

# ‘短柄樱桃’花芽休眠解除过程中差异表达基因的研究

李永强, 赵腮宝, 倪开诚, 陈文荣, 辛德东, 郭卫东\*

(浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004)

**摘要:** 以中国樱桃的优良品种‘短柄樱桃’(*Prunus pseudocerasus* Lindl. ‘Duanbing’)的花芽为材料, 采用 mRNA 差异显示技术, 分析休眠解除的过程中相关差异表达基因。共克隆获得 79 个差异 cDNA 片段; 通过半定量 RT-PCR 验证, 确定 18 个阳性差异 cDNA 片段为休眠解除相关候选基因; 休眠解除过程中上调的基因片段 11 个, 下调的 7 个。测序及同源性比对结果显示: 差异表达基因主要参与糖代谢、信号转导、跨膜转运及氧化还原等反应过程。这些基因在‘短柄樱桃’休眠解除阶段可能起到直接或间接的作用。

**关键词:** 中国樱桃; 休眠; 基因; mRNA 差异显示技术; 半定量 RT-PCR

**中图分类号:** S 662.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 07-1253-10

## Studies on Differentially Expressed Genes in Flower Bud During Dormancy Release in *Prunus pseudocerasus* Lindl. ‘Duanbing’

LI Yong-qiang, ZHAO Sai-bao, NI Kai-cheng, CHEN Wen-rong, XIN De-dong, and GUO Wei-dong\*  
(College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

**Abstract:** The mRNA differential display technique (DDRT) was used to identify the differentially expressed cDNA fragments during chilling-induced release of dormancy in buds of *Prunus pseudocerasus* Lindl. ‘Duanbing’. Seventy-nine differentially expressed fragments were initially identified by DDRT, and among which, 18 of them were confirmed as true differentially expressed genes using semi-quantitative RT-PCR. Out of these 18 differentially expressed genes, 11 were up-regulated and 7 were down-regulated, respectively, during the release of dormancy. Gene ontology analysis indicated that the differentially expressed genes are mostly involved in the processes of glycometabolism, signal transduction, trans-membrane transport, and oxidation-reduction reactions. The results suggest that these genes may somehow contribute to the release of dormancy, either directly or indirectly, in *Prunus pseudocerasus* Lindl. ‘Duanbing’.

**Key words:** *Prunus pseudocerasus*; dormancy; gene; mRNA differential display; semi-quantitative RT-PCR

收稿日期: 2012-03-07; 修回日期: 2012-06-15

基金项目: 浙江省科技重大专项 (2007C12021); 浙江省科技计划公益技术研究项目 (2010C32041); 浙江省重点科技创新团队项目 (2011R09033-06)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gwd@zjnu.cn)

‘短柄樱桃’ (*Prunus pseudocerasus* Lindl. ‘Duanbing’) 是中国樱桃的优良品种之一, 主产于浙江, 自花结实性好, 早果, 丰产, 适应性强, 果实相对较大, 成熟期早而集中, 不仅可作为重点推广品种, 也是优良的育种材料。

季节周期性的生长和休眠是多年生植物的独特特征, 芽休眠的打破往往取决于有效低温的积累, 只有满足需冷量才能保证在春季适宜条件下顺利萌发 (高东升 等, 2002)。国内外关于芽休眠的生理研究表明, 激素含量变化、氧化胁迫、钙信号及碳水化合物代谢在休眠解除过程中起重要作用 (Pacey et al., 2003; 段成国 等, 2004; 王海波 等, 2006; Tattershall et al., 2007; Mathiason et al., 2009)。关于休眠解除机制在分子水平上在很大程度上还是未知的。现今休眠解除的分子机制研究主要集中在激素、水分状态、核酸修饰、光信号调控的分子机制上 (Maurel, 1997; Fennell & Line, 2001; Law & Suttle, 2002; Schrader et al., 2004)。差异显示反转录 PCR (differential display reverse transcription PCR, DDRT-PCR) 是由美国 Dena-Farb 癌症研究所两名科学家 (Liang & Pardee, 1992) 发明的。其为差异表达基因的筛选提供了一种快速且技术简单的鉴定方法, 该技术已经在植物生长发育、植物抗性机理、激素调控等多个领域的差异表达基因方面得到了广泛的应用 (Knaap & Knende, 1995; Sage et al., 1998; Carginale et al., 2004)。

本试验中以‘短柄樱桃’为试材, 研究休眠解除过程中差异表达的基因片段并分析其功能, 为了解芽休眠解除的分子机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2007—2009 年每年 11 月份开始至次年 1 月, 每隔 7 d 左右分别采集生长势较为一致‘短柄樱桃’带花芽枝条 10~15 个, 剪平枝条基部, 放入盛有清水的小桶中, 在人工气候室中培养。培养条件: 昼/夜温度 25/20 °C, 光照强度 100 mmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照周期 14 h/10 h (光/暗), 相对湿度 70%。每隔 2 d 换 1 次水, 换水同时剪去枝条基部少许 (约 1 cm) 露出新茬, 培养 4 周, 观察统计萌芽开花状况。以花芽明显膨大, 鳞片松动, 露绿较多为萌发标准, 统计萌发百分率, 以确定花芽所处的休眠状态。

根据萌芽率统计结果, 选择深度休眠期 (花芽萌芽率最低, 采样日期 11 月 26 日), 休眠解除期 (花芽萌芽率 > 50%, 采样时间 12 月 23 日) 和萌发期 (花芽萌芽率接近 100%, 采样时间 1 月 7 日) 的花芽, 液氮速冻后在 -80 °C 冰箱中冷冻保存, 用于后续的差显表达试验。

### 1.2 DDRT-PCR 分析

差显引物 (表 1) 为 mRNA 差异显示第 3 代引物, 购自 GenHunter 公司。采用 CTAB 法提取总 RNA, 并采用 Oligotex<sup>TM</sup>-d(T)<sub>30</sub> < Super > mRNA 纯化试剂盒 (TaKaRa) 对提取的总 RNA 进行 mRNA 纯化。

每个采样时间点的花芽 mRNA 分别用 3 种锚定引物 H-(T)11G、H-(T)11C 和 H-(T)11A (表 1) 按照 Invitrogen superscript<sup>TM</sup> III 反转录试剂盒 (Invitrogen) 进行反转录得到 cDNA。

将 3 个锚定引物和 8 个随机引物 (表 1) 的 24 个组合分别进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系中含 10 × Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 2.0 μL, 2 μmol·L<sup>-1</sup> 锚定引物和随机引物各 2.0 μL, 1 U Taq DNA 聚合酶, 以及 2 μL cDNA 模板溶液, 加无菌超纯水补足总体积。反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 38~42 °C 退火温度范围内退火 40 s, 72 °C 延伸 50 s, 40 个循环; 72 °C 下延伸 5 min。

4 ℃ 保存。PCR 仪为 Bio-Rad My Cycler。

采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离差异片段, 银染显色。对于可反复出现、大小在 100 bp 以上的差异条带进行回收。操作步骤参照 Biospin 聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒操作方法。

以回收的差异条带 (cDNA) 为模板, 用原引物组合对其进行重扩增, 扩增条件相同。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳确认, 对条带清晰、大小相符的差异片段用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (Sangon) 回收、纯化。

表 1 锚定, 随机及 Actin 引物列表  
Table 1 List of anchored, random and Actin primers sequence

引物 Primer	名称 Name	引物序列 (5' - 3') Primers sequence (5' - 3')
锚定引物 Anchored primer	H-(T) <sub>11</sub> G	AAGCTTTTTTTTTTTG
	H-(T) <sub>11</sub> A	AAGCTTTTTTTTTTTA
	H-(T) <sub>11</sub> C	AAGCTTTTTTTTTTTC
随机引物 Random primer	H-AP1	AAGCTTGATTGCC
	H-AP2	AAGCTTCGACTGT
	H-AP3	AAGCTTTGGTCAG
	H-AP4	AAGCTTCTCAACG
	H-AP5	AAGCTTAGTAGGC
	H-AP6	AAGCTTGCACCAT
	H-AP7	AAGCTTAACGAGG
	H-AP8	AAGCTTTTACCGC
内参引物 Actin primer	Actin (sense)	AGATGACGCAGATTATGTTTGA
	Actin (anti-sense)	CAATGAGTGATGTTGGAAGAG

### 1.3 差异 cDNA 片段的克隆与序列分析

采用感受态细胞制备试剂盒 (TaKaRa) 制备感受态细胞。选用 pMD18-T Simple Vector (TaKaRa) 作为克隆载体进行目的 DNA 片段克隆。

差异 cDNA 片段测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。差异片段序列通过 BLASTX Uniprot 蛋白质数据库获得 GO 功能分类信息。然后用同源序列的蛋白序列号查询 “goa\_uniprot” 文件, 获取 Gene ontology 功能分类信息, 所得的序列按照分子功能进行分类。同时, 在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 ESTree (<http://www.itb.cnr.it/estree/>) 上, 利用 BLAST 在线分析工具将测序结果进行序列同源性比较分析。

### 1.4 半定量 RT-PCR 分析与验证

根据 Blast 结果, 选择功能明确的差异片段, Primer Premier 5.0 设计引物, 以 cDNA 为模板, 设置不同循环次数, 用不同引物对和内标引物进行 PCR 扩增, 确定合适的条件, 保证扩增均处于线性期。PCR 反应产物的检测, 取扩增产物在含溴化乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳结果在紫外灯下用 Bio-red 公司成像系统自带 Quantity One 软件进行扫描成像和光密度分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 mRNA 差异显示结果

分别以 ‘短柄樱桃’ 花芽深度休眠期、休眠解除期和萌发期的总 RNA 为模板, 用 3 种锚定引物 H-T11G、H-T11C 和 H-T11A 进行逆转录反应, 得到 9 种 mRNA 亚群的 cDNA。再以这些 cDNA

为模板, 与 8 种随机引物 (H-AP1 ~ H-AP8) 组合进行 PCR 扩增。用相同的引物组合进行 3 个时期扩增产物的差异比较。扩增结果显示, 扩增条带大小在 100 ~ 2 000 bp 之间, 扩增片段的分离结果见图 1 (箭头示差异条带)。

比对 3 个阶段 cDNA 扩增结果, 分离得到在‘短柄樱桃’花芽休眠解除阶段差异表达的 cDNA 片段, 对其中 79 条差异 cDNA 片段完成了克隆和测序。

根据测序结果, 与 Uniprot 蛋白质数据库进行 BLASTX 分析, 发现有功能注释的有 63 条, 其中匹配性较高 ( $E\text{-value} < 0.001$ ) 的 44 条;  $E\text{-value} \geq 0.001$  的 19 条; 没有任何匹配的片段定义为 null, 一共有 16 条, 这些有可能是‘短柄樱桃’新的基因或是没有在数据库中注释的其他植物基因, 也有可能是由于序列中没有包含编码序列以至无法根据同源性进行注释。

对  $E\text{-value} < 0.001$  的功能比较可靠的片段按其分子功能进行 Gene ontology 功能分类, 44 条差异片段可分为, 抗氧化活性, 分子传导, 结构分子, 转录调节活性, 翻译调节活性, 运输活性, 酶活性和结合物等, 共 8 大类别, 其蛋白功能主要为结合物活性或是酶活性的两类, 分别占 47.72% 和 56.82%。

对这两大类进行进一步的功能分析发现, 酶活性中水解酶活性的比例最多, 有 13 个, 其次是转移酶活性有 7 个, 另外还有 3 个具有氧化还原酶活性, 1 个具有裂解酶活性; 结合物活性中主要为具核酸、核苷和离子束缚活性的功能蛋白, 分别有 10 个、9 个和 9 个, 其次是蛋白结合功能的有 5 个, 另外辅因子结合和脂质结合物各有 1 个。

## 2.2 半定量分析结果

### 2.2.1 半定量 RT-PCR 循环数的确定

半定量 RT-PCR 是通过调整每个反转录产物即 PCR 模板的量使内标基因产量一致, 来确定 PCR 过程中模板的用量, 以确保不同批次反转录的 cDNA 的量相同。cDNA 量相同, 即可通过 PCR 扩增结果判断该目的基因在不同阶段表达量的差异。在 PCR 扩增对数期, 模板量与扩增产量成正比, 而在 PCR 扩增后期其产量将不随模板量增加而增加。

如图 2 所示, *Actin* 基因在 22 个循环时开始出现, 在 32 个循环时达到平台期, 从 24 ~ 32 阶段

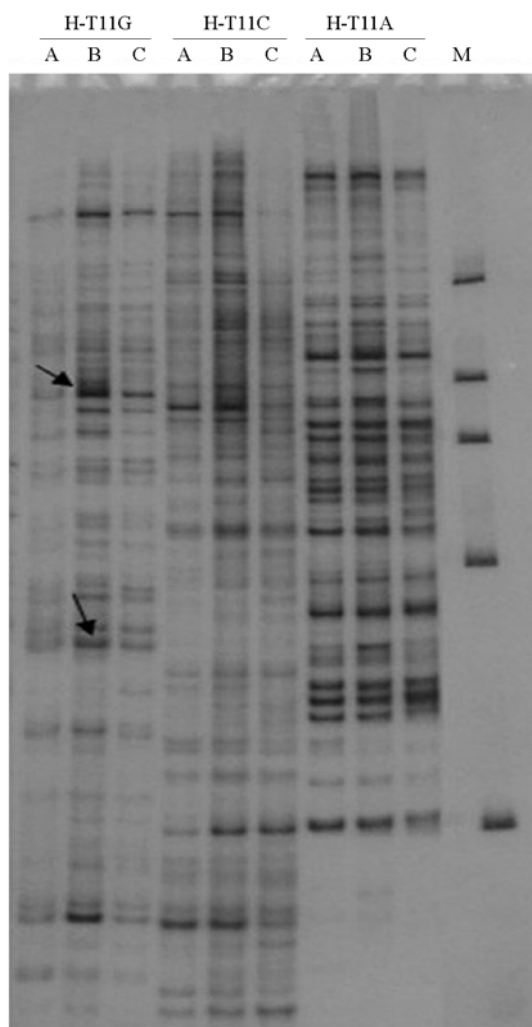


图 1 DDRT-PCR 扩增结果 (随机引物 H-AP1)

A: 深度休眠期; B: 休眠解除期; C: 萌发期; H-T11G、H-T11C 和 H-T11A: 3 种锚定引物。箭头所示为差异片段; M: Marker。

Fig. 1 A typical result of DDRT-PCR amplification (Random primer H-AP1)

A: Endo-dormancy period; B: Dormancy-releasing period; C: Germination period; H-T11G, H-T11C and H-T11A: Three anchor primers. Arrow as differentially expressed fragments; M: Marker.

都为对数增长期，在对数期内选择的循环数不能太低，故选择内标的循环数为 30。依据上述方法确定差异片段的 RT-PCR 的扩增条件，包括引物的序列、退火温度及 PCR 反应的循环数见表 2。

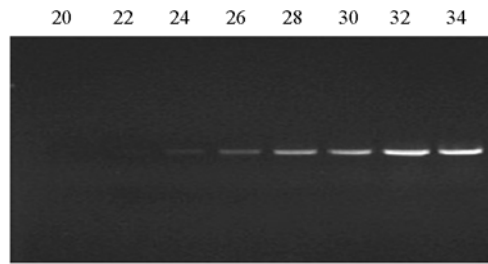


图 2 *Actin* 不同循环数的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification results of *Actin* at different cycle number

表 2 差异片段半定量 RT-PCR 反应的引物序列、退火温度及反应循环数

Table 2 Primer sequences, annealing temperature and cycle number in Semi-quantitative RT-PCR of differential fragments

片段名称 Fragment names	上游引物序列 (5' - 3') Upstream primer (5' - 3')	下游引物序列 (5' - 3') Downstream primer (5' - 3')	退火温度/ °C Annealing temperature	循环数 Recurring number
7-3	CTTGGCTCTGTTCTTCCTTTCC	AGCTTGATTGCCCTCTGTTAG	60	30
7-16	AAACCCCAAATGCTGAAGAAC	CTTTGAGAAGGCGGAGAGATG	60	30
6-13	CTCACTGAAAGGGTGGAAGAC	GCTCACAAGCTGCTAAGACATAC	55	30
7-18	TAGACCACTTCACATTCCAGA	GACCAACCTTGCCATCATCTAT	55	32
8	AGTGGGAGGAAGTGCTGCTAAA	ACAGAAGTTTCACTTATTTGGT	60	28
G19	TGGAGGCTCACCAGATTCCGATGC	TTCTTCACATGAATATGGCACT	60	30
4	ACTTTCTGTGGCTGTGGGTCT	AGTCTTCTGCCTCAATGGTCTAAT	60	34
5	TTTTGGCAAGGTCTGTAATCAT	GTCCAGTGAAGGCGGCTTTGTT	55	30
7-10	ATTATTGTTACGCCGACCACCA	TCTGACCCAAATTGAGCAAAGG	60	30
C19	TCAGCAAGCCACCATAAAACCA	TTTCCATCAATTTGTCCACTA	60	30
7-1	TTGAAGAATGGAGATGCTGGTA	CGCACAGCTCCTCTACAACCCT	55	32
G12	ACAACCTTGGCAAAGACCACCGTGAC	ACATCTCCCATATCAAGCTCAC	60	28
G20	GTCAACATCATCTCCCCATCG	CAAAACAACAAATTACGACAGA	55	32
C13	GTTGATGAGATTCTACCCTGCTT	CATTGGTGCCGTCCATGCGTTA	55	30
C17	TTTGGTCAGTGAGGCAAGGAAG	AACATTCTTTACCCAATCTCCA	55	34
C20	ACTTCAAGGTTTCTGGAGGGGATG	TTTTCAAACAGCACAGACTAC	60	30
C16	CAACAGAAGACAATCGCAGGAC	CAGAAATGCCTGAACTGTAAATC	55	30
3	AATCCAATCCCGCAACATACCA	TGCTGAAGCCTCTACAATAAG	55	30

### 2.2.2 半定量 RT-PCR 验证的差异 cDNA 片段

根据半定量 RT-PCR 扩增结果，将表达差异片段与 DDRT-PCR 结果一致的片段定义为阳性差异片段。通过验证，共得到 18 个阳性差异表达 cDNA 片段，作为休眠解除过程中相关的候选基因。

上述阳性差异 cDNA 片段，根据其在休眠解除过程的表达量不同，大体分为上调基因片段和下调基因片段。休眠解除阶段上调的 cDNA 片段一共有 11 个（图 3）。

这些上调片段在 3 个阶段的表达模式可以分为随休眠解除表达逐渐上调（如 7-3、7-16、6-13、7-1、7-18、8、7-10、G19、4、5）和休眠解除时上调表达（如 C19）。这些上调的差异 cDNA 片段功能同源性比对和功能分类见表 3，其中多为编码水解酶或转移酶活性的基因。

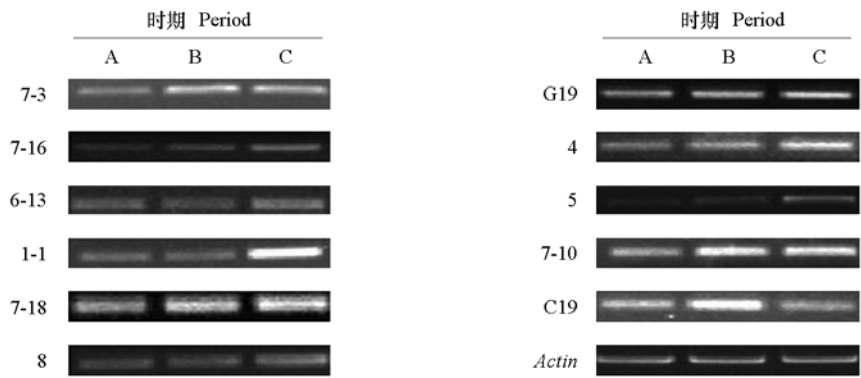


图 3 上调 cDNA 片段半定量 RT-PCR 结果

*Actin* 为内标。A: 深度休眠期; B: 休眠解除期; C: 萌发期。

Fig. 3 Semi-quantitative RT-PCR results of up-regulated cDNA fragments

*Actin* as the internal standard. A: Endo-dormancy period; B: Dormancy-releasing period; C: Germination period.

表 3 休眠解除过程中上调 cDNA 片段的功能

Table 3 Function of up-regulated cDNA fragments during the release of dormancy

片段名称 Fragment names	蛋白功能 Protein function	E-value	相似性/% Similarity	功能类别 Functional categories
7-3	40S 核糖体蛋白 40S ribosomal protein	4E-59	90	核苷结合物 Nucleoside combo
7-16	30S 核糖体蛋白 30S ribosomal protein	8E-76	96	核苷结合物 Nucleoside combo
8	颗粒结合淀粉合成酶 (GBSS) Granule-bound starch synthase	3E-17	70	转移酶 Transferase
G19	亮氨酸重复序列 (LRR) 蛋白激酶 Leucine rich repeat protein kinase	1E-15	50	分子传导/转移酶 Molecular conduction/transferase
5	短链脱氢/还原酶 (SDR) 2 Short chain dehydrogenase/reductase 2	0.001	48	氧化还原酶 Oxidoreductase
7-10	ATP 合成酶 $\alpha$ 亚基 ATP synthase alpha subunit	e-133	98	转录调节/水解酶 Transcription regulation/hydrolase
7-1	延伸因子 1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ ) Elongation factor-1	2E-41	93	翻译调节/水解酶 Translation regulation/hydrolase
6-13	蛋白酶体 $\alpha$ 亚基 Proteasome subunit alpha	4E-55	74	水解酶 Hydrolase
7-18	1,4 - $\alpha$ - 葡聚糖分支酶 1,4-alpha-glucan branching enzyme	2E-19	83	水解酶/转移酶 Hydrolase/transferase
4	肽链内切酶 Endopeptidase	2E-07	31	水解酶 Hydrolase
C19	尿苷二磷酸葡萄糖醛酸脱羧酶 Uridine diphosphate glucose decarboxylase	0.002	85	裂解酶 Lyase

在休眠阶段表达量较高，而随休眠解除表达量下降的差异 cDNA 片段共有 7 个（图 4）。下调 cDNA 片段的表达模式可以分为随休眠解除在萌发才表现为下调（G20、G12、C16 和 C17）和随休

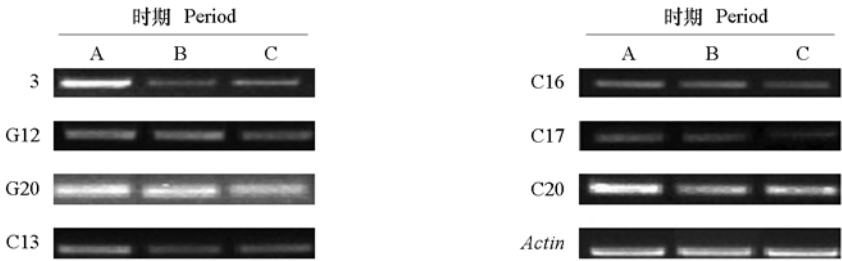


图 4 下调 cDNA 片段的半定量 RT-PCR 结果

*Actin* 为内标。A: 深度休眠期; B: 休眠解除期; C: 萌发期。

Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR results of down-regulated cDNA fragments

*Actin* as the internal standard. A: Endo-dormancy period; B: Dormancy-releasing period; C: Germination period.

眠解除而下调，在萌发期又有表达增加的趋势（C20、C13 和 3）。下调的差异 cDNA 片段功能其同源性比对和功能分类结果见表 4，其中编码抗氧化酶活性相关的基因最多共有 3 个。

表 4 休眠解除过程中下调的 cDNA 片段的功能

Table 4 Function of down-regulated cDNA fragments during the release of dormancy

片段名称 Fragment names	蛋白功能 Protein function	E-value	相似性/% Similarity	功能类别 Functional categories
G12	非特异脂转移蛋白 1 (LTP1) Non-specific lipid transfer proteins 1	3E-41	90	脂质结合物 Lipid combo
G20	脯氨酸富含蛋白 Proline-rich protein	2E-06	77	结构分子 Structure of molecules
C16	锌指蛋白 Zinc finger protein	0.01	50	核酸结合物 Nucleic acid conjugates
C17	$\gamma$ -谷氨酰水解酶 Gamma-glutamyl hydrolase	1E-14	80	水解酶 Hydrolase
3	NADH 脱氢酶 $\beta$ 复合体亚基 NADH dehydrogenase $\beta$ subcomplex	0.0002	29	氧化还原酶 Oxidoreductase
C20	Peroxiredoxin-2F	2E-09	75	抗氧化活性/氧化还原酶 Antioxidant activity/Oxidoreductase
C13	核氧化还原蛋白 (NXN) Nucleus redox proteins	1E-23	47	抗氧化活性/氧化还原酶 Antioxidant activity/Oxidoreductase

### 3 讨论

本研究中采用 mRNA 差异显示技术 (DDRT-PCR)，使用 3 个锚定和 8 个随机引物的 24 个组合，对‘短柄樱桃’3 个不同休眠时期的 cDNA 进行扩增，获得数千条片段，从中比较分析得到差异 cDNA 片段，并对 79 个拟定的差异表达的 cDNA 片段进行克隆、测序和功能分析。同时，DDRT-PCR 往往存在一些假阳性结果 (Zegzouti et al., 1997)。因此，本研究中应用半定量 RT-PCR 对 mRNA 差异显示技术筛选的结果进行验证，只有半定量 RT-PCR 扩增结果与 mRNA 差异显示技术变化趋势一致的差异片段才确定为休眠解除过程中差异表达的阳性片段，验证得到 18 个阳性差异 cDNA 片段作为休眠解除相关的候选基因。

#### 3.1 糖代谢相关基因与休眠解除

在‘短柄樱桃’花芽休眠解除过程中，与糖代谢相关的候选基因片段有 C19，7-10，7-18 和 8，序列分别同源尿苷二磷酸葡萄糖醛酸脱羧酶、ATP 合成酶  $\alpha$  亚基、1,4- $\alpha$ -葡聚糖分支酶和颗粒结合淀粉合成酶 (GBSS)。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸脱羧酶是一种和核糖代谢相关的酶，其表达量在萌芽率大于 50% 的休眠解除期显著增加。Dornelas 等 (2007) 分析橙 (*Citrus sinensis*) 花器官特异表达的基因时首次报道编码该酶基因的 EST。该酶的一同族体已经在黄瓜中被证实可能与雄蕊的发育有关，而且在两性和雄性黄瓜花中表达较强，在营养组织和雌花中缺乏转录 (Terefe & Tatlioglu, 2005)。ATP 合成酶  $\alpha$  亚基的表达量在本研究中的 3 个时期呈上升趋势，这直接关系到休眠解除阶段能量代谢的回升 (Gévaudant et al., 2001)。花生种子的休眠打破阶段往往伴随 ATP 的积累 (Perl, 1982)，新生芽中糖类的转运通常依赖  $H^+$ -ATPase 产生的 pH 值梯度 (Améglio et al., 2000)。ATP 合成酶的上调表达将有利于休眠解除时分生组织需要从周围组织中大量吸收糖类物质，以保证芽休眠解除后萌发的需要，这与悬钩子芽休眠解除时  $H^+$ -ATPase 基因也表现上调的报道具有一致性 (Mazzitelli et al., 2007)。7-18 和 8 这两个片段的上调与休眠解除的关系还有待研究。

#### 3.2 信号转导基因与休眠解除

G19 被推断为编码植物类受体蛋白激酶 (receptor-like protein kinase, RLK)。RLK 是一类包含胞外结构域、单次跨膜域和胞内激酶域的蛋白分子，它们通过胞外结构域与胞外信号分子，如离子、

小分子或多肽等的特异结合来激活胞内激酶域的自磷酸化和互磷酸化活性,完成跨膜传递信号的功能(马媛媛等,2005)。最近的研究发现,拟南芥 LRR 型类受体激酶所介导的胞间信号调控着细胞增殖与器官生长(Shpak et al., 2004)。因而,樱桃休眠解除过程中 G19 可能起到重要的信号转导作用,LRR-RLK 介导的信号转导途径目前还不是很清楚,但典型的亮氨酸拉链结构,提示了其信号分子可能会以肽类物质为主(马媛媛等,2005)。

### 3.3 核酸结合蛋白基因与休眠解除

在转录调节中,下调的差异片段 C16 被推测为编码锌指蛋白,在休眠阶段其表达量较高。锌指蛋白能与某些 RNA/DNA 结合,具有选择性的结合特异的靶结构使锌指蛋白在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用(Laity et al., 2001; 田路明等,2005)。Mazzitelli 等(2007)在研究中发现了悬钩子休眠阶段锌指蛋白表达量较高,并随着休眠解除而下降。He 和 Gan(2004)在拟南芥种子中分离鉴定了休眠相关的锌指蛋白基因(MARD1),其受 ABA 诱导上调。

7-1 序列同源于延伸因子 1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* )。EF-1 $\alpha$  具有翻译调节活性,在休眠解除阶段表达上调,说明了‘短柄樱桃’花芽转录水平在休眠解除阶段的提高。差异表达片段 7-3 和 7-16 分别编码两种核糖体的结构蛋白,在休眠解除过程中也呈上调表达。Toorop 等(2005)对拟南芥的研究中发现两种核糖体蛋白在满足萌发的条件下的种子中表达量受到上调。苹果花芽休眠解除过程中总核糖体的数量大约增加了 4 倍(Li et al., 1989)。这些结果均表明,休眠的解除意味着大量核糖体蛋白的合成,以适应新芽的蛋白质及生物量增加。

### 3.4 氧化还原酶基因与休眠解除

差异片段 C13、C20、3 和 5 分别编码核氧化还原蛋白(NXN)、Peroxioredoxin-2F、NADH 脱氢酶  $\beta$  复合体亚基和短链脱氢/还原酶(SDR) 2。其中除片段 5 之外,其他 3 个片段都在休眠解除时表现为下调,在萌芽率继续增加的阶段表达量又略有回升。Peroxioredoxin 蛋白是新近发现的一类过氧化物酶,除了在清除活性氧中具有重要作用外,还具有其它的功能:如细胞增殖与分化、细胞信号转导及保护其它蛋白的氧化等(章波等,2004)。NADH 脱氢酶是植物呼吸链的组成成分,在能量传递途径中将电子从 NADH 传递到辅酶 Q, NADH 脱氢酶表达量的变化表明休眠解除这一生理过程伴随着能量代谢的起伏变化。C13、C20 和 3 这 3 个编码抗氧化酶相关的 cDNA 片段表达量下降,说明在‘短柄樱桃’花芽解除休眠的过程也伴随着抗氧化酶活性的降低,这引起活性氧活动的增强,将有利于活性氧作为信号分子诱导休眠的解除。在香橼(Tessitori et al., 2007)及葡萄(Pérez & Lira, 2005)的休眠解除中亦发现相似的结果。

### 3.5 休眠解除中其他功能基因的表达

差异表达的基因有些还涉及休眠阶段发育的过程,或是与抗逆相关。G12 为编码非特异脂转移蛋白(nsLTP)的基因。非特异性脂转运蛋白是一类对细菌、真菌等微生物有抑制或杀灭作用的蛋白质,具有一定的抗逆作用(汪少芸等,2004)。片段 4 被推断为肽链内切酶基因,6-13 被推断为编码蛋白酶体  $\alpha$  亚基基因,是蛋白酶体(Proteasome)的 20S 核心结构的成分,与细胞的 DNA 修复、胚胎形成、转录调节、细胞程序性凋亡等细胞生理过程关系密切(Jiang & Ma, 2003; Dhanaraj et al., 2007)。C17 被推测编码  $\gamma$ -谷氨酰水解酶(Gamma-glutamyl hydrolase, GGH)的基因。GGH 具有肽链内切酶活性。Huangpu 等(1996)在大豆的研究中发现 GGH cDNA 只在幼嫩(1~15 d)叶、茎和根组织中表达,因此表达受发育过程控制,该蛋白在叶酸新陈代谢中起重要作用。差异片段 G20 编码脯氨酸富含蛋白(PRP),PRP 是植物细胞壁主要组成蛋白之一,PRPs 基因表达对环境



因素敏感, 如病菌感染, 伤害及干旱等 (Bradley et al., 1992; Brisson et al., 1994)。

## References

- Améglio T, Guillot A, Lacointe A, Julien J L, Alves G, Valentin V, Petel G. 2000. Water relations in winter: Effect on bud break of walnut tree// Viémond J D, Crabbé J. Dormancy in plants: From whole plant behavior to cellular control. Wallingford, UK: CAB International: 109 – 120.
- Bradley D J, Kjellbom P, Lamb C J. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell*, 70 (1): 21 – 30.
- Brisson L F, Tenhaken R, Lamb C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, 6 (12): 1703 – 1712.
- Carginalo V, Maria G, Capasso C, Lonata E, La C F, Pastore M, Bertaccini A, Capasso A. 2004. Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display. *Gene*, 332: 29 – 34.
- Dhanaraj A L, Alkharouf N W, Beard H S, Chouikha I B, Matthews B F, Wei H, Arora R, Rowland L J. 2007. Major differences observed in transcript profiles of blueberry during cold acclimation under field and cold room conditions. *Planta*, 225: 735 – 751.
- Dornelas M C, Boscariol Camargo R L, Berger I J, Takita M A. 2007. Towards the identification of flower-specific genes in *Citrus* spp. *Genetics and Molecular Biology*, 30 (3): 761 – 768.
- Duan Cheng-guo, Li Xian-li, Gao Dong-sheng, Liu Huan-fang, Li Meng. 2004. Effects of removing scales and exogenous hormone treatments on changes of endogenous hormone in sweet cherry flower buds and dormancy release during dormancy. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 24 (4): 615 – 620. (in Chinese)
- 段成国, 李宪利, 高东升, 刘焕芳, 李 萌. 2004. 剥鳞和激素处理对大樱桃花芽休眠解除及内源激素变化的影响. *西北植物学报*, 24 (4): 615 – 620.
- Fennell A, Line M J. 2001. Identifying differential tissue response in grape (*Vitis riparia*) during induction of endodormancy using nuclear magnetic resonance imaging. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 681 – 688.
- Gévaudant F, Pétel G, Guillot A. 2001. Differential expression of four members of the H<sup>+</sup>-ATPase gene family during dormancy of vegetative buds of peach trees. *Planta*, 212: 619 – 626.
- Gao Dong-sheng, Shu Huai-rui, Li Xian-li, Chen Xue-sen. 2002. Effect of exogenous plant growth hormones on the changes of carbohydrates in peach bud during dormant period. *Journal of Fruit Science*, 19 (2): 104 – 107. (in Chinese)
- 高东升, 束怀瑞, 李宪利, 陈学森. 2002. 桃自然休眠过程中外源激素对花芽碳水化合物的调控效应. *果树学报*, 19 (2): 104 – 107.
- He Y, Gan S. 2004. A novel zinc-finger protein with a proline-rich domain mediates ABA-regulated seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 54 (1): 1 – 9.
- Huangpu J, Pak J H, Graham M C, Rickle S A, Graham J S. 1996. Purification and molecular analysis of an extracellular  $\gamma$ -glutamyl hydrolase present in young tissues of the soybean plant. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 228 (1): 1 – 6.
- Jiang Y Q, Ma R C. 2003. Generation and analysis of expressed sequence tags from almond (*Prunus dulcis* Mill.) pistils. *Sexual Plant Reproduction*, 16: 197 – 207.
- Knaap E, Knende H. 1995. Identification of gibberellin induced gene in deep water rice using differential display of mRNA. *Plant Molecular Biology*, 28: 589 – 592.
- Laity J H, Lee B M, Wright P E. 2001. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. *Current Opinion Structural Biology*, 11: 39 – 46.
- Law R D, Suttle J C. 2002. Transient decreases in methylation at 5-CCGG-3 sequences in potato (*Solanum tuberosum* L.) meristem DNA during progression of tubers through dormancy precede the resumption of sprout growth. *Plant Molecular Biology*, 51: 437 – 447.
- Li Q B, Liu L H, Liang H G. 1989. Changes in ribosome population and in nucleic acids during breaking of dormancy and development of apple flower buds. *Physiologia Plantarum*, 77 (4): 531 – 536.
- Liang P, Pardee A B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257 (14): 967 – 971.
- Ma Yuan-yuan, Gan Rui, Wang Ning-ning. 2005. Biological functions of leucine-rich repeat class of receptor-like protein kinases in plants. *Journal of*

- Plant Physiology and Molecular Biology, 31 (4): 331 - 339. (in Chinese)
- 马媛媛, 甘 睿, 王宁宁. 2005. 植物富含亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶的生物学功能. 植物生理与分子生物学学报, 31 (4): 331 - 339.
- Mathiason K, He D, Grimplet J, Venkateswari J, Galbraith D W, Fennell A. 2009. Transcript profiling in *Vitis riparia* during chilling requirement fulfilment reveals coordination of gene expression patterns with optimized bud break. Functional & Integrative Genomics, 9: 81 - 96.
- Maurel C. 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 399 - 429.
- Mazzitelli L, Hancock R D, Haupt S, Walker P G, Pont S D, Mcnicol J, Cardle L, Morris J, Viola R, Brennan R, Hedley P E, Taylor M A. 2007. Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds. Journal of Experimental Botany, 58 (5): 1035 - 1045.
- Pacey M T, Scott K, Ablett E, Tingey S, Ching A, Henry R. 2003. Genes associated with the end of dormancy in grapes. Functional & Integrative Genomics, 3: 144 - 152.
- Perl M. 1982. ATP Accumulation in peanut seeds during seed-ripening and during the dormancy-breaking process. Journal of Experimental Botany, 33: 449 - 455.
- Pérez F J, Lira W. 2005. Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. Journal of Plant Physiology, 162 (3): 301 - 308.
- Sage O K, Ono M, Harada H, Kamada H. 1998. Accumulation of a clock-regulated transcript during flower-inductive darkness in *pharbitis* nil. Plant Physiology, 116: 1479 - 1485.
- Schrader J, Moyle R, Bhalerao R, Hertzberg M, Lundeberg J, Nilsson P, Bhalerao R P. 2004. Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the transcriptome. The Plant Journal, 40: 173 - 187.
- Shpak E D, Berthiaume C T, Hill E J, Toril K U. 2004. Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation. Development, 131: 1491 - 1501.
- Tattershall E A, Grimplet J, DeLuc L, Wheatley M D, Vincent D, Osborne C, Ergül A, Lomen E, Blank R R, Schlauch K A, Cushman J C, Cramer G R. 2007. Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. Functional & Integrative Genomics, 7: 317 - 333.
- Terefe D, Tatlioglu T. 2005. Isolation of a partial sequence of a putative nucleotide sugar epimerase, which may involve in stamen development in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Theoretical and Applied Genetics, 111: 1300 - 1307.
- Tessitori M, Maria G, Capasso C, Catara G, Rizza S, De L V, Catara A, Capasso A, Carginale V. 2007. Differential display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by *Citrus viroid* III. Biochimica et Biophysica Acta, 1769: 228 - 235.
- Tian Lu-ming, Huang Cong-lin, Zhang Xiu-hai, Zhang Lu-sheng, Wu Zhong-yi. 2005. Advances of plant zinc finger proteins involved in abiotic stress. Biotechnology Bulletin, 6: 12 - 16. (in Chinese)
- 田路明, 黄丛林, 张秀海, 张璐生, 吴忠义. 2005. 逆境相关植物锌指蛋白的研究进展. 生物技术通报, 6: 12 - 16.
- Toorop P E, Barroco R M, Engler G, Groot S P, Hihorst H W. 2005. Differentially expressed genes associated with dormancy or germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. Planta, 221: 637 - 647.
- Wang Hai-bo, Gao Dong-sheng, Wang Xiao-di, Li Jiang. 2006. Research achievement on bud endodormancy induction in deciduous fruit trees. Journal of Fruit Science, 23 (1): 91 - 95. (in Chinese)
- 王海波, 高东升, 王孝娣, 李 疆. 2006. 落叶果树芽自然休眠诱导的研究进展. 果树学报, 23 (1): 91 - 95.
- Wang Shao-yun, Ye Xiu-yun, Rao Ping-fan. 2004. Research of nonspecific lipid transfer protein (nsLTP) in plant. Bulletin of Biology, 39 (9): 11 - 12. (in Chinese)
- 汪少芸, 叶秀云, 饶平凡. 2004. 植物非特异脂转移蛋白的研究. 生物学通报, 39 (9): 11 - 12.
- Zegzouti H, Marty C, Jones B, Bouquin T, Latche A, Pech J C, Bouzayen M. 1997. Improved screening of cDNAs generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages. Plant Molecular Biology Reporter, 15: 236 - 245.
- Zhang Bo, Xiang Yu-mei, Bai Yun. 2004. The progress of peroxidases peroxiredoxin family. Progress in Physiological Sciences, 35 (4): 352 - 354. (in Chinese)
- 章 波, 向渝梅, 白 云. 2004. 抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 家族研究进展. 生理科学进展, 35 (4): 352 - 354.