

滨梅幼苗耐盐相关基因差异表达的 cDNA-AFLP 初步分析

张 春 红, 胡 淑 英, 吴 文 龙, 李 维 林

(江苏省中国科学院 植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘 要:以生根的“滨梅 5 号”幼苗为试材,采用 cDNA-AFLP 差异显示方法研究 200 mmol/L NaCl 处理对基因差异表达的影响,并采用半定量 RT-PCR 方法验证候选基因的盐胁迫和组织表达模式。结果表明:256 对选择性引物组合可扩增出 4 263 条可分辨的条带,且 47 条具有明显差异;其中 24 条经测序后分析表明,14 条与已知片段具有较高同源性,主要涉及代谢、转录因子、胁迫相关蛋白等;获取了 2 条耐逆相关差异基因片段,分别与蝴蝶草天冬酰胺合成酶同源性达 92%、与野草莓硫转运蛋白基因同源性达 81%;与硫转运蛋白基因同源的差异基因在盐处理 3 h 时表达量最高,随处理时间增加而表达量逐渐下降,在各组织中以根中的表达量最高,推测其主要在根中行使功能。

关键词:滨梅;cDNA-AFLP;耐盐;基因表达分析

中图分类号:S 684 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)20-0081-05

滨梅(*Prunus maritima* Marshall)属蔷薇科李属的一种海滩沙生灌木,原产于美国的纽芬兰州到北卡罗莱那州的北大西洋海岸^[1-2],被认为是集园林观赏、生态修复及果实食用等多用途于一体的一种前景广阔的新经济植物^[3]。关于滨梅抗旱性、耐沙生和抗盐性等的研究证明,滨梅可在 pH 7.92^[4]和 0.9% NaCl^[5]极端胁迫条件下正常生长。国内自 2001 年始引种滨梅以来,近年来在滨梅的繁殖及抗性生理等方面开展了一系列研究^[4]。关于其耐盐基础研究,不仅已发现盆栽滨梅在 6 g/L NaCl 处理下生长良好,生长量及主要抗性指标均随 NaCl 处理浓度升高呈先升后降的趋势^[5],也可以短期耐受 8.8 g/L NaCl 胁迫^[6]。

cDNA-AFLP 是在转录水平研究基因差异表达的有效技术之一,具有灵敏度高、重复性好的特点^[7]。高丰度表达的基因转录本经 cDNA-AFLP 扩增后条带的强弱能定性地直接反映出基因表达量的差异,得到的转录衍生片段(trivially distributed file system, TDFs)可最大

限度地提供基因编码区的信息^[8]。利用 cDNA-AFLP 技术已获得了诸多植物耐盐相关基因,主要包括与逆境相关的功能蛋白基因、渗透保护物质合成基因、信号传递的调控因子、防御相关基因、代谢相关基因等^[9]。

课题组在前期研究中发现滨梅不同种源组培幼苗耐受盐胁迫程度不同,对不同种源进行耐盐性评价后发现其最高可耐受 200 mmol/L 的 NaCl 处理且筛选出耐盐性较好的滨梅种质“滨梅 5 号”。在此基础上,该研究拟利用 cDNA-AFLP 技术对滨梅组培幼苗在高盐胁迫下的基因差异表达进行分析,以期挖掘滨梅耐盐相关基因,为探讨滨梅的耐盐机理提供一定基础依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以耐盐种质“滨梅 5 号”种源为研究对象,将生根的组培苗在培养瓶内添加 200 mmol/L NaCl 进行盐胁迫处理,处理 0、3、12、24、48 h 后分别采集叶片,液氮速冻后保存备用。

RNA 的提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒购自于北京 Bioteke 生物技术有限公司, *Taq* 酶为 Bioteke 公司产 Power *Pfu* DNA 聚合酶,双链 cDNA 合成试剂盒 TaKaRa M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit、*T₄* DNA ligase 酶均购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 购自 BioLabs 公司,接头引物和扩增引物及测序由上海英骏生物技术公司完成。

第一作者简介:张春红(1979-),女,博士,副研究员,现主要从事果树遗传育种等研究工作。E-mail:chzhang0714@163.com.

责任作者:李维林(1966-),男,博士,研究员,现主要从事悬钩子植物资源利用等研究工作。E-mail:lwlcnbng@mail.cnbg.net.

基金项目:江苏省科技支撑计划资助项目(BE2011324);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)。

收稿日期:2015-05-21

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及双链 cDNA 的合成 参照 Biotek 公司通用植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取各处理的滨梅叶片总 RNA,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测质量,参照 TaKaRa 公司双链 cDNA 合成试剂盒说明书,将 RNA 合成双链 cDNA 并进行纯化。

1.2.2 酶切与连接 用 *EcoR* I 和 *Mse* I 限制性内切酶对 cDNA 进行酶切,40 μ L 酶切体系包括 dscDNA 10 μ L, 10 \times NEB buffer 4 μ L, *Mse* I (10 U/ μ L) 1 μ L, *EcoR* I (10 U/ μ L) 1 μ L, BSA 0.4 μ L, ddH₂O 23.6 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h, 75 $^{\circ}$ C 灭活 15 min。用 60 μ L 体系进行连接,向 40 μ L 酶切产物中加 *Mse* I 接头 (50 pmol/L) 2 μ L, *EcoR* I 接头 (50 pmol/L) 2 μ L, 10 \times T4 DNA ligase bufer 6 μ L, T4 DNA ligase (350 U/ μ L) 3 μ L, ATP 1 μ L, ddH₂O 6 μ L, 2 000 r/min 离心 10 s 后置 16 $^{\circ}$ C 恒温水浴 12 h。 *EcoR* I 接头引物如下, Adapter-E-5': 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'; Adapter-E-3': 5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'; *Mse* I 接头引物如下, Adapter-M-5': 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'; Adapter-M-3': 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'。

1.2.3 预扩增 将酶切连接产物原液用于预扩增。预扩增引物序列为 E0: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'; M0: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'。50 μ L 预扩增体系包含连接产物 5 μ L, E0 (10 pmol/L) 1.5 μ L, M0 (10 pmol/L) 1.5 μ L, *Taq* 酶 (2.5 U/ μ L) 1 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L, Mg²⁺ (2.5 mmol/L) 3 μ L, ddH₂O 29 μ L。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 10 min。

1.2.4 选择性扩增及聚丙烯酰胺胶电泳检测 将预扩增产物稀释 2 倍,选择性扩增体系参照预扩增体系,20 μ L 反应体系包括预扩增稀释产物 2 μ L, 引物组合 1.2 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, Mg²⁺ (2.5 mmol/L) 1.2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 11.4 μ L。选择性扩增程序为 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 65 $^{\circ}$ C, 30 s (−0.7 $^{\circ}$ C E/cyc); 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 共 14 个循环; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 共 23 个循环, 最后为 72 $^{\circ}$ C, 1 min。 *EcoR* I 选择性扩增引物为 5'-GAC TGC GTA CCA ATT NNN-3' (NNN: CCA, CCC, CCG, CCT, CGA, CGC, CGG, CGT, CAA, CAC, CAG, CAT, CTA, CTC, CTG, CTT, 对应引物编号依次为 E1-E16)。 *Mse* I 选择性扩增引物为 5'-GAT GAG TCC TGA GTA NNN-3' (NNN: AAA, AAC, AAG, AAT, ATA, ATC, ATG, ATT, ACA, ACC, ACG, ACT, AGA, AGC, AGG, AGT, 对应引物编号依次为 M1-M16)。选择性扩增产物用 6.0% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,在 0.5 \times TBE 中 80 W 电泳 2 h 后银染法检测,经银染显色后统计结果,

方法参照 CHALHOUB 等^[10]。

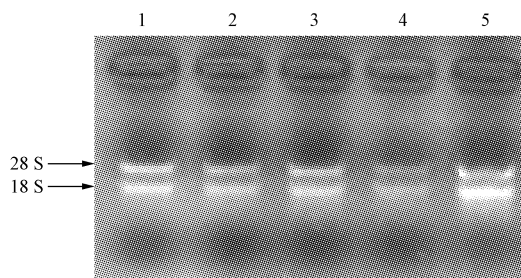
1.2.5 差异片段转化与同源性分析 将初筛差异片段移入 200 μ L 离心管中,加入 20 μ L ddH₂O,浸泡 24 h 以上,取上清液为模板,按选择性扩增体系和程序进行 2 次扩增,扩增产物用 1.0% 琼脂糖进行检测和 DNA 片段回收。将回收成功的片段转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,阳性重组子样品送交测序。将所得序列利用 GenBank 中 BLAST 软件进行序列同源性分析。

1.2.6 差异候选片段的半定量 RT-PCR 分析 为鉴定 2 个耐逆候选基因在不同组织及盐处理过程中的表达模式,设计其特异性引物,其中天冬酰胺合成酶基因引物组合 E16M4F 为 5'-ATT AGG AAA TTA GGA-3', E16M4R 为 5'-TTG CCG TTC TTG GTT-3'; 硫蛋白转运基因引物组合 E7M12F 为 5'-CAC TCA TGC AGA CAA CAA AG-3', E7M12R 为 5'-CAA TTG CGG TTA TGT TCA CA-3'。以先前获得的 *Pmact1* 为内标基因^[11],对筛选的 2 个候选基因片段进行半定量 RT-PCR 验证。

2 结果与分析

2.1 耐盐差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析

“滨梅 5 号”5 个处理样品的叶片总 RNA 纯度高、完整性好,可用于后续的反转录反应(图 1)。参照 TaKaRa 公司双链 cDNA 合成试剂盒说明将 RNA 合成双链 cDNA,并进行纯化。合成的双链 cDNA 呈均匀弥散分布,对其采用双酶切组合 *Mse* I 和 *EcoR* I 酶切后进行连接,将酶切连接产物进行预扩增和选择性扩增,扩增产物片段主要集中在 100~500 bp。



注:1~5 为滨梅幼苗盐处理 0、3、12、24、48 h 的叶片。

Note: 1~5 represent the leaf samples of beach plum seedlings after salt treatment of 0 h, 3 h, 12 h, 24 h and 48 h.

图 1 5 个叶片处理样品的总 RNA 电泳图谱

Fig. 1 Total RNA electrophoresis display of five leaf tissues

该研究共选择了 16 个 E-NNN 与 16 个 M-NNN 组合成 256 对引物对 200 mmol/L NaCl 处理后不同时间取样的滨梅叶片进行研究。结果发现,256 对引物均可以扩增出清晰的条带,共得到 4 263 条可分辨的条带。表 1 详细说明每对引物组合的扩增情况,共初步筛选出了 47 个典型差异片段。

表 1 256 对引物组合出现的 AFLP 条带数及其多态性

Table 1 Numbers and polymorphism of AFLP bands by using 256 primer combinations

引物 Primer	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16
E1	19	20	15	14	16	19	17	16	18	17	19	16	19	16	17	20
E2	14	15	16	16	17	17	16	15	13	14	17	16	14	17	15	17
E3	12	11	15	16	17	18	17	15	17	18	18	16	19	16	16	18
E4	19	20	17	15	17	19	13	17	13	15	18	18	17	15	17	18
E5	15	19	21	16	19	19	16	15	14	15	17	20	19	16	17	17
E6	12	14	15	14	16	17	14	12	16	17	14	13	16	17	18	20
E7	13	17	18	19	17	16	14	15	14	16	17	15	19	20	16	19
E8	15	17	20	18	20	16	18	20	16	18	20	17	17	18	16	19
E9	14	17	16	15	16	17	18	20	12	15	17	14	16	19	18	20
E10	15	17	14	13	16	13	13	12	16	15	20	17	16	16	18	17
E11	21	17	23	19	16	16	17	19	22	17	17	18	19	17	17	15
E12	17	18	18	16	19	19	14	16	17	15	13	21	16	14	17	18
E13	17	21	20	21	17	21	18	19	17	14	18	19	20	18	17	14
E14	15	15	13	14	15	12	17	14	13	21	16	17	18	19	11	17
E15	16	15	18	15	16	16	16	15	18	19	18	18	18	17	18	16
E16	15	14	18	20	17	15	18	14	16	14	17	15	20	18	13	18

2.2 差异片段的生物信息学分析

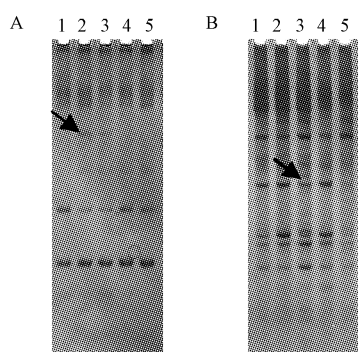
将 47 条初筛的差异条带进行 2 次扩增后回收,共得到 24 条条带,克隆后获得成功测序。将成功测序的结果进行 BLAST 比对,结果见表 2。生物信息学分析表明,差异片段的功能主要涉及蛋白合成、蛋白转运、转录调控等,还有一些未知功能蛋白。其中获取了 2 个植物

耐逆相关差异基因片段,引物组合分别为 E7M12 和 E16M4,大小分别为 222 bp(图 2A)和 89 bp(图 2B),前者与在 GenBank 公布的野草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)硫转运蛋白基因同源性的为 81%,后者与蝴蝶草(*Securigera parviflora*)天冬酰胺合成酶基因同源性的为 92%。

表 2 盐胁迫下滨梅基因差异片段的测序比对结果

Table 2 Sequencing and comparing results of differentially expressed gene fragments from beach plum under salt-tolerance

引物 Primer	片段大小 Length/bp	功能 Function	一致性 Identity/ %	登录号 Accession No.	E 值 E value
E2M11	307	Po/OH-LL26/2002/US polyprotein gene (Sapovirus)	90	AY974195	1e-110
E10M5	82	BRA21-RS/04 RNA dependent RNA polymerase gene (<i>Porcine enteric</i> sapovirus)	89	EF183479	1e-20
E10M16	104	Pa_22522 transcribed RNA sequence (<i>Prunus avium</i>)	100	GAJZ01006690	5e-45
E11M1	93	Flavin-containing monooxygenase YUCCA8-like (LOC101308331) (<i>Fragaria vesca</i>)	93	NC_020492	2e-15
E11M3	227	Tubulin alpha chain (<i>Schistosoma mansoni</i>)	97	XP_002574232	0.078
E12M12	241	Swine/C28/CHN/2009 RNA-dependent RNA polymerase gene (Sapovirus)	96	HQ292717	4e-30
E14M10	304	BRA37-MG/05 RNA dependent RNA polymerase gene (<i>Porcine enteric</i> sapovirus)	83	EF183481	1e-84
E16M4	89	Asparagine synthetase (AS2) gene (<i>Securigera parviflora</i>)	92	AY208747	7e-16
E16M16	55	COL domain class transcription factor (COL4) (<i>Malus x domestica</i>)	88	HMI22534	6e-07
E1M1	69	k31,9035062 transcribed RNA (<i>Anolis carolinensis</i>)	94	GAGB010392537	0.074
E1M5-1	242	Tubulin alpha chain (<i>Schistosoma mansoni</i>)	97	XP_002574232	0.003
E16M6	58	Pa_03973 transcribed RNA (<i>Prunus avium</i>)	98	GAJZ01001984	3e-18
E1M9	297	Swine/C28/CHN/2009 RNA-dependent RNA polymerase (Sapovirus)	95	HQ292717	1e-128
E9M16	64	k41,1485681 transcribed RNA (<i>Anolis carolinensis</i>)	86	GAGC011032255	9.8
E3M13	291	sw/PC47b/NL RNA dependent RNA polymerase (Sapovirus)	92	JN644276	2e-114
E8M12	108	CPSCT029 microsatellite (<i>Prunus salicina</i>)	73	AY426214	2e-05
E5M15	60	Pa_02723 transcribed RNA (<i>Prunus avium</i>)	98	GAJZ01001401	2e-20
E5M16	126	Polygalacturonase gene (<i>Prunus persica</i>)	90	FJ940722	2e-07
E7M12	222	Sulfate transporter 3.1-like (LOC101305326) (<i>Fragaria vesca</i>)	81	XM_004290579	8e-82
E8M3	69	RIB40 DNA (<i>Aspergillus oryzae</i>)	86	AP007150	0.90
E8M8	74	Uncharacterized LOC101219560 (<i>Cucumis sativus</i>)	96	NC_026657	3.6
E3M4	52	EST from mild drought-stressed leaves (Populus)	84	CU232315	6e-06
E9M8	73	Pa_10055 transcribed RNA sequence (<i>Prunus avium</i>)	88	GAJZ01004302	1e-19
E10M2	74	Predicted protein (<i>Populus trichocarpa</i>)	83	XP_006373300	7e-09



注:箭头所示为多态性片段。

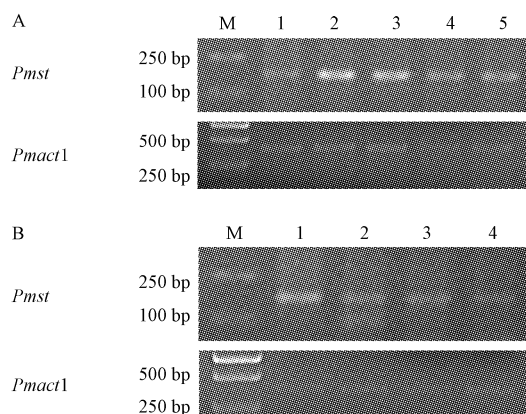
Note: Arrows showed the polymorphic bands.

图2 选择性扩增引物组合 E7M12(A)和 E16M4(B)在 5 个处理样品中的扩增结果

Fig. 2 Electrophoresis diagram of amplified products by selective primer combination E7M12 (A) and E16M4 (B)

2.3 差异候选基因的表达分析

利用半定量 RT-PCR 验证 2 个候选基因片段的表达,结果仅成功获得了与野草莓硫蛋白转运基因同源的差异基因片段 *Pmst*。与盐处理前相比,该基因在处理 3 h 时表达量相对较高,之后随着处理时间增加而表达量逐渐下降(图 3A)。在根、茎尖、叶片和花序等不同组织中,以在根中的表达量相对较高(图 3B),在其它组织中表达量基本相似,推测其可能是响应盐胁迫的应答基因,且主要在根中行使功能。



注:M,DL 2 000;A 中 1~5 分别为 200 mmol/L NaCl 处理 0、3、12、24、48 h;B 中 1~4 为滨梅一年生幼苗的根、茎尖、幼叶和花序。

Note:M,DL 2 000 Marker. Lanes 1~5 in Fig. 3A show expression of *Pmst* in leaf tissues of different treatment time of 0 h, 3 h, 12 h, 24 h, 48 h under 200 mmol/L NaCl. Lanes 1~4 in Fig. 3B show expression of *Pmst* in roots, stem tips, leaves and inflorescences of beach plum annual seedling.

图3 硫蛋白转运基因 *Pmst* 在滨梅 5 个处理样品(A)和不同组织中(B)的表达

Fig. 3 Expression patterns of *Pmst* encoding sulfate transporter in five leaf tissues (A) and different organs (B)

3 结论与讨论

植物对盐胁迫的适应是通过基因互作和协调形成一定的基因表达和调控系统来完成的^[12-13]。在盐胁迫下,植物体内与逆境相关的功能蛋白基因会表达上调,提高植物对盐胁迫的耐性^[14]。目前研究发现的植物耐盐应答机制主要类型包括几类,如 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白等蛋白将细胞内的盐分区隔化^[13];无机、有机、糖类及其衍生物在细胞内进行渗透调节^[14];清除体内活性氧,降低膜脂氧化程度,减轻盐胁迫的伤害^[15];受伤蛋白的降解、加强自身代谢能力等^[16]。在滨梅上,对耐盐基础已开展了一定的研究,但主要集中于生理指标的测定上,目前已发现在盐处理下,滨梅叶片 Na^+ 浓度和丙二醛(MDA)含量均随盐浓度提高而增加,且叶片 Na^+ 增长速率显著低于土壤中的 Na^+ 增长速率,表明低浓度盐胁迫下根系可以有效聚集 Na^+ ^[7]。也有研究认为,随着盐浓度增加,滨梅叶片的丙二醛含量、相对电导率、脯氨酸及可溶性蛋白含量均有升高趋势,而抗氧化酶、净光合速率、水分利用效率等则呈先上升后下降的趋势,胞间 CO_2 浓度规律相反^[5],暗示滨梅耐盐基础的揭示较为复杂。

cDNA-AFLP 技术是 BACHEM 等^[7]提出的基于 AFLP 的一种使差异表达基因可视化的新技术。该研究用 200 mmol/L NaCl 处理滨梅生根的组培幼苗,对 5 个不同处理时间叶片样品进行差异显示分析,采用双酶切 *Mse* I 和 *Eco*R I 组合酶切后进行扩增,得到了清晰可辨的条带,建立了滨梅叶片 cDNA-AFLP 分析技术体系。采用了 256 对引物组合,共扩增出了 4 263 条可分辨的条带,得到差异条带 47 条,选取 24 条进行克隆、测序和序列比对。生物信息学分析表明,14 条已知基因具有同源性的差异片段主要与代谢、转录因子、与胁迫相关蛋白等相关,其它的差异基因待于研究。获取了 2 个植物耐逆相关差异基因片段,大小分别为 89 bp 和 222 bp,分别与蝴蝶草天冬酰胺合成酶基因同源率为 92%、与野草莓硫蛋白转运基因同源率为 81%。已有研究表明,天冬酰胺合成酶是植物氮代谢中起重要作用的酶,转小麦 *TriA5* 基因的拟南芥耐盐性增加,与积累渗透调节物质天冬酰胺有关^[17]。硫酸盐转运蛋白(sulfate transporter, ST)是植物体硫代谢途径中最初的 2 个基础调控位点之一,是作物中清除过氧化氢、有机毒物、降低重金属污染和提高作物抗性的重要酶类之一^[18]。研究表明,硫转运蛋白主要定位于根部,对外界养分变化非常敏感^[19],而该文中获得的硫转运蛋白差异片段基因正是在耐盐胁迫下而来,且在根中表达量较高,表明其对盐胁迫具有一定响应,而且根是响应盐胁迫的敏感部位。目前也已发现多种蛋白与植物耐盐性密切相关,如 Na^+/H^+ 反向转运蛋白、水通道蛋白、渗透蛋白、晚期胚胎发生丰富

蛋白以及信号转导过程中一些重要的蛋白激酶^[9]。该文中揭示的硫转运蛋白差异片段基因可以响应盐胁迫的变化,表明其可能是植物体内离子变化的一个反应,也可能表达与缓解盐胁迫伤害密切相关,关于该特异蛋白的具体功能还需进一步研究。

以高盐胁迫下的耐盐果树滨梅为材料,利用 cDNA-AFLP 技术分离得到了与盐胁迫有关的 47 条差异片段,24 个片段被克隆测序,比对结果表明 14 个与已知基因具有同源性,为耐盐机理揭示提供了基础,同时暗示了对根系研究可以对深入揭示滨梅耐盐性机理具有一定重要性。

参考文献

- [1] RIEGER M. Salt stress resistance of peach and four North American *Prunus* species[J]. ISHS Acta Horticulturae, 2001, 557: 181-192.
- [2] UVA R H. Growth and yield of beach plum (*Prunus maritima* Marshall) in horticultural, land restoration, and ecological systems[D]. Ithaca: Cornell University, 2003.
- [3] 王小敏,张春红,吴文龙,等. 开发滨梅作为滩涂和荒地适种的多用途新经济植物[J]. 林业调查规划, 2012, 37(2): 73-75, 80.
- [4] 闫道良,王光,方遼,等. 耐盐果树滨梅的引种及开发利用[J]. 林业科技开发, 2006, 20(5): 67-69.
- [5] 王利民,陈金林,梁珍海,等. 盆栽滨梅幼苗对 NaCl 胁迫的响应[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2010, 34(3): 89-92.
- [6] 黄涛,朱泓,王小敏,等. 盆栽滨梅扦插苗对 NaCl 胁迫的响应[J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(9): 102-106.
- [7] BACHEM C W B, van DER 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]. Plant Journal, 1996, 9(5): 745-753.
- [8] BREYNE P, DREESEN R, CANNOOT B, et al. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies[J]. Mol Genet Genomics, 2003, 269(3): 173-179.
- [9] 胡淑英,张春红,王小敏,等. cDNA-AFLP 技术在植物耐盐基因鉴定上的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(2): 254-259.
- [10] CHALHOUB B A, THIBAUT S, LAUCOU V, et al. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels[J]. Biotechniques, 1997, 22(2): 216-218, 220.
- [11] 张春红,胡淑英,王小敏,等. 滨梅 2 个肌动蛋白 cDNA 片段的克隆与表达[J]. 生物技术, 2012, 22(6): 27-31.
- [12] WANG L, ZHOU B, WU L L, et al. Differentially expressed genes in *Populus simonii* × *Populus nigra* in response to NaCl stress using cDNA-AFLP[J]. Plant Science, 2011, 180: 796-801.
- [13] 马雅琴. 小麦 (*Triticum aestivum* L.) 种质资源的耐盐性鉴定及其相关基因的挖掘[D]. 北京: 中国农业科学研究院, 2004: 1-100.
- [14] HUANG H, NIU Y J, CAO H W, et al. cDNA-AFLP analysis of salt-inducible genes expression in *Chrysanthemum lavandulifolium* under salt treatment[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169: 410-420.
- [15] 王雪青. 野大麦盐诱导基因的筛选与克隆[D]. 北京: 首都师范大学, 2006: 1-70.
- [16] 贾晋,蔡祿,张鲁刚,等. 盐爪爪耐盐相关基因的 cDNA-AFLP 分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(2): 280-285.
- [17] 张晓磊,李培培,任丽彤,等. 小黑麦天冬酰胺合成酶基因表达载体构建及功能验证[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(8): 1392-1399.
- [18] 邱睿. 干旱条件下玉米硫代谢相关基因的克隆及原核表达[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009: 14-15.
- [19] 陈昕,王保莉,曲东. 植物硫转运蛋白研究进展[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1966-1971.

Preliminary Expression Analysis of Seedling Under Salt-tolerance in Beach Plum Using cDNA-AFLP

ZHANG Chunhong, HU Shuying, WU Wenlong, LI Weilin

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

Abstract: Using rooted 'Beach plum No. 5' seedlings as experimental material, differential gene expression analysis was performed under salt treatment of 200 mmol/L NaCl by using cDNA-AFLP (Amplified fragment length polymorphism). Expression patterns under salt-tolerance and in different tissues of the candidate genes were then revealed by semi-quantitative RT-PCR validation. The results showed that a total of 4 263 distinguishable bands were obtained by amplification through 256 pairs of selective primer combinations, and 47 bands were obtained with significant differences. After cloning and sequencing of 24 bands, sequence analysis of them showed that main functions of the 14 differential sequence segments comprised of metabolism, transcription factors, stress-related proteins, etc. Two fragments related to plant resistance were obtained and had the 92% homology with butterfly grass asparagine synthetase, and 81% homology with wild strawberry sulfate transporter gene respectively. The differential band homologous to the wild strawberry sulfate transporter gene was obtained and the expression level reached maximum under 3 hours treatment followed by gradual decrease with the increased processing time. Tissue expression analysis indicated that it had the highest level in roots indicating it mainly played a vital role in roots.

Keywords: beach plum; cDNA-AFLP; salt-tolerance; gene expression analysis