

# 白菜离体春化相关基因表达的 cDNA-AFLP 分析

孙保娟<sup>1,2</sup> 曹家树<sup>1\*</sup> 黄细松<sup>1</sup> 余小林<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学蔬菜研究所, 浙江杭州 310029; <sup>2</sup> 广东省农业科学院蔬菜研究所, 广东广州 510640)

**摘要:** 借助 cDNA-AFLP 技术分离到 15 个与白菜离体春化反应相关的表达序列标签 (EST)。Blast 结果表明: 低温春化处理抑制性表达的 12 个 EST, 多与异化作用相关基因同源性较高; 春化诱导表达的 3 个 EST, 分别与编码核糖体蛋白的亚基 (或与自主开花途径相关的 FAC 基因连锁的因子), ATPase 的亚基, 小 G-蛋白亚基的基因同源性较高。

**关键词:** 白菜; 春化; 离体; 基因; cDNA-AFLP

**中图分类号:** S 634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 06-1341-04

## cDNA-AFLP Analysis on Genes Associated with Vernalization in Vitro in *Brassica campestris ssp. chinensis*

Sun Baojuan<sup>1,2</sup>, Cao Jiashu<sup>1\*</sup>, Huang Xisong<sup>1</sup>, and Yu Xiaolin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China; <sup>2</sup> Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

**Abstract:** Fifteen ESTs associated with vernalization in vitro of Chinese cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino) were isolated by cDNA-AFLP. Blast results showed that 12 ESTs down-regulated by vernalization had high similarity to genes encoding enzymes involved in the dissimilation. 3 ESTs up-regulated had high similarity to genes with positive effect on vernalization, including ribosomal protein subunit related to the synthesis of protein or the linkage factor of FAC involved in auto flowering pathway, the subunit of ATPase, and the subunit of small-G protein.

**Key words:** Chinese cabbage-pak-choi; *Brassica campestris* ssp. *chinensis*; Vernalization; In vitro; Gene; cDNA-AFLP

## 1 目的、材料与方法

白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 生态类型丰富, 对二年生白菜春化诱导成花转变机制的研究具有重要的意义。基于春化作用过程中重要基因转录的程序化改变的观点, 通过差异筛选和差异显示策略, 种康等<sup>[1]</sup>在冬小麦上克隆了一系列春化作用相关的基因, 这为白菜春化作用研究提供了很好的借鉴。在离体条件下进行不同时间的低温处理, 借助 cDNA-AFLP 技术分离白菜春化作用相关基因, 将为从分子水平上对白菜等芸薹属蔬菜进行成花调控奠定基础。

采用“未春化—春化—脱春化”模式研究白菜不定芽离体春化中差异表达的基因, 用 5~4 d 处理消除冷适应特异表达的基因。‘矮脚黄’白菜可育株再生的不定芽在 MS + 2%蔗糖 + 0.8%琼脂粉 + 2 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA 的培养基上扩繁。具有 5~6 片叶的不定芽培养 7 d 后, 进行如下处理: (1) 未春化; (2) 5~4 d; (3) 5~28 d; (4) 5~28 d 后, 33~5 d 脱春化。低温处理和高温脱春化在人工气候光照培养箱内进行, 设定 16 h/8 h 的光暗交替。

切取各处理不定芽顶端分生组织 (生长点), 长度约为 0.3 cm, 每处理至少取 60 个, 用于提取

收稿日期: 2006-01-12; 修回日期: 2006-03-27

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目 (2005C12019-02); 国家自然科学基金项目 (30370975)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jshcao@zju.edu.cn)

RNA。总 RNA 的提取、cDNA-AFLP 分析参考王永勤等<sup>[2]</sup>文章,略有改动。春化处理特异表达和缺失的条带回收、克隆后,提供 1 mL 菌液到鼎国公司测序。测序结果通过 NCB I 国际互联网进行 BLAST 分析。RT-PCR 检测,先以肌动蛋白 (ACTN) 引物进行 PCR 扩增,根据琼脂糖凝胶电泳结果,调整不同处理模板 (双链 cDNA) 用量,使亮度一致。不同处理模板用量确定之后,把 ACTN 引物换成不同的片段特异性引物,进行 PCR 扩增。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 离体春化处理差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析

各处理材料的总 RNA 甲醛变性凝胶电泳如图 1-A, 28S、18S 和 5S 条带清晰。cDNA 的第 2 链合成最佳的循环数是 26, 双链 cDNA 合成结果如图 1-B, cDNA 在 0.1~3 kb 之间形成 Smear, 说明合成的双链 cDNA 质量较好。

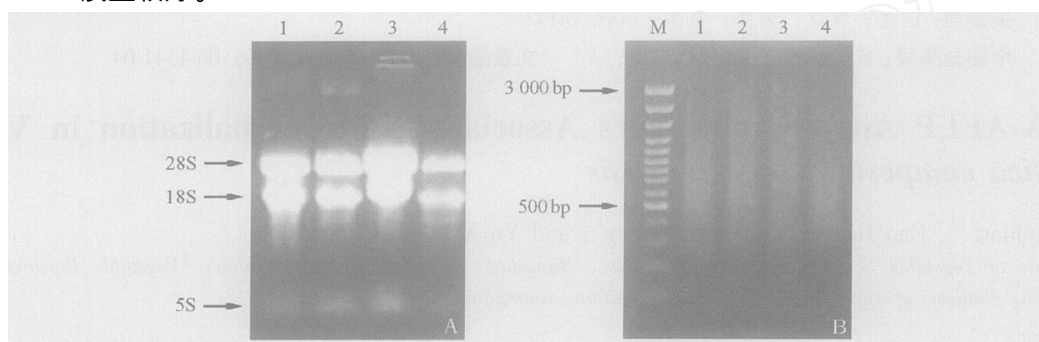


图 1 白菜 ‘矮脚黄 ZUB97-01AB’ 不同时间低温处理的不定芽 RNA (A) 及反转录后 dDNA (B) 电泳分析

M: Marker, 1: 未春化处理, 2: 5~4 d, 3: 5~28 d, 4: 脱春化处理。

Fig. 1 Electrophoresis of RNA (A) and dDNA (B) reverse transcribed from total RNA of adventitious shoots of ‘A jiaohuang ZUB97-01AB’ lines with different time low temperature treatment

M: Marker, 1, 2, 3, 4: dDNA of unvernalized, 5~4 d, 5~28 d and devernalized, respectively

利用 256 对引物进行选择扩增, 其中每个处理都有其特异表达的 EST, 最终回收到 3 条春化特有带 (A4T16V, A10I9V, A14T5V) 和其余 12 条春化缺失条带 (图 2)。与未春化、5~4 d 和脱春化处理相比, 春化处理 28 d 后, 很多结构性基因的表达减弱。

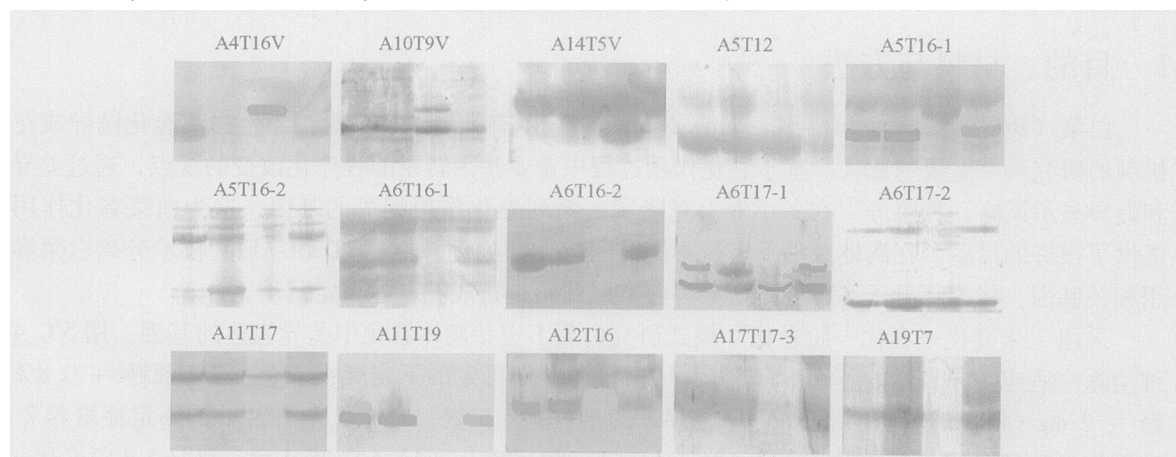


图 2 不同时间低温处理 ‘矮脚黄 ZUB97-01AB’ 白菜离体再生不定芽 cDNA-AFLP 分析获得的差异表达片段

泳道从左到右依次为: 未春化、5~4 d、5~28 d 春化、脱春化 4 个处理。

Fig. 2 Differential expression fragments obtained from cDNA-AFLP analysis on different duration of chill treatments in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*

Lanes from left to right: unvernalized, 5~4 d, 5~28 d vernalized, devernalized

2.2 差异片段测序结果的 BLAST分析及半定量 RT-PCR检验

测序结果通过 NCB 国际互联网进行 BLAST分析 (表 1)。可见，春化后缺失的 EST，一般与水

表 1 差异片段的基本特征

Table 1 The basic characteristics of the differential expression fragments

表达类型 Expression type	片段编号 Fragment code	长度 Length (bp)	同源序列 Sequences of significant alignments	同源性 Identities (%)	最低 E 值 Lowest E value
春化特有 Peculiar to vernalization	A4T16V	167	拟南芥核糖体蛋白基因或 FCA 基因重叠群 <i>Arabidopsis thaliana</i> ribosomal protein gene or FCA gene config	90.06	e-47
	A10T9V	186	萝卜叶绿体 ATP 酶 亚基基因 <i>Raphanus sativus</i> chloroplast gene for ATPase beta subunit	99.46	4e-97
	A14T5V	192	G - 蛋白家族基因 G-protein family gene	22.39	9e-09
春化缺失 Deficient after vernalization	A5T12	206	拟南芥花芽 GSLTfB33ZB04克隆 <i>Arabidopsis thaliana</i> flower buds GSLTfB33ZB04 clone	86.36	1e-41
	A5T16-1	318	半胱氨酸蛋白酶 Cysteine proteinase	90.25	1e-100
	A5T16-2	187	拟南芥细胞周期相关的基因 <i>Arabidopsis thaliana</i> cell cycle-related protein	84.44	7e-34
	A6T16-1	318	半胱氨酸蛋白酶 Cysteine proteinase	90.31	1e-100
	A6T16-2	179	油菜 -1, 4 - 内葡聚糖酶 <i>Brassica napus</i> gene for endo-1, 4-beta-D-glucanase	99.33	3e-73
	A6T17-1	215	蛋白酶体调控部分的亚基 Putative 26S proteasome subunit	90.19	2e-52
	A6T17-2	179	油菜 -1, 4 - 内葡聚糖酶 <i>Brassica napus</i> gene for endo-1, 4-beta-D-glucanase	99.34	7e-74
	A11T17	173	新基因 New gene	23.70	6e-06
	A11T19	184	拟南芥去乙酰化酶基因 <i>Arabidopsis thaliana</i> gene for histone deacetylase	87.88	1e-29
	A12T16	289	拟南芥抗病相关的甜蛋白 <i>Arabidopsis thaliana</i> gene for putative thaumatin protein	86.03	3e-62
	A17T17-3	199	新基因 New gene	11.56	0.033
	A19T7	220	油菜生长素负调控蛋白基因 <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> auxin-repressed protein	98.62	1e-111

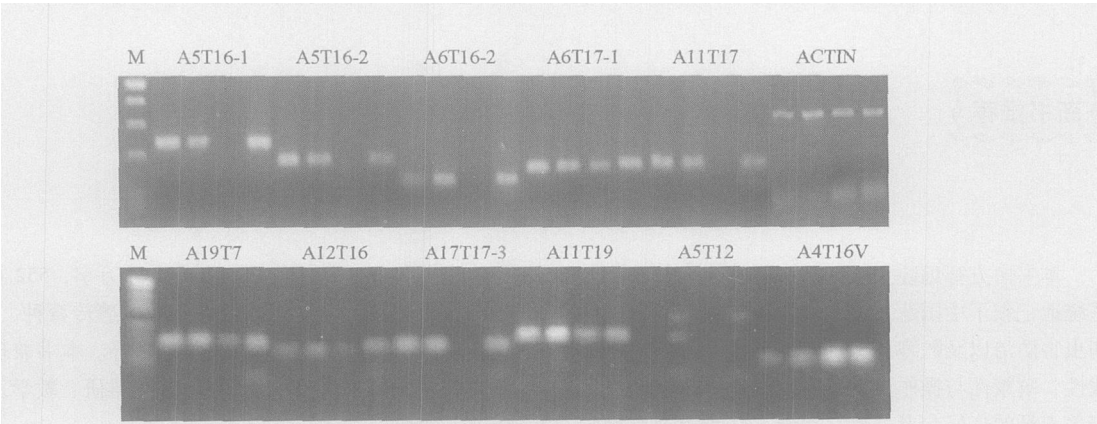


图 3 Actin及差异片段的 RT-PCR检测电泳图

M: Marker (从上至下: 501 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp)。  
每对引物对应的泳道从左到右依次为: 未春化、5 4d 5 28d春化、脱春化 4个处理。

Fig 3 Electrophoresis of RT-PCR for Actin and differential fragments

M: Marker (Up to down: 501 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp).  
Lanes of each pair of primers from left to right: unvernallized, 5 4 d, 5 28 d vernallized, devernallized

解代谢, 或异化代谢相关基因的同源性较高; 春化诱导表达的 EST, 与合成代谢相关基因的同源性较高。

A5T16-1、A5T16-2、A6T16-2、A11T17和 A17T17-3等 5个片段的 RT-PCR 表达模式与 cDNA-AFLP分析结果一致 (图 3); A5T12有所不同; A6T17-1、A19T7、A12T16、A11T9等 4个片段在春化处理的条件下也有扩增, 但表达较弱, 这很可能是由于人肉眼读板将弱表达条带判读为无。春化特异表达的片段 A4T16V在其它 3个处理中也有表达, 但春化处理表达较强, 春化特异表达的条带 A10T9V和 A14T5V在本试验所设计的引物条件下无扩增。

春化过程涉及糖、核酸、蛋白质代谢<sup>[3]</sup>及信号转导途径<sup>[4]</sup>, 因此与这些代谢途径相关基因的去阻遏或阻遏都可能对春化作用产生影响。白菜离体春化后, 受到正调控的基因, 如蛋白合成相关基因 (A4T16V), 光合磷酸化作用相关基因 (A10T9V), 以及信号转导途径相关基因 (A14T5V) 为春化作用的发生提供了物质基础、动力支持和传递途径。受到负调控的基因, 如编码蛋白酶体基因 (A6T17-1) 的低表达, 能够保证低温春化过程中新合成的蛋白质不被泛素—蛋白酶体途径识别而被降解; 去乙酰化酶基因 (A11T19) 的低表达使得一些基因的转录抑制被解除。

## 参考文献:

- 1 Chong K, Tan K H, Huang H L, Liang H G. Molecular cloning and characterization of vernalization-related (ver) genes in winter wheat *Physiologia Plantarum*, 1994, 92: 511 ~ 515
- 2 王永勤, 曹家树, 符庆功, 余小林, 叶毓芝, 向 翥. 利用 cDNA-AFLP技术分析白菜核雄性不育两用系的表达差异. *中国农业科学*, 2003, 36 (5): 557 ~ 560  
Wang Y Q, Cao J S, Fu Q G, Yu X L, Ye W Z, Xiang X. Differential expression analysis of genic male sterility A/B lines by cDNA-AFLP in Chinese cabbage-pak-choi (*B. missica campestris* ssp. *chinensis* Makino). *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36 (5): 557 ~ 560 (in Chinese)
- 3 谭克辉, 王宏文, 何希文, 李守全. 代谢抑制剂对冬小麦春化过程的影响. *植物学报*, 1981, 23 (5): 371 ~ 376  
Tan K H, Wang H W, He X W, Li S Q. Effect of metabolic inhibitors on vernalization process in winter wheat *Acta Botanica Sinica*, 1981, 23 (5): 371 ~ 376 (in Chinese)
- 4 Xu Y Y, Chong K, Xu Z H, Tan K H. Expression patterns of a vernalization-related genes responding to jasmonate. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43 (8): 871 ~ 873

## 新书推荐

## 《蔬菜学》

本书由方智远院士主编, 江苏科学技术出版社出版发行。全书共分 7 大章, 33 个小题, 44 万字, 552 页, 本书系统地记叙了中国蔬菜学发展的历史轨迹、学术成就; 比较全面地论述了蔬菜作物种质资源、遗传育种、栽培技术、病虫害防治以及贮藏加工等各个专业的性质、研究内容; 简述了 21 世纪中国蔬菜学的发展趋势。本书兼理论性与实践性、政策性与操作性于一体, 有利于读者更加深入地了解蔬菜学, 研究蔬菜学, 是从事蔬菜科研、教学及生产实践有关人员的良好参考书籍。定价: 47 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所 《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。