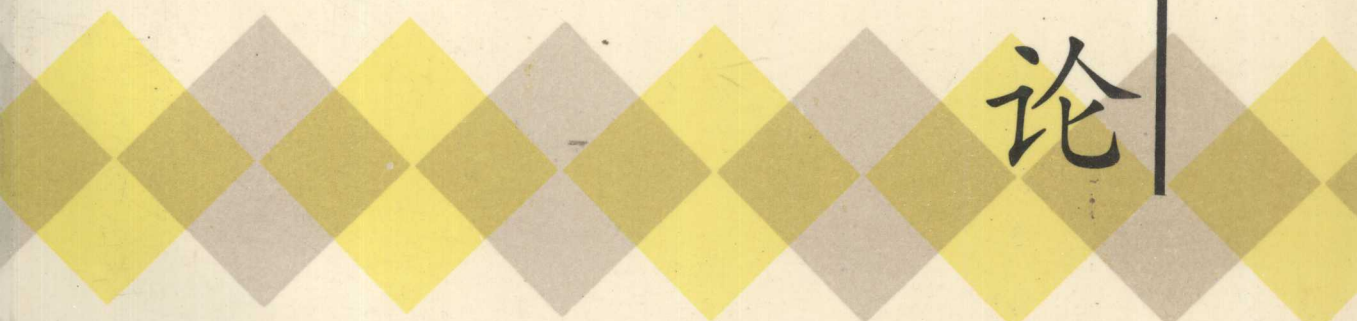


林金安主编 王宏良副主编

东北林业大学出版社

植物科学综论



植 物 科 学 综 论

林金安 主 编
王宏良 副主编

04-1
2



东北林业大学出版社

(黑) 新登字第 10 号

植物科学综论

林金安 主 编

王宏良 副主编

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

东北林业大学印刷厂印刷

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 21.25 字数 457 千字

1993 年 12 月第 1 版 1993 年 12 月第 1 次印刷

印数 1—700 册

ISBN 7-81008-439-9

S·107 定价: 15.00 元

前 言

植物科学 (Plant Sciences) 研究的对象是整个植物界。近 20 年来, 由于分子生物学和环境生物学以及近代技术科学、数学、物理、化学等学科的许多新概念和新技术被引入植物科学的各个领域, 大大促进了植物科学的发展。

本书收集了 30 篇文章, 内容包括植物科学的各个领域, 如植物分子生物学、植物胚胎学、植物细胞学、植物生理学、植物形态学、植物解剖学、植物分类学和植物生态学等。除有关基础理论的研究进展外, 还选用了有关理论与应用结合、研究方法介绍等方面的文章。这些文章主要是由活跃在各大学和科研单位的青年学者, 结合自己的研究, 并综合国内外的研究撰写而成的。我们期望本书的出版能对广大植物科学工作者、研究生、大学生及有关研究人员有所裨益。

由于植物科学涉及的内容十分广泛, 一本书是很难全面包括的, 这种编写方式也只是一种尝试。我们希望有更多的植物科学工作者参与这方面的工作, 共同推进植物科学的发展。

最后需要说明的是, 由于编写、组织过程时间仓促, 书中一定会有不妥之处, 我们衷心希望读者提出宝贵意见, 以利我们今后工作的改进和提高。

编 者

1993 年 8 月

目 录

植物激素分子生物学的研究进展	马庆虎 (1)
利用转基因植物生产有用的次生代谢产物	邱德有 (20)
植物小孢子培养研究进展	
刘公社 朱至清 刘岩 刘凡 曹鸣庆 CRAMBE E. PICARD E. BONJEAN A. (35)	
被子植物的花粉	方瑾 陈令静 (46)
植物抗寒性的研究进展	王毅 (57)
柑桔汁囊的形态发生、离体培养及饮料工业利用的研究现状	关雪莲 (65)
花粉粒和花粉管中细胞骨架研究进展	蔡雪 董云洲 (77)
细胞遗传学在油菜远缘杂交研究中的新进展	李再云 刘后利 (91)
果树光合作用研究进展	彭永宏 (100)
植物组织与细胞培养中次生产物代谢调控的 研究进展	尹作鸿 叶和春 李国凤 秦秀芹 匡廷云 (110)
杨树人工林定向培育中无性系选择的生理学研究动态	刘建伟 (118)
导管及其在植物水分运输中的作用	林金星 林金安 (125)
形成层研究现状与展望	魏令波 林金星 (138)
次生维管组织的二次变化	林金安 林月惠 张胜利 (152)
韧皮部的系统发育	刘宏顺 奇文清 (163)
创伤系统及其应用	张仲鸣 林月惠 范六民 (174)
我国植物分类学的基本资料	马金双 (186)
壳斗科植物分类系统的变迁及争论焦点	林金星 李正理 (197)
土壤种子库研究评述	安树青 林向阳 林金安 (211)
物种多样性指数与物种多度分布格局	谢晋阳 (222)
气候-植被关系的研究 (I) ——气候-植被分类	周广胜 (234)
气候-植被关系的研究 (II) ——植物的净第一性生产力研究	周广胜 (246)
植物对大气污染生物指示与监测作用研究——回顾、进展与展望	蒋高明 (255)
景观生态学的历史回顾与展望	王仰麟 (268)
大气污染对森林遗传资源多样性的影响	汪政科 魏令波 (276)
植物种群生态学研究进展	郑元润 徐文铎 (287)
我国枣树研究概况	王戴 张秀珍 (300)
猕猴桃发展及研究	梁铁兵 (305)
植物基因转移方法	毕亚兵 (316)
人工林地力衰退和树木施肥的研究	王辉民 张家武 (327)

植物激素分子生物学的研究进展

马庆虎

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

1953年, Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构模型, 开创了分子生物学的研究^[139], 其后分子生物学发展迅速, 已成为最富有成果的研究领域之一。回顾分子生物学的研究历史, 在 50、60 年代, 一些开创性的成就包括 DNA 的复制^[63], 遗传密码的破译^[146], mRNA 的发现^[21,138]以及中心法则的阐明^[26]等, 这些主要解决了分子生物学开创初期所面临的一些根本性的理论课题, 为其以后的发展奠定了基础。从 70 年代起, 以限制性内切酶^[58,117,140]为代表的一些工具酶的研究最终导致 DNA 重组技术的诞生^[25], 并随之形成了一系列的实验方法, 比如琼脂糖电泳分析 DNA 片段^[4,103], 分子杂交^[118], 基因文库^[24,49]以及近年来广泛开展的限制性片段多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, 简称 RFLP)^[19,144]和聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, 简称 PCR)^[99]等, 这不仅对分子生物学的研究具有重大的理论和现实意义, 也带动了整个生物学各分枝学科的研究向分子水平看齐。现在几乎没有一门生物学的研究不采用分子生物学的方法和手段, 以植物生理学为例, 由美国出版的国际上著名的植物生理学年评 (Annual Review of Plant Physiology) 从 1988 年起改为植物生理学和分子生物学年评 (Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology), 从中也可以看出分子生物学对各个学科的影响。

植物激素的研究自 Went 分离生长素^[141]开始, 早期的研究着重于分离鉴定新的植物激素, 并且研究它们的生理作用, 至 70 年代基本上确立了五大类植物激素, 即生长素, 细胞分裂素、赤霉素、脱落酸和乙烯^[34,78,95,124], 虽然近年来在发现新的植物激素方面又有一些进展, 对多胺类 (polyamines)^[112]、油菜素内酯类^[73]、茉莉酸类 (jasmonates)^[28]以及水杨酸^[96] (salicylate) 类物质进行了比较多的研究, 但是迄今为止整个植物激素的研究仍然以五大类植物激素为基本框架。对它们的生理作用的大量研究表明, 植物激素在调节植物的生长发育过程中起重要作用, 其作用范围涉及从种子萌发、生长、开花、结果一直到衰老脱落和逆境反应等几乎植物生命过程中所有的环节, 因此这一领域的研究工作一直受到植物学家的高度重视。80 年代以前的研究主要集中在分离测定方法的建立^[1], 新的植物激素分离鉴定, 阐明激素的生理作用、作用机理以及代谢和运转, 人工合成的生长调节剂及其在生产实践中的应用等方面, 其中核心问题是激素的作用机理和生理作用, 以往通常采用外施与内源水平的测定进行研究, 由此产生的一系列问题如吸收运转、内外因素干扰和因果关系不明等一直是植物激素学家的难题^[132]。分子生物学方法的应用, 不仅对植物激素的理论研究具有重要意义, 也为应用植物激素进行遗传育种展

示了广阔的前景,因此近年来已经逐渐成为研究的热点。

植物激素的研究对于植物分子生物学的发展同样具有重要意义。与其它分枝的分子生物学相比较,植物分子生物学比较独特之处在于转基因植物的获得^[94]。获得转基因植物(transgenic plants)除了需要DNA重组技术之外,一方面需要植物特殊的基因载体(vector)和转化技术,另一方面则需要植物的组织培养。植物基因的载体直接受益于植物激素相关的农杆菌的研究,而植物的组织培养则于植物激素密切相关。有关植物的组织培养的概念最早是由德国植物学家Gottlieb Haberlandt于1902年提出,他用野芝麻(*Lamium purpureum* L.)、凤眼莲(*Eichhornia crassipes* Solms)、腺毛肺草(*Pulmonaria mollissima* Kern.)和虎眼万年青(*Orthithogalum* L.)等植物的表皮和叶肉组织,以Knop溶液加上蔗糖进行了培养^[42],但未获成功,直到1934年第一次利用番茄的根离体培养成功^[142]。50年代,Skoog和崔徵等人首先证明了植物激素对离体植物组织生长的重要性^[108,109],并最终导致在胡萝卜体细胞胚中证明植物细胞的全能性(totipotency)^[98,122,123]。从此植物的组织培养技术发展迅速,也正是由于有了这样的研究基础,在DNA重组技术诞生之后通过应用于植物领域即于1983年获得了首例转基因植物^[53],近年来已经有50余种植物获得了转基因植株^[94],使得植物分子生物学成为分子生物学中最富有成果的研究领域之一。

有鉴于植物激素分子生物学研究的重要意义,本文拟就此做以综述,并结合本实验室近年来的工作和一些观点,以期引起人们的注意和讨论。

一、转基因植物与植物激素的生理作用

1. T_i 质粒与转基因植物

早在1907年,Smith等^[116]就发现致瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感染受伤的植物组织后能够诱导冠瘿瘤(crown gall)的形成。后来人们证明农杆菌的致瘤性是由于它含有一个长约200kb的大质粒,它在农杆菌感染植物组织时进入细胞之内,而农杆菌的染色体DNA被排斥在细胞之外,这种质粒被称为 T_i 质粒(tumor-inducing plasmid)^[147]。随后又证明 T_i 质粒上有一段特定的DNA区域在农杆菌感染植物细胞后被稳定地整合到植物的染色体上,以后即随着染色体在植物细胞中遗传给后代,这段DNA被称之为转移DNA(transferred DNA),简称T-DNA^[23],另外在 T_i 质粒上还有一段与农杆菌转移T-DNA有关的区域,称为Vir区(virulence region)^[88]。

进一步研究表明,整个T-DNA区内与整合有关的是其两侧约几百个碱基的所谓边界顺序(border sequence)^[93,134],边界顺序的特点是其含有一个25bp的正向重复序列^[137],在边界顺序之间约23kb长的T-DNA区段与整合无关,而且任何外源DNA只要插入到边界顺序之间就能被整合到植物的染色体之中,也就是说边界顺序与被整合的DNA之间是顺式作用(cis action)。Vir区长大约为40kb,已经鉴定出有24个基因,分别属于8个操纵子(operon),分别以VirA, B, C, D, E, F, G和H命名,这8个操

纵子又由一个控制子(regulon)控制,其结构十分复杂^[121]。Vir 区的主要功能是使 T-DNA 由农杆菌转入到植物的染色体上,包括与植物细胞的识别和附着,对 T-DNA 的切割,转移和整合等,这些作用包括农杆菌染色体上一些基因的协同作用^[32]。虽然现在对有关 Vir 基因的详细功能还不太清楚,但是有一点已经证明,即它们是通过合成一些蛋白质而负责 T-DNA 的转移,也就是说 Vir 基因的作用是反式作用(trans action)^[29,50]。

根据农杆菌和 Ti 质粒的上述特点,人们对野生型的 Ti 质粒进行了一系列的加工改造,从而设计出了一系列的易于 DNA 体外操作的基因载体。这些载体大体上可分为两类:一类叫做共整合载体(cointegrating vectors),这类载体与农杆菌中的帮助 Ti 质粒有一段同源序列,在进入农杆菌细胞后可以通过同源重组整合到农杆菌的 Ti 质粒中,这就要求每一类共整合载体有一个对应的农杆菌株系,比较常见的有 pGV3850,是农杆菌 C58 质粒去除其 T-DNA 中的植物激素基因而由 pBR322 替代,并含有左、右边界顺序。任何含有 pBR322 同源顺序的质粒都可以共整合到这种 Ti 质粒中再转化植物细胞^[148]。另外一类共整合系统称做 SEV,它是将 Ti 质粒的右边界顺序的植物激素基因去除,保留左边界顺序以及一小部分称做 LIH (limited internal homology) 的 T-DNA 区段,含有 LIH 区段以及右边界顺序的载体可以通过重组得到含有左、右边界顺序的 Ti 质粒而转化植物^[35]。另一类载体称做双元载体(binary vectors),这类载体含有广泛宿主范围的复制子,可以在大肠杆菌和农杆菌中自主复制,并且具有左、右边界顺序和用于重组 DNA 操作所需要的限制酶位点和抗生素选择基因。外源 DNA 通过通常的 DNA 重组操作插入双元载体后即可转化到农杆菌细胞内,所需要的 Vir 基因是由农杆菌中的帮助质粒以反式作用提供。虽然双元载体在农杆菌细胞内比共整合载体的稳定性稍低一些,但是它操作方便,可以在比较广泛的农杆菌株系中使用,而且转化农杆菌比形成共整合质粒的几率要高出 10^4 ,因此近年来越来越多的转基因植物的研究都采用了双元载体系统,象常见的 pBin19^[16], pGA471^[8]和 pMON503^[52]等都属于双元载体。

以农杆菌为基础所发展出的载体系统对转基因植物的研究起到了极大的推动作用。虽然近年来又有一些新的技术产生,如电激(electroporation)^[36],花粉管通道(pollen tube pathway)^[68],基因枪(biolistics bombardment)^[100]等,但是这些方法通常是解决了外源 DNA 进入植物细胞的问题,在细胞内整合到植物染色体上一般仍要有 Ti 质粒上边界顺序的作用。

值得注意的是近年来除了利用致瘤农杆菌 Ti 质粒所设计的载体外,对与其类似的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)中的发根质粒(root-inducing plasmid,简称 Ri 质粒)也进行了类似的工作^[149]。因为 Ri 质粒在转移外源 DNA 方面与 Ti 质粒非常相似,这里就不再赘述。另外近年来在分离植物基因时所采用的 T-DNA 标记技术(T-DNA tagging)也日益广泛,有兴趣的读者可参阅有关的文章^[85]。

2. Ti 质粒与植物激素基因

50 年代崔微和 Skoog 等人关于植物激素和烟草组织培养方面的研究一方面导致了细胞分裂素的发现,另一方面还证明了生长素和细胞分裂素在组织培养过程中维持离体

细胞的生长和分化是必需的,而感染农杆菌之后的冠瘿瘤细胞在离体培养过程中不需要外加生长素和细胞分裂素即能无限分裂生长,这表明感染农杆菌之后冠瘿瘤细胞本身具有了合成这两种激素的能力。根据前面有关 Ti 质粒转化植物细胞的研究可以知道,转化后只有 T-DNA 区段进入植物的染色体中,对 T-DNA 结构的研究表明其中含有不同的基因,经过转座子突变证明,基因 1 和 2 与生长素的合成有关,基因 4 与细胞分裂素的合成有关^[38,87]。在大肠杆菌内的基因克隆进一步证明,基因 4 编码异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase,简称 ipt)^[7,12,22],这个酶负责催化细胞分裂素生物合成过程中最重要的一步限速反应。基因 1 编码色氨酸单加氧酶(tryptophan monooxygenase,简称 iaaM)^[130,135],基因 2 编码吲哚乙酰胺水解酶(indoleacetamide hydrolase,简称 iaaH)^[59,102],这两个酶负责吲哚乙酸的生物合成。这些基因的核苷酸序列也已经鉴定清楚^[11,40]。

在利用 Ti 质粒为载体转化外源基因时人们注意到,由于 T-DNA 上植物激素基因的存在使得转化植物在形态上出现异常,影响其正常的生长和发育,为此通常的办法是将 T-DNA 上这些植物激素基因去掉,形成所谓的解除武装的 Ti 质粒(disarmed Ti Plasmid)。利用这样的 Ti 质粒转化植物细胞可以得到分化正常的植株^[148]。而有趣的是,Ti 质粒上的这些植物激素基因又可以做为目的基因,以转基因植物进行植物激素生理作用的研究。

3. 植物激素作用机理的研究

多年来,植物激素学家一直希望能够人为地控制植物激素在植物体内的合成,以便更深入地研究其作用机理。对于动物可以采取切除和移植腺体的方法达到上述目的。植物激素由于在体内缺乏十分专一的合成部位,要做到这一点就比较困难,而转基因植物使这一希望成为了现实。Monsanto 公司首先于 1987 年从农杆菌中克隆出 iaaM 和 iaaH 基因,并与花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus) 19S 启动子结合,通过农杆菌载体稳定整合到矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm),的基因组中,最后获得了转基因的矮牵牛植株,其组织中吲哚乙酸含量比未转基因的植株增加 10~100 倍。在形态上,转基因植株表现出强烈的顶端优势,很少分枝、茎伸长而且木质化加剧、不定根增多等生长素的典型反应,而且这些性状可以稳定地遗传到后代中去^[62]。将 iaaM 基因与果蝇(*Drosophila melanogaster*)的热激蛋白 hsp70 启动子结合,感染落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)茎段和胡萝卜根圆片以及烟草叶圆片,经 42℃ 热激处理后能明显促进这些组织的生根能力^[57]。导入 iaaM 和 iaaH 基因的烟草(*N. glutinosa* L.)细胞可以在没有 2, 4-D 的情况下诱导体细胞的形成^[2]。为了研究生长素在植物体内的调控情况,有人将 iaaM 和 iaaH 基因引入烟草后发现,在转化的愈伤组织中自由态吲哚乙酸含量比对照增加 2 倍,结合态吲哚乙酸增加 3 倍,而再生植株中自由态吲哚乙酸含量仅比对照植株增加 40%,这表明整体植物可以自动调节其体内生理活性的生长素水平。在这种转基因的烟草中还发现其形态上与正常烟草没有显著差异,但是花粉和种子的形成以及种子的发芽率都大大降低,表明生长素在营养生长和生殖过程中的作用具有一定的差异,值

得进一步研究^[106]。将 *iaaM* 和 *iaaH* 与不同强度的启动子（比如 T_R -DNA1' 启动子, CaMV35S 启动子以及马铃薯 ST-LS1 启动子等）结合后转化烟草, 再经过相互杂交得到 *iaaM* 与 *iaaH* 两种基因表达强度不同的组合, 分析其吲哚乙酸的含量表明, 吲哚乙酸的生物合成主要与 *iaaM* 基因的表达强度相关, 而且还发现转基因烟草中吲哚乙酸的增加会引起脱落酸水平的降低, 其机理有待进一步研究^[107]。

细胞分裂素 *ipt* 基因通常是与热激蛋白启动子结合, 这样可以克服过量的细胞分裂素对再生根的抑制。采用玉米热激蛋白和果蝇热激蛋白 *hsp70* 启动子与 *ipt* 基因结合转化烟草, 取得了类似的结果^[74, 114]。转基因植株在热激处理后其体内细胞分裂素含量能增加上百倍之多, 即使在没有热激处理的正常生长环境下, 这些转基因植株的细胞分裂素含量也比对照高数倍, 从而导致植株矮小、侧芽增多、根系生长减慢, 但是对植株的开花、花期以及生殖过程没有显著影响。采用大豆热激蛋白 *hsp70* 启动子与 *ipt* 基因结合转化烟草, 其再生植株在非诱导条件下细胞分裂素的合成不增加, 也未表现任何生长异常。经过热激处理, 细胞分裂素的含量增加 5 倍, 并观察到侧芽增多、茎伸长等特征, 另外还发现叶片黄化、叶子发育异常、花芽生长延迟等以前未报道的现象^[5], 应该进一步地探讨。对 *ipt* 基因在不同组织内的表达特异性研究表明, 由热激蛋白启动子与 *ipt* 基因组成的嵌合基因只在茎、叶中表达, 在根系中不表达, 而用同样的启动子指导其它基因却能在根中获得高水平的表达, 如 *NPT II*^[120], 这是否由于根做为正常植株细胞分裂素合成的主要部位具有某种调控机制还有待证明^[114]。

二、受植物激素调控的基因及其分离

1. cDNA 文库与基因调控

研究高等生物体内的基因调控是分子生物学的一项重要重要的研究内容。以植物为例, 由于植物细胞具有全能性, 从理论上讲, 每个细胞都包含有发育成完整植物的全部遗传信息。而在植物的个体发育过程中, 这些基因并不是没有组织的一起表达, 而是以一定的时间和空间顺序地表达, 只有这样才能保证植株发育的协调性, 由一个受精卵最后形成一个完整的植株, 可以说在植株的发育过程中, 以及植株与外界环境的的相互作用, 无时无刻不涉及到相关基因的调控表达, 因此了解基因的调控已经成为探索生命秘密和最基本的手段之一。

根据中心法则, 某个基因的活化首先表现在转录出相应的 mRNA。1970 年, 有两家实验室同时证明在病毒中存在一种以 RNA 为模板合成互补 DNA (complementary DNA, 即 cDNA) 的酶, 这种酶被称为逆转录酶 (reverse transcriptase)^[10, 128], 随后即利用逆转录酶进行了 cDNA 文库的工作。最初主要用于研究像人体珠蛋白这样高丰度的基因的表达^[24], 由于技术的不断进步, 现在分离丰度低至 0.001% 的 mRNA 种类都可以获得成功, 各种方法层出不穷。由于 cDNA 文库在研究基因结构、基因的表达和调控以及基因的分离方面的重要作用, 已经成为分子生物学中研究最广泛的领域之一。

cDNA 文库技术通常可以分为几个基本步骤,一是选择合适的组织,一般是某种 mRNA 含量比较多的组织,然后分离其中的 poly (A⁺) -RNA。第二步是合成 cDNA,第三步是将 cDNA 插入合适的载体再转入有关的宿主中形成文库 (library),最后一步是筛选获得有用的 cDNA 克隆并用于以后的进一步研究。具体的实验方法随着分子克隆技术的发展变化很大,比如现在已经开始采用与 PCR 技术结合以简化筛选的步骤,有兴趣的读者应该随时注意有关的进展。

植物激素是植物体内的调节控制因子,在环境与植物体内以及植物体内各部分之间的相互协调方面起重要作用,而这些作用许多是通过调节基因表达的方式实现的,因此通过 cDNA 文库研究对基因表达的调控对于了解植物激素的作用机理具有重要意义,也是近年来进展迅速的领域。以下将分激素对有关的情况做一介绍。

2. 生长素

生长素的作用按其作用的速度可划分为两类:快速反应如细胞的伸长,在玉米胚芽鞘、豌豆和大豆的胚轴中其作用的延迟期在 10~25 分钟之内;长效反应,如细胞分裂、分化和形态建成,其作用延迟期从几小时到几天。

在关生长素引起细胞伸长的作用机理,很早就有人认为与基因的表达有关^[60],直到 1982 年采用体内翻译及双向电泳技术才证明施用生长素 10~20 分钟内有 mRNA 的合成^[129,150],进一步采用 cDNA 文库技术分离到许多 cDNA 克隆,其中研究比较多的包括从大豆胚轴中分离的 pGH1~4 克隆和一组由生长素正调控的小 RNA 克隆 (small, auxin-up-regulated mRNAs; 简称 SAURs)^[43,70]。Northern 杂交以及核转录 (nuclear run-on) 测定表明这些基因的转录受生长素特异性的诱导,其最早出现的时间约在外施生长素后 2.5 分钟,这时尚未观察到细胞的伸长,通过蛋白合成抑制剂环己亚胺的研究表明其中一些基因涉及生长素的直接作用。通过原位杂交证明 SAUR 转录与胚轴的向地性弯曲呈正相关^[71],将这些 cDNA 克隆的核苷酸顺序以及基因结构分析后^[39,69],将其启动子与 GUS 报告基因连接转入烟草,在转基因烟草中证明其控制的 GUS 基因表达受生长素调节^[44],而且与植物体内生长素的向性梯度相关连^[65],因此这些基因在生长素的作用方面可能具有重要作用。

有关生长素与细胞分裂的关系,有人从烟草原生质培养细胞中经双向电泳发现由生长素诱导出现的两个蛋白^[77],进一步从 cDNA 文库中筛选出两个克隆,分别命名为 parA 和 B, parA 编码 220 个氨基酸,为一亲水蛋白质, parB 编码 213 个氨基酸,经分析与谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase) 顺序接近,其意义有待研究^[125,126]。这两个 cDNA 都出现在细胞分裂由 G₀ 期到 S 期的转变过程中,将基因的 5' 端顺序与 GUS 报告基因拼合后证明其活性受生长素的调节^[127],因此估计这两个基因与细胞分裂的起始有关。

3. 赤霉素

与赤霉素有关的生理反应研究最多的是糊粉层系统。在种子萌发过程中赤霉素促进

胚乳中贮藏物质的降解以供给幼苗的生长需要,这涉及到一系列的酶的作用,其中以 α -淀粉酶研究最为详尽。从小麦糊粉层的cDNA文库中经差异筛选获得七类受赤霉素诱导的基因族(gene family),其中一类为 α -淀粉酶,其它六类的功能尚不清楚^[15], α -淀粉酶分三个异构酶,分别命名为 α -Amy1, α -Amy2^[64]和 α -Amy3^[14],每一类异构酶又由不同的同源基因组成,情况很复杂。 α -Amy1只在糊粉层细胞表达, α -Amy3只在发育的胚乳中表达,而 α -Amy2则在这两种组织中均表达。将 α -淀粉酶的基因的上游区段与GUS报告基因连接后在燕麦糊粉层原生质体做瞬间表达(transient expression)证明,在转录起始点上游约300bp的区段负责赤霉素的诱导反应,而且这种诱导受脱落酸的抑制^[55],利用电泳延迟测定(gel retardation assay)在水稻的糊粉层细胞还分离到一种与赤霉素调控基因有关的结合蛋白^[91]。由 α -淀粉酶基因中初步鉴定的赤霉素反应因子(GAREs)的保守序列为GGCCGATAACAAACTCCGCC,它具有增强子的功能^[110],不过由于 α -淀粉酶的基因结构十分复杂,而且还涉及与脱落酸的协同作用,有关赤霉素如何调控这些基因的活动仍然有大量的问题需要进一步的研究。

4. 脱落酸

脱落酸在植物的逆境反应和生长发育的许多方面都起重要作用,而有关脱落酸控制基因表达的研究则比较多的集中于种子系统。种子发育通常可以分为三个阶段:器官形成阶段,贮藏物质的积累阶段和种子脱水(desiccation)阶段,其中脱落酸的作用主要是在后二个阶段。由脱落酸诱导合成种子贮藏蛋白包括油菜种子^[27],大豆种子^[20]以及小麦的7S球蛋白^[143]等。

种子发育后期的一个显著特点是脱水,其水分含量可以从占鲜重的85%下降到10%,在这个过程中通常有一些称做胚发生晚期蛋白(LEA proteins)的积累,这在棉花^[9,37]、油菜^[47]、大麦^[51]、水稻^[80]、小麦^[67]和玉米^[41]的种子中都已经得到证实,因此可能在植物种子中普遍存在。已经研究的大麦中的22kD蛋白、玉米中的15.4kD富含甘氨酸蛋白、水稻中的Rab蛋白以及小麦中的E_m蛋白,它们都具有相似的表达特性,即其表达是在胚形成的后期,在成熟干燥的种子中存在,随着种子的萌发而含量迅速下降,受ABA的诱导,而且在种子之外的其它组织如幼苗、根、茎中也普遍存在,在大麦幼苗中干旱可以诱导这类蛋白的迅速积累,用脱落酸预处理大麦幼苗,随着这类蛋白的积累,幼苗在迅速失水的情况下的存活力明显增加。推测这些LEA蛋白可以作为渗透保护剂(osmoprotectant)在种子发育以及正常植株干旱情况下发挥作用^[33],最近从大麦中分离到的一个受脱落酸调控的基因,经鉴定编码醛糖还原酶(aldose reductase),是负责山梨醇的合成^[13],这也与失水时的渗透调节有关。

5. 细胞分裂素

细胞分裂素在植物的形态发生中起重要作用,如诱导芽的形成,由此推测它对基因表达的影响应该是十分广泛的,但是由于缺少合适的模型系统,有关细胞分裂素调控基因表达的研究进展十分缓慢。

以转农杆菌细胞分裂素合成基因的烟草为材料分析其基因表达产物,发现细胞分裂素诱导的产物主要是与防御有关的蛋白,包括伸展蛋白(extensin),几丁质酶(chitinase)和抗病相关蛋白(pathogenesis-related protein,简称PR)^[75,76],在以细胞分裂素诱导烟草薄层细胞形成花芽的过程中也有类似的结果^[83]。这些基因产物推测是细胞分裂素诱导形态发生等而引起的次级效应,而不是细胞分裂素的直接作用。

6. 乙烯

乙烯在果实成熟,特别是呼吸跃变型果实中起重要作用,研究比较多的材料包括番茄、苹果和西葫芦(*Cucurbita pepo* L.)等。经过cDNA克隆筛选了一些在果实成熟过程中受乙烯调控的基因,经分析其中一些属于细胞壁的水解酶,比如多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase,简称PG)^[30,104,111]。在番茄中,PG为一个单拷贝基因,长约7kb,含有8个内含子(intron)^[17],而PG酶蛋白分为三种异构酶^[6],其中PG2A和PG2B是由翻译后糖基化不同所致^[90],PG1是由一分子的PG2加上一个41kD的蛋白组成^[79],关于41kD蛋白的作用尚不清楚,估计与PG酶的稳定及定位有关。整个PG的表达主要是在果实成熟过程中,估计与果实的软化有关。其它受乙烯调控的基因包括E8^[66],pTom5^[97]等,E8基因经初步鉴定能抑制乙烯的合成^[92],而pTom5则与番茄中色素合成有关^[18],其详细的结构还待进一步的研究。

乙烯除了调节其它植物基因外,它对自身的合成基因也有调节作用。虽然在80年代初已经搞清乙烯合成的途径为蛋氨酸→S-腺苷蛋氨酸→ACC→乙烯^[145],其中控制ACC和乙烯形成的酶分别为ACC合成酶和乙烯形成酶,但是试图分离这两个酶蛋白及其基因

的工作却一直未获成功,主要是由于这两个酶在植物体内极不稳定,而且其含量及其mRNA的含量都很低(通常低于0.001%),直到1989年有人采用先纯化ACC合成酶的抗体,再筛选cDNA文库,从而从激素诱导的西葫芦中分离到ACC合成酶的cDNA克隆^[101]。现在知道ACC合成酶是一个基因家族(multi-gene family)所编码,受受伤、生长素、金属离子和果实发育等多种因子调控,包含有多种同工酶,已经分离得到cDNA克隆的材料有受伤诱导的笋瓜(*Cucurbita maxima* Duth)^[81]、激素诱导的西葫芦^[101]、成熟的苹果^[31]和受伤及成熟的番茄果实^[86,133]等。在西葫芦中,通过研究其两个ACC合成酶基因在染色体上的分布及其序列分析表明,其编码区同源性高达97%,而5'和3'端则仅为50%,这也证明了顺式因子在调控这个基因表达方面的重要性^[54]。

乙烯形成酶的研究则完全采用了反向生物学的策略,首先从cDNA文库中筛选出番茄果实成熟表达的cDNA克隆,将它们分别在酵母和蛙卵中表达证明具有乙烯形成酶的功能^[46,119],而分离酶蛋白的工作直到1991年才第一次从香瓜(*Cucumis melo* L.)中得到初步纯化的乙烯形成酶^[136],而通过此途径进一步分离基因尚未成功。由于乙烯形成酶的基因结构也很复杂,还需要做进一步的研究。

三、植物激素基因工程与农业生产

植物生理学做为农作物的基础理论研究,其目标将服务于农业生产,对于植物激素的研究情况也是这样。60、70年代由于对植物激素在农作物上生理作用的广泛了解和大量廉价高效的人工合成的生长调节剂的问世,在农业生产上开始从化学施肥转向化学调控,也就是不仅仅限制于施用营养元素,而更重要的是调控农作物的生长,使其获得最佳的经济效率。进入90年代,由于植物激素分子生物学研究的广泛深入,使得人们可以通过基因工程培育一些优良的生产品种,从而可以省去外施生长调节剂所耗费的人力和物力,这将把化学调控的概念提高到一个新的水平。

1. 耐贮藏果蔬品种的培育

水果蔬菜的贮藏保鲜是生产实践中的一个重要问题,以往主要通过气调、低温冷库、保鲜膜等技术来延长果蔬的贮藏时间,但每年要耗费很大的人才物力。近年来,由于植物激素分子生物学研究的深入,对后熟过程的基因活动已经有了相当的了解,结合反义技术的应用,使得这方面有了新的突破。反义技术(antisense RNA technology)主要是通过基因工程的手段特异性地抑制某种基因的表达,从而达到改变植物性状的目的,有兴趣的读者可参阅作者的详细综述^[3]。

首先研究成功的是在番茄果实中抑制PG酶的工作。前文已经介绍过,在研究乙烯调控的基因表达中已经分离出PG的cDNA克隆,并证明了其在果实软化中的作用,为此美国和英国的科学家分别采用PG反义基因抑制番茄果实成熟过程中PG酶的表达,可对PG酶活性抑制90%以上,自交子代抑制PG酶活性可达99%,从而阻止了细胞壁中果胶的解聚^[105,115],在番茄的贮藏品质方面有了一定的改善,并在美国开始大田生产以供应市场。而通过反义基因抑制ACC合成酶^[84]以及乙烯形成酶^[45]基因的表达效果则更加明显,在转基因的番茄果实中,几乎不表现呼吸跃变高峰及乙烯高峰,其果实变软过程可以延长达3个月之久,因此具有很大的商业价值,将这项研究在其它果蔬中推广将具有很大的应用意义。

2. 其它

有人用大豆热激蛋白的启动子hs6871指导ipt基因在烟草中的表达,在转基因植株中观察到延迟叶片衰老的效应,这对试图通过延缓衰老提高作用产量提供了一种途径^[113]。通过细胞分裂素基因在烟草种子内专一性的表达,观察到种子内贮藏蛋白含量的增加,说明细胞分裂素作为一种源对有机物质在植物体内的分配起一定的作用^[72]。转细胞分裂素基因的马铃薯,其营养生长期间的生物产量比对照增加2~3倍,在大田中有些株系还表现出生长期缩短和块茎增多的特征,可以进一步筛选高产品种^[89]。转反义pTom5的番茄可以改变果实的颜色^[18]。相信随着研究的深入,必然会有更多的工作应用于农业生产之中。

四、展 望

分子生物学向生物学各个研究领域的渗透已经成为必然,从以上的介绍可以看出,在植物激素研究领域,这方面的研究已经取得了很大的进展,很多结果对于深入了解植物激素的作用机理具有重要意义,因此已经越来越成为激素研究的热点和前沿。展望未来,应该从几个方面开展工作:有关基因的分离与鉴定,基因的调控与表达,最后还需要借鉴分子生物学新的研究成果及技术方法。

对于基因的分离,从植物激素的基础研究来讲,一是有关植物激素合成和代谢的基因,这方面可以借鉴一些病原微生物中的工作,如农杆菌,假单孢菌(*Pseudomonas* L.)等,这些细菌在长期的生物进化过程由于与植物的相互作用,具有了一些类似于植物激素基因的作用,这为研究植物激素的合成与代谢,特别是在基因水平上提供了一个简单的替代材料。更为重要的则是分离植物体内源的植物激素基因,由于植物基因组比细菌大许多,而且结构十分复杂,因此工作难度很大,现在已经开始的工作,比如 RFLP, T-DNA 标记以至于植物全基因组的顺序分析,都会对此有所帮助,而要加快研究的进展,也许还需要一些新的技术方法,另外选择合适的实验材料,比如基因组相对较小的拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*),使用合适的植物激素突变体^[61],都是十分重要的。

对于分离和鉴定受植物激素调控的有关基因则对了解植物激素的作用机理具有重要意义,同时也可以更好地应用于生产实践之中,比如前文提出的 PG 基因。同时还需要进一步了解基因的调控机理。从已经分离的植物激素调控基因情况来看,还不能简单地以顺式和反式因子而解释清楚的,只有了解了植物体内基因的调控情况才能应用基因工程等技术时取得更好的效果,现在得到的有些转基因植物,虽然外源基因已经整合到植物的染色体中,但是其表达的强度以及组织和时间特异性却不尽如意,其原因也就是在于对植物基因的调控机理了解不够深入,这也是目前这方面的研究日益受到人们重视的原因。

另外对于植物激素作用机理的研究,一个很重要的方面是受体及其信号传递,这是了解植物激素作用的最原初的环节。近年来虽然植物激素受体的工作有了一些进展^[82],也克隆出一些可能的受体蛋白基因^[48,56,131],但是总的来讲开展的工作还比较少,而且是在生长素受体方面工作比较深入,其它几类激素则相对较差。对于信号传递的研究则刚刚起步,大部分是借鉴动物方面的研究结果,因此这方面工作的开展,特别是在分子水平的深入,对于整个植物激素的分子生物学研究具有积极的意义。

总之,植物激素作为具有重要理论意义和应用性很强的研究领域,其分子生物学的研究深入,必将极大促进这一学科的发展,在此基础上结合分子生物学其它领域的进展,如基因工程,转基因植物和细胞工程等,其前景将会非常诱人。

参 考 文 献

- [1] 马庆虎、谭志一、焦述平, 1987: 简评植物激素的几种测定方法。植物生理学通讯, 23 (1): 7~11。
- [2] 刘春明、刘林德、姚敦义、许智宏, 1990: T₁ 质粒的基因 1、2 对烟草体细胞发生的诱导作用。实验生物学报, 23: 1~9。
- [3] 宋艳茹、马庆虎, 1990: 植物基因工程中反义 RNA 的应用。植物学通报, 7 (4): 13~17。
- [4] Aaij, C. and P. Borst, 1972: The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 269: 192~200.
- [5] Ainley, W. M., K. J. McNeil, J. W. Hill, W. L. Lingle, R. B. Simpson, M. L. Brenner, R. T. Nagao and J. L. Key, 1993: Regulatable endogenous production of cytokinins up to 'toxic' levels in transgenic plants and plant tissues. *Plant Mol. Biol.*, 22: 13~23.
- [6] Ali, Z. M. and C. J. Brady, 1982: purification and characterization of polygalacturonase of tomato fruits. *Aust. J. Plant Physiol.*, 9: 155~169.
- [7] Akiyoshi, D. E., H. Klee, R. M. Amasino, E. W. Nester and M. P. Gordon, 1984: T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 5994~5998.
- [8] An, G., B. D. Watson, S. Stachel, M. P. Gordon and E. W. Nester, 1985: New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.*, 4: 277~284.
- [9] Baker, J., C. Steele and L. Dure III, 1988: Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.*, 11: 277~291.
- [10] Baltimore, D., 1970: RNA dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226: 1209~1211.
- [11] Barker, R. F., D. E. Idler, D. V. Thompson and J. D. Kemp, 1983: Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.*, 2: 335~350.
- [12] Barry, G. F., S. G. Rogers, R. T. Fraley and L. Brand, 1984: Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4776~4780,
- [13] Bartels, D., K. Engelhardt, R. Roncarati, K. Schneider, M. Rotter and F. Salamini, 1991: An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *EMBO J.*, 10: 1037~1043.
- [14] Baulcombe, D. C., A. K. Huttley, R. A. Martienssen, R. F. Barker and M. G. Jarvis, 1987: A novel wheat α -amylase gene (α -Amy3). *Mol. Gen. Genet.*, 209: 33~40.
- [15] Baulcombe, D. C. and D. Buffard, 1983: Gibberellic-acid-regulated expression of α -amylase and six other genes in wheat aleurone layers. *Planta*, 157: 493~501.
- [16] Bevan, M. W., 1984: Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.*, 12: 8711~8721.
- [17] Bird, C. R., C. J. S. Smith, J. A. Ray., P. Mourey, M. J. Bevan, A. S. Bird, S. Hughes, P. C. Morris, D. Grierson and W. Schuch, 1988: The tomato polygalacturonase gene and ripening

- specific expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 11: 651~662.
- [18] Bird, C. R., J. A. Ray, J. D. Fletcher, J. M. Boniwell, A. S. Bird, C. Teulieres, I. Blain, P. M. Bramley and W. Schuch, 1991: Using antisense RNA to study gene function: inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. *Biotechnology*, 9: 635~639.
- [19] Botstein, D., R. L. White, M. Stolnick and R. W. Davis, 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Amer. J. Hum. Genet.*, 32: 314~331.
- [20] Bray, E. A. and R. N. Beachy, 1985: Regulation by ABA of β -conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.*, 79: 746~750.
- [21] Brenner, S., F. Jacob and M. Meselson, 1961: An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*. 190: 576~581.
- [22] Buchmann, J., F. J. Marner, G. Schroder, S. Waffenschmidt and J. Schroder, 1985: Tumor genes in plants: T-DNA encodes cytokinin biosynthesis. *EMBO J.*, 4: 853~857.
- [23] Chilton, M. D., R. K. Saiki, N. Tadav, M. P. Gordon and F. Quetier, 1980: T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 4060~4064.
- [24] Clarke, L. and J. Carbon, 1976: A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, 9: 91.
- [25] Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling, 1973: Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 3240~3244.
- [26] Crick, F. H. C., 1958: On protein synthesis. *Symb. Soc. Exptl. Biol.*, 12: 138~163.
- [27] Crouch, M. L. and I. M. Sussex, 1981: Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. *Planta*, 153: 64~74.
- [28] Dathe, W., H. Honsch, A. Diess, W. Schade, G. Sembdner and K. Schreider, 1981: Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta*, 153: 530~535.
- [29] de Framond, A., K. A. Barton and M. D. Chilton, 1983: Mini-Ti, a new vector strategy for plant genetic engineering. *Biotechnology*, 1: 262~269.
- [30] DellaPenna, D., D. C. Alexander and A. B. Bennett, 1986: Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase; analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6420~6424.
- [31] Dong, J. G., W. T. Kim, W. K. Yip, G. A. Thompson, L. M. Li, A. B. Bennett and S. F. Yang, 1991: Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. *Planta*, 185: 38~45.
- [32] Douglas, C. J., R. J. Staneloni, R. A. Rubin and E. W. Nester, 1985: Identification and genetic analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.*, 161: 850~860.
- [33] Dure III, L., M. Crouch, J. Harada, T-H. D. Ho, J. Mundy, R. Quatrano, T. Thomas and Z. R. Sung, 1989: Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 12: 475~486.