

文章编号:1001-7380(2017)04-0053-04

珙桐分子生物学研究进展

周鑫伟,李媛媛,张驰强,周 庆*

(贵州省植物园,贵州 贵阳 550004)

摘要:珙桐是珍稀的第三纪孑遗树种,也是优良的用材兼园林绿化树种。开展珙桐研究,不仅具有重大科学意义,而且具有重要的经济和生态价值,但珙桐的分子生物学研究进展相对缓慢。该文从分子标记、遗传多样性、败育基因和抗胁迫基因等方面对珙桐树种的分子生物学研究进展进行综述,并就当前亟需解决的问题进行讨论,以期为加快分子生物学技术在珙桐乃至其他树种研究中的应用提供参考。

关键词:珙桐;分子标记;遗传多样性;基因工程;珍稀树种

中图分类号:S792.99;Q755

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2017.04.013

Research advances in molecular biology of *Davidia involucrata*

ZHOU Xin-wei, LI Yuan-yuan, ZHANG Chi-qiang, ZHOU Qing*

(Guizhou Botanical Garden, Quiyang 550004, China)

Abstract: *Davidia involucrata*, a relic species of the Tertiary, is one of the most important afforestation and ornamental tree species. *Davidia* research has scientific significance as well as great economic and ecological benefits. However, research in molecular biology of *Davidia* has advanced slowly. This review summarizes the research progress in molecular biology of *D. involucrata* from the aspects of molecular marker, genetic diversity, abortive gene and stress resistant gene. The problems to be solved are proposed and discussed for accelerating the application of molecular biological technologies in *D. involucrata* and other tree species.

Key words: *Davidia involucrata*; Molecular marker; Genetic diversity; Genetic engineering; Rare tree species

珙桐(*Davidia involucrata*)是珙桐科珙桐属、我国特有的单型属珍稀孑遗植物,属于国家一级保护植物,植物系统发育与演化以及地史变迁研究方面有很高的科学价值;其花形似白鸽,有“中国鸽子树”的美称^[1]。由于珙桐的天然分布呈间断性零星分布,种群间相互影响较小,导致基因交流受阻,自然更新十分困难而处于濒危状态。如何利用科学,有效保护珙桐和合理开发应用其种质资源,具有十分重要的研究意义。

珙桐研究时间相对较短,自20世纪初被法国人

发现后,1954年在我国引起领导和学者的关注,在国外也引发了一段引种热浪^[2]。但在我国,作为热点的兴起为20世纪90年代至今。鉴于珙桐的生长和分布情况,国内学者最先开始的研究工作是发现其自然群落,后续研究才包括其生理特性、解剖特征、群落学及繁殖等方面。学者们力求利用现代先进生物技术,加快珙桐的研究进程,也取得了诸多有益的成果和突破,但受到林木自身特性和资源的影响,总体进展相对缓慢,其更多的价值还有待挖掘。本文以分子标记、遗传多样性、败育基因和抗

收稿日期:2017-07-12;修回日期:2017-07-28

基金项目:贵州省社会发展科技攻关计划项目“珍稀植物珙桐资源收集、保育及基地建设技术研究”(黔科合SY字[2013]3149号);贵州科学院省级财政科研专项资金项目“中国特有珍稀濒危植物珙桐专类园建设”(黔科院科专合字[2013]05号);贵州科学院项目“珙桐基地建设与管理技术研究”;贵州科学院省级科研专项资金项目“贵州省植物园植物保育展示平台建设”(黔科院科专合字[2013]05号)

作者简介:周鑫伟(1990-),男,贵州兴仁人,硕士研究生,研究实习员。研究方向:森林培育。

* **通信作者:**周 庆(1962-),男,贵州正安人,研究员,本科毕业。研究方向:主要从事资源植物学研究。

胁迫基因等方面对珙桐树种的分子生物学研究进展进行综述,并就当前亟需解决的问题进行讨论,以期加快分子生物学技术在珙桐乃至其他树种研究中的应用提供参考。

1 DNA 分子标记技术对珙桐的应用

随着分子生物学的不断发展,以 PCR 为基础建立起来的分子标记技术,不仅有利于种质资源和系统分类的研究,还有利于功能性标记基因的定位和筛选,这将更好地为生物育种提供帮助。主要的分子标记技术有随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记、扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 标记、简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSR) 标记、简单重复序列区间 (Inter simple sequence repeats, ISSR) 标记、特定序列扩增区域 (Sequence-characterized amplified region, SCAR) 标记等。

1.1 ISSR-PCR 反应体系建立

而基于 PCR 的分子标记技术的实现就需要建立其相应的反应体系。李雪萍等^[3]于 2007 年初建立了适用于珙桐的 ISSR 分析的扩增体系:在退火温度 61.5 °C 下,25 μL 的适宜于珙桐 ISSR 分析的扩增体系即 20 ng 模板 DNA, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.20 mmol/L dNTP, 0.6 μmol/L 引物, 1.5 U Taq DNA 聚合酶。荣熔等^[4]在这个基础上研究改良后得到了更加适宜的珙桐愈伤组织 ISSR-PCR 扩增条件是在其他条件不变的情况下 dNTP 增加 0.2 mmol/L, TaqDNA 聚合酶下降 0.5 U, 增加 0.2 μmol/L 引物。建立同一体系但使用的反应物浓度发生区别,其原因有可能是因为 2 者选取的引物不同,或者是因为愈伤组织培养过程中,细胞的成分发生了变化。张玉晶等^[5]通过正交实验,也对珙桐的 ISSR 扩增体系进行了优化后得到的最佳反应体系为 20 μL 反应液中含有 2.0 μL 10 × buffer、镁离子浓度 2.75 mmol/L (比上 2 个体系中浓度多 1.25 mmol/L)、0.125 mmol/L dNTPs、0.7 μmol/L 引物、0.75 U Taq 酶和 40 ng 模板。该体系的 PCR 反应参数为预变性温度 94 °C 时间 5 min;变性温度 94 °C 时间 30 s,退火温度 53.2 °C 时间 45 s,延伸温度 72 °C 时间 1 min,共 40 个循环;后延伸温度 72 °C 时间 7 min。与荣熔等^[4]体系的 PCR 反应参数相比,预变性条件相同,变性温度相同但时间多 5 s,退火温度为 55.1 °C (较另一体系高 1.9 °C) 时间相同,延伸温度相同但

时间延长 1 min,多 5 个循环;后延伸温度相同而时间延长 6 min。

1.2 分子标记及遗传多样性

徐刚标等^[6]用 RAPD 分析对湘西和鄂西 2 地的天然珙桐群体的 60 个样品进行分析后,发现湘西与鄂西珙桐群体的遗传结构差异不大。李雪萍等^[7]通过 AFLP 分析对湖北省的珙桐和光叶珙桐进行了分析后,发现珙桐的遗传多样性较高,其存在遗传分化和有限的基因流动,但由于选用的引物组合较少,并没有发现珙桐与其变种光叶珙桐在 AFLP 分析下存在差异。通过 ISSR 分子标记发现,珙桐物种和种群都维持了较高的遗传多样性,种群间存在遗传分化,说明珙桐这一物种具有较大进化潜力^[8-10]。

2 基因工程技术对珙桐的应用

2.1 cDNA 文库的建立

cDNA 文库是指一群含重组的细菌或噬菌体克隆。以某组织细胞的全部 mRNA 为模板,在体外由反转录酶酶促合成单链 DNA,即 cDNA。再以 cDNA 为模板,由 DNA 聚合酶合成双链 DNA。将其和载体重组,并转化到宿主细菌或包装成噬菌体颗粒后转染给宿主细菌,经复制形成的在寄主细胞中保存的多个克隆。每个克隆只含 1 种 mRNA 的信息,足够数目克隆的综合则包含细胞的全部 mRNA 信息,这样的克隆群体叫 cDNA 文库。cDNA 文库反映了来源细胞当时基因组表达的基因序列信息,是包含了生物体表达基因信息的一个集合体,也是获取未知功能基因的一种技术手段^[11]。徐刚标等^[12]用湖南省植物园珙桐幼树树叶通过 SMART 技术构建了珙桐叶全长 cDNA 文库。结果表明,以 XL1-Blue, BM25.8 为受体菌测定的原始文库滴度为 8.3×10^6 pfu/mL,扩增后文库总滴度为 4.16×10^8 pfu/mL,重组率为 97.3%。而齐刚等^[13]使用四川卧龙保护区的珙桐种子,也是利用 SMART 技术获取了珙桐的 cDNA 文库,该文库的滴度为 1.5×10^6 pfu/mL,重组率比徐刚标等的稍高 1%,cDNA 文库插入片段大小主要集中在 0.5—1.0 kb。随机测序获得 148 个 EST 序列,拼接成 127 个 uniEST,经网上 BlastN 及 BlastX 分析后发现,75 个序列为目前已知功能的基因标签,相似性较高,而 32 个序列在 GenBank 中相似性较低,13 个序列在 GenBank 中没有匹配。

2.2 珙桐败育基因研究

Li 等^[14]对珙桐的果实及种子进行了研究后发现,DEGs 是正常种子与败育种子间表达出现差异的基因,在种子败育过程中主要的调节因子是 MYB 转录因子、WEKY 转录因子、受体激酶和漆酶。熊亚丽等^[15]对珙桐种子当中的纤维素进行了分析后发现,正常种子在发育过程中纤维素含量持续升高,而在败育种子中纤维素含量显著高于正常种子。对在败育种子中显著上调的 *CesA* 基因进行 qPCR 分析后发现,该基因在茎中表达量较低,而在果肉中表达量较高,在败育种子中表达量显著高于其他组织,推测其在珙桐生殖器官中是调控纤维素合成的关键基因。戴鹏辉等^[16]从珙桐中筛选出了一个与青花素相关基因,并将其克隆后确定为一个编码 MYB 转录因子的基因 *DiMYB1*,对该基因的核苷酸序列及其编码产物进行了生物信息学分析和预测后发现,该基因的表达在珙桐的败育种子中较高于珙桐这次种子,推测该基因在珙桐败育过程中起到重要作用。

2.3 珙桐抗胁迫基因研究

珙桐由于其生长于阴湿地带但又能引种存活在云南、武汉等相对温度较高的地方,故刘美等^[17]认为珙桐必然有适应机理及调节物质,并成功找到了珙桐的热休克蛋白 18 (HSP18) 核苷酸序列。季红春等^[18]从珙桐 cDNA 文库中获得一个未知基因 (*DiRCI*),该基因长 539 bp,后经过实验证实,该基因为低温诱导膜蛋白基因。Yu 等^[19]通过对珙桐的叶绿体研究后,发现了珙桐完整的叶绿体基因。珙桐的叶绿体基因、基因组长度为 169,196 bp,129 个基因包含 83 个蛋白质编码基因 (PCG),40 个 tRNA 基因和 6 个 rRNA 基因。大多数基因种类以单拷贝的形式出现,而 18 个基因种类则出现在双拷贝中,其中包括 6 种 PCG (*ndhB*, *rpl2*, *rpl23*, *rps7*, *rps15* 和 *ycf2*),8 种 tRNA (*trnH-GTG*, *trnL-CAA*, *trnI-CAT*, *trnV-GAC*, *trnL-GAV*, *trnA-UGC*, *trnN-GTT* 和 *trnR-ACG*) 和所有 4 种 rRNA 种类 (*rrn4.5*, *rrn5*, *rrn16* 和 *rrn23*)。

2.4 内参基因研究

内参基因是指在 PCR 技术中,经常要用于作为对照组的基因,由于其在生物体或者细胞中的表达相对稳定,不受外源或内源因素的影响。任锐等^[20-21]发现 1 个编码网格蛋白衔接蛋白复合物 (Clathrin adaptor complexes, CAC) 的基因,命名为 *DiCAC*。该基因开放阅读框全长 1 317 bp,编码 438

个氨基酸。CAC 与 ACT7 在珙桐营养器官与生殖器官中均表达稳定,且新内参基因 CAC 的稳定性优于 ACT7; β -TUB 更适合作为珙桐营养器官中的内参基因,而 *eIF* 更适合作为生殖器官中的内参基因。

3 展望

综上所述,不难看出珙桐分子生物学研究取得了很大进展,然而,也应看到目前的研究工作中仍存在着一些问题,如很多的基因组、转录组信息还有待进一步分析鉴定。随着科学技术的进步,新一代高通量测序技术也被研究出来,传统分子生物学也逐渐被新的技术所替代,不依赖于参考基因组序列和信息的情况下的基因定位也被实现,这种新的方法有力地推动了林木包括珙桐这一树种的分子生物学研究。像目前新出来的转录组测序 (RNA-Seq) 技术,不仅可以经济实惠、高效、大量地发掘基因在基因组未知的非模式植物种,还可以对基因突变的基因位点进行识别,确定该基因是如何表达,表达水平如何,用选择性剪切会对该突变表型有什么样的影响。目前,该技术已经在水稻^[22-23]、拟南芥^[24-25]、玉米^[26-27]、杨树^[28-29] 等得到了广泛的应用,而对于珙桐在这方面却并未见到相关的报道。如果能够好好利用这项新技术,不仅可以为珙桐表达谱分析、分子标记辅助育种及基因克隆奠定基础,还可以对基因组解释提供参考。

然而,由于珙桐自身特性和其地理分布的独特性,分子生物学研究团队力量薄弱,对其资金的投入不足,技术不到位等原因,分子生物技术在珙桐中的应用仍有许多难点。相较于目前已知的一些模式树种,珙桐在全基因组的破译和高效稳定遗传转化体系的建立是珙桐分子生物学能否深入展开的关键问题。有鉴于此,认为今后的研究在以下几个方向亟需加强:(1)全基因组的破译。目前珙桐的研究已经破译了珙桐叶绿体全基因组,而珙桐树种的全基因组破译并未见报道,未来解决这个问题的关键在于如何选取有效的测序材料和高效组装软件的开发,这样可以为珙桐以及其他植物的功能基因组和生物学基础研究。(2)高效稳定的遗传转化体系的构建。珙桐组织培养体系中最大的难题在组织培养苗褐化严重^[30]。通过在培养基中添加外源物质(活性炭等)、改变外部光照条件或者消毒技术的改变,这样获得稳定而又高效的组织培养体系是可能的,同时通过对基因转化效率的提高,建立完善的转化机制,为充分利

用获得的 EST 序列,对其相关基因进行解析奠定基础。(3)濒危机理研究。目前利用分子标记技术,国内学者对珙桐的遗传多样性和败育原因展开了研究,但没有涉及基因的表达调控^[6,7,15]。利用表征遗传学,配合转录组图谱,对珙桐生物学性状基因的表达展开分析研究,尤其是珙桐的濒危机理,这将为改善珙桐濒危这一现状提供理论基础。(4)蛋白组学及分子传导途径研究。通过蛋白乙酰化、糖基化等高通量测序技术进行重要功能蛋白的结构与功能、蛋白质的翻译后修饰调控机制(磷酸化和脱磷酸化等)、功能蛋白的互作网络、重要蛋白质的亚细胞分布及其调控等研究,是珙桐分子生物学进一步深入研究的重要内容。随着分子生物学技术的快速发展,和以上问题的逐步解决,珙桐有关分子机理将得到阐明,在种质资源保护、亲本选择利用、分子标记辅助育种和转基因育种等方面,将发挥重要作用,并将加快珙桐的育种进程。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所.中国高等植物图鉴(第2册)[M].北京:科学出版社,1972:984.
- [2] 王献溥,李俊清,张家勋.珙桐的生物生态学特性和栽培技术[J].广西植物,1995,15(4):347-353.
- [3] 李雪萍,何正权,陈发菊,等.濒危植物珙桐 ISSR-PCR 反应体系的建立[J].江苏农业科学,2007(2):162-165.
- [4] 荣 熔,陈蕤坤,田金华,等.珙桐愈伤组织 ISSR-PCR 体系的建立[J].林业科技,2015,40(4):1-5.
- [5] 张玉晶,李牡丹,石 旭,等.珙桐基因组 DNA 的提取及 ISSR-PCR 体系的优化[J].山地农业生物学报,2011,30(3):211-214.
- [6] 徐刚标,禹玉婷,申响保.湘鄂西地区珙桐天然群体遗传结构的研究[J].中南林业科技大学学报,2007,27(6):5-9.
- [7] 李雪萍,李在留,贺春玲,等.珙桐遗传多样性的 AFLP 分析[J].园艺学报,2012,39(5):992-998.
- [8] 张玉梅,徐刚标,申响保,等.珙桐天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析[J].林业科学,2012,48(8):62-67.
- [9] 李雪萍,郑 雪,朱文琰,等.濒危植物珙桐遗传多样性与遗传结构的 ISSR 分析[J].广东农业科学,2012,39(6):121-123.
- [10] FRANKHAM R, BALLOU J D, BRISCOE D A. Introduction to conservation genetics [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 96-112.
- [11] 晏慧君,黄兴奇,程在全. cDNA 文库构建策略及其分析研究进展[J].云南农业大学学报,2006,21(1):1-6.
- [12] 徐刚标,房学爽,叶翠层.利用 SMART 技术构建珙桐叶片全长 cDNA 文库[J].中南林业科技大学学报,2008,28(6):40-45.
- [13] 齐 刚,苏智先,李劲涛,等.休眠期珙桐种子 cDNA 文库构建及 EST 分析[J].林业科学,2009,45(10):69-73.
- [14] LI M, DONG X J, PENG J Q, et al. *De novo* transcriptome sequencing and gene expression analysis reveal potential mechanisms of seed abortion in dove tree (*Davidia involucrata* Baill.) [J]. BMC Plant Biology, 2016(16):82-102.
- [15] 熊亚丽,曹福祥,刘志明,等.珙桐种子败育相关基因 CesA 的克隆及表达分析[J].植物生理学报,2016(10):1481-1490.
- [16] 戴鹏辉,任 锐,曹福祥,等.珙桐 MYB 转录因子 DiMYB1 基因的克隆及表达分析[J].植物生理学报,2016(8):1255-1262.
- [17] 刘 美,苏智先,齐 刚,等.珙桐热休克蛋白序列分析及功能预测[J].光谱实验室,2011,28(1):36-40.
- [18] 季红春,苏智先,杨 军,等.珙桐中一个与低温相关基因的克隆及其表达研究(英文)[J].云南植物研究,2010,32(2):151-157.
- [19] YU T, LYU J, LI J, et al. The complete chloroplast genome of the dove tree *Davidia involucrata* (Nyssaceae), a relict species endemic to China [J]. Conservation Genetics Resources, 2016, 8(3):263-266.
- [20] 任 锐,戴鹏辉,曹福祥,等.珙桐 CAC 基因的克隆及其作为内参基因的评价[J].生物技术通报,2017,33(4):119-129.
- [21] 任 锐,戴鹏辉,李 萌,等.珙桐实时定量 PCR 内参基因的筛选及稳定性评价[J].植物生理学报,2016(10):1565-1575.
- [22] MAGBANUA Z V, ARICK M 2nd, BUZA T, et al. Transcriptomic dissection of the rice-*Burkholderia glumae* interaction[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1):755-767.
- [23] XU R, ZHANG S, HUANG J, et al. Genome-wide comparative in silico analysis of the RNA Helicase Gene Family in *Zea mays* and *Glycine max*: A comparison with *Arabidopsis* and *Oryza sativa* [J]. Plos One, 2013, 8(11):e78982.
- [24] BHARGAVA A, CLABAUGH I, TO J P, et al. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology, 2013, 162(1):272-294.
- [25] LORRAINE A E, McCORMICK S, ESTRADA A, et al. RNA-seq of *Arabidopsis* pollen uncovers novel transcription and alternative splicing[J]. Plant Physiology, 2013, 162(2):1092-1109.
- [26] KAKUMANU A, AMBAVARAM M M, KLUMAS C, et al. Effects of drought on gene expression in maize reproductive and leaf meristem tissue revealed by RNA-Seq [J]. Plant Physiology, 2012, 160(2):846-867.
- [27] Liu X, Xu X, Li B, et al. RNA-seq transcriptome analysis of maize inbred carrying nicosulfuron-tolerant and nicosulfuron-susceptible alleles [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(3):5975-5989.
- [28] CHEN J, QUAN M, ZHANG D. Genome-wide identification of novel long non-coding RNAs in *Populus tomentosa* tension wood, opposite wood and normal wood xylem by RNA-seq [J]. Planta, 2015, 241(1):125-143.
- [29] ZHANG W, CHU Y, DING C, et al. Transcriptome sequencing of transgenic poplar (*Populus × euramericana* “Guariento”) expressing multiple resistance genes [J]. BMC Genetics, 2014, 15(S1):S7.
- [30] 余阿梅,苏智先,胡进耀,等.珙桐愈伤组织诱导和继代培养中的褐化研究[J].绵阳师范学院学报,2008,27(8):70-74.