

山核桃成花过程基因表达的 cDNA-AFLP 分析

黄有军^{1,2}, 周丽³, 陈芳芳², 周秦², 黄坚钦², 黄敏仁¹, 王明麻¹

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300; 3. 杭州天目山药业股份有限公司, 浙江 临安 311300)

摘要: 为缩短山核桃 *Carya cathayensis* 童期, 促进成花, 探讨木本植物成花机制, 以山核桃为材料, 采取成花决定前、成花决定期和成花决定后共 3 个时段的雌花芽, 利用互补脱氧核酸扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)技术克隆成花相关的特异基因片段 (TDFs)。试验共获得 278 个 TDFs, 经测序和序列同源性分析, 其中 65 个 TDFs 为未知基因序列, 213 个 TDFs 具有同源序列, 其功能涉及激素合成、酶合成、细胞信号转导、叶绿体合成和光诱导等。图 2 表 3 参 17

关键词: 植物学; 山核桃; 成花基因; cDNA-AFLP

中图分类号: S718.3; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)03-0297-05

Gene expression with cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism) during flowering of *Carya cathayensis*

HUANG You-jun^{1,2}, ZHOU Li³, CHEN Fang-fang², ZHOU Qin², HUANG Jian-qin²,
HUANG Min-ren¹, WANG ming-xiu¹

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. Hangzhou Tianmushan Pharmaceutical Co. Ltd., Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To shorten the juvenile period and promote early flowering in *Carya cathayensis* (Chinese hickory), the flowering mechanism of woody plants was studied. Female flower buds were plucked during three periods: before, during, and after flower determination. Then the transcript-derived fragments (TDFs) associated with flowering were cloned using cDNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) analysis. Of the 278 TDFs, after sequencing and homologous analysis, 65 TDFs showed unknown functions, whereas the others showed various functions including hormone synthesis, enzyme synthesis, cell signal transduction, chloroplast synthesis, and photo-induction. [Ch, 2 fig. 3 tab. 17 ref.]

Key words: botany; *Carya cathayensis* (Chinese hickory); flowering gene; cDNA-AFLP

花器官形成直接影响果实产量。通过拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和水稻 *Oryza sativa* 等模式植物的成花机制研究, 目前形成 4 条较公认的成花控制途径, 分别是光周期诱导途径、自发途径、春化促进途径和赤霉素诱发途径^[1-6]。木本植物的成花机制和性别调控问题, 与模式植物相比有其特殊性, 迄今还没有系统阐明。以前人们主要是通过园艺栽培技术, 调控花芽形成来实现果树的高产稳产^[7-9], 但要从根本上提高产量或矮化早实, 研究成花机制有着十分重要的理论价值和应用前景。山核桃

收稿日期: 2008-09-23; 修回日期: 2008-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30872047); 浙江省自然科学基金资助项目(Z307534, Y306373); 浙江省森林培育重中之重学科开放基金资助项目(200507)

作者简介: 黄有军, 副教授, 从事林木遗传育种研究。E-mail: youjunhuang@163.com。通信作者: 王明麻, 教授, 中国工程院院士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: mxwang@njfu.edu.cn

Carya cathayensis 是中国特有的名优干果和木本油料树种, 主要分布于浙江西部地区以及安徽部分地区。山核桃从种子播种到结果需 10 余年的时间, 从而较大程度抑制了山核桃的产业发展。如何缩短童期促进早实是山核桃研究者亟待解决的难题。互补脱氧核酸扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)是一项分析基因差异表达的技术, 具有重复性好, 假阳性低, 可检测低丰度 mRNA 表达等优点^[10], 不仅可以从单个基因分析基因表达信息以及编码蛋白的生理功能, 也可以从基因组水平研究基因表达^[11]。笔者利用 cDNA-AFLP 技术比较了山核桃成花过程不同时期的基因表达, 并回收部分差异片段进行测序分析, 以了解山核桃成花过程中不同时期基因调控上的变化, 为进一步克隆山核桃成花同源基因和阐明木本植物成花的相关机制奠定基础。

1 材料和方法

试验地点和试验树设在浙江省临安市太湖源镇白沙村。采取成花决定前、成花决定期和成花决定后共 3 个时段的雌花芽^[12], $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用 cDNA-AFLP 法^[13]分析山核桃成花过程的基因表达情况。操作步骤如下: 改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取总核糖核酸(RNA)^[14], 用 Oligotex mRNA Spin-Column (德国 QIAGEN 公司)纯化总 RNA, 用 SMARTTM cDNA library construction kit(美国 Clontech 公司)合成, 用 QIAquick PCR purification kit (德国 QIAGEN 公司)纯化 cDNA。双链 DNA 经 *TaqI* 和 *AseI* 酶切后, 分别进行接头连接、预扩增和选择性扩增。选择性扩增产物用 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染后获得差异条带。割取差异条带分离纯化后进行 2 次扩增。扩增产物回收纯化后 PMD19-T 载体连接, 经重组克隆、筛选和鉴定获得的阳性克隆, 交给上海生物工程有限公司测序。依次在 NCBI (The National Center for Biotechnology Information) 的 BLASTN, BLASTX 和 TBLASTX 的数据库中搜索, 对搜索到的已知功能基因($E\leq 1e-4$)进行功能分类。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

提取的总 RNA 品量的好坏直接影响后续试验的成败。成花决定前、成花决定期和成花决定后共 3 个时段的雌花芽总 RNA 检测结果显示 28, 18 和 5 S 条带清晰(图 1), 光密度值介于 1.8 ~ 2.0(表 1), 因此适于 cDNA-AFLP 分析。

2.2 cDNA-AFLP 技术获得差异片段

采用 80 对引物对山核桃成花过程 cDNA-AFLP 分析表明, 80 对引物均能获得条带, 其差异条带数量因引物对而异, 共获得 278 个特异基因片段(TDFs), 山核桃成花不同期基因表达差异明显(图 2)。TDFs 共存 6 种类型, 分别记为 101, 010, 100, 011, 110, 001(1 表示有条带, 0 表示无条带; 101 表示在成花决定前期、成花决定期和成花决定后期该 TDF 的表现为表达-不表达-表达; 其余 TDFs 类型表示方法相同)。经合计发现, 101, 010, 011 类型的 TDFs 数居多, 其余 3 种类型的 TDFs 数量相对较少(表 2)。

2.3 差异片段同源性分析

对 278 个 TDFs 测序的结果表明, 65 个 TDFs 为未知基因序列; 213 个 TDFs 同源性达 80% 以上的

表 1 光密度 D_{260}/D_{280} 值测定结果

样品时间	质量浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	D_{260}/D_{280}
成花决定前	7.54	1.81
成花决定期	39.78	1.88
成花决定后	33.68	1.92

表 2 不同类型 TDFs 数量

TDFs 类型	数量/个	比例/%
101	58	21
010	69	25
100	28	10
011	65	23
110	32	12
001	26	9
合计	278	100

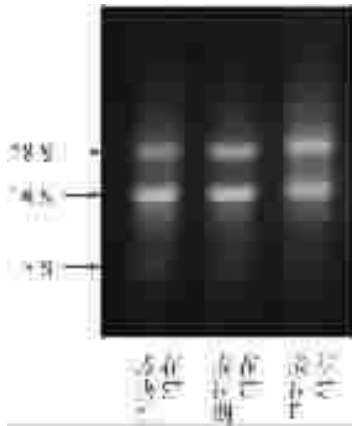


图 1 CTAB 法提取的总 RNA

Figure 1 Total RNA extracted using CTAB method



图 2 A17T11 引物条件下 cDNA-AFLP 分析结果 (箭头示差异条带)

Figure 2 Result of cDNA-AFLP analysis by A17T11 primers (arrows show transcription derived fragments)

占 52%，同源性达 90% 以上的占 14%，推测该 213 个 TDFs 具有与各自相应的同源基因相同或相似的生物学功能。

2.4 TDFs 功能归类

通过对已知功能的同源基因进行分类，共分为 11 类：细胞信号转导、细胞生长、衰老与死亡、细胞分化与植物成熟、激素合成、胁迫与抗病、物质运输、光合作用、物质和能量代谢、矿物质同化与有机物合成和光形态建成，在山核桃成花过程中起着直接或间接的作用 (表 3)。

表 3 TDFs 功能归类

Table 3 The classification of TDFs function

编号	功能	TDFs/个	占已知同源序列总和的比例/%
1	细胞信号转导	22	8.6
2	细胞生长	12	4.7
3	衰老与死亡	5	2.0
4	细胞分化与植物成熟	4	1.6
5	激素合成	11	4.3
6	胁迫与抗病	35	13.7
7	物质运输	12	4.7
8	光合作用	73	28.6
9	物质和能量代谢	47	18.4
10	矿物质同化与有机物合成	31	12.2
11	光形态建成	3	1.2

3 结论与讨论

利用 cDNA-AFLP 技术克隆获得山核桃成花过程的 278 个 TDFs，其中 65 个 TDFs 为未知基因序列，213 个 TDFs 具有同源序列。

植物在成花过程中，要经过营养生长的物质积累，在受到外界环境的诱导及其自身的开花信号的作用下，然后向生殖生长转变^[15-17]。植物成花的外因包括日照、温度和水分等生态因素，而植物开花的内因则包括细胞壁松弛与合成、细胞生长分化、细胞周期调控、胁迫响应、光合作用、脂类代谢、蛋白代谢、氨基酸代谢、糖类代谢、转录调控、细胞凋亡、激素合成与运输、核酸代谢和物质运输等等，它们最终都受到内部基因的调控。

细胞信号转导。信号的传递在细胞的增殖、分化和生存等过程中都起着十分关键的作用。研究发现 8 个基因参与 G 蛋白合成，3 个合成参与法尼基化反应的蛋白，1 个合成富亮氨酸重复跨膜蛋白激酶，1 个合成酪蛋白激酶 I，3 个合成丝/苏氨酸激酶，2 个类受体蛋白激酶，1 个 *AtC401* 基因合成 SNF1-like 蛋白激酶，1 个合成参与去谷胱甘肽化反应的谷氧还蛋白。

细胞生长。研究表明有 5 个与细胞壁结构与功能相关的基因参与植物成花过程。与细胞分裂有关

的基因中, 3个基因参与合成和细胞周期相关的细胞周期素, 3个合成与DNA复制有关的DNA II型局部异构酶, 1个合成水解酶亚基植物血凝素前体。

衰老与死亡。1个 *Gda1* 基因和1个 *Gda2* 基因参与抑制衰老, 1个细胞致死基因参与细胞程序性死亡, 另有2个与衰老有关的基因参与。

细胞分化与植物成熟。研究发现有1个 *Rab7* 基因在细胞的分化调控, 内吞, 外排, 神经递质的运输和释放发挥调节作用, 1个转录因子 mRNA, 另外有2个参与植物成熟调节蛋白的合成。

激素合成。有5个基因参与合成植物生长激素调节蛋白, 2个合成作为植物新型肽类生长调节剂的磺肽素, 1个合成植物生长激素诱导蛋白, 2个合成与乙烯合成有关的蛋氨酸合成酶, 1个合成与吲哚乙酸有关的邻氨基苯甲酸盐合酶。

胁迫与抗病。3个参与热休克蛋白合成, 5个合成 CIPK 蛋白, 1个合成过敏反应诱导蛋白, 6个合成过氧化氢酶, 1个合成超氧化物歧化酶, 3个 DnaJ-like 蛋白假基因合成 HSP70 的辅助伴侣蛋白 (co-chaperone), 参与细胞内新生蛋白的折叠、装配和跨膜运输等过程, 并能在逆境条件下防止未折叠的蛋白变性和介导逆境消退后聚集蛋白的溶解复性。1个合成几丁质酶抗病蛋白前体, 2个 *Grp94* mRNA 合成葡萄糖调节蛋白 94, 2个 *FAD8* mRNA 合成植物脂肪酸去饱和酶, 6个参与合成脂肪酸去饱和酶, 2个合成与 NO 合成酶相关的甘氨酸脱羧酶复合体, 1个合成与清除有害物质有关的谷氧还蛋白, 1个合成与植物抗病相关的水杨酸结合过氧化氢酶, 1个 *DEAD box* RNA 对植物的生长发育和抗逆反应中起调控作用。

物质运输是细胞生长的驱动力。1个合成与微管结构相关的 α -微管蛋白, 1个合成与微丝有关的肌动蛋白, 1个合成糖类输送蛋白, 1个合成蛋白转移蛋白, 7个 *MipC* mRNA 和 *PIP 2* 合成水通道蛋白, 1个合成质膜内在性嵌入蛋白。囊泡运输为生长的细胞提供必须的细胞壁、质膜衬质和蛋白质, 其中1个 *Rab7* 基因是囊泡出芽、移动和融合过程中的调节因子。

光合作用为成花过程储存物质与能量。5个与 ATP 合成有关的 ATP 合酶, 2个合成 NADH 脱氢酶 *ndhH* 亚基, 42个合成氨基酸转运蛋白, 61个合成叶绿体, 13个是光系统 II 编码基因, 2个是 *Chl a/b* 结合蛋白, 4个是叶绿体翻译起始因子, 1个合成叶绿体光合作用耦合因子, 1个与叶绿体质体系 I 有关, 1个是叶绿体蛋白核编码前体, 3个 *Cab* 基因参与合成捕光叶绿素 a/b 结合蛋白, 1个合成捕光复合体 II 蛋白前体, 1个与光合体系 I 有关, 1个与光合体系 I 聚光复合体合成有关, 1个合成与叶绿素合成有关的镁-原卟啉 IX 甲基转移酶。

碳和氮等物质和能量代谢为细胞生长提供物质和能量基础及保护性物质。4个合成与 ATP 产生有关的线粒体, 有14个合成与 ATP 降解有关的 ATP 酶, 2个合成 ATP 依赖蛋白酶, 3个合成 ATP 结合蛋白酶, 3个参与氧化还原酶合成, 6个合成与磷酸代谢有关的酸性磷酸酯酶, 1个合成与乙醇代谢有关的短链乙醇脱氢酶, 1个 *ClpA* mRNA 合成与蛋白质降解相关的蛋白酶活性调节物质, 1个合成与呼吸作用中丙酮酸合成有关的托品醇乳酸脱氢酶, 6个合成与蛋白水解相关的枯草杆菌蛋白酶, 2个合成与水解葡萄糖苷基相关的 β -葡萄糖苷酸酶, 1个合成与酰胺基酰水解有关的胺酶家族蛋白, 2个合成糖基水解酶家族蛋白, 1个合成与蛋白质降解有关的蛋白质泛素连接酶。

矿物质同化与有机物合成。13个合成与蛋白质合成有关的核糖体, 3个是核糖体结构蛋白, 1个基因与核糖体灭活有关, 1个输送与脂肪代谢有关的肌醇, 2个合成与生物固氮有关的铁蛋白(固氮酶还原酶), 1个合成与淀粉生物合成有关的淀粉分支酶, 1个合成与酚类合成有关的苯丙氨酸解氨酶, 8个成熟酶 *K* 基因将未成熟的 mRNA 中的内含子 2 切除掉, 产生成熟的 mRNA, 以此用于转运氨基酸。1个 *DEAD box* RNA 编码 RNA 解旋酶, 此酶在 RNA 合成与降解上起着重要作用。

光形态建成。光敏色素作为形成光受体系统的重要光受体, 具有广泛的生理作用, 包括光周期、花诱导和花色素形成等等。其中发现有3个基因参与合成光敏色素。在成花多因子诱导途径中, 包括由光敏色素和隐花色素参与的光周期途径。*PhyB* 抑制 *CO* 的表达, 而 *PhyA*, *Cry1* 和 *Cry2* 相互作用, 通过生理钟基因促进成花素的形成, 从而促进 *CO* 的表达, 通过作用于 *AGAMOUS-LIKE20* 而促进成花。

参考文献:

- [1] MOURADOV A, CREMER F, COUPLAND G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity [J]. *Plant Cell*, 2002 (supp): 111 – 130.
- [2] SIMPSON G G, DEAN C. *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? [J]. *Science*, 2002, **296** (5566): 285 – 289.
- [3] CORBESIER L, VINCENT C, JANG S, *et al.* FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2007, **316** (5827): 1030 – 1033.
- [4] YAN L, LOUKOIANOC A, BLECHL A, *et al.* The wheat *vrn2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization [J]. *Science*, 2004, **303** (5224): 1640 – 1644.
- [5] BEN-NISSAN G, LEE J Y, BORDHOV A, *et al.* GIP, a *Petunia hybrida* GA-induced cysteine-rich protein: a possible role in shoot elongation and transition to flowering [J]. *Plant J*, 2003, **37** (2): 229 – 238.
- [6] ZHU Yong, ZHAO Huifang, REN Guodong, *et al.* Characterization of a novel developmentally retarded mutant (*drm1*) associated with the autonomous flowering pathway in *Arabidopsis* [J]. *Cell Res*, 2005, **15** (2): 133 – 140.
- [7] LOONE Y N E, PHARIS R, NOMA M. Promotion of flowering in apple trees with gibberellin A4 and C-3 epi-gibberellin A4 [J]. *Planta*, 1985, **165** (2): 292 – 294.
- [8] GARCIA-LUIS A, KANDUSER M, SANTAMARINA P, *et al.* Low temperature influence on flowering in *Citrus* [J]. *Physiol Plant*, 1992, **86** (4): 648 – 652.
- [9] MANOCHAI P, SRUAMSIRI P, WIRIYA-ALONGKORN W, *et al.* Year around off season flower induction in longan (*Dimocarpus longan*, Lour.) trees by KClO₃ applications: potentials and problems [J]. *Sci Hortic*, 2005, **104** (4): 379 – 390.
- [10] 姜立杰, 张开春, 张晓明. cDNA-AFLP 技术及其在基因表达研究中的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, **23** (12): 82 – 86.
JIANG Lijie, ZHANG Kaichun, ZHANG Xiaoming. The principle of cDNA-AFLP technique and its application in gene expression [J]. *Prog Biotechnol*, 2003, **23** (12): 82 – 86.
- [11] 卢钢, 曹家树. cDNA-AFLP 技术在植物表达分析上的应用 [J]. 植物学通报, 2002, **19** (1): 103 – 108.
LU Gang, CAO Jiashu. The cDNA-AFLP technique and its application in plants [J]. *Chin Bull Bot*, 2002, **19** (1): 103 – 108.
- [12] 黄有军, 夏国华, 王正加, 等. 山核桃雌花发育的解剖学研究 [J]. 江西农业大学学报, 2007, **29** (5): 723 – 726.
HUANG Youjun, XIA Guohua, WANG Zhengjia, *et al.* Studies on anatomy of development of female flower in *Carya cathayensis* Sarg. [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2007, **29** (5): 723 – 726.
- [13] BACHEM C W B, OOMEN R J F J, VISSER R G F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, **16**: 157 – 173.
- [14] 王家保, 徐碧玉, 杜中军, 等. 改良 CTAB 法从采后荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 果皮中提取总 RNA [J]. 农业生物技术学报, 2006, **14** (6): 998 – 999.
WANG Jiabao, XU Biyu, DU Zhongjun, *et al.* Extracting total RNA from pericarp of postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit by improved CTAB method [J]. *J Agric Biotechnol*, 2006, **14** (6): 998 – 999.
- [15] BOHLENIUS H, HUANG Tao, CHARBONNEL-CAMPAA L, *et al.* CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees [J]. *Science*, 2006, **312** (5776): 1040 – 1043.
- [16] BAURLE I, DEAN C. The timing of developmental transitions in plants [J]. *Cell*, 2006, **125** (4): 655 – 664.
- [17] WIGGE P A, KIM M C, JAEGER K E, *et al.* Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2005, **309** (5737): 1056 – 1059.