

# 糜子抗旱及复水相关基因的 cDNA-AFLP 差异显示

林凡云, 胡银岗, 宋国琦, 何蓓如

(西北农林科技大学农学院, 国家小麦改良中心杨凌分中心,  
陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌, 712100)

**摘要:** 以糜子抗旱种质为实验材料, 采用 cDNA-AFLP 技术分析四叶期糜子幼苗叶片在干旱、复水与对照等条件下的基因表达差异。选取了 36 个引物组合(6 个荧光标记 Taq I 引物×6 个非荧光标记 Mse I 引物)进行选择扩增, 结果表明, 这些引物组合都有很好的扩增效果, 在三种处理之间均能扩增出表达模式不同的差异片段。随机选取了 8 个干旱特有和 4 个复水特有的差异片段进行了克隆测序。利用 NCBI 的 Blastn 进行序列的 dbEST 比对结果表明, 12 个 EST 序列中有 2 个分别与小麦、玉米的 EST 序列有较高的相似性, 其余 10 个与已知 EST 序列的同源性都很低, 可能为新的糜子抗旱相关基因。用 Blastx 与 Genebank 的非冗余蛋白数据库进行比较结果表明, 其中的一个序列(DR007245)与 N-乙酰葡萄糖胺-N-乙酰胞壁酸五肽(UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-Pentapeptide)的同源性较高, 两个序列(DR007249, DR007250)与水稻的反转录转座子蛋白具有较高的同源性, 反转录转座子在植物抗旱、耐盐等抗逆境方面有重要作用。另外还有两个序列(DR007251, DR007252)与两种假定蛋白同源性较高。

**关键词:** 糜子; 抗旱; 复水; cDNA-AFLP; 差异显示

**中图分类号:** S332.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2006)03-0095-05

提高作物水分利用率, 对农作物进行抗旱节水的遗传改良, 是目前研究的一个热点<sup>[1]</sup>。而用高效利用水分的植物基因资源改良小麦、玉米等作物的水分利用效率是生物节水的一条有效途径。糜子(*Panicum miliaceum* L.)属禾本科, 黍属(*Panicum miliaceum*), 是一种抗逆能力很强的作物, 具有耐旱、耐贫瘠、水分利用效率高等特点。同时糜子是一种 C<sub>4</sub> 植物, 光合速率较高, 干物质积累很快, 水分利用效率高, 在 C<sub>3</sub> 植物完全停止干物质生产的水分条件下, 仍能进行干物质生产<sup>[2]</sup>。它是提高作物抗旱特性的优异基因资源, 然而关于其抗旱的分子机理研究尚未见报道。为了探明糜子抗旱、耐旱的分子机理, 我们利用 cDNA-AFLP 技术, 对糜子在水分胁迫及复水条件下的基因表达模式进行了分析, 以期为进一步分离糜子抗旱相关基因奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以西北农林科技大学保存的糜子抗旱材料印度 790051 为实验材料, 温室种植, 常规管理, 选生长一致的四叶期幼苗进行自然干旱处理, 对照材料正常浇水。叶片已全部萎蔫时(干旱处理 10 d 后), 剪取对照及部分干旱处理的叶片, 同时保留部分干旱处

理植株并马上对其进行复水处理, 复水 6 h 后剪取复水处理叶片, 于液氮中速冻, -70℃ 冰箱保存备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 提取及双链 cDNA 合成

总 RNA 提取采用 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒(上海生工)。提取方法参照说明, 最后溶于 30 μl DEPC-H<sub>2</sub>O。总 RNA 中的痕量 DNA 用 DNase I (TaKaRa, 大连)进行处理, 经酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)纯化后用于 cDNA 合成。

cDNA 第一链合成采用 M-MuLV 逆转录酶(NEB, New England), 第二链的合成采用 DNA Polymerase I (NEB, New England), 方法依照说明进行。双链 cDNA 经酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)纯化后溶于 10 μl ddH<sub>2</sub>O 中, -20℃ 保存备用。

#### 1.2.2 cDNA-AFLP

cDNA-AFLP 反应采用 AFLP Expression Analysis Kit(LI-COR, Nebraska, USA), 体系及程序按照试剂盒使用说明进行。采用 6 个 IRDye 800-labeled Taq I 引物和 6 个 Mse I 引物组成 36 个引物组合进行选择扩增, 在 IR<sup>2</sup> DNA Analyzer 4200(LI-COR, Nebraska, USA)上进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(6.5%, 7.5 mol/L 尿素)。用 SAGA 软件(LI-COR, Nebraska, USA)收集并分析数据。

收稿日期: 2005-12-01

基金项目: 教育部回国留学人员科研启动经费, 西北农林科技大学专项科研经费

作者简介: 林凡云(1975-), 女, 吉林白山人, 博士研究生, 主要从事作物分子遗传育种研究。

通讯作者: 胡银岗(1967-), 博士, 副教授, 主要从事作物杂种优势利用及抗旱分子遗传育种研究。

### 1.2.3 差异片段的回收与再扩增

用 Odyssey 双色红外荧光扫描仪(LI-COR, Nebraska, USA)回收差异片段,将回收的凝胶条溶于 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, -20 $^{\circ}$ C 冰箱过夜沉淀。过夜沉淀的凝胶于 4 $^{\circ}$ C, 14000 r/min 离心 20 min, 吸上清液, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2), 2.5 倍体积的无水乙醇(-20 $^{\circ}$ C 预冷)沉淀 DNA。用 80% 乙醇洗沉淀一次, 风干 5~10 min, 最后溶于 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。

取 2  $\mu$ l 回收产物做模板, 用与原来相同的选择性扩增引物和程序进行再扩增, 用 Agarose Gel DNA Purification Kit (TaKaRa, 大连) 回收试剂盒回收纯化目的片段, 最后溶于 25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中。

### 1.2.4 差异片段的阳性克隆筛选、测序及生物信息学分析

将回收的差异片段与 pMD18-T 载体(TaKaRa, 大连)进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。转化后的菌液涂 LB 平板(氨苄/IPTG/X-gal), 37 $^{\circ}$ C 过夜进行筛选培养。挑取过夜培养的白色克隆于 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中, 以 M13 正向及反向引物进行菌落 PCR 检测。20  $\mu$ l 反应体系包括: 2  $\mu$ l 10 $\times$  Reaction Buffer, 2  $\mu$ l dNTP (2 mmol/L), 1  $\mu$ l M13 Forward primer (10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ l M13 Reverse primer (10  $\mu$ mol/L), 0.2  $\mu$ l Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ l) 及 2  $\mu$ l 菌液 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu$ l。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 接下来进行 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s 共 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。扩增产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

经 M13 引物鉴定的阳性克隆交由上海博亚公司测序。将测序得到的 EST 序列去除载体、接头序列, 利用 NCBI(www.ncbi.nih.gov) 的 BLAST 分析软件分别对 GenBank 的 dbEST 数据库和非冗余蛋白数据库序列进行比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 糜子叶片对照、干旱胁迫及复水条件下基因差异表达谱

基因表达谱是指细胞中所有基因表达的格局, 植物的生长发育是基因在时空上表达的综合现象, 通过比较分析基因表达谱, 可从整体水平研究代谢机制, 认识基因的相互作用, 发现重要基因<sup>[3]</sup>。

本实验选取 6 个 IRDye 800 荧光标记的 Taq I 引物和 6 个无荧光标记的 Mse I 引物, 组成 36 个引物组合进行了差异表达基因的筛选。实验结果表明每对引物组合都能扩增出较好的差异条带。这些条带可以分为以下三类: 第一类条带在三种条件下都出现(图 1, A), 可能是一些比较保守的、组成型表达的基因片段, 在这一类中有些条带随着处理的不同表现出转录产物量的差异; 第二类条带只在其中两种处理中出现(图 1, B), 在另外一种处理中没有表达; 第三类条带只出现在其中一种处理中(图 1, C)。根据基因的表达模式可以看出, 第二、三类条带可能是与耐旱及复水相关的基因, 这些基因的转录活性在不同处理条件下表现为诱导表达或完全抑制, 在质上表现为与干旱胁迫—复水的作用相关。

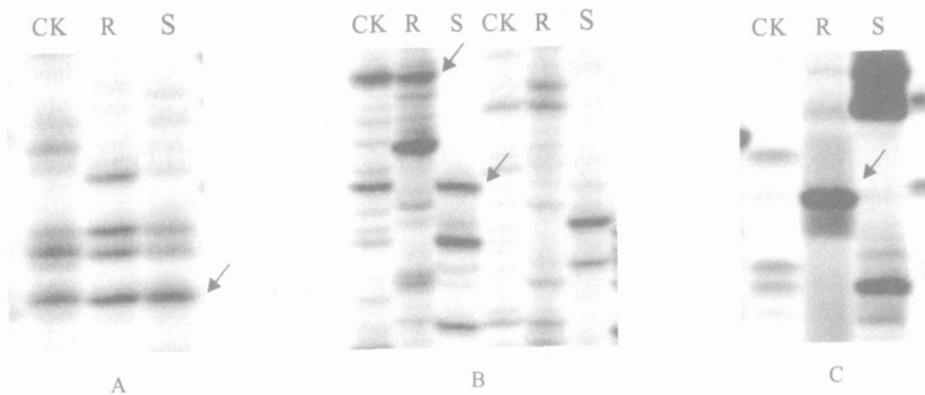


图 1 部分引物组合的扩增产物(未列全)

Fig. 1 Amplified products of several primer pairs

A: 引物组合 T-AG-M-TC 扩增产物(部分); B: 引物组合 T-CA-M-CG 和 T-CC-M-GA 扩增产物(部分); C: 引物组合 T-CT-M-CA 扩增产物(部分); CK: 对照, R: 复水, S: 干旱胁迫 A: Amplified products of primer pair T-AG and M-TC (part); B: Amplified product of primer pairs T-CA and M-CG, T-CC and M-GA (part); C: Amplified product of primer pair T-CT and M-CA (part); CK: Check, R: Rehydration, S: Drought Stress

对其中的 5 对引物组合的扩增结果进行了统计(表 1), 可以看出不同引物组合的扩增的条带数从

62~143 条不等。每一种处理都有一些特异条带, 对照中的特异条带可能是一些只在正常生长情况下

大量表达而受干旱及复水抑制的基因,其中可能涉及光合代谢方面的功能基因和一些抗旱应答相关的负调控因子;而干旱及复水中的特异片段则可能是一些受干旱和复水特异诱导的胁迫或复水应答基因,而其中复水特异诱导的基因可能在植物耐旱调节方面有重要意义。在三个池中总条带数的多少依次为:对照>复水>胁迫,说明在干旱胁迫条件下,

糜子基因的表达受到一定程度的抑制,转录活性降低,表现生理活性降低,代谢能力下降,植株脱水萎蔫;但是经复水后,转录又变得较为活跃,基因的表达量又增大了,代谢开始恢复,植株萎蔫程度减轻。以上结果表明糜子对干旱胁迫的高度适应性与相关基因的表达密切相关。

表1 部分引物扩增结果统计

Table 1 The amplified results of five primer pairs

引物组合名称 Code of primer pair	总条带数 Numbers of total ESTs	对照所有条带数 Total EST numbers of check	对照特有 条带数 Total EST numbers present in CK	干旱所有条带数 Total ESTs numbers of drought	干旱特有 条带数 Total EST numbers present in drought	复水所有条带数 Total ESTs numbers of rehydration	复水特有 条带数 Total EST numbers present in rehydration
T-CA, M-CT	81	37	14	31	8	40	17
T-CA, M-CA	62	35	17	29	13	30	15
T-GA, M-GA	107	70	28	45	14	56	17
T-GA, M-GT	143	80	38	31	18	55	14
T-AG, M-GA	88	53	13	35	6	48	14
平均值 Mean	96	54	22	34	11	46	15
百分比(%) Percent	—	56.3	22.9	35.4	11.5	47.9	15.6

## 2.2 部分差异条带的序列分析

由于 cDNA-AFLP 技术显示的是植物基因在表达水平上的差异,所以无论扩增的是质的差异还是量的差异,均能正确反应出基因在整个发育阶段的表达变化。为了能进一步阐明糜子对干旱胁迫及复水条件的适应调节机制,随机选取了 12 条表现为质的差异的片段,其中 8 条在干旱中特有,4 条在复水条件特有,对这些片段进行了克隆、测序。得到的序列长度从 144bp 到 575bp 之间,获得的 ESTs 已递交 GenBank, GenBank 序列号为 DR007243-DR007254, dbEST-ID 为 28911138-28911149。

利用 NCBI 的 Blastn 进行序列的 EST 相似性分析,比对结果表明,12 个 EST 序列中只有 2 个 (GenBank 收录号 DR007252、DR007250) 分别与小麦、玉米的 EST 序列有一定的相似性,其余 10 个与已知 EST 序列的同源性都很低,可能是新的与干旱及复水相关的基因片段。将获得的核酸序列利用 Blastx 与 Genebank 的非冗余蛋白数据库进行比较 (结果见表 2), 结果表明,其中的一个序列 (DR007245) 与 N-乙酰葡萄糖胺-N-乙酰胞壁酸五肽 (UDP-N<sup>acetyl</sup>glucosamine-N<sup>acetyl</sup>muramyl- (Pentapeptide)) 具有较高的同源性,此酶催化肽聚糖生物合成的最后一步,而肽聚糖是细菌细胞壁的主要成分;

两个序列 (DR007249, DR007250) 与水稻的反转录转座子蛋白具有较高的同源性;另外有两个序列 (DR007251, DR007252) 与两种假定蛋白同源性较高;其他序列未找到匹配较高的蛋白序列。

## 3 讨论

干旱胁迫是作物生产面临的主要环境问题,高等植物对干旱胁迫的耐受性在一定程度上具有相似的分子基础,很多基因的表达受干旱胁迫的诱导并在植物抵抗干旱胁迫中起作用。反转录转座子是真核生物中一类可移动因子,可分为 LTR (Long Terminal Repeats, LTR) 反转录转座子和非 LTR 反转录转座子<sup>[4]</sup>。目前许多研究都表明,反转录转座子的转录可以被多种生物或非生物的逆境所激活,如细胞培养、外伤及水杨酸等<sup>[5]</sup>。现有的研究证实,植物在逆境胁迫情况下,反转录转座子的活化可以调节植物抗逆相关基因的表达,转座可能与植物发生防卫反应有关,是植物自我保护的一种反应<sup>[6]</sup>。本研究的两个在干旱下表达的序列 (DR007249, DR007250) 与水稻的反转录转座子蛋白具有较高的同源性,也证实了反转录转座子与植物的抗旱有关。关于反转录转座子在植物抗旱方面的具体机制有待于进一步研究。

表 2 差异表达序列的 Blastx 比对结果  
Table 2 Blastx results of differential-displayed EST

克隆代号 Clone No.	GenBank 收录号 GenBank serial No.	引物组合 Primer pairs	胁迫类型 Type of Stress	片段大小 Size of ESTs	同源基因编码的蛋白 Gene products of DNA homology	同源基因来源 Category of DNA homology	氨基酸一致性 Identities of Amino acid
5-S-1	DR007245	T-GA M-GA	干旱	490bp	UDP-N-acetylglucosamine- N-acetylmuramyl <sup>-</sup> (pentapeptide)	Propionibac- terium acnes	138/139 (99%)
9-R-2	DR007244	T-GT M-AC	复水	176bp	No homology	—	—
23-S-3	DR007251	T-TC M-TC	干旱	474bp	hypothetical protein egd4-3670	Cryptosporidium parvum	27/78 (34%)
23-S-4	DR007253	T-TC M-TC	干旱	437bp	No homology	—	—
26-S-2	DR007248	T-TG M-AG	干旱	307bp	No homology	—	—
26-S-3	DR007254	T-TG M-AG	干旱	529bp	No homology	—	—
30-S-1	DR007249	T-TG M-GT	干旱	197bp	retrotransposon protein	Oryza sativa	37/66 (56%)
30-S-3	DR007250	T-TG M-GT	干旱	575bp	retrotransposon protein	Oryza sativa	147/189 (77%)
44-S-1	DR007252	T-CA M-CT	干旱	144bp	hypothetical protein Lgas02000346	Lactobacillus gasseri	28/44 (63%)
44-R-4	DR007247	T-CA M-CT	复水	312bp	No homology	—	—
44-R-6	DR007243	T-CA M-CT	复水	340bp	No homology	—	—
50-R-4	DR007246	T-AG M-AG	复水	235bp	No homology	—	—

cDNA-AFLP 技术是 Bachem 等 (1996) 发展起来的一种新的方法, 将 AFLP 用于 mRNA 的表达差异分析<sup>[7]</sup>, 该技术保留了 AFLP 技术的可靠性与高效性, 可用于植物生长发育过程中基因的分离与表达特性分析。Money 等 (1996) 利用实验验证了该技术的可重复性<sup>[8]</sup>。Bachem 等 (1998) 比较了 RAD-PCR, DD-PCR 及 cDNA-AFLP 等技术对反应条件及模板质量的敏感性, 结果表明 cDNA-AFLP 要明显地优于前两者<sup>[9]</sup>。目前 cDNA-AFLP 已经被广泛地应用于基因的表达差异研究, 并且被证实是比较有效的<sup>[10~12]</sup>。本研究也表明 cDNA-AFLP 适合于研究糜子干旱胁迫和复水条件下基因的表达差异。

本研究获得的 12 条 EST 中, 其中 5 条与已知 EST 或蛋白序列具有一定的序列相似性 (34~99%), 且这 5 个序列都只在干旱胁迫条件下表达。另外的 7 条没有较好的比对结果, 推测可能是新的与干旱或复水相关的基因片段。复水相关 EST 都未找到同源性较高的序列, 可能是有关复水分子机理的研究较少, 缺乏可供比较的 EST 序列, 也可能

是测序片段的数目太少, 要获得更多的信息还应增加测序量或通过 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 的方法的到全长 cDNA 序列。目前对植物复水条件下的分子机制研究只在部分复苏植物及模式植物拟南芥上有报道<sup>[13~14]</sup>, 而在作物上的研究尚未见报导, 本研究为进一步分离糜子抗旱相关基因奠定了基础。

#### 参 考 文 献:

- [1] 张正斌, 徐 萍, 贾继增. 作物抗旱节水生理遗传研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2005, (5): 20-23.
- [2] 段维生. C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, CAM 植物的分类与生产性 [J]. 国外农业科技, 1982, (1): 4-10.
- [3] 陈庆山, 杨春明, 刘春燕, 等. RNA 分子表达技术研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(2): 235-240.
- [4] 王子成, 李忠爱, 邓秀新. 植物反转录转座子及其分子标记 [J]. 植物学通报, 2003, 20(3): 287-294.
- [5] Grandbastien M A. Activation of plant retrotransposons under stress condition [J]. Trends Plant Sci, 1998, (3): 181-187.
- [6] Yosuke K, Yukio T, Saorio S, et al. OARE-1, a Ty1-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses [J].

- Plant Cell Physiol. 2001, 42, 1345—1354.
- [7] Bachem C W B, Heoven R S van der, Bruijn S M de, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. Plant Journal, 1996, (9): 745—753.
- [8] Money T, Reader S, Qu L J, et al. AFLP-based mRNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24, 2616—2617.
- [9] Bachem C W B, Domen 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.
- [10] 王永勤, 曹家树, 符庆功, 等. 利用 cDNA-AFLP 技术分析白菜核雄性不育两用系的表达差异 [J]. 中国农业科学, 2003, 36 (5), 557—560.
- [11] 吴敏生, 高志环, 戴景瑞. 利用 cDNA-AFLP 技术研究玉米基因的差异表达 [J]. 作物学报, 2001, 27 (3), 339—342.
- [12] Dellagi A, Birch P R J, Lyon G D. cDNA-AFLP analysis of differential gene-expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia-Carotovora* [J]. Microbiology, 2000, 146, 165—171.
- [13] Giovanni B, Francesco S, Dorothea B. Molecular characterization of the rehydration process in the resurrection plant *Craterostigma plan tagineum* [J]. Plant Physiol, 1996, 111, 1043—1050.
- [14] Oono Y, Seki M, Nanjo T, et al. Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray [J]. The Plant Journal, 2003, 34, 868—887.

## Analysis on the responsive genes during drought and rehydration in Broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) by means of cDNA-AFLP

LIN Fan-yun, HU Yin-Gang, SONG Guo-qi, HE Bei-ru

(College of Agronomy of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Branch of China National Wheat Improvement Center; Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** cDNA-AFLP (cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism) was used to analyze genes differentially expressed in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) seedling under the condition of normal watering, serious drought and rehydration. All of the thirty-six primer pairs used in the selective amplification could amplify differential expression profile among the samples. Twelve fragments only presented in serious drought or rehydration were selected, cloned and sequenced. Blastn search to NCBI dbEST showed that only two of the fragments had significant homologous nucleotide sequence with wheat and rice ESTs, others could not find significant homologous nucleotide sequence. Based on the Blastx search to NCBI non-redundant protein database, one fragment was similar to UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(Pentapeptide), two fragments had significant homologous protein sequence with rice retrotransposon, another two had significant homologous protein sequence with two hypothetical proteins.

**Keywords:** broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.); drought tolerance; rehydration after drought; cDNA-AFLP; differential display