

乙烯利调控甘蔗生长前期基因表达初报

魏源文^{1,3}, 胡春锦², 邓智年^{1,3}, 李杨瑞^{1*}

(1. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007; 2. 广西农业科学院
植物保护研究所, 南宁 530007; 3. 广西大学农学院, 南宁 530005)

摘要: 在甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)生长前期分别叶面喷施 200 mg L⁻¹ 乙烯利和清水, 利用 cDNA-AFLP 技术分析甘蔗经不同处理后体内基因表达的差异情况, 以期通过对差异表达基因进行序列分析和功能分析, 探讨乙烯利调控甘蔗生长的分子机理。结果表明: 经乙烯利处理后的甘蔗叶片, cDNA-AFLP 的扩增产物多态性丰富, 基因表达差异显著; 部分差异片断序列与抗病、抗逆及促进光合作用等相关基因具有较高的同源性。

关键词: 甘蔗; 乙烯利; cDNA-AFLP; 基因差异表达

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)04-0290-04

Differential Gene Expression in Sugarcane Leaves Regulated by Ethephon during Early Growth Stage

WEI Yuan-wen^{1,3}, HU Chun-jin^{2,3}, DENG Zhi-nian^{1,3}, LI Yang-rui^{1*}

(1. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab., Nanning 530007, China; 2. Plant Protection Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 3. Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: A study was conducted to investigate differential gene expression in sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv. ROC16) leaves subjected to 200 mg L⁻¹ ethephon. cDNA-AFLP amplification showed a high level of polymorphism, and gene expression was significantly different compared with the control. Some sequences of different expression fragments were highly homologous to disease-resistant and photosynthesis-associated genes.

Key words: Sugarcane; Ethephon; cDNA-AFLP; Differential gene expression

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)是我国主要的糖料作物、重要能源作物和新兴的饲料作物。在 2003-2004 年榨季, 我国甘蔗蔗糖产量已占到总产糖量的 94%左右^[1]。在甘蔗育种过程中, 无论培育糖料蔗、能源甘蔗还是饲料甘蔗, 高产高糖依然是育种的最重要指标。现有研究表明, 在甘蔗的不同生长期用不同浓度的乙烯利对甘蔗的生长和糖分积累进行调控, 可以促进分蘖, 提高光合作用、产量及蔗糖分, 增强植株抗病抗逆性^[2-6]。为了探讨乙烯利在调控甘蔗生长中有哪些关键的基因的表达受到影响, 本研究拟利用 cDNA-AFLP 技术, 分析处于生长前

期的甘蔗在乙烯利作用下体内基因的差异表达, 为进一步研究乙烯利诱导下甘蔗生长前期体内基因的差异表达与促进甘蔗分蘖、提高光合作用及增强抗病抗逆性的关系提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

以生长 40 d, 约 4-5 片叶, 处于分蘖前期的甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)品种新台糖 16 号(ROC16)植株为材料, 分别以 200 mg L⁻¹ 的乙烯利

收稿日期: 2006-08-04 接受日期: 2007-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(39860039); 广西科技能力创新与条件建设项目(桂科能 0630006-5F)资助

* 通讯作者 Corresponding author

进行叶面喷施,并于处理 6 h、12 h 和 24 h 后,分别取 +1 叶(叶片刚刚完全抽出,能看到完整的肥厚带)或 +2 叶(为 +1 叶前抽出的叶)为材料。每次取 3 株,等量混合以用于总 RNA 的提取。以清水喷施处理为对照。

1.2 RNA 的分离及 cDNA 合成

用 Trizol 法少量提取总 RNA。在进行氯仿抽提前,在 $12\ 000\times g$ 下对甘蔗组织和 Trizol 混合物离心 5 min,去除甘蔗组织,余下操作主要参照 Trizol 产品手册进行。

cDNA 第一链合成参照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 说明手册的方法进行。cDNA 第二链的合成综合王关林等^[7]和 Breyne 等^[8]的方法,在 DNA Polymerase I、RNase H 和 *E. coli* DNA Ligase 等共同作用下置换合成。

1.3 cDNA-AFLP 分析

建立以 *Ase* I 和 *Taq* I 为工具酶的 AFLP 反应体系,进行 cDNA-AFLP 分析所用接头和引物由大连宝生物工程有限公司合成,序列如下:

Ase I 接头: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3';
5'-TAGGTACGCAGTCTAC-3';

Ase I 预扩增引物: 5'-CTCGTAGACTGCGTACCCTAAT-3';

Ase I 选择性扩增引物: 5'-GACTGCGTACCTAATNN-3',其中 N 为 ATCG 中的任意一种,选择性扩增引物 A4-A19 共 16 条;

Taq I 接头: 5'-GACGATGAGTCCTGAC-3';
5'-CGGTCAGGACTCAT-3';

Taq I 预扩增引物: 5'-GACGATGAGTCCTGACCGA-3';

Taq I 选择性扩增引物: 5'-GATGAGTCCTGACCGANN-3' (N 为 ATCG 中的任意一种,选择性扩增引物 T4-T19 共 16 条)。

cDNA-AFLP 分析参照邹喻苹等^[9]和 Bachem 等^[10]的方法进行。cDNA-AFLP 扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,参照 Promega GenePrint 所报道的银染检测方法建立银染体系并进行银染反应。通过扫描仪记录 cDNA-AFLP 产物电泳结果。

2 结果和分析

2.1 乙烯利对甘蔗根系生长的影响

与对照相比(图 1),叶面喷施 $200\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ 乙烯

利的甘蔗经过约 25 d 生长后,乙烯利处理的甘蔗须根变长、数量增多,且多数都比对照提前发生分蘖。

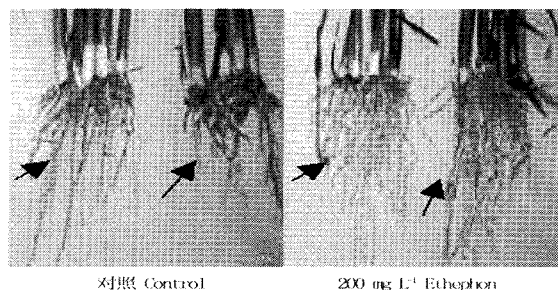


图 1 乙烯利处理对甘蔗根系生长的影响

Fig. 1 Effect of ethephon on sugarcane roots

2.2 甘蔗总 DNA 的提取

利用 Trizol 提取甘蔗叶片总 RNA 过程中,先经过高速离心去除甘蔗组织后,再进行氯仿抽提,所获得的总 RNA 中多糖等物质含量明显减少(图 2),能满足进行 cDNA 合成的需要。

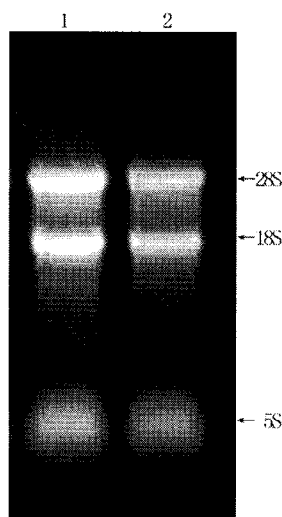


图 2 总 RNA 的电泳检测

Fig. 2 Electrophoresis of the total RNA extracted from sugarcane leaves

2.3 cDNA-AFLP 分析

从 256 对引物组合中随机选出 128 对分别对叶面喷施乙烯利和清水的甘蔗进行 cDNA-AFLP 分析,重复两次。聚丙烯酰胺变性凝胶电泳结果显示:每次反应扩增条带的总数在 35-80 之间,在所有 PCR 反应中能稳定出现的条带约有 12 859 条。在这些稳定存在的条带当中,不同引物组合之间所反映出来的多态性条带数量差异较大(图 3)。

差异片段的序列分析结果显示:部分转录获得片段(TDFs)分别与几丁质酶基因、谷胱甘肽转移酶

基因、生长素诱导蛋白基因以及玉米核结合蛋白基因(MIN1b)等基因相类似(表1)。

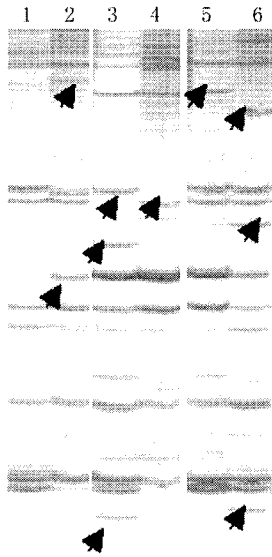


图3 甘蔗叶片 cDNA-AFLP 分析

Fig. 3 Amplification of RNA extracted from sugarcane leaves by using cDNA-AFLP

1,3,5: 对照,分别为叶面喷施清水后 6、12、24 h; 2,4,6 分别为叶面喷施 200 mg L⁻¹ 乙烯利后 6、12、24 h。1, 3 and 5: Control, leaves were sprayed water for 6, 12 and 24 h, respectively, while 2, 4 and 6: sprayed with 200 mg L⁻¹ ethephon for 6, 12 and 24 h, respectively.

3 讨论

cDNA-AFLP 技术可通过引物的选择性扩增来表现研究对象在不同时间或不同处理条件下 cDNA (即 mRNA) 之间的差异,具有可靠性高、重复性好的特点。本研究在利用该技术分析乙烯利诱导下甘蔗生长前期基因表达差异的过程中,大多数电泳图谱显示出丰富的差异转录片段。这可能一方面说明了乙烯在调控植物生长过程中,诱导了一大批基因的表达;另一方面,处理和对照之间原本在生理状态上的差异,也是导致大量基因差异表达的重要原因之一。在提高处理和对照材料之间的均一度的同时,采取同一处理多株采样,构建混合样品池,并结合使用 Northern 杂交验证等手段是减少假阳性条带的有效手段。

在初步研究结果中,部分差异片段的序列与编码 GST、CHI、ARP (auxin-responsive protein)、MIN1b 等蛋白的基因具有较高的同源性。由此初步推测:编码 GST、CHI、ARP、MIN1b 等蛋白基因的表达,或许与乙烯利调控甘蔗生长,诱导产生促进生

表 1 部分差异片段序列分析结果

Table 1 Sequence analysis of partial differential transcript derived fragment (TDF)

序号 No.	大小 Size (bp)	NCBI接受号 Access number	已鉴定的蛋白质 Protein identified	E-value	200 mg L ⁻¹ ethephon			H ₂ O		
					6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
1	437	AY532766.1 (<i>Zea diploperennis</i>)	几丁质酶 I Chitinase (chiI)	2e-36		*				
2	334	AF244677 (<i>Z. mays</i>)	谷胱甘肽S转移酶 Glutathione S-transferase	5e-33	*					
3	285	NM197907.1 (<i>Oryza sativa</i>)	-	1e-82					*	
4	284	X66077.1 (<i>Z. mays</i>)	DNA结合蛋白 DNA-binding protein	1e-39						*
5	268	X79211.1 (<i>Z. mays</i>)	生长素诱导蛋白 Auxin-induced protein	1e-31						*
6	193	X13908.1 (<i>O. sativa</i>)	叶绿素a/b结合蛋白 Light harvesting chlorophyll a/b-binding protein	7e-31						*
7	187	XM468119.1 (<i>O. sativa</i>)	-	2e-31					*	
8	401	-	-	-		*				
9	306	-	-	-						*

-: 没有已知功能的蛋白 No identified protein; *: 有该差异片段出现 The differential TDF appeared.

长、提高光合作用、增强抗病抗逆性等生理效应存在一定的关系。至于它们在乙烯利调控甘蔗生长中的确切贡献, 还有待于利用 Northern 杂交或 Real time PCR 等技术手段做进一步研究和证明。

参考文献

- [1] Li Y R. China: An emerging sugar super power [J]. Sugar Techn, 2004, 6(4):213-227.
- [2] Li Y R, Solomon S S. Ethephon: a versatile growth regulator for sugar industry [J]. Sugar Techn, 2003, 5(4):213-223.
- [3] Li Y J(李永健), Yang L T(杨丽涛), Li Y R(李杨瑞), et al. Influence of ethephon sprayed at different stages on growth, agronomic traits and drought resistance of sugarcane [J]. Sugarcane(甘蔗), 2002, 9(1):12-18.(in Chinese)
- [4] Xing Y X(邢永秀), Yang L T(杨丽涛), Li Y R(李杨瑞). Effect of ethephon on respiratory exchange in different sugarcane varieties [J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 2002, 23(3):66-72.(in Chinese)
- [5] Liao F(廖芬), Lin J Z(林鉴钊), Li Y R(李杨瑞), et al. Effects of ethephon on the leaf microstructure related to drought-resistance in sugarcane [J]. SW China J Agri Sci(西南农业学报), 2003, 16(2):45-48.(in Chinese)
- [6] Liao W Z(廖维政), Li Y R(李杨瑞), Lin Y K(林炎坤), et al. Effects of ethephon applied at different times of late growth stage on ripening of sugarcane [J]. SW China J Agri Sci (西南农业学报), 2003, 16(4):60-64.(in Chinese)
- [7] Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, et al. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies [J]. Mol Genet Genom, 2003, 269(2):173-179.
- [8] Wang G L(王关林), Zhang H Y(张宏筠). Plant Gene Engineering [M]. Beijing: Science Press, 2002:750.(in Chinese)
- [9] Zhou Y P(邹喻莘), Ge S(葛颂), Wang X D(王晓东). Molecular Marker of Systematic & Evolutionary Botany [M]. Beijing: Science Press, 2001:111-117.(in Chinese)
- [10] Bachem C W B, Oomen R J F J, Visser R G F, et al. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol [J]. Plant Mol Biol Rep, 1998, 16:157-173.
- [11] Yanagisawa S, Izui K. Multiple interactions between tissue-specific nuclear proteins and the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene for C_4 photosynthesis in *Zea mays* [J]. Mol Gene Genet, 1990, 224:325-332.