

园艺植物抗寒基因工程研究进展

陈延惠¹, 连红可¹, 马海旺², 李洪涛³, 李跃霞¹, 胡青霞^{1*}

(1. 河南农业大学 园艺学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑研种苗科技有限公司, 河南 郑州 450015;
3. 郑州市园林科学研究所, 河南 郑州 450003)

摘要: 抗寒基因工程的发展为防治园艺植物冻害提供了一条新途径。为此, 综述了近年来国内外园艺植物抗寒基因工程的研究进展, 概述了常用的抗寒基因, 特别是抗寒基因在园艺植物转化上的方法和成效, 并对发展前景阐述了观点和看法。

关键词: 园艺植物; 抗寒基因; 基因工程

中图分类号: S565.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)02-0025-04

Research Progress on Genetic Engineering of Horticultural Plants for Cold-resistance

CHEN Yan-hui¹, LIAN Hong-ke¹, MA Hai-wang², LI Hong-tao³, LI Yue-xia¹, HU Qing-xia^{1*}

(1. College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Zhengyan Seeding Technology Co., Ltd of Zhengzhou, Zhengzhou 450015, China;
3. Landscape Scientific Research Institute of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: The development of cold-resistance genetic engineering of plants had provided a new way to prevent from freezing for horticulture plants. In this paper, the recent research progress of cold-resistance genetic engineering of horticulture plants was reviewed, and the common cold-resistance genes, especially the methods and results of the transformation cold-resistance genes on horticulture plants were outlined, and some views were presented.

Key words: Horticultural plants; Cold gene; Genetic engineering

园艺植物是一类供人们食用或观赏的植物。其生长状况与外界环境的变化密切相关。低温是影响其生存及分布的一个重要的环境因子。在栽培条件下, 园艺植物的产量和品质与温度有着更为密切的联系。因此, 提高其对恶劣环境胁迫的忍受能力有着十分重要的现实价值和意义^[1]。目前, 人们开始逐步探索利用基因工程手段进行植物抗寒育种和有关生理研究^[2], 并且利用基因工程提高园艺植物抗寒性^[3]。主要开展了两方面的研究内容: 一方面是从植物或植物以外更广泛的物种范围获取“抗寒”基因转入园艺植物, 来打破遗传中抗寒种质资源缺乏的限制; 另一方面是利用外界的刺激来诱导自身的抗寒蛋白或基因来发挥作用^[4]。另外, 亦克隆了一些植物自身的抗

寒基因。为此, 综述了近年来国内外园艺植物抗寒基因工程的研究进展。

1 抗寒功能基因的研究

1.1 抗冻蛋白基因及其转基因园艺植物

自从北极鱼抗冻蛋白(Antifreeze proteins, AFPs)基因(AFP)被揭示以后, 人们就尝试用转鱼类 AFP 的方法来提高作物的抗冻性^[5-8]。早在 1998 年, 英国 York 大学已经研究了胡萝卜 AFP 基因, 标志着第一个植物 AFP 基因的发现。近年来我国用 PCR 的方法克隆了胡萝卜 AFP 基因, 构建了表达载体, 为进一步转化番茄、甜椒等作物奠定了试验基础^[9]。1992 年以来, 该类基因已在东黑麦、油菜、烟草、玉米和番茄等

收稿日期: 2010-08-10

作者简介: 陈延惠(1963-), 女, 河南南阳人, 副教授, 主要从事果树遗传育种研究。E-mail: chenyanhui188@163.com

* 通讯作者: 胡青霞(1971-), 女, 河南偃师人, 副教授, 主要从事园艺产品贮藏加工研究。E-mail: hortdept@126.com

作物中表达。在香蕉抗寒基因的研究中,通过农杆菌介导法已经成功将 *AFP* 基因转入胚型悬浮细胞系中,现已经获得转基因植株,并且检测呈阳性^[10]。另外,通过氮离子注射技术在杏茎段中转入 *AFP* 基因,研究结果表明,抗寒生理指标与氮离子束浓度有关。但转基因植株能否表现抗性,还需利用 PCR 及 Southern 进一步检测^[11]。

1.2 抗渗透胁迫相关基因及其转基因园艺植物

1.2.1 *COR* 基因

低温诱导蛋白是植物在低温作用下,由于基因表达的改变而诱发合成的蛋白质。研究证明,导入冷诱导基因确实具有提高植物抗寒性的功能。运用 RT-PCR、RACE 技术从不结球白菜中获得 1 个抗寒相关基因,命名为 *BrCOR14*,为研究 *COR* 基因在植物发育代谢中的功能提供帮助^[12]。另外,试验也表明了 2 个 *CBF/DREB1* 基因与抗寒性存在着联系^[13]。另外,在大白菜中克隆了低温诱导基因 *COR30*^[14],并且分析了其转录与表达。通过研究枣树分生组织特异基因从侧面揭示其抗寒原理^[15]。通过农杆菌介导将 *RD29A-COR15a* 导入番茄,最终进行 PCR 检测,能扩增出预期的目的条带,初步证实目的基因已整合到番茄染色体基因组中^[16]。在柑橘的研究上,将筛选到的差异表达 cDNA 构建差减文库,获得了一个首次在柑橘上发现的、特有的、编码冷相关 *COR413* 蛋白基因的 EST 序列,为探明柑橘抗寒的分子机制提供理论依据。

1.2.2 *LEA* 蛋白基因

LEA 蛋白即胚胎发生后期富集的蛋白质。是在种子成熟和发育阶段合成的一种蛋白质。1999 年,齐眉等克隆了胡萝卜 *LEA* 基因的 cDNA 片段,并且通过改变蔗糖的浓度,可使体细胞胚重现天然种子休眠与萌发的整个过程^[17]。之后,刘一鸣等又克隆了胡萝卜 *DcLEA1* 基因,并从侧面反应了其可以缓解细胞水分胁迫^[18]。另外,在甘蔗中,已经完成了胚胎晚期丰富蛋白基因 (*LEA*) cDNA 的克隆。研究发现:此基因在抗旱和抗盐机制中发挥着重要的作用。但是否具有抗寒能力,还有待进一步的研究^[19]。

1.2.3 脂肪酸去饱和酶基因及其转基因植物

很多研究表明,低温冻害导致生物膜的透性改变。低温引起膜脂的物相发生变化,使膜脂由正常的液晶态变为凝胶态,如果在低温下能保持膜脂的液晶状态,则植物的抗冻性提高;而增加膜脂中不饱和脂肪酸的比例即可维持膜的液晶状态,防止膜类固化,即能提高抗寒性^[20-21]。目前,园艺植物中有关此基因的报道还比较少。

1.2.4 *CBF* 基因及其转基因植物

在苹果嘎啦试管

苗中转入 *CBF* 抗寒基因,获得了带有目的基因的转基因植株,发现其在低温胁迫时体内的脯氨酸含量与普通植株有差异^[22]。利用花粉管通道法和农杆菌介导法,已经获得了携带有 *CBF3* 目的基因的植株,明确了外援 *CBFs* 基因与苹果抗寒的相关性^[23]。通过根癌农杆菌介导法已经成功将 *CBF1* 基因转入草莓中,并且在后期利用 PCR 手段,扩增出了含有目的基因的阳性片段。这也标志着已经成功获得了草莓的抗寒性植株。但是其在大田生产中是否具有抗寒性还有待进一步研究^[24]。此外,通过农杆菌介导将 *CBF1* 基因转入龙牙蕉和贡蕉两者的胚型悬浮细胞中,最终产生了抗寒植株^[25]。百子莲及狗牙根中亦转入了 *AtCBF* 基因,但是在后期的 PCR 扩增阶段没有检测到携带目的基因的片段,后续工作有待进一步深入研究^[26]。在番茄的新品种培育中,通过农杆菌介导将 *CBF3* 基因转入番茄外植体,如子叶、叶片、茎段以及下胚轴中,最终获得转基因植株。然而,其在大田中的抗寒性表现有待进一步的研究和检测^[16]。

2 抗寒基因的启动子类型

2.1 组成型启动子

2 个组成型启动子 CaMV P35S 启动子(又名可变启动子^[26-28])和 *CBF1-PRO* 启动子,均是 *CBF1* 的启动子。该转录因子在植物耐逆性的综合改良中具有广泛的应用前景和极大的利用价值^[29]。

2.2 组织特异性启动子

组织特异性启动子也称之为器官特异性启动子^[30]。烟草花粉绒毡层细胞启动子 pTA 29,豌豆清蛋白 (legumin) 基因启动子均可在转化植物种子中特异性表达,马铃薯块茎储藏蛋白 (patatin) 基因启动子在块茎中优势表达^[31]。

2.3 诱导型启动子

Atrd29A 基因受低温诱导^[32]。通过 GUS 活性组织染色分析发现, *Atrd29A* 是低温诱导启动子^[33]。黄瓜采用 *COR15a* 基因并用 *RD29A* 作为启动子转移基因,可以获得新品种^[34-35]。研究表明,该基因的表达明显提高了植物细胞对低温条件的抵抗能力^[36]。另外,还有 *mwcs120* 启动子也是逆境诱导启动子^[37]。综上所述,抗寒基因工程多采用 CaMV35s 组成型强启动子来启动外源基因的表达,虽在逆境下能较好地提高植物抗寒水平。但在非逆境下,这种不必要的高表达也给植物带来许多负面效应^[38]。园艺植物抗寒基因的转移在某些植物上已经获得了一定的成效^[39-40],而在有些植物上只是刚刚起步,它们在转化方法、外植体类型、目的基因、转化成效上面均有自己

的特点(表 1)。另外,有些抗寒基因还处于克隆和检测阶段,有些已经应用在植物上面(表 2)。

表 1 抗寒基因在园艺植物上的应用

园艺植物种类	转化方法	外植体类型	目的基因	转化成效	参考文献
樱桃	农杆菌介导法	叶片	抗冻蛋白(<i>AFP</i>)	获得转基因植株	刘庆忠等 ^[42]
杏	氮离子注入	茎段	<i>AFP</i>	获得嫁接成活植株	王华等 ^[1]
香蕉	农杆菌介导法	胚性细胞悬浮系	<i>pBI121-AFP</i>	获得转基因再生植株	徐春香等 ^[10]
香蕉	农杆菌介导法	胚性细胞悬浮系	<i>CBF</i>	获得转基因植株	黄学林等 ^[25]
苹果	根癌农杆菌介导法	白化茎段	<i>CBF</i>	获得转基因植株	杜国强等 ^[22]
草莓	根癌农杆菌介导法	叶片	<i>CBF1</i>	获得转基因植株	金万梅等 ^[24]
苹果	花粉管通道法、农杆菌介导法	组培苗幼嫩叶片	<i>CBF3</i>	获得抗寒再生植株	杜国强等 ^[23]
番茄	农杆菌介导法	子叶、下胚轴、茎段、叶片等	<i>COR</i> 、 <i>CBF</i>	获得转基因植株	张兴国等 ^[16]
番茄	农杆菌介导法	叶片、茎段	果聚糖和酶 <i>sucB</i> 基因	获得转基因植株电导率增加	王关林等 ^[28]
甘蓝型油菜	农杆菌介导法	子叶和下胚轴	<i>FAD8</i>	获得转化成功抗寒植株	赵德刚等 ^[20]
百子莲	农杆菌介导法	胚性愈伤组织	<i>CBF</i>	获得植株,未检测到目的基因	刘群录等 ^[26]
狗牙根	农杆菌介导法	胚性愈伤组织	<i>CBF</i>	获得植株,未检测到目的基因	刘群录等 ^[26]

表 2 抗寒基因的克隆与表达

园艺植物种类	克隆基因片段及材料	与其相似的抗寒基因	成效	参考文献
不结球白菜	<i>BrCOR14</i> 基因 叶片	<i>COR</i> 基因	氨基酸序列与油菜、拟南芥、荠菜编码的氨基酸序列有极高的同源性	蒋芳玲等 ^[12]
油菜	<i>BnCOR14</i> 基因, 幼叶	<i>COR</i> 基因	克隆了 <i>BnCOR14</i> 基因, 并且发现其具有典型的 LEA 蛋白序列特征, 表明其可能在油菜抵抗冷胁迫的过程中具有重要的作用	开国银等 ^[15]
白菜	<i>COR30</i> 基因 叶片	具有 LEA 蛋白家族第二亚类特征	克隆了 <i>COR30</i> 基因, 发现其具有脱水蛋白序列特征, 表明其在逆境中有联系	卢泳全等 ^[14]
胡萝卜	胡萝卜 <i>AFP</i> , 幼叶	<i>AFP</i> 基因	克隆了 <i>AFP</i> 基因 并构建了植物表达载体	尹明安等 ^[9]
胡萝卜	<i>DcLEA1</i> 基因 愈伤组织诱导形成的体细胞胚	<i>LEA</i> 基因	克隆了 <i>DcLEA1</i> 基因, 并且分析了其结构与表达特征 推测其在逆境胁迫中发挥作用	刘一鸣等 ^[18]
胡萝卜	悬浮体细胞胚 <i>LEA</i> 基因 cDNA 片段	<i>LEA</i> 基因	克隆了 <i>LEA</i> 基因 cDNA 片段, 并且可使体细胞胚胎重现天然种子休眠与萌发的过程	齐眉等 ^[17]
甘蔗	芽 <i>ScLEA</i> 基因	<i>LEA</i> 基因	完成了 <i>LEA</i> c 基因的全长克隆, 并且推测其在抗旱和抗盐机制中发挥作用	刘金仙等 ^[19]

目前我国园艺植物转基因事业有了长足发展,并且逐步建立了转基因的发展模式:利用外源目的基因,将其转入园艺植物,最终获得表达,从而提高园艺植物抗寒能力,最终促进了生产发展^[43-44]。但这些研究工作刚刚起步,果树抗寒基因的转移研究较农田作物和蔬菜相对落后;而观赏园艺植物在抗寒研究方面也比较少^[45-46]。借鉴其他植物在抗寒研究方面取得的最新进展,将其用于园艺植物的抗寒研究,将有效地提高其转化的速度和效率。总之,园艺植物抗寒基因转化研究已经取得了一定的成果,随着研究手段逐步地发展和更新,其将在园艺植物抗寒和品种改良等方面发挥更大的作用^[47]。

参考文献:

[1] 王华, 杨建峰. 植物抗寒基因工程研究进展[J]. 现代农业科技, 2007(23): 117-122.

[2] 陈香, 张爱平, 姚泉洪. 植物抗寒基因工程研究进展[J]. 生物技术通讯, 2001, 12(4): 318-324.

[3] 于亚军, 夏新莉, 尹伟伦. 果树抗虫基因工程研究进展[J]. 北方园艺, 2008(7): 102-104.

[4] 刘立全, 杨剑超, 张衡. 根癌农杆菌介导的植物遗传转化研究[J]. 现代农业科技, 2009(11): 143-147.

[5] 黄永芬, 汪清胤, 付桂荣, 等. 美洲拟鲈抗冻蛋白基因(*AFP*)导入番茄的研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(4): 418-422.

[6] Georges F, Saleem M, Cutler A J. Design and cloning of a synthesis gene for the flounder antifreeze p rotein and its expression in plant cells[J]. Gene, 1990, 91(2): 159-165.

[7] Hightower R, Cathy B, Ranela D. Expression of antifreeze proteins intransgenic plants[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(5): 1013-1021.

[8] Wallis J G, Wang Hongyu, Guerra D J, et al. Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35(3): 323-330.

[9] 尹明安, 崔鸿文, 樊代明, 等. 胡萝卜抗冻蛋白基因克隆及植物表达载体构建[J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29(1): 6-10.

[10] 徐春香, 何勇强, 尉义明, 等. 抗冻蛋白(*AFP*)基因表达载体的构建及对香蕉胚型细胞悬浮系的转化[J]. 广西植物, 2009, 29(5): 664-668.

[11] 冯殿齐, 刘静, 孙仲序, 等. 利用氮离子注入技术转化抗

- 寒基因(AFP)初步研究[J]. 山东农业大学学报 2005, 36(1): 86-92.
- [12] 蒋芳玲, 侯喜林, 史公军, 等. 不结球白菜 *BrCOR14* 基因 cDNA 全序列克隆及结构特征分析[J]. 江苏农业学报 2007, 23(1): 34-38.
- [13] 安黎哲, 杨同文. 大白菜 CBF 冷应答途径中基因的克隆及其表达分析[D]. 兰州: 兰州大学, 2006.
- [14] 卢泳全, 吴为人. 大白菜低温诱导基因 COR30 的转录表达[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 631-632.
- [15] 孟玉平, 曹秋芬, 孙海峰. 枣树花分生组织特异基因 *ZjAP1* 的克隆与表达分析[J]. 山西农业科学 2010, 38(2): 6-11.
- [16] 张兴国, 李志友. *COR* 和 *CBF3* 基因导入番茄的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [17] 齐眉, 陈凡, 黄美娟, 等. 胡萝卜 *LEA* 基因 cDNA 片段的克隆及其表达特性分析[J]. 科学通报, 1999, 44(18): 1949-1963.
- [18] 刘一鸣, 刁凤秋, 张雷, 等. 胡萝卜 *LEA* 基因家族新成员 *DcLEA1* 的克隆及其结构与表达特性分析[J]. 自然科学进展, 2004, 14(8): 882-894.
- [19] 刘金仙, 阙友雄, 郭晋隆, 等. 甘蔗胚胎晚期丰富蛋白基因(*LEA*) cDNA 全长克隆及表达特性[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(5): 836-842.
- [20] 王瑞云, 贺润喜, 岳文斌, 等. 植物抗寒性基因工程研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(1): 26-29.
- [21] 张洁, 杨大威, 孟玉平, 等. 枣树水通道蛋白基因生物信息学分析及原核表达载体的构建[J]. 山西农业科学 2010, 38(1): 6-10.
- [22] 杜国强, 杨丽丽. 根癌农杆菌介导的抗寒基因转录因子 CBF 转化苹果的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.
- [23] 杜国强, 冯莎莎. 冷诱导基因转录因子 CBFs 导入苹果及转化株系抗寒性指标分析[D]. 保定: 河北农业大学 2007.
- [24] 金万梅, 尹淑萍, 王萍, 等. 冷旱诱导表达的转录因子 CBF1 对草莓的遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 34-36.
- [25] 黄学林, 肖宁. 拟南 *CBF1* 基因的克隆及其对香蕉胚型悬浮细胞转化的研究[D]. 广州: 中山大学, 2006.
- [26] 刘群录, 吴晨祎. 抗寒基因 *AtCBF* 的克隆及在百子莲与狗牙根中的遗传转化研究[D]. 上海: 上海交通大学 2009.
- [27] 焦改丽, 孟钊红, 聂安全, 等. 花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子在转基因棉花中的表达[J]. 作物学报, 2004, 30(11): 1135-1139.
- [28] 王关林, 李铁松, 方宏筠, 等. 番茄转果聚糖和酶基因获得抗寒植株[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1193-1197.
- [29] 李萍, 艾秀莲, 王志芳, 等. 雪莲 PBP 基因表达载体的构建[J]. 生物技术, 2006, 16(2): 11-13.
- [30] 杨广东, 李燕娥, 郭瑜敏. 我国蔬菜转基因技术研究进展[J]. 山西农业科学, 2003, 31(03): 59-64.
- [31] 李杰, 张福城, 王文泉, 等. 高等植物启动子的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(4): 658-661.
- [32] 陈得波, 张爱平, 姚泉洪, 等. 植物抗寒基因工程研究进展[J]. 生物技术通报, 2001, 36(4): 14-20.
- [33] 朱丽萍, 于壮, 邹翠霞, 等. 植物逆境相关启动子及功能[J]. 遗传, 2010, 32(3): 229-234.
- [34] 陈敬东, 孙艳, 刘荣云, 等. 黄化转基因技术的研究进展[J]. 蔬菜, 2009(9): 32-35.
- [35] Seki M, Narusaka M, Abe H, *et al.* Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a fulllength cDNA microarray[J]. Plant Cell, 2001(13): 61-72.
- [36] Arras N N, Uemura M, Slepunka P L, *et al.* Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(23): 13404-13409.
- [37] 杜鹃, 朱祯, 李晚枕, 等. 植物逆境诱导启动子 *mwes120* 的克隆及表达特性研究[J]. 作物学报, 2005, 31(10): 1328-1332.
- [38] 陈儒钢, 巩振辉, 逯明辉, 等. 植物抗寒基因工程研究进展[J]. 西北植物学报, 2008, 28(6): 1274-1277.
- [39] 张同庆, 郭芳阳, 姚根怀, 等. 抗黄瓜花叶病转基因烟草 NC89 抗病性鉴定[J]. 河南农业科学 1997(2): 22-23.
- [40] 乔德瑞, 朱芷葳. 基因打靶技术及其应用前景[J]. 现代农业科技, 2009(20): 368-369.
- [41] 王凤华, 李光远, 陈双臣. 农杆菌介导的茄子愈伤组织遗传转化研究[J]. 河南农业大学学报, 2009, 43(8): 389-392.
- [42] 刘庆忠, 赵红军, 李志强. 甜樱桃矮化砧木吉塞拉(Gise-la)的离体叶片再生植株研究[J]. 果树学报, 2001, 18(5): 255-257.
- [43] 曾青兰. *phyA* 基因在毕赤酵母中的表达以及表达产物的检测[J]. 现代农业科技, 2007(3): 105-106.
- [44] 范国强, 赵振利, 曹艳春. 根癌农杆菌介导的悬铃木叶片遗传转化体系研究[J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(8): 359-374.
- [45] 孙磊, 张启翔. 利用 *gus* 基因瞬时表达探讨菊花叶盘基因枪转化参数[J]. 河南农业科学, 2007(11): 81-84.
- [46] 杨中旭, 李秋芝, 张徽. 适应性参数法评价转基因抗虫棉品种的丰产性及稳产性[J]. 现代农业科技, 2006(5): 13-14.
- [47] 桂友龙, 刘杰, 饶力群, 等. 柑桔抗寒研究的现状与展望[J]. 生物技术通报, 2006(Z): 58-62.