

陈己任◎著

月季

耐逆分子育种研究

STUDY ON MOLECULAR
BREEDING FOR ROSE STRESS TOLERANCE



中国林业出版社

月季耐逆分子育种研究

Study on Molecular Breeding for Rose Stress Tolerance

陈己任 著

中国林业出版社

作者简介

陈己任,男,1972年1月生,湖南湘乡人,中共党员。北京林业大学博士,师从王华芳教授;湖南农业大学博士后,师从熊兴耀教授和邓子牛教授。现为湖南农业大学园艺园林学院副教授。2003年以来一直从事月季耐逆分子生物学与种质创新与改良研究。多次赴泰国、美国、波兰、法国进行相关学术交流。主持国家自然科学基金面上项目和中国博士后特别资助等多个项目。国内外公开发表研究论文十余篇。

图书在版编目(CIP)数据

月季耐逆分子育种研究 / 陈己任著. —北京:中国林业出版社, 2017. 10
ISBN 978-7-5038-9351-3

I. ①月… II. ①陈… III. ①月季—植物育种—研究 IV. ①S685.123

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 267053 号

中国林业出版社

责任编辑:何增明 邹 爱

电 话:010-83143571

出版发行 中国林业出版社(100009 北京市西城区德内大街刘海胡同7号)
<http://lycb.forestry.gov.cn>

印 刷 固安县京平诚乾印刷有限公司
版 次 2017年12月第1版
印 次 2017年12月第1次印刷
开 本 710mm×1000mm 1/16
印 张 10.5 彩页 6
字 数 198千字
定 价 80.00元

前 言

月季被誉为“花中皇后”，其品种之多、色彩之繁、花期之长、应用之广，是其他众多花卉都无法比拟的。

中国的月季花在输入英、法等国之后，与欧洲蔷薇反复杂交，创造了庞大的现代月季杂交品种群，成为全世界广泛栽培与应用的观赏植物之一。中国月季花在月季发展史上，写下了极为光辉的一页。世界各国育种家们培育现代月季付出的艰辛，是对人类的伟大贡献，功不可没。

月季是我国的十大传统名花，也是世界四大切花之一。月季作为重要的鲜切花，时常要面对长时间的低温保鲜、长途运输和长时间瓶养。耐逆能力的提高，可极大提高其产量、品质和效益，具有非常重要的意义。传统杂交育种虽然创造了庞大的现代月季杂交品种群，但长时间的杂交育种已经难以满足日益增长的月季种质创新要求，引入某一或某些优良性状时往往伴随一些不良性状的引入，而且近亲杂交严重影响月季的生活力。利用分子育种技术增强月季耐逆性已成为提高月季产量和效益、增强其观赏性的必然选择。

植物耐逆分子育种相关内容非常丰富。本书主要依托本人在月季耐逆分子育种实践中的经验和体会，进行了以下几方面的论述：

1) 系统发掘和鉴定耐逆相关 *DREB* 转录因子基因 3 个，耐逆生长交叉调控 *XET* 基因 2 个，阐述它们耐逆的分子调控机理，为精准改良提供分子基础和理论支撑。

2) 在重组基因片断进行基因鉴定的过程中，发现基于长引物 PCR 基因剪接的关键因子“触发引物”，揭示长引物 PCR 的反应机制；以此发现为基础的长引物 PCR 技术可大大提高剪接成功率，减轻实验人员的劳动强度。

3) 发现月季体细胞胚胎发生过程中激素、光照和体胚发育的密切联系，揭示了脱落酸 ABA 是体胚子叶分化的关键因子，光照是体胚子叶发育的关键因子，月季体胚发生和器官发生是同源的；以此发现为基础的月季再生体系使月季分子育种成为可能。

4) 建立月季转基因技术体系，通过 *DREB* 单基因或 *DREB/XET* 双基因

聚合转化月季，并结合对转化植株进行分子检测、耐逆表型检测和转录组分析，系统阐述月季耐逆分子育种的理论与方法。

本书是作者自 2003 年以来，在北京林业大学硕博连读和湖南农业大学从事博士后研究、工作期间研究结果的汇集。本人博士阶段是在北京林业大学王华芳教授悉心指导下完成的；博士后阶段是在湖南农业大学熊兴耀教授和邓子牛教授的悉心指导下完成的。导师们执着的敬业精神、严谨的治学态度、渊博的专业知识时刻浮现在我的脑海中；他们多年以来在科研、学习上的严格要求和谆谆教诲，生活上无微不至的关怀和照顾，让我一直激动不已，难以忘怀；本专著既是本人多年以来辛勤耕耘的结果，也凝聚了导师们的心血及无私奉献。

本书中的部分研究工作得到了北京林业大学罗晓芳教授、中国科学院遗传与发育生物学研究所陈受宜研究员和张劲松研究员、中国林业科学研究院卢孟柱研究员、中国农业科学院黄三文研究员、中国农业大学高俊平教授的大力支持和无私援助。

在本人研究过程中，湖南农业大学于晓英教授和龙岳林教授从不同的角度提出了建设性的指导意见；李炎林、陈海霞、黄笛、李达等同事给予了热情帮助；王天祥、吕京晶、李莉、吴炼等同门进行了不同程度的参与。

本人的研究生胡博文、陈彦斌、易星、李青、谢磊、王姗姗、李聪、杨莹莹等为研究的顺利展开进行了大量的工作。

研究与成书过程充满艰辛！家人的默默付出与支持、朋友们热情关注与鼓励，是本人不断克服困难、积极进取的力量源泉！感激之情，难以一一赘述！

书中错漏之处在所难免，敬请读者批评指正！

陈己任

2017 年 9 月 30 日

目 录

前 言

1 导 言	(1)
1.1 月季分子育种现状	(2)
1.1.1 花色改良	(3)
1.1.2 花型	(4)
1.1.3 花香	(4)
1.1.4 开花期	(5)
1.1.5 抗逆性	(5)
1.2 月季耐逆分子育种研究的意义	(6)
1.2.1 耐逆分子育种研究是国家生态植被修复的需要	(7)
1.2.2 月季分子育种研究是人们生活品质提高的需要	(7)
1.2.3 月季耐逆分子育种研究是城市建设发展的需要	(7)
2 植物耐逆育种的分子机理	(9)
2.1 植物耐逆相关目的基因	(9)
2.1.1 植物干旱响应基因	(9)
2.1.2 植物寒冷响应基因	(10)
2.2 植物耐逆的转录因子调控	(11)
2.2.1 转录因子的结构特征	(11)
2.2.2 转录因子的分类	(12)
2.2.3 与植物胁迫相关的转录因子的研究进展	(12)
2.2.4 转录因子在逆境抗性基因工程中的应用	(17)
2.3 植物 DREB 转录因子的研究进展	(18)
2.3.1 5DREB 转录因子的特征及作用	(19)
2.3.2 DREB 转录因子及植物抗逆基因工程	(21)
2.4 植物 <i>XET</i> 基因的研究进展	(24)
2.4.1 <i>XET</i> 在植物生长机制中的核心地位	(24)

2.4.2	<i>XET</i> 与根系向水性	(25)
2.5	<i>DREBI</i> 和 <i>XET</i> 在植物耐逆与生长机制中的交叉调控	(26)
3	植物耐逆分子育种基本技术	(28)
3.1	分子育种的基本内涵	(28)
3.1.1	目的基因的分离与鉴定	(28)
3.1.2	植物表达载体构建	(29)
3.1.3	受体细胞培养	(29)
3.1.4	转基因技术	(29)
3.1.5	外源基因整合表达检测	(30)
3.2	耐逆相关基因克隆技术	(30)
3.2.1	耐逆相关基因的电子克隆	(31)
3.2.2	耐逆相关基因的实验室克隆及序列分析	(37)
3.2.3	目的基因的序列分析及功能预测	(51)
3.3	目的基因功能鉴定技术	(58)
3.3.1	<i>DREB</i> 转录因子功能鉴定	(58)
3.3.2	<i>DREB</i> 基因的耐逆功能鉴定	(65)
3.3.3	<i>MtXET</i> 基因功能鉴定	(73)
4	基因重组技术	(74)
4.1	基于长引物 PCR 的分子重组	(74)
4.1.1	长引物 PCR 基因剪接	(75)
4.1.2	长引物 PCR 基因剪接的策略	(79)
4.1.3	长引物 PCR 的分子机制	(80)
4.2	长引物 PCR 的应用	(83)
4.2.1	基因内的片段剪除	(84)
4.2.2	RNAi 发夹结构的构建	(84)
4.2.3	同向串联基因序列的构建	(89)
5	月季基因转化受体系统的优化	(103)
5.1	月季离体培养与植株再生	(103)
5.1.1	2,4-D、TDZ 对月季愈伤形成和体胚发生的影响	(103)
5.1.2	4-D 和 TDZ 对胚性愈伤形成的影响	(104)
5.1.3	胚性愈伤的保持与体胚发生	(105)
5.1.4	光照对月季再生的影响	(106)

5.1.5	ABA 对月季再生的影响	(108)
5.1.6	月季不同类型体胚的植株再生	(110)
5.1.7	月季体胚再生的进程	(111)
5.2	月季转基因体系的优化	(113)
5.2.1	材料与方法	(113)
5.2.2	结果	(115)
5.2.3	讨论	(117)
6	月季耐逆分子改良研究	(119)
6.1	月季 <i>DREB1C</i> 基因转化	(119)
6.1.1	材料与方法	(119)
6.1.2	结果	(121)
6.2	月季 <i>DREB1C/XET</i> 双基因聚合转化及检测	(123)
6.2.1	月季双基因聚合转化	(123)
6.2.2	转化植株分子检测	(124)
6.2.3	转化植株耐逆性和表型分析	(127)
6.3	多基因转化应用前景	(131)
7	结 语	(132)
	课题支撑	(138)
	参考文献	(139)
	成果清单	(154)
	附录 1 论文中所涉及的分子生物学基本方法	(156)
	附录 2 图版	(161)

1 导 言

观赏植物作为重要的栽培植物，在社会经济发展中起着重要作用。观赏植物产业被誉为 21 世纪的“朝阳产业”，是农村经济新的增长点。

月季是重要的栽培观赏植物，是我国十大传统名花之一和世界四大切花之一，被誉为“花中皇后”。月季花色艳丽，香气袭人，又是各种高级食品和化妆品的重要香料原料，具有极高的商业价值。因此，月季的育种在观赏植物育种中更受关注，是观赏植物育种中最活跃的领域之一。

传统杂交育种在月季育种中发挥了巨大的作用，创造了庞大的现代月季杂交品种群。但月季杂交育种存在以下 2 个问题：①传统杂交方法存在杂交难以引入亲源性较远种的优良性状，引入某一或某些优良性状时往往伴随一些不良的性状引入等缺点；②月季遗传背景相对狭窄。据统计，蔷薇属的 100 多个物种中只有 8 个对现代月季做出过突出贡献，因此这种近亲杂交现象严重影响月季的生活力 (Dubois 和 deVries, 1995)。月季种植不得不依赖于疏花、扭枝和嫁接来提高鲜切花的质量和生长势，这必然会降低产量和增加人工投入。传统的月季杂交育种依赖于有性杂交的选育和自然变异的筛选，但这种技术越来越受限于作物的杂合性，只有极少数基因产生变异而获得不多的新品种，获得月季优良新品种的难度越来越大。

由于传统杂交育种的局限性，越来越多的月季育种研究者将目光投向以组织培养、分子标记辅助育种、基因工程育种为基础的现代生物技术研究。基因工程育种可以有效地改良某个基因特性而不改变原有极具商业价值的基因表型；可以定向修饰品种在外源基因控制的性状上发生改变而保持其他性状相对稳定；可以克服了常规育种方法周期长、预见性差及选择效率低的缺点，且能够打破物种界限，克服生殖隔离困难，实现优良基因重组，定向选育优质、高抗观赏植物新品种。通过引入外来基因可扩大基因库，丰富植物农艺和观赏性状，创造出更加奇特的新品种。

1.1 月季分子育种现状

20 世纪 80 年代以来，现代生物技术广泛应用于观赏植物种质资源遗传分析、新品种培育和优质新产品开发，大大加快了全球观赏植物产业的发展，现已形成了一整套观赏植物现代生物育种技术。

将以这些现代生物技术为平台的分子育种技术与传统技术相结合，会极大地拓展观赏植物育种的范围。月季作为重要的观赏植物，其分子育种研究取得了令人瞩目的成绩。总结起来主要集中在花色、花香、花形、生活力、保鲜期、耐寒及抗病等性状的改良，如表 1(戴思兰等，2013；Chen 等，2016；谢磊等，2017)。

表 1 月季相关分子育种一览表
The related molecular breeding in rose

受体植物	分子设计	性状变化	参考文献
矮牵牛 (<i>Petunia hybrid</i>)	抑制内源 <i>F3'H</i> 表达 + 过表达月季 <i>DFR</i>	红色变为橙色	Tsuda et al. , 2004
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)南芥	CRISPR/ <i>Cas9</i> 载体将月季 <i>TCP9</i> 转化拟	花瓣增多，雄蕊减少	谢磊等，2017
夏堇 (<i>Torenia fournieri</i>)	抑制内源 <i>F3'H</i> 和 <i>F3'5'H</i> + 过表达月季 <i>DFR</i>	蓝紫色变为粉色	Nakamura et al. , 2010
菊花(<i>Chrysanthemum morifolium</i>)	月季 <i>CHS</i> 启动子 + 三色堇 <i>F3'5'H</i> + 菊花 <i>RNAi</i>	<i>F3'H</i> 粉色变为蓝色	Brugliera et al. , 2013
月季(<i>Rosa chinensis</i> <i>R. Hybrida</i>)	过表达三色堇 <i>F3'5'H</i> + 鸢尾 <i>DFR</i> + 月季 <i>DFRRNAi</i>	红-白青变为浅蓝色	Katsumoto et al. , 2007
	抑制内源基因 <i>RhAG</i> 表达	双花结构	Dubois et al. , 2010
	<i>TCP3SRDX</i> 整合蛋白超表达载体将拟南芥 <i>AtTCP3</i> 转化月季	株型和叶型花型完全改变	Gion et al. , 2011
	<i>RhSEP3SRDX</i> 嵌合蛋白超表达载体将内源 <i>SEP3</i> 转化月季	花瓣完全消失，仅留存萼片	Ishiguro et al. , 2012
	<i>YAB1SRDX</i> 整合蛋白超表达载体将拟南芥 <i>AtYAB1</i> 转化月季	株型和花型完全改变	Ishiguro et al. , 2012
	过表达拟南芥 <i>AtPAPI</i> 基因	使萜类化合物的含量增加	Zvi et al. , 2012

(续)

受体植物	分子设计	性状变化	参考文献
	过量表达开花抑制子基因 <i>RoKSN/TFLI</i>	月月粉不开花	Randoux et al., 2014
	过表达洋葱 <i>Ace-AMPI</i> 基因	获得对蔷薇单丝壳菌抗性提高的转基因株系	Li et al., 2003
	过表达几丁质酶基因	黑斑病发生减少	Marchant., 1998
	过表达藜苜蓿 <i>DREB1C</i> 基因	转基因植株抗冷性提高	Chen et al., 2010
	利用 VIGS 沉默 <i>RhNAC2</i> 或 <i>RhEXPA4</i> 基因	月季花瓣的耐失水性 and 扩展能力降低	Dai et al., 2012
	利用 VIGS 沉默 <i>RhNAC100</i> 基因	促进了月季花瓣面积的增加和细胞的扩展	Pei et al., 2013
	过表达藜苜蓿 <i>DREB1C</i> + 月季 <i>XET</i> 基因	转基因植株抗冷性提高	Chen et al., 2016

1.1.1 花色改良

具有新异花色的花卉往往经济价值可观。利用基因工程技术培育新异花色品种是花卉分子育种研究的热点之一，也是目前最成功的观赏植物性状改良的范例之一。随着人们对花色素代谢途径的解析、相关基因的分离以及转基因技术的不断成熟，改变观赏植物花色已成为可能。花色素代谢途径还为基因工程效率的研究提供了模式。

植物的花色主要由三大类色素决定：类黄酮(包括花青素)、类胡萝卜素和甜菜色素。花青素是类黄酮家族中的主要呈色物质。通过对花青素合成分支途径的关键节点基因进行调控，人们成功地获得了一些花色改良的观赏植物新品种。

导入单个外源基因使花色发生改变的尝试，近年来有许多成功的案例，尤其是在缺乏蓝色系的物种中导入有“蓝色基因”之称的 *F3'5'H* 基因，开启了蓝色花育种的大门。目前的研究热点是通过多基因导入完成分支途径的重建。通过抑制内源 *F3'H* 基因表达 + 过表达月季 *DFR*，可使红色矮牵牛变为橙色；通过抑制内源 *F3'H* 和 *F3'5'H* + 过表达月季 *DFR*，可使夏堇从蓝紫色变为粉色。月季 *CHS* 启动子 + 三色堇 *F3'5'H* + 菊花 *F3'H* RNAi，可将粉色菊花变成蓝色；过表达三色堇 *F3'5'H* + 鸢尾 *DFR* + 抑制月季 *DFR* RNAi，

对多个基因进行调控,成功实现花青素合成分支途径的重建,获得了花色偏蓝的月季。

1.1.2 花型

观赏植物的花型是指植物的花器官形态,包括各部分器官的形状、数量、大小和对称性等。利用分子育种技术进行花型改良也取得了一些进展。目前,国内外关注的焦点是花瓣形态建成的分子机制。各类花器官的发育是以一整套高度保守的同源异型基因(花器官发育 ABC 模型)为基础,通过保守的组合模式起作用。在观赏植物育种中,利用同源异型基因的突变可以培育出具有独特花型的新品种。C 类基因的基因工程育种往往是形成重瓣花卉新品种的重要来源,月季是由于内源 C 类基因正常功能被抑制获得。

由于 ABC 模型中的成员和花对称性决定因子多以转录因子家族形式存在,且绝大多数观赏植物为异源多倍体,控制其花型的转录因子数量较多,使用传统的转基因技术难以克服转录因子间的冗余性,育种难度较高。通过构建 35S: *AatTCP3: EAFmotif* 嵌合蛋白超表达载体获得了多种花型改变的转基因株系,如花瓣边缘呈波浪状的月季;构建 *TCP3SRDX* 嵌合蛋白超表达载体,获得了叶型和花型改变的转基因株系。利用月季 ABC 模型中的 B 类基因 *SEP3* 构建 *RhSEP3SRDX* 嵌合蛋白超表达载体转化月季,获得了花瓣完全消失、仅留存萼片的“绿色月季”;而使用拟南芥中控制细胞扩展的基因 *AtYABI* 构建 *YABISRDX* 载体转化月季,获得了株型和花型完全改变的“奇异”月季转基因株系。

1.1.3 花香

花香化合物主要由萜类、苯类/苯丙素类、脂肪酸衍生物和一些含氮或硫化物等组成。第 1 个花香育种成功的案例来自 Lückner 等对烟草的实验,他们将柠檬中 3 个不同的单萜基因同时转入烟草,转基因烟草的叶和花中都释放出 β -蒎烯、柠檬烯、 γ -萜品烯以及很多花香化合物的副产品,引起了花香的强烈改变。月季 *RhAAT* 基因(乙醇-乙酰转移酶基因)在矮牵牛中异源表达,能产生了芳香物质乙酸苜酯和乙酸苯乙酯,育成了芳香型矮牵牛转基因株系。

除上述萜类物质合成相关基因的转化外,改变苯类/苯丙素类化合物途径的分支代谢模式,亦能增加目的产物的合成,增强花香。向矮牵牛中转入

拟南芥花青素合成途径调节基因 *AtPAP1*，在改变花色的同时，其体内的苯乙醛含量增加，增加了转基因矮牵牛的芳香性。将该基因转入月季，亦能够使转基因月季的挥发类物质萜类化合物的含量增加 6.5 倍，且该变化可被人类嗅觉所区分。

1.1.4 开花期

观赏植物的开花期是构成其观赏价值的重要内容之一。在观赏植物的生产中，控制产品的开花期，适时上市可直接影响其在市场上的价格。因此，花期始终是观赏植物品种改良的重要目标性状之一。模式植物拟南芥开花调控网络主要有 6 条成花调控途径：光周期途径和春化途径响应季节变化过程中日长和温度的变化；环境温度途径响应栽培环境中的温度变化；自主途径、赤霉素途径和年龄途径响应自身生长发育状况的变化。在不断变化的外部环境条件和内部生理条件下，这些途径通过一些主要的整合因子（如 *SOC1*、*FT* 和 *LFY* 等）的作用实现对拟南芥开花时间的精确调控。近年来的研究表明，*FT* 蛋白就是“成花素”，可以通过韧皮部从叶片运输到茎端分生组织，与 *bZIP* 转录因子 *FD* 互作，共同激活花分生组织基因 *API* 的表达，从而促进拟南芥成花转换并启动花发育过程（戴思兰等，2013）。月季是月月开花植物，其花期调控的分子机制与拟南芥有不同：外源乙烯能够促进月季切花品种‘*Samantha*’开花，但抑制另一品种‘*Kardinal*’开花（Tan 等，2006）。通过对‘*Samantha*’开花过程中乙烯受体基因的表达量进行分析发现，外源乙烯参与开花调控是通过调节 2 个乙烯受体（*RhETR1* 和 *RhETR3*）和 2 个 *CTR* 基因（*Rh-CTR1* 和 *Rh-CTR2*）来实现的（Ma 等，2006）。花芽发育前期喷施外源赤霉素促进开花抑制子 *RoKSN/TFL1* 的积累，抑制或延迟某些月季春季开花（Randoux 等，2012）。过量表达开花抑制子基因 *RoKSN/TFL1*，导致月月粉不开花（Randoux 等，2014）。这些研究表明，乙烯或赤霉素介导的分子调控是月季花期调控的重要途径。

1.1.5 抗逆性

抗逆性一般包括非生物胁迫和生物胁迫两方面。

在现代切花和盆花生产中，由于精细栽培设施和智能光温系统的推广，非生物胁迫对观赏植物的影响已经越来越小。但要实现高效节能的集约化生产，提高抗逆性仍是改良观赏植物品质的重要内容。在露地栽培和园林景观

营造中,抗非生物胁迫则始终是观赏植物育种的一项重要内容。DREB 类转录因子是调控高等植物抗干旱、耐盐渍和低温最重要的一类转录因子,也是抗逆基因工程中最常被选择的目标基因,其在多种观赏植物抗非生物胁迫过程中发挥“节点”基因的作用。将抗寒信号通路 DREB-CBF 途径的 *DREB1C* 等基因转入月季中,能够提高转基因植株的抗冷性,且转基因植株的其他观赏特性不变(陈己任,2008;Chen 等,2010)。通过将 *DREB1C* 基因和与生长相关木葡聚糖转葡萄糖苷酶基因 *XET* 聚合转化月季,其抗冷性与生长势均有增强(陈己任,2013;Chen 等,2016)。

真菌、细菌、病毒、病原体以及虫害会对花卉生产及销售的各个环节带来毁灭性打击。传统的育种方法和化学药剂防治均不能在真正意义上实现抗生物胁迫花卉新品种的培育,转基因育种是一条经济可行的育种策略。综合国内外报道,培育抗镰孢菌、葡萄孢属真菌、锈病、黑斑病、白粉病和蚜虫的观赏植物新品种,是现代花卉生产中抗生物胁迫最为重要的育种目标。将几丁质酶基因导入月季,获得了黑斑病减少的转化植株;将洋葱转脂蛋白基因 *Ace-AMPI* 转入月季,获得了对蔷薇单丝壳菌抗性提高的转基因月季株系。近年来,研究者发现月季中的 *Agos* 基因、水通道蛋白基因(*Rh-PIP1*; *1*, *Rh-PIP2*; *1*)及扩展蛋白基因 *RhEXPA4* 均位于乙烯信号转导途径的下游,在乙烯对花瓣细胞扩展的抑制中起重要作用,抑制该类基因均能够促进月季花瓣的扩展。而 *NAC* 基因家族的 2 个成员 *RhNAC2* 和 *RhNAC100* 有可能是乙烯信号转导通路的正、负调控因子,*RhNAC2* 可以直接调节 *RhEXPA4* 的表达,抑制该基因显著降低月季花瓣的耐失水性和花瓣的扩展能力,而 *RhNAC100* 是细胞扩展的负调节因子,抑制该基因的表达明显促进月季花瓣面积的增加和细胞的扩展。除了降低乙烯的生物合成,延长瓶插寿命的另一策略是增加衰老过程中的细胞分裂素合成。将衰老阶段特异作用启动子 *SAG12* 与异戊烯转移酶基因 *IPT* 连接转化矮牵牛和月季,均得到了瓶插时间长的新品种。

由于植物分子育种相关内容较多,本研究耐逆育种主要是指非生物胁迫,尤其是耐寒耐旱相关研究。

1.2 月季耐逆分子育种研究的意义

非生物逆境胁迫已成为威胁人类赖以生存与发展的粮食安全、生态安全

的主要环境因素。

1.2.1 耐逆分子育种研究是国家生态植被修复的需要

全球 20% 的耕地受到盐渍威胁, 43% 的耕地为干旱、半干旱地区。我国存在干旱胁迫问题的国土面积为 50% 以上, 大多数分布在西北部地区。这些地区往往也是冬季寒冷地区, 干旱和低温使得该自然环境下生态植被难以修复。近 20 年来全球荒漠化面积已占陆地面积的 25%。我国西部荒漠化的土地以每年 300 万亩的速度扩大。据估计每年因风沙危害导致直接经济损失高达 45 亿元。近年来, 极端天气频现, 气候变暖现象越来越突出, 高温天气不断刷新极端记录。今年夏天, 长沙 40℃ 以上高温天气持续达 1 个月以上。河流干涸、土地沙化、沙尘暴频发、湖泊湿地萎缩、草地退化、森林锐减、生物量和生物多样性急剧下降已引起社会广泛关注。

我国实施京津风沙源治理等生态修复工程以来, 立地条件较好的林地基本上已经种草种树。立地条件困难地区的生态植被修复急需耐逆能力强的林草植物材料才能修复。林木分子设计培育高耐逆林木新品种是其基础和保证。

常规的抗逆育种工作通过属种间杂交获得抗逆性新品种, 也可以通过地域、气候相近地区的引种丰富和改良生物多样性, 经过多次回交才能得到较为理想的抗逆品种。林木多年生、结构复杂、育种周期长。基因工程提高植物耐逆性的方法与传统的选种、引种、育种手段相比, 克服种间障碍, 有效组合基因资源, 具有周期短、可利用基因资源广泛等的优点, 在抗逆育种工作上具有广阔的应用前景。

1.2.2 月季分子育种研究是人们生活品质提高的需要

随着全球经济的发展和人们生活品质的提高, 人们不仅对色彩鲜艳、花型奇特、气味芳香、品质优良的观赏植物产品需求进一步增加, 同时由于人们环保意识的进一步加强, 培育生长快速、节约资源、抗逆性强和环境效益好的月季新品种已成为必然。

1.2.3 月季耐逆分子育种研究是城市建设发展的需要

月季是城市绿化和鲜切花的主要材料, 有很高的商品价值, 在我国广泛栽培。月季作为重要的鲜切花, 时常要面对长时间的低温保鲜、长途运输和

长时间瓶养。抗冻能力提高 $1\sim 2^{\circ}\text{C}$ ，可以极大地提高农作物产量和效益。近年来，由于温室效应导致地球变暖加速，低温、高温、干旱等极端天气时有发生，增强月季的耐寒性，不仅可以提高月季瓶养寿命、月季切花品质和经济效益，而且对于城市靓化、城市节水、居室美化、乃至生态植被的恢复具有非常重要的意义。

2 植物耐逆育种的分子机理

2.1 植物耐逆相关目的基因

培育耐旱、耐寒林木新品种对困难地区生态植被恢复和城市节水绿化具有实际意义。分子育种或分子改良技术,人工重组目的基因,克服物种之间生殖隔离,优化目的基因与受体资源配置,在较短时间内定向培育出高强耐旱、耐寒林木新品种,使现有资源和技术难以或不能绿化的立地条件的植被修复成为可能和现实。因此,必须首先建立耐旱分子育种技术平台,其关键或前提是必须有耐逆功能明确的可用于培育耐旱林木新品种的目的基因。

2.1.1 植物干旱响应基因

植物对环境干旱的反应主要表现在形态结构(宏观和微观形态)和内部机理(生理、生化、基因表达调控)即代谢调控等两个方面。目前,转基因改良植物耐旱性所用的目的基因主要是植物缺水引发的信号传递和分子反应的相关基因。信号传递系统启动和链接干旱信号(即水分信号)在土壤-植物-大气之间的细胞、组织和器官缺水的分子反应。分子反应的生理功能主要表现在3个方面:保持细胞结构,特别是膜系统的完整性;增强细胞保水和吸水的能力;增强吸收地下水的力量。

细胞膜系统完整性保护相关基因:干旱胁迫使体内产生过多的氧自由基,导致膜脂过氧化而形成丙二醛(MDA),使膜系统受到破坏。细胞膜完整性保护系统由活性氧清除系统主要由抗氧化酶系统和抗氧化物质组成。抗氧化酶系统清除活性氧的方式,首先是超氧歧化酶(SOD)将活性氧氧化成 H_2O_2 ,然后过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)利用抗坏血酸(AsA)为底物将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 。抗氧化物质是由AsA和谷胱甘肽(GSH)组成,其作用方式为谷胱甘肽-抗坏血酸还原系统。催化这些反应的酶的编码基因已在不同实验室克隆。GSH基因已从酵母中克隆获得(李