

## 用 cDNA-AFLP 技术分析山核桃嫁接过程中的 *CcARF* 基因表达

郑炳松, 陈 苗, 褚怀亮, 艾 雪, 黄有军, 李雪芹, 黄坚钦

(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)

**摘要:** 利用 cDNA-AFLP(互补脱氧核糖核酸-扩增片段长度多态性)技术, 在山核桃 *Carya cathayensis* 嫁接过程中分离得到 1 个与山核桃嫁接相关的 cDNA 片段。与美国国家生物技术信息中心(NCBI)同源性比较分析表明, 该 cDNA 片段与小麦生长素响应因子部分区段有 81% 的同源性, 命名为 *CcARF*。荧光定量实时聚合酶链式反应 (RT-PCR) 分析表明: 该基因在山核桃嫁接前砧木和接穗中都有强烈表达, 但在嫁接后 3 d 急剧下降, 在这之后砧木中的表达增强不大, 而接穗中嫁接后 7 d 表达开始增强, 到嫁接后 14 d 表达明显, 比嫁接后 3 d 增强了 4.7 倍。该 *CcARF* 片段可能对山核桃嫁接起到基因表达调控的作用。图 3 表 1 参 21

**关键词:** 植物学; cDNA-AFLP; 山核桃; 嫁接; 生长素响应因子

**中图分类号:** S718.4      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1000-5692(2009)04-0467-06

## Auxin response factor fragments cloned by cDNA-AFLP during *Carya cathayensis* grafting process

ZHENG Bing-song, CHEN Miao, CHU Huai-liang, AI Xue, HUANG You-jun,  
LI Xue-qin, HUANG Jian-qin

(The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** In order to improve survival of *Carya cathayensis* (Chinese hickory) grafted seedling, a cDNA fragment related to Chinese hickory graft was obtained by cDNA-amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) techniques during the grafting process. Analyses were conducted using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) homology comparison and Fluorescence Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The NCBI homology comparison showed that a cDNA fragment, named *CcARF*, was 81% homologous with a wheat section of the auxin response factor (ARF). Meanwhile, RT-PCR revealed that before grafting, gene expressions were strongly induced both in the rootstock and scion of Chinese hickory and declined sharply at 3 d after grafting. After 3 d, expression in rootstock was weakly induced. However, in the scion, 7 d after grafting, expression increased reaching a maximum 14 d after grafting; this was 4.7 times stronger than 3 d after grafting. Thus, when grafting Chinese hickory, the *CcARF* fragment may be involved in the regulation of gene expression. [Ch, 3 fig. 1 tab. 21 ref.]

**Key words:** botany; cDNA-amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP); *Carya cathayensis* (Chinese hickory); grafting; auxin response factor (ARF)

植物嫁接过程的实质就是砧木与接穗愈合的过程, 在这个过程中会发生一系列包括初始黏连、愈

收稿日期: 2008-09-03; 修回日期: 2009-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371124); 浙江省森林培育重中之重学科开放基金资助项目(200509)

作者简介: 郑炳松, 副教授, 博士, 从事植物分子生理生化等研究。E-mail: bszheng@zjfc.edu.cn

合组织的形成、贯穿砧木和接穗的维管束桥的形成等形态结构变化和包括细胞对水分的透性增加、可溶性糖等有机物质的积累与运输、生长素等激素的合成与释放、蛋白质合成及基因表达发生改变等生理生化变化<sup>[1-3]</sup>, 其中基因的表达和调控研究近年来逐渐受到重视。郭蕾等<sup>[4]</sup>在水稻 *Oryza sativa* 愈合组织分化生根过程中, 利用 cDNA 芯片杂交技术, 克隆到多个嫁接诱导或抑制相关的基因。肖桂山等<sup>[5]</sup>利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺胶体电泳 (SDS-PAGE) 技术分析了黄瓜 *Cucumis sativus* 嫁接过程中全蛋白的变化, 发现了 3 种新合成的特异蛋白质。陈红等<sup>[6]</sup>发现过氧化物酶等同工酶参与了茄子 *Solanum melongena* 的离体嫁接过程, 但未见有关基因和蛋白在山核桃 *Carya carthayensis* 嫁接过程中的功能作用的报道。山核桃是中国特有的优质干果, 不能园艺化、良种化栽培是阻碍山核桃产业发展的重要瓶颈, 实行嫁接繁殖是解决山核桃童期长, 产量不稳定, 采摘不易的重要途径。目前, 对山核桃嫁接成活机制的研究主要集中在形态解剖学、生理生化机制等方面, 因此, 研究山核桃嫁接成活的分子机制具有十分重要的意义。cDNA-AFLP (互补脱氧核糖核酸-扩增片段长度多态性) 技术<sup>[7]</sup>是近年来发展起来的一种成熟高效的 RNA 指纹技术, 与差减杂交和差异显示实时聚合酶链式反应 (DD RT-PCR) 等分离差异表达基因的技术相比, 它具有多态检出效率高, 可靠性高, 假阳性率低, 且不需要预先知道序列信息, 重复性好等优点<sup>[8-10]</sup>, 目前已用于多种植物不同发育过程差异基因的分离及其表达调控<sup>[11-13]</sup>。笔者利用 cDNA-AFLP 技术对山核桃嫁接前后的基因表达差异进行了分析。对部分差异 cDNA 片段进行测序和同源性比较后发现, 其中 *CcARF* 片段与小麦生长素响应因子有一定的同源性, 并对 *CcARF* 进行了初步的表达分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

植物材料为山核桃无性系, 试验地点为浙江林学院山核桃试验基地, 嫁接前取山核桃 2 年生砧木和接穗作为对照, 嫁接后每隔 3, 7, 14 d 在嫁接部位采集嫁接苗, 每次采集 30 ~ 50 个嫁接苗, 立即于液氮中迅速冷冻, 带回实验室于 -70 °C 保存备用。

### 1.2 RNA 的提取与纯化

采用刘晓菊等<sup>[14]</sup>发展的改良十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取总 RNA。采用 Oligotex mRNA Spin-Column 试剂盒 (QIAGEN 公司) 按照说明书操作纯化 mRNA。

### 1.3 cDNA-AFLP 分析

cDNA-AFLP 分析采用 Yang 等<sup>[15]</sup>的方法。分别用等量的 mRNA 反转录成 cDNA 第 1 链, 用 SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, USA) 合成 cDNA 第 2 链, 产物经沉淀浓缩后, 用 *TaqI* 和 *AseI* 酶切并加接头, 预扩增后, 稀释作为 cDNA-AFLP 的选择性扩增模板, 经各种不同引物组合扩增后, 产物在 6% 的聚丙烯酰胺变性凝胶上电泳, 银染。

用刀片切割回收 cDNA 差异片段, 取回收产物做模板, 用原来选择性扩增引物和聚合酶链式反应 (PCR) 程序进行二次扩增。按 DNA 回收试剂盒说明书回收纯化目的片段, 将回收的差异片段连接到 PMD-18T 载体中。经检测鉴定的阳性克隆交由上海生物工程公司测序。将测序得到的 EST 序列去除载体、接头序列, 利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 的 BLAST 进行同源性比对分析。

### 1.4 荧光定量 RT-PCR 分析

山核桃嫁接过程中砧木和接穗总 RNA 的提取和 cDNA 的合成分别按改良 CTAB 法和 cDNA 文库构建试剂盒进行。采用 TAKARA 的 SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) 试剂盒进行定量 RT-PCR 分析, 具体方法参照操作说明书。实验所用引物序列见表 1。按如下程序进行 PCR: 94 °C 预变

表 1 荧光定量 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of real-time RT-PCR

引物	<i>ACTIN</i>	<i>CcARF</i>
正向引物	5'-GCTGAACGGGAAATTGTC-3'	5'-TTACAGAATCGGCATCCTCA-3'
反向引物	5'-AGAGATGCTGGAAGAGG-3'	5'-CAAAGGGTACGATAAATGCAG-3'

性 10 s, 接下来进行 94 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环。试验所得数据用 Microsoft Excel 2003 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 山核桃嫁接成活过程中的 mRNA 差异表达分析

利用 100 对引物组合通过 cDNA-AFLP 分析方法研究了山核桃砧木和接穗在嫁接过程中的基因表达变化, 共回收了大小为 200~1 000 bp 的差异表达片段 (TDFs) 300 多条。图 1 中利用了 4 对引物组合 (A15T14, A15T15, A15T16 和 A15T17) 进行了 cDNA-AFLP 扩增。结果表明山核桃砧木和接穗在嫁接过程中大多数基因的表达没有明显的变化, 只有部分基因出现了基因表达的差异。有的基因在嫁接早期表达, 在嫁接后期则未表达, 推测其可能与山核桃嫁接早期创伤响应有关; 有的基因只在嫁接后期表达, 推测其可能与山核桃嫁接成活后生长发育有关; 有的基因只在砧木中表达; 有的基因只在接穗中表达 (研究结果待发表)。因此, 利用 cDNA-AFLP 技术可以研究同一基因在山核桃不同材料 (砧木和接穗) 不同的嫁接时间过程中的动态表达。在对部分差异片段进行克隆测序后发现, 其中一个在山核桃嫁接前表达较强的 *CcARF* 片段与小麦生长素响应因子同源性为 81%。由于该基因有可能与山核桃嫁接过程中基因的表达调控有关, 因此对该基因进行了进一步的表达分析。

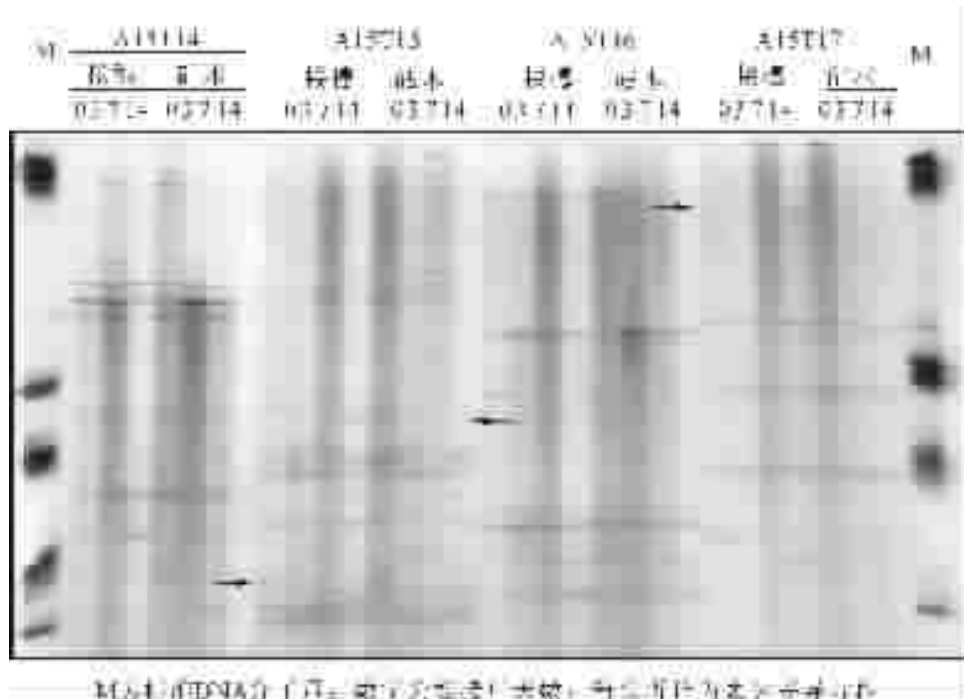


图 1 银染后的 cDNA-AFLP 指纹图

Figure 1 Example of a cDNA-AFLP fingerprints after silver staining

### 2.2 *CcARF* 基因在山核桃嫁接成活过程中的表达分析

为了验证该基因在山核桃嫁接过程中的差异表达, 以 cDNA-AFLP 得到的 300 bp 的 *CcARF* 片段 (图 2) 设计引物进行荧光定量 RT-PCR 差异表达分析。结果发现该基因的表达量从嫁接前到嫁接后 3 d 急剧下降, 分别在砧木和接穗中下降了 89% 和 91%。在随后的 11 d, 该基因的表达量在砧木中略微有所上升, 至嫁接后 14 d 基因的转录水平比嫁接后 3 d 增加了 25%。但是在接穗中, 在随后 11 d 中表达明显上升, 在嫁接后 7 d 比嫁接后 3 d 上升了 2.0 倍, 至嫁接后 14 d 基因的转录水平比嫁接后 3 d 增强了 4.7 倍, 达到嫁接前接穗中该基因表达量的一半 (图 2)。

在山核桃嫁接前, *CcARF* 基因在接穗中表达量是砧木中的 80% 左右, 但在嫁接后早期 *CcARF* 基因在砧木和接穗中都受到强烈的抑制, 嫁接后 7 d 和 14 d *CcARF* 基因在砧木中的表达增强不明显,

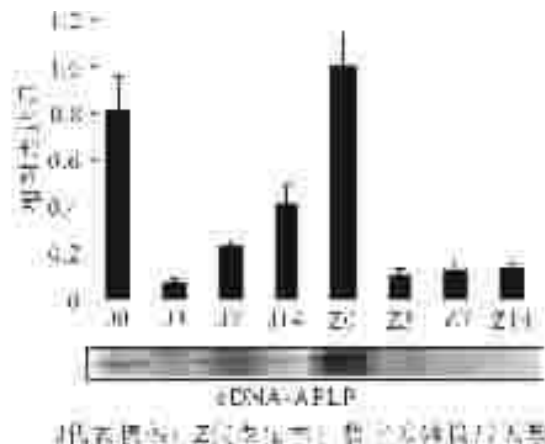


图2 山核桃生长素响应因子(*CcARF*)的荧光定量RT-PCR和cDNA-AFLP凝胶图

Figure 2 Expression patterns of *CcARF* fragments by cDNA-AFLP and Real-time RT-PCR analysis

但在接穗中表达明显增强,到嫁接后14 d时是同时期砧木中*CcARF*基因表达量的3.0倍(图2)。这与cDNA-AFLP扩增结果相一致,证实了我们得到的cDNA片段不是假阳性克隆。

### 2.3 差异cDNA片段的序列分析及同源性分析

将回收差异cDNA片段连接到PMD-18T载体上并进行测序分析。测序结果表明该cDNA片段长687 bp,扣除两端的引物序列,实际长度266 bp(图3)。将序列通过NCBI网站进行同源性比对,该序列与小麦生长素响应因子的部分区段(378~578)具有81%的同源性。结果表明,该克隆片段可能是山核桃的生长素响应因子*CcARF*片段。

```

1 TGAATGAGTTC TGACCGAACC TCGAGGATC TCATTTTGA CTGGGCTAC
2 CTTACAGAAT CGTCATCTC AGTTCGAATC AATGTGCCAC AGAATCTCTG
3 TTTTTCAGTGGG TTTTACCTT CAAGCTTAA TTTGAACTT ATTCCCTAAG
4 TATGATGTTCT TCTGACAGAT TCCATATAT TATCAAAAGCT TACGATATAT
5 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
6 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
7 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
8 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
9 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
10 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
11 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
12 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
13 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
14 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
15 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
16 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
17 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
18 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
19 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
20 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
21 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
22 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
23 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
24 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
25 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
26 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
27 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
28 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
29 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
30 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
31 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
32 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
33 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
34 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
35 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
36 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
37 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
38 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
39 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
40 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
41 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
42 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
43 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
44 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
45 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
46 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
47 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
48 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
49 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
50 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
51 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
52 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
53 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
54 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
55 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
56 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
57 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
58 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
59 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
60 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
61 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
62 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
63 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
64 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
65 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
66 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
67 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
68 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
69 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
70 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
71 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
72 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
73 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
74 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
75 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
76 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
77 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
78 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
79 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
80 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
81 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
82 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
83 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
84 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
85 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
86 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
87 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
88 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
89 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
90 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
91 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
92 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
93 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
94 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
95 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
96 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
97 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
98 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
99 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT
100 TATGATGTTCT TATGTTCT TGGTTT TGAATGAG ACAGATGAACT TGTACATGAT

```

图3 山核桃生长素响应因子(*CcARF*)片段核苷酸序列

Figure 3 The nucleotide sequence of fragment *CcARF*

## 3 讨论

利用cDNA-AFLP技术,我们克隆到一个山核桃生长素响应因子(*CcARF*)基因片段。生长素响应因子(ARF)是转录因子的一个家族,编码一类可以与生长素响应基因启动子中的生长素应答元件结合,从而调节着生长素响应基因表达的蛋白质。ARF具有多种与生长素信号途径有关的生物学功能,包括促进维管束和雌蕊的发育,操纵下胚轴的分化生长响应,影响下胚轴的伸长等<sup>[16]</sup>。研究表明ARF在生长素信号传导途径中生长素早期响应基因表达的调节中起到关键的作用<sup>[17]</sup>。低浓度生长素环境中,生长素响应因子ARF蛋白与生长素结合形成异二聚体,负责调控ARF的功能<sup>[18]</sup>。当细胞内生长素浓度升高时,转录因子ARF由于生长素/吲哚乙酸AUX/IAA蛋白降解而形成自身二聚体,并通过其N端的DNA结合结构域结合生长素早期应答基因启动子区的生长素响应元件,从而抑制或激活下游基因的表达<sup>[19]</sup>。山核桃嫁接后,砧木与接穗切面细胞会产生一种强烈愈合反应,生长素响应因子ARF也可能受到创伤而激活,从而表达强烈。随后的3 d由于砧木与接穗表面细胞受到伤害破裂,缺少物质交流通道,砧木和接穗中生长素含量下降<sup>[20]</sup>,强烈地抑制了ARF的活性(图2),从而使包括在ARF内的可溶性蛋白质含量受到强烈的抑制<sup>[3]</sup>。嫁接后7 d,砧木与接穗之间形成了愈合组织<sup>[1-2]</sup>,在接穗中生长素浓度由于生长素的极性运输开始升高<sup>[20]</sup>,ARF由于AUX/IAA蛋白降解而激活,从而表达增强(图2),启动生长素早期应答基因的表达。但在砧木中由于切断了生长素的来源,

因此 ARF 表达还是很弱。到了 14 d, ARF 由于生长素在接穗中的持续积累而表达明显; 同时砧木和接穗产生的愈合组织细胞突破了隔离层, 互相嵌合, 产生次生胞间连丝之后<sup>[21]</sup>, 恢复了接穗对砧木的生长素运输, 从而使 ARF 在砧木中也有所表达(图 2)。因此通过对该生长素响应因子(*CcARF*)基因全长的克隆、对山核桃嫁接的调控机理及其与生长素信号途径关系的研究, 不仅丰富了生长素响应因子基因家族的基因信息, 为生长素响应因子蛋白的研究提供了良好的物质基础, 而且有助于进一步揭示 ARF 影响山核桃嫁接成活的作用机制和山核桃嫁接过程生长素信号传导机制。

#### 参考文献:

- [1] 黄坚钦, 章滨森, 陆建伟, 等. 山核桃嫁接愈合过程的解剖学观察[J]. 浙江林学院学报, 2001, **18** (2): 111 - 114.  
HUANG Jianqin, ZHANG Binsen, LU Jianwei, *et al.* Anatomical observation in graft union of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2001, **18** (2): 111 - 114.
- [2] 黄坚钦, 方伟, 丁雨龙. 植物生长调节物质对山核桃嫁接的效用[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2002, **26** (4): 78 - 80.  
HUANG Jianqin, FANG Wei, DING Yulong. The effect of plant growth regulators on *Carya cathayensis* grafting [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2002, **26** (4): 78 - 80.
- [3] 郑炳松, 刘力, 黄坚钦, 等. 山核桃嫁接成活的生理生化特性分析[J]. 福建林学院学报, 2002, **22** (4): 320 - 324.  
ZHENG Bingsong, LIU Li, HUANG Jianqin, *et al.* Analysis on physiological and biochemical traits of survival of *Carya cathayensis* grafted seedling [J]. *J Fujian Coll For*, 2002, **22** (4): 320 - 324.
- [4] 郭蕾, 程英豪, 王紫祎, 等. 水稻愈伤组织根分化过程相关基因的初步筛选[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2006, **42** (2): 175 - 179.  
GUO Lei, CHENG Yinghao, WANG Ziyi, *et al.* Primary study on gene expression during root differentiation from rice calli [J]. *Acta Sci Nat Univ Pekin*, 2006, **42** (2): 175 - 179.
- [5] 肖桂山, 杨世杰. 黄瓜同种异体嫁接组合形成过程中特异蛋白质的产生[J]. 农业生物技术学报, 1995, **3** (2): 32 - 37.  
XIAO Guishan, YANG Shijie. Appearance of specific proteins during development of *Cucumis sativus* homograft [J]. *J Agric Biotech*, 1995, **3** (2): 32 - 37.
- [6] 陈红, 王永清, 袁媛, 等. 茄子/番茄嫁接体发育过程中的蛋白质含量, POD, CAT 和 SOD 活性及其同工酶研究 [J]. 四川农业大学学报, 2006, **24** (2): 144 - 147.  
CHEN Hong, WANG Yongqing, YUAN Yuan, *et al.* Studies on protein content, activity and enzymes of POD, SOD and CAT in eggplant/tomato graft union [J]. *J Sichuan Agric Univ*, 2006, **24** (2): 144 - 147.
- [7] BACHEM C W B, OOM J, VISSER R G F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, **16**: 157 - 173.
- [8] BREYNE P, ZABEAU M. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, **4**: 136 - 142.
- [9] DITT R F, NESTER E W, COMAI L. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, **98**: 10954 - 10959.
- [10] DURRANT W E, ROWLAND O, PIEDRAS P, *et al.* cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles [J]. *Plant Cell*, 2000, **12**: 963 - 977.
- [11] 杨玲, 郑炳松, 毛传澡, 等. 利用 cDNA-AFLP 技术分析旱作促进水稻种子根伸长过程中的基因表达[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, **29** (1): 65 - 70.  
YANG Ling, ZHENG Bingsong, MAO Chuanzao, *et al.* Analysis of gene expression during enhanced seminal root elongation of rice under upland condition by cDNA-AFLP [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2003, **29** (1): 65 - 70.
- [12] 韩斌, 彭建营. cDNA-AFLP 技术及其在植物基因表达研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2006, **26** (8): 1753 - 1758.  
HAN Bin, PENG Jianying. cDNA-AFLP and its application in research about gene expressions of plants [J]. *Acta Bot Borreal-Occident Sin*, 2006, **26** (8): 1753 - 1758.
- [13] 秘彩莉, 张学勇, 温小杰, 等. 利用 cDNA-AFLP 技术获得小麦耐盐性相关基因 *TaVHA-C* [J]. 中国农业科学, 2006, **39** (9): 1736 - 1742.  
BI Caili, ZHANG Xueyong, WEN Xiaojie, *et al.* Isolation of *TaVHA-C*, a gene in wheat related to salt-tolerance via

- cDNA-AFLP [J]. *Sci Agric Sin*, 2006, **39** (9): 1736 – 1742.
- [14] 刘晓菊, 洪海波, 李敏, 等. 改良 CTAB 法提取核桃总 RNA 试验[J]. 山东农业科学, 2008 (1): 97 – 99.  
LIU Xiaoju, HONG Haibo, LI Min, *et al.* An improved CTAB method for extracting total RNA from walnut [J]. *Shandong Agric Sci*, 2008 (1): 97 – 99.
- [15] YANG L, ZHENG B S, MAO C Z, *et al.* cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit [J]. *Gene*, 2003, **314**: 141 – 148.
- [16] 吴蓓, 吴建勇, 蔡刘体, 等. 生长素反应因子[J]. 植物生理学通讯, 2005 (6): 273 – 277.  
WU Bei, WU Jianyong, CAI Liuti, *et al.* Auxin response factor [J]. *Plant Physiol Commun*, 2005 (6): 273 – 277.
- [17] TATEMATSU K, KUMAGAI S, MUTO H, *et al.* MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin- regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2004, **16**: 379 – 393.
- [18] TIWARI S B, WANG X J, HAGEN G, *et al.* AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin [J]. *Plant Cell*, 2001, **13**: 2809 – 2822.
- [19] HAGEN G, GUILFOYLE T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **49**: 373 – 385.
- [20] 黄坚钦. 山核桃嫁接的生物学机理研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2002.  
HUANG Jianqin. *Study on Grafting Biological Mechanism of Carya cathayensis* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2002.
- [21] 卢善发, 杨世杰. 砧木与接穗间的电波传递[J]. 植物生理学报, 1995, **21** (4): 386 – 392.  
LU Shanfa, YANG Shijie. Electrical wave transmission between stock and scion [J]. *Acta Phytophysiol Sin*, 1995, **21** (4): 386 – 392.



## 浙江林学院与安徽省林业厅合作共建毛竹科技示范园区

2009年5月21日, 浙江林学院与安徽省林业厅合作共建毛竹科技示范园, 实施“毛竹林效益翻番工程”签约仪式在安徽省林业厅举行。浙江林学院院长周国模、副校长方伟, 科技处、竹类研究所相关人员参加了签约仪式。

方伟代表学校与安徽省林业厅签订了院厅共建科技示范园区协议。安徽省林业厅韩柏泉厅长指出, 大力发展竹产业是安徽省提升森林质量、兴林富民的重要内容, 对浙江林学院支持安徽竹产业发展表示感谢, 并就此次合作提出了希望和建议。周国模表示, 浙江林学院凭借自身的师资力量和科研条件, 有能力为周边省市的农林产业经济发展提供先进的科技成果。

竹类研究所还与宁国市、广德县、黄山区、霍山县等签订了具体的共建合作协议。签约仪式结束后, 方伟带领竹类研究所的专家赴安徽省霍山县开展竹子园区的实地踏勘选点等工作。

余学军