

# 用 cDNA-SRAP 技术分离蜡梅花发育 不同时期差异表达基因片段

赵凯歌 王文颖 陈龙清

华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 应用 cDNA-SRAP 标记方法, 筛选出 19 对引物, 对 8—12 月所采集的 24 个蜡梅花芽(花朵)样品所制备的 cDNA 模板进行扩增, 研究蜡梅花发育各时期的基因表达情况, 并对部分差异片段进行了表达分析和功能预测。结果表明, cDNA-SRAP 分子标记技术操作简便, 能产生较丰富的条带, 是进行差异显示分析研究的有效途径; 与玉米淀粉去分支酶基因、欧洲山杨纤维素合成酶基因、玉米抗锈病基因和小麦多酚氧化酶基因相似性高的差异表达片段, 可能对蜡梅花发育和抗性表现起着重要的作用。

**关键词** 蜡梅; cDNA-SRAP; 差异显示; 基因表达; 发育阶段

**中图分类号** S 685.99 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)06-0693-06

蜡梅(*Chimonanthus praecox* (L.) Link) 又称腊梅、黄梅、寒梅等, 为蜡梅科蜡梅属落叶灌木。其开放时正值腊月, 花色晶莹剔透, 花香浓郁, 是深受中国人民喜爱的传统名花。蜡梅对环境条件适应性很强, 易于栽培, 具有抗多种生物胁迫的能力<sup>[1]</sup>。很多蜡梅品种一朵花可以同时呈现出黄色和紫红色<sup>[2]</sup>, 是研究花色相关基因差异表达的理想材料。蜡梅花香成份复杂, 市场应用潜力高。近年来, 挖掘其抗逆性、花色、花香相关基因并进行功能分析已成为蜡梅研究中的热点内容。Xiang 等<sup>[3]</sup>采用同源克隆的方法克隆了与花香相关的 *CpSAMT* 和 *CpFPPS* 基因; 刘群等<sup>[4]</sup>研究了脂转移蛋白在蜡梅非生物胁迫过程中的应答情况; 眭顺照等<sup>[5]</sup>研究了凝集素基因对蚜虫、蛴螬的抗性; 谢树章等<sup>[6]</sup>认为蜡梅几丁质酶可能与蜡梅抗寒性有关, 这些研究为蜡梅的品种改良和种质创新奠定了基础。但是这些研究多侧重于对蜡梅花期的基因表达情况进行研究, 而蜡梅从夏季花芽分化到冬季花期长达数月, 该过程中的基因表达情况目前尚无研究。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphisim, SRAP) 又称为基于序列扩增多态性, 是 2001 年由美国加州大学的 Li 等<sup>[7]</sup>提出

的一种基于 PCR 技术的新型分子标记技术, 已被应用于遗传多样性分析、比较基因组学、遗传图谱构建、性状标记及种质资源评价<sup>[8-10]</sup>。在 Li 等<sup>[7]</sup>对白菜不同组织中的 cDNA 进行 SRAP 扩增时, 检测到了组织特异性表达的条带, 说明 SRAP 技术也可用于 cDNA 差异表达分析, cDNA-SRAP 技术目前已在剪股颖<sup>[11]</sup>、甘蔗<sup>[12]</sup>、油菜<sup>[13]</sup>、芝麻<sup>[14]</sup>、花生<sup>[15]</sup>、油莎豆<sup>[16]</sup>等植物中得到应用, 成为一种新的转录基因组学研究工具。本研究利用 cDNA-SRAP 分子标记技术, 以不同时期的蜡梅花芽或花被片为材料进行花发育过程中的基因差异表达研究, 以期找到一些与花发育及抗性相关的基因, 为蜡梅的品种改良和种质利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为种植于华中农业大学校内的‘狗牙’蜡梅。该蜡梅属红心型, 花较小, 花期早, 中被片为淡黄色, 内被片为紫红色。从 2010 年 8 月初开始, 每 10 d 采集 1 次花芽样品, 从 10 月起缩短采样间隔, 每 6 d 采样 1 次, 至蜡梅开放, 共采集 24 份花芽(花朵)样品。

收稿日期: 2011-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800762, 30972019)

赵凯歌, 博士, 副教授, 研究方向: 园林植物与观赏园艺. E-mail: zhaokaige@mail.hzau.edu.cn

通讯作者: 陈龙清, 博士, 教授, 研究方向: 园林植物与观赏园艺. E-mail: chenlq@mail.hzau.edu.cn

## 1.2 方 法

将提取的蜡梅总 RNA 用 DNase 酶纯化,用 M-MLV 逆转录酶反转录合成 cDNA 第一链并检测。根据 Li 等<sup>[7]</sup>开发的 SRAP 标记引物,共合成了正向引物 10 条,反向引物 17 条,组成 170 对引物组合。

PCR 扩增体系和反应程序参照 Li 等<sup>[7]</sup>的方法,略作改动。扩增体系 20  $\mu\text{L}$ ,其中 cDNA 第一链 45 ng,10 $\times$ PCR buffer 2  $\mu\text{L}$ ,dNTPs 0.2 mmol/L,正向引物 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ,反向引物 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ,*Taq* 酶 1 U。PCR 反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,35  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,5 个循环;94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,50  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。反应结束后,取扩增产物于 2% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。将差异条带与载体连接,转化到感受态大肠杆菌上,经蓝白斑初步筛选后,挑取白色菌斑进行菌落 PCR,检测是否阳性克隆。进行测序分析,并在 NCBI 上进行比对。

为了进一步研究差异片段在不同发育阶段的表达情况,根据其序列设计引物,进行逆转录 PCR。扩增体系为 20  $\mu\text{L}$ ,其中 10 $\times$ PCR buffer 2  $\mu\text{L}$ ,dNTPs 0.2 mmol/L,正向引物 1.5  $\mu\text{mol/L}$ ,反向引物 1.5  $\mu\text{mol/L}$ ,cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,*Taq* 酶 1 U。反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60~70  $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s(每进行 5 个循环退火温度下降 2  $^{\circ}\text{C}$ ),72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。内参为 18S rRNA 基因。

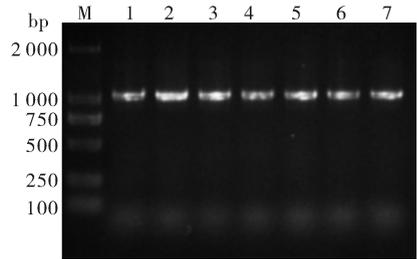
## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

对所采 24 份样品进行了总 RNA 的提取。所提取的 RNA 28S,18S 的带型清晰整齐,无拖尾,无降解,完整性好。用紫外分光光度计测得  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  均为 1.8~2.0, RNA 质量浓度为 500~1 000 ng/ $\mu\text{L}$ ,符合后续试验要求。

用 Invitrogen 公司的 M-MLV 逆转录酶将 RNA 反转录成 cDNA 第一链。合成后,以稀释 10 倍的 cDNA 第一链为模板,用笔者所在课题组克隆的蜡梅 *DFR* 基因(1 100 bp 左右)引物进行扩增,检测 cDNA 第一链的质量。PCR 结束后,用 1% 琼脂

糖凝胶检测,结果如图 1,所合成的 cDNA 第一链均能扩增出单一明亮的目的条带,说明 cDNA 第一链的合成效果较好。



M: 分子质量标记 Molecular weight marker; 1~3: 花芽样品 Flower bud samples; 4~7: 分别为盛花期和衰老期的中轮花被片和内轮花被片 Middle and inner tepals of fully opened flowers and senescent flowers, respectively.

图 1 反转录产物检测的结果

Fig. 1 Quality of reverse transcription PCR products

### 2.2 蜡梅花不同发育时期的 cDNA-SRAP 扩增差异显示

通过预试验确定的 cDNA-SRAP 反应体系与条件,对 170 对引物进行筛选,最终选择了 19 对引物进行后续试验(表 1)。以 24 个不同时期反转录单链作为模板,进行 PCR 扩增。检测结果显示,共扩增出清晰可辨的条带 596 条,条带主要分布在 100~1 000 bp 之间(图 2)。

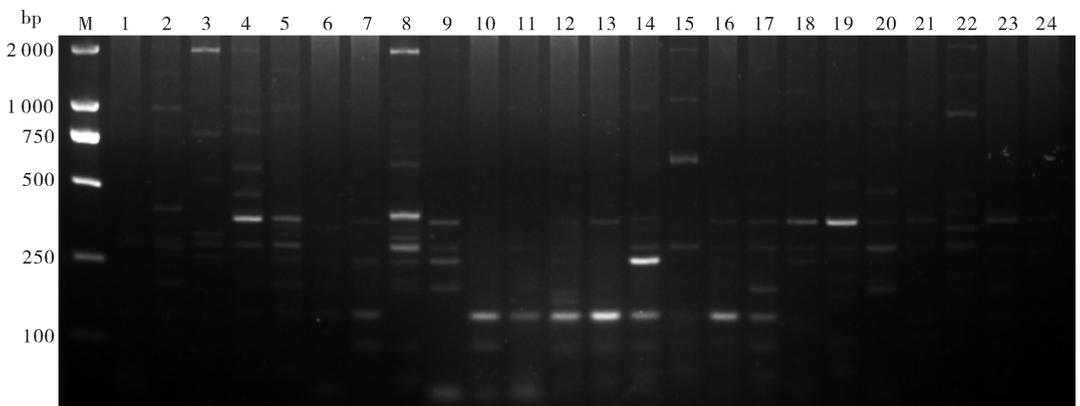
### 2.3 差异条带的测序

经重复扩增后,选择能在同一位置稳定出现、大小在 100~1 000 bp 之间,带型明亮清晰的部分条带进行回收测序,在 NCBI 上进行同源性比对分析,与已知功能序列同源性较高的序列有 23 条(表 2)。有的序列与转录因子、转座子、逆转录转座子关系密切,如 Copia-like 逆转录转座子基因、AP2 转录因子基因;有的序列与生物代谢有关,如纤维素合成酶基因、谷氨酰胺合成酶基因等;有的序列与植物抗逆性有关,如抗锈病基因、多酚氧化酶基因、钙依赖蛋白激酶基因等。

还有 20 个片段为未知功能序列,其中 1 条序列与非生物胁迫后得到的葡萄 EST 数据库同源性高,1 条与梨叶缘焦枯病病原菌感染后得到的柑橘 cDNA 文库数据同源性高,1 条与干旱处理后得到的二穗短柄草 cDNA 文库数据同源性高,推测它们可能与植物抗逆功能有关。

表 1 cDNA-SRAP 引物组合  
Table 1 The combination of cDNA-SRAP primers

引物编号 Sequence number	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
1	Em06;GACTGCGTACGAATTGCA	Me01;TGAGTCCAAACCGGATA
2	Em06;GACTGCGTACGAATTGCA	Me02;TGAGTCCAAACCGGAGC
3	Em02;GACTGCGTACGAATTTGC	Me10;TGAGTCCAAACCGGTGC
4	Em07;GACTGCGTACGAATTATG	Me06;TGAGTCTTTCCGGTAA
5	Em10;GACTGCGTACGAATTTAG	Me01;TGAGTCCAAACCGGATA
6	Em10;GACTGCGTACGAATTTAG	Me07;TGAGTCTTTCCGGTTG
7	Em11;GACTGCGTACGAATTTGC	Me03;TGAGTCCAAACCGGAAT
8	Em13;GACTGCGTACGAATTCAA	Me09;TGAGTCCAAACCGGTCC
9	Em12;GACTGCGTACGAATTGAC	Me03;TGAGTCCAAACCGGAAT
10	Em12;GACTGCGTACGAATTGAC	Me04;TGAGTCCAAACCGGACC
11	Em17;GACTGCGTACGAATTCCA	Me02;TGAGTCCAAACCGGAGC
12	Em14;GACTGCGTACGAATTCTG	Me03;TGAGTCCAAACCGGAAT
13	Em08;GACTGCGTACGAATTAGC	Me06;TGAGTCTTTCCGGTAA
14	Em01;GACTGCGTACGAATTAAT	Me01;TGAGTCCAAACCGGATA
15	Em16;GACTGCGTACGAATTCAG	Me03;TGAGTCCAAACCGGAAT
16	Em17;GACTGCGTACGAATTCCA	Me06;TGAGTCTTTCCGGTAA
17	Em02;GACTGCGTACGAATTTGC	Me06;TGAGTCTTTCCGGTAA
18	Em07;GACTGCGTACGAATTATG	Me03;TGAGTCCAAACCGGAAT
19	Em02;GACTGCGTACGAATTTGC	Me03;TGAGTCCAAACCGGAAT



M:分子质量标记 Molecular weight marker; 1~10:8-10月每10d所采花芽 Flower bud samples collected every 10 days during August to October period; 11~18:11-12月每6d所采花芽 Flower bud samples collected every 6 days during November to December period; 19~24:初开期、盛花期和衰老期的中轮花被片和内轮花被片 Middle and inner tepals of partially opened, fully opened flowers and senescent flowers, respectively.

图 2 Em11Me03 引物组合的 cDNA-SRAP 扩增结果  
Fig. 2 Amplified result of Em11Me03 primer combination

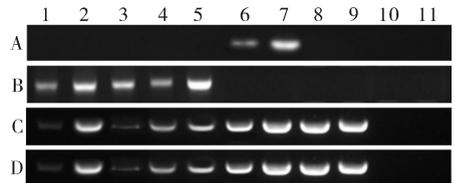
表 2 部分 cDNA-SRAP 差异片段的序列分析

Table 2 Sequence analysis of a part of differential cDNA-SRAP fragments

序号 No.	GenBank 登录号 GenBank accession No.	物种 Species	相似序列 Similar sequence	片段长度/bp Length of sequences
1	AY574035.1	玉米 <i>Zea mays</i>	抗锈病基因 Rust resistance protein <i>rp3-1</i> gene	213
2	AY162181.1	欧洲山杨 <i>Populus tremuloides</i>	纤维素合成酶 mRNA Cellulose synthase (CesA4) mRNA	419
3	DQ195078.1	玉米 <i>Zea mays</i>	淀粉去分支酶 Pullulanase-type starch debranching enzyme gene ( <i>Zpu1</i> )	215
4	GQ252858.1	毛竹 <i>Phyllostachys edulis</i>	转座酶蛋白基因 Transposon protein genes	515
5	XR_077361.1	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	miscRNA 基因 Miscellaneous RNA gene	265
6	FY987163.1	日本黄莲 <i>Coptis japonica</i>	AP2 转录因子基因 AP2 class transcription factor	252
7	JN632508.1	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	多酚氧化酶基因 Polyphenol oxidase gene ( <i>PPO-B2</i> )	187
8	NM_001112072	玉米 <i>Zea mays</i>	钙依赖蛋白激酶基因 Calcium-dependent protein kinase	374
9	JQ246972.1	野胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	<i>atp1</i> 基因 ATPase subunit 1 gene ( <i>atp1</i> )	266
10	NM_001255403.1	大豆 <i>Glycine max</i>	谷氨酰胺合成酶基因 Glutamine synthetase beta2 mRNA	158
11	FJ660634.1	水稻 <i>Oryza sativa</i>	脂氧合酶基因 Basmati LOX9 mRNA	125
12	DQ359721.1	火炬松 <i>Pinus taeda</i>	叶绿体 tRNA-Val 基因 tRNA-Val gene ( <i>trnV</i> )	289
13	AJ428413.1	美国蜡梅 <i>Calycanthus fertilis</i>	叶绿体基因 Chloroplast gene	300
14	HQ215855.1	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	NAC mRNA 基因 NAC domain mRNA gene	264
15	JQ340872.1	棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	果胶甲基酯酶基因 Pectin methylesterase mRNA	415
16	GU647223.1	白羽扇豆 <i>Lupinus albus</i>	甘油磷酸二酯磷酸二酯酶基因 Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1 gene	237
17	NM_103475.1	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	hAT 家族转座子 mRNA hAT transposon protein mRNA	178
18	AY099257.1	宽叶菜豆 <i>Phaseolus acutifolius</i>	谷胱甘肽硫转移酶 mRNA Glutathione S-transferase mRNA	221
19	JQ429083.1	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	多磷酸肌醇激酶基因 IPK2 protein mRNA	132
20	EU853459.1	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	RanBP1 mRNA 基因 Ran-binding protein mRNA gene	443
21	JN402332.1	柑橘 <i>Citrus sinensis</i>	Copia-like 逆转录转座子基因 Retrotransposon copia-like polyprotein gene ( <i>Tcs1</i> )	126
22	EF088506.1	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	钙网蛋白基因 Calreticulin 2 mRNA ( <i>CRT2</i> )	187
23	XM_002281150.1	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	GLP 类萌发素蛋白基因 Germin-like protein mRNA	203

## 2.4 一些重要片段的基因表达分析

对一些预测功能比较重要的片段设计引物,进行逆转录 PCR 反应,以进一步了解其在蜡梅花不同发育阶段的表达情况。结果表明,由引物 Em02Me10 扩增的长度为 215 bp 的差异片段(命名为 Em02Me10-215),在蜡梅初开花朵中特异出现(图 3-A),它与玉米淀粉去分支酶基因的部分编码区有 81% 的相似性。由引物 Em02Me03 扩增的长度为 419 bp 的差异片段(命名为 Em02Me03-419),在蜡梅蕾期的样品中特异出现(图 3-B),它与欧洲山杨纤维素合成酶(CesA4) mRNA 完整编码区序列的一部分有 87% 的相似性。由引物 Em14Me03 扩增的长度为 213 bp 的差异片段(命名为 Em14Me03-213)在蜡梅花发育各阶段均有表达,在初开期和盛花期表达量上升(图 3-C),它与玉米抗



1~5: 采自 8—12 月蕾期样品 Flower bud samples collected during August to December period; 6~11: 初开期、盛花期和衰老期的中轮花被片和内轮花被片 Middle and inner tepals of partially opened, fully opened flowers and senescent flowers, respectively; A: Em02Me10-215; B: Em02Me03-419; C: Em14Me03-213; D: Em02Me06-187.

图 3 逆转录 PCR 检测一些片段在蜡梅花不同发育阶段的表达情况

Fig. 3 Expression of some putative gene fragments in *Chimonanthus praecox* at different developmental stages by reverse transcription PCR

锈病蛋白(RP3-1)的完整编码区的一部分有98%的相似性。由引物Em02Me06扩增的长度为187 bp的差异片段(命名为Em02Me06-187)在蜡梅花芽期、初开期、盛花期均有表达,在衰老花被片中没有检测到表达(图3-D),它与小麦多酚氧化酶基因部分编码区有71%的相似性。

### 3 讨论

无论是动物还是植物,同一基因在不同的组织,或同一组织的不同发育阶段,其基因的表达量都是有差异的。为了研究这些呈现出表达差异的基因,人们建立起了一系列差异基因筛选技术,其中cDNA-AFLP试验成本相对较低,稳定性好,在国内外应用较多<sup>[17]</sup>。本研究发现,与cDNA-AFLP方法相比,cDNA-SRAP方法同样具有重复性好,能产生较丰富的条带,可同时检测多个样本之间的表达差异等优点,并且cDNA-SRAP方法操作步骤更简单,实验成本更低;而且在一些实验过程中,cDNA-SRAP的PCR扩增产物可以直接用琼脂糖凝胶电泳分离,避免了变性或非变性聚丙烯酰胺凝胶的复杂制备过程。因此,近年来cDNA-SRAP技术已逐渐成为基因表达研究的重要工具。

本研究采用cDNA-SRAP技术,以不同发育时期的蜡梅花芽(花朵)为试材研究蜡梅花发育过程中的表达差异,最终获得与已知功能序列同源性较高的序列23条及未知功能序列20条,并对一些预测功能比较重要的片段进行逆转录PCR反应,以进一步了解其在蜡梅花不同发育阶段的表达情况。结果表明,在蜡梅初开花被片、花芽中分别有特异表达的片段与玉米淀粉去分支酶基因(*Zpu1*)、欧洲山杨纤维素合成酶基因(*CesA4*)具有较高的相似性;在蜡梅花芽及初开、盛开花朵中有特异表达的片段与小麦多酚氧化酶基因(*PPO*)有较高相似性,这一片段在衰老花被片中不表达;另有一片段与玉米抗锈病基因(*RP3-1*)相似性高,在蜡梅花发育各阶段有不同程度表达。这些基因可能与蜡梅花发育和抗性表现有密切联系。

玉米淀粉去分支酶由*Zpu1*基因编码,在淀粉的合成过程中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。植物体中存在着众多种类的纤维素合成酶,它们催化合成的 $\beta$ -1,4糖苷链构成了植物细胞壁中含量最丰富的纤维素组分。根据本试验结果以及蜡梅花开放的生理过程,笔者推测,蜡梅是落叶灌木且花期是冬季,从蕾期到

开放的过程中,花瓣明显、迅速增大,所以在蕾期的时候,对构成细胞壁的主要成分——纤维素需求量急剧增加,导致纤维素合成酶基因(*CesA4*)大量表达;又由于蜡梅此时处于落叶期,不能继续生成游离的单糖分子,这种情况可能激发了淀粉脱分支酶基因表达,将多糖降解,所得产物用以生成纤维素,保证花被片的正常增大。

植物在长期进化中,形成了一系列防御机制来抵抗各类病原物入侵,其中抗病*R*基因发挥着关键作用。*R*基因以基因家族的形式存在,通常成簇排列从而形成复杂的结构。对玉米抗病基因的一致性图谱的研究表明,玉米抗锈病基因*Rp3*是1个抗病主基因,位于3号染色体着丝粒附近的抗性基因群中<sup>[19]</sup>。蜡梅的抗病性很强,病虫害少,同源比对出的玉米抗锈病蛋白(RP3-1)可能与蜡梅的抗病机理有关。

多酚氧化酶(PPO)广泛存在于植物中,也与抗性密切相关。很多植物的抗性品系PPO活性比敏感品系高,感染后抗性品系的PPO活性增高的速率要比敏感性品系快<sup>[20]</sup>。它通常在幼嫩组织活性高,而在衰老部位活性低。本研究中,多酚氧化酶基因类似片段在蜡梅花芽期、初开期、盛花期均有表达,在衰老花被片中没有检测到表达,与前人研究所得PPO活性规律相符。

本研究通过cDNA-SRAP技术,分离了蜡梅花发育不同时期差异表达基因片段,并结合RT-PCR技术对进行了基因表达分析及功能预测,初步得到了与蜡梅抗性及花发育关系密切的基因片段。其确切功能有待通过RACE技术得到全长,进一步做基因功能验证进行确定。

### 参 考 文 献

- [1] ZHANG S, WEI Y, LIU J, et al. An apoplastic chitinase CpCHT1 isolated from the corolla of wintersweet exhibits both antifreeze and antifungal activities[J]. *Biologia Plantarum*, 2011, 55(1): 141-148.
- [2] 周明芹, 陈龙清. 蜡梅花色素种类的初步分析[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(1): 107-110.
- [3] XIANG L, ZHAO K G, CHEN L Q. Molecular cloning and expression of *Chimonanthus praecox* farnesyl pyrophosphate synthase gene and its possible involvement in the biosynthesis of floral volatile sesquiterpenoids[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(10/11): 845-850.
- [4] 刘群, 马婧, 祝钦波, 等. 蜡梅非特异性脂转移蛋白基因*nsLTP*家族3个成员的分子特征及非生物胁迫应答分析[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(6): 1027-1034.

- [5] 睦顺照,李琳莉,祝钦汶,等. 蜡梅凝集素基因克隆及其对蚜虫、蛴螬抗性分析[J]. 中国农业科学,2011,44(2):358-368.
- [6] 谢树章,秦平伟,张迷,等. 蜡梅几丁质酶基因的克隆与原核表达[J]. 林业科学,2009,45(12):36-41.
- [7] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [8] CASTONGUAY Y, CLOUTIER J, BERTRAND A, et al. SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(8): 1611-1619.
- [9] YOUSSEF M, JAMES A C, RIVERA-MADRID R, et al. Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP [J]. Molecular Biotechnology, 2011, 47(3): 189-199.
- [10] 左丹丹,赵海涛,刘春,等. 蜡梅天然群体遗传多样性的 SRAP 标记分析[J]. 园艺学报,2009,36(8):1197-1202.
- [11] DINLER G, BUDAK H. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from *Agrostis* species obtained using sequence related amplified polymorphism [J]. Biochemical Genetics, 2008, 46(9/10): 663-676.
- [12] 吴建明,李杨瑞,王爱勤,等. 利用 cDNA-SRAP 分析赤霉素诱导甘蔗节间伸长的差异表达[J]. 中国农业科学,2010,43(19): 3937-3944.
- [13] 马爱芬,李加纳,谌利,等. 甘蓝型油菜种皮色泽相关基因的 cDNA-SRAP 差异显示[J]. 作物学报,2008,34(3):526-529.
- [14] 张艳欣,张秀荣,车卓,等. 应用 SRAP 标记分析白芝麻核心种质遗传多样性[J]. 中国油料作物学报,2010,32(1):46-52.
- [15] 王强,张新友,汤丰收,等. 基于 SRAP 分子标记的栽培种花生遗传连锁图谱构建[J]. 中国油料作物学报,2010,32(3):374-378.
- [16] 赵永国,危文亮. 利用 SRAP 标记分析油莎豆遗传多样性[J]. 中国油料作物学报,2011,33(4):351-355.
- [17] 桂琴,王嘉璐,伍晓明,等. SRAP-cDNA 方法在植物基因差异表达分析中的应用[J]. 中国油料作物学报,2007,29(4):497-502.
- [18] FUJITA N, TOYOSAWA Y, UTSUMI Y, et al. Characterization of pullulanase (PUL)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(3): 1009-1023.
- [19] 张书红,张世煌,李新海,等. 玉米抗病基因一致性图谱的构建 [J]. 中国农学通报,2007,23(6):601-606.
- [20] 王曼玲,胡中立,周明全,等. 植物多酚氧化酶的研究进展 [J]. 植物学通报,2005,22(2):215-222.

## Using cDNA-SRAP method to isolate gene fragments expressing at different developmental stages of flower of *Chimonanthus praecox*

ZHAO Kai-ge WANG Wen-ying CHEN Long-qing

College of Horticulture and Forestry Sciences /Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Nineteen pairs of cDNA-SRAP primers were designed to amplify cDNA samples of 24 *Chimonanthus praecox* flower buds/tepals representing different developmental stages. The biological functions of a portion of differentially expressed genes were predicted and characterized. The results showed that cDNA-SRAP methods is simple, cheap, effective in generating relatively abundant bands and a valid approach to study differentially expressed genes. It indicated that fragments having high sequence similarity with *Zea mays Zpu1*, *Populus tremuloides CesA4*, *Zea mays RP3-1* and *Triticum aestivum PPO* may play an important role in flower development and resistance to stress.

**Key words** *Chimonanthus praecox*; cDNA-SRAP; differential display; gene expression; developmental stage

(责任编辑:张志钰)