

花卉分子育种的研究进展

李美茹¹ 陈金婷¹ 孙梓健¹ 陈贻竹¹ 李洪清^{2*}

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650; 2. 华南师范大学生命科学院, 广东 广州 510631)

摘要: 介绍花卉分子育种的研究概况和分子育种的操作策略, 进一步强调在我国应用和发展花卉分子育种方法的必要性。

关键词: 分子育种; 观赏花卉; 基因工程

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)01-0087-06

Advances in Molecular Breeding of Ornamental Plants

LI Mei-ru¹ CHEN Jin-ting¹ SUN Zi-jian¹ CHEN Yi-zhu¹ LI Hong-qing^{2*}

(1. *South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China;*

2. Life Sciences of College, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Plant gene engineering was paid more attention to and resulted in many excited achievements during the past decade. In this paper, significant progress in molecular breeding of ornamental plants, and the strategies and methods of molecular breeding are reviewed. The significance of application and developing molecular breeding in ornamental plants in China is discussed and emphasized.

Key words: Molecular breeding; Ornamental plants; Gene engineering

运用分子生物技术, 将目的基因或 DNA 片段通过载体或直接导入受体细胞, 使遗传物质重新组合, 通过细胞复制增殖, 新的基因在受体细胞中表达, 最后从转化细胞中筛选有价值的新类型而构成工程植株, 从而创造新品种的一种定向育种的新技术, 称之为分子育种^[1]。蓬勃发展的分子生物技术给社会生活的各个方面带来了新的观念, 也带来了新的发展机遇。第一例转基因植物的诞生是 1984 年, 经过 10 多年的发展, 转基因技术已在近 200 种植物中获得成功。1987-1998 年美国田间投放的转基因植物种类有: 阿勒格尼唐棣 (*Allegheny serviceberry*)、树莓、越桔、菠萝、木瓜、李、枫香属植物、板栗、桧柏、颠茄、天竺葵、甘薯、南瓜、西瓜、豌豆、茄子、菊苣、洋葱、燕麦、菊花、唐菖蒲、草地早熟^[2]。我国目前有 6 种转基因植物被批准进行商业化生产, 它们是耐储藏的番茄、矮牵牛、抗病毒的甜辣椒和番茄、抗虫棉花、保龄棉花^[3]。

转基因技术在提高农业和园艺价值、作为某些重要蛋白和次生代谢产物的廉价生物反应器以及研究基因在发育和其它生理生化过程与代谢途径中的作用等方面, 均充当了核心角色。在过去的十几年里, 从植物基因的分离、载体的构建、基因的转化和转化株的再生到目的基因的表达、转化株的检测等生物技术的发展和普及都很迅速。目前, 就大多数植物而言, 基因的转移以及转基因植株的检测, 已不再是植物改良和分子生物学研究中的限制因素, 而且转基因技术理论研究已不再是简单地、盲目地将基因导入植物中, 而是更多地朝向转基因表达的高效性、可预测性、稳定性和安全性等方面的研究。花卉基因工程研究的广泛开展是花卉育种发展的必然结果, 它将成为花卉育种方法的主攻方向。

1 研究概况

花卉育种和品种的改良一直是花卉科研的主题。近年来, 应用分子育种技术在改良植物花色、采后寿命、花型、株型、香味等方面取得了重要的进展^[4-6]。下

收稿日期: 2001-12-03; 接受日期: 2002-03-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170667); 全国 100 篇优秀博士论文作者专项基金资助

* 通讯作者 Corresponding author

面简要介绍这些成果,供花卉育种工作者、生产者、经营者借鉴,以加快我国花卉分子育种的步伐。

1.1 花色

花色是花卉植物观赏价值的重要标准。自然界花色繁多,但一些重要花卉却色彩有限,如月季、郁金香、康乃馨缺少蓝色和紫色;非洲紫罗兰、仙客来、天竺葵、矮牵牛缺少纯黄色;鸢尾、紫罗兰等缺少红色和砖红色。这是运用传统杂交育种方法无法解决的问题。在充分了解花色形成的化学基础和调控机制的基础上,应用基因工程技术就能改造花色。花色主要由三大类色素决定,即类黄酮(flavonoids)、类胡萝卜素(carotenoids)及甜菜色素(betalains),其中,类黄酮是主要的色素。参与花色形成的类黄酮主要有两大类:一类是产生红色或紫色的花色素苷;另一类是黄色的 2-苯甲川基苯呋喃酮(aurones)和苯基苯乙烯酮(chalcones)。花色素苷所占比例在很大程度上能决定花的最终颜色。实际上,花色的形成还取决于细胞中其他组分的含量,如起协同着色作用(copigmentation)的色素(如黄酮、黄酮醇、橙酮和类胡萝卜素)以及金属离子和液泡的 pH 值等^[6]。目前,对花色素苷生物合成途径研究得较为清楚。类黄酮生物合成的每一步,从查耳酮形成直至花青素苷分子的复杂修饰,几乎都有其对应的突变体,在不同程度上控制代谢途径的基因已被鉴定。

影响花色素苷生物合成代谢的基因分为结构基因和调节基因。结构基因直接编码花色素苷代谢生物合成酶类,包括查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、类黄酮 3',5'-羟化酶(flavonoid 3',5'-hydroxylase, F3'5'H)、二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花青苷合酶(anthocyanidin synthase, ANS)、类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶(flavonoid 3-O-glucosyltransferase, FGT)等。调节基因控制结构基因表达的强度和程式。花色素苷生物合成途径的调节基因,包括 *C1* 或 *Pl, an 2* 等(它们属于 Myb 类转录因子)和 *R/B* 家族的成员(如 *R*、*B*、*Lc* 和 *Sn* 等基因),它们具有 bHLH(basic-helix-loop-helix)结构。

首例花色基因工程操作是在 1987 年^[9]。矮牵牛(*Petunia hybrida*)细胞中由于缺少将二氢三羟黄酮醇(dihydrokoempferol)转化为无色天竺葵青素苷(leucopelargonidin)的 DFR 酶。由于缺少天竺葵青素苷,从而导致矮牵牛中缺少橘红、砖红和亮红色的品种。矮牵牛变异株 RL01 细胞中积累二氢三羟黄

酮醇,花呈白色。Meyer 等将玉米(*Zea mays*)的 DFR 基因转入 RL01 株系,获得的转基因株开出的花呈红色,该颜色是天竺葵青素类型的。将玉米调节基因 *C1* 和 *R* 基因分别导入烟草(*Nicotiana tabacum*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)之后,两个物种的白色花冠都不同程度地转为粉红^[10]。

观赏花卉中蓝色花卉的品系特别少,特别是某些重要的名贵花卉,如月季、百合、郁金香等均缺乏蓝色的品种,因此,培育蓝色花卉是世界花卉育种学家的主攻目标之一。由黄酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)、类黄酮 3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)和 F3',5'H 酶这 3 种羟化酶所催化反应的产物是合成花色素苷的直接前体。二氢黄酮醇被羟化的程度和位置不同,将决定最终合成的花色素苷的种类以及花的颜色。如果 B-环的 3' 和 5' 位置都被羟化,二氢黄酮醇将变成二氢杨梅黄酮,这是蓝紫色的翠雀素糖苷的直接前体;如果 B-环只有 3' 位置被羟化,将变成二氢栎皮酮,这是红色花青素糖苷的直接前体;如果 3' 和 5' 位置都没有被羟化,则转变成砖红色的花葵素糖苷。编码 F3',5'H 基因(*Hf1, Hf2*)是目前国际上用于研究培育稀有蓝色花卉品系的关键基因,人们期望将编码 F3',5'H 基因引入合成花葵素苷和花青素苷的月季栽培品种里,促使花色素苷的合成转向翠雀素糖苷的合成方向,从而使花变为蓝色^[11]。

1993 年美国奥克兰港 DNA 植物技术公司报道从矮牵牛中分离到一个能调控花卉 pH 值的基因(*Ph6*),通过突变使该基因失活,能使花瓣细胞提取物的 pH 值增加到 6.4 左右。由此推测,如果使月季中 *Ph6* 基因受到抑制,以此提高细胞中的 pH 值,将有希望培育出开蓝花的月季^[12,13]。2000 年,日本 Iida 教授实验室首次从裂叶牵牛(*Ipomoea nil*)中分离到 *Pr* 基因,预测该基因是编码液泡 Na⁺/H⁺ 反向传递体(antiporter 或 exchanger)。研究发现,开蓝色花的裂叶牵牛突变为开紫色花是由于转座子插入到 *Pr* 基因,影响了该基因的表达,使之缺乏 Na⁺/H⁺ 反向传递体,因而降低了液泡内的 pH 值,突变株无法产生正常的亮蓝色^[14,15]。以上提及的基因具有重要的商业价值,预计采用基因工程技术培育蓝色月季、蓝色百合等已为期不远。至今利用外源花青素结构基因和调节基因进行遗传转化,已在多种花卉上实现了花色的改造。

1.2 花卉瓶插寿命

对于乙烯跃变型的花卉,乙烯是切花衰老的主

要影响因子。利用基因工程的方法抑制乙烯生物合成有关酶的基因,降低合成乙烯的直接前体或降低花瓣对乙烯的敏感性可以达到延迟花瓣衰老,延长瓶花寿命的目的。ACC合成酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase)和ACC氧化酶(ACC oxidase)是植物乙烯生物合成过程中的关键酶。将ACC氧化酶基因的反义序列导入香石竹(*Dianthus caryophyllus*)中,ACC氧化酶的表达受到抑制,峰值乙烯降低了90%,花瓣内卷受到抑制,寿命延长。该植物已在澳大利亚推广并进行商品化生产^[16]。由于ACC是合成乙烯的直接前体,其降解将抑制乙烯的生物合成,ACC脱氨酶可将ACC代谢为 α -丁酮酸。Klee等^[7]将ACC脱氨酶基因转入番茄(*Lycopersicon esculentum*),结果抑制了果实成熟过程中的90%~97%乙烯的产生,显著延迟果实的成熟。可惜该文没有报道转基因植株花寿命是否受到影响。目前尚未见到通过操作该基因延缓花卉衰老的报告。降低花瓣对乙烯的敏感性比降低花瓣中乙烯的生物合成更好。已有实验表明将拟南芥显性突变体*etr1-1*的基因转入野生型植株中,得到的转基因植株对乙烯完全不敏感,同样,如果将诸如*etr1-1*的基因转入花卉,这可能是控制花瓣衰老的最终的有效的方法^[16]。Fernandez等报道将胚性MADS域因子*AGL15*在组成型启动子(CaMV 35S)控制下,拟南芥的花萼和花瓣的寿命大大延长,这一过程与导致对乙烯不敏感的突变的效应显然不同^[18]。

另一方面,导入异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase, *ipt*)基因和抗性基因等也可达到延缓花卉衰老的目的。*ipt*可促进转基因植物内源细胞分裂素的产生。Gan和Amasino得到的SAG12-*ipt*转基因烟草,其*ipt*表达受衰老特异启动子SAG12的特异调控,因此,该转基因植株在正常形态和发育不受影响的前提下叶片衰老大大延迟,花的寿命也得以延长^[9]。微生物的活动常常导致切花输导组织的堵塞,进而导致切花缺水而加速切花衰老。Derks曾将一个编码抗菌蛋白cecropin B的基因转入月季(*Rosa hybrida*),获得了延长瓶插寿命的转基因月季^[20]。

1.3 花器官发育及形态改良

花型与株型是花卉植物重要的观赏性状,花卉形态发育的改良包括对开花时间、花器官形态、花枝着生状态、花序类型、株型等的改良。育种的目标包括缩短开花周期、延长花期、提高花瓣重瓣程度、增大花朵等。实现基因工程手段修饰花卉的形态发育和株型,应建立在充分了解花发育的分子遗传理

论基础上。花发育的研究一直引人注目,传统生物学对花发育的关注可以追溯到200年前,而分子遗传学的研究十几年前才开始,现已成为植物发育研究中的热门学科,在拟南芥和金鱼草这两种模式植物中已取得了令人瞩目的进展,分离了大量与花发育有关的重要基因^[21,22]。如:影响花期的基因,即与开花时间有关的基因(flowering time gene),这类基因的突变会使突变体的开花时间提早或延迟,促进开花的基因有*CO*, *DET2*, *FCA*, *LD*, *PHYA*等;抑制开花的基因包括*CCA1*, *CLF*, *ELF3*, *LHY*, *PHYB*等。参与决定花分生组织特征的基因,如*LFY*, *API*, *CAL*等,这些基因突变将导致花向花序的转变。根据ABC模型学说,A、B、C三类同源异型基因决定了花的4轮器官的特征。A类基因单独作用决定形成第1轮的花萼,A和B共同决定形成第2轮的花瓣,B和C共同决定形成第3轮的雄蕊,而C单独决定形成第4轮的心皮。控制花型发育基因,如金鱼草的*CYC*和*DICH*基因控制着花瓣的对称性,当该基因发生突变时,金鱼草的花形发育为不对称型。调控花瓣发育的基因,如*CRABSCLAW*, *SPATULA*等。

目前,利用以上基因在花卉上进行基因转化操作仍不多。拟南芥*LFY*基因在杨树中的超量表达(overexpression),使在正常情况下需8~20a才开花的杂交种在6个月内即可开花^[23]。转*lfy*基因的菊花(*Chrysanthemum morifolium*),其花期提前了60多天^[24]。另一由CaMV 35S启动子控制的花分生组织特征决定基因*API*在矮牵牛中组成型表达,其开花时间早于野生型^[25]。这些实验表明花分生组织特征决定基因的超量表达导致了枝条向花的转变时间提早。随着基因工程技术的应用,人类将能实现人工控制某些周期长的名贵花卉(如兰花)的开花时间。

目前,一些农杆菌基因也被用于改变植物的形态,如发现转发根农杆菌*ipt*基因和带有*aux*、*tms*、*iaa*基因的转化植株,表现出增强或减弱顶端优势,形成畸型花,抑制茎、叶生长等表型变化,这些表明人类可利用基因工程技术达到培育新型花卉的目的。

1.4 花香和抗性育种

香味是花卉不可缺少的另一个重要品质,但其基因工程的研究较为缓慢,主要原因是构成香味的芳香物质远比构成花色素的代谢产物丰富,且代谢途径更为复杂。Pellegrineshi等利用野生型发根农

杆菌转化柠檬天竺葵,发现转化株的芳香物质牻牛儿醇(geraniol)含量比对照株增加 3-4 倍,蒎烯醇(linalool)和桉树脑(1,8-eineole)的含量也明显高于对照株^[26]。Lis 基因编码 S-蒎烯醇(S-linalool)合成酶,它可将牻牛儿磷酸一步转化成 S-蒎烯醇,因此,这一基因对培育新型香味的花卉具有潜在的价值^[27]。

抗性育种是现代花卉育种研究的又一热点。抗病毒、抗虫是植物基因工程研究较多的领域,已取得了令人瞩目的成就。花卉抗性分子育种进展也相当迅速,如通过将带有对苏云杆菌有毒杀作用的毒素基因启动子导入菊花中培育出抗甜菜夜蛾(Beet armyworm)的菊花新类型,预计在不久的将来会得到抗葡萄球菌的郁金香新品种、高抗病毒的香石竹、百合等^[9]。

花卉基因工程技术研究历史不长,但十几年来取得了令人瞩目的成就,其研究结果向人们揭示了如何调控和操作花色显现、花器官发育,为培育色彩缤纷、形态独特的奇花异草带来希望。

2 技术操作策略

2.1 建立花卉植物组培快繁、植株再生系统和转化体系

这是进行分子育种操作的前提条件。现已有多种植物建立了这些体系,特别是某些重要的观赏植物,如月季、菊花、香石竹、非洲菊、郁金香、安祖花、杜鹃花、虾脊兰等,这将有利于对这些植物进行遗传操作,推动其商品化的发展。

2.2 分离克隆目标基因

目前有 3 种方法:一是直接分离组织特异表达的基因、或不同发育阶段的组织特异表达的基因,常用的方法是 cDNA 文库的差示筛选法(differential display)。二是当已知基因的蛋白产物时,用抗体寡聚核苷酸探针或 PCR 制备的探针对文库进行筛选来分离目标基因。三是当基因产物和功能未知时,可用转座子标记(transposon tagging)、染色体步行(chromosome walking)或 DNA 差异显示和转座诱变(transposon mutagenesis)相结合的方法分离目标基因。

2.3 研究基因的功能

根据技术原理的不同可分为正向遗传学(forward genetics)和反向遗传学(reverse genetics)。在过去相当长的时间里,多使用正向遗传学方法进行基因功能的研究,这是在已知突变体的表型后,研

究突变体表型变化是由哪个基因功能改变而引起。反向遗传学方法是近 10 年发展起来的,是指在得到基因之后,再研究该基因的功能,研究的中心是该基因丧失功能之后,植物将会产生什么样的表型变化。现在每天都有大量新基因被发现、被分离,但这些基因功能如何,还远未被人所知。反向遗传学是研究基因功能十分有效的方法,它包括反义 RNA 技术、gene targeting 和 RNA/DNA 嵌合体转化技术等。

2.4 基因活性调控操作策略

目的是抑制或增加目标基因的表达活性,它包括以下的一些操作方法:

反义 RNA 技术(antisense suppression) 就是将所研究基因的 cDNA 反义接在启动子后面,用于转化植物,在植物细胞中表达后产生的 RNA 将与植物中原有基因转录的 mRNA 互补,从而抑制后者的正常翻译,产生抑制表型。Van Der Krol 等 1988 年首先将编码 CHS 的结构基因反向导入矮牵牛植株之后,使转基因植株表现出不同程式的花色变异(颜色变浅或成白色)^[28]。采用此方法也使菊花、非洲菊的花色得到一定程度的变异。

共抑制法(sense suppression 或 cosuppression) 通过导入一个(或几个)内源基因额外的拷贝,达到抑制该内源基因转录产物的积累,进而抑制该内源基因表达的技术。Napolic 等的研究表明,当 CHS 有多拷贝导入植物体内时,植株的内源 CHS 便局部或全部不表达,从而形成白色花或图案变化十分丰富的彩瓣花^[29]。

基因超表达方法 通过基因在植物体内的超表达增强原有代谢产物的含量,如通过 *lfy* 基因在植物体内的超表达,使植物花期提早。

向植物导入一个(或几个)新的目的基因法 通过导入欲修饰供试株及其近缘种植物中原先没有的基因,从而使供试株增加一个或几个新的性状。Meyer 等将一个编码二氢黄酮醇-4-还原酶的玉米 *A1* 基因导入矮牵牛突变体 RL01 株系中,结果开白花的矮牵牛经转化后形成开砖红色花的矮牵牛^[9]。

3 我国花卉分子育种的研究进展

近 20 年来,我国花卉业得到了长足的发展,种植面积已超过 8.6 万 hm^2 ,位于世界前列,但我国的花卉出口贸易额仅占全球的 1%,这是很严峻的局

面。我国花卉产业长期存在“重引轻育”的现象,目前市场上销售的花卉种子、种苗、种球中的绝大多数均由国外、台湾引进。对引进后的种类及品种如何有计划的选育或进一步进行遗传改良的工作做得极少。这是由于我们花卉经营者过分注重短期效益引起的,只因引进的花卉种类及品种能很快进入销售市场,而选育新品种则投资大、见效慢。其实从国外引进的花卉种类有不少是以我国原产的植物种类为主要亲本培育的,甚至有些植物品种本身就是从我国的种源中选出来,经国外育种专家培育改良并重新包装后,又被我们自己以高价购买回来的。“谁拥有种质资源,谁就拥有市场”,欧美发达国家的花卉产业发展水平高,重要的原因是他们花卉育种持续开展,育种技术不断地更新。我国有着丰富珍贵的野生花卉种质资源,具备发展商品花卉生产的基础条件。我们应充分发挥分子生物技术的最大优势,开展观赏植物育种,充分利用国内外的种质资源,培育人们所期望的新品种,改变我国“重引轻育”、种源受制于人、本土种质资源流失的现象,赶超世界先进水平。

我国植物生物技术起步于70年代初,以植物组织培养为基础的生物技术发展一直保持良好的优势,而分子生物学的发展则相对较晚。从90年代初期开始,我国的高校和科研单位纷纷开设了分子生物学课程和建立分子生物学技术实验室,在我国已约有100多个实验室进行了一系列以主要农作物、经济作物为对象的生物工程试验,主要包括抗病毒、抗虫害、改良作物品质以及RFLP技术在基因组分析和育种中的应用等。如中国科学院大东基因工程育种基地是以获得优质农作物种源为目标的研究和生产为一体的高科技实体;北京市植物细胞工程实验室是以生物技术为手段对小麦、水稻进行改良为主要研究方向,包括基因转化和分子标记等;中国水稻所、浙江大学和浙江农科院组建的南方转基因植物产业化基地工作的主要方向是以水稻、油菜、果蔬等作物为对象的转基因产业化。从现有的资料看,在我国只有少数几个实验室在从事花卉的基因转化研究,如北京大学生命科学院的陈章良教授实验室,主要进行克隆与花青素代谢有关的CHS基因,并利用该基因对改变矮牵牛花色进行研究;中国热带农业科学院和华南热带农业大学的生物技术国家重点实验室,开展植物lfy基因转化菊花的研究;华中农业大学林学系包满珠在进行矮牵牛花色调节基因转化研究;天津市园林绿化研究

所采用基因工程方法培育出开黄花的仙客来等等。可见,无论从广度还是从深度看,目前我国的花卉基因工程技术研究和应用仍处于起步阶段,仍远远落后于欧美发达国家^[2,30]。随着基因工程技术的普及及常规化,目前我国基因工程技术与世界水平相差还不大,我们应该抓住机遇,建立具有观赏植物色、香、形特色的育种技术体系,填补我国的空白。

从1987年第一例利用基因工程技术成功进行花色改造至今,已有10多年,其间已在多种植物上成功地进行了花色、花形、花寿命等基因工程技术的操作。但因为花的性状受多种因素的影响,而目前对于花发育的分子遗传学知识的认识仍然有限,因此,还不能随心所欲地进行花卉性状的改造。相信随着分子生物学及基因工程技术的不断成熟和发展,花卉基因工程的进展将更加迅速,并有可能给花卉业带来革命性的影响,不仅能培育出色彩缤纷、形态独特、花香四季的奇花异草,而且在理论上为开花生物学、发育生物学、物种多样性及进化机理研究提供信息调控依据。

参考文献

- [1] Chen J S (程金水). Molecular breeding [A]. In: Genetic Breeding Science of Garden Plant [M]. Beijing: Chinese Forestry Press, 1999. 197-207. (in Chinese)
- [2] Yan Y D (杨又迪). Introduction of horticultural research in USA [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2000, 27(Suppl):563. (in Chinese)
- [3] Chen Z L (陈章良). Present situation of research and industry of agricultural biological engineering, and strategy in developing the research and research in our country [A]. In: Lin Z P (林忠平). Green Gene for 21st Century [M]. Beijing: Science Press, 2000. 1-13. (in Chinese)
- [4] Fu R Z (傅荣昭), Ma J S (马江生), Cao G C (曹光诚), et al. Advances in genetic engineering of color, fragrance and shape of ornamental plants [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 1995, 22(4): 381-385. (in Chinese)
- [5] Pan H T (潘会堂), Zhang Q X (张启翔). Recent advances of research on ornamental plant resources, genetics and breeding [J]. J Beijing For Univ (北京林业大学学报), 2000, 22(1):81-86. (in Chinese)
- [6] Meng F J (孟繁静). Molecular Biology of Plant Flower Development [M]. Beijing: Chinese Forestry Press, 2000. (in Chinese)
- [7] Mol J, Cornish E, Mason J. Novel coloured flowers [J]. Curr Opin Biotech, 1999, 10:198-201.
- [8] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. Plant Physiol, 2001, 126:485-493.
- [9] Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, et al. A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene

- [J]. *Nature*, 1987, 332:677-678.
- [10] Lloyd A M, Walbot V, Davis R W. Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *C1* [J]. *Science*, 1992, 258:1773-1775.
- [11] Holton T A, Bryugliera F, Lester D R, et al. Cloning and expression of cytochrome *P450* genes controlling flower colour [J]. *Nature*, 1993, 366:276-279.
- [12] Chuck G, Robbins J, Nijjar C, et al. Tagging and cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element activator [J]. *Plant Cell*, 1993, 5:371-378.
- [13] Griesbach R J. The effect of the *Ph6* gene on the color of Petunia hybrida Vilm. glowers [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1998, 123(4): 647-650.
- [14] Fukuda-Tanaka S, Inagaki Y, Yamaguchi T, et al. Colour-enhancing protein in blue petals [J]. *Nature*, 2000, 407:581.
- [15] Yamaguchi T, Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, et al. Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(5):451-461.
- [16] Van Altvorst A C, Bovy A G. The role of ethylene in the senescence of carnation flowers [J]. *Plant Growth Regul*, 1995, 16: 43-53.
- [17] Klee H J, Hayford M B, Dretzmer K A, et al. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants [J]. *Plant Cell*, 1991, 31:1187-1193.
- [18] Fernandez D E, Heck G R, Perry S E, et al. The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically: inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression [J]. *Plant Cell*, 2000, 12:183-197.
- [19] Gan S, Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin [J]. *Science*, 1995, 270: 1986-1988.
- [20] Derks F H M, Van Dijk A J, Hnaisch-Ten Catc C H, et al. Prolongation of vase life of cut rose via introduction of genes coding for antibacterial activity: somatic embryogenesis and *agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Acta Hort*, 1995, 405: 205-209.
- [21] Luo D (罗达). Molecular genetics of flower development [A]. Xu Z H (许智宏), Liu C M (刘春明). *Molecular Mechanism of Plant Development* [M]. Beijing: Science Press, 1999. 89-106. (in Chinese)
- [22] Zhao H E (赵惠恩), Chen J Y (陈俊愉). Some advances in molecular genetics of flower development and its potential value in breeding of ornamental plants [J]. *J Beijing For Univ (北京林业大学学报)*, 2001, 23(1):81-83. (in Chinese)
- [23] Weigel D, Nilsson O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants [J]. *Nature*, 1995, 377:495-500.
- [24] Shao H S (邵寒霜), Li J H (李继红), Zheng X Q (郑学勤), et al. Cloning of the *LFY* cDNA from *Arabidopsis thaliana* and its transformation to *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1999, 41(3):268-271. (in Chinese)
- [25] An L X (安利忻), Liu R W (刘荣维), Chen Z L (陈章良), et al. Studies on *Petunia hybrida* transformed with flower-meristem-identity gene *API* [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2001, 43(1):63-66. (in Chinese)
- [26] Pellegrineshi A, Damon J P. Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Bio Tech*, 1994, 12:64-68.
- [27] Dudareva N, Cseke L, Blanc V M, et al. Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase genes expression in the *C. breweri* flowers [J]. *Plant Cell*, 1996, 8:1137-1148.
- [28] Van Der Krol A R, Lenting R J, Veenstra J G, et al. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation [J]. *Nature*, 1988, 333:866-869.
- [29] Napolio C, Lemieuz C, Jargensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes *in trans* [J]. *Plant Cell*, 1990, 2:279-289.
- [30] Bao M Z (包满珠). Advances in research and application of biological technology in ornamental plants in our country [A]. *Twenty Years of Scientific Technology in Ornamental Plants* [M]. Beijing: Science Press, 1999. 115-125. (in Chinese)