

滇杨侧芽休眠期基因表达多样性的 cDNA-AFLP 分析

李 里¹, 江 涛^{1,2}, 周 安 佩¹, 纵 丹¹, 赵 月 明¹, 何 承 忠^{1,2}

(1. 西南林业大学, 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学, 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘 要:为探讨滇杨分枝特性差异的分子机理,对采集于四川省和云南省的 59 个滇杨优树无性系 3 a 生苗木进行了 cDNA-AFLP 差异研究,分析了苗木侧芽休眠时基因表达的多样性。结果表明:筛选出的 7 对引物组合共扩增出了总条带 608 条,其中有 353 条差异性条带,Nei's 基因多样性指数为 0.1061,Shannon 信息指数为 0.1856,遗传分化系数为 0.0123,居群间的基因流为 40.28,表明居群间的遗传分化程度较低。分子生物学方差分析(AMOVA)结果表明,居群间的差异仅为 0.99%,差异不显著($P=0.052$),居群内差异占 99.01%,差异极显著;表明滇杨侧芽在休眠期个体之间基因表达的复杂性;聚类分析结果显示,在亚分枝单元或最小分枝单元,大部分无性系能够以分枝性状相聚。该研究结果为进一步开展滇杨分枝相关基因的筛选及克隆等工作奠定了前期研究基础。

关键词:滇杨侧芽;休眠期;cDNA-AFLP;遗传差异

中图分类号:S 503.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0117-05

滇杨(*Populus yunnanensis* Dode)为我国西南地区特有的杨属青杨派树种,具有分布海拔变幅大、适应性强、易繁殖、生长快、成材早等优良特点,属于全国乃至世界少有的广泛分布于低纬度高海拔地区的宝贵杨树资源,也是开展山地造林的先锋树种,滇杨主要分布于云南中部、北部及滇南的开远、蒙自和文山、四川西南部以及贵州威宁等地^[1-4]。早在 18 世纪滇杨就作为高山杨树的代表引种到澳大利亚,而新西兰把滇杨作为抗叶锈病和叶斑病的基因资源加以收集、保存和利用^[5-6],喜马拉雅山麓高原地带的苗期对比试验显示,滇杨比银白杨、美洲黑杨等具有更明显的速生性,在高原地带具有十分巨大的发展潜力^[7-8]。四川的布托、美姑和昭觉大量发展滇杨人工林,为当地牧民提供优良的建筑材料和燃料,产生了良好的社会、经济和生态效益^[9]。由此可见,滇杨是一种具有多种用途的杨属树种,其开发利用不仅能够为我国杨树育种提供新的基因资源,还能够为我国高原地区短周期速生丰产林的营造提供一个优良树种。然而,在前期开展的滇杨资源调查与优良变异类

型的工作中发现,分布于不同海拔高度的滇杨,其干形、分枝状况、虫害情况等差异较大。侧芽萌发能力和分枝习性决定了其冠层结构,理想的冠型结构正是杨树遗传育种的改良目标之一^[10]。植物枝芽是由腋分生组织分化而来,而分枝程度不仅依赖于腋分生组织的建立,更依赖于它随后的活力和生长,枝芽一旦产生,要么迅速发育成分枝,要么保持休眠状态,而芽的休眠是对外界环境条件的一种生物学适应,在休眠后又可以重新被激活产生分枝^[11]。因此,通过对滇杨侧芽在休眠时期的基因表达差异分析,能够为阐明滇杨优树苗木分枝特性差异的分子机理提供理论依据。

cDNA-AFLP 是 Bechem 等^[12]将扩增片段长度多态性(AFLP)技术应用于 mRNA 表达差异分析而形成的一种 mRNA 指纹图谱技术,它结合了 RT-PCR 和 AFLP 技术,可对生物体转录组进行较全面、系统的基因差异表达分析。该技术具有假阳性低、重复性好、稳定可靠的特点,目前已普遍应用于植物逆转录组的全面、系统的分析中^[13-14]。

该研究运用 cDNA-AFLP 分子标记,对滇杨优树无性系 3 a 苗木主干侧芽在休眠时的表达差异进行了研究,分析其基因表达的多样性,以期与滇杨分枝相关的功能基因的筛选、定位、分离及鉴定等工作提供科学依据,为开展滇杨理想株型的分子育种奠定前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用绝对值优树选择方法,于 2008 年 12 月至 2009 年 2 月从四川省凉山州、云南省丽江市、曲靖市等滇杨天然林或人工林中,选择基本处于自然生长状态、人为

第一作者简介:李里(1985-),男,云南德宏人,硕士研究生,现主要从事林木遗传育种等研究工作。

责任作者:何承忠(1970-),男,甘肃民勤人,博士,教授,现主要从事林木遗传育种与分子生物学方面的研究工作。E-mail:hcz70@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960320);国家林业公益性行业专项基金资助项目(201104076);云南省中青年学术与技术带头人后备人才培养基金资助项目(2012HB021)。

收稿日期:2013-04-08

干扰较少、生长健壮、干形通直圆满、无病虫害的成年优树 59 株,分别采集当年萌生的健壮枝条作为繁殖材料,制作约 20 cm 长的插穗进行扦插繁殖育苗。

表 1 59 株滇杨优树采集地点及分枝性状

Table 1 Sampling site and branch characteristics of 59 *Populus yunnanensis* trees

序 号	优树无性 系编号	采集地点	分枝性状
1	QXJ022	云南省宣威市靖外镇	分枝角度小,侧枝多且较粗
2	QXJ021	云南省宣威市靖外镇	分枝角度大,侧枝多且较粗
3	QXB028	云南省宣威市板桥镇	分枝近平展,侧枝多且较粗大
4	QZD032	云南省沾益县大坡乡	分枝角度大,侧枝多且较粗
5	QXJ031	云南省宣威市鸡街乡	分枝角度大,侧枝多且较粗
6	LYL001	云南省玉龙县拉什海乡	分枝角度大,侧枝多且较粗
7	LYL004	云南省玉龙县拉什海乡	分枝角度大,侧枝多且较粗
8	QZY003	云南省沾益县炎方乡	分枝角度大,侧枝少且较细小
9	QZY002	云南省沾益县炎方乡	分枝角度小,侧枝少且较细
10	QZY001	云南省沾益县炎方乡	分枝角度大,侧枝少且较细
11	QXJ016	云南省宣威市靖外镇	分枝角度大,侧枝少且较细
12	QXJ018	云南省宣威市靖外镇	分枝角度大,侧枝少且较细
13	QXB010	云南省宣威市宝山镇	分枝角度大,侧枝少且较细
14	QXJ030	云南省宣威市鸡街乡	分枝角度大,侧枝多且较粗
15	QXB007	云南省宣威市宝山镇	分枝角度小,侧枝多且较粗
16	QXJ020	云南省宣威市靖外镇	分枝角度大,侧枝多且较粗
17	QXH025	云南省宣威市花椒镇	分枝角度大,侧枝多且较粗
18	QZY004	云南省沾益县炎方乡	分枝角度大,侧枝多且较粗
19	QXB005	云南省宣威市板桥镇	分枝角度小,侧枝多且较粗大
20	LYL002	云南省玉龙县拉什海乡	分枝角度大,侧枝多且较粗
21	HKB001	云南省开远市碑格乡	分枝角度小,侧枝少且较细
22	QXB006	云南省宣威市板桥镇	分枝近平展,侧枝少且较细
23	QXB026	云南省宣威市板桥镇	分枝角度大,侧枝少且较细
24	LBB001	四川省布拖县补尔乡	分枝角度小,侧枝多且较粗
25	LBB002	四川省布拖县补尔乡	分枝角度大,侧枝少且较细
26	LMM001	四川省美姑县县城	分枝角度大,侧枝多且较粗
27	LMB005	四川省美姑县巴普镇	分枝近平展,侧枝少且较细
28	LMB006	四川省美姑县巴普镇	分枝近平展,侧枝多且较粗
29	LMB019	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝多且较粗
30	LMB017	四川省美姑县巴普镇	分枝角度小,侧枝多且较粗
31	LMB015	四川省美姑县巴普镇	分枝角度小,侧枝多且较细
32	LMB018	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝多且较粗
33	LMB016	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝少且较细
34	LMB020	四川省美姑县巴普镇	分枝近平展,侧枝多且较粗
35	LML002	四川省美姑县龙门乡	分枝角度小,侧枝少且较细小
36	LMB009	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝多且较粗
37	LML001	四川省美姑县龙门乡	分枝角度小,侧枝少且较细小
38	LMB013	四川省美姑县巴普镇	分枝角度小,侧枝多且较粗
39	LMB008	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝多且较粗
40	LMB014	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝多且较粗
41	LMB011	四川省美姑县巴普镇	分枝角度小,侧枝少且较细
42	LMB007	四川省美姑县巴普镇	分枝角度小,侧枝多且较细
43	LBB021	四川省布拖县补尔乡	分枝角度大,侧枝多且较粗大
44	LBM022	四川省布拖县木尔乡	分枝角度小,侧枝多且较细
45	LBM023	四川省布拖县木尔乡	分枝角度小,侧枝多且较粗大
46	LBM024	四川省布拖县木尔乡	分枝角度小,侧枝少且较细小
47	LMB025	四川省美姑县巴普镇	分枝近平展,侧枝多且粗大
48	LMB026	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝少且较细
49	LMB027	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝少且较细
50	LMB028	四川省美姑县巴普镇	分枝近平展,侧枝多且粗大
51	LMB029	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝少且较细
52	LMB030	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝少且较细
53	LMB031	四川省美姑县巴普镇	分枝角度大,侧枝少且较细
54	LMB032	四川省美姑县巴普镇	分枝角度小,侧枝多且较细
55	LMB033	四川省美姑县巴普镇	分枝角度小,侧枝多且较细
56	LMB034	四川省美姑县巴普镇	分枝近平展,侧枝多且较粗
57	LME035	四川省美姑县峨曲古乡	分枝角度小,侧枝少且较细,分枝间距较大
58	LME037	四川省美姑县峨曲古乡	分枝角度大,侧枝少且粗,分枝间距较大
59	LME038	四川省美姑县峨曲古乡	分枝角度大,侧枝多且较细

采用完全区组试验设计,4 株小区,3 次重复,于次年 3 月平茬后以株行距 3 m×3 m 定植于西南林业大学树木园。于 2012 年 1 月侧芽休眠时,在同一区组内,各优树无性系在小区内随机选取 1 株苗木,采取上一年度抽生主干的中下部 3 颗侧芽混合后作为测试样本,提取总基因组 RNA。59 株滇杨优树来源详见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 总基因组 RNA 提取与 cDNA 双链合成 将侧芽置于预先冷冻的研钵内,加入适量液氮后轻轻敲击,去除芽鳞,采用改良 CTAB 法提取各样本的总 RNA^[11]。参照 TIANGEN 公司 Quant cDNA Synthesis Kit 中介绍的方法合成 cDNA 第 1 条链。第 2 条链合成每管反应体系 80 μ L,其中,第 1 链反应产物 20 μ L,10×*E. coli* DNA ligase buffer 8 μ L,10 mM dNTP mix 1.5 μ L,0.1 M DTT 3.0 μ L,*E. coli* DNA ligase (60 U/ μ L) 0.125 μ L, DNA polymerase I (5 U/ μ L) 5 μ L, RNase H (5 U/ μ L) 0.015 μ L,加 ddH₂O 至 80 μ L。12℃温育 2 h 后,22℃温育 2 h;加入 17 μ L 0.2 M 乙二胺四乙酸(EDTA),终止反应;加入 1.5 μ L (15 U) RNAase,37℃消化 30 min;加入 5 μ L (3 U) 的蛋白酶 K,37℃消化 30 min。双链 cDNA 合成后经过纯化,-20℃保存备用。

1.2.2 AFLP 分析 采用 *Eco*R I/*Pst* I 组合进行 cDNA 的限制性双酶切,与接头连接,预扩增反应选用引物组合 E₀₀/P₀₀,选择性扩增反应采用 E₊₃/P₊₃ 引物组合,选择性扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染法进行指纹图谱的显影。

1.3 数据分析

AFLP 属于显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带可被认为具有同源性^[15]。依据同一位点条带的“有”、“无”,分别计为“1”或“0”,形成 0/1 矩阵。应用 POPGENE 1.32 软件^[16]对云南和四川 2 个滇杨居群及各单株滇杨优树无性系分别进行各参数分析,计算差异性条带百分率(PPB)、观测等位基因数(N_o)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)和居群间基因分化系数(G_{ST})^[13]。应用 NTSYSpc 2.0 软件计算各优树间的遗传相似系数,采用 UPGMA 方法对各优树无性系进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 滇杨侧芽的差异表达基因多样性

由表 2 可知,从 48 对 AFLP 引物组合中筛选出扩增条带多、分布均匀、清晰可辨且多态性高的 7 对引物组合用于 59 株滇杨优树无性系 3 a 生苗木落叶期侧芽的 cDNA-AFLP 分析。7 对引物组合共扩增得到总条带 608 条,其中,差异性条带数 353 条;平均每对引物组合扩增出 86.86 条带,平均每对引物组合得到 50.43 条差异性条带。由此可见,在休眠期,59 株滇杨优树无性系苗木侧芽内基因表达的差异性较为丰富。59 株滇杨优树无性系苗木休眠期侧芽 cDNA-AFLP 标记结果显示,滇杨优树无性系苗木侧芽在休眠期时功能基因表达总

表 2

滇杨优树无性系侧芽 cDNA-AFLP 分析结果

Table 2

The cDNA-AFLP results of lateral buds of *Populus yunnanensis* clones

居群	样本数	差异条带数	差异带百分率 PPB/%	观测等位基因数 N_o	有效等位基因数 N_e	Nei's 基因多样性指数 H	Shannon's 信息指数 I
云南	23	337	55.43	1.5543	1.1388	0.1049	0.1821
四川	36	345	56.74	1.5674	1.1402	0.1048	0.1816
平均	—	341	56.09	1.5609	1.1395	0.1049	0.1819
总计	59	353	58.06	1.5806	1.1390	0.1061	0.1856

差异 H_T 为 0.1062, 居群内功能基因平均表达差异 H_S 为 0.1048, 遗传分化系数 $G_{ST} = 0.0123$, 基因流 $Nm = 40.28$ 。因此, 在休眠期, 滇杨不同居群之间的功能基因表达差异仅占总差异的 1.23%, 居群内不同优树无性系之间的差异是滇杨侧芽功能基因组差异的主要来源, 但 2 个居群之间存在着较高的基因交流。不同采集地优树无性系侧芽功能基因组的表达差异性指标分析表明, 采集于四川的滇杨优树无性系的差异性条带数、差异性条带百分率、观测等位基因数、Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别为 345、56.74%、1.5674、1.1402、0.1048、0.1816, 采集于云南的滇杨优树无性系, 差异性条带数为 337, 差异性条带百分率=55.43%, 观测等位基因数=1.5543, Nei's 基因多样性指数=0.1049, Shannon's 信息指数=0.1821。其中, 云南省滇杨优树无性系居群的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数略高于四川滇杨优树居群, 表明云南居群滇杨优树无性系苗木侧芽功能基因组在休眠期时的差异性表达较四川居群更为丰富。

方差分析结果表明(表 3), 方差变量的 0.99% 来源于居群间, 居群内不同个体间的变异占总变异的 99.01%, 居群间的分子水平差异不显著($P=0.052$), 而居群内不同个体间的差异达到极显著水平($P<0.001$)。表明滇杨侧芽休眠期基因表达也存在着较大的差异性, 而差异性的来源主要是来自于居群内不同个体之间。

表 3 滇杨 2 个居群 cDNA-AFLP 标记的 AMOVA 分析

Table 3 AMOVA analysis of cDNA-AFLP

markers between two populations in *Populus yunnanensis*

变异来源	自由度	方差和	变异组分	变异百分率/%	P 值
居群间	1	67.32	0.5266	0.99	0.052
居群内	57	2 994.91	52.5424	99.01	<0.001
总计	58	3 062.24			

2.2 滇杨侧芽基因表达相似性的聚类分析

基于 cDNA-AFLP 分析结果, 应用 NTSYSpc version 2.10e 软件计算 59 个滇杨优树无性系间的遗传相似系数并采用 UPGMA 进行聚类分析。结果表明, 59 个滇杨优树无性系之间的遗传相似系数在 0.7385~0.9408 之间, 平均相似系数为 0.8263。其中, QXJ031 和 LBB002 之间相似系数最大, 表明二者之间的差异最小, 而 QXJ018 与 LMB034 之间的相似系数最小, 表明二者之间的差异最大。云南居群 23 个滇杨优树无性系之间的遗传相似系数变化幅度为 0.7615~0.9161, 平均相似系数为 0.8244; 最大值出现在 QXJ031 和

LYL004 之间, 表明二者之间在休眠期基因表达差异性最小, 最小值出现在 QXB005 与 QXB006 之间, 虽然采集于同一地方, 但二者之间在休眠期基因表达差异性最大。四川居群 36 个滇杨优树无性系之间的遗传相似系数变异范围为 0.7500~0.9326, 平均相似系数为 0.8289; 最大值出现在 LMB016 和 LMB020 之间, 最小值出现在 LMB019 和 LMB029 之间。由此可见, 在休眠期, 处于相同环境条件下的四川居群滇杨优树无性与云南居群滇杨优树无性系之间的平均遗传相似系数比较接近, 与二者之间的分子水平的差异不显著相一致。

从图 1 可以看出, 以遗传相似系数 0.80 为阈值, 59 个滇杨优树无性系可以划分为 3 组。第 1 组包括了 52 个滇杨优树无性系, 其中, 采集于云南的滇杨优树无性系全部聚分于第 1 组, 但来自于同一采集地的优树无性系并没有聚集于相同分枝。第 2 组包含了采集于四川美姑县的 6 个无性系, 但 LME037 和 LME038 采集于峨边古乡, 二者先相聚于同一单个分支单元; 其余 4 个优树是采集于巴普镇, 相聚于同一亚分支单元。第 3 组仅由优树无性系 LMB015 构成。由此可见, 滇杨侧芽功能基因组的差异与地理来源之间不存在较强的相关性。由于树体在休眠期时, 各部位器官均处于生长停止期, 而外部环境主要表现为低温, 且此时正是处于昆明市大气环境较为干燥的时期, 加上对苗木没有开展浇水等人工管理措施, 因此, 此时苗木侧芽功能基因表达的差异性可能与各苗木的抗逆性有一定关系。在聚类图的分支位置, 表现出了较弱的采集地生长环境(如低温等)的某些特征, 如滇杨优树 LMB029、LMB030、LMB031 和 LMB034, 采集于相同的小环境之中, 4 株优树优先相聚为一个亚分支, 然后再与 LME037 和 LME038 的最小分支单元相聚。此外, 进一步对亚分枝单元和最小分枝单元分析可知, 大部分无性系能够以侧枝粗细或侧枝多少相聚为亚分枝单元或最小分枝单元, 如无性系 QXJ022、QXJ021 和 QZD032, 分枝角分别为小、大和大, 侧枝分枝数量均较多且粗大, 3 个无性系相聚为一个亚分枝单元; 无性系 LMB032 和 LMB033, 分枝角均为小, 侧枝分枝数均表现为多且细, 二者相聚为一个分枝单元。

3 讨论

树木的分枝特性受较强的遗传控制, 尤其在杨树的研究中, 除分枝粗度外, 分枝角度、分枝数量、分枝长度等性状均在不同基因型间存在明显的差异^[17-19]。毛果杨(*P. trichocarpa*)和美洲黑杨(*P. deltoides*)栽植在相同环境条件下, 在侧枝生长方面存在很大的差异, 而且二

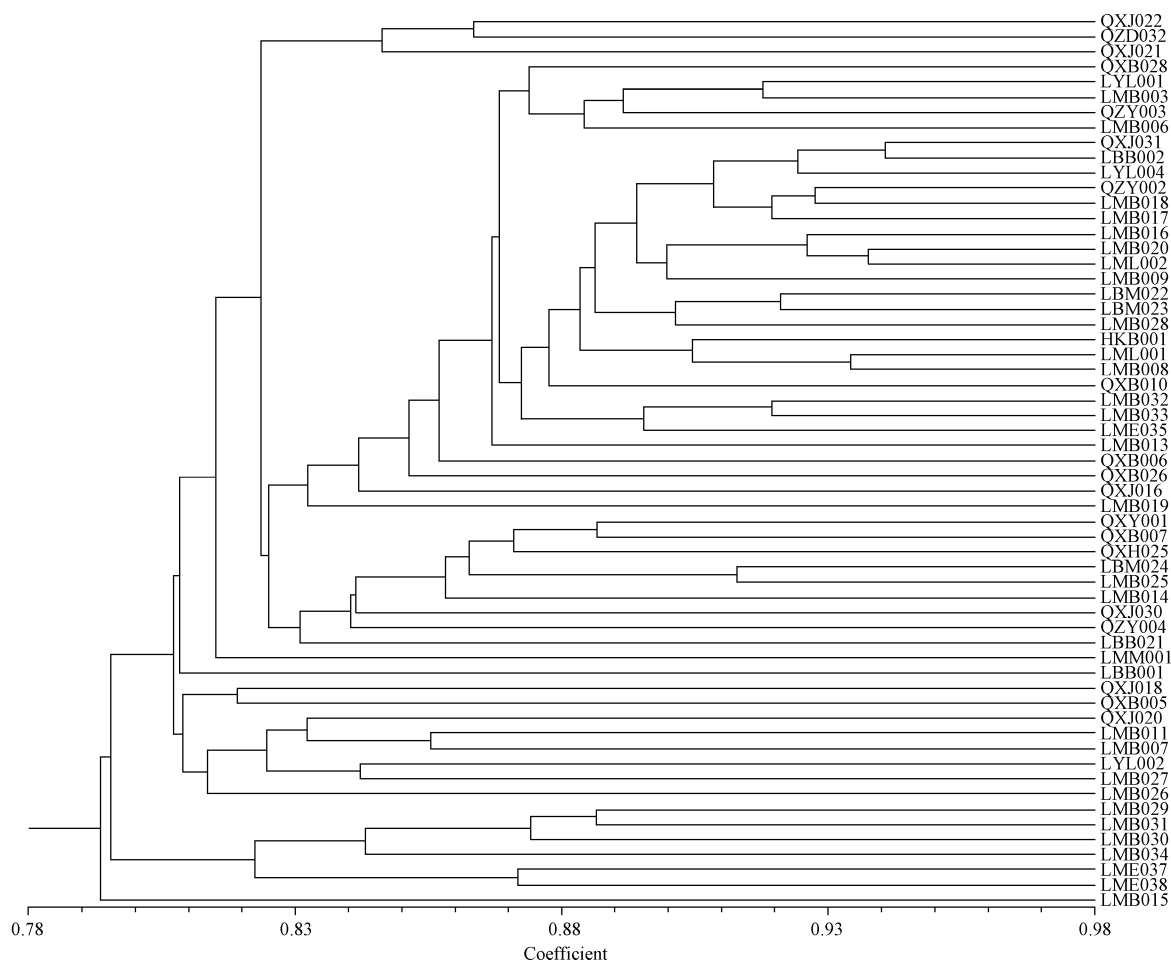


图1 基于遗传相似系数构建的UPGMA聚类图

Fig.1 UPGMA clustering map based on coefficients of genetic similarity

者之间的杂交子代中也表现出明显的分离。研究表明,毛果杨和美洲黑杨侧芽的萌发对生长素极不敏感,造成这种分枝特性的差异主要是由遗传物质的不同而引起的^[20-21]。万雪琴等^[22]对5个杂交组合的30个杂交杨无性系1a生扦插苗分枝习性的研究也表明,不同基因型杨树的分枝差异明显。由此可知,基因型的不同也是引起树体分枝特性差异的主要原因之一。

植物芽在休眠期并非绝对地停止一切生命活动,其生理生化变化都与基因的表达调控一一对应,而目前休眠期植物芽的研究主要集中于生理生化方面的指标,例如,在落叶果树整个休眠期关于芽的研究表明,碳水化合物有着显著的变化,尤其是糖类,休眠前期较低,休眠后期较高,而淀粉含量刚好和糖类相反^[23-24]。陈登文等^[25]在对杏枝芽的生理生化研究表明,枝芽总含水量、自由水含量、呼吸强度随着低温累计量的增加而逐渐下降,游离的氨基酸与脯氨酸含量与低温有极显著的正相关关系。

目前对于调控分枝的分子生物学研究主要集中在突变体上,例如西红柿中LS基因,其隐性突变阻止了腋分生组织的形成^[26]。拟南芥中LAS基因的突变也将导

致侧枝数目的减少。但是植物分枝发育的遗传控制是复杂的,人们对基因的调控途径,基因之间的相互影响等还知之甚少。对分枝机理的不够了解,最主要的一个原因就是缺少足够的突变体及相关基因。

cDNA-AFLP差异显示法是鉴定未知基因的有效手段之一^[27],陈荣平等^[28]以烤烟接种烟草花叶病毒(TMV)的叶片为试验材料,通过cDNA-AFLP差异显示方法最终获得与核酸代谢、蛋白质合成与修饰、能量代谢、胁迫响应、细胞内运输、糖代谢等相关的差异表达片段。运用cDNA-AFLP技术对相同环境下生长的植物个体上同一部位的器官进行研究,能排除时空效应和环境效应的影响,其检测结果所表示的差异性能真正代表不同无性系间的遗传基础。该试验中,cDNA-AFLP筛出的7对引物组合共扩增出总条带608条,其中差异性条带为353条,滇杨树种较高的遗传多样性水平,也可能与抗逆性(如低温、干旱等)、分枝性状等相关联。因此,该研究结果既证明了应用cDNA-AFLP技术进行滇杨分枝性状相关基因的定位、分离及鉴定的可行性,也为后期分离差异表达基因并对其功能鉴定等提供了前期研究基础。

参考文献

- [1] 何承忠,张志毅,陈宝昆,等. 滇杨遗传改良策略初论[J]. 西部林业科学, 2004, 33(1): 44-48.
- [2] Chandra J P, Ram A. Trial on exotic poplars in Himachal Pradesh[J]. Van Vigyan, 1973, 11(1/2): 1-6.
- [3] Burfal B S, Meena K L, Sharama R C, et al. Status of poplar in Uttar Pradesh[J]. India Forester, 2001, 127(2): 137-143.
- [4] 李忠洪, 张洪清. 杨树山地造林品种比较试验[J]. 贵州林业科技, 1995, 23(3): 17-19.
- [5] 殷书柏, 吕宪国. 湿地功能快速评价中的若干理论问题[J]. 湿地科学, 2006, 4(1): 1-6.
- [6] 崔丽娟. 湿地价值评价研究[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 欧阳云志, 王如松, 赵景柱. 生态系统服务功能及其生态经济价值评价[J]. 应用生态学报, 1999, 10(5): 635-640.
- [8] 俞穆青, 田卫, 孙道玮, 等. 湿地资源开发环境影响评价探讨[J]. 东北师范大学学报(自然科学版), 2001, 32(1): 84-89.
- [9] 王琪, 吴磊, 伦小文, 等. 吉林省自然保护区的管理有效性研究[J]. 吉林化工学院学报, 2005, 22(1): 24-26.
- [10] 温志宏, 黄敏仁. 美洲黑杨冠层光截获特性的遗传学研究[J]. 南京林业大学学报, 1992, 16(3): 11-17.
- [11] Shimizu S S, Mori H. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds[J]. Plant Physiol, 2001, 127(4): 1405-1413.
- [12] Becham C, Heven R S, Bruijn Z 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]. Plant Journal, 1996, 9(6): 745-753.
- [13] Becham C W B, Ronald J F J, Oomen, et al. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16(2): 157.
- [14] 韩斌, 彭建营. cDNA-AFLP 技术及其在植物基因表达研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2006, 26(8): 1753-1758.
- [15] Bensch S, Åkesson M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? [J]. Molecular Ecology, 2005, 14: 2899-2914.
- [16] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian J Bot, 1997, 129: 157.
- [17] Cannell M G R, Last F T. 熊文愈. 树木生理与遗传改良[M]. 吴贯明, 译. 北京: 中国林业出版社, 1980.
- [18] Isebrands J G. Genetic variation in phytosynthetic traits among *Populus* clones in relation to yield[J]. Plant Physiological Biochemistry, 1988, 26: 427-437.
- [19] David A K. Tree allometry, leaf size and adult tree size in old-growth forests of western Oregon[J]. Tree Physiology, 1991, 9: 369-381.
- [20] Cline M G. Control mechanisms of sylleptic branching in hybrid *Populus* [J]. Plant Molecular Biology and Biotechnology PMBB Research Symposium, 2000.
- [21] Cline M G, Dong-il K. A preliminary investigation of the role of Auxin and Cytokinin in sylleptic branching of three hybrid poplar clones exhibiting contrasting degrees of sylleptic branching[J]. Annals of Botany, 2002, 90: 417-421.
- [22] 万雪琴, 张帆, 胡庭兴. 30 个杂交杨无性系扦插苗分枝习性研究[J]. 四川林业科技, 2008, 29(1): 43-46.
- [23] 夏宁. 桃设施栽培几个技术及其原理的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 1997.
- [24] 高升东. 桃自然休眠过程中外源激素对花芽碳水化合物化合物的调控效应[J]. 园艺学报, 2002(2): 104-107.
- [25] 陈登文, 王飞, 高爱琴, 等. 休眠期间低温积累对杏枝芽生理生化的影响[J]. 西北植物学报, 2000, 20(2): 212-217.
- [26] Groot S P C, Keizer L C P, de Ruiter W, et al. Seed and fruit set of the lateral suppressor mutant of tomato[J]. Scientia Horticulturae, 1994, 59: 157-162.
- [27] Dellagi A, Brich P R J, Heilbronn J. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora* [J]. Microbiology, 2000, 146(1): 165-171.
- [28] 陈荣平, 刘磊, 万秀清, 等. TMV 侵染烟草基因差异表达的 cDNA-AFLP 分析[J]. 作物学报, 2012, 38(1): 62-70.

(该文作者还有刘东玉, 单位同第一作者。)

Diversity Analysis of Gene Expression at Dormancy Stage of Lateral Buds in *Populus yunnanensis* by cDNA-AFLP Markers

LI Li¹, JIANG Tao^{1,2}, ZHOU An-pei¹, ZONG Dan¹, ZHAO Yue-ming¹, HE Cheng-zhong^{1,2}, LIU Dong-yu¹

(1. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: To reveal the molecular mechanism of branching characteristic difference in *Populus yunnanensis*, taking 59 three-year-old seedlings of plus trees clones of *P. yunnanensis* collected from Sichuan Province and Yunnan Province as the tested materials, cDNA-AFLP molecular technique was conducted to examine the diversity of gene expression at dormancy stage of lateral buds of the seedlings. The results showed that a total of 608 bands including 353 different bands were amplified using selected seven primer combinations. Nei's gene diversity index and Shannon's information index were 0.1061 and 0.1856 respectively. Gene differentiation coefficient was 0.0167, and gene flow was 29.42, which indicated a lower genetic differentiation existed among populations of *P. yunnanensis*. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that variance was 0.99% among populations and 99.01% within population. Moreover, the variance only was highly and significantly different among population. The results suggested that gene expression was complicated at dormancy stage of lateral buds. Furthermore, the clustering results showed that most of the clones held the same branching characteristics fell into subcluster unit or single cluster unit. The results of this study laid the foundation of the previous research for further screening and cloning of genes related to branching in *P. yunnanensis*.

Key words: lateral buds of *Populus yunnanensis*; dormancy stage; cDNA-AFLP; genetic differences