

陈发波,姚启伦,聂术君,等. 利用 *Waxy* 基因检测不同玉米地方品种的遗传差异[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):18-21.

# 利用 *Waxy* 基因检测不同玉米地方品种的遗传差异

陈发波,姚启伦,聂术君,董二飞,程远芳,向顺军

(长江师范学院生命科学与技术学院,重庆涪陵 408100)

**摘要:**为了解我国西南地区不同玉米品种间的遗传多样性,对5份玉米地方品种的 *Waxy* 基因部分编码区核苷酸序列进行克隆、测序及序列比对。结果表明,所选材料的 *Waxy* 基因序列长度约为1370 bp,一致性为96.60%,大于3 bp的插入/缺失有8个。不同地方品种材料间的遗传相似系数在98.7%~99.6%之间,平均遗传相似系数为99.2%,根据聚类图将供试材料分为4类。说明 *Waxy* 基因具有较高的保守性,所选材料间存在一定的遗传多样性,利用 *Waxy* 基因序列可以将不同的玉米地方品种区分开来。*Waxy* 基因序列可作为一种理想的分子标记,用于今后玉米地方品种的研究。

**关键词:** *Waxy* 基因;玉米;地方品种;遗传差异;保护利用

**中图分类号:** S513.032 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0018-04

玉米 (*Zea mays* L.) 是我国除水稻以外的第二大农作物,种植面积约占世界玉米种植面积的20%,总产量仅次于美国。1940年之后,随着杂交育种技术的发展,玉米产量有了较大的提高,但育种工作者在育种工作中对少数固定的玉米品种亲本长期连续自交选择,使玉米之间的遗传差异缩小,遗传多样性也严重退化,导致玉米种质遗传基础出现了“瓶颈”现象<sup>[1]</sup>。例如,美国玉米杂交种亲本完全来源于固定的6~8个原始亲本,我国玉米杂交种亲本也大都来自约20个固定的原始自交系<sup>[2-4]</sup>。有研究发现,我国各地区的玉米地方品种变异程度高,具有丰富的遗传多样性,在育种方面具有较大的利用潜力,保护与利用玉米地方种质资源成为玉米育种工作的重点。西南地区因其独特的地理环境和气候条件仍有大量地方玉米品种,其蕴藏着丰富的遗传多样性,是我国玉米种质资源最丰富的地区之一。蔡一林等就玉米的品质及表型对重庆地区710份地方品种进行了研究,结果表明,各地区不同玉米地方品种间的平均含油率无较大差异,而蛋白质所占比例、株高和雄穗分枝数等表型性状的差异较大,这为该地区玉米地方种质资源的高效管理和合理利用提供了科学依据<sup>[5]</sup>。戴玄等选取武陵山区中具有特殊代表性的玉米地方品种和骨干玉米自交系品种各10个进行研究,结果表明,地方品种比骨干自交系产量更高,抗倒伏及抗病虫害能力更强,这为挖掘、利用优良玉米地方品种种质基础提供了科学依据<sup>[6]</sup>。姚启伦等利用SSR标记技术对四川及重庆玉米地方品种遗传多样性进行比较分析后发现,该地区玉米地方品种存在丰富

的遗传多样性,这为其保护和利用提供了重要理论依据<sup>[7]</sup>。姚启伦等还发现,云南和贵州玉米地方品种在DNA分子水平平均表现出较高的遗传变异特性<sup>[8]</sup>。张燕以西南高山地区的玉米地方品种为材料,采取完全随机抽样调查的方法研究了其碱基对序列之间的差异性,结果表明,西南高山地区的玉米地方品种种质资源丰富,变异度显著,遗传差异大,因此在育种工作中具有较大利用潜力,同时为拓宽种质基础和丰富玉米的遗传多样性提供了可能<sup>[9]</sup>。

目前,鉴定、筛选优良玉米地方种质并在育种中加以利用是解决种质基础狭窄的重要途径之一<sup>[10]</sup>。随着现代生物技术的蓬勃发展,人们可以直接从基因水平研究作物间的遗传差异,指导作物的筛选与利用。许多基因序列已被作为分子标记,用于植物遗传多样性及起源进化的研究。玉米 *Waxy* 基因位于玉米第9染色体9.03位置,编码颗粒凝缩型淀粉合成酶,决定玉米胚乳和花粉中的支链淀粉合成,是决定玉米胚乳淀粉类型和性质的关键基因之一。*Waxy* 基因为单拷贝序列,具有较高的保守性<sup>[11]</sup>。因此,本研究通过对5份玉米地方品种 *Waxy* 基因进行克隆、测序和序列比对,检测西南地区不同玉米品种间的碱基序列差异,探讨将 *Waxy* 基因应用于玉米地方品种遗传差异检测的可能性,以期今后玉米地方品种的保护与利用提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

在西南地区收集5个具有典型地方特色的玉米地方品种作为供试材料,材料编号、名称及收集地见表1。并以NCBI网站所公布的玉米 *Waxy* 基因序列(GenBank 编号为HQ423241.1)为对照。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA提取** 每个品种取15张新鲜单株叶片并混合,采用2×CTAB法提取基因组DNA,并用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测DNA原液的浓度及DNA的完整性。

**1.2.2 *Waxy* 基因的克隆** 根据美国国立生物信息网(CNBI)公布的 *Waxy* 基因碱基序列,采用Primer5.0软件合

收稿日期:2013-10-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31371633);重庆市教育委员会科技计划(编号:KJ121304);重庆市科学技术委员会攻关(编号:CSTC2011AB1022)。

作者简介:陈发波(1981—),男,四川冕宁人,博士,副教授,从事作物遗传育种研究。Tel:(023)72792193;E-mail:chenfabo963@126.com。

通信作者:姚启伦,博士,教授,从事作物遗传育种研究。Tel:(023)72792193;E-mail:yq1641@aliyun.com。

表1 供试材料

材料编号	名称	收集地
1	DP-25	重庆黔江
2	DP-57	重庆涪陵
3	DP-93	四川攀枝花
4	DP-127	云南玉溪
5	DP-145	贵州六盘水

成通用引物序列:F,5' - TCGGAGCTCGACAACATCATGCG - 3'; R,5' - AGGGCGCGCCACGTCTTCC - 3'。对 PCR 程序和体系进行筛选及优化,获得合适的 PCR 反应程序和体系。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行回收。取 5  $\mu$ L 回收液与 pMD19-T 载体连接过夜,加入到 DH52 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞中热击转化,再加入到有氨苄青霉素的 LB 固体培养基中培养 12 ~ 16 h,挑选阳性克隆。用 PCR 鉴定阳性克隆的真实性后,将菌液送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果用 Contig Express 软件进行手工拼接校对,切除载体序列,得到目的基因序列。利用 NCBI 中的 Blast 软件包对 DNA 序列进行比对分析,确认序列的可靠性。

1.2.3 统计分析 将获得的 *Waxy* 基因序列用 Clustalx 1.83 进行多重排定,再使用 DNAMAN 软件进行序列长度变异、插入/缺失分析并进行多重比较,分析不同玉米品种间的遗传差异,探讨 *Waxy* 基因用于玉米地方品种遗传多样性分析的可能性。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 反应程序和体系筛选

PCR 是本试验最重要和最关键的步骤,其中退火温度是 PCR 试验成功的关键。因此,只有筛选出合适的体系和程序才能保证整个试验的成功。根据文献[10]所公布的反应体系和程序,经过多次 PCR 试验,对 *Waxy* 基因的 PCR 程序和体系进行筛选和优化,最终将 *Waxy* 基因 PCR 扩增反应的最适体系确定为 45  $\mu$ L,最适退火温度确定为 64  $^{\circ}$ C (该温度下电泳无杂带),菌液检测体系确定为 15  $\mu$ L。经过优化和筛选后,获得了浓度较高、特异性较强的 PCR 扩增产物。本研究筛选到的 PCR 反应体系、程序见表 2、表 3 和表 4。

表2 45  $\mu$ L PCR 扩增反应体系

编号	名称	用量( $\mu$ L)
1	RNase Free Water	20.0
2	2 $\times$ Taq PCR MasterMix	21.0
3	10 ng/mL 前引物	0.5
4	10 ng/mL 后引物	0.5
5	DNA 稀释液	3.0

以上 PCR 反应程序和体系经电泳检测可知,扩增出来的 PCR 产物电泳效果(图 1)和菌液电泳检测效果(图 2)都较好。

### 2.2 序列对比

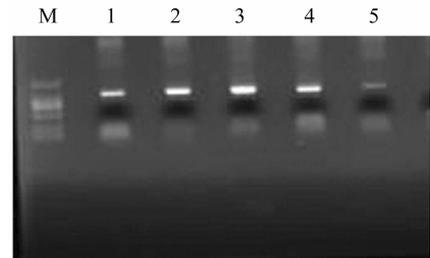
将克隆出的 5 个玉米地方品种材料 *Waxy* 基因序列与 NCBI 网站所公布的玉米 *Waxy* 基因序列(Genbank 编号为 HQ423241.1)进行比对,结果表明,所选 5 个材料 *Waxy* 基因序列长度约为 1 370 bp,6 个序列的一致性为 96.60%,因此

表3 PCR 反应程序

步骤编号	步骤	温度( $^{\circ}$ C)	时间(min)	循环数(次)
1	预变性	94	4	1
2	预变性	80	3	1
3	变性	94	1	35
4	退火	64	2	35
5	延伸	72	2	35
6	延伸	72	10	1
7	保存	10	—	—

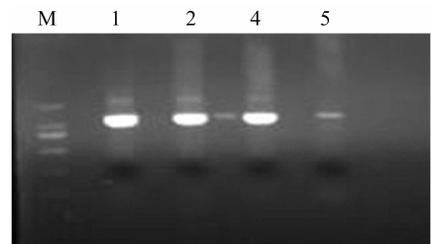
表4 15  $\mu$ L 菌液检测 PCR 反应体系

编号	名称	用量( $\mu$ L)
1	RNase Free Water	4.4
2	2 $\times$ Taq PCR MasterMix	8.0
3	10 ng/mL 前引物	0.3
4	10 ng/mL 后引物	0.3
5	菌液	2.0



M—Marker; 1—DP-25; 2—DP-57; 3—DP-93; 4—DP-127; 5—DP-145

图1 PCR 扩增产物检测结果



注同图1

图2 菌液检测结果

可以确定所克隆出来的 DNA 序列为玉米 *Waxy* 基因序列。由序列比对的结果可以看出,大于 3 bp 的插入/缺失片段主要有 8 个(图 3):(1)发生在 190 ~ 200 bp 之间的插入/缺失 DP-25、DP-127 和 DP-145 均缺失了 GGCGGCTT;(2)发生在 250 ~ 270 bp 之间的插入/缺失 HQ423241.1、DP-57、DP-93(插入了 GTT 序列)以及 DP-25、DP-127、DP-145(插入了 CTT);(3)发生在 410 ~ 430 bp 之间的插入/缺失 HQ423241.1(缺失了 ATAC)以及 DP-25、DP-145(缺失了 TACA);(4)发生在 519 ~ 532 bp 之间的插入/缺失 HQ423241.1、DP-57、DP-93、DP127(插入了序列 GT), DP-25(插入了序列 GTCACGT), DP-145(插入了序列 GTCA);(5)发生在 610 ~ 614 bp 之间的插入/缺失 HQ423241.1、DP57 和 DP-93 缺失了序列 AATC;(6)发生在

780 ~ 790 bp 之间的插入/缺失 DP - 127 (插入了序列 CACG)、DP - 25 (插入了序列 GC)、DP - 145 (插入了序列 G);(7)发生在 906 ~ 912 bp 之间的插入/缺失 HQ423241.1、DP - 25、DP - 93、DP - 145 (缺失了碱基 T),DP127 (插入了碱基 ACGA);(8)发生在 1 040 ~ 1 052 bp 之间的插入/缺失

HQ423241.1、DP - 93 (插入了碱基 T),DP - 57 (插入了序列 AT),DP - 127 (插入了序列 TGCGAT),DP - 25 (插入了序列 TGA)。通过对 6 个序列的比对结果发现,不同玉米地方品种间 *Waxy* 基因序列存在一定的遗传变异性,说明 *Waxy* 基因序列可用于玉米地方品种遗传多样性、分子进化等方面的研究。

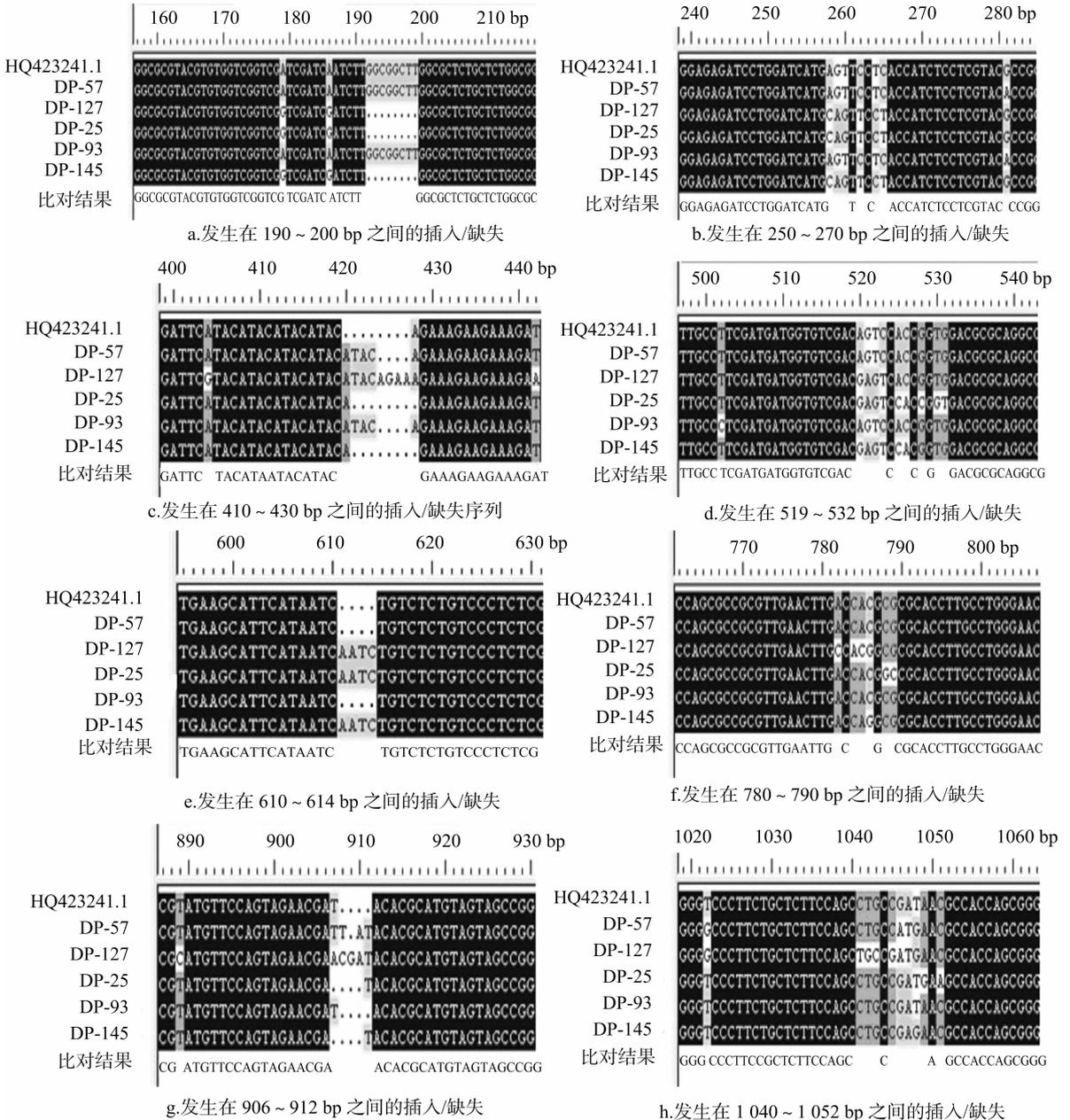


图3 6个 *Waxy* 基因序列比对部分结果

### 2.3 供试材料的遗传多样性分析

利用 DNAMAN 软件对材料间的遗传多样性进行分析,结果(表 5)表明,6 个材料间的遗传相似系数在 98.7% ~ 99.6% 之间,平均遗传相似系数为 99.2%。其中,DP - 127 与 DP - 93 之间的遗传相似系数最小,为 98.7%;DP - 57、DP - 25 与 HQ423241.1 之间的遗传相似系数最大,均为 99.6%。

### 2.4 聚类分析

根据遗传相似系数进行聚类分析,结果见图 4。由图 4

可以看出,6 个材料划分为 4 类,HQ423241.1 与 DP - 57 遗传距离较小,亲缘关系较近,可划分为第 I 类;DP - 93 划分为第 II 类;DP - 127 划分为第 III 类;DP - 25 与 DP - 145 之间的亲缘关系较近,划分为第 IV 类。说明利用 *Waxy* 基因序列可以将不同的玉米地方品种区分开来。

### 3 结论与讨论

一个玉米类群的遗传多样性反映了该类群的遗传差异和变异。遗传多样性越丰富,则说明类群的遗传差异越大,变异

表5 6个材料的遗传相似系数

材料	遗传相似系数(%)					
	DP-57	DP-127	DP-25	DP-93	DP-145	HQ423241.1
DP-57	100.0					
DP-127	99.0	100.0				
DP-25	99.2	99.3	100.0			
DP-93	99.5	98.7	99.0	100.0		
DP-145	99.2	99.3	100.0	98.9	100.0	
HQ423241.1	99.6	99.3	99.6	99.4	99.5	100.0

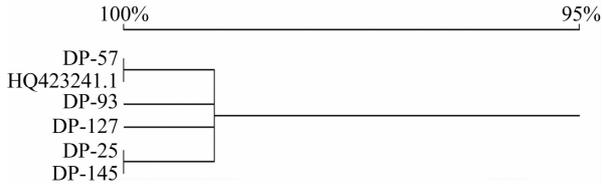


图4 6个玉米品种间的聚类结果

性越强,其中蕴藏的可供育种选择利用的潜能就越大。本研究采用 DNAMAN 软件对供试的 5 个玉米地方品种的 *Waxy* 基因序列进行对比,结果发现,虽然 *Waxy* 基因为保守基因且相似度较高,但仍然存在 8 个变异区间,表明 5 个地方品种中存在一定的遗传多样性,这与蔡一林等对西南地区玉米地方品种研究结论<sup>[5-9]</sup>一致,在今后玉米育种中应加强这一地区玉米地方种质资源的鉴定与利用。

*Waxy* 基因作为单拷贝基因,序列相对保守,可作为分子系统学研究的重要分子标记,已用于检测植物间的遗传差异及系统进化关系。田孟良等对我国西南地区 23 份糯玉米品种的 *Waxy* 基因序列多态性进行了分析,结果发现,我国糯玉米的核苷酸多态性较低,因此他们提出了育种工作应从近缘物种中引入等位变异以提高玉米产量和淀粉质量的观点<sup>[11]</sup>。赵耀等对玉米 *Waxy* 基因密码子偏好性和玉米 GBSS I 蛋白编码基因的密码子偏好性进行分析,并将 *Waxy* 基因的密码子用法与真核表达系统、酵母两类普遍采用的原核、大肠杆菌的密码子偏好性进行比较,得出了“通过对密码子偏好性分析可为基因表达选择适宜的表达式”的结论,同时也为密码子的改造、增加基因的表达量提供了较可靠的依据<sup>[12]</sup>。但是,真正将 *Waxy* 基因序列运用于玉米种质改良的实例还不多。虽然玉米地方品种中蕴藏着巨大的遗传变异性,但由于玉米地方品种繁多且许多品种间的亲缘关系较近,不易利用常规分子标记分析一系列品种间的遗传差异。本研究通过对 6 个序列的比对结果发现,不同玉米地方品种间 *Waxy* 基因序列存在一定的遗传变异性,说明 *Waxy* 基因序列可用于玉米地方品种遗传多样性、分子进化等方面的研究。

另外,笔者所在的课题组只选择了 5 个地方玉米品种作为试验材料并对其 *Waxy* 基因进行克隆和序列比对。因此,无法避免数据的片面性,在今后的研究中须要利用 *Waxy* 基

因序列检测更多的玉米地方品种,以充分利用这些材料。通过与 NCBI 中公布的序列进行比对可以看出,所选材料中的 *Waxy* 基因序列与公布的序列有较高的一致性,进一步证明 *Waxy* 基因具有较高的保守性,同时也存在一定的遗传变异位点。说明 *Waxy* 基因具有较高的保守性,所选材料间 *Waxy* 基因序列存在一定的遗传多样性,*Waxy* 基因序列可作为一种理想的分子标记用于今后玉米地方品种的研究。

#### 参考文献:

- [1] 曾三省. 中国玉米杂交种的种质基础[J]. 中国农业科学,1990,23(4):1-9.
- [2] 吴绍骞,王茂华. 作物品种资源研究[M]. 北京:农业出版社,1984:174-180.
- [3] 彭泽斌,张世煌,刘新芝. 我国玉米种质的改良创新与利用[J]. 玉米科学,1997,5(2):5-8.
- [4] 王懿波,王振华,王永普,等. 中国玉米主要种质杂交优势利用模式研究[J]. 中国农业科学,1997,30(4):17-25.
- [5] 蔡一林,刘志斋,王天宇,等. 国内部分玉米地方品种的品质与农艺性状的表型多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(1):31-36.
- [6] 戴玄,姚启伦,李昌满,等. 武陵山区玉米地方品种的评价与利用研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2004,26(2):210-213.
- [7] 姚启伦,许江,许冬梅,等. 四川及重庆玉米地方品种遗传多样性的比较分析[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(1):6-12.
- [8] 姚启伦,杨克诚,潘光堂,等. 云南和贵州玉米地方品种遗传多样性的比较分析[J]. 云南大学学报:自然科学版,2008,30(4):408-414.
- [9] 张燕. 西南高原生态区玉米地方种质表型多样性分析[J]. 河南农业科学,2012,41(7):17-20.
- [10] 程玉静,薛林,白善军,等. 玉米耐盐性种质挖掘与滩涂种植鉴定[J]. 江苏农业科学,2012,40(1):88-90.
- [11] 田孟良,黄玉碧,谭功燮,等. 西南糯玉米地方品种 *Waxy* 基因序列多态性分析[J]. 作物学报,2008,34(5):729-736.
- [12] 赵耀,刘汉梅,顾勇,等. 玉米 *Waxy* 基因密码子偏好性分析[J]. 玉米科学,2008,16(2):16-21.