

文章编号:1000-8551(2011)06-1142-06

文心兰 cDNA-AFLP 体系的建立及 TDFs 分析

龚茂江 田 敏 王彩霞

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所,浙江 富阳 311400)

摘要:通过总 RNA 提取、cDNA 合成等试验,建立 cDNA-AFLP 分析体系。结果表明,采用 *Mse* I 和 *Eco*R I 酶切 3h,预扩增产物稀释 15 倍作为选择性扩增模板,利用筛选的引物进行扩增,可获得丰度和多态性较高的指纹图谱。利用 59 对引物获得约 1160 条 TDFs (Transcription-derived fragments)。回收、克隆其中 128 条进行测序,获得 102 条可读序列,GenBank 登陆号为 JG014357 ~ JG014458。BLASTN/X 同源比对发现,87% 的条带在 NCBI 数据库中能找到功能已知的同源序列;其中 2 条 TDFs 分别可能与文心兰子房发育 (TDF0073a) 和花器官挥发性香味物质合成 (TDF0139a) 相关。序列分析表明 TDFs 对应基因的功能涉及植物生命活动的诸多领域。cDNA-AFLP 分析体系的建立及 TDFs 序列分析为进一步克隆花发育相关基因,研究文心兰花发育相关分子调控机制奠定了基础。

关键词:文心兰;cDNA-AFLP;引物筛选;TDFs

ESTABLISHMENT OF A cDNA-AFLP SYSTEM IN *Oncidium* Orchid AND TDFs ANALYSIS

GONG Mao-jiang TIAN Min WANG Cai-xia

(Subtropical Forestry Research Institution, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400)

Abstract: The cDNA-AFLP analysis system was established in *Oncidium* Milliongolds with young leaves and flower buds as materials after a series of work, including total RNA extraction, mRNA isolation, single-and double-strand cDNA synthesis, *Mse* I and *Eco*R I digestion, etc. . The results indicated that the ds-cDNA was digested completely by *Mse* I and *Eco*R I in 3h. The fingerprint map with high abundance ratio and polymorphism was obtained when the ligation products were used as templates for pre-amplification directly and 15 times-diluted pre-amplification products for selective amplification, using the 114 primer pairs that were gained by screening all 576 primer pairs, as selective amplification primers. Approximately a total of 1160 transcription-derived fragments (TDFs) were generated with 59 primer pairs. Among these TDFs, 128 were sub-cloned and sequenced, and 102 readable sequences were produced. The sequences were submitted to the dbEST in NCBI, and the GenBank accession numbers are JG014357 ~ JG014458. BLASTX/N analysis showed that 87% of them had identity genes with functions already known. The TDF0073a is probably involved in ovary development, and TDF0139a is likely to play a role in floral fragrance diffusing. Sequence analysis revealed that the floral differentially expressed genes had putative functions involved in many different fields of plant metabolic activity. The establishment of the cDNA-AFLP system and sequence analysis the TDFs in *Oncidium* can provide a platform for cloning the genes that involved in flower development and further understanding of the molecular mechanisms underlying flower development.

Key words: *Oncidium*; cDNA-AFLP; primer screening; TDFs

收稿日期:2010-11-30 接受日期:2011-08-19

基金项目:国家林业局 948 项目 (NO. 2008-4-25),浙江省自然科学基金 (NO. Y3100272)

作者简介:龚茂江(1983-),男,江西萍乡人,硕士,主要从事花发育分子生物学方面的研究。E-mail: gmj0718joe@163.com

通讯作者:田 敏(1974-),女,河南新乡人,博士,副研究员,主要从事花卉育种及分子生物学研究。Tel: 0571-63105077; E-mail: tmin115@

163.com

cDNA-AFLP (cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism) 是 Bachem 等^[1,2]发明的一种将 AFLP 应用于 mRNA 表达差异分析的技术,具有可靠性强、灵敏度高、重复性好,无需预先了解序列信息等优点,可对生物体转录组进行全面、系统的分析,是寻找差异表达基因的有效手段^[3]。利用 cDNA-AFLP 技术, Goupil 等^[4]分析了菊苣营养生长早期根增粗过程中的差异表达基因,并获得了 2 个在该过程中高度表达的基因片段。Hsu 等^[5]比较分析了蝴蝶兰野生型和体细胞无性系变异植株花芽中基因表达的类型,发现了 5 条在野生型植株中特异表达的 TDFs 和 2 条在体细胞无性系变异植株中特异表达的 TDFs。唐美玲等在珠眉海棠^[6]、山葡萄^[7]等多种植物中建立了稳定的 cDNA-AFLP 分析体系。

兰科是被子植物中高度进化的类群之一,其花形独特,1 枚花瓣特化为唇瓣,雄蕊与雌蕊合生形成蕊柱。这种高度特化的繁殖器官为人们发现新的变异基因以及研究花形态建成中不同水平、层次的遗传调控提供了极好的材料。文心兰作为兰科的成员之一,具有典型的兰科植物花结构特点。本研究以文心兰花芽为试材,建立了稳定的 cDNA-AFLP 分析体系,获得了高质量的指纹图谱并对 TDFs 进行序列分析,以期为进一步克隆花发育相关基因,揭示花发育过程中的分子调控机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以富阳绿园园艺公司的文心兰品种‘百万金币’(*Oncidium* ‘Milliongold’)为材料。依据本实验室对文心兰花芽进行显微镜形态观察的结果,将不同大小的花芽分成 5 个发育阶段:(1)直径小于 1mm 的花芽处于花蕾原基分化期;(2)直径 1~2mm 的花芽主要进行花被原基的分化;(3)直径 2~3mm 的花芽处于合蕊柱形成期;(4)直径 3~5mm 的花芽处于花粉块形成期;(5)直径大于 5mm 的花芽中,花器官原基快速生长增大,直至盛开。将不同发育阶段的花芽采下后液氮速冻,并保存于 -80℃ 备用。同时采集嫩叶用于对照分析。

1.2 方 法

1.2.1 初级模板制备 取不同发育阶段等量混合的花芽和嫩叶各 3~5g,天泽柱式植物 RNA_{OUT} 2.0 试剂盒提取总 RNA。采用 PolyATtract mRNA Isolation Systems 试剂盒分离 mRNA。cDNA 的合成采用

Universal Riboclone cDNA Synthesis System 试剂盒。双酶切采用 *Mse* I 和 *Eco*R I,反应体系(50μl):10 × *Eco*R I Buffer 5μl, cDNA 20μl, *Mse* I 10U, *Eco*R I 20U,100 × BSA 0.5μl, ddH₂O 定容至 50μl。37℃ 温育 3h,65℃ 温育 20min 终止反应。*Eco*R I 接头 ADE 序列为 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-CTGACGCATGGTTAA-5'; *Mse* I 接头 ADM 序列为 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/3'-TACTCAGGACTCAT-5'。接头连接体系(20μl):T₄ DNA Ligase Buffer 2μl, ADE 和 ADM (10μmol/L)各 0.5μl, T₄ DNA Ligase 400U, cDNA 酶切产物 16μl,室温 30min。

1.2.2 次级模板制备 以连接产物为模板,用与接头互补的引物 M00/E00 进行预扩增。扩增体系(50μl):10 × LA PCR Buffer 5μl, MgCl₂ (25mmol/L) 5μl, dNTP (各 2.5mmol/L) 8μl, cDNA 模板 5μl, 引物 M00(5'-GATGAGTCTGAGTAA-3')/E00 (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') (10μmol/L) 各 1μl, LA Taq 2.5U, ddH₂O 定容至 50μl;反应程序(BIO-RAD C1000™, Thermal Cycler):94℃ 预变性 3min;94℃ 变性 30s,56℃ 退火 60s,72℃ 延伸 60s,35 个循环;72℃ 延伸 7min。预扩增产物稀释 15 倍作为次级模板。

1.2.3 选择性扩增引物筛选和选择性扩增 引物筛选扩增体系(50μl):10 × Buffer 5μl, MgCl₂ (25mmol/L) 3μl, dNTP (各 2.5mmol/L) 4μl, 模板 1.5μl, 引物 MNN(MOO + NNN)/ENA(E00 + NNN) (N 代表任意碱基) (10μmol/L) 各 1.5μl, rTaq 0.25μl, ddH₂O 定容至 50μl;采用 Touch Down PCR 反应程序:95℃ 预变性 4min,前 13 个循环为 95℃ 30s;65℃ 30s;72℃ 60s;退火温度每个循环降低 0.7℃,后 24 个循环为 95℃ 30s;56℃ 30s;72℃ 60s。

利用筛选的引物对和次级模板进行选择性扩增。选择性扩增体系和反应程序与引物筛选时相同。6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物,银染显色。

1.2.4 TDFs 的回收及测序 将聚丙烯酰胺凝胶上 100~1000bp 之间的 TDFs (Transcription derived fragments) 切下,水煮法回收。用相应引物进行再扩增,扩增体系与选择性扩增相同。反应程序为 95℃,5min;95℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 60s,40 个循环;72℃ 10min。再扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, AxyPrep™ DNA Gel Extraction 试剂盒回收条带,回收产物连接 pGEM-T Easy Vector (Promega) 载体,转化 DH5α 大肠杆菌。经蓝白斑筛选,菌落 PCR 鉴定,取阳性克隆测序。测序结果进行 BLASTN/X 分析。

2 结果与分析

2.1 文心兰 cDNA-AFLP 分析体系的建立

2.1.1 初级模板制备 总 RNA 具有 28S、18S 和 5.8S 3 条带 (图 1-A); OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8 ~ 2.0 之间, 表明总 RNA 完整性和纯度较好。mRNA 电泳呈弥散条带, 分子量范围在 500 ~ 3000bp 之间 (图 1-B)。单链和双链 cDNA 合成都能检测到产物 (图 1-C), 表明反转录成功。双酶切产物均匀分布于 100 ~ 1500bp 之间 (图 1-D), 无大分子 DNA。说明酶切 3h 已将 cDNA 充分消化, 能够满足后续试验的要求。

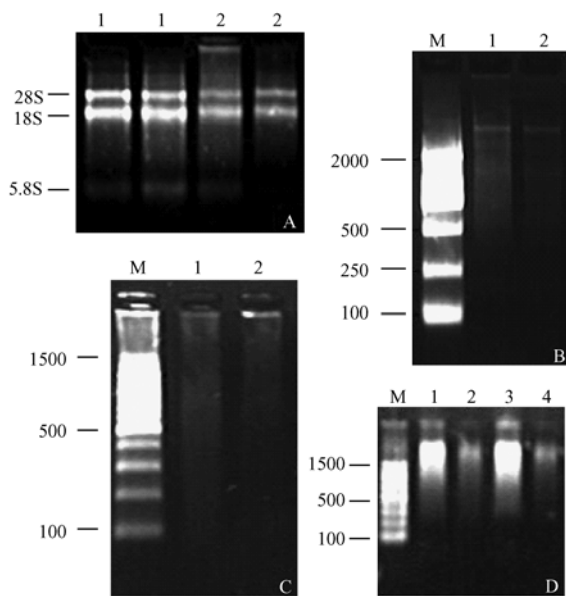


图 1 初级模板制备

Fig. 1 The preparation of primary template

A: 总 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳检测; B: mRNA 分离, 1: 花芽; 2: 叶片; C: cDNA 单链及双链合成, 1: 花芽第一链 cDNA; 2: 花芽双链 cDNA; 3: 叶片第一链 cDNA; 4: 叶片双链 cDNA; D: 双酶切琼脂糖凝胶电泳检测, 1: 花芽; 2: 叶片; M: DNA marker
A: Detection of total RNA extraction by 1% agarose gel electrophoresis; B: The result of mRNA isolation, 1: mRNA from flower buds; 2: mRNA from leaves; C: Synthesis of single-/double-strand cDNA, 1: first-strand cDNA of flower buds; 2: double-strand cDNA of flower buds; 3: First-strand cDNA of leaves; 4: double-strand cDNA of leaves; D: Agarose gel electrophoresis of the digested cDNA, 1: the digested cDNA of flower buds; 2: the digested cDNA of leaves; M: DNA marker

2.1.2 次级模板制备 由图 2 可见, 扩增产物分布在 100 ~ 2000bp 范围内, 且在 500 ~ 750bp 范围内扩增信号较强, 说明预扩增能够为选择性扩增提供良好的模板。将预扩增产物稀释 15 倍作为次级模板。

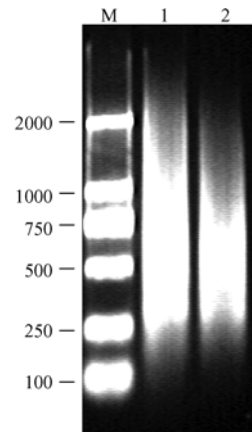


图 2 预扩增产物电泳检测

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the pre-amplified products

1: 花芽 cDNA 预扩增产物; 2: 叶片 cDNA 预扩增产物;

M: DL2000 DNA marker

1: the pre-amplified products of flower bud cDNA; 2: the pre-amplified products of leaf cDNA, M: DNA marker DL2000

2.1.3 引物筛选及选择性扩增 以 100 ~ 2000bp 分子量范围内有 20 条以上扩增条带的引物对作为选择性扩增引物, 经筛选有 114 对引物符合要求。扩增产物经 PAGE 分离, 结果如图 3, 可见产物条带可分为 3 种类型: (i) 在叶片和花芽中都有表达; (ii) 只在花芽中表达, 而在叶片中不表达; (iii) 只在叶片中表达, 而在花芽中不表达。说明利用筛选的引物能够获得条带丰富、多态性高的指纹图谱。

2.1.4 TDFs 回收及测序 图 4-A 为引物 E + ATC/M + GCT 的 4 条 TDFs 再扩增结果, 4 个条带都有特异扩增产物, 说明再扩增体系可行。经蓝白斑筛选, 培养基平板上白色菌落占 80% 以上, 转化效率较高。菌落 PCR 检测结果表明白色菌落中大多数是带有目的 TDFs 片段的阳性克隆 (图 4-B), 可用于测序。

2.2 TDFs 分析

利用 59 对引物进行 cDNA-AFLP 分析, 共获得约 1160 条 TDFs, 平均每对引物约扩增出 20 条, 长度在 100 ~ 1000bp 之间。其中 98 条分别为花芽 (67 条) 和叶片 (31 条) 中的差异表达条带, 占总条带数的 8.4%。将 128 条 TDFs 进行回收、克隆、测序, 得到 102 条可读序列。BLASTX/N 比对结果显示, 100 条 TDFs 在 NCBI 数据库中能找到具有较高同源性的序列, 其中 11 条有同源序列但功能未知; 另外 2 条 TDFs 在已知数据库中找不到同源序列。后者可能代表了文心兰中新的未知功能基因, 有待进一步分析。将所测序列提交至 NCBI 数据库 dbEST, GenBank 登录号为

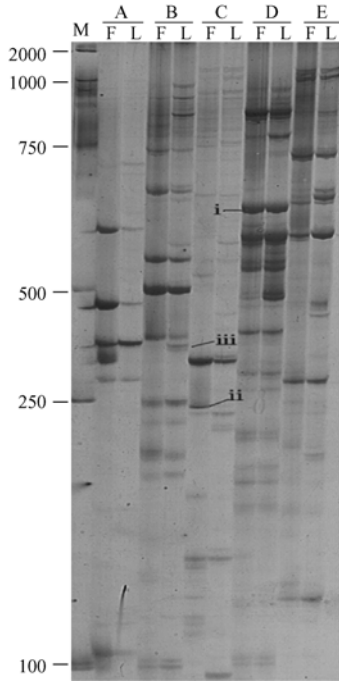


图3 选择性扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig.3 Isolation of selective amplification products by PAGE

A: 引物 E + GAT/M + GCA; B: 引物 E + ATC/M + GTC; C: 引物 E + ACT/M + TAG; D: 引物 E + TAC/M + AGC; E: 引物 E + TCA/M + CGT; F: 花芽 cDNA 选择性扩增产物; L: 叶片 cDNA 选择性扩增产物; M: DL2000 DNA Marker; i: 在花芽和叶片中都有表达的条带; ii: 在花芽中有表达,在叶片中没有表达的条带; iii: 在叶片中有表达,在花芽中没有表达的条带
A: primer E + GAT/M + GCA; B: primer E + ATC/M + GTC; C: primer E + ACT/M + TAG; D: primer E + TAC/M + AGC; E: primer E + TCA/M + CGT; F: Selective amplifying products of flower buds cDNA; L: Selective amplifying products of leaves cDNA; M: DNA Marker DL2000; i: TDFs visualized both in flower buds and leaves; ii: TDFs visualized in flower buds only; iii: TDFs visualized in leaves only

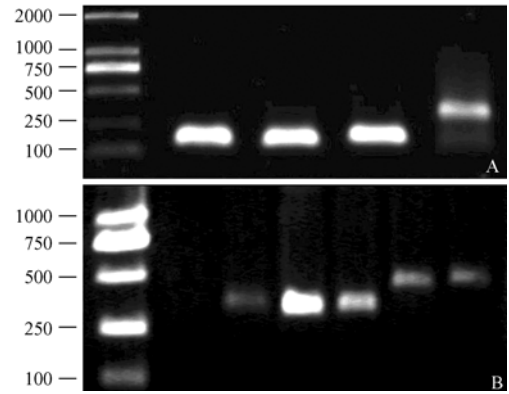


图4 TDFs 回收后扩增(A)及菌落 PCR 检测(B)
Fig.4 Amplification of TDFs excised from polyacrylamide gel(A) and confirming T-vector single insertion by PCR detection (B)

JG014357 ~ JG014458。表 1 展示了部分 TDFs 的 GeneBank 登录号、序列长度及同源性。

依据 BLASTN/X 同源性比对的结果,将 TDFs 分成 13 类,包括代谢、细胞运输及传输、逆境应答、信号转导等(图 5)。在这些序列中,功能已知的序列占 87%,其中占份额较大的是代谢相关基因(25%)和信号转导相关的基因(23%)。

3 讨论

3.1 文心兰 cDNA-AFLP 体系建立

高质量的总 RNA 是 cDNA-AFLP 分析的关键之一。本实验采用试剂盒法提取的总 RNA 纯度和完整性较高,能满足 cDNA-AFLP 分析要求。内切酶的选择是 cDNA-AFLP 技术的另一重要环节。理想的内切酶组合应包含一个稀有位点酶和一个非稀有位点酶,识

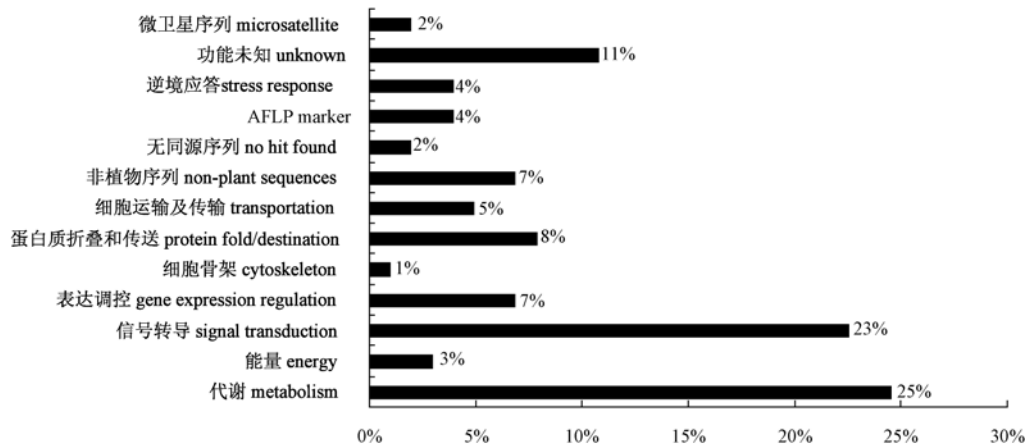


图5 TDFs 功能分类
Fig.5 Functional classification of TDFs

表 1 部分 TDFs 的 GenBank 登录号、序列长度及同源性比对结果

Table 1 GenBank accession numbers and fragment sizes of TDFs, along with their homology

TDF 编号 TDF No.	登录号 GenBank accession	长度 length (bp)	同源序列 (GenBank 登录号) homology to gene (GenBank accession No.)	生物来源 organism	E 值 E - value
TDF0073a	JG014359	121	果实无籽性状相关片段 (EU442614.1) a fragment related to seedless trait of fruit	<i>Citrus reticulata</i>	1e-14
TDF0084a	JG014360	187	GTP 环化水解酶 II (NP_201235) GTP cyclohydrolase II	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-14
TDF0139a	JG014364	221	丁香油酚合成酶 eugenol synthase 1	<i>Petunia × hybrida</i>	1.7
TDF0140a	JG014365	186	α -甘露糖苷酶 (ADU20406) alpha-mannosidase	<i>Capsicum annuum</i>	4e-11
TDF0165a	JG014367	310	蔗糖、葡萄糖运输 (XP_002281683.1) transportation of sucrose and glucose	<i>Vitis vinifera</i>	0.73
TDF0171a	JG014370	224	溶酶体 α -甘露糖苷酶 (XP_002512839) lysosomal alpha-mannosidase	<i>Ricinus communis</i>	6e-24
TDF0179a	JG014372	190	光系统 II D1 蛋白 (PsbA) (AY433956.1) photosystem II D1 protein	<i>Pyrus communis</i>	2e-04
TDF0233a	JG014382	312	半胱氨酸合成酶 (ABO15564) cysteine synthase	<i>Glycine max</i>	5e-28
TDF0255a	JG014388	300	凝集素样受体激酶 (NP_001147947.1) lectin-like receptor kinase	<i>Zea mays</i>	1e-26
TDF0257a	JG014389	160	延伸因子 1- β (XP_002523210.1) elongation factor 1-beta	<i>Ricinus communis</i>	2e-12
TDF0265a	JG014392	105	SORBIDRAFT 假拟蛋白 (XP_002463429.1) hypothetical protein SORBIDRAFT	<i>Sorghum bicolor</i>	4e-05
TDF02892a	JG014408	246	ARF-GTP 酶激活蛋白 (XP_002523190.1) ARF GTPase activator	<i>Ricinus communis</i>	1e-22
TDF03042a	JG014415	203	Ser/Thr 蛋白激酶 PPK18 (BAB02708.1) serine/threonine-protein kinase PPK18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4e-05
TDF03044a	JG014417	342	GTP 结合蛋白 (BAD35220.1) GTP-binding protein	<i>Oryza sativa</i>	6e-12
TDF0311a	JG014419	153	无同源序列 no hit	-	-
TDF0353a	JG014422	239	α -衔接蛋白 (ABF93610.1) alpha-adaptin	<i>Oryza sativa</i>	2e-27
TDF0354a	JG014423	217	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 mRNA (EU975551.1) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	<i>Zea mays</i>	2e-24
TDF0369a	JG014431	247	热激蛋白 70 (ACO71287.1) heat shock protein	<i>Triticum aestivum</i>	2e-28
TDF0370a	JG014432	151	NADP ⁺ 还原酶类似蛋白 (Q41014.2) ferredoxin NADP oxidoreductase	<i>Pisum sativum</i> (<i>Pea</i>)	8e-06
TDF0383a	JG014438	174	转录因子 (ADG58078.1) transcription factor	<i>Lycoris longituba</i>	4e-13
TDF0392a	JG014441	343	动员蛋白 MobS (P20086.1) Mobilization protein mobS	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	3e-13
TDF0398a	JG014444	269	β -微管蛋白 (ACI03399.1) beta-tubulin	<i>Prunus salicina</i> var. <i>cordata</i>	3e-38
TDF0405a	JG014446	235	TMS 膜蛋白 (ABF97020.1) TMS membrane family protein	<i>Oryza sativa</i>	3e-11
TDF0411a	JG014450	168	Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (ABI34607.1) copper/zinc superoxide dismutase	<i>Musa formosana</i>	4e-14
TDF0462a	JG014457	229	Met 合成酶 (XP_002338954.1) methionine synthase	<i>Populus trichocarpa</i>	4e-05

别位点分别由 6 个和 4 个碱基组成;稀有位点酶应在每个 cDNA 分子上有 1 个识别位点,非稀有位点酶在稀有位点酶识别位点附近有 1 个识别位点,内切酶应最大限度地覆盖 mRNA 池。Bachem 等^[2]将 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Pst* I 与 *Taq* I 和 *Mse* I 随机组合,以马铃薯块茎 cDNA 为底物比较不同组合的酶切效果,发现各组合在识别差异表达基因方面具有相同的潜力。本试验采用 *EcoR* I/*Mse* I 消化 3h,结果表明 cDNA 酶切充分,利用该初级模板能够获得理想的指纹图谱。引物的选择直接影响指纹图谱质量,为保证指纹图谱条带的丰富性和多态性,提高识别差异表达基因的灵敏度,本研究从 576 对引物中筛选了 114 对适用于文心兰的引物。

TDFs 回收、测序过程中常遇到的问题是回收条带

扩增后可能出现 2 条或多条产物条带。Bachem 等^[1]提出通过在选择性扩增引物 3'-端添加一个碱基来避免这种现象。本研究通过分别回收各产物条带、克隆并测序,结果发现较短条带包含于较长条带中。这说明目的 TDFs 内部含有 1 至多个与上游或下游引物互补的序列,非特异性扩增导致产生多条产物条带,因此,应取扩增产物中较长的序列进行测序。

3.2 TDFs 序列分析

本研究获得的 TDFs 序列中,TDF0073a 和 TDF0139a 为 2 个花特异表达片段,其中 TDF0073a (表 1) 与柑橘 (*Citrus reticulata*) 果实无籽性状相关的 EST 序列具有 94% 同源性。果实无籽性状的形成主要是由于在花未受精情况下子房自行发育膨大,或受精后胚的败育导致的^[8]。由此推测该 TDF 对应的

基因可能与文心兰子房发育有关。TDF0139a (表1) 与山字草 (*Clarkia breweri*) 丁香油酚合成酶具有 78% 同源性。丁香油酚是一种无色或浅黄色油状液体, 有香味, 存在于植物的花蕾或其他组织中^[9, 10], 被广泛用于牙科止痛剂^[11] 和香水制作中。推测文心兰丁香油酚合成酶基因可能与其花中挥发性香味物质的合成相关。TDF0140a、TDF0165a 及 TDF0354a 等 (表1) 都是与植物体内糖代谢相关基因片段, 可能参与开花过程中的物质和能量代谢。有报道指出, 糖类除作为能量代谢底物外还可作为信号分子调节植物基因的表达^[12~14]。因此推测, 此类糖代谢相关基因还可能参与花发育过程中糖信号的转移或产生。此外, TDF0255a 编码凝集素样受体激酶, TDF03044a 编码 GTP 结合蛋白、TDF0353a 编码 α -衔接蛋白, 都是植物信号转导途径中的成分, 这类基因的大量表达说明花发育涉及大量的信号转导过程。部分 TDFs 编码转录因子和翻译起始因子、延伸因子等, 说明花发育过程涉及大量基因的转录和翻译调控。

部分 TDFs 与微生物蛋白质片段具有较高同源性, 如 TDF0392a (表1), 与氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) Mobs 蛋白具有较高同源性。类似现象在其他植物中也有发现, 如 Mondego 等^[15] 利用 cDNA-AFLP 技术在拟南芥花芽中发现了 1 个细菌移位酶 I 类似基因 (Translocase I *mra Y*) 并探索了其在拟南芥中的功能。推测此类基因可能是文心兰中的新功能基因。

4 结论

建立了稳定的 cDNA-AFLP 分析体系: 用试剂盒进行总 RNA 提取、mRNA 分离及 cDNA 双链合成后, 以 *EcoR* I / *Mse* I 消化 cDNA 3h, 消化产物加接头后直接用作预扩增模板, 预扩增产物稀释 15 倍作为选择性扩增模板, 经引物筛选获得了 114 对选择性扩增引物, 选择性扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 回收条带连接 T-载体, 经蓝白筛选挑取阳性克隆进行测序。

利用 59 对引物进行选择性扩增, 共获得约 1160 条 TDFs, 其中 98 条为花芽 (67 条) 和叶片 (31 条) 的差异表达条带, 占总条带数的 8.4%。回收、克隆 128 条 TDFs, 测序得到 102 条可读序列。序列分析表明花芽特异表达基因的功能涉及植物生命活动的诸多领域。本研究结果可为进一步研究植物花器官发育相关基因奠定基础。

参考文献:

- [1] Bachem C W B, van-der-Hoeven R S, de-Brujin S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP[J]. *Plant Journal*, 1996, 9(6):745-753
- [2] Bachem C W B, Oomen R J F J, Visser R G F. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16:157-173
- [3] Jones J T, Harrower B E. A comparison of the efficiency of differential display and cDNA-AFLPs as tools for the isolation of differentially expressed parasite genes [J]. *Fundamental and Applied Nematology*, 1998, 21(1):81-88
- [4] Goupil P, Mahamoud Y S, Poulain J, Windels D, Cr  t   P, Huss B, Rambour S. cDNA-AFLP display for the isolation of differentially expressed genes during chicory root development [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160:303-309
- [5] Hsu T W, Tsai W C, Wang D P, Lin S, Hsiao Y Y, Chen W H, Chen H H. Differential gene expression analysis by cDNA-AFLP between flower buds of *Phalaenopsis Hsiang Fei* cv. H. F. and its somaclonal variant [J]. *Plant Science*, 2008, 175:415-422
- [6] 李志红, 唐美玲, 刘 佳. 珠眉海棠 cDNA-AFLP 分析体系的建立 [J]. *核农学报*, 2008, 22(5):607-610
- [7] 唐美玲, 孔 瑾, 徐维华, 韩振海. 山葡萄 cDNA-AFLP 体系的建立及引物的筛选 [J]. *华北农学报*, 2009, 24(2):79-83
- [8] 祝海燕, 郎德山, 默书霞, 刘艳梅. 植物无籽果实发生机理研究综述 [J]. *河北林果研究*, 2007, 22(3):259-261
- [9] 赵 超, 杨再波, 肖利强, 周 欣, 陈华国, 胡晓娜. 固相微萃取技术/气相色谱/质谱分析水菖蒲挥发性化学成分 [J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(4):464-467
- [10] 徐凤侠, 黄青云, 刘鸿洲, 林春松. 三角梅属四个品种花挥发性组分的 GC-MS 分析 [J]. *亚热带植物科学*, 2010, 24(4):464-467
- [11] 杨振城. Vitapex 糊粉剂和氧化锌丁香油糊粉剂作为根管充填材料治疗乳牙根尖周炎的比较研究 [J]. *中外医疗*, 2010, 33:95
- [12] Koch K E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47:9-40
- [13] Smeekens S, Rook F. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants [J]. *Plant physiology*, 1997, 115:7-13
- [14] Smeekens S. Sugar regulation of gene expression in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, 1:230-234
- [15] Mondego J M C, Sim  es-Ara  jo J L, de-Oliveira D E, Alves-Ferreira M. A gene similar to bacterial translocase I (*mra Y*) identified by cDNA-AFLP is expressed during flower bud development of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Science*, 2003, 164:323-331

(责任编辑 王媛媛)