

# SAMDC 基因对一串红侧枝发育的影响

智利婷<sup>1</sup>, 洪培培<sup>2</sup>, 陈洪伟<sup>2</sup>, 马洪艳<sup>1</sup>, 张海明<sup>1</sup>

(1. 北京农学院 科技产业集团, 北京 102206; 2. 北京农学院 城乡发展学院, 北京 102206)

**摘要:**以一串红 35 及 35-1 为试验材料, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 研究了 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC)基因在 35 及 35-1 不同发育时期、不同部位的表达情况。结果表明:幼苗期腋芽未形成和腋芽形成后 35 中 SAMDC 基因的相对表达量均低于 35-1;营养生长期 35 的茎节、根尖及侧枝顶芽中 SAMDC 的表达量均高于 35-1, 且差异显著。试验表明, SAMDC 在一串红幼苗顶芽中相对表达量高, 可促进植株细胞分裂分化形成侧芽;营养生长期 SAMDC 相对表达量低, 可促进分支和枝条伸长生长。

**关键词:**一串红; SAMDC; 侧枝; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号:**S 681.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0090-05

植物激素指在植物体内某些部位合成, 可被运送至其它部位发生特殊生理作用的微量有机物质。目前, 已经确认的植物激素有九大类, 即生长素(IAA)、赤霉素(GA)、细胞分裂素、脱落酸(ABA)、乙烯、油菜素甾醇类(BRs)、水杨酸(SA)、茉莉酸类(JAs)和多胺(PAs)。多胺是生物代谢过程中产生的具有生物活性的低分子量含氮碱, 主要包括腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm)。多胺作为生长调节物质, 广泛参与植物的生理生化过程, 能与 DNA、RNA 等大分子阴离子结合, 对植物生长发育起调节作用, 能够促进细胞分裂、促进植物生长, 也能促使植物不定芽及根的形成和发生<sup>[1]</sup>, 对植物胚胎发育、性型分化和形态建成起重要作用。S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC)是以 SAM 为底物催化脱羧形成脱羧 SAM, 进而合成 Spd 和 Spm, 是 Spd 和 Spm 合成的限速酶。S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶在植物形态发生、胚胎发生和早期果实发育过程中具有很强的调节作用<sup>[2]</sup>。

一串红(*Salvia splendens*)属唇形科鼠尾草属植物, 花序修长, 花红艳丽, 适应性强, 是北方城市五一、十一期间城市绿化的常用花材。课题组通过对一串红种质资源多年的收集、整理, 从自编号为 35 的株系中选育

出分支级数多, 花序数多, 株型紧凑、自然发育成球形的新品种, 经北京市林木品种审定委员会审定定为‘彩铃红’, 课题组将其编号为 35-1。

该研究采用实时荧光定量 PCR 技术, 以 35 和 35-1 为试验材料, 研究二者不同发育时期、不同部位 SAMDC 基因的相对表达量情况, 以期研究 SAMDC 基因对 35 和 35-1 侧枝发育的影响, 为一串红形态建成研究奠定一定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为培育在北京农学院实践教学基地日光温室中的 35 及 35-1 实生苗。

供试仪器: 高压灭菌锅, 冷冻离心机, iCycler iQ5 荧光定量 PCR 仪, 恒温培养摇床, 核酸定量仪, 紫外凝胶成像系统。

供试试剂: 总 RNA 分离纯化系统试剂盒(Promega)、cDNA 第一链合成试剂盒(Promega); 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根公司); DNaseI(RNase-free)、pMD18-T 克隆载体、SYBR Premix Ex Taq™II(Perfect Real Time)×2 均购自大连 Takara 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 取材时期及部位 幼苗期-腋芽未形成: 顶芽、茎节和根尖; 幼苗期-腋芽形成后: 顶芽、茎节、根尖及侧芽; 营养生长期: 茎节、根尖, 35 基部未伸长侧枝顶芽(侧枝长度约 0.5 cm)及 35-1 伸长侧枝顶芽(侧枝长度约 10 cm)。材料编号, 液氮速冻保存。

**第一作者简介:**智利婷(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: 649123440@qq.com

**责任作者:**张海明(1960-), 男, 博士, 教授, 现主要从事作物栽培与遗传育种等研究工作。E-mail: zhanghmm@yahoo.com.cn

**收稿日期:**2015-07-27

1.2.2 RNA 提取及 cDNA 第一链合成 根据 Promega 公司总 RNA 分离纯化系统试剂盒操作说明,提取 35 和 35-1 不同时期、不同部位材料中的总 RNA, DNase I 去除痕量 DNA 污染。紫外分光光度计检测 RNA 浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。分别取不同时期、不同部位总 RNA 样品 1  $\mu\text{g}$ , 参照 cDNA 第一链合成试剂盒操作说明合成 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  存放备用。

1.2.3 SAMDC 基因片段克隆 根据课题组已建立的抑制消减杂交 cDNA 文库 (SSH 库) 中 SAMDC 基因的测序结果, 设计 PCR 引物: SAMDC 正向引物 5'-GAAACAGGCGGGTATGATT-3'; 反向引物 5'-TCTCACTCCAGCATTGGTG-3', 产物长度 273 bp, 退火温度  $57^{\circ}\text{C}$ 。分别以 35 和 35-1 侧枝顶芽 (与已建立的 SSH 文库取材部位保持一致) cDNA 第一链为模板进行扩增。扩增体系 20  $\mu\text{L}$ : cDNA 2  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L) 1.5  $\mu\text{L}$ ,  $10\times$  缓冲液 ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 (5 U/L) 0.1  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , RNase-free 水补充体积至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  45 s;  $94^{\circ}\text{C}$  45 s,  $57^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 30 次循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收目的条带、克隆, 送至上海英俊生物技术有限公司测序。

1.2.4 标准曲线制定与结果计算 以 18 S RNA 作为内参基因, 将不同时期不同部位 cDNA 模板的混合样品进行 10 倍梯度稀释制作标准曲线, 以 SAMDC 和 18 S RNA 特异引物扩增获得标准曲线, 横坐标为稀释浓度, 纵坐标为临界循环值 Ct。每个样本设置 3 个重复。18 S RNA 的正向引物 5'-CCTGAGAAACGGCTACCACAT-3', 反向引物 5'-CACCAGACTTGCCCTCCA-3', 产物长度 171 bp。

1.2.5 SAMDC 基因在 35 和 35-1 不同组织中的表达分析 以 35 和 35-1 不同发育时期不同部位的 cDNA 第一链样品为模板, 各 cDNA 样品分别以 SAMDC 和 18 S RNA 引物进行实时荧光定量 PCR 反应。扩增反应参照 TaKaRa SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒说明书进行。反应体系 20  $\mu\text{L}$ : SYBR Green I 10  $\mu\text{L}$ , 5' 和 3' 引物各 0.25  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.1  $\mu\text{L}$ 。配制混合物充分混匀后平均分配至 96 孔 PCR 板中。反应条件如下:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  30 s,  $57^{\circ}\text{C}$  40 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 次循环;  $95^{\circ}\text{C}$  1 min,  $58^{\circ}\text{C}$  30 s;  $95^{\circ}\text{C}$  30 s。温度每上升  $0.2^{\circ}\text{C}$ , 读板 1 次。所有设定保存后运行程序。

### 1.3 项目测定

数据统计分析采用  $\Delta\Delta\text{CT}$  法, 计算目的基因 SAMDC 的相对表达量差异。计算出每个样本的平均  $C_T$  值, 根据相对定量计算公式:  $\Delta\Delta\text{CT} = (C_T \text{ 目的基因} - C_T \text{ 内参})_{\text{处理组}} - (C_T \text{ 目的基因} - C_T \text{ 内参})_{\text{对照组}}$ , 将 35 作为处理组, 35-1 作为对照组, 35 目的基因表达/35-1 目的基因表达 =  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ , 从而比较 SAMDC 基因在 35 和 35-1 中的表达差异。分别计算出 SAMDC 基因在 35 和 35-1 不同发育时期不同部位的改变倍数, 以相对表达量的改变倍数作图, 并进行显著性分析。

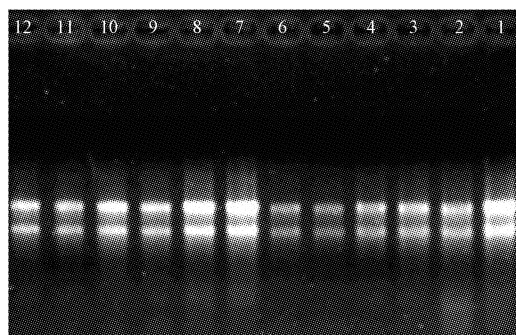
### 1.4 数据分析

采用 SPSS 软件对数据进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 纯度和完整性验证

总 RNA 取 1  $\mu\text{L}$  稀释 50 倍, 经分光光度计检测, OD  $A_{260}/A_{280}$  值均在 1.8~2.1 之间, 电泳检测显示 RNA 条带清晰整齐, 无明显降解 (图 1)。



注: 1, 3, 5, 7, 9, 11 为 35; 2, 4, 6, 8, 10, 12 为 35-1。

Note: 1, 3, 5, 7, 9, 11 are from 35; 2, 4, 6, 8, 10, 12 are from 35-1.

图 1 总 RNA 提取电泳检测图

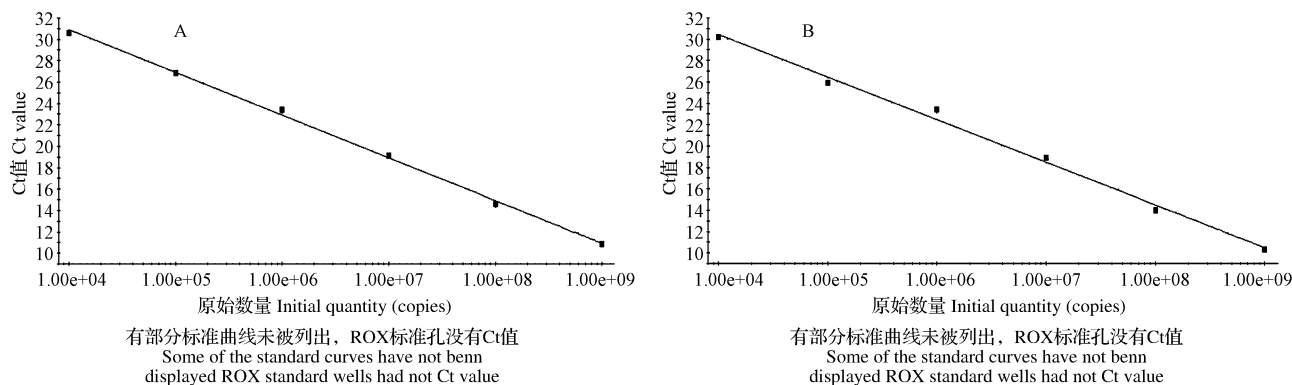
Fig. 1 Total RNA of 35 and 35-1 isolate in 1% agarose gel electrophoresis

### 2.2 SAMDC 基因片段克隆

测序结果经 DNAMAN 数据分析, 35 和 35-1 侧枝顶芽中 SAMDC 基因测序结果与 SSH 文库中 SAMDC 基因序列相比, 相似度均大于 90%。因此可推定 PCR 产物为目的基因片段, 可进行后续实时荧光定量 PCR 试验。

### 2.3 标准曲线建立

以 18 S RNA 为参照基因。SAMDC 和 18 S RNA 标准曲线的斜率分别为 -3.994 和 -3.992, 线性相关系数分别为 0.994 和 0.998 (图 2)。



注:A为18 S RNA标准曲线图,B为SAMDC标准曲线图。

Note:A was standard curve of 18 S RNA,B was standard curve of SAMDC.

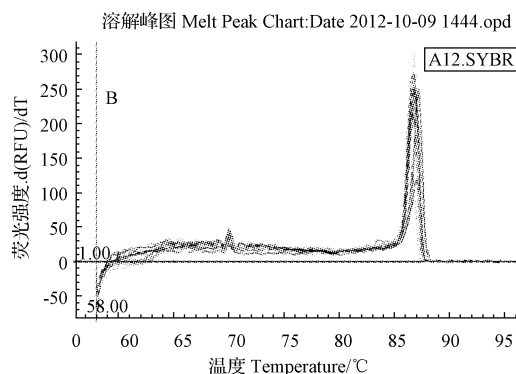
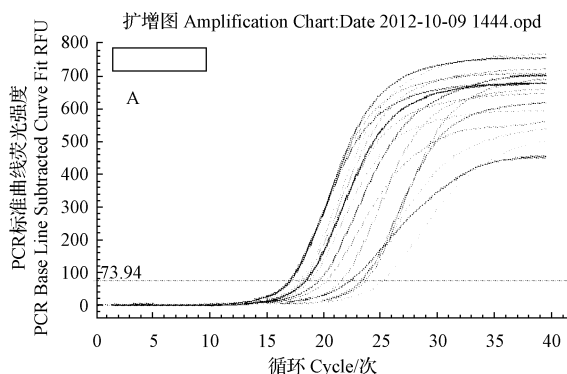
图2 标准曲线图

Fig.2 Standard curves of 18 S RNA (A) and SAMDC (B)

## 2.4 SAMDC 基因表达准确性检测

由图3可知,样品在荧光定量PCR仪上进行,得到了一条反应核酸扩增过程的S形荧光动力学曲线(图

3A),曲线基线平整,指数区较明显,Ct值在20~40。溶解曲线(图3B)只有1个溶解峰,说明没有引物二聚体和其它杂质的产生,产物单一,引物特异。



注:A为SAMDC基因扩增曲线,B为SAMDC基因溶解曲线。

Note:A was amplification plots of SAMDC,B was melting curve of SAMDC.

图3 SAMDC 基因的表达

Fig.3 Expression of SAMDC gene

## 2.5 SAMDC 表达的相对定量检测及差异显著性分析

采用建立的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 操作方法,对一串红 35 及 35-1 不同发育时期不同部位的 cDNA 样品进行荧光定量 PCR 扩增,并进行差异显著性分析。

由表1、图4可以看出,幼苗期-腋芽未形成时,SAMDC基因在35顶芽、茎节、根尖中的相对表达量均低于35-1,且在二者顶芽和茎节中的相对表达量差异极显著或显著。幼苗期-腋芽形成后,SAMDC基因在35顶芽和根尖中的相对表达量低于35-1,且差异显著或极显著。营养生长期,即侧枝快速发育期,SAMDC基因在35茎节中的相对表达量是35-1的1.43倍,根中的相对表达量为35-1的2.95倍,侧枝顶芽中是35-1的1.53倍。且在35茎节、根尖、侧枝顶芽中的相对表达量均高于35-1,差异显著或极显著。

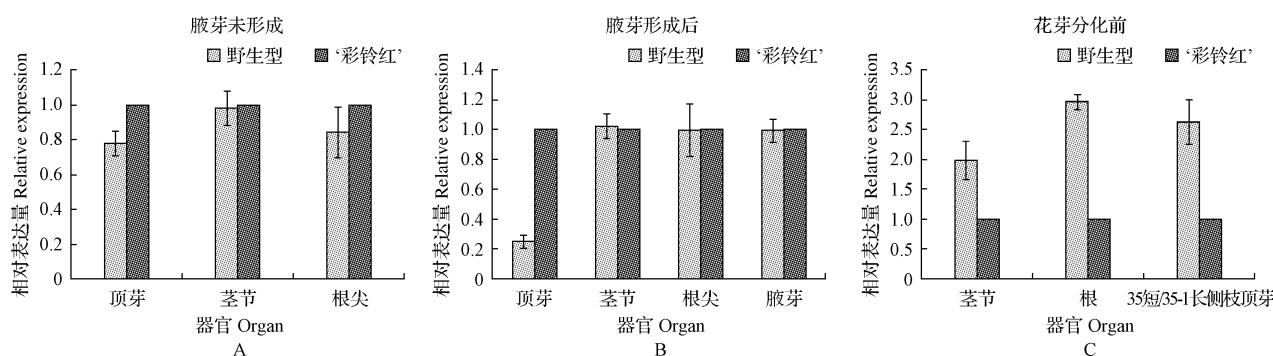
表1 SAMDC 在 35 及 35-1 不同时期不同器官相对表达差异分析

Table 1 Relative expression variation analysis of SAMDC in different periods and organs

| 发育时期      | 器官   | 相对表达量         | 显著性分析 |
|-----------|------|---------------|-------|
| 幼苗期-腋芽未形成 | 顶芽   | 0.652 786 061 | 极显著   |
|           | 茎节   | 0.902 179 900 | 显著    |
|           | 根尖   | 0.891 141 450 | 不显著   |
| 幼苗期-腋芽形成后 | 顶芽   | 0.694 600 520 | 显著    |
|           | 茎节   | 1.170 316 690 | 不显著   |
|           | 根尖   | 0.707 699 400 | 极显著   |
| 营养生长期     | 腋芽   | 0.922 064 890 | 不显著   |
|           | 茎节   | 1.434 634 760 | 显著    |
|           | 根尖   | 2.031 343 820 | 极显著   |
|           | 侧枝顶芽 | 1.530 091 440 | 显著    |

## 3 讨论

多胺在高等植物中主要以游离态形式存在于植物



注:A,幼苗期-腋芽未形成;B,幼苗期-腋芽形成后;C,营养生长期。

Note: A, before axillary bud formation; B, after axillary bud formation; C, before bud differentiation.

图4 SAMDC在35和35-1不同时期不同器官的表达量差异

Fig. 4 Expression variation of SAMDC in different periods and organs of 35 and 35-1

体内细胞分裂旺盛的部位,是植物体内调控生长发育的重要生理活性物质。研究表明,对休眠芽的外植体培养基中加入适量的多胺而不加入其它生长物质,其块茎细胞也进行分裂和生长,说明多胺可促进细胞分裂和生长。

SAMDC基因是与多胺合成密切相关的一个基因,SAMDC基因表达量的升高,提供了充足的氨丙基,促进了腐胺向亚精胺、精胺的转化。SAMDC主要通过调控植物体内多胺的含量来影响植物的生长发育和应答环境胁迫<sup>[3]</sup>。SAMDC基因在旺盛分裂的组织中活性最高,而在成熟和衰老组织中则活性很低。

在菜豆上施用SAMDC抑制剂,降低了内源亚精胺和精胺的含量,不管生长素IAA存在与否,均能抑制根系分化<sup>[4]</sup>。苹果的生根与多胺含量的升高也有关<sup>[5]</sup>。提高植物中SAMDC的活性,可以提高植物中主要是叶片和种子中亚精胺和精胺的水平<sup>[6]</sup>。

在烟草中反义表达曼陀罗SAMDC基因的cDNA,可对乙烯的活性、腐胺/亚精胺的比例,生根的潜力以及对茉莉酮酸酯的反应产生影响<sup>[7]</sup>。增加马铃薯块茎中SAMDC基因的活性,导致马铃薯块茎数量增加和块茎大小的改变<sup>[8]</sup>。用GA处理矮化豌豆后发现,腐胺和精胺的含量随节间伸长的加快而上升。Kaur-Sawhney进一步说明了多胺参与了枝条的伸长<sup>[9]</sup>。该试验中幼苗期腋芽形成前和腋芽形成后35顶芽中SAMDC基因的表达量低于35-1,故推测35-1顶芽中SAMDC基因的相对高表达,促进了35-1植株体内亚精胺和精胺合成,进而可能诱导35-1侧芽的分化形成。而在营养生长期,35中的相对表达量低于35-1,故推测35、35-1营养生长期,SAMDC基因的相对低表达,通过对体内多胺含量的调控,对35-1枝条的伸长生长起到促进作用。

有试验表明,用SAMDC基因的反义RNA技术使得植物中SAMDC转录水平明显下降,亚精胺和精胺含量下降,植物表现出生长受抑制,节间缩短,叶子变小等特征;利用诱导型表达启动子获得马铃薯正义SAMDC转基因植株,过量表达植株中,SAMDC转录水平升高,精胺、亚精胺、腐胺的含量升高;而组成型表达的反义转基

因植物表现出生长受抑制、节间缩短,分支增加、叶子变小等特殊的生长表型。

该研究初探了SAMDC基因在一串红35和35-1不同发育时期、不同部位的表达情况,在一定程度上阐释了SAMDC基因对35和35-1侧枝发育的影响作用。然而植物生长是一个复杂的发育过程,侧枝的形成受到生长素、细胞分裂素、脱落酸等多种植物激素及多种基因的共同作用。植物由于受到生长素顶端优势的控制,侧枝发育受到抑制,而细胞分裂素则促进植株侧枝生长发育,多胺作为新的植物激素,共同参与这个复杂的发育过程,因此要全面了解一串红侧枝发育及形态建成的机理还需要更深入的研究。

#### 参考文献

- [1] 刘林德,姚敦义. 植物激素的概念及其新成员[J]. 生物学通报, 2002, 37(8): 18-20.
- [2] 赵福康. 盐胁迫下植物体内多胺和脯氨酸代谢及其相互关系的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2000.
- [3] BOUCHEROU A, AZIZ A, LARHER F, et al. Polyamines and environmental challenges: recent development[J]. Plant Science, 1999, 140(2): 103-125.
- [4] JARVIS B C, JASMIN S, COLEMAN M T. RNA and protein metabolism during adventitious root formation in stem cutting of *Phaseolus aureus* cultivar Berkin[J]. Physiol Plant, 1985, 64: 53-59.
- [5] 崔凤芝, 张运. 多胺与园艺植物生长发育的关系[J]. 河北农业大学学报, 1996, 19(3): 95-98.
- [6] THUANG P, BASSIE L, SAFWAT G. Expression of a heterologous S-adenosylmethionine decarboxylase cDNA in plants demonstrates that changes in S-adenosyl-L-methionine decarboxylase activity determine levels of the higher[J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1744-1754.
- [7] TORRIGIANI P. Expression of an antisense *Datura stramonium* S-adenosylmethionine decarboxylase cDNA in tobacco: changes in enzyme activity, putrescine-spermidine ratio, rhizogenic potential, and response to methyl jasmonate[J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162(5): 559-571.
- [8] PEDROS A R, MACLEOD M R, ROSS H A, et al. Manipulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers. An increase in activity leads to an increase in tuber number and a change in tuber size distribution[J]. Planta, 1999, 209(1): 153-160.
- [9] KUSHAD M M, ORVOS A R, YELENOWSKY G. Relative changes in polyamines during citrus flower development[J]. Hort Science, 1990, 25: 946-948.



DOI:10.11937/bfyy.201524027

# 铁线莲品种 *Clematis* 'Bill MacKenzie' 愈伤组织的诱导

马育珠, 李林芳, 马玲玲, 王淑安, 汪庆, 李亚

(江苏省中国科学院植物研究所 南京中山植物园, 江苏 南京 210014)

**摘要:**以铁线莲 *Clematis* 'Bill MacKenzie' 优良单株的嫩茎为外植体, 研究了不同灭菌时间、基本培养基类型对 *C. 'Bill MacKenzie'* 愈伤组织诱导的影响, 并在初代愈伤诱导的基础上, 研究了不同外源激素组合对 *C. 'Bill MacKenzie'* 愈伤组织诱导及状态的影响。结果表明:最佳的灭菌时间为 12 min; 基本培养基类型为 MS, 诱导率为 68.4%; 不同的外源激素组合均能诱导出愈伤, 但是愈伤状态不同, 其中 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA 时愈伤状态最好。

**关键词:**铁线莲; 茎段; 愈伤; 诱导

**中图分类号:**S 682.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0094-04

铁线莲(*Clematis*)属毛茛科(Ranunculaceae)多年生的木质或草质藤本, 观赏价值高, 抗逆性强, 少数为直立灌木<sup>[1]</sup>。铁线莲属的栽培品种花大色艳, 花色丰富, 花型多变, 花期长, 观赏价值高, 且园艺用途广泛, 是非常优良的垂直绿化材料, 具有“藤本皇后”的美称<sup>[2]</sup>。铁线

莲品种 *Clematis* 'Bill MacKenzie' 属于西藏型铁线莲品种群, 为非常罕见的黄花品种之一。花单瓣, 钟型, 下垂, 黄色, 较大, 直径 6~7 cm。萼片 4, 较宽、厚、肉质, 先端锐尖、翻卷。花丝红棕色、花药棕色。宿存花柱被长柔毛、丝质, 长约 5 cm, 园艺用途广泛。

铁线莲虽然可以扦插繁殖, 但由于对繁殖材料要求高, 导致合适的插穗稀缺, 繁殖基数小、周期长, 且生长不整齐, 往往不能满足研究及大规模推广应用的需, 从而导致市面上铁线莲苗木价格居高不下的现状<sup>[3-5]</sup>, 而组培苗生产规模大、周期短且生长整齐, 能够较好的解决这一问题。

张徐俞等<sup>[6]</sup>对天台铁线莲(*C. patens* ssp. *tiantensis*)

**第一作者简介:**马育珠(1989-), 女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 研究方向为园林植物。E-mail: myz133@163.com.

**责任作者:**李亚(1969-), 男, 安徽颍上人, 博士, 研究员, 现主要从事观赏植物等研究工作。E-mail: yalcnbg@aliyun.com.

**基金项目:**江苏省中国科学院植物研究所青年基金资助项目(SQ201301)。

**收稿日期:**2015-08-19

## Effect of SAMDC Gene on *Salvia splendens* Collateral Development

ZHI Liting<sup>1</sup>, HONG Peipei<sup>2</sup>, CHEN Hongwei<sup>2</sup>, MA Hongyan<sup>1</sup>, ZHANG Haiming<sup>1</sup>

(1. Technology Industry Group, Beijing Agricultural University, Beijing 102206; 2. College of Landscape, Beijing Agricultural University, Beijing 102206)

**Abstract:** Taking *Salvia splendens* 35 and 35-1 as materials, using real-time fluorescence quantitative PCR technology to analysis the S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene relative expression in 35 and 35-1 of different parts and developmental stages. The results showed that in seedling stage, before and after axillary buds formed SAMDC relative expression in 35 was lower than that in 35-1. In vegetative stem, root tips and lateral buds were higher than in 35-1. Difference was significant. It was speculated that SAMDC high expression in seedling bud could promote plant cell division and differentiation to formation lateral bud. In vegetative growth stage, low expression could promote branch and elongation branches growth. This study would help to explore the effect of SAMDC gene in *Salvia splendens* 35 and 35-1 collateral development and built a foundation of *Salvia splendens* morphogenesis studies.

**Keywords:** *Salvia splendens*; SAMDC; lateral branch; real-time fluorescent quantitative PCR