

# 枣黄化根蘖苗成因分析

谢南南<sup>1</sup>, 崔明稳<sup>2</sup>, 彭 龙<sup>1</sup>, 赵 锦<sup>1,\*</sup>, 刘孟军<sup>3,\*</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001; <sup>2</sup>衡水学院分院, 河北衡水 053000; <sup>3</sup>河北农业大学中国枣研究中心, 河北保定 071000)

**摘 要:** 为了探究枣黄化根蘖苗的成因, 对其黄化根蘖苗、正常根蘖苗和母株之间的形态学指标、叶绿素及矿质元素含量和相关基因表达水平进行了分析。结果表明, 与正常植株比, 黄化根蘖苗形态学指标没有明显变化, 但叶绿素含量及叶绿素 a/b 比值显著降低, 矿质元素 N、P、K、Mn、Cu、Zn、Fe 含量显著增高, 但 Ca 和 Mg 差异不显著。同时, AFLP 分析表明, 黄化根蘖苗与正常植株在基因组水平没出现显著差异; 但 cDNA-AFLP 和 RT-PCR 分析表明在转录水平上, 黄化根蘖苗中酰基转移酶基因表达增加, Ty3-gypsy 反转录转座子基因和 GAGA 结合转录激活因子基因表达降低。综合分析认为, 枣根蘖苗的黄化可能是与叶绿素合成转录相关的反转录转座子和 GAGA 结合转录激活因子基因表达降低, 影响了叶绿素合成, 使植株最终表现黄化; 同时黄化植株中与光呼吸相关的一些基因, 如酰基转移酶基因表达相应增加以适应这种逆境胁迫, 说明这些基因间存在着相互适应的调控网络。

**关键词:** 枣; 根蘖; 黄化; 叶绿素; 矿质元素; AFLP; cDNA-AFLP; 半定量 RT-PCR

**中图分类号:** S 665.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 10-1919-09

## The Cause of Etiolation of Root Suckers of Chinese Jujube

XIE Nan-nan<sup>1</sup>, CUI Ming-wen<sup>2</sup>, PENG Long<sup>1</sup>, ZHAO Jin<sup>1,\*</sup>, and LIU Meng-jun<sup>3,\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; <sup>2</sup> Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000, China; <sup>3</sup> Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China)

**Abstract:** In order to explore the reason of etiolated seedling from root suckers of Chinese jujube, morphological index, chlorophyll content, mineral content and molecular variation of etiolated and normal seedling from root suckers of jujube trees were studied in this paper. The results showed that there was no significant change in morphological index between etiolated seedling and healthy seedling from root suckers, but the chlorophyll content of etiolated seedling was significantly lower than that of healthy ones, the mineral content of N, P, K, Mn, Cu, Zn and Fe were significantly increased, Ca and Mg were no significant change. The AFLP analysis showed that there were no obvious differences on the level of genome between etiolated seedling from root suckers and healthy plants. The results of cDNA-AFLP and RT-PCR showed that the *Acyltransfer* gene expression was higher in etiolated seedlings compared to healthy ones, expression of *Ty3-gypsy* was decreased dramatically and the expression of *GAGA-binding*

收稿日期: 2012-05-14; 修回日期: 2012-07-23

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2009000534, 08D020); 河北省杰出青年基金项目 (C2010000679); 国家科技支撑计划项目 (2008BAD92B03, 2007BAD36B07, 2006BAD18B02)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhaojind@yahoo.com; lmj1234567@yahoo.com.cn)

*transcriptional activator* was reduced slightly in etiolated ones. So the change of expression of *GAGA-binding transcriptional activator* and *Ty3-gypsy* may influence the chlorophyll synthesis, and then resulted in the etiolation. But in that stress case the expression of genes related photorespiration, such as *Acytransfer*, were increased. Those results showed that there were regulatory networks among those genes.

**Key words:** Chinese jujube; etiolated seedling from root suckers; chlorophyll; minerals; AFLP; cDNA-AFLP; semi-quantitative RT-PCR

黄化病是高等植物中常见的病害, 表现为枝叶黄化、长势衰弱, 严重的会造成植株死亡。据报道, 发生黄化病较严重的木本植物有枣树、樟树、葡萄、苹果、栀子花、银杏、柑橘、杨树等(周厚基和全月澳, 1988; 晁无疾 等, 2000; 王玢 等, 2007; 谢钟琛 等, 2009; 范志云, 2010; 李利敏 等, 2010; 刘孟军 等, 2010; 刘云鹏 等, 2010; 乾义柯 等, 2010), 会造成巨大的经济损失。通常植物黄化分为生理性黄化和病理性黄化两种, 生理性黄化多是因为植株缺素或营养失衡引起; 病理性黄化一般是由于植原体(phytoplasma)、病毒、细菌或真菌等病原物引起的植株黄化, 多具传染性。枣树上出现黄化病症多是植原体引起的枣疯病(刘孟军 等, 2010)。但在枣园中也经常发现枣树的正常根蘖苗中出现整株黄化, 连续观察两年, 黄化根蘖苗保持稳定的黄化状态, 极少数植株生长后期会出现叶片返绿情况。这种黄化根蘖苗是植原体引起的还是矿质元素失衡, 或者是基因突变引起的, 对于其成因国内外文献尚无相关报道。针对此问题, 本研究中从黄化根蘖苗的形态特征、叶绿素、矿质元素含量及相关基因表达水平方面进行了比较分析, 旨在探究其黄化的成因及可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试品种为‘献王’枣(*Ziziphus jujuba* Mill. ‘Xianwang’), 于2010—2011年取自河北省献县枣园。枣园正常管理。

### 1.2 形态学观察

于5月至8月连续观察, 黄化根蘖苗的形态学指标根据枣种质资源描述规范和数据标准进行观察和测量(刘孟军和汪民, 2009)。

### 1.3 叶绿素、胡萝卜素和矿质元素含量测定

叶绿素采用95%乙醇浸提法(陈毓荃, 2005)。7月份采集黄化根蘖苗、正常根蘖苗及母株每处理枝条中部叶片30片, 称取各处理叶片0.1 g, 剪成约0.2 cm细丝状置于20 mL刻度试管中, 每样品3次重复, 加20 mL 95%乙醇避光浸提24 h, 待叶片组织彻底变白后, 在665、649、470 nm波长下比色测定, 计算叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量。 $C_{Chl.a} = 13.95D_{665} - 6.88D_{649}$ ;  $C_{Chl.b} = 24.96D_{649} - 7.32D_{665}$ ; 叶绿素含量( $mg \cdot g^{-1}$ ) =  $C \times V \times 1\,000 \times W$ ;  $C_{x.c} = (1\,000D_{470} - 2.05C_{Chl.a} - 114C_{Chl.b}) / 245$ ; 其中,  $C_{Chl.a}$ 为叶绿素a浓度;  $C_{Chl.b}$ 为叶绿素b浓度;  $C_{x.c}$ 为类胡萝卜素浓度; D为测定时吸光值; W为样品鲜样质量; V为测定液总体积。

矿质元素采用浓硫酸—高氯酸消煮, 原子吸收法测定(薛进军和王秀茹, 1999)。

## 1.4 遗传变异机制分析

### 1.4.1 DNA、RNA 提取与 cDNA 合成

采集 3 株黄化根蘖苗、1 株正常根蘖及母株进行核酸提取, 采样部位为枝条, 枝条绿色韧皮部用于核酸提取。

DNA 提取采用本实验室改进的 CTAB 法(谢南南等, 2011)提取, 称量 0.15 ~ 0.20 g 枣枝韧皮部, 加入液氮迅速研磨成粉末, 转入 1.5 mL 离心管中, 每管加 750  $\mu\text{L}$  65  $^{\circ}\text{C}$  预热的 DNA 提取液(2.0% CTAB, 1.4  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 0.5% PVP-40, 0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.0, 0.25  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇), 充分混匀, 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min, 每隔 10 min 混匀 1 次; 4  $^{\circ}\text{C}$  10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 吸取上清液 700  $\mu\text{L}$ , 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 混匀静置 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 吸取上清液 500  $\mu\text{L}$ , 加入等体积氯仿: 异戊醇(24: 1), 混匀静置 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 吸取上清液 300  $\mu\text{L}$ , 加入 0.6  $\times$  体积的冰冻异丙醇, 混匀 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻沉 1 h; 4  $^{\circ}\text{C}$  10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清液用 70% 乙醇洗沉淀 2 次, 100% 乙醇洗沉淀 1 次, 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 溶解过夜, 待用。

RNA 提取采用改进的 CTAB 法, 称样 0.3 ~ 0.5 g, 置于含液氮研钵中研磨成粉末状(研磨过程中可加入液氮使组织保持冰冻状态), 迅速转入 1.5 mL 离心管中, 每管提前加入 1 mL 65  $^{\circ}\text{C}$  预热 30 min 的提取液, 剧烈摇动, 充分混匀; 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 10 min; 吸取上清液于新离心管中, 每管加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 颠倒混匀, 冰上放置 10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 10 min; 吸取上清液于新离心管中, 每管加入 1/20 体积 4  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KAc pH 5.5、1/10 体积 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的无水乙醇, 轻轻颠倒混匀; 加入等体积氯仿: 异戊醇(24: 1), 颠倒混匀, 冰上放置 10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 10 min; 取上清液于新离心管中进行 RNA 沉淀(薛渝峰, 2008)。

合成 cDNA 参照 TaKaRa 公司反转录酶说明书进行。

### 1.4.2 AFLP 和 cDNA-AFLP 分析

酶切: 20  $\mu\text{L}$  体系中 NEB buffer 2.2  $\mu\text{L}$ , BSA 0.2  $\mu\text{L}$ , *Mse* I (10 U) 0.3  $\mu\text{L}$ , *Eco*R I (20 U) 0.15  $\mu\text{L}$ , DNA/cDNA 100 ng, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu\text{L}$ 。混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  3 h, 65  $^{\circ}\text{C}$  20 min 使酶失活。

连接: 将 5  $\mu\text{L}$  体系[Ligase buffer 0.5  $\mu\text{L}$ , *Eco*R I adapter 1.0  $\mu\text{L}$ , *Mse* I adapter 1.0  $\mu\text{L}$ , T4 Ligase (5 U) 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu\text{L}$ ]加入 20  $\mu\text{L}$  酶切产物中。混匀, 16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接, 然后 70  $^{\circ}\text{C}$  灭活 10 min。

预扩增: 预扩体系为 25  $\mu\text{L}$ , 循环条件, 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 23 个循环(94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min); 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保温。连接产物不稀释。

选择性扩增: 预扩产物稀释 20  $\times$  作为选扩模板, 选扩体系 20  $\mu\text{L}$ , 循环条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 13 个循环(94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 65  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 每循环降 0.7  $^{\circ}\text{C}$ ; 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min); 25 个循环(94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min); 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保温。上样前加入 10  $\mu\text{L}$  loading buffer, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min。AFLP 和 cDNA-AFLP 分析所用引物包括: M-CAT/E-ATT、M-CAT/E-ACT、M-CCT/E-ACC、M-CCA/E-ATT、M-CCA/E-ATA、M-CAT/E-ACC、M-CAT/E-AGA、M-CGC/E-ACT、M-CCT/E-AGA、M-CCT/E-ATT、M-CCT/E-ACT、M-CCT/E-ATA、M-CCA/E-AGA、M-CGC/E-ACC、M-CGC/E-AGA、M-CGC/E-ATT 和 MCCA/ECCA(薛渝峰, 2008)。

电泳和染色: 先在 80 W 恒功率条件下预电泳 30 min, 然后点样, 80 W 恒功率电泳 2 h。染色方式采用银染(王洋等, 2010)。

对有差异的条带切胶, 用上海生工凝胶回收试剂盒纯化回收, 克隆入 PMD-19<sup>T</sup> Simple 载体中, 经蓝白斑筛选挑取阳性克隆送上海生工进行测序。

将测定的核苷酸序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对和生物信息分析。

#### 1.4.3 半定量 RT-PCR 分析

利用测序获得的基因片段设计半定量 RT-PCR 引物, 其中, 转移酶编码基因引物为 zs1: CTAGAAACGGTGGGACCGAAATG, za1: CAGTGCAGCTAACTAAGCTGA AAGAT; ty3-gypsy 反转座子基因引物为 12s-1: AGTAACCAACTCCAAGGTGCC, 12a-1: CATAATGTCCGTACCTCGTCCT; GAGA-binding 转录激活因子基因引物为 2s: AATGCCAGTTCCAATGTG, 2a: ACCCTCCTCCGCTTTC。选用 *His-3* 为内参基因 (Sun et al., 2009)。

## 2 结果与分析

### 2.1 枣黄化根蘖苗田间症状和叶片叶绿素含量的变化

‘献王’枣成龄树根部每年都会滋生出根蘖苗, 其中会出现个别整株黄化的根蘖苗, 黄化根蘖苗生长早期与正常根蘖苗 (图 1, A) 生长状态相似, 但叶色发黄, 树姿半张开, 树形圆锥形, 树势中等, 但生长后期 (8 月份后) 植株表现为灼伤状, 地上部分逐渐死亡, 次年 5、6 月份再次萌发依然表现为整株黄化 (图 1, B)。



图 1 枣树的黄化根蘖苗与正常根蘖苗

A. 正常根蘖苗; B. 黄化根蘖苗; C. 从左到右分别为母株叶片、正常根蘖苗幼嫩叶片、黄化根蘖苗叶片;  
D. 从左到右分别为母株二次枝、正常根蘖苗二次枝、黄化根蘖苗二次枝。

Fig. 1 Etiolated and normal seedling from root suckers of Chinese jujube

A. Normal seedling from root suckers; B. Etiolated seedling from root suckers; C. Left to right: Leaf of mother plant, normal seedling root suckers, etiolated seedling root suckers; D. Left to right: Secondary branch of mother plant, normal seedling root suckers, etiolated seedling root suckers.

分别于 2010、2011 年 5—8 月对黄化和正常根蘖苗的形态学指标进行了比较, 与正常根蘖苗相比, 黄化根蘖苗枣头叶片和枝条颜色呈明显的浅黄色, 针刺较发达 (图 1, C、D); 但枣头蜡层、叶片色泽度、叶片形状、叶尖形状、叶基形状、叶缘形状、二次枝长度、二次枝节数及二次枝弯曲度等指标与正常根蘖苗均没有明显差异。黄化和正常根蘖苗在叶片颜色方面差异显著。由表 1 可以看出, 黄化根蘖苗叶片叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量均显著低于母株和正常根蘖苗叶片。母株和正常根蘖苗叶片叶绿素 a/b 的比值, 分别为 3.259 和 2.549, 符合正常叶片叶绿素 a/b 约为 3.00 的比例关系; 而黄化根蘖苗叶片叶绿素 a/b 为 1.097, 显著小于正常值。

表 1 黄化根蘖苗与正常植株叶绿素含量比较

Table 1 Chlorophyll content of etiolated and normal seedlings from root suckers

处理 Treatment	叶绿素 a / (mg · g <sup>-1</sup> ) Chlorophyll a	叶绿素 b / (mg · g <sup>-1</sup> ) Chlorophyll b	叶绿素 a + b / (mg · g <sup>-1</sup> ) Chlorophyll a + b	类胡萝卜素 / (mg · g <sup>-1</sup> ) Carotenoids	叶绿素 a/b Chl.a/b ratio
母株叶 Leaf of mother plant	1.147 a	0.352 b	1.499 a	0.337 a	3.259
正常根蘖叶 Leaf of normal seedling root suckers	0.984 b	0.386 a	1.370 b	0.334 a	2.549
黄化根蘖叶 Leaf of etiolated seedling root suckers	0.034 c	0.031 c	0.064 c	0.056 b	1.097

注：差异分析方法采用 DPS 分析，不同字母表示差异显著。

Note: Differences were analyzed by DPS. Values with the different letters have very significant differences.

## 2.2 矿质元素含量变化

由表 2 可以看出，黄化根蘖苗中矿物质 N、P、K、Mn、Cu、Zn、Fe 含量均显著高于正常分蘖苗和母株的矿物质含量；黄化根蘖苗 Ca 含量与母株中 Ca 含量差异不显著，显著低于正常分蘖苗；黄化苗 Mg 含量与正常根蘖及母株之间差异不显著，这一结果与文献报道中苹果、梨、桃等果树缺铁性黄化叶片中 P、K、Cu、Zn 含量升高（张朝红 等，2002）相一致；黄化叶片中 Fe 含量也显著高于正常叶。由于黄化根蘖和正常根蘖为同一母株来源，生长在同样条件下，正常根蘖苗与黄化根蘖苗生长区域非常接近，正常分蘖没有表现因缺素而产生的异常状态，所以根蘖苗黄化不是由于缺素引起的。

表 2 黄化根蘖苗、正常根蘖苗与母株矿质元素含量比较

Table 2 Minerals content of three kinds of plant

处理 Treatment	(mg · g <sup>-1</sup> )					(μg · g <sup>-1</sup> )			
	N	P	Ca	Mg	K	Mn	Cu	Zn	Fe
黄化根蘖叶 Leaf of etiolated seedling root suckers	9.11 a	7.32 a	9.09 b	2.37 a	27.17 a	104.41 a	19.96 a	47.27 a	807.99 a
正常根蘖叶 Leaf of normal seedling root suckers	6.42 b	3.25 b	9.57 a	1.83 a	18.61 b	61.30 b	7.89 b	36.88 b	510.30 b
母株叶 Leaf of mother plant	7.54 ab	2.82 b	8.85 b	2.03 a	14.88 b	35.69 c	6.16 b	25.67 c	411.05 c

注：差异分析方法采用 DPS 分析，不同字母表示差异显著。

Note: Differences were analyzed by DPS. Values with the different letters have very significant differences.

## 2.3 AFLP 和 cDNA-AFLP 分析

提取黄化根蘖苗、正常根蘖及母株的基因组 DNA，采用枣多态性较好的 17 对引物扩增进行 AFLP 分析，获得条带 339 条，但没有发现差异条带（图 2）。

进一步对上述样品表达水平进行了 cDNA-AFLP 分析，并以其它‘猷王’枣母株分蘖作为外对照。采用 14 对引物进行多态性分析，共获得条带 505 条，其中差异条带 45 条（图 3）。其差异条带分为 4 类：（1）黄化根蘖苗中表达量升高的条带（1 条）；（2）黄化根蘖苗中特异表达的条带（1 条）；（3）正常植株中表达，黄化根蘖苗未表达的条带（1 条）；（4）外对照正常根蘖苗特有条带（43 条，本文中暂不讨论）。

将 cDNA-AFLP 分析中与黄化相关的差异条带进行了回收测序，得到的 3 条序列分别与蝶豆酰基转移酶基因（为黄化根蘖苗表达量增加的片段）同源性 79%，与矮牵牛 ty3-gypsy 反转座子基因（为黄化根蘖苗特异表达片段）同源性 78%，与葡萄 GAGA-binding 转录激活因子（为黄化根蘖苗中缺失表达片段）同源性 84%。

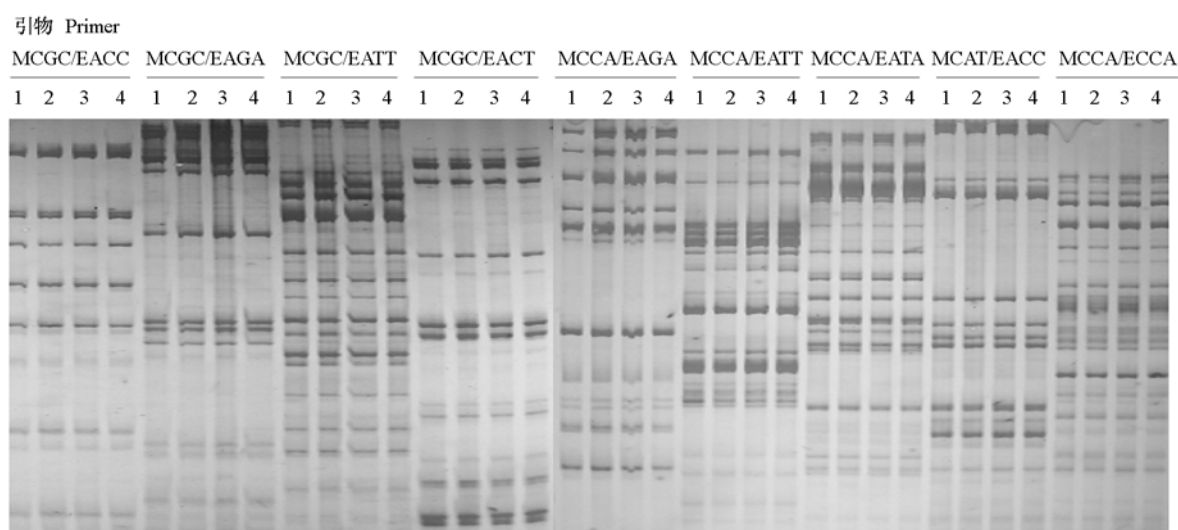


图 2 黄化根蘖苗、正常根蘖苗及母株部分引物的 AFLP 图谱

1、2. 黄化根蘖苗; 3. 正常根蘖苗; 4. 母株。

Fig. 2 Etiolated seedling root suckers and formal plants AFLP analysis

1, 2. Etiolated seedling root suckers; 3. The normal root suckers; 4. Mother plant.

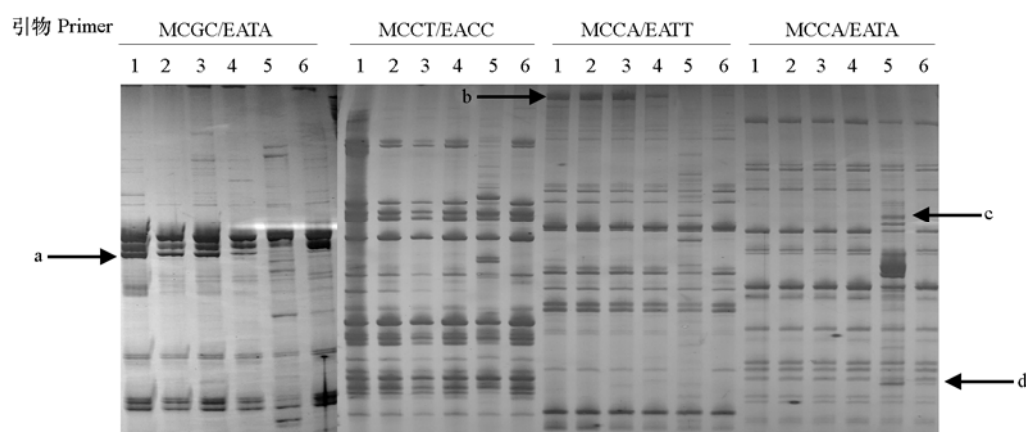


图 3 黄化根蘖苗、正常根蘖苗、母株及外对照部分引物的 cDNA-AFLP 图谱

1~4. 黄化根蘖苗; 5. 外对照根蘖苗; 6. 母株。a 为黄化根蘖苗表达量增加片段; b 为黄化根蘖苗特异表达片段; c 为外对照特异表达的条带; d 为黄化根蘖苗中缺失表达片段。

Fig. 3 cDNA-AFLP analysis of etiolated seedling from root suckers and normal plants

1~4. Etiolated seedling root suckers; 5. The reference root suckers; 6. Mother plant. a. The band with higher expression in etiolated seedling from root suckers; b. The band with specific expression in etiolated seedling from root suckers; c. The band with specific expression in the control; d. The absence of expression of etiolated seedling root suckers.

## 2.4 相关基因的半定量 RT-PCR 分析

为了进一步研究测序获得基因在黄化和正常植株中的表达情况, 进一步利用所得基因片段设计引物, 进行了半定量 RT-PCR 分析。由图 4 可以看出, 黄化根蘖苗中酰基转移酶基因 (*Acyltransferas*) 表达量高于正常植株, 但反转座子基因 (*Ty3-gypsy*) 和 GAGA 结合转录激活因子 (*GAGA-binding transcriptional activator*) 表达量低于正常植株。

分别设计引物扩增黄化根蘖和正常根蘖及母株中的以上这 3 种基因片段, 并对获得的序列进行

了比对,黄化根蘖和正常植株中的 *Acyltransferas* 和 *Ty3-gypsy* 片段没有发现碱基差异,而 *GAGA-binding* 转录激活因子发生了单碱基变异(图 5),导致氨基酸发生相应变化,在正常植株中为 GAC(天冬氨酸)和 ATC(异亮氨酸),而黄化植株则为 GCC(丙氨酸)和 GTC(缬氨酸)。

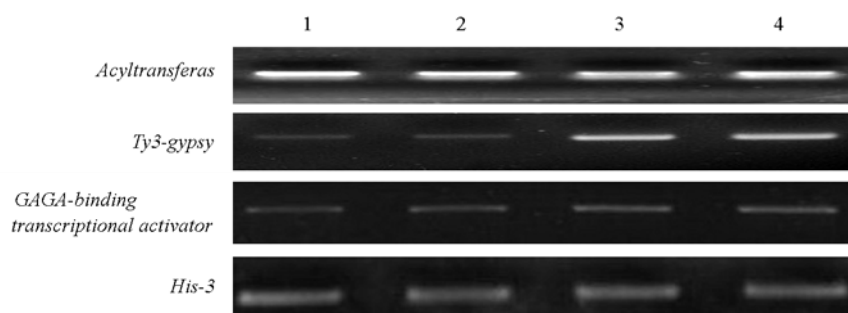


图 4 *Acyltransferas*、*Ty3-gypsy* 和 *GAGA-binding transcriptional activator* 在黄化根蘖苗与正常植株中的表达分析  
1、2. 黄化根蘖苗; 3. 正常根蘖; 4. 母株。*His-3* 为内参基因 (Sun 等, 2009)。

Fig. 4 Expression analysis of *Acyltransferas*, *Ty3-gypsy* and *GAGA-binding transcriptional activator* in etiolated seedling root suckers and normal plants by semi-quantitative RT-PCR analysis

1, 2. Etiolated seedling root sucker; 3. The normal root suckers; 4. Mother plant. *His-3* as reference gene (Sun et al., 2009).

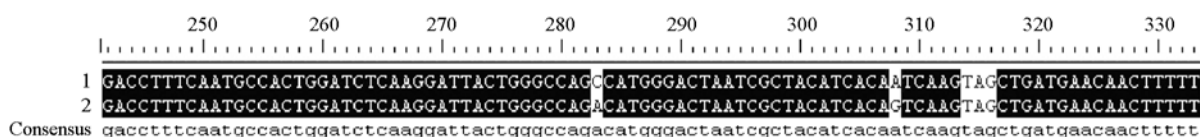


图 5 黄化根蘖苗与正常植株中 *GAGA-binding* 转录激活因子基因序列 DNAMAN 同源比对结果

1. 黄化根蘖苗; 2. 正常根蘖。

Fig. 5 Sequence alignment of *GAGA-binding transcriptional activator* of etiolated and normal seedling

1. Etiolated seedling root sucker; 2. The normal root suckers.

### 3 讨论

经过 2010—2011 两年的调查发现,在同一株枣树的根蘖苗中同时存在正常植株和黄化植株,说明黄化根蘖苗的形成不是由于土壤、光照、温度等外界环境因素及植株个体差异所致。黄化根蘖苗的黄化特征仅为叶片黄化,其他生物学特征并未发生明显变化,不符合枣疯病黄化、小叶丛生、花变叶等特征(刘孟军 等, 2010),对其进行枣疯病病原检测也没有发现相关病原(数据未显示),因此排除了枣疯病病因引起的黄化。

通过对不同类型叶片叶绿素和胡萝卜素的检测可以看出,黄化根蘖苗叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量均明显低于母株和正常根蘖苗。正常植株叶绿素和类胡萝卜素的含量比例约为 3:1(潘瑞炽, 2004),但黄化根蘖苗比值(1.143)小于正常值,说明黄化根蘖苗叶片两大色素含量失衡,并且,叶绿素 a/b 的比例(1.097)也小于正常比值(潘瑞炽, 2004),说明黄化根蘖苗叶绿素 a 含量较正常植株含量表现异常。叶绿素 b 是由叶绿素 a 进一步合成而来的(潘瑞炽, 2004),所以分析黄化苗应该是叶绿素 a 合成异常从而使总体含量降低,从而表现为叶片失绿黄化。

矿质元素含量对植株叶绿素的合成有很大影响,缺乏 N、P、K、Mn、Cu、Zn、Ca、Mg、Fe 时就会造成植株不同程度的失绿(潘瑞炽, 2004; 李利敏 等, 2010)。本试验结果显示,黄化根蘖苗中 N、P、K、Mn、Cu、Zn、Fe 均显著高于正常分蘖苗和母株含量,Ca 和 Mg 含量与母株含量没

有显著差异(表 2)。分析原因可能是黄化植株虽能正常吸收矿质元素,但是由于叶绿素合成机制受抑,所需的矿质元素不能被利用而在叶中积累导致含量增高。

反转录转座子广泛存在于高等植物基因组中,是数量最大的一类可活动的遗传成分。在玉米的基因组中 49%~78%是反转录转座子(SanMiguel & Bennetzen, 1998),而在小麦中包含约 68%的转座子(Li et al., 2004)。Ty3-gypsy 类转座子是其中一类具有长末端重复序列(long terminal repeats, LTR)转座子。经 cDNA-AFLP 和 RT-PCR 分析,本试验发现黄化苗中 Ty3-gypsy 反转录转座子基因表达显著降低。而最初转座子的发现者 B. Mc Clintock 就是研究转座子介导玉米籽粒颜色变异与染色体断裂融合桥形成之间的关系;李洪清等(2003)也报道利用转座子构建特殊表达载体,随机激活花色合成基因来产生嵌合花色,这些研究均表明转座子与色素合成之间有密切关系。所以,本试验中 Ty3-gypsy 反转录转座子基因表达的显著降低,很可能影响了受其调控的叶绿素合成基因的表达,使植株最终表现黄化。

在高等植物中,酰基转移酶基因是光呼吸途径中的一个关键酶,对光呼吸作用的正常运转起着重要作用(王金菊 等, 2010),而光呼吸是植物在高光等条件下的保护反应。本试验中发现酰基转移酶基因在黄化根蘖苗中表达量高于正常植株。而与转录相关的 *GAGA-binding* 转录激活因子在黄化植株中表达量低于正常植株,且有两个位点发生单碱基变异,导致氨基酸发生变化,可能影响其发挥正常功能,从而影响了此基因参与转录的激活(Tokameh et al., 2002)。综合以上 3 个基因的表达变化,分析在黄化根蘖苗中可能与叶绿体合成转录相关的一些基因,如反转座子基因(*Ty3-gypsy*)和 *GAGA* 结合转录激活因子(*GAGA-binding transcriptional activator*)表达降低,从而造成黄化根蘖苗中叶绿体合成降低,但同时黄化植株体内与光呼吸相关的一些基因,如酰基转移酶基因增加表达量来促进光呼吸,能减轻植物的光抑制和光氧化伤害(李朝霞 等, 2003),说明了在一定逆境条件下不同基因间存在相互适应的调控网络。

## References

- 晁无疾,周 敏,张铁强,付京晶,丁双陆. 2000. 葡萄缺铁性黄化病调查与矫治试验. 中外葡萄与葡萄酒, (2): 25 - 27.
- Chen Yu-quan. 2005. Experimental methods and techniques of biochemistry. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 陈毓荃. 2005. 生物化学实验方法和技术. 北京: 科学出版社.
- Fan Zhi-yun. 2010. Lobular gardenia yellow disease prevention test report. Journal of Green Science and Technology, 10: 31 - 33. (in Chinese)
- 范志云. 2010. 小叶栀子花黄化病防治试验报告. 绿色科技, 10: 31 - 33.
- Li Hong-qing, Li Mei-ru, Pan Xiao-ping, Chen Yi-zhu. 2003. The progress in genetic modification of flower color. Progress in Biotechnology, 23 (7): 42 - 46. (in Chinese)
- 李洪清, 李美茹, 潘小平, 陈贻竹. 2003. 花色改造基因工程. 中国生物工程杂志, 23 (7): 42 - 46.
- Li Li-min, Wu Liang-huan, Ma Guo-rui. 2010. Studies on year-cycle changes of leaf nutrient status from camphor tree. Acta Horticulturae Sinica, 37 (2): 277 - 282. (in Chinese)
- 李利敏, 吴良欢, 马国瑞. 2010. 樟树正常叶片与黄化叶片营养状况的周年变化. 园艺学报, 37 (2): 277 - 282.
- Li W, Zhang P, Fellers JP, Friebe B, Gill B S. 2004. Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. Plant J, 40 (4): 500 - 511.
- Li Zhao-xia, Zhao Shi-jie, Meng Qing-wei. 2003. Pathways and function of photorespiration. Chinese Bulletin of Botany, 20 (2): 190 - 197. (in Chinese)
- 李朝霞, 赵世杰, 孟庆伟. 2003. 光呼吸途径及其功能. 植物学通报, 20 (2): 190 - 197.
- Liu Meng-jun, Wang Min. 2009. Germplasm resources of Chinese jujube. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 刘孟军, 汪 民. 2009. 中国枣种质资源. 北京: 中国林业出版社.
- Liu Meng-jun, Zhao Jin, Zhou Jun-yi. 2010. Jujube witches' broom disease. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)



- 刘孟军, 赵 锦, 周俊义. 2010. 枣疯病. 北京: 中国农业出版社.
- Liu Yun-peng, Xu Fu-yuan, Zhu Xing-jun, Yan Xiang-jin. 2010. Oxidases and MDA response characteristics in poplar yellow seedling leaves. *Forest Research*, 23 (3): 355 - 361. (in Chinese)
- 刘云鹏, 徐福元, 朱兴俊, 严相进. 2010. 杨树黄化苗木叶部氧化酶及 MDA 响应特征. *林业科学研究*, 23 (3): 355 - 361.
- Pan Rui-chi. 2004. *Phytophysiology*. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- 潘瑞炽. 2004. *植物生理学*. 北京: 高等教育出版社.
- Qian Yi-ke, Zhang Xiang-lin, Ma Chun-chun, Wang Chong. 2010. Detection and RFLP analysis of 16S ribosomal DNA of phytoplasma *Flavescence dorée*. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 47 (5): 915 - 920. (in Chinese)
- 乾义柯, 张祥林, 马春春, 王 翀. 2010. 葡萄金黄化植原体 16S rDNA 检测与 RFLP 分析. *新疆农业科学*, 47 (5): 915 - 920.
- SanMiguel P, Bennetzen J L. 1998. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany*, 82 (Suppl A): 37 - 44.
- Sun Hai-feng, Meng Yu-ping, Cui Gui-mei, Cao Qiu-fen, Li Jie, Liang Ai-hua. 2009. Selection of housekeeping genes for gene expression studies on the development of fruit bearing shoots in Chinese jujube (*Ziziphus jujube* Mill.). *Mol Biol Rep*, 36: 2183 - 2190.
- Tokameh Mahmoudi, Katerina R Katsani, Verrijzer C Peter. 2002. GAGA can mediate enhancer function in trans by linking two separate DNA molecules. *The EMBO Journal*, 21 (7): 1775 - 1781.
- Xie Nan-nan, Qiao Yong, Zhao Jin, Liu Meng-jun. 2011. A SON-PCR technique suitable to amplificating the flanking regions of gene of Chinese jujube. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (4): 781 - 788. (in Chinese)
- 谢南南, 乔 勇, 赵 锦, 刘孟军. 2011. 一种适合扩增枣基因片段侧翼序列的 SON-PCR 技术. *中国农业科学*, 44 (4): 781 - 788.
- Xie Zhong-chen, Li Jian, Shi Qing, Xie Wen-long, Yang Jian-rong, Chen Yue-fei, Zhong Lian-sheng. 2009. Damage and epidemics of citrus Huanglongbing in Fujian Province. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (11): 3888 - 3897. (in Chinese)
- 谢钟琛, 李 健, 施 清, 谢文龙, 杨建榕, 陈跃飞, 钟连生. 2009. 福建省柑橘黄龙病危害及其流行规律研究. *中国农业科学*, 42 (11): 3888 - 3897.
- Xue Jin-jun, Wang Xiu-ru. 1999. The effect of different fertilizing methods on chlorophyll and iron content in apple tree. *Journal of Fruit Science*, 16 (4): 246 - 249. (in Chinese)
- 薛进军, 王秀茹. 1999. 铁肥品种和施肥方式对黄化苹果树复绿和铁含量的影响. *果树科学*, 16 (4): 246 - 249.
- Xue Yu-feng. 2008. The differential expression of genes related to the resistance of jujube witches broom induced by phytoplasma [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 薛渝峰. 2008. 植原体诱导下抗枣疯病相关基因的差异表达研究 [硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Wang Di, Sun Jie, Jiang Hua. 2007. Analysis of the cause of yellow disease in ginkgo. *Liaoning Agricultural Sciences*, (3): 82 - 83. (in Chinese)
- 王 均, 孙 洁, 姜 华. 2007. 银杏黄化病的病因分析. *辽宁农业科学*, (3): 82 - 83.
- Wang Jin-ju, Liu Xia, Guo Xiao-chen, Liu Qing-dai, Zhang Zhi-zhou. 2010. Progress in plant serine: Glyoxylate aminotransferase. *Journal of Anhui Agri Sci*, 38 (30): 16762 - 16764. (in Chinese)
- 王金菊, 刘 霞, 郭晓晨, 刘清岱, 张治洲. 2010. 植物丝氨酸: 乙醛酸氨基转移酶研究进展. *安徽农业科学*, 38 (30): 16762 - 16764.
- Wang Yang, Zhao Shu-gang, Zhao Jin, Liu Meng-jun. 2010. AFLP analysis on 17 species of Oleaceae family. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 33 (6): 31 - 35. (in Chinese)
- 王 洋, 赵书岗, 赵 锦, 刘孟军. 2010. 木犀科 17 种植物的 AFLP 指纹分析. *河北农业大学学报*, 33 (6): 31 - 35.
- Zhang Zhao-hong, Wang Yue-jin, Li Yan. 2002. Effect of iron deficiency on contents of nutrient elements and photosynthetic characteristic of leaves in pear trees. *Journal of Northwest Forestry College*, 17 (4): 9 - 11. (in Chinese)
- 张朝红, 王跃进, 李 琰. 2002. 缺铁黄化对酥梨叶片营养元素含量和光合特性的影响. *西北林学院学报*, 17 (4): 9 - 11.
- Zhou Hou-ji, Tong Yue-ao. 1988. Study of apple iron deficit and chlorosis. *Scientia Agricultura Sinica*, 21 (4): 46 - 50. (in Chinese)
- 周厚基, 仝月澳. 1988. 苹果树缺铁失绿研究的进展. *中国农业科学*, 21 (4): 46 - 50.