

白桦雄花序发育早期和中期差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析

暴 帅¹, 孔 雪¹, 邢 磊¹, 张翠霞², 官民晓¹,
赵丽红¹, 刘 闯¹, 刘雪梅^{1*}

(1. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 香城镇林业站, 山东 邹城 273503)

摘要:白桦雄花发育周期较长,从出现雄花序至花粉成熟经历近一年,其发育早期和中期是决定雄配子体发育的重要时期。采用 cDNA-AFLP 方法对白桦早期和中期发育雄花序进行了差异表达谱分析,共得到了 62 个 TDFs,其中 30 个 TDFs 与 Genbank 中的基因具有较高的同源性,其它 32 个是未知序列。GO 分析结果显示,这些已知基因主要参与代谢过程、细胞过程、刺激应答、生殖、信号传导和生物调控等生物学过程,其分子功能主要涉及催化活性、结合分子功能、酶调节活性和转运活性等;发现了参与生殖和雄花发育的两个重要 TDFs, Bplbs658 和 Bplbs199。另外,选择 11 个 TDFs 进行不同组织的 qRT-PCR 转录表达分析,结果表明这些基因不仅参与花发育,也参与营养组织的发育,但各自具有不同的组织表达特征。

关键词:白桦;生殖;差异表达;转录;花发育;雄花序

中图分类号:S792.153

文献标识码:A

cDNA-AFLP Analysis of Differentially Expressed Transcripts in Early and Middle Development Stages of Male Inflorescence in White Birch (*Betula platyphylla* Suk.)

BAO Shuai¹, KONG Xue¹, XING Lei¹, ZHANG Cui-xia², GUAN Min-xiao¹, ZHAO Li-hong¹,
LIU Chuang¹, LIU Xue-mei¹

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. Forestry Station of Xiangcheng Town, Zoucheng 273503, Shandong, China.)

Abstract: The reproductive development of male inflorescence for *Betula platyphylla* takes almost a whole year from the emergence of original male inflorescence to the formation of mature pollen. The early and middle development periods are much essential for the development of male gametophyte of *B. platyphylla*. The differentially expressed transcripts in early and middle developmental stages were analyzed by cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP) technique. Among 62 successfully sequenced fragments, 30 showed significant homologies to known genes in Genbank, while the other 32 were supposed to unknown and new sequences. GO annotation showed that these known genes were involved in the processes of metabolic process, cellular process, response to stimulus, reproduction, signal transduction, and biological regulation, and then with the molecular function of catalytic activity, binding molecular, enzyme regulator activity and transporter activity. Two important TDFs involved in reproduction and male inflorescence development of *B. platyphylla* were found, named as Bplbs658 and Bplbs199. In addition,

收稿日期:2013-11-05

基金项目:国家自然科学基金项目(31100449)

作者简介:暴帅(1988—),吉林省敦化市,在读硕士

* 通讯作者:东北林业大学生命科学学院,副教授

tion, the transcript expression of 11 TDFs were examined in different tissues by qRT-PCR. The results indicated that these genes were involved in the development of both floral tissues and vegetative tissues of *B. platyphylla* with distinct tissue-specific expression patterns.

Key words: *Betula platyphylla*; reproduction; differential expression; transcription; floral development; male inflorescence

当植物经过充分的营养生长后,达到一定的生理状态,当外界诱导成花的因素存在时(如光周期,春化作用和激素),就进入花发育阶段^[1]。随着测序技术和生物信息学的迅猛发展,植物花发育转录表达谱研究日益丰富,并提供了大量有价值的序列和调控网络信息。基于生殖发育的序列表达谱将会对其表型特征相关的基因提供功能注解。例如,Shaogui Guo 等从黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 两种类型的花即雌花和雌雄同体花的花芽中鉴定了大量差异表达基因和 SSR、SNP 标记,这些 EST 序列有利于促进更好地了解植物性别决定的分子机制^[2]。David H. and David T.^[3] 利用 Affymetrix ATH1 基因芯片技术鉴定了拟南芥 1 355 个雄配子体特异表达的基因,并揭示了配子体调控网络的调节蛋白和共表达基因。共表达分析鉴定了 17 个玉米(*Zea mays* L.) 基因模块,其表达模式与曾报导的基因有共同之处,其中的基因注释、基因家族特征和重要的候选基因等信息将有助于了解玉米的生殖发育机理^[4]。

被子植物雄性生殖发育以减数分裂和小孢子发生为基础,在此期间,多种基因共同调控下使得此过程顺利完成^[5]。近年来分子遗传研究表明在拟南芥小孢子发生阶段,信号分子和转录因子在决定花药细胞类型和控制基因表达方面起着重要作用^[6],并有不少转基因的报道。从拟南芥中分离出的 FLA3 基因参与小孢子发育和花粉内壁的形成^[7],AMS (ABORTED MICROSPORES) 基因编码的是一种 bHLH 蛋白,受转录因子 MYB35 调控,控制许多与开花相关的基因^[8],是正常小孢子发生所必需的^[9]。

白桦(*Betula platyphylla* Suk.) 为雌雄同株的单性花树种,其雄花为不完全花,只有两轮,即退化的花被和雄蕊,其生殖发育周期很长,近 1 年,单核小孢子经过冬季后,在次年春天发育为成熟的雄配子体,从小孢子母细胞至形成小孢子历时 1 个多月^[10]。根据多年来对白桦雄花序发育的解剖学研究结果^[10],将雄花序发育划分为早期、中期和晚期。

早期为减数分裂前,中期为减数分裂或小孢子发生,后期为雄配子体形成期。而雄花序发育早期和中期是决定雄配子体即花粉形成的重要阶段。因此,这两个时期的差异表达基因将在一定程度上揭示雄花序早、中期发育的分子机制。互补脱氧核酸扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)是一项分析基因差异表达的技术,具有灵敏度高、重复性好、假阳性低等优点^[11],是寻找差异表达基因的有效手段^[12]。本研究利用 cDNA-AFLP 技术分析白桦雄花序早期和中期差异表达基因,对其进行生物信息学功能预测和归类,确定关键基因及其表达规律,将有助于今后进一步揭示白桦雄花发育的分子机制。

1 材料与方法

1.1 植物材料

白桦雄花一般在每年的 6 月初开始发育,7 月中旬到 8 月中旬是减数分裂和小孢子发生时期^[7]。本研究材料经取材后解剖观察,早期(减数分裂前)雄花序采自 2011 年 6 月 17 日至 2011 年 6 月 29 日,中期(减数分裂期)雄花序采自 2011 年 8 月 5 日至 2011 年 8 月 17 日,每 3~4 天取材 1 次,每次取生长良好的雄花序,用液氮速冻后放入 -80℃ 冰箱中保存,用于 cDNA-AFLP 分析。2012 年 5 月 1 日至 2012 年 5 月 3 日搜集白桦成熟花粉,2012 年 7 月 18 日对白桦的老叶、老叶柄、幼叶、幼叶柄、老枝、幼枝、嫩枝、雌花、雌花柄、雄花进行取材,用液氮速冻后放入 -80℃ 冰箱中保存,用于 qRT-PCR 分析。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 CTAB-LiCl 沉淀法提取总 RNA^[13]。各白桦组织的总 RNA 经 DNaseI (MBI 公司) 消化除去 DNA,并用 RNA 清洁纯化试剂盒(北京盖宁金诺生物技术有限责任公司)纯化回收,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分光光度计检测其纯度及浓度。采用 M-MLV Rtase cDNA 合成试剂盒(TaKaRa, Japan) 合成双链 cDNA。

1.3 cDNA-AFLP 分析

cDNA-AFLP 应用技术参考了 Bachem 等^[14] 的

方法,并利用优化的白桦 cDNA-AFLP 体系^[15],采用低频酶 *EcoR* I 和 高频酶 *Mse* I 酶切双链 cDNA。预扩增中 Mg^{2+} 浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$,引物浓度为 $0.3 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$,dNTP 浓度为 $0.25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$,Taq 酶浓度为 1U,退火温度控制在 60°C 时,预扩增的结果好。扩增的产物经过 6% 的聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳和银染检测。

1.4 差异片段的克隆及序列分析

将 cDNA-AFLP 得到的具有差异表达条带经过回收和纯化克隆到 PMD-18T 载体 (TaKaRa, Japan) 并测序,利用 BLASTX 程序与 NCBI 数据库进行同源性比对分析^[16]。应用 Blast2go 软件进行 GO (Gene Ontology Consortium) 分析。

1.5 差异片段的 qRT-PCR 分析

使用 Primer 5.0 软件设计引物 (表 1)。反应试剂为 TransStart Top Green qPCR SuperMix (北京全式金),反应体系: $10 \mu\text{L}$ Trans Top qPCR Mix、 $1 \mu\text{L}$ cDNA 模板、上下游引物各 $1 \mu\text{L}$ 、 $6 \mu\text{L}$ ddH₂O。扩增程序: 94°C 30 s; 94°C 12 s, 57°C 30 s, 72°C 45 s, 79°C 1 s, 共 45 个循环。实验设置 3 次重复,整个反应在 ABI 公司生产的荧光实时定量 PCR 仪上进行,通过利用 Opticon Monitor 2 软件进行数据的处理和分析。

表 1 用于 qRT-PCR 的引物

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
<i>Bplbs68</i>	TGATTGTGTGATTGCAGAAGAC	TTGTGCTTATGC-CAACCTCT
<i>Bplbs110</i>	AAGTTTCAGGGTATGTCCGAC	GACATTGCTCTACAT-GATACTTATT
<i>Bplbs199</i>	GAAGAACAACGAGAAGGGTG	GAAGATTCTGGCAGG-TAAGC
<i>Bplbs319</i>	GACCTCAAGGCTGAAGACTC	CGCAATCTACCAACT-TCTGA
<i>Bplbs336</i>	ATGAACGACAAGATACTG-GAGAG	CCAGCCAACATAAGG-TAGAA
<i>Bplbs419</i>	TGTTTAGTTGCCACCGTTGA	CCGGCGATTAC-TAGCGATT
<i>Bplbs428</i>	TACACCAATCATCAACCCAC	CAATTTCAG-CAGAACTTCATACA
<i>Bplbs454</i>	GGAGACAAATCCTCTGCTGACC	TGTTTCGCAACCAG-GAAGATG
<i>Bplbs475</i>	TTCAGTCGGAAGAGTTTAGGTA	GCAAACCTGACCCTA-AGTAATCG
<i>Bplbs553</i>	GACACTGCTGGTCAAGAACG	CAAATGCCTTGCCT-GTCTCA
<i>Bplbs715</i>	GGAGGCTTGTAGGCAATGAA	ACGTTACTGGACCAT-GTGAAG
Actin	CATCTCTGATCGGAATGGAAG	AGATCCTTTCT-GATATCCACG

2 结果与分析

2.1 cDNA-AFLP 筛选的 TDFs 序列分析

在白桦雄花序发育早期和中期的差异基因表达谱中,共显示约 3 500 个多态性片段 (TDFs) (图 1), 425 个是差异表达的,其中 120 个 TDFs 在早期特异表达或表达量较高,210 个 TDFs 在中期特异表达或表达量较高。从中筛选出信号强、重复性好的 62 个条带进行回收、克隆、测序。通过 BLASTX 同源性比对,有 30 个片段 (45.5%) 与已知基因有较高相似性,其余片段均是未知功能片段。其中 17 个 TDFs (56.7%) 在雄花早期较强表达 (E), 13 个 TDFs (43.3%) 为中期较强表达 (M) (表 2)。

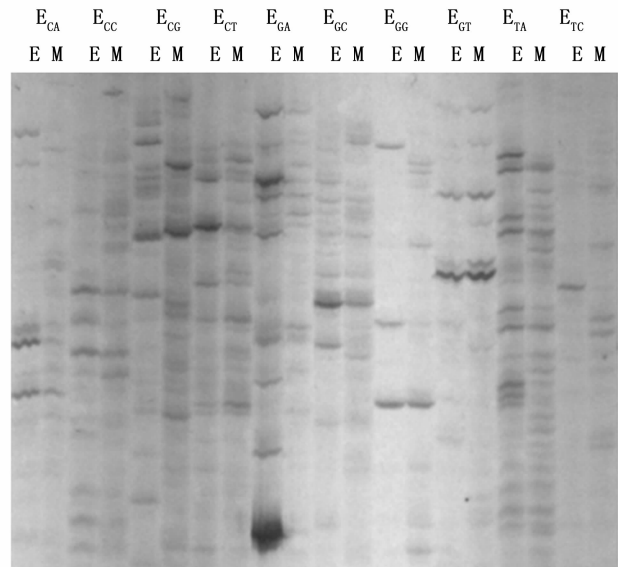


图 1 白桦早期和中期发育雄花序 cDNA-AFLP 的差异片段

对 30 个已知同源性的 TDFs 序列进行 GO 功能分类,共有 17 个 TDFs 得到 GO 注释,其中 16 个 TDFs 归于生物学过程,17 个归于分子功能,13 个归于细胞组分。在生物过程中,共涉及 62 个生物过程 (图 2),分为 6 个分类级别,二级分类包含 11 个生物学过程。可见,一个基因可参与多个生物过程。从二级分类看,代谢过程和细胞过程均为 23.5%,刺激应答占 13.7%,单生物体过程占 9.8%,信号生物过程和生物调控均为 7.8%,另外,生殖、多细胞有机体过程、细胞组分组织和发育过程均为 1.6%。在分子功能中 (图 3),共涉及 18 项,分为 5 个分类级别,二级分类中包含 4 项分子功能:催化活性 51.9%,结合分子活性 40.7%,酶调节活性和转运活性均为 3.7%。细胞组分中,共涉及 29 种组分,分

为7个从属级别,二级分类为5项,包含细胞(37.5%)、膜(25.0%)、细胞器(28.1%)、细胞外区(6.25%)和大分子复合体(3.1%)。上述GO注释

的多样性说明了雄花序发育中基因表达的复杂性,也暗示了雄花发育不同阶段具有不同的基因表达和调控机制。

表2 cDNA-AFLP 差异片段的序列同源性分析

差异片段	长度/bp	同源序列	同源性/E值	表达模式
Bplbs7	113	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit I from <i>Fragaria moschata</i> (AFS35526)	100%/3e-19	M
Bplbs68	177	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase from <i>Populus tremula</i> × <i>Populus alba</i> (ABL95959)	93%/6e-29	E
Bplbs110	180	Cytochrome c oxidase subunit I from <i>Secale cereale</i> (CAJ18329)	98%/5e-32	M
Bplbs174	180	Sieve element occlusion a from <i>Malus domestica</i> (ADN32815)	52%/4e-19	E
Bplbs199	233	CCR4-associated factor 1 homolog 7-like from <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> (XP_004305482)	84%/5e-38	E
Bplbs201	138	Auxin-binding protein ABP19a-like from <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> (XP_004287629)	78%/5e-13	E
Bplbs253	288	Peptide methionine sulfoxide reductase-like from <i>Cicer arietinum</i> (XP_004501840)	98%/1e-19	E
Bplbs279	119	Polygalacturonase-like from <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> (XP_004306749)	92%/4e-16	E
Bplbs319	254	Ethylene insensitive 2 from <i>Prunus persica</i> (ACY78397)	68%/2e-27	E
Bplbs336	255	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C-like isoform 2 from <i>Fragaria vesca subsp. Vesca</i> (XP_004303322)	96%/5e-48	E
Bplbs337	168	SUMO-conjugating enzyme SCE1-like isoform 1 from <i>Brachypodium distachyon</i> (XP_003574257)	97%/3e-15	M
Bplbs343	194	Poly(A) polymerase-like from <i>Vitis vinifera</i> (XP_002277939)	75%/3e-22	M
Bplbs349	118	Rac-like GTP-binding protein 3-like from <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> (XP_004299574)	97%/5e-19	M
Bplbs351	144	Expansin-like B1-like from <i>Cucumis sativus</i> (XP_004148383)	84%/4e-11	E
Bplbs370	224	Aspartyl aminopeptidase, putative from <i>Ricinus communis</i> (XP_002511215)	65%/4e-25	M
Bplbs398	212	Arginase, partial from <i>Prunus armeniaca</i> (AAV34907)	93%/1e-07	E
Bplbs419	280	ORF16-lacZ fusion protein from <i>Salmonella enterica subsp</i> (AAX67927)	58%/3e-17	M
Bplbs428	229	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex 2, mitochondrial-like from <i>Solanum lycopersicum</i> (XP_004244101)	99%/5e-40	E
Bplbs454	211	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase-like from <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> (XP_004306571)	87%/9e-36	E
Bplbs475	220	ATP synthase subunit 4 (mitochondrion) from <i>Vigna angularis</i> (YP_007889795)	97%/8e-33	M
Bplbs484	153	POL3-like reverse transcriptase from <i>Phaseolus coccineus</i> (AAK14317)	65%/1e-13	M
Bplbs553	160	Rab-type small GTP-binding protein from <i>Cicer arietinum</i> (BAA76422)	92%/2e-25	M
Bplbs658	151	Leucine-rich repeat receptor protein kinase EXS from <i>Medicago truncatula</i> (XP_003614019)	86%/4e-20	E
Bplbs677	165	COV1-like protein from <i>Zea mays</i> (NP_001151981)	92%/2e-07	E
Bplbs706	176	Lysine-specific demethylase 3A-like from <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> (XP_004301847)	64%/4e-06	E
Bplbs711	233	RRNA intron-encoded homing endonuclease from <i>Medicago truncatula</i> (XP_003614387)	93%/1e-14	E
Bplbs715	252	Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit from <i>Eucalyptus globules</i> (BAI53120)	90%/4e-46	M
Bplbs721	117	ATPase from <i>Vitis pseudoreticulata</i> (ABC70534)	100%/1e-16	E
Bplbs727	188	Chaperone binding / ATPase activator from <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_200619)	79%/3e-26	M
Bplbs788	309	Poly(A) polymerase from <i>Medicago truncatula</i> (XP_003631046)	60%/5e-27	M

2.2 差异表达 TDFs 的转录表达

为了检测是否为雄花特异性表达,从34个具有功能注释的TDFs中,选择11个差异表达较强、大于100 bp的TDFs进行不同组织的qRT-PCR分析,其中早期TDFs 6个(Bplbs68、Bplbs199、Bplbs319、Bplbs336、Bplbs428、Bplbs454),中期TDFs 5个(Bplbs110、Bplbs419、Bplbs475、Bplbs553、Bplbs715)。结果表明,几乎所有11个基因不仅在雌雄花中较高表达甚至高于雌雄花(如Bplbs715),也在其它组织有不同程度的较高表达,但他们在不同组织表达情况有明显差异(图4)。Bplbs68在老叶中的表达量最高,与雌花相比,在雄花中转录水平

更高(图4a)。Bplbs110在幼叶柄中表达量最高,而在幼叶和花粉中极低。雌花转录水平较雄花高(图4b)。Bplbs199在叶片中的表达量高于其它组织,且在雌花和雄花中的表达量基本持平(图4c)。Bplbs319在老叶柄和雄花中的表达量较高,在叶片和花粉中表达量极低(图4d)。Bplbs336在老叶中表达量最高,在茎和花粉中表达量较低,且其表达量在雌花中高于在雄花中(图4e)。Bplbs419在雌花中的表达量非常高,远远高于雄花和其它组织,在叶片、叶柄和花粉中表达量极低(图4f)。Bplbs428在老叶和雌雄花中表达量较高,且在叶柄高于叶片(图4g)。Bplbs454在叶组织和雌雄花序中表达水平较

Biological Process GO Classification

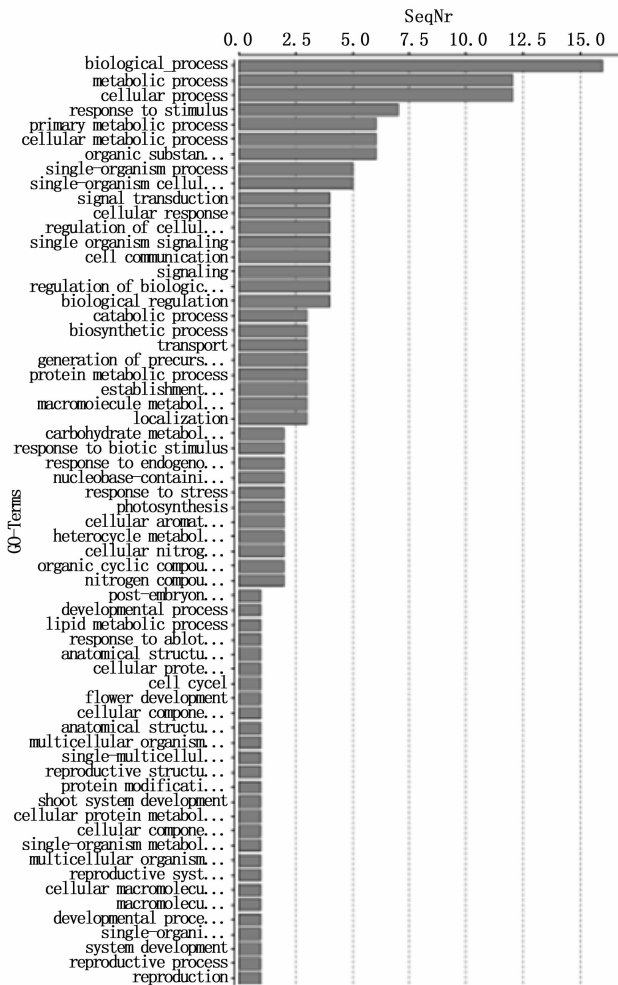


图2 白桦雄花发育早期和中期差异表达基因的
GO 生物过程分析

Molecular Function GO Classification

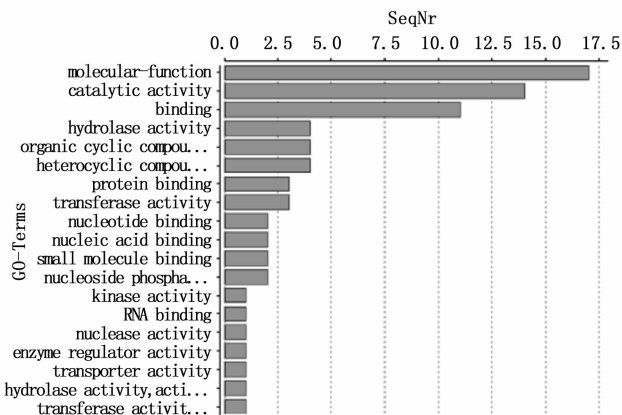


图3 白桦雄花发育早期和中期差异表达
基因的 GO 分子功能分析

花的3倍,在其它组织中表达量均较低(图4i)。 *Bplbs553* 在叶和雌雄花序中表达均较高,在茎和花粉中表达量低(图4j)。 *Bplbs715* 只在叶片高水平表达,而在其它组织表达极低(图4k)。值得强调的是,该11个TDFs在花粉中的表达量均很低。

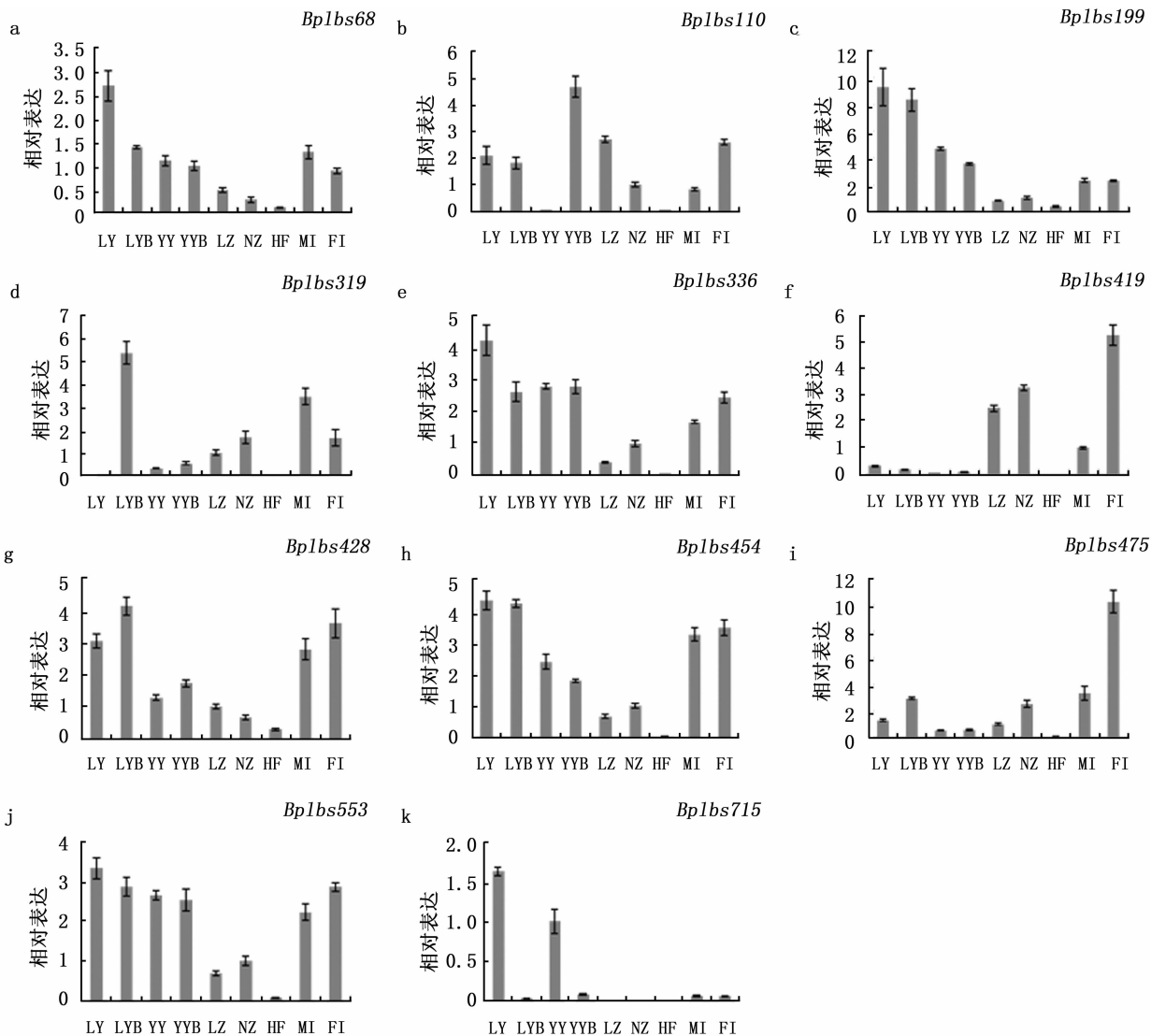
3 讨论

本研究通过cDNA-AFLP技术,获得了白桦雄花序早期和中期差异表达的66个TDFs,对其中30个具有功能注释的TDFs进行了GO分析,发现白桦雄花两个不同发育时期的生物学过程有很大差异。但其中的代谢过程、细胞过程、生物调节过程、信号传递过程、刺激应答和单生物体过程是两个发育时期共有的,说明相同的生物学过程可能需要不同的基因维持其发育及生物学活动,同时暗示了这些生物学过程在维持白桦雄花序早期和中期发育具有重要作用。除此之外,通过GO注释发现了其它重要的生物学过程,如生殖、多细胞生物过程、定位、发育和细胞组分的组织等过程。由于本研究涉及的基因数量较少,不宜根据GO注释确定两个发育时期所特有的生物学过程。另外,白桦雄花序中包含大量的苞片,对于雄花的发育具有支持、保护和营养的作用,因此,这些GO注释的基因序列不仅来源于花药及花粉发育组织,同时也可能来源于周围的苞片组织。

为了更详细了解差异基因所涉及的生物过程,分析了三级生物过程分类,共包含21个生物过程,其中,细胞代谢、有机物代谢和初级代谢过程各占6/59,单生物体细胞过程占5/59,生物过程调控、细胞刺激应答和单生物信号生物过程均占4/59,生物合成过程、分解代谢过程和定位建成均占3/59。值得注意的是,各类刺激或胁迫应答过程占11/59,除了生物内因素,环境因素如光、温度、水分、病原体、激素和生长调节剂等可直接影响植物有性生殖发育^[17-18]。因此,白桦雄花发育过程是一个具有活跃代谢和信号传递的过程,并受多种生物体内外因素的影响。另外,约11/59为单生物细胞过程、单生物代谢过程、单生物信号生物学过程及单生物发育过程等。

另外,发现了两个与花发育和细胞周期相关的、分别具有激酶活性和核酸结合作用的基因:*Bplbs658*和*Bplbs199*。根据功能注释,*Bplbs658*推测为富亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶(LRR-RLK),该类LRR-

高,且老叶明显高于幼叶,而花粉中的表达量极低(图4h)。 *Bplbs475* 在雌花中表达量非常高,约为雄



LY:老叶;LYB:老叶柄;YY:幼叶;YYB:幼叶柄;LZ:老枝;NZ:嫩枝;HF:花粉;MI:雄花;FI:雌花。

图4 白桦雄花发育差异表达基因的不同组织转录表达

RLK 蛋白激酶主要具备 3 种生物学功能:抗逆性反应、调节植物发育和介导植物激素信号传导^[19-20]。本研究中,其 GO 分子功能分类中主要为激酶活性、催化活性和对含磷基团的转移酶活性,GO 细胞组分分类中为细胞质、外膜、细胞器、高尔基体。在 GO 生物过程我们发现了生殖发育、花发育和后胚胎发育过程。拟南芥中该基因的突变体杂交植株 *brll-1/brll-4* 为完全雄性不育^[19],由此推测,该基因在白桦的花发育中可能具有重要作用。除此之外,该基因还涉及其它 GO 生物过程,如生物学过程调控、细胞交流、单有机体过程、芽系统发育、信号传导和生物刺激应答,但没有涉及非生物刺激应答,推测该基因除了参与花发育,也可能参与生物内的多种发育调控和信号传导。后续将对其进行更深入的生物学功

能研究。

Bplbs199 被推测为编码 CAF1 的基因。本研究中,该基因的 GO 分子功能为水解酶活性、核酸结合、有机循环、核酸酶和杂环复合物结合活性,GO 细胞组分显示为具有外膜的细胞器和细胞核。CAF1 通过与细胞周期蛋白激酶 DBF2 调控细胞周期^[21]。缺失 CAF1 可导致雄鼠不育^[22]。该基因可能参与白桦雄花发育,值得今后进一步探讨。

qRT-PCR 分析中, *Bplbs68*、*Bplbs319*、*Bplbs428*、*Bplbs454* 和 *Bplbs475* 分别在雄花中比在其它多数组织中的表达量较高,后四者在雄花中的表达量高于其它 7 个 TDFs(图 4),推测它们可能与雄花发育有关。另外, *Bplbs419* 和 *Bplbs475* 在雌花中表达量非常高, *Bplbs553* 在雌雄花和叶组织表达量显著高于

其他组织, *Bplbs715* 只在叶片中高表达, 说明它们具有较强的组织特异性表达差异(图 4)。

在雄花表达量较高的 4 个 TDFs 中, *Bplbs319* 与桃的 EIN2(乙烯不敏感 2) 有着较高的同源性, 乙烯是一种植物激素, 在植物的生长和发育过程中起着重要的作用^[23]。EIN2 蛋白定位于内质网, 在乙烯信号中起至关重要的作用^[24]。Ecker^[25] 研究小组发现内质网中 EIN2 蛋白加工的一种机制以及信号分子移动到细胞核中是激活乙烯反应的必要条件, 而且乙烯外界压力条件可触发植物中的各种负反应, 包括光合效率减低、授粉不良以及花、叶和种子损失等^[26]。在白桦和番茄中具有相似的表达类型, 在幼叶中表达明显高于老叶^[27], 此外本研究还发现, 该基因在雄花序中高表达, 在花粉中几乎不表达(图 4 d)。这个结果暗示了该基因可能参与叶片成熟和雄花发育。

Bplbs428 与茄属的酮戊二酸脱氢酶复合物 2(OGDHC) 具有较高的同源性, OGDHC 便随着柠檬酸合酶和 NAD-异柠檬酸脱氢酶被认为是柠檬酸循环控制中的调节点, 在柠檬酸循环中起着十分重要的作用^[28-30]。柠檬酸循环是植物代谢的主要能量来源, 能够为植物花发育提供能量^[31]。本研究中, 该基因在雌雄花和老叶发育中呈高水平表达(图 4 g), 与在拟南芥老叶中的表达水平相似^[32], 推测 *Bplbs428* 可能在参与了叶片成熟的同时也参与白桦雌雄花的成熟。

Bplbs454 与草莓属 2,4 二烯酰辅酶 A 还原酶(DEC2) 同源性较高, 近几年研究表明 DEC2 参与不饱和脂肪酸代谢作用^[33], 植物当中的不饱和脂肪酸含量决定植物对温度逆境的适应能力^[34], 而温度是植物花发育过程中至关重要的影响因素。该基因与 *Bplbs 428* 类似, 在雌雄花和老叶中明显高表达(图 4 h)。由此推测 *Bplbs428* 可能对白桦的生长发育和花发育中起一定作用, 由于相关报道较少, 需要以后更多证据来证明。

Bplbs475 与豇豆的 ATP 合成酶具有较高的同源性, ATP 合成酶广泛分布于线粒体内膜, 叶绿体类囊体上, 参与氧化磷酸化和光合磷酸化, 合成 ATP, 在不同的光强下, 它会改变对光合作用的反馈调节^[35]。在早期和中期发育的雄花序外部聚集大量的绿色苞片, 其物质和能量代谢直接影响内部花药的发育。*Bplbs475* 在白桦雄花和雌花中较其它组织呈高水平表达, 尤其在雌花中更显著(图 4 i), 与在

拟南芥花序中的表达类型相似^[36], 可以推测该基因可能在花发育和雌性生殖发育中起着重要的作用。

除了已知功能 TDFs, 还获得了一些未知基因 TDFs, 进一步研究这些未知基因, 可以为白桦花发育相关新基因开发提供新的资源。本研究筛选出来的与白桦雄花发育相关的基因, 为今后对白桦花发育以及花器官形成的后续研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: Genetics interactions controlling flower development [J]. *Nature*, 1991, 353(6339):31-37
- [2] Shaogui G, Yi Z, Je-Gun J, et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of cucumber flowers with different sex types [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 384-397
- [3] David H, David T. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(11): R85
- [4] Rebecca M D, Candice N H, Malali G, et al. Utility of RNA sequencing for analysis of maize reproductive transcriptomes [J]. *The Plant Genome*, 2011, 4(3): 191-203
- [5] Ma H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis microgametogenesis in flowering plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56:393-434
- [6] Chang F, Wang Y, Wang S, et al. Molecular control of microsporogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(1):66-73
- [7] Li J, Yu M, Geng L L, et al. The fasciclin-like arabinogalactan protein gene, FLA3, is involved in microspore development of *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2010, 64(3):482-497
- [8] Xu J, Yang C, Yuan Z, et al. The ABORTED MICR-OSPORES regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(1):91-107
- [9] Sorensen A M, Krober S, Unte U S, et al. The *Arabidopsis* ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor [J]. *The Plant Journal*, 2003, 33(2):413-423
- [10] 姜立杰, 张开春, 张晓明. cDNA-AFLP 技术及其在基因表达研究中的应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(12):82-86
- [11] 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
- [12] 曾凡锁, 南楠, 詹亚光. 富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总 RNA 的提取 [J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(5):913-916
- [13] Bachem C W, Oomen R J F, Visser R G. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16(2):157-173
- [14] 邢磊, 刘雪梅, 宋福南. 白桦 cDNA-AFLP 体系的优化和建立

- [J]. 东北林业大学学报,2010,38(10):15-18
- [16] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*,1997,25(17):3389-3402
- [17] Heslop-Harrison J; The experimental modification of sex expression in flowering plants[J]. *Biological Reviews*, 1957, 32(1): 38-90
- [18] Korpelainen H; Labile sex expression in plants [J]. *Biological Reviews* 1998, 73(2):157-180
- [19] Aifen Z, Huachun W, John C. W, *et al.* BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis brassinosteroid* signaling [J]. *The Plant Journal*, 2004, 40(3):399-409
- [20] 马媛媛,甘睿,王宁宁. 植物富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的生物学功能 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(4):331-339
- [21] Liu H Y, Toyn, J H, Chiang Y C, *et al.* DBF2, a cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex [J]. *EMBO J.* 1997, 16:5289-5298
- [22] Berthet C, Morera A M, Asensio M J, *et al.* CCR4-associated factor CAF1 is an essential factor for spermatogenesis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004,24: 5808-5820
- [23] Bleecker A B, Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2000,16(1):1-18
- [24] Ju C, Yoon G M, Shemansky J M, *et al.* CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2012, 109(47):19486-19491
- [25] Alonso J M, Ecker J R. The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction [J]. *Science Signaling*, 2001, (70):re1
- [26] Qiao H, Shen Z, Huang S C, *et al.* Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas [J]. *Science Signaling*,2012,338(6105):390-393
- [27] Wang J, Chen G, Hu Z, *et al.* Cloning and characterization of the EIN2 homology gene LeEIN2 from tomato; full length research article [J]. *Mitochondrial DNA*,2007,18(1):33-38
- [28] Voet D, Voet J G, Pratt C W. Electron transport and oxidative phosphorylation [M]. *Biochemistry*, 3rd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons,2004:797-842
- [29] Campbell M K, Farrell S O. Bioquímica [M]. Cengage Learning Latin America,2004:515-543
- [30] Araujo W L, Nunes-nesi A, Nikoloski Z, *et al.* Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues [J]. *Plant, Cell & Environment*,2012, 35(1):1-21
- [31] Carlsson J, Leino M, Sohlberg J, *et al.* Mitochondrial regulation of flower development [J]. *Mitochondrion*,2008,8:74-86
- [32] Araujo W L, Tohge T, Nunes-nesi A, *et al.* Phosphonate analogs of 2-oxoglutarate perturb metabolism and gene expression in illuminated *Arabidopsis* leaves [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 114:1-44
- [33] Hubbard P A, Liang X, Schulz H, *et al.* The crystal structure and reaction mechanism of *Escherichia coli* 2,4-dienoyl-CoA reductase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(39):37553-37560
- [34] Lyons J M. Chilling injury in plants [J]. *Annual Review of Plant Physiology*,1973,24(1):445-466
- [35] Kohzuma K, Dal B C, Kanazawa A, *et al.* Thioredoxin-insensitive plastid ATP synthase that performs moonlighting functions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012,109(9):3293-3298
- [36] Li W Q, Zhang X Q, Xia C, *et al.* Male Gametophyte Defective 1, encoding the Fad subunit of mitochondrial F1F0-ATP synthase, is essential for pollen formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*,2010,51(6):923-935