾, 李慧芬, 彭忱晨, 等. 腊梅花香基因 *SAMT* 的 cDNA 克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(3): 1324-1328, 1331.
- [50] 张园. cDNA-AFLP 技术分离桂花香气相关基因[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [51] Pellegrineschi A, Damon J P, Valtorta N, *et al.* Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Bio/Technology*, 1994, 12(1): 64-68.
- [52] Lavy M, Zuker A, Lewinsohn E, *et al.* Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 9(2): 103-111.
- [53] Lückner J, Bouwmeester H J, Schwab W, *et al.* Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside[J]. *Plant J*, 2001, 27(4): 315-324.
- [54] Marshall D R, Brown A H D. Optimum sampling strategies in genetic conservation[M]//Frankel O H, Hawkes J G. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. London: Cambridge University Press, 1975: 53-80.
- [55] Ben Zvi M M, Negre-Zakharov F, Masci T, *et al.* Interlinking showy traits: Co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(4): 403-415.
- [56] Underwood B A, Tieman D M, Shibuya K, *et al.* Ethylene-regulated floral volatile synthesis in petunia corollas[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(1): 255-266.
- [57] Kaminaga Y, Schnepf J, Peel G, *et al.* Phenylacetaldehyde synthase from *Petunia hybrida* is a biofunctional enzyme that catalyzes the efficient coupling of phenylalanine decarboxylation to phenylalanine oxidation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(33): 23357-23366.
- [58] Diemer F, Caissard J C, Moja S, *et al.* Altered monoterpene composition in transgenic mint following the introduction of 4S-limonene synthase[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39(7/8): 603-614.
- [59] Zuker A, Tzfira T, Ben-Meir H, *et al.* Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 9(1): 33-41.