

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00755

白菜抽薹性状相关基因的 cDNA-AFLP 分析

邹艳敏^{1,2}, 于拴仓², 张凤兰², 余阳俊², 赵岫云², 张德双²

1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037;
2. 北京农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097

摘要: 先期抽薹严重制约着我国春大白菜及高原或高海拔地区的春夏白菜栽培, 给生产造成重大损失, 因而研究白菜作物低温春化途径抽薹和开花的相关基因对白菜育种具有重要意义。文章选取极早抽薹株系 DH-54 和极晚抽薹株系 DH-43 为材料, 利用 256 对引物组合进行 cDNA-AFLP 分析, 筛选到与抽薹开花相关的差异表达的转录衍生片段(Transcript-derived fragment, TDF)191 条, 对其中 82 个 TDF 进行克隆测序。结果表明: 52 个 TDF 与 NCBI 或 TIGR 已有序列同源, 功能涉及代谢、胁迫及逆境应答、信号转导、转录调控等等; 22 个 TDF 在 NCBI 或 TIGR 找到同源序列, 但功能未知; 有 8 个 TDF 在 NCBI 或 TIGR 找不到同源序列, 可能是一些新基因。

关键词: 大白菜(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*); 春化; cDNA-AFLP; 抽薹

cDNA-AFLP analysis on transcripts associated with bolting in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*

ZOU Yan-Min^{1,2}, YU Shuan-Cang², ZHANG Feng-Lan², YU Yang-Jun², ZHAO Xiu-Yun², ZHANG De-Shuang²

1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China;
2. Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science (BAAFS), Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100097, China

Abstract: Premature bolting, caused by low temperature in spring and summer cultivation in low land and high land respectively, leads to reduction of the yield and quality of the harvested products in Chinese cabbage. Therefore, exploring genes involved in vernalization response is important to the improvement of Chinese cabbage varieties. Here, one extremely early bolting line (DH-54) and one extremely late bolting line (DH-43) were employed, and the cDNA-AFLP approach was used to identify key components involved in the low-temperature required vernalization response. Of 256 primer recombinations screened, a total of 191 differential expressed transcript-derived fragments (TDFs) were identified, and 82 TDFs were sequenced. BLAST and alignments showed that 52 candidate TDFs shared high levels of similarity with genes of known function, 22 TDFs of unknown function and 8 novel ESTs. The TDFs of known function were involved in genes encoding enzymes working in metabolism, proteins related to stress and defense, signal transduction, and transcription regulation, etc.

Keywords: Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*); vernalization; cDNA-AFLP; bolting

收稿日期: 2008-11-13; 修回日期: 2009-01-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z1C9, 2006AA100108), 北京市科技新星计划项目(编号: 2006B05)及“现代农业产业技术体系建设专项资金”资助

作者简介: 邹艳敏(1981-), 女, 硕士, 专业方向: 遗传学。Tel: 13811320891; E-mail: yanmin5036@sohu.com

通讯作者: 张凤兰(1964-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 蔬菜遗传育种与分子生物学。Tel: 010-51503038; E-mail: zhangfenglan@nercv.org

大白菜(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 属十字花科芸薹属蔬菜作物, 原产我国, 是我国重要的蔬菜作物之一, 有“菜中之王”的美誉。白菜类作物属于长日照春化需求型植物, 在开花习性上有一年生和两年生之分, 在抽薹时间上存在很大的变异。抽薹是白菜类蔬菜生产中重要的农艺性状, 尽管抽薹和开花在生理上、时间上都是不同的, 抽薹不一定开花, 但抽薹是开花的前提。因而, 抽薹时间更能准确地揭示开花植物由营养生长向生殖生长过渡的时间, 通常用抽薹时间来衡量开花时间^[1]。

在我国北方地区的春大白菜栽培及高海拔地区的春夏白菜生产中, 由于气温从低到高的变化, 常发生先期抽薹现象, 降低了产品的产量和质量, 给生产造成重大损失。为解决这一问题, 曾在栽培措施、晚抽薹育种等方面做过很多研究^[2], 培育晚抽薹的品种是解决这一问题的根本途径^[3]。目前, 育种工作者还是主要通过表型而不是基因型来判断是否为晚抽薹品种, 这不仅带有一定的盲目性, 还大大增加了育种工作的难度和周期, 因而研究白菜类作物抽薹开花相关的分子遗传机理, 尤其是研究低温春化途径抽薹和开花相关的基因对白菜育种具有重要意义。

近年来, 关于春化、抽薹和开花机理的研究已经取得了很大的进展。拟南芥的研究表明, 存在多条控制开花的途径, 包括光周期途径、春化途径、自主开花途径和赤霉素途径等^[4,5]。研究发现 *FLC* 基因编码 MADS-box 蛋白, 是开花的抑制因子^[6-8]。遗传分析揭示, 早花与晚花生态型在开花时间上的不同主要依赖 *FLC* 等位基因的变化^[6,7,9]; 芸薹属植物包括甘蓝、大白菜、芜菁、甘蓝型油菜等, 是典型的春化敏感型植物, *FRI* 和 *FLC* 的同源基因在芸薹属植物春化应答中起主要作用^[10], 在早花甘蓝型油菜中, 组成型表达拟南芥 *FLC* 基因能延迟开花 2~6 个星期^[11]。通过对拟南芥突变体的分析, 还克隆了一系列开花相关的基因, 如 *VRN1*^[12]、*VRN2*^[13]、*VIN3*^[14]; 在玉米上克隆了 *Dwarf8*^[15]; 在小麦上克隆了 *Verc17*^[16]、*Verc79*^[17]、*Verc203*^[18]、*Verc2*^[19]; 在白菜上, 克隆了 4 个 *FLC* 基因的同源基因 *BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3*、*BrFLC5*^[20]。Kim 等^[21]对 *BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3* 的功能进行了详细的分析和验证, 但这些基因之间有什么关系, 如何相互作用影响抽薹开花, 具体作

用模式尚不清楚。

本研究以易抽薹大白菜“BY”与晚抽薹芜菁“M.M”杂交的 F_1 通过小孢子培养建立的 DH 群体为材料, 从中选取了一个极早抽薹的双单倍体株系 (DH-54) 和一个极晚抽薹的株系 (DH-43), 利用 cDNA-AFLP 技术筛选与抽薹性相关的特异片段, 以为晚抽薹分子育种和抽薹开花的分子调控机制的揭示提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

以易抽薹大白菜 BY (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 和低温要求型极晚抽薹的欧洲芜菁 MM (*B. rapa* L. ssp. *rapifera* Metzg) 为亲本杂交得到 F_1 代; 在同一 F_1 单株上取 2~3 mm 的花蕾, 收集小孢子, 诱导获得胚状体, 并继代培养至生根, 成苗, 经倍性鉴定和自交授粉后获得 81 个 DH 株系的种子; 通过抽薹性鉴定选出一个极早抽薹株系 DH-54 和一个极晚抽薹的株系 DH-43 用于本研究。其中, 中国大白菜 BY 为高代自交系, 华南型耐热材料, 极易抽薹开花; MM 为欧洲芜菁 (Manchester Market) 的自交系, 为春化低温要求性极高、表现极晚抽薹的材料。DH-54 和 DH-43 的抽薹性分别与 BY 和 MM 相似。

将 DH-54 和 DH-43 的种子播种于育苗盘中, 放入白天 25~30℃、夜间 15~20℃ 的温室中。待植株长出 2~3 片真叶, 转至 5℃ 低温温室中, 分别于低温处理第 0 d (处理前)、5 d、10 d、15 d、20 d、30 d、40 d、60 d 和 80 d 取从上向下第二片真叶, 液氮速冻后保存于 -80℃ 冰箱备用。春化 80 d 后取出全部植株, 在空调温室 (20±5℃) 继续培养, 检测植株是否完全度过春化期。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及反转录

采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司产品) 提取总 RNA。用 RNase Free DNase (TaKaRa 公司) 处理总 RNA, 去除残留的基因组 DNA。以 TaKaRa 公司的 M-MLV RTase cDNA 合成试剂盒合成 cDNA, 具体步骤参照试剂盒说明。

1.2.2 cDNA-AFLP 分析

AFLP 体系及程序参照张伟峰等^[22]的方法并略

有改动, 以 16 条 *Pst* (P+2)引物和 16 条 *Mse* (M+2)引物组成 256 对引物组合(引物由北京塞百盛基因技术有限公司合成), 聚丙烯酰胺凝胶电泳后利用银染法进行显色。对于差异较显著的引物组合进行二次重复以降低假阳性。

1.2.3 差异条带的回收、克隆和测序

将目标片段所在聚丙烯酰胺凝胶区域用 ddH₂O 冲洗干净, 用锋利刀片切下目标片段, 装于 1 mL Eppendorf 管中, 加入 30 μ L ddH₂O, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱浸泡 24 h 以上。然后以浸出液为模板, 按照 AFLP 反应体系和程序重新扩增。PCR 产物用 Biomed 的琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒, 与 pGM-T 载体(天根生化科技有限公司)连接, 然后转化 TOP10 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 采用质粒小提试剂盒(北京塞百盛基因技术有限公司)提取质粒, *EcoR* 酶切电泳鉴定为阳性克隆后交由天根生化科技有限公司测序。

1.2.4 序列分析

将测序得到的序列在 NCBI 上应用 BLAST 程序进行同源性检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>); 利用 DNAMAN 软件进行去除载体序列及序列比对分析, 利用 DNASTAR 软件对序列进行聚类拼接, 在 Gene Ontology Home 上进行 EST 功能分类(<http://www.geneontology.org/>)。

2 结果与分析

2.1 低温春化结果

春化 80 d 后取出全部植株, 在空调温室(20 \pm 5 $^{\circ}$ C)继续生长, 其中早抽薹株系 DH-54 取出 2 d 就开始抽薹, 但晚抽薹株系 DH-43 取出 20 d 后才开始抽薹。结果表明, 两者均已度过春化期。

2.2 cDNA-AFLP 多态性分析

利用 256 对 *Pst* 和 *Mse* 引物组合进行选择性的扩增, 共扩增出 4 513 条转录衍生片段(Transcript-derived fragments, TDF), 平均每对引物扩增出 18 条, 长度在 40~600 bp 之间。其中, 58 对引物扩增出 191 条在两系间表现差异的条带, 占总条带数的 4.4%。差异表达的 TDF 呈现多样化的表达模式(图 1)。(1)在诱导表达的 TDF 中, 只在春化处理某一段时间内出现的: 只在早抽材料(DH-54)中出现的有 31 条(图

1: C、E、J), 只在晚抽材料(DH-43)中有 21 条(图 1K); (2)在低温处理过程中开始表达, 或者呈现上调趋势的: DH-54 有 20 条(图 1: D、I), DH-43 有 29 条(图 1: A、B、D); (3)在低温处理初期有表达, 处理后期已经检测不到其表达, 或者表达呈现下调趋势, 表现为明显的低温抑制的: DH-54 有 58 条(图 1: A、B、F、H), DH-43 有 32 条(图 1: F、G、H)。其中有些 TDF 在两个材料中表达模式出现较大差异(图 1: A、B、E、G、I、J、K)。

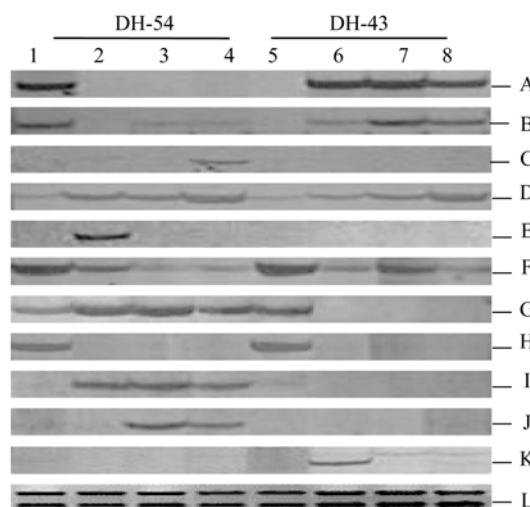


图 1 不同表达模式 TDF

1、2、3 和 4 分别代表 DH-54 春化处理前、混 1(春化处理 5 d 和 10 d)、混 2(春化处理 15、20、30 d)和混 3(春化处理 40、60、80 d); 5、6、7 和 8 分别代表 DH-43 春化处理前、混 1(春化处理 5 d、10 d)、混 2(春化处理 15、20、30 d)和混 3(春化处理 40、60、80 d)。A: DH-54 春化抑制表达, DH-43 春化诱导表达; B: DH-54 下调表达, DH-43 上调表达; C: DH-54 上调表达, DH-43 不表达; D: 两者均上调表达; E: DH-54 春化 5 d、10 d 表达; F: 两者均下调表达; G: DH-54 稳定表达, DH-43 春化抑制表达; H: 春化抑制表达; I: DH-54 春化诱导表达, DH-43 不表达; J: DH-54 春化诱导表达, DH-43 不表达; K: DH-54 不表达, DH-43 在 5 d、10 d 表达; L: rRNA (goldview)。

2.3 差异条带功能分类

在 191 条差异条带中, 挑选出 82 条比较典型的差异条带进行回收、克隆测序。Blast 结果显示(表 1)82 个 ESTs 有 74 个 ESTs 在 NCBI 中找到较高同源性的序列, 其中有 52 个是蛋白功能已知序列, 22 个 ESTs 在 NCBI 和 TIGR 中有同源序列但功能未知, 8 个 ESTs 在 NCBI 和 TIGR 中均无同源序列, 这些 ESTs 可能是一些新的未知功能基因, 有待进一步分析。82 条序列提交 GenBank 数据库, 已被收录 (GenBank 登录号: GD254045~GD254126, 表 1)。

表 1 TDF 序列同源性比较结果

| 编号 | 登录号 | 长度(bp) | 一致性(%) | E 值 | 功能预测 |
|--------------|----------|--------|--------|--------|----------------------------------|
| p63m50-1 | GD254045 | 210 | 97 | 3e-15 | 拟南芥内膜蛋白家族 ^x |
| p63m50-2 | GD254046 | 114 | 95 | 0.001 | 拟南芥依赖NADPH的硫氧还蛋白还原酶 ^x |
| p64m55-1-4 | GD254047 | 229 | 95 | 9e-35 | 拟南芥CDC50 家族蛋白 ^x |
| p64m55-2-4 | GD254048 | 165 | 82 | 3e-29 | 大白菜克隆KBrB017B11 ^N |
| p64m56-2-4 | GD254049 | 303 | | | 功能未知 |
| p64m56-4-4 | GD254050 | 44 | 100 | 9e-15 | 斑节对虾克隆AFE30M28 ^N |
| p64m57-1-4-1 | GD254051 | 254 | 89 | 1e-86 | 拟南芥泛素特异性蛋白酶 14 ^N |
| p64m57-1-4-2 | GD254052 | 200 | | | 功能未知 |
| p64m57-3-4 | GD254053 | 159 | 91 | 6e-56 | 拟南芥含HNH核酸内切酶结构域蛋白 ^N |
| p64m58-1-4 | GD254054 | 96 | 92 | 4e-10 | 斑节对虾克隆AFE30M28 ^N |
| p64m58-2-4 | GD254055 | 193 | 98 | 6e-89 | 大白菜克隆KBrB030F12 ^N |
| p64m61-1-5 | GD254056 | 173 | 98 | 8e-26 | 拟南芥质体核糖体蛋白L15 ^x |
| p66m48-2-5 | GD254057 | 264 | 98 | 2e-23 | 侧金盏花丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 ^x |
| p66m48-2-4 | GD254058 | 93 | 95 | 5e-06 | 拟南芥半胱氨酸抗氧化酶 ^x |
| p66m48-3-4 | GD254059 | 278 | 82 | 1e-24 | 拟南芥含GRAM结构域蛋白 ^N |
| p66m48-4-4 | GD254060 | 214 | 71 | 6e-20 | SLW-5-E07 mRNA 序列 ^N |
| p66m48-5-4 | GD254061 | 157 | 98 | 3e-59 | 大白菜克隆KBrH004P05 ^N |
| p66m49-1-5 | GD254062 | 170 | 88 | 1e-51 | 大白菜克隆KBrS004B22 ^N |
| p66m49-2-4 | GD254063 | 165 | 87 | 2e-10 | 拟南芥金属肽链内切酶 ^x |
| p66m49-3-4 | GD254064 | 147 | 98 | 1e-64 | 大白菜 类金属硫蛋白mRNA ^N |
| p66m50-2-5 | GD254065 | 87 | 92 | 1e-08 | 拟南芥DNAJ热激蛋白家族 ^x |
| p66m50-4-4 | GD254066 | 246 | 93 | 7e-37 | 拟南芥谷氨酸受体蛋白离子通道 ^x |
| p66m52-1-4 | GD254067 | 293 | 87 | 3e-45 | 拟南芥结瘤素MtN21 家族蛋白 ^N |
| p66m53-2-4 | GD254068 | 192 | 86 | 4e-28 | 大白菜克隆 KBrH004P05 |
| p66m53-3-4 | GD254069 | 154 | 85 | 1e-26 | 大白菜克隆 KBrH004P05 |
| p69m55-1-4 | GD254070 | 193 | 89 | 7e-25 | 拟南芥转录因子CZF1/ZFAR1 ^x |
| p69m59-1-4 | GD254071 | 181 | 90 | 7e-22 | 拟南芥转录因子BES1 ^x |
| p69m60-1-4 | GD254072 | 221 | 85 | 2e-26 | 拟南芥转录因子 ^x |
| p69m60-2-4 | GD254073 | 159 | 77 | 1e-27 | 拟南芥第二类内含子剪接因子 ^N |
| p69m62-1-4 | GD254074 | 143 | 81 | 2e-29 | 大白菜克隆KBrB003A10 ^N |
| p69m62-2-4 | GD254075 | 104 | 83 | 2e-20 | 大白菜克隆KBrB003A10 ^N |
| p70m47-1-5 | GD254076 | 184 | 71 | 1e-20 | 拟南芥未知蛋白 ^N |
| p70m52-1-5 | GD254077 | 284 | 82 | 1e-73 | 拟南芥三角状五肽重复区 ^x |
| p70m52-2-5 | GD254078 | 284 | 81 | 8e-71 | 拟南芥三角状五肽重复区 ^x |
| p70m56-1-5 | GD254079 | 159 | 98 | 1e-20 | 拟南芥光系统 蛋白 ^x |
| p70m56-2-5 | GD254080 | 136 | | | 未知片段 |
| p70m57-1-4 | GD254081 | 214 | 97 | 3e-32 | 甘蓝吸胀蛋白 ^x |
| p70m57-2-4 | GD254082 | 153 | 82 | 1e-33 | 拟南芥ATNHX8 ^N |
| p70m57-4-4 | GD254083 | 84 | 85 | 2e-04 | 拟南芥剪接因子 64 ^x |
| p70m62-1-4 | GD254084 | 103 | 84 | 4e-08 | 拟南芥未知蛋白 ^x |
| p70m62-2-5 | GD254085 | 115 | 83 | 4e-11 | 拟南芥MAG2 (MAIGO2) ^x |
| p71m51-1-4 | GD254086 | 156 | 98 | 2e-21 | 拟南芥未知蛋白 ^x |
| p71m52-1-4 | GD254087 | 236 | 99 | 7e-115 | 大白菜克隆KBrB026K21 ^N |
| p71m55-2-5 | GD254088 | 102 | 98 | 5e-41 | 白菜克隆 665 未知mRNA ^N |
| p71m55-3-5 | GD254089 | 99 | 93 | 1e-09 | 拟南芥富含亮氨酸跨膜蛋白激酶 ^x |
| p71m57-1-4 | GD254090 | 291 | 81 | 4e-55 | 拟南芥相关的转录因子 ^x |
| p71m61-1-4 | GD254091 | 155 | 100 | 3e-21 | 香雪球NADH脱氢酶ND1 ^x |
| p71m61-3-5 | GD254092 | 167 | 90 | 3e-22 | 拟南芥尿卟啉脱羧酶 ^x |

(续表 1)

| 编号 | 登录号 | 长度(bp) | 一致性/% | E 值 | 功能预测 |
|------------|----------|--------|-------|-------|---|
| p72m48-1-4 | GD254093 | 112 | 81 | 3e-11 | 拟南芥armadillo/ β -catenin重复家族蛋白 ^X |
| p72m48-2-4 | GD254094 | 106 | 97 | 4e-12 | 盐芥热激同源蛋白 70 ^X |
| p74m56-1-4 | GD254095 | 111 | | | 功能未知 |
| p74m57-1-5 | GD254096 | 303 | 94 | 5e-48 | 拟南芥核移动蛋白家族 ^X |
| p74m59-1-5 | GD254097 | 158 | | | 功能未知 |
| p74m60-1-4 | GD254098 | 169 | 80 | 8e-36 | 拟南芥与COP1 互作的相关蛋白 ^N |
| p74m60-2-5 | GD254099 | 169 | 82 | 2e-38 | 拟南芥与COP1 互作的相关蛋白 ^N |
| p74m60-3-4 | GD254100 | 149 | 100 | 2e-21 | 拟南芥剪接因子 ^X |
| p74m61-1-5 | GD254101 | 376 | 96 | 3e-55 | 拟南芥线粒体琥珀酸脱氢酶铁硫亚基 ^X |
| p74m61-2-5 | GD254102 | 116 | 93 | 4e-09 | 拟南芥Ca ²⁺ 通道mRNA ^X |
| p74m61-3-5 | GD254103 | 148 | 95 | 8e-13 | 拟南芥SPX(SYG1/Pho81/XPR1)结构域 ^X |
| p75m50-3-4 | GD254104 | 186 | 96 | 3e-24 | 水稻ATP合酶beta亚基 ^X |
| p75m51-1-4 | GD254105 | 79 | 92 | 2e-05 | 拟南芥未知蛋白 ^X |
| p75m51-2-5 | GD254106 | 79 | 84 | 5e-04 | 拟南芥未知蛋白 ^X |
| p75m52-1-4 | GD254107 | 136 | 90 | 3e-34 | 拟南芥蛋白结合域 ^N |
| p75m57-1-4 | GD254108 | 361 | 98 | 3e-60 | <i>Draba nemorosa</i> NADH脱氢酶ND1 ^X |
| p75m57-2-5 | GD254109 | 75 | | | 功能未知 |
| p76m56-1-4 | GD254110 | 160 | 80 | 2e-31 | 拟南芥未知蛋白 ^N |
| p76m58-1-5 | GD254111 | 235 | | | 功能未知 |
| p76m58-2-5 | GD254112 | 102 | 91 | 9e-32 | 拟南芥钝叶醇 14- α 去甲基化酶 ^N |
| p77m49-1-5 | GD254113 | 145 | 86 | 4e-26 | 斑节对虾克隆AFE19M19 ^N |
| p77m50-1-4 | GD254114 | 161 | 87 | 1e-45 | 拟南芥组成型光形态建成 1 互作蛋白 ^N |
| p77m51-1-5 | GD254115 | 197 | | | 功能未知 |
| p77m54-1-5 | GD254116 | 200 | 77 | 1e-35 | 拟南芥BAH蛋白 ^N |
| p77m55-2-5 | GD254117 | 232 | 93 | 2e-34 | 拟南芥未知蛋白 ^X |
| p77m55-3-5 | GD254118 | 59 | 94 | 0.50 | 拟南芥硫腺苷甲硫氨酸载体 ^X |
| p77m56-2-5 | GD254119 | 237 | 88 | 2e-34 | 拟南芥DNA拓扑异构酶 α 亚基 ^X |
| p77m57-1-5 | GD254120 | 406 | 98 | 5e-71 | 甘蓝型油菜叶绿体(光系统 1)type 叶绿素a/b结合蛋白 ^X |
| p77m57-3-5 | GD254121 | 124 | 97 | 2e-15 | 拟南芥 (光系统 1)type ^X |
| p77m58-1-5 | GD254122 | 186 | 81 | 8e-43 | 拟南芥细胞凋亡相关蛋白 ^N |
| p77m58-2-5 | GD254123 | 146 | 100 | 1e-19 | 拟南芥Zn ⁺ 结合蛋白 ^X |
| p77m62-2-4 | GD254124 | 451 | 97 | 3e-79 | 甘蓝型油菜叶绿体光系统 叶绿素a/b结合蛋白 ^X |
| p77m62-3-4 | GD254125 | 104 | 95 | 2e-05 | 拟南芥肽链内切酶 ^X |
| p78m49-1-4 | GD254126 | 119 | 89 | 1e-07 | 拟南芥未知蛋白 ^X |

注: X 代表 BlastX 分析; N 代表 BlastN 分析。

52 个蛋白功能已知序列, 根据功能分成 11 类(图 2), 包括代谢、能量、细胞运输及传输促进作用、逆境响应、亚细胞定位、表达调控、信号转导、蛋白质的折叠修饰和传送、细胞周期及 DNA 修饰、代谢及蛋白功能调控、细胞命运。功能已知序列占 63.4%, 其中占份额较大的是代谢相关基因(12.3%)和表达调控有关基因(14.6%)(图 2)。

3 讨 论

开花是高等植物生活史上的一个质变过程, 是

植物个体发育过程的中心环节^[23]。这也说明开花是一个非常复杂的现象。根据本研究对差异片段所作的功能分类可以看出春化诱导开花过程可能涉及物质和能量代谢、信号转导系统、细胞运输及传输促进作用、逆境响应、亚细胞定位、表达调控、蛋白质的折叠修饰和传送、细胞周期及DNA修饰、细胞命运和代谢及蛋白功能调控等方面。其中物质和能量代谢为开花的启动提供了物质基础和动力支持^[24]; 植物通过信号转导系统传递低温信号, 启动相关基因的表达, 开启相关代谢途径^[25]; 在此过程中通过

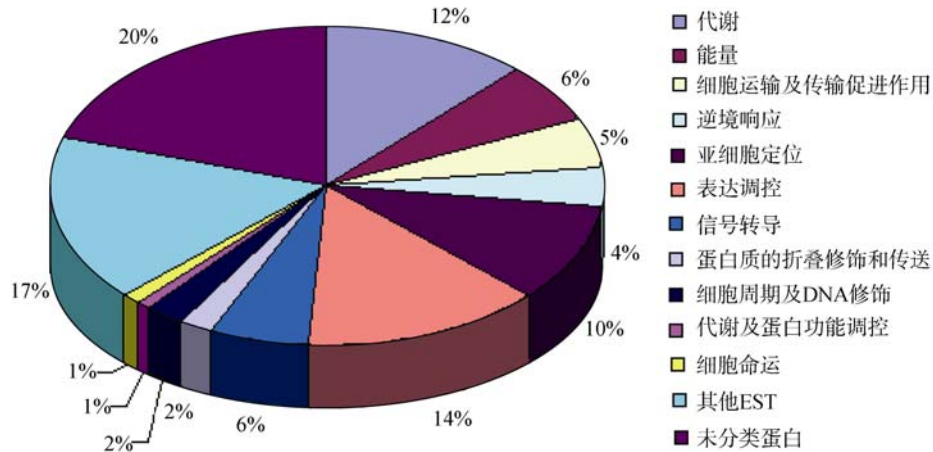


图2 低温诱导表达基因的功能分类

未分类蛋白包括蛋白功能未知序列和在 NCBI 尚未查到具有同源性及同源性较低的序列；其他 EST 序列包括查到的未注释的 EST 序列。

对DNA的修饰，众多转录因子的合成与分解精确地调控相关基因的表达与关闭，控制细胞的命运是转向生殖器官的发育还是继续营养生长；同时，植物的春化反应是在低温逆境的基础上发生的发育转变，因而春化过程也与植物的抗氧化酶系统密切相关^[26]。由此可见，开花是一个相当复杂的过程，涉及众多基因，多条通路，形成了复杂的网络信号系统。

3.1 低温诱导过程中的基因表达调控

*FLC*基因编码开花抑制因子，春化作用通过降低*FLC*的表达促进开花^[27]，这种春化诱导的*FLC*转录水平的降低通过有丝分裂保持稳定，并发生在所有组织中，就像每次开花的启动都需要暴露在低温下春化一样，*FLC*的活动在每一代中都必须重建^[28]。因而调控*FLC*基因的表达活性对于开花的启动显得至关重要。本研究中发现的p77m54-1-5与编码BAH甲基化酶的基因一致性达77%，而BAH甲基化酶能对DNA进行修饰作用^[29]，Piñeiro等^[30]也证实含BAH结构域的*EBS*基因参与了对开花时间的调控，通过染色质重塑在转录调控中起作用。该甲基化酶在早抽品种春化初期有表达，后期不表达，说明可能与*FLC*基因或者其转录因子，或者其他开花基因春化后甲基化水平降低有关^[7]，但BAH甲基化酶的靶位点是否为*FLC*基因或者其转录因子还需要进一步验证。除此以外，在本研究中发现的春化后开始表达的转录因子(p69m60-1-4、p69m60-2-4、p70m52-1-5、p70m52-2-5、p74m60-3-4)可能与*FLC*基因被抑制、开花启动、大量相关基因表达有关；同时也有一些

转录因子在春化后被抑制(p66m49-3-4、p69m55-1-4、p70m57-4-4等)，可能与一些编码开花抑制因子的基因失活有关。

3.2 低温诱导与信号转导

光通过内在的能感应光信号的信号分子——光受体介导的信号转导途径，调控植物自种子萌发直到开花的整个生长发育过程。2008年，Liu等^[31]阐明了CRY-COP1信号系统通路，CRY信号通路负调控COP1蛋白，稳定CO蛋白活性，CO蛋白激活*FT*基因的转录，诱导开花。在本研究中克隆得到的p77m50-1-4与编码CIP1蛋白的基因一致性达87%，而CIP1通过与COP1相互作用控制COP1的核质运输，调控COP1的活性最终诱导开花^[32]，但是低温如何控制CIP1的表达还未见报道，也可能CIP1又是一个联系光周期途径与春化途径的蛋白，也说明各开花途径控制开花并不是独立的，而是几条途径协同作用的结果。

p69m59-1-4与编码BES1的基因一致性达90%，BES1作为转录因子调控BR(油菜素内酯)信号转导途径^[33]，而Domagalska等^[34]认为BR通过调控*FLC*基因的表达调节生殖生长向营养生长过渡的时间，但认为BR信号通路调控开花时间独立于春化途径及自主开花途径。表明对于开花调控的研究还远远不够，还可能其他的开花途径，还需要生物工作者做更多的工作以揭示这一神秘的自然现象。

3.3 低温诱导与胁迫应答

植物的春化反应是在低温逆境的基础上发生的

发育转变。低温胁迫导致细胞内自由基累积过多^[25], 此时要求植物抗氧化能力提高。在本研究中发现的 p66m48-2-4 与编码过氧化物酶的基因一致性达 95%, 而过氧化物酶可以及时对低温逆境做出反应, 维持细胞内正常的代谢平衡^[35]。在洋桔梗低温诱导成花的实验中也表明春化过程中也存在抗氧化物质提高的过程^[36]。Gama 等^[37]也认为低温能够诱导过氧化物酶的产生, 且过氧化物酶在抗胁迫信号转导中也具有重要作用^[38]。另外发现的 p66m48-3-4 与负调控细胞凋亡的 GRAM 结构域^[39]一致性达 82%; p66m48-2-5 与编码 ATSK11 的基因一致性达 98%, 而 ATSK11 在信号转导, 胁迫应答, 花的发育上具有重要功能^[40-42]等等, 但这些基因与开花的启动有着什么样的关系, 在开花途径中的哪个环节起作用还需要进一步的验证。

同时在我们的实验中还得到了一些基因如 DNA 拓扑异构酶(p77m56-2-5)与基因重组、DNA 修复有关^[43, 44]; NADH 脱氢酶(p71m61-1-4), NADPH 脱氢酶(p63m50-2), ATP 合酶(p75m50-3-4)^[45], 叶绿素 a/b 结合蛋白(p77m62-2-4)^[46]等都与能量代谢有关, 他们在低温诱导后都出现了表达水平的变化, 但是低温如何调控这些基因的表达, 与开花途径的关系还尚不清楚, 有待我们做进一步的研究。

尽管我们得到了大量低温春化过程中差异表达的基因片段, 但由于 cDNA-AFLP 技术存在较高的假阳性, 还需要通过 Northern blot、荧光定量 PCR 来验证这些结果的可靠性及所得 TDF 在春化各时期具体的表达情况, 为我们的后续试验提供理论依据; 而且这些差异表达片段在春化及开花启动中的作用还只是推测, 需要进一步得到基因的全长, 构建表达载体研究其在白菜春化诱导开花中的作用。这将为揭示白菜类作物开花时间的分子遗传机理提供了重要的参考, 从而为解决白菜先期抽薹问题奠定很好的研究基础。

参考文献(References):

- [1] Chia TY, Müller A, Jung C, Mutasa-Göttgens ES. Sugar beet contains a large CONSTANS-LIKE gene family including a CO homologue that is independent of the early-bolting (B) gene locus. *J Exp Bot*, 2008, 59(10): 2735-2748. [\[DOI\]](#)
- [2] 程斐, 李式军, 奥岩松, 陈广福. 大白菜抽薹性状的遗传规律研究. 南京农业大学学报, 1999, 22(1): 26-28.
- [3] 余阳俊, 张凤兰, 赵岫云, 张德双, 张振贤. 大白菜晚抽薹性快速评价方法. 中国蔬菜, 2004, (6): 16-18.
- [4] Simpson GG, Gendall AR, Dean C. When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 519-550. [\[DOI\]](#)
- [5] Jack T. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*, 2004, 16(Suppl.): S1-S17. [\[DOI\]](#)
- [6] Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES. The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*, 1999, 11(3): 445-458. [\[DOI\]](#)
- [7] Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3753-3758. [\[DOI\]](#)
- [8] He Y, Amasino RM. Role of chromatin modification in flowering time control. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(1): 30-35. [\[DOI\]](#)
- [9] Michaels SD, Amasino RM. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 1999, 11(5): 949-956. [\[DOI\]](#)
- [10] Osborn TC, Kole C, Parkin IA, Sharpe AG, Kuiper M, Lydiate DJ, Trick M. Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 1997, 146(3): 1123-1129.
- [11] Tadege M, Sheldon CC, Helliwell CA, Stoutjesdijk P, Dennis ES, Peacock WJ. Control of flowering time by *FLC* orthologues in *Brassica napus*. *Plant J*, 2001, 28(5): 545-553. [\[DOI\]](#)
- [12] Levy YY, Mesnage S, Mylne JS, Gendall AR, Dean C. Multiple roles of *Arabidopsis VRN1* in vernalization and flowering time control. *Science*, 2002, 297(5579): 243-246. [\[DOI\]](#)
- [13] Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C. The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell*, 2001, 107(4): 525-535. [\[DOI\]](#)
- [14] Sung S, Amasino RM. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature*, 2004, 427(6970): 159-164. [\[DOI\]](#)
- [15] Andersen JR, Schrag T, Melchinger AE, Zein I, Lübberstedt T. Validation of *Dwarf8* polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, 2005, 111(2): 206-217. [\[DOI\]](#)
- [16] Chong K, Wang LP, Tan KH, Huang HL, Liang HG. Molecular cloning and characterization of vernalization-related (*ver*) genes in winter wheat. *Physiol Plant*, 1994, 92(3): 511-515. [\[DOI\]](#)
- [17] Zhao DZ, Chong K, Wan L, Xu J, Tan KH. Molecular cloning of a vernalization-related cDNA clone (*Vrc*) of

- Vrc79 in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Bot Sin*, 1999, 41(1): 34–39.
- [18] Jia SQ, Yong WD, Xu WZ, Xu YY, Wu JS, Chong K, Tan KH, Xu ZH. Existence of homologous sequences corresponding to cDNA of the *ver* gene in diverse higher plant species. *Cell Res*, 2001, 11(4): 265–271. [\[DOI\]](#)
- [19] Yong WD, Xu YY, Xu WZ, Wang X, Li N, Wu JS, Liang TB, Chong K, Xu ZH, Tan KH, Zhu ZQ. Vernalization-induced flowering in wheat is mediated by a lectin-like gene *VER2*. *Planta*, 2003, 217(2): 261–270.
- [20] Schranz ME, Quijada P, Sung SB, Lukens L, Amasino R, Osborn TC. Characterization and effects of the replicated flowering time gene *FLC* in *Brassica rapa*. *Genetics*, 2002, 162(3): 1457–1468.
- [21] Kim SY, Park BS, Kwon SJ, Kim J, Lim MH, Park YD, Kim DY, Suh SC, Jin YM, Ahn JH, Lee YH. Delayed flowering time in *Arabidopsis* and *Brassica rapa* by the overexpression of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* homologs isolated from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep*, 2007, 26(3): 327–336. [\[DOI\]](#)
- [22] 张伟峰, 于拴仓, 余阳俊, 张凤兰, 张德双, 赵岫云, 徐家炳. 白菜低温要求型晚抽薹性的相关序列克隆与分析. 分子植物育种, 2007, 5(4): 1–6.
- [23] 桂建芳, 易梅生. 发育生物学. 北京: 科学出版社, 2002, 305–306.
- [24] 孙保娟, 曹家树, 黄细松, 余小林. 白菜离体春化相关基因表达的 cDNA-AFLP 分析. 园艺学报, 2006, 33(6): 1342–1344.
- [25] Xu YY, Chong K, Xu ZH, Tan KH. Eexpression patterns of a vernalization-related genes responding to jasmonate. *Acta Bot Sin*, 2001, 43(8): 871–873.
- [26] 潘瑞炽. 植物生理学. 北京: 高等教育出版社, 2001, 280–281.
- [27] Amasino R. Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant cell*, 2004, 16(10): 2553–2559. [\[DOI\]](#)
- [28] Sheldon CC, Conn AB, Dennis ES, Peacock WJ. Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell*, 2002, 14(10): 2527–2537. [\[DOI\]](#)
- [29] Callebaut L, Courvalin JC, Mornon JP. The BAH (bromo-adjacent homology) domain: A link between DNA methylation, replication, transcriptional regulation. *FEBS Lett*, 1999, 446(1): 189–193. [\[DOI\]](#)
- [30] Piñeiro M, Gómez-Mena C, Schaffer R, Martínez-Zapater JM, Coupland G. Early bolting short days is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in *Arabidopsis* by repressing *FT*. *Plant Cell*, 2003, 15(7): 1552–1562. [\[DOI\]](#)
- [31] Liu LJ, Zhang YC, Li QH, Sang Y, Mao J, Lian HL, Wang L, Yang HQ. COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20(2): 292–306. [\[DOI\]](#)
- [32] Matsui M, Stoop CD, von Arnim AG, Wei N, Deng XW. *Arabidopsis* COP1 protein specifically interacts *in vitro* with a cytoskeleton-associated protein, CIP1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(10): 4239–4243. [\[DOI\]](#)
- [33] Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 120(2): 249–259. [\[DOI\]](#)
- [34] Domagalska MA, Schomburg FM, Amasino RM, Vierstra RD, Nagy F, Davis SJ. Attenuation of brassinosteroid signaling enhances *FLC* expression and delays flowering. *Development*, 2007, 134(15): 2841–2850. [\[DOI\]](#)
- [35] 孙保娟. 白菜花组织再生体系的建立及离体条件下阶段发育转变的研究 [学位论文]. 浙江大学, 2005.
- [36] Yanagida M, Mino M, Iwabuchi M, Ogawa K. Reduced glutathione is a novel regulator of vernalization-induced bolting in the rosette plant *Eustoma grandiflorum*. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(2): 129–137. [\[DOI\]](#)
- [37] Gama F, Keech O, Eymery F, Finkemeier I, GelhayeE, Gardeström P, Dietz KJ, Rey P, Jacquot JP, Rouhier N. The mitochondrial type peroxiredoxin from poplar. *Physiol Plant*, 2006, 129(1): 196–206. [\[DOI\]](#)
- [38] Kang SW, Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Choi MH. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: Therapeutic implications. *Trends Mol Med*, 2005, 11(12): 571–578. [\[DOI\]](#)
- [39] Lorrain S, Lin B, Auriac MC, Kroj T, Saindrenan P, Nicole M, Balagué C, Roby D. Vascular associated death1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2217–2232. [\[DOI\]](#)
- [40] Dornelas MC, van Lammeren AA, Kreis M. *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *Plant J*, 2000, 21(5): 419–429. [\[DOI\]](#)
- [41] Chevalier D, Walker JC. Functional genomics of protein kinases in plants. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2005, 3(4): 362–371. [\[DOI\]](#)
- [42] Yoo MJ, Albert VA, Soltis PS, Soltis DE. Phylogenetic diversification of glycogen synthase kinase3/SHAGGY-like kinase genes in plants. *BMC Plant Biol*, 2006, 6(3): 1–14. [\[DOI\]](#)
- [43] Bennett RJ, Noirot-Gros MF, Wang JC. Interaction between Yeast Sgs1 helicase and DNA topoisomerase. *J Biol Chem*, 2000, 275(35): 26898–26905. [\[DOI\]](#)
- [44] Nadal M. Reverse gyrase: An insight into the role of DNA-topoisomerases. *Biochimie*, 2007, 89(4): 447–455.
- [45] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2002, 121–126, 131–137.
- [46] Schmid VH. Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(22): 3619–3639. [\[DOI\]](#)