

cDNA-AFLP 技术在果树生物技术育种上的应用

胡淑英,张春红,王小敏,李维林,吴文龙

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏 南京 210014)

摘要: cDNA-AFLP 技术是近年来广泛应用于植物基因分离与表达研究的 mRNA 指纹图谱技术,具有可靠、高效的优点。在果树生物技术应用方面,目前该技术在第一代果树中应用居多且已取得大量成果,在第二代果树上仅有少量报道,在第三代果树上的应用处于起步阶段。在简单叙述其基本原理和特点的基础上,重点阐述其在果树基因分析研究中的应用,包括芽变突变体鉴定、基因分离、基因表达特性分析以及指纹图谱构建,并对其在果树生物技术育种研究上的应用前景进行了展望。

关键词: cDNA-AFLP; 基因鉴定; 果树

中图分类号: S66

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2012)10-0025-04

cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism) 技术是 Bachem^[1] 等在 1996 年提出的使差异表达基因可视化的一种新技术。它是在 AFLP 基础上发明的用于 RNA 指纹分析的方法。该技术保留了 AFLP 技术可靠性与高效性的优点^[2],操作过程简单^[3],灵敏度高^[4],是目前植物基因表达研究的有效工具^[5]。该技术集中显示基因组表达序列的多态性差异,可对生物体转录组进行全面、系统的分析,目前其已经成为筛选差异表达基因、表达基因的遗传连锁作图、基因表达特性和基因克隆最有效的方法之一。近年来随着该技术的不断发展,逐渐显示出它在基因功能全面分析上的巨大应用价值,并开始应用在果树基因研究上^[6],尤其在第一代果树如苹果^[7-10]、桃^[11]、柑橘^[12]、葡萄^[13]等的基因鉴定方面,该技术的应用已经较为成熟;该技术在第二代果树如枣^[14-15]、草莓^[16]等的基因研究上已开始得到较广泛的应用;在第三代果树上该技术应用很少,目前国内仅在蓝莓^[17]和山葡萄^[18]上有初步报道。该文就 cDNA-AFLP 技术目前在果树生物技术育种中的广泛用途进行综述。

1 果树性别鉴定

幼苗期植物的性别从形态学角度一般很难鉴定,利用 cDNA-AFLP 技术可以解决这类问题。有研究利用 cDNA-AFLP 技术对番木瓜幼苗期性别进行了鉴定,分析了不同植株性别基因表达的差异,并通过对差异表达基因进行序列和功能分析探讨调控番木瓜性别分化的分子机理^[19]。

2 果树芽变鉴定

果树上的芽变指芽的分生组织细胞自然发生的遗传物质的突变。有些果树芽变性状机理利用形态学方法很难阐明,利用 cDNA-AFLP 技术则可以很好地对其进行鉴定并能分离出芽变基因。刘永忠^[20]利用 cDNA-AFLP 技术分析了脐橙晚熟芽变性状的形成,结果表明对比的两个脐橙品种果实在成熟过程中的转录因子、信号转导因子、逆境应答因子以及一些编码 DNA 复制及其它蛋白质的基因表达发生了改变。陶能国^[21]对甜橙红肉突变体类胡萝卜素合成相关基因进行克隆与特性分析,通过 cDNA-AFLP 获得了 1 个在红肉脐橙果肉中增强表达的基因 *CitCpi*,推论该基因可能与红肉脐橙的红肉芽变有关。徐立^[22]对香蕉果皮带毛和早花突变体进行筛选和鉴定,对 50 个差异片段进行序列分析后发现 25 个序列与 GenBank 中已经注册的基因同源,其中包括 UDP-glucose 4-epimerase (UDP 半乳糖 4-差向异构酶)、phytoenesynthase (八氢番茄红素合成酶)和 arabinoxylanarabinofuranohydrolase (果桃 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶抗体)等与细胞生长发育有关的基因。

收稿日期:2012-07-11

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2011686);江苏省农业“三新”工程资助项目[sx(2011)240];2010 年江苏省“博士集聚计划”资助项目;江苏省中国科学院植物研究所青年科技创新基金资助项目(青 201101)

第一作者简介: 胡淑英(1987-),女,安徽省休宁县人,在读硕士,从事植物栽培研究。E-mail: hushuying3646@126.com。

通讯作者: 张春红(1979-),女,山东省菏泽市人,博士,助理研究员,从事黑莓等果树生物技术育种研究。E-mail: chzhang0714@yahoo.com.cn。

3 果树特异表达基因分离

cDNA-AFLP 技术能定性或半定量地分析基因的转录模式,从而分离出特异表达基因。近几年来利用 cDNA-AFLP 技术已经在果树上分离了一些特异表达基因。

3.1 抗性基因

基于 cDNA-AFLP 技术的诸多优点,在分离、克隆果树抗逆基因方面潜力很大,目前已取得一些成就^[23]。Campalans 等^[24]对 8 个杏品种干旱条件下叶片基因表达情况进行了比较和鉴定,发现含氮化合物的转移蛋白、酰基乳糖转移酶、低分子量休克蛋白、半胱氨酸蛋白酶等表达上调,推测这些蛋白与耐旱性相关。肖金平等^[12]利用 81 对引物组合进行分离和鉴定柑橘干旱胁迫应答基因,筛选共获得 113 条差异表达转录衍生片段(TDFs),其中 33 个 TDFs 与已知功能基因具较高同源性,功能涉及信号转导、能量代谢、离子通道和蛋白合成。

利用 cDNA-AFLP 技术也可以揭示植物感病前后基因表达的变化,阐明抗病品种的抗病机理和寻找抗病基因。Jensen 等^[9]以苹果砧木 M. 7 EMLA(半矮化砧木、可减少接穗品种对火疫病的敏感性)和 M. 9 T337(矮化砧木、不改变接穗品种对火疫病的敏感性)为试材,利用 cDNA-AFLP 技术研究砧木对接穗基因表达的影响,研究表明非特异性脂转移蛋白、金属硫蛋白与苹果抗火疫病相关,渗透蛋白表达上调有利于苹果抗旱。Esealtes 等^[25]揭示对李痘病毒(Plum pox virus, PPV)具有部分抗性的杏品种“Goldrich”在接种 PPV 前后基因表达的变化,发现了 21 个与数据库中基因有同源关系的差异表达基因,它们分别与代谢、信号转导、防卫、胁迫及胞内/胞外连接有关。宋蓓^[11]研究了枣抗病品种“星光”在病原体侵染前后不同时期的基因表达差异,得到 10 条诱导性表达和 14 条抑制性表达差异条带,这些条带或许是枣疯病病原体和枣抗病品种互作时直接相关的片段,也可能是诱导后相关抗性途径中有关物质的表达片段。

3.2 发育基因

目前通过 cDNA-AFLP 技术已分离了一系列果树发育相关基因,如苹果果实低酸性状相关基因^[7]和柱型相关基因^[8]、焦核龙眼败育相关基因^[26]、四季蜜龙眼成花逆转相关基因^[27]等。谭

全伟^[28]对胚胎发育的正常型、部分败育型和完全败育型荔枝胚胎进行差异分析,不仅构建了荔枝胚胎发育 cDNA-AFLP 图谱,且发现有 7 个 TDFs 序列信息与其它物种的胚胎发育相关基因有较高的同源性。黄有军等^[29]对山核桃成花决定前、成花决定期和成花决定后 3 个时段的雌花芽进行差异显著性分析,克隆了成花相关的特异基因片段,其功能涉及激素合成、酶合成、细胞信号转导、叶绿体合成和光诱导等。Han 等^[15]研究了枣无核相关基因的差异表达,得到了 3 条与枣无核基因有关的差异片段。

3.3 调控基因

Burger 和 Botha^[13]通过 cDNA-AFLP 技术研究发现了与葡萄成熟相关的 cDNA 片段。曾志等^[30]以龙眼(*Dimocarpus longan* Lour. cv. Longyou)正常成花花芽和成花逆转花芽为材料,应用 cDNA-AFLP 技术获得 13 个差异片段,这些基因片段在龙眼成花逆转过程中参与器官脱落、生殖生长和营养生长等的调控。郑炳松等^[31]利用 cDNA-AFLP 技术在山核桃(*Carya carthayensis*)嫁接过程中分离得到 1 个与山核桃嫁接相关的 cDNA 片段,该 cDNA 片段与小麦生长素响应因子部分区段有 81% 的同源性,可能对山核桃嫁接起到基因表达调控的作用。

4 果树基因表达差异分析

cDNA-AFLP 技术在果树生物技术育种上的应用以基因表达差异分析居多。Geuna 等^[32]利用 34 个引物组合,对杏 6 个发育阶段中的叶片和芽进行筛选,共选出 265 个差异条带,对其中 125 个谱带进行克隆、测序,发现与细胞壁、有机酸、蛋白质代谢及激素信号转导等相关,从而为核果果实成熟调查建立依据。李钰婷等^[11]以半矮生型桃“SD9238”为研究试材,采用 cDNA-AFLP 差显技术分析其新梢生长跃变期前后 4 个生长阶段差异表达基因,鉴定出其中 11 个差异条带,主要功能涉及木质素生物合成、蛋白质水解、转录调控及生长调节等。Čechová 等^[33]分析了 4 个杏品种不同休眠期花芽差异表达基因,结果发现大部分基因主要存在于休眠的组织中,一些基因与水通道蛋白、GTP 结合蛋白、ATP 依赖蛋白、木葡聚糖内糖基转移酶的合成有关。

5 果树指纹图谱构建

果树指纹图谱研究技术是在现代仪器分析技

术基础上发展起来的,进而对果树遗传信息进行鉴定和质量控制。卢秉国^[34]等分别提取‘红核子’龙眼(*Dondcerpus longan* Lour.)谢花后35 d(早期)和50 d(晚期)子叶胚RNA,建立了cDNA-AFLP分析体系,并获得指纹图谱。赵惠新等^[35]以新疆甜瓜伽师和皇后为试材,研究了影响cDNA-AFLP反应体系的几个关键因素,建立了适合于甜瓜的cDNA-AFLP反应体系,得到了较为理想的甜瓜mRNA指纹图谱。李开拓等^[36]以荔枝果皮为材料,对cDNA-AFLP的选择性扩增体系进行优化,建立了适宜荔枝果皮的cDNA-AFLP分析体系,并得到了较为清晰可辨的cDNA-AFLP指纹图谱。李志红等^[37]以珠眉海棠(*Malus zumi* Mats)为研究材料,对cDNA-AFLP反应体系的关键因素(酶切时间、预扩增体系、选择性扩增体系)进行探索,建立了重复性好的cDNA-AFLP分析体系,并得到了较为清晰可辨的cDNA-AFLP指纹图谱。

6 展望

综上所述,cDNA-AFLP技术已逐渐成为果树基因研究的有效工具,是果树基因转录和表达研究的新方法、新手段,并逐渐显示出它在基因全面分析上的巨大优势,今后在果树发育、果树生理和病理调控等基因的分离和克隆方面将会发挥越来越大的作用。当然cDNA-AFLP技术亦存在一些缺点,主要表现在获得的基因差异片段还不够全面丰富,验证程序比较繁琐,限制了其在某些方面的应用。Paris等^[10]将cDNA-AFLP技术和DHPLC(变形高效液相色谱法)相结合,认为这个是完全自动化来处理大型样品的差异表达基因的好方法,并成功应用在苹果疮痂病上。总体而言,cDNA-AFLP技术目前主要应用于主要农作物上,如在水稻、小麦上报道较多。在果树方面的应用虽已有报道,但相对较少。鉴于cDNA-AFLP技术多态性丰富、稳定性高、特异性高、灵敏度高,无需了解序列信息、集中显示基因组表达序列的多态性差异,所需实验仪器设备简单等诸多优点,加上该技术自身的不断发展和完善,其必将在果树基因转录、基因表达研究及生物技术育种中发挥更大的作用,成为促进果树生物技术发展的新动力。

参考文献:

- [1] Bachem C W, vander Hoeven R S, de Bruijn S M, 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]. The Plant Z., 1996, 9: 745-753.
- [2] Bove J, Lucas E, Godin B, Oge L, et al. Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana glauca* [J]. Plant Mol. Bio., 2005, 57(4): 593-612.
- [3] 王会, 梁月荣, 陆建良, 等. cDNA-AFLP分子标记技术及其在茶树育种上的应用前景[J]. 茶叶, 2006, 32(2): 75-78.
- [4] 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.
- [5] Dellagi A, Birch P R, Heilbronn J, et al. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Ewingia carotovora* [J]. Microbiology [J], 2000, 146(Pt1): 165-171.
- [6] 张志宏, 赵进春, 代红艳. 全基因组基因表达分析技术及其在果树上的应用[J]. 果树学报, 2008, 25(3): 382-388.
- [7] 姚玉新. 苹果果实酸度相关基因的筛选、克隆及表达分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006: 1-130.
- [8] 朱元娣, 孙凌霞, 李春雨, 等. 利用cDNA-AFLP技术研究苹果柱型与非柱型cDNA的差异表达[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 283-288.
- [9] Jensen P J, Rytter J, Detwiler E A, et al. Rootstock effects on gene expression patterns in apple tree scions[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 53(4): 493-511.
- [10] Roberta Paris, Luca Dondini, Graziano Zannini, et al. dHPLC efficiency for semi-automated cDNA-AFLP analyses and fragment collection in the apple scab-resistance gene model *Planta* [J]. Emerging Technologies, 2012, 235(5): 1065-1080.
- [11] 李钰婷, 鲁振华, 牛良, 等. 半矮生型桃生长跃变期差异表达基因的cDNA-AFLP初步分析[J]. 分子植物育种, 2011, 9(1): 91-96.
- [12] 肖金平, 陈俊伟, 张慧琴, 等. 干旱胁迫下柑橘叶片基因表达谱的cDNA-AFLP分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(3): 417-424.
- [13] Burger Anita L, Botha Frederik C. Cloning of a specific ripening-related gene from the multiple of ripening-related genes identified from a single band excised from a cDNA-AFLP gel[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22(3): 225-236.
- [14] 宋蓓. 枣cDNA-AFLP技术体系优化及其在抗枣疯病相关基因片段筛选中的应用[D]. 保定: 河北农业大学, 2007: 1-54.
- [15] Han Bin, Bai Ruixia, Li Li. Establishment of cDNA-AFLP technology system and stoneless gene difference expression in *Ziziphus jujuba* Mill [J]. Frontiers of Agriculture in China, 2010, 4(4): 449-455.
- [16] Miao Lixiang, Zhang Yuchao, Yang Xiaofang, et al. Optimization of cDNA-AFLP amplification reaction system in strawberry leaves[J]. International Conference on Bioin-

- formatics and Biomedical Engineering-ICBBE, 2011, 1: 1-3.
- [17] Claudio Inostroza-Blancheteau, Felipe Aquea, Marjorie Reyes-Díaz, et al. Identification of aluminum-regulated genes by cDNA-AFLP analysis of roots in two contrasting genotypes of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) [J]. Molecular Biotechnology, 2011, 49(1): 32-41.
- [18] 唐美玲, 孔瑾, 徐维华, 等. 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.
- [19] 李亚丽, 沈文涛, 熊建平, 等. 番木瓜不同性别基因表达 cDNA-AFLP 分析 [J]. 广西农业科学, 2009, 40(5): 468-471.
- [20] 刘永忠. 脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 晚熟芽变性状形成机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006: 1-89.
- [21] 陶能国. 甜橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 红肉突变体类胡萝卜素合成相关基因的克隆与特性分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006: 1-104.
- [22] 徐立. 香蕉果皮带毛和早花突变体的筛选、鉴定及突变机理初步研究 [D]. 海南: 华南热带农业大学, 2006: 1-110.
- [23] 于虹, 丁国华. cDNA-AFLP 技术及在差异表达基因克隆上的应用 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(12): 77-80.
- [24] Campalans A, Pages M, Messegue R. Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*) [J]. Tree Physiol, 2001, 21(10): 633-643.
- [25] Schurdi-Levraud Escalettes V, Hullot C, Wawrzyńczak D, et al. Plum pox virus induces differential gene expression in the partially resistant stone fruit tree *Prunus armeniaca* cv. Goldrich [J]. Gene, 2006, 374: 96-103.
- [26] 唐晰. 焦核龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 种子繁育 cDNA-AFLP 分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009: 1-67.
- [27] 王晓航. 四季蜜龙眼花芽和叶芽 cDNA-AFLP 体系建立及差异基因分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2010: 1-61.
- [28] 谭全伟. cDNA-AFLP 技术分离和分析荔枝胚胎发育相关基因 [D]. 福州: 福建农林大学, 2010: 1-73.
- [29] 黄有军, 周丽, 陈芳芳, 等. 山核桃成花过程基因表达的 cDNA-AFLP 分析 [J]. 浙江林学院学报, 2009, 26(3): 297-301.
- [30] 曾志, 王平, 梁文裕, 等. 龙眼成花逆转相关基因表达的 cDNA-AFLP 分析 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(6): 1050-1055.
- [31] 郑炳松, 陈苗, 褚怀亮, 等. 用 cDNA-AFLP 技术分析山核桃嫁接过程中的 CcARF 基因表达 [J]. 浙江林学院学报, 2009, 26(4): 467-472.
- [32] Geuna F, Banfi R, Bassi D. Identification and characterization of transcripts differentially expressed during development of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit [J]. Tree Genetics and Genomes, 2005, 1: 69-78.
- [33] Čechová J, Baránek M, Krška B, et al. Screening of differentially expressed genes during the end of endogenous dormancy of flower buds in *Prunus armeniaca* L. [J]. Plant Growth Regulation, 2012, 3(4): 1-10.
- [34] 卢秉国, 申艳红, 蒋际谋, 等. 利用 cDNA-AFLP 技术分析龙眼子叶胚基因表达差异 [J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(6): 562-566.
- [35] 赵惠新, 唐亚萍, 祝长青, 等. 甜瓜 cDNA-AFLP 分析体系的建立 [J]. 种子, 2009, 28(11): 48.
- [36] 李开拓, 潘东明, 郭志雄, 等. 荔枝果皮 cDNA-AFLP 分析体系的建立 [J]. 热带植物学报, 2010, 31(10): 1757-1762.
- [37] 李志红, 唐美玲, 刘佳, 等. 珠眉海棠 cDNA-AFLP 分析体系的建立 [J]. 核农学报, 2008, 22(5): 607-610.

Application of the cDNA-AFLP Technique on Biotechnology Breeding of Fruit Tree

HU Shu-ying, ZHANG Chun-hong, WANG Xiao-min, LI Wei-lin, WU Wen-long

(Botany Institute of Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract: cDNA-AFLP technique is a kind of mRNA fingerprint technology widely used in plant gene isolation and expression with reliable and efficient advantages. As to its current application in fruit tree biotechnology, the technique is mainly used in the first generation of fruit trees and has achieved many achievements, while in the second generation of fruit trees it has a small amount of coverage and in the third generation the application is at the initial stage. On the basis of a brief description of cDNA-AFLP technique in the basic principle and features, the application of cDNA-AFLP technique in fruit gene analysis was introduced especially, including the identification of bud mutation, gene isolation, gene expression analysis and construction of fingerprint. Finally, the prospect of cDNA-AFLP technique in the fruit tree biotechnology breeding was summarized.

Key words: cDNA-AFLP; gene identification; fruit tree