

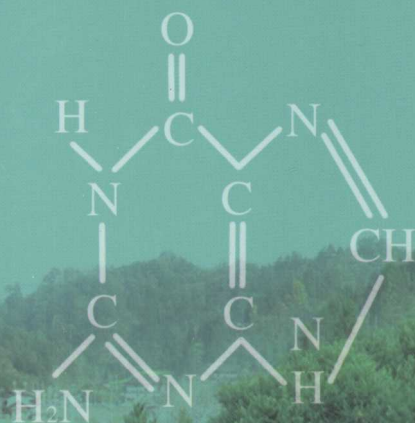


果树分子生物学

Molecular biology in fruit crops

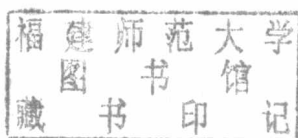
章 镇 韩振海 主编

上海科学技术出版社



果树分子生物学

章 镇 韩振海 主编



1030263



T1030263

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

果树分子生物学/章镇,韩振海主编. —上海:上海科学技术出版社,2012.10

ISBN 978-7-5478-1280-8

I. ①果… II. ①章… ②韩… III. ①果树—分子生物学 IV. ①S660.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 080362 号

本书出版由上海科技专著出版资金资助



上海世纪出版股份有限公司 出版、发行
上海科学技术出版社

(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235)

新华书店上海发行所经销

浙江新华印刷技术有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张:20 插页:6

字数:350 千字

2012 年 10 月第 1 版 2012 年 10 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5478-1280-8/S·49

定价:65.00 元

本书如有缺页、错装或坏损等严重质量问题,
请向工厂联系调换

内 容 提 要

本书以植物分子生物学为基础,系统介绍以果树为试材、以分子生物学研究方法为手段的研究成果。全书内容共分十七章,涵盖果树发育的各个阶段,主要包括植物分子生物学基础;果树基因组学;果树分子生物学研究方法;果树嫁接分子机理;果树开花分子生物学;果实发育和品质分子生物学;果树抗逆分子生物学;果树营养生理与分子生物学;果树自交不亲和分子机理;果树基因克隆与遗传转化等。

本书可作为高等院校的研究生教材,也是园艺(果树)专业的研究生、教师,以及从事果树研究的科技工作者了解果树科学发展现状的重要参考书。

编写人员名单

主 编 章 镇 韩振海

副 主 编 王跃进 陈昆松 郝玉金 郭文武 张志宏 高志红

编 委(以姓氏笔画为序)

王 忆 王三红 王西平 由春香 乔玉山 刘永忠

李 鲜 李天忠 杨洪强 冷 平 张绍铃 房经贵

徐昌杰 高中山 程宗明

参加编写人员(以姓氏笔画为序)

王 晨 王庆菊 代红艳 庄维兵 刘 曦 刘智新

李 莹 杨朝崑 吴 俊 何 平 宋长年 张计育

张玉明 张玮玮 罗昌国 侍 婷 徐 娟 殷学仁

董 畅 谢兴斌 蔡 斌

前 言

果树分子生物学是从分子水平研究生物大分子(蛋白质和核酸)的结构与功能,从而阐明果树生命现象本质的科学,是分子生物学与果树生物学交叉融合而成的新兴学科。1953年, Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构开创了分子生物学的新纪元。1973年, DNA 重组技术的建立带动了整个生命科学的迅速发展。果树分子生物学研究虽然起步较晚,近年来也得到了突飞猛进的发展。在我国,近十年来果树分子生物学已成为果树学研究的前沿与新的生长点,受到越来越多的果树研究者的关注。2007年以来,我国已先后在辽宁兴城、江苏南京和海南海口召开了三届全国果树分子生物学学术研讨会,并在海口会议上成立了中国园艺学会果树分子生物学协作组。目前我国设有果树学科的高等院校大都设立了《果树分子生物学》研究生课程,但教材缺乏,有关的科研院所也缺乏果树分子生物学方面的参考书籍。因此,由南京农业大学和中国农业大学牵头,组织浙江大学、西北农林科技大学、华中农业大学、沈阳农业大学、山东农业大学、山东省果树研究所和辽宁农业职业技术学院共四十多位从事果树分子生物学研究的科研工作者,共同编写了这本《果树分子生物学》,以供同行们参考与应用,希望能对我国果树分子生物学研究起到一些促进作用。

本书内容包括果树发育生物学、果树营养生物学和果树环境生物学等领域的分子基础,还对当前果树分子生物学的热点问题,即 miRNA 和逆转座子在果树遗传转化和发育中的作用以及果树基因工程进行了介绍。该书既不同于果树生物学,对果树形态及生理变化不作介绍;也不同于普通分子生物学,主要介绍以果树为研究对象的分子生物学内容。但是为了便于理解,对植物分子生物学的基本原理也进行了一定的介绍。同时,由于在分子水平上果树诸多生命现象的本质是一致的,所以各章内容难免有部分重复,但介绍重点是不同的。

本书除绪论外,共分十七章。绪论由南京农业大学程宗明、蔡斌和李莹编写,第一章由南京农业大学高志红和庄维兵编写,第二章由中国农业大学李天忠编写,第三章由南京农业大学高志红和侍婷编写,第四章由南京农业大学张绍铃和吴俊编写,第五章由华中农业大学刘永忠和郭文武编写,第六章由山东农业大学由春香、谢兴斌、郝玉金和华中农业大学徐娟、刘曦编写,第七章由浙江大学高中山和杨朝崴编写,第八章由中国农业大学冷平编写,第九章由浙江大学李鲜、殷学仁、徐昌杰和陈昆松编写,第十章由中国农业大学王忆和韩振海编写,第十一章由西北农林科技大学王西平和王跃进编写,第十二章由南京农业大学章镇、董畅和辽宁农业职业技术学院王庆菊编写,第十三章由山东农业大学杨洪强、张玮玮和刘智新

编写,第十四章由南京农业大学王三红和章镇编写,第十五章由南京农业大学房经贵、宋长年和王晨编写,第十六章由沈阳农业大学张志宏、何平和山东省果树研究所代红艳编写,第十七章由南京农业大学乔玉山、张计育、罗昌国和章镇编写。全书最后由章镇和韩振海统稿完成。

在本书编写过程中,不少同行提出了很好的意见和建议,在此深表感谢。由于目前果树分子生物学研究正在日新月异地发展,研究的内容也不断更新,同时我们的编写能力有限,书中难免出现一些差错,恳请读者谅解和提出宝贵意见。

编 者

目 录

绪 论

第一章 果树季节性休眠的分子机制

1 生长停止和休眠诱导	4
1.1 DAM 相关基因	4
1.2 DAM 基因抑制了 <i>FT</i> 基因的表达	5
1.3 光受体 <i>PHY</i> 和生物钟基因在休眠诱导中的作用	6
2 自然休眠过程中植株的生命活动	6
2.1 <i>CBF</i> 转录因子参与的休眠期间耐冷机制	7
2.2 <i>Lea</i> 蛋白相关基因的表达	7
2.3 热激蛋白	7
3 休眠解除	8
3.1 <i>GHI7</i> 基因家族参与了休眠解除	8
3.2 质子泵和热激蛋白的作用	8
3.3 过氧化氢等抗氧化系统也参与了休眠解除	8
4 信号转导网络在休眠中的作用	9
4.1 <i>Ca</i> 信号物质在休眠解除中的作用	9
4.2 植物激素、过氧化氢和锌指家族基因的信号作用	10
5 展望	10

第二章 果树砧穗间相互作用的分子机制

1 果树砧穗间相互作用的传统机制	14
2 果树砧穗间基因表达差异分析	14
3 植物砧穗间生物大分子的运输	14
3.1 植物体运输系统	15
3.2 RNA 植物体韧皮部长距离运输机制	17
3.3 植物体韧皮部长距离运输的分子	19
4 RNA 植物体韧皮部长距离运输调控砧木或接穗性状	20
4.1 砧木 RNA 韧皮部长距离运输调控接穗性状	20
4.2 接穗 RNA 韧皮部长距离运输调控砧木性状	21
5 展望	22
5.1 砧穗间韧皮部长距离运输的差异性 RNA 表达分析	22

5.2 韧皮部长距离运输的 RNA 分子在果树转基因中的应用	22
--------------------------------------	----

第三章 果树开花的分子生物学基础

1 童期的调控	26
2 开花时间的调控	27
3 花器官形成和发育的调控	28
3.1 花分生组织特征基因激活花器官特征基因	28
3.2 雌蕊的形成和发育的分子机制	29
3.3 miRNA 在果树花形成和发育中的调控作用	30
4 展望	33

第四章 果树自交不亲和性的分子机制

1 雌蕊特异性决定因子	37
1.1 S 糖蛋白(S-RNase)的发现	37
1.2 S-RNase 基因的结构特征	37
1.3 S-RNase 基因的内含子	38
2 雄蕊特异性决定因子	39
2.1 S 位点的连锁基因	39
2.2 李属果树植物的雄蕊特异性决定因子	40
2.3 梨属和苹果属植物的雄蕊特异性决定因子	42
3 蔷薇科果树自交(不)亲和性机制	43
3.1 雌蕊 S 基因的变异	43
3.2 花粉 S 基因的变异	45
3.3 “竞争作用”模式	46
3.4 无功能的雌蕊和花粉 S 基因的积累	46
4 植物自交不亲和性的反应模式	47
4.1 受体模式和抑制模式学说	47
4.2 简单抑制模式	48
4.3 修正抑制模式	48
5 修饰基因	49
5.1 HT-B 基因	49
5.2 PhSBP1 基因	50
5.3 其他修饰基因	50
6 蔷薇科果树 S 等位基因的进化	50
6.1 S-RNase 基因的进化学说	50
6.2 李属植物 SFB/SLF 基因的进化	51
6.3 李属新特异性 S 基因的进化模式	51
7 花粉管在花柱中的生长调控机制	52

第五章 果实糖、酸积累的分子基础

1 果实糖分积累	64
1.1 糖分运输	64
1.2 果实糖分分配	67
1.3 糖分在液泡中积累	68
2 果实酸积累	69
2.1 有机酸代谢相关酶的基因表达与有机酸积累	71
2.2 有机酸的运输蛋白与酸积累	71
3 果实糖、酸研究展望	73

第六章 果实色泽发育的分子基础

1 花青苷合成	79
1.1 花青苷的生物合成途径	79
1.2 影响花青苷合成的环境因子	82
1.3 转录因子	84
1.4 果树的花青苷合成和转录调控	89
2 植物类胡萝卜素代谢	90
2.1 植物类胡萝卜素代谢途径	90
2.2 植物类胡萝卜素代谢调控	92
2.3 番茄果实类胡萝卜素代谢研究	93
2.4 柑橘果实类胡萝卜素代谢研究	93

第七章 水果过敏及过敏原的分子基础

1 水果过敏简要背景知识	105
1.1 水果过敏的临床表现和流行病学调查	105
1.2 水果过敏反应发生机制	106
1.3 水果过敏与花粉等过敏的交叉反应	107
2 主要水果过敏蛋白家族分类和特性	107
2.1 过敏原的鉴定与命名	107
2.2 水果过敏原蛋白家族聚类	108
2.3 过敏原结构及与抗体结合表位鉴定	110
3 过敏原基因图谱定位和基因组序列分布	110
3.1 过敏原基因连锁图谱定位	110
3.2 基因组序列物理图谱	112
4 过敏原基因表达	112
5 品种间过敏性的差异	113
5.1 不同品种过敏性评价	113
5.2 苹果 <i>Mal d 1</i> 基因成员遗传多样性和与过敏性关联分析	114
6 展望	115

第八章 乙烯和脱落酸对果实成熟与衰老的分子调控机制

1 乙烯与果实成熟和衰老的关系	124
1.1 乙烯的生物合成	125
1.2 乙烯的信号转导	126
2 脱落酸与果实成熟的关系	126
2.1 高等植物 ABA 的生物合成	127
2.2 ABA 的分解代谢	130
2.3 高等植物 ABA 的信号转导途径	132

第九章 果实成熟质地变化的调控机制

1 成熟果实质地变化的生物学特征	138
1.1 果实软化	138
1.2 果实木质化	139
2 与果实质地相关的酶活性及基因表达	139
2.1 乙烯生物合成与信号转导	139
2.2 细胞壁降解相关酶	140
2.3 细胞壁次生木质化相关酶	143
2.4 膨胀素蛋白	145
3 果实成熟衰老质地变化的调控	146
3.1 物理调控	146
3.2 生物化学调控	148
4 展望	149

第十章 果树铁素代谢的分子基础

1 果树对铁素的吸收	153
1.1 外界环境对果树吸收铁素的影响	153
1.2 铁吸收相关的基因	154
1.3 植物激素对铁吸收的影响	157
1.4 与铁吸收相关转录因子的调控	158
1.5 植物缺铁胁迫下诱导蛋白的研究	159
1.6 苹果吸收利用铁素的分子机制	159
2 铁素在植物体内的运输	161
2.1 铁的长距离运输	161
2.2 细胞内的铁运输	163
3 铁的储存和利用	164
3.1 铁的储存	164
3.2 铁の利用	165
4 展望	166

第十一章 果树抗病的分子机制

1 植物抗病的分子基础	171
1.1 寄主-病原物互作	171
1.2 植物抗病反应机制	171
1.3 果树抗病的分子机制	172
1.4 植物抗病基因	173
2 果树抗病基因研究进展	176
2.1 葡萄抗病基因研究进展	176
2.2 苹果抗病基因研究	179
2.3 柑橘抗病基因研究进展	182
3 展望	183

第十二章 果树响应温度胁迫的分子机制

1 低温胁迫	186
1.1 耐低温的分子机制	186
1.2 低温胁迫下的信号转导和基因表达	189
1.3 低温信号转导	194
2 高温胁迫	196
2.1 热激蛋白	196
2.2 热激转录因子	198
2.3 高温胁迫的信号转导机制	201

第十三章 果树响应水分胁迫的分子机制

1 植物水分胁迫信号传递的一般过程	213
2 植物水分胁迫信号识别与转导途径	214
2.1 根系对土壤干旱的识别与感知	214
2.2 植物水分胁迫信号转导途径	215
3 介导水分胁迫信号的胞内信使	216
3.1 钙离子	216
3.2 一氧化氮	216
3.3 多胺	217
4 水分胁迫下胞间信使 ABA 的产生	218
5 水分胁迫信号传递中的蛋白可逆磷酸化	220
5.1 胁迫下的蛋白磷酸化与去磷酸化	220
5.2 CDPK	221
5.3 MAPK	221
5.4 PP2C 和 SnRK2	222
6 响应水分胁迫的转录因子	223
6.1 AP2/EREBP 类转录因子	224

6.2	bZIP 类转录因子	224
6.3	MYB 类转录因子	225
6.4	NAC 转录因子	225
6.5	WRKY 转录因子	226
7	与水分胁迫相关的功能基因	226
7.1	渗透调节物质合成基因	226
7.2	LEA 基因	227
7.3	水孔蛋白基因	228
7.4	活性氧清除酶基因	228
8	展望	229

第十四章 果树耐盐的分子机制

1	盐胁迫应答基因	236
1.1	渗透调节物质合成基因	236
1.2	离子转运和重建离子平衡的有关基因	237
1.3	编码抗逆相关蛋白的基因	237
2	调节基因	239
2.1	bZIP 类转录因子	239
2.2	HD-ZIP 转录因子	240
2.3	AP2/EREBP 类转录因子	240
2.4	MYB 转录因子	241
2.5	NAC 转录因子	241
3	小 RNA 与植物抗盐性	242
4	盐胁迫信号的感知与传导	242
4.1	SOS 信号转导途径	242
4.2	CDPK 级联反应途径	243
4.3	MAPK 级联反应途径	244
4.4	ABA 信号通路	245

第十五章 miRNA 在果树发育中的作用

1	miRNA 概述	250
1.1	miRNA 的发现	250
1.2	miRNA 的生物合成	251
1.3	miRNA 的作用机制	251
1.4	植物 miRNA 的特点	252
1.5	植物 miRNA 的功能	253
1.6	miRbase 数据库	253
2	miRNA 的分离和鉴定方法	255
2.1	遗传学筛选法	255
2.2	小分子 RNA 克隆	255

2.3	生物信息学预测法	256
2.4	高通量测序	257
2.5	Northern 杂交	258
2.6	原位杂交	258
2.7	基因芯片	258
2.8	反转录聚合酶链式反应	259
2.9	miR-RACE 克隆法	259
3	果树中 miRNA 的鉴定和功能研究	260
3.1	果树 miRNA 生物信息学预测	261
3.2	果树 miRNA 的鉴定	262
3.3	果树 miRNA 高通量测序	263
3.4	果树 miRNA 靶基因鉴定	264
4	展望	265

第十六章 逆转座子在果树遗传进化和发育中的作用

1	植物逆转座子的类型和结构	268
2	逆转座子的转座和转录	269
2.1	逆转座子的转座过程	269
2.2	逆转座子转录活性的调控	270
2.3	逆转座子的沉默	272
3	逆转座子在果树遗传进化中的作用	272
3.1	基因组中的逆转座子数量和分布	272
3.2	逆转座子在果树遗传进化中的作用	273
4	逆转座子在果树发育中的作用	274
5	逆转座子的研究工具和技术	275
5.1	基于逆转座子的分子标记及其应用	276
5.2	逆转座子在植物功能基因组学中的应用	277
6	展望	278

第十七章 果树基因工程

1	转基因技术与方法	282
1.1	农杆菌介导法	282
1.2	基因枪法	284
1.3	电穿孔法	284
1.4	花粉管通道法	284
2	果树转基因进展	284
2.1	促进果树生根和树体矮化	284
2.2	缩短果树童期和早花早实	286
2.3	提高果树抗病性	286
2.4	提高果树抗虫害能力	290

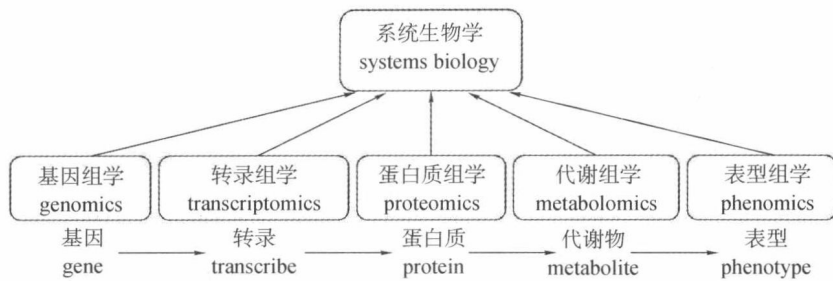
2.5	提高果树抗非生物逆境的能力·····	290
2.6	提高果品耐储运能力·····	292
2.7	改善果实品质·····	293
2.8	其他·····	293
3	展望 ·····	294
3.1	果树功能基因有待进一步挖掘·····	294
3.2	转基因果树安全性·····	294
3.3	高效遗传转化体系·····	294
3.4	多基因转化·····	295
3.5	商业化应用·····	295

绪 论

果树分子生物学的未来挑战和应对方案

过去的十年是果树分子生物学研究最旺盛的十年。从分子标记、基因克隆和功能验证、抗病抗逆及生长发育,到果实品质形成分子机制都取得了极大的进展。但最大的进展莫过于最近几年多种果树全基因组测序的完成。葡萄(Jaillon 等,2007; Velasco 等,2007)、番木瓜(Ming 等,2008)、桃(2010)、苹果(Velasco 等,2010)、草莓(Shulaev 等,2011)全基因组测序已完成,而梨和柑橘的全基因组测序即将完成,许多果树的重测序也正在进行中。随着这些果树基因组测序的完成,果树生物学研究进入各种“组学”和“后基因组学”时代。由于基因组全序列蕴含了大量的信息,包括基因的序列和结构、非编码区的特征、基因的拷贝数、基因的相对位置、染色体的结构等,科研工作者可以通过比较基因组学(comparative genomics)在基因组图谱和测序的基础上,进行基因组之间的比较研究以获得果树类群中的基因数目、位置、功能、表达机制和与其他物种的进化关系。基因组比较可进行种间比较和种内比较。通过种内基因组或种间基因组序列比较,可以得到我们感兴趣的基因,然后利用基因工程技术,通过转基因将优良的基因转入果树或其他植物,培育具有优良性状的品种。转录组(transcriptome)是指生物在特定的时间和空间条件下,所表达的所有基因的总和。通过转录组的研究,可以找到植物在特定时期起关键作用的基因,分析基因之间的相互关系,研究基因调控网络结构,从而找到对生产和育种有用的基因,进行更加深入系统的研究。研究者还可以研究蛋白质组(proteome,某一时空翻译的所有蛋白)、代谢组(metabolome,某一时空产生的所有代谢产物)和表型组(phynome,所有表现型的总汇),并通过它们的研究转入基因组研究,进而可以研究基因之间的相互关系及其网络结构。这些组学的研究和传统的分子生物学研究不同。经典的分子生物学研究是一种垂直型的研究,即采用多种手段研究个别的基因和蛋白质功能,看它们如何影响代谢和表型。而基因组学、蛋白质组学和其他各种“组学”则是水平型研究,即以单一的手段对群体的研究。它们同时研究成千上万个基因、蛋白质、代谢产物的功能及它们与表型之间的关系。而新兴的系统生物学(systems biology)则把水平型研究和垂直型研究、传统的生物学以及近些年来迅猛发展的生物信息学整合起来,并突破了原有的学科界限形成多门交叉学科,成为一种“三维”研究。系统生物学从系统的角度研究一个生物系统中所有组成成分,同时分析这些组分间在特定条件下的相互关系。显然,系统生物学整合多方面的生物信息并成为一个网络,并将其开发出能描述系统结构和行为的模型。根据这些模型,预测生物系统的行为。因此,系统生物学是结合许多不同学科领域,通过彼此相互的网状合作,针对一个生物现象所进行的研究(下图)。

多种果树基因组计划的完成以及相关“组学”技术的迅速发展为果树分子生物学研究提



系统生物学的构成(程宗明等, 2011)

供了前所未有的机遇:①不再仅仅基于小规模的表现型、单个基因、单个蛋白的研究,而更多基于大规模的基因型、基因家族和整个基因组或蛋白质组的研究;②知道基因组的结构、基因的拷贝数和基因在基因组的位置和环境;③可以研究调控网络,而不是孤立地研究一两个基因或表现型;④不再局限于少数分子标记,可轻易地获得全基因组的 SSR 和 SNP(单核苷酸多态性)。该时代的特征就是根据基因序列,利用分子生物学及生物工程技术手段研究基因的功能。总之,研究者可以在系统水平上研究果树基因组、转录组、蛋白质组、代谢组以及表型组之间的关系,获取候选基因,并对这些基因进行功能鉴定,进而阐明果树生长发育的系统机制。最终可以将鉴定的优良基因通过遗传转化的方法导入栽培品种,培育优良新品种,这对于提升果树育种水平和培育新品种具有重大意义。

在未来十年或更长一段时间,果树学研究将面临多方面的挑战:①果树产业体系将面临重大调整,劳动力成本、化肥、农药特别是水资源和能源成本将大幅提高,我们如何应用果树系统生物学研究来降低成本、提高生产效率和产量? ②随着大部分果树的产量和面积大幅提高,部分水果出现过剩,消费者对果实的综合品质,特别是果品安全、多元化、特新异提出了更高的要求,我们如何应用果树系统生物学研究来提高果品安全系数,并培育出多元化的特新异品种来满足消费者的不断更新的需求? ③随着气候的变化,大气 CO_2 的浓度预测将从目前的 375×10^{-6} 左右增加到 $(550 \sim 750) \times 10^{-6}$,灾难性气候,如大范围的干旱、高温、寒害和病虫害的暴发,将会更频繁地发生,我们如何应用果树系统生物学研究来保证未来果树生产的可持续性发展?

果树的生物学特性也给果树系统生物学带来多重挑战。对于多年生木本果树而言,树体大、周期长、占地面积大明显地制约了它们的分子生物学研究效率。果树种类繁多,许多“小”果树在当地经济和民族文化方面起着非常重要的作用,但它们的分子生物学研究要远远落后于大众果树,如苹果、柑橘和葡萄。这方面的研究需要“区域”果树学者的努力。果树系统生物学的研究从技术层面上讲也面临诸多挑战。虽然多种果树的基因组已全测序,但全基因组的基因的结构注释仅仅才开始,需要大批具有专门训练的人才和国际合作来完成这些艰巨工程。精确的基因注释和结构注释可以大大提高果树学研究的效率。大部分果树的分子生物学研究仍然缺乏其和研究拟南芥和水稻等模式植物类似的遗传资源,如大批量的遗传突变体、T-DNA、transposon 插入库、高效遗传转化体系、高通量的瞬时表达和病毒诱导基因沉默体系,都很大程度限制了果树基因功能的研究、基因的挖掘利用和对果树品种的遗传工程改良。

面对未来的挑战,我们必须采取综合性的解决方案,必须加强全球果树界内部的协作和合作,如建立更多的分享资源库,成立信息共享平台,定期地交流纵向研究成果;加强全球果