

细叶百合休眠与解除 SSH 文库构建及其调控基因的初步筛选

刘芳^{1,2}, 王家艳¹, 周蕴薇^{1,*}

(¹东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040; ²黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 为了验证百合鳞茎休眠解除过程中基因表达的差异性, 以细叶百合休眠鳞茎和休眠解除鳞茎为材料, 利用抑制消减杂交技术构建了百合鳞茎休眠及解除正、反向抑制消减文库。文库富集了差异基因, 消减效率符合要求, 插入片段集中于 250~1 000 bp 之间。对正、反向文库随机挑选阳性克隆测序, 各获得 100 个表达序列标签 (EST), 在 NCBI 上进行 BLASTx 分析, 并用 KOBAS 系统将获得的 unigene 定位到 Pathways 中。分析结果表明, 休眠文库 ESTs 功能主要涉及胁迫响应方面, 如苯丙氨酸代谢途径、促分裂素原活化蛋白激酶途径等与休眠有关。休眠解除文库在糖代谢、激素响应及信号转导方面表达量较高, 如亚油酸代谢途径、淀粉及蔗糖代谢途径等参与了休眠解除过程。

关键词: 细叶百合; 鳞茎; 休眠; 抑制消减杂交

中图分类号: S 682.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 07-1476-09

Preliminary Screening of Dormancy Regulation Related Genes from SSH Library Constructed Using Dormant and Dormancy Breaking Bulbs of *Lilium pumilum*

LIU Fang^{1,2}, WANG Jia-yan¹, and ZHOU Yun-wei^{1,*}

(¹College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: In order to verify the differences of gene expression in the process of lily bulb dormancy breaking, two SSH-cDNA libraries were constructed using dormant and dormancy breaking bulbs. The forward library contained genes preferentially expressed in dormancy breaking bulbs and the reverse library contained genes preferentially expressed in dormant bulbs. The results showed that differential express genes were enriched effectively in two libraries, and subtraction efficiency reached the demand. Most of the length of inserted fragments was 250 - 1 000 bp. One hundred positive clones were randomly selected for sequencing from the two libraries. We analyzed ESTs in BLASTx of NCBI and unigenes positioning in the pathways using KOBAS system. Results indicated that in dormant bulb library, these functionally known genes were detected in stress response. Phenylalanine metabolism and MAPK signaling pathway were associated with dormancy. In bulb dormancy breaking library, the function of

收稿日期: 2013 - 12 - 25; **修回日期:** 2014 - 04 - 21

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (DL13CA14); 黑龙江省自然科学基金项目 (C201137); 黑龙江省博士后科研启动金项目 (LBH-Q09188)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: dlzhyw@126.com)

ESTs involved in sugar metabolism, hormone response and signal transduction, linoleic acid metabolism and starch and sucrose metabolic pathway was involved in dormancy breaking process.

Key words: *Lilium pumilum*; bulb; dormancy; suppression subtractive hybridization

细叶百合 (*Lilium pumilum*) 为百合科百合属植物, 是分布纬度偏北的耐寒野生种, 在哈尔滨地区能够露地越冬, 地上植株秋季枯萎后鳞茎进行自发休眠, 鳞茎需经历低温春化作用才能解除休眠。目前关于百合鳞茎休眠的研究主要集中在休眠解除过程中生理生化变化和形态解剖的研究上, 植物休眠的分子机制研究也主要集中在对种子及芽休眠和解除的研究上, 尤其对于在北方寒地能够自然陆地越冬的野生种百合来说休眠的分子研究尚属空白。大量研究表明植物在休眠期和休眠解除时期存在差异表达基因, 相同基因在植物的不同发育阶段的表达量也存在差异。从桦树、牡丹等植物的芽中分离出了休眠促进基因 *BpuDhn1* 及冷诱导基因 *PsMPT* (Welling et al., 2004; Huang et al., 2008)。脱落酸响应信号 ABI 家族相关基因及光敏色素基因 *PHYB1* 和 *PHYB2* 的表达也与休眠有关 (Frewen et al., 2000)。H⁺-ATPase 基因的上调表达有利于桃树芽休眠的解除, 它主要在 H⁺ - 蔗糖同向运输过程中起调控作用 (Gévaudant et al., 2001)。休眠特性因物种、品种及器官组织的不同而存在差异。影响物种休眠的环境因子多种多样, 如光周期、温度、水分等。而对于寒地细叶百合来说, 休眠解除进程也是对低温的胁迫过程。因此利用现代分子生物学手段深入挖掘细叶百合在生理休眠和解除过程中的特异基因是揭示其生理休眠机理的关键。

抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是研究差异表达基因简便而有效的方法, 具有速度快、效率高、灵敏度高、假阳性率低等优点, 目前已广泛用于植物抗逆基因筛选以及生长发育相关基因研究中 (牟永潮 等, 2011; Liu et al., 2012)。本研究中通过 SSH 技术研究细叶百合鳞茎在冬季自然休眠解除过程中转录水平上的基因表达差异, 获得休眠调控基因的 EST 序列, 利用生物信息学分析方法, 了解文库中休眠调控基因的表达种类、丰度及其参与的代谢途径, 为揭示百合鳞茎休眠与萌发的分子机制提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其总 RNA 的提取

于 2011 年 10 月末和 2012 年 4 月中旬, 采收东北林业大学大田引种的细叶百合鳞茎, 洗净, 液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存待用。取 0.1 mg 研磨过的植物样品加入 1 mL CTAB 提取液, 65 °C 水浴震荡 30 min, 加入等体积的氯仿, 室温放置 10 min。4 °C 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 抽提两次。转移上清液加入 1/4 体积的 10 mol·L⁻¹ LiCl, 混匀, 4 °C 过夜。12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。沉淀溶于 500 μL SSTE, 上清液加入两倍体积的无水乙醇, -70 °C 冰浴 30 min。离心 20 min 弃上清液。用 1 mL 75%乙醇洗沉淀, 吹干后用 DEPC 水溶解 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA, 抽提好的 RNA 于 -80 °C 保存。

1.2 SSH-cDNA 文库的构建

按 Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit 说明书进行 SSH 操作。以解除休眠鳞茎为检测子 (tester), 休眠鳞茎为驱动子 (driver), 构建鳞茎休眠解除正向 SSH-cDNA 文库。与此相反, 构建鳞茎休眠期差异表达基因的反向文库。SSH 产物经纯化和浓缩后与 pMD-18-T 载体连接, 形成质粒文库。连接产物转化感受态宿主菌 DH5α, 涂于含有 Apr-IPTG/x-gal LB 固体培养基上, 挑取白斑克

隆, 检测目的片段的插入情况, 构建正、反向 SSH 文库。

1.3 序列测定和 EST 分析

以通用引物 Nested primer 1 和巢式引物 Nested Primer 2R 进行菌液 PCR 扩增, 筛选阳性克隆送上海欧意生物公司测序。测得序列用 NCBI 的 Vector Screen 程序去除载体和接头序列后, 经 DNASTar 软件进行拼接聚类成 Unigenes。剔除 < 100 bp 的低质量序列获得有效 EST。利用 NCBI 的 BLASTx 在线序列比对工具, 对非冗余蛋白质数据库进行同源性检索分析。利用 BLAST2GO 软件获得 Unigenes 的 GO 注释信息, 然后用 WEGO 软件对大小为 200 bp 以上 (e 值 < $1e-5$) 的 EST 进行 GO 功能分类统计。用 KOBAS2.0 软件进行代谢途径分析。

2 结果与分析

2.1 SSH-cDNA 文库质量分析

利用 CTAB 法提取细叶百合鳞茎的总 RNA, 休眠样和休眠解除样品的 28S 和 18S 核糖体 RNA 条带清晰, 无弥散现象, 经紫外分光光度计检测分析, RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~ 2.1 之间, 表明 RNA 的纯度和含量都能满足试验要求。两个样品的双链 cDNA 在酶切前后都呈现弥散现象, 酶切后条带明显缩短, 条带下移 (图 1)。经过 2 次差减杂交和 2 次抑制性 PCR 扩增, 从差减后的 PCR 产物电泳结果 (图 2) 可以看出: 正反向差减库中的片段大约分布在 250 ~ 2 000 bp 之间, 一些差异表达的基因得到了富集, 说明差减产物两次选择性 PCR 扩增运行正常。

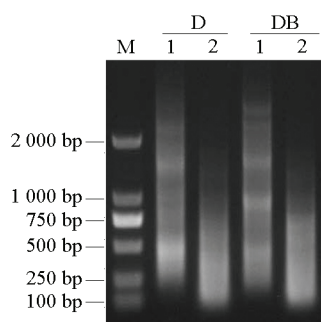


图 1 cDNA 及 *Rsa* I 酶切电泳图谱

M: DL2000 marker; D: 休眠鳞茎; DB: 休眠解除鳞茎;
1: 酶切前; 2: 酶切后。

Fig. 1 The electrophoresis of cDNA and *Rsa* I digested

M: DL2000 marker; D: Dormant bulb; DB: Dormancy breaking bulb;
1: cDNA before digestion; 2: cDNA after digestion.

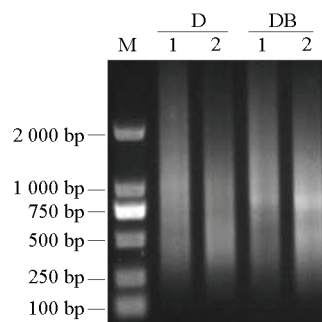


图 2 抑制性差减杂交 2 次 PCR 产物分析

M: DL2000 marker; D: 休眠鳞茎; DB: 休眠解除鳞茎;
1: 杂交前; 2: 杂交后。

Fig. 2 PCR analysis of subtraction efficiency

M: DL2000 marker; D: Dormant bulb; DB: Dormancy breaking bulb;
1: cDNA before hybridization; 2: cDNA after hybridization.

2.2 SSH 文库中插入片段 PCR 检测

经抑制差减杂交富集得到的 DNA 片段转化大肠杆菌 DH5 α , 构建百合休眠形成及休眠解除差减 cDNA 文库, 正、反向文库各随机挑取白斑克隆, 进行菌落 PCR 检测, 结果 (图 3) 显示, 扩增条带为特异性单一条带, 正向休眠解除文库大部分插入片段分布在 250 ~ 1 000 bp 范围内, 反向休眠文库插入片段大小集中分布在 250 ~ 1 500 bp 范围内, 正、反向文库平均片段长度在 500 bp 左右, 片段大小符合要求, 表明抑制差减文库构建成功。

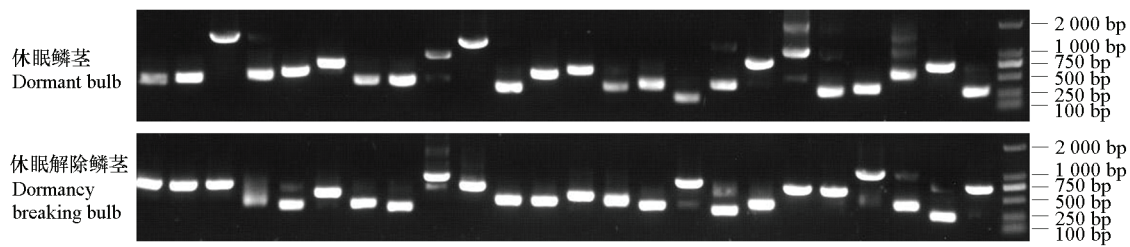


图 3 差减文库插入片段 PCR 产物分析
Fig. 3 PCR analysis of the inserted fragments

2.3 EST 的功能分类

正、反向文库分别成功测序 100 个克隆, 利用 DNASTar 软件进行载体去除和序列聚类拼接后, 正库共获得 80 个 Unigene (EST 序列), 最长的为 1 084 bp, 最短的为 164 bp, 平均 477 bp。反库共获得 81 个 Unigene, 最长的为 1 291 bp, 最短的为 104 bp, 平均 413 bp。利用 BLASTx 同 GenBank 的非冗余蛋白质数据库进行同源性检索发现, 正库中有 48 条 EST 的功能是已知的或推测的, 7 条 EST 为未知功能基因, 未比对上任何基因的 EST 有 25 条。反库中有 43 条具有已知或推测功能, 8 条 EST 为未知功能基因, 未比对上任何基因的 EST 有 30 条。结合 BLASTx 及 BLAST2GO 的比对结果, 对大小为 200 bp 以上有显著相似性 (e 值 $< 1e-5$) 的 EST 进行 GO 功能分类统计 (图 4) 显示, 正、反向文库的基因表达谱有一定的差异, 且参与各个过程的基因比例存在明显差异。

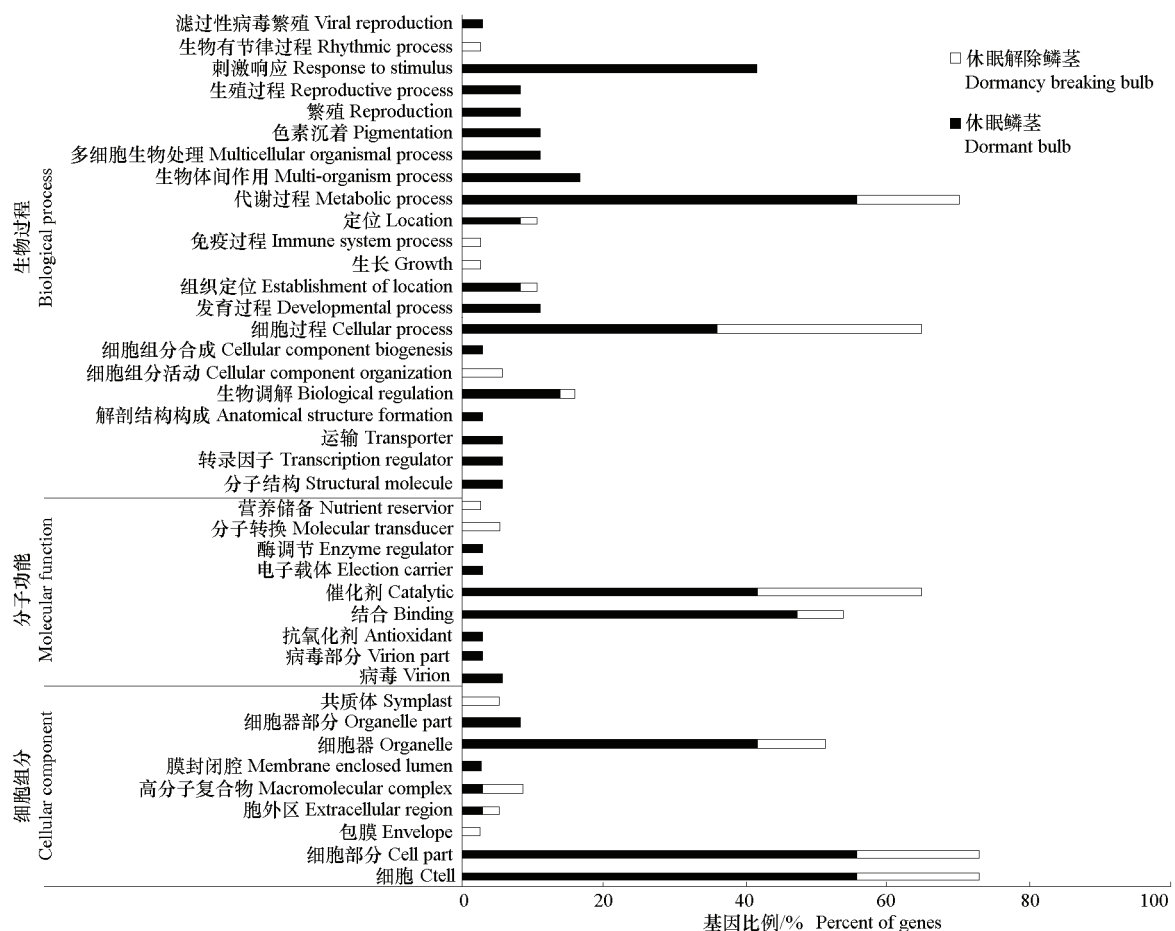


图 4 正向 (休眠解除鳞茎)、反向 (休眠鳞茎) 文库的基因表达谱比较
Fig. 4 Gene ontology classifications for EST-confirmed genes in dormant and dormancy breaking bulb libraries

在细胞组分方面,正、反库所占比例最大的均是细胞(正库 72.97%,反库 55.56%),其次为细胞器成分(正库 51.35%,反库 41.67%)。在分子功能方面,正反库中催化活性(正库 64.86%,反库 41.67%)和分子结合活性(正库 54.05%,反库 47.22%)所占比例较高。在生物过程方面,正库在参与代谢过程和细胞过程的基因所占比例最高,分别为 70.27%和 64.86%,而反库参与代谢过程及外界刺激响应的基因比例较高,分别为 55.56%和 41.76%。

2.4 EST 代谢通路分析

经 KEGG 代谢途径分析,找出与休眠调控显著相关的代谢途径(表 1)。其中 P 值小于 0.05 的代谢途径正库共有 11 个,包含 15 个 EST,反库 10 个,包含 12 个 EST。正、反库所涉及的代谢途径有很大差异,正库中涉及的代谢途径有亚油酸代谢途径、淀粉及蔗糖代谢途径、半胱氨酸和甲硫氨酸等氨基酸代谢途径等,而反库中涉及到的代谢途径有苯丙氨酸代谢及苯丙素生物合成途径,抗坏血酸代谢及促分裂素原活化蛋白激酶/MAPK 激酶途径等。部分 ESTs 及其功能见表 2。

表 1 部分与休眠调控相关的代谢途径
Table 1 Part of metabolic pathways related dormancy regulation

KEGG 途径 KEGG pathway	基因数 Number of genes	P 值 P value	组织 Tissue
亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	4	0.0010	DB
嘌呤代谢 Purine metabolism	2	0.0021	DB
α -亚麻酸代谢 Alpha-linolenic acid metabolism	1	0.0099	DB
磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	1	0.0168	DB
肌醇磷酸代谢 Inositol phosphate metabolism	1	0.0184	DB
核糖核酸聚合酶 RNA polymerase	1	0.0185	DB
氨基糖及核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1	0.0212	DB
淀粉及蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	1	0.0252	DB
N-聚糖合成 N-glycan biosynthesis	1	0.0369	DB
核糖体蛋白体 Ribosome	1	0.0379	DB
半胱氨酸及甲硫氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	1	0.0434	DB
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	1	0.0034	D
抗坏血酸代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	1	0.0036	D
类黄酮 Flavonoid biosynthesis	1	0.0072	D
泛醌及类萜醌合成 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	1	0.0083	D
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	1	0.0132	D
二芳基庚烷,姜醇合成 Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	1	0.0261	D
丝裂原激活的蛋白激酶/MAP 激酶 MAPK signaling pathway	1	0.0284	D
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	2	0.0285	D
核糖体蛋白体 Ribosome	1	0.0331	D
苯丙素生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	2	0.0344	D

注: D: 休眠鳞茎; DB: 休眠解除鳞茎。下同。

Note: D: Dormant bulb; DB: Dormancy breaking bulb. The same below.

表 2 百合鳞茎消减文库中部分休眠调控相关的基因片段
Table 2 Part of ESTs involved in dormancy regulation of lily bulbs in SSH libraries

类型 Type	克隆号 Clone No.	登录序号 Accession No.	功能注释 Function annotation	物种 Species	期望值 E-value
蛋白质合成 相关 Protein synthesis	DB 3	XP_003626943.1	70 kD 肽基脯氨酰基异构酶 70 kD peptidyl-prolyl isomerase	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	6E-84
	DB 4	AFW90557.1	60S 核糖体蛋白 L37a 60S ribosomal protein L37a	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	2e-15
	DB 44	XP_003595099.1	60S 核糖体蛋白 L7-4 60S ribosomal protein L7-4	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	8e-12
	DB 55	AFP44118.1	亲环蛋白 Cyclophilin	长筒石蒜 <i>Lycoris longituba</i>	3e-16
	D 9	EMT03009.1	42 kD 肽基脯氨酰基异构酶 42 kD peptidyl prolyl isomerase	山羊草 <i>Aegilops tauschii</i>	7e-104
	D 78	AFW90557.1	60S 核糖体蛋白 L37a 60S ribosomal protein L37a	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	2e-45

续表 2

类型	克隆号	登录序号	功能注释	物种	期望值
Type	Clone No.	Accession No.	Function annotation	Species	E-value
细胞结构相关 Cell structure	DB 90	AAA33906.1	谷蛋白 Glutelin	水稻 <i>Oryza sativa</i>	2e-23
	D 2	ACG28358.1	纤维素蛋白 Fb2 Fiber protein Fb2	玉米 <i>Zea mays</i>	1e-8
	D 10	NP_001152685.1	种子成熟蛋白 Seed maturation protein	玉米 <i>Zea mays</i>	5e-12
	D 57	AAF73008.1	种子贮藏蛋白 Seed storage protein	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	4e-20
细胞抗性 & 防御相关基因 Cell resistance and defence	DB 13	ACS12983.1	2,4 - 二烯酰辅酶 A 还原酶 2,4-dienoyl-CoA reductase	麻风树 <i>Jatropha curcas</i>	9e-87
	DB 15	XP_002523311.1	WD - 重复蛋白 WD-repeat protein	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	9e-47
	DB 27	AAD17336.1	胞内发病原相关蛋白 PR-107 Intracellular pathogenesis-related protein PR-107	麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	4e-79
	D 6	NP_001149550.1	胁迫响应蛋白 Stress responsive protein	玉米 <i>Zea mays</i>	6e-47
	D 22	ACJ11740.1	热激蛋白 70 Heat shock protein 70	陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	9e-173
	D 29	AAD17336.1	胞内发病原相关蛋白 PR-107 Intracellular pathogenesis-related protein PR-107	麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	3e-80
	D 33	XP_002310444.1	谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	6e-23
	D 42	AEX55236.1	晚期胚胎发育蛋白 14-a Late embryogenesis abundant protein lea 14-a	大蒜 <i>Allium sativum</i>	5e-42
	D 48	ADF43731.1	单脱水抗坏血酸还原酶 Monodehydroascorbate reductase	麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	3e-83
	D 80	CAI65403.1	脱水蛋白 Dehydrin	硬质小麦 <i>Triticum durum</i>	4e-41
	D 83	AFK09767.1	干旱及盐胁迫蛋白 Drought and salt tolerance protein	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	7e-15
	D 52	AAR92156.1	假定的半胱氨酸蛋白酶 Putative cysteine protease	鸢尾 <i>Iris × hollandica</i>	5e-45
	DB 12	XP_003631055.1	糖基转移酶 Glycosyltransferase	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	8e-17
	DB 0	AAP04432.1	脂氧合酶 Lipoxigenase	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	2e-23
	DB 1	NP_001234098.1	脂氧合酶 Lipoxigenase	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	2e-55
	DB 18	BAH57745.1	脂氧合酶 Lipoxigenase	软枣猕猴桃 <i>Actinidia arguta</i>	5e-46
代谢相关 Metabolism	DB 66	EMS52413.1	α - 葡萄糖苷酶 AB α -neutral alpha-glucosidase AB	小麦 <i>Triticum urartu</i>	9e-50
	DB 79	AAD09861.1	脂氧合酶 Lipoxigenase	油梨 <i>Persea americana</i>	9e-38
	DB 35	NP_001266910.1	脂肪酸双加氧酶 Fatty acid alpha-dioxygenase	玉米 <i>Zea mays</i>	1e-47
	DB 94	NP_193740.1	尿囊酸氨基水解酶 Allantoate amidohydrolase	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-32
	DB 100	ABM68549.1	糖基转移酶家族相似蛋白 Glycosyltransferase family-like protein	麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	5e-14
	D 25	XP_003626642.1	甘露聚糖内 - 1,4 - β - 甘露糖苷酶 Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	2e-141
	D 24	ABS50433.1	丙二烯氧化酶合成酶 Allene oxidase synthase	天仙子 <i>Hyoscyamus niger</i>	4e-8
	D 40	AAD09861.1	脂氧合酶 Lipoxigenase	油梨 <i>Persea americana</i>	3e-9
	D 65	AAC49386.1	甘露糖结合凝集素前体 Mannose-binding lectin precursor	郁金香 <i>Tulipa hybrid cultivar</i>	2e-16
	Signal DB 17	ADQ38359.1	油菜素固醇信号激酶 Brassinosteroid signaling kinase	陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	6e-16
	DB 34	ABR92615.1	肌糖 1,3,4,5,6 - 戊基磷酸激酶 Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase	玉米 <i>Zea mays</i>	4e-7
	DB 53	XP_003625068.1	赤霉素诱导蛋白 Gibberellin induced protein	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	4e-8
	DB 61	AFW72934.1	ADP 核糖基化因子 ADP-ribosylation factor	玉米 <i>Zea mays</i>	6e-9
	DB 87	ACB32228.1	钙调蛋白 Calmodulin	甜菜 <i>Beta vulgaris</i>	5e-73
	D 30	EOX99605.1	磷脂酰肌醇转移酶家族蛋白异形体 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family Protein isoform	可可 <i>Theobroma cacao</i>	2e-58
	D 71	XP_003626433.1	生长素诱导蛋白 PCNT115 Auxin-induced protein PCNT115	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	2e-34
能量代谢相关 Energy	DB 68	NP_175576.1	ATP 合成酶 ATP synthase subunit epsilon	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-20

续表 2

类型 Type	克隆号 Clone No.	登录序号 Accession No.	功能注释 Function annotation	物种 Species	期望值 E-value
转录相关 Transcription	DB 24	XP_003617082.1	bZIP114 转录因子 BZIP transcription factor bZIP114	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	1e-35
	DB 96	AAZ03985.1	核糖核酸聚合酶 β 链 A polymerase beta' chain	菖蒲 <i>Acorus americanus</i>	7e-14
	D 3	NP_001056834.1	锌指蛋白 R2931 Zinc-finger protein R2931	水稻 <i>Oryza sativa</i>	2e-8
	D 45	EOX95610.1	DHHC 型锌指家族蛋白 DHHC-type zinc finger family protein	可可 <i>Theobroma cacao</i>	2e-19
次生代谢相关 Secondary metabolism	D 47	AAS48417.1	辅酶 A 连接酶 4-coumaroyl-coenzyme A ligase	洋葱 <i>Allium cepa</i>	5e-75
	D 84	AAB80931.1	咖啡酸辅酶 A 甲基转移酶 Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	5e-118
蛋白质降解 相关 Protein degradation	DB 5	CAI77786.1	胰蛋白酶抑制剂 Kunitz trypsin inhibitor	杨树 <i>Populus tremula</i>	2e-32
	DB 77	NP_851116.1	泛素结合酶 E2 Ubiquitin-conjugating enzyme E2	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	7e-66
	DB 85	NP_567089.1	甲硫氨酸胺基肽酶 2B Thionine aminopeptidase 2B	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-12
	DB 91	NP_001130530.1	甲硫氨酸胺基肽酶 Methionine aminopeptidase	玉米 <i>Zea mays</i>	3e-14
	DB 97	NP_001234425.1	S-腺苷甲硫氨酸 S-adenosylmethionine synthase	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	3e-101
	D 5	CAI77795.1	胰蛋白酶抑制剂 Kunitz trypsin inhibitor	欧洲山杨 <i>Populus tremula</i>	5e-30
	D 66	XP_003594399.1	天冬氨酸蛋白酶 Aspartic proteinase nepenthesin	苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	3e-8
	D 23	XP_002519708.1	DNA 结合蛋白 MNB1B DNA-binding protein MNB1B	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	2e-6
分子结合活性 相关 Molecular binding activity					

3 讨论

细叶百合鳞茎休眠属于冬季休眠类型，休眠的建立是和低温适应相伴随的，这一过程中一系列适应性响应基因相继表达。鳞茎防御功能增强，保证了鳞茎内正常的生理代谢。休眠阶段抗胁迫的基因所占比例高于休眠解除时期。本研究中从休眠文库中分离了晚期胚胎发育蛋白基因、脱水素基因、热激蛋白 HSP70 基因等多种抗逆基因及与活性氧清除相关的基因，如单脱水抗坏血酸还原酶基因、谷胱甘肽过氧化物酶基因等。由于脱水素具有高度的水合能力，它与膜脂结合能够阻止细胞内水分大量流失，维持膜结构的水合保护体系，避免由于磷脂双分子层间距减小发生膜融合，防止生物膜结构遭到破坏（张瑞萍，2009）。低温条件下脱水素还能维持过氧化氢酶和 α -淀粉酶的催化活性（Hara et al., 2001; Welling et al., 2004），它可被 ABA 诱导。已有研究表明脱水素基因可能参与了休眠的形成，其在休眠过程中表达量很高，在芽萌发前表达量却显著下降（Yakovlev et al., 2008）。热激蛋白（HSP）是生物体在高温、低温、盐渍、干旱等逆境胁迫下诱导合成的一类应激蛋白。在多种植物中发现热激蛋白基因可被低温诱导，HSP70 能参与蛋白质新生肽的折叠并介导变性蛋白质的复性和降解过程，通过维持细胞内环境的稳定性来保护细胞（Bukau & Horwich, 1998）。本试验中从休眠库中发现 HSP70 与 MAPK（促分裂素原活化蛋白激酶）信号通路相关。p38MAPK 是 MAPK 家族成员之一，可以由细胞外的多种应激包括紫外线、渗透压、热休克、 H_2O_2 和生理应激等激活并作用于相应的转录因子，启动相关基因进行转录。p38MAPK 通路与 c-Jun 氨基末端激酶途径的作用相似，可诱导细胞产生凋亡，HSP70 在细胞凋亡过程中参与了多个信号途径调节节点的调控（Morimoto, 1998）。王莉等（2003）的研究表明体外转染 HSP70 基因可抑制紫外线照射后人胶质瘤 BT-325 细胞 p38MAPK 的表达。因此，在鳞茎休眠过程中 HSP70 很可能通过下调促细胞凋亡相关基因、蛋白和蛋白酶活性起到拮抗细胞凋亡的作用，从而增强抗逆性。在本研究中发现 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因（4-coumaroyl-coenzyme A ligase）和咖啡酸辅酶 A 甲基转移酶（caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase）同时参与苯丙氨酸代谢（Phenylalanine metabolism）途径和苯丙素生物合成（Phenylpropanoid biosynthesis）途径。这些途径产生的类黄酮、木质素等次生物质在植物抗逆境、

抗病害方面有很重要的作用。酚类化合物(如香豆酸、咖啡酸)是植物生长的抑制剂, 酚类物质可能与植物的休眠有关。Benkeblia 和 Shiomi (2004) 指出酚类物质是洋葱鳞茎萌发的抑制物质, 在鳞茎休眠阶段含量较高。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是催化苯丙氨酸脱氨反应形成酚类物质的关键酶。孙红梅等(2004)发现低温解除兰州百合鳞茎休眠过程中鳞茎内酚类物质含量及 PAL 活性则呈上升趋势。植物的休眠过程是受多基因调控的, 在此过程中又有多个代谢途径, 休眠过程中大量基因的表达表明植物的休眠只是生长的暂时停止而非代谢的停止。

低温积累可解除鳞茎休眠, 从休眠解除文库中分离出一批与激素代谢、糖代谢、脂类转换及 ATP 合成酶等能量代谢基因同源的 EST 片段。文库中有 4 个脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)基因参与了亚油酸代谢(linoleic acid metabolism), 1 个脂肪酸双加氧酶(fatty acid α -dioxygenase)参与了 α -亚麻酸代谢(α -linolenic acid metabolism)途径。LOX 具有氧化生物膜的能力, 同时参与种子萌发过程中贮存脂的动员, 已有研究表明特异的 LOX 基因在大豆、大麦、黄瓜种子萌发的早期阶段被诱导(Alexander, 1998)。生物膜是许多特殊酶、离子和激素受体传递的功能位点, 生物膜的许多生物特性是由膜脂组成决定的, 植物的休眠及恢复生长过程中的一些生化反应都与其有关。当需冷量基本满足时, 会引起膜上亚麻酸含量的升高, 亚油酸含量相应降低, 说明亚麻酸不饱和酶活性提高, 同时脂类和半乳糖类的含量迅速提高。膜上一系列生化反应如亚油酸转换成亚麻酸要求大量的还原力和活性氧, 会导致过氧化物、超氧阴离子等有毒物质大幅度增加, 相应的清除有毒物质的酶系统被激活, 各种酶在休眠解除前后活性升高, 膜功能逐渐恢复(杨琳, 2005)。百合鳞茎休眠解除过程中涉及一系列物质能量代谢, 淀粉降解, 可溶性糖含量升高。Azusa 等(2006)指出风信子鳞茎休眠解除过程中 α -淀粉酶基因表达上调。本试验中从休眠解除文库中分离了 α -葡萄糖苷酶、糖基转移酶、ATP 合成酶等糖代谢相关基因。糖基转移酶参与了淀粉及蔗糖代谢和氨基糖及核苷酸糖代谢过程。Gévaudant 等(2001)研究表明 ATP 酶 α 亚基基因的表达上调与休眠解除阶段能量代谢的增强有关, 花生种子在休眠解除阶段也出现 ATP 酶的积累(Perl et al., 1982), 芽中糖类的转运通常认为是依赖 H^+ -ATPase 产生的 pH 值梯度(刘柏林, 2011), 说明 ATP 酶基因与糖代谢密切相关, 保证鳞茎休眠解除及萌发所需的能量供应。本研究中分离了部分与信号转导相关的基因, 如赤霉素诱导蛋白基因、钙调蛋白、ADP 核糖基化因子、肌醇多磷酸激酶等。赤霉素作为关键的信号分子在休眠解除过程中起着关键的作用, 已证实 GA 合成酶基因在休眠解除时表达(Horvath et al., 2003)。钙调素是植物细胞中胞内 Ca^{2+} 最重要的多功能受体蛋白。钙调素活化后与其靶蛋白中的短肽序列结合, 才能诱发其结构变化, 从而调控植物的细胞分裂、伸长、生长、发育和抗逆等(Sanders et al., 1999)。ADP 核糖基化因子(ADP-ribosylation factor)对蛋白质合成后的运输发挥作用并调控细胞的信号转导(Memon et al., 1993)。本研究中这些信号转导基因在休眠解除时上调表达, 推测其可能对鳞茎的破眠及发芽过程中信号转导起重要作用。

休眠的形成及休眠解除的调控过程不是某一类基因上调的结果, 而是植物体内各个系统相互协调及其代谢通路上相关基因在不同阶段有序的选择性表达过程。这些 EST 的获得为筛选候选基因及后续的基因克隆提供了丰富的材料。如热激蛋白 HSP70 基因、赤霉素诱导蛋白基因、ADP 核糖基化因子等可以作为候选基因克隆全长, 进行后续试验。

References

- Alexander Grechkin. 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research*, 37 (5): 317 - 352.
- Azusa Sato, Hiroshi Okubo, Kazuyuki Saitou. 2006. Increase in the expression of an α -amylase gene and sugar accumulation induced during cold period reflects shoot elongation in Hyacinth bulbs. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131: 185 - 191.
- Benkeblia V, Shiomi N. 2004. Chilling effect on soluble sugars respiration rate, total phenolics, peroxidase activity and dormancy of onion bulbs.

- Scientia Agricola, 61 (3): 281 – 285.
- Bukau B, Horwich A L. 1998. The HSP70 and HSP60 chaperone machines. Cell, 92 (3): 351 – 366.
- Frewen B E, Chen T H H, Howe G T. 2000. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in populus. Genetics, 154: 837 – 845.
- Gévaudant F, Petel Q, Guilliot A. 2001. Differential expression of four members of the gene family during dormancy of vegetative buds of peach trees. Planta, 212: 619 – 626.
- Hara M, Terashima S, Kuboi T. 2001. Characterization and cryoprotective activity of cold responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. Journal of Plant Physiology, 158: 1333 – 1339.
- Horvath D P, Anderson J V, Chao W S, Foley M E. 2003. Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy. Trends in Plant Science, 8: 534 – 540.
- Huang X, Zhu W, Dai S L. 2008. The involvement of mitochondrial phosphate transporter in accelerating bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Planta, 228: 545 – 552.
- Liu Bai-lin. 2011. Construction of suppression subtractive hybridization cDNA library and cloning of genes related to potato tuber dormancy and sprouting[M. D. Dissertation]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. (in Chinese)
- 刘柏林. 2011. 马铃薯块茎休眠与发芽抑制差减 cDNA 文库构建及相关功能基因克隆[硕士论文]. 兰州: 甘肃农业大学.
- Liu Bailin, Zhang Ning, Wen Yikai, Si Huaijun, Wang Di. 2012. Identification of differentially expressed genes in potato associated with tuber dormancy release. Molecular Biology Reports, 39: 11277 – 11287.
- Memon A R, Clark G B, Thomson G A J. 1993. Identification of an ARF type low molecular mass GTP-binding protein in pea (*Pisum sativum*). Biochemical and Biophysical Research Communications, 193: 809 – 813.
- Morimoto R I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Development, 12 (13): 3788 – 3796.
- Mu Yong-chao, Cui Hong, Yu Jing, Cang Jing, Zeng Yan, Meng Jian-nan. 2011. Expression analysis of three genes from SSH library constructed using tillering nodes of Dongnongdongmai 1 under low temperature. Acta Agronomica Sinica, 37 (5): 918 – 923. (in Chinese)
- 牟永潮, 崔红, 于晶, 苍晶, 曾俨, 孟健男. 2011. 低温胁迫下东农冬麦 1 号分蘖节 SSH 文库的构建及文库中 3 个基因的表达模式. 作物学报, 37 (5): 918 – 923.
- Perl M. 1982. ATP accumulation in peanut seeds during seed ripening and during the dormancy breaking process. Journal of Experimental Botany, 33: 449 – 455.
- Sanders D, Brownlee C, Harper J. 1999. Communicating with calcium. Plant Cell, 11 (4): 691 – 706.
- Sun Hong-mei, Li Tian-lai, Li Yun-fei. 2004. Changes of phenols content and activity of enzymes related to phenols in lily bulbs stored at different cold temperatures for breaking dormancy. Scientia Agricultura Sinica, 37 (11): 1777 – 1782. (in Chinese)
- 孙红梅, 李天来, 李云飞. 2004. 低温解除休眠过程中兰州百合鳞茎酚类物质含量及相关酶活性变化. 中国农业科学, 37 (11): 1777 – 1782.
- Wang Li, Li Qing, Zhang Feng, Guo Bin, Guo Ai-lin, Ye Jing, Lin Sheng-cai, Fan Dai-ming. 2003. Effects of transfected HSP70 on p38MAPK signal pathway. The Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research, 2 (1): 43 – 46. (in Chinese)
- 王莉, 李青, 张丰, 郭斌, 郭爱林, 叶菁, 林圣彩, 樊代明. 2003. 转染热休克蛋白 70 对 p38MAPK 信号通路的影响. 中华神经外科疾病研究杂志, 2 (1): 43 – 46.
- Welling A, Rinne P, Vihera-Aarnio A, Kontunen-SoPPela S, Heino P, Palva E T. 2004. Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). Journal of Experimental Botany, 55: 507 – 516.
- Yakovlev I A, Asante D K, Fossdal C G, Partanen J, Junttila O, Johnsen O. 2008. Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce. Planta, 228: 459 – 472.
- Yang Lin. 2005. Studies on chilling requirement of lily bulbs in dormancy[M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 杨琳. 2005. 百合鳞茎休眠过程中需冷量的研究[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Zhang Rui-ping. 2009. Study on expression pattern of *ThDHN* responding to different abiotic stress and establishment of genetic transformation of *Betula platyphylla*[Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 张瑞萍. 2009. 脱水素基因逆境表达模式与白桦遗传转化研究[博士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学.