

陈明辉, 张志录, 杨雨华, 等. 红豆杉种质资源遗传多样性的目标起始密码子多态性(SCoT)分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 116–119. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.028

红豆杉种质资源遗传多样性的目标起始密码子多态性(SCoT)分析

陈明辉, 张志录, 杨雨华, 佟伟霜, 杨风岭

(平顶山学院, 河南平顶山 467000)

摘要:采用目标起始密码子多态性(SCoT)分子标记技术, 研究红豆杉 18 份种质的遗传多样性及种质间的遗传关系, 为红豆杉资源的保护、利用以及遗传育种提供依据。以 18 份红豆杉种质资源为材料, 从 80 条引物中筛选出 19 条重复性好、条带清晰的引物进行 PCR 扩增, 利用 NTSYS-pc2.10e 软件对其扩增位点多态性进行分析。结果表明: 19 条引物共扩增出 134 条带, 其中 97 条具有多态性, 多态性带比率为 72.39%。18 个红豆杉种质间遗传相似系数在 0.31~0.89 之间, 说明 SCoT 标记能够揭示材料间较高的遗传多样性。利用 UPGMA 进行系统的聚类分析显示, 在相似系数 0.53 处可将 18 份红豆杉资源分成两大类; 主坐标分析结果与聚类分析结果相一致。红豆杉资源具有较丰富的遗传多样性, SCoT 分子标记技术可有效地从分子水平揭示红豆杉种质资源的遗传背景和亲缘关系。

关键词: 红豆杉; 目标起始密码子多态性(SCoT); 遗传多样性; 聚类分析; 亲缘关系

中图分类号: S791.490.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0116-04

红豆杉[*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.] 是第四纪孑遗植物, 已在地球上生活 250 万年, 是我国 I 级重点保护野生植物, 被称为活化石^[1-2]。1971 年, 美国科学家 Wani 等首次从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*) 树皮中提取获得抗癌药物紫杉醇(Taxol)^[3], 此后红豆杉的药用价值及其开发在我国广泛开展。红豆杉生长缓慢, 极少成林, 资源极其贫乏, 而且紫杉醇含量仅为 0.01%, 由于红豆杉资源遭到严重破坏而数量急剧下降, 目前天然红豆杉已处于严重濒危状态; 所以, 关于红豆杉的繁殖、保护与利用已成为当前多个学科的研究热点^[4-11]。

目前红豆杉分子标记研究取得了一定的成果。张雪梅等

通过对南方红豆杉 18 个居群进行了 RFLP 分析, 发现南方红豆杉现在的遗传结构可能源于居群的片段化效应^[12]; Miao 等利用 SSR 技术对 14 个居群的南方红豆杉生境断裂谱系和遗传效应进行了研究, 结果发现生境断裂导致了云南红豆杉近亲繁殖和种群分化^[13]; 吴琼等利用基于红豆杉转录组进行高通量测序进而发掘基因表达谱多态性标记^[14]。但这些分子标记方法成本较高, 操作复杂。目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT) 分子标记技术是 Collard 等^[15]开发的一种基于 SPAR(单引物扩增反应)的目的基因分子标记新技术。SCoT 依据植物基因中的 ATG 翻译起始位点侧翼序列的保守性, 设计单引物并对基因组进行扩增^[16]。SCoT 标记结合 ISSR 标记和 RAPD 标记的优点, 操作简单、成本低廉、多态性丰富, 能有效地产生与性状联系的标记, 是一种能跟踪性状的新的分子标记, 有利于分子辅助育种^[17-18]。该分子标记技术已被成功应用于花生^[19]、龙眼^[20]、芒果^[21-22]等植物。本研究利用 SCoT 分子标记技术, 从 DNA 水平研究了红豆杉 18 份种质的遗传多样性及种质间的遗传关系, 以期对其亲缘关系有更全面了解, 为资源的保护、利用以及遗传育种提供依据。

收稿日期: 2015-09-25

基金项目: 河南省科学攻关计划(编号: 122102310652); 河南省环境科学重点学科建设项目(编号: Pxy-zdxk-2013003)。

作者简介: 陈明辉(1974—), 男, 河南平顶山人, 博士, 讲师, 主要从事植物生理生化及分子生物学研究。E-mail: cmh_abc@126.com。

通信作者: 杨风玲, 博士, 教授, 主要从事植物化学研究。E-mail: yangfl0001@163.com。

- and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum[J]. Nature Genetics, 2007, 39(9): 1156–1161.
- [9] Hou J N, Long Y, Raman H, et al. A Tourist-like MITE insertion in the upstream region of the *BnFLC. A10* gene is associated with vernalization requirement in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 463–480.
- [10] Li J T, Wang Z Z, Peng H R, et al. A MITE insertion into the 3'-UTR regulates the transcription of *TaHSP16.9* in common wheat[J]. Crop Journal, 2014, 2(6): 381–387.
- [11] 李静婷, 王健胜, 杨风玲. 小麦 MITE 转座子对 *sHSP* 基因的表达调控研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 29–32.

- [12] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002.
- [13] 侯福林. 植物生理学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [14] 叶凡, 侯喜林, 袁建玉. 高温胁迫对不结球白菜幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化作用的影响[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(2): 154–156.
- [15] 彭华婷, 高悦, 杜红梅, 等. 高温胁迫对大花三色堇幼苗相关生理指标的影响[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(6): 66–71.
- [16] 万里强, 李向林, 何峰, 等. 热胁迫下两种禾草抗性生理指标的变化[J]. 西南农业学报, 2012, 25(4): 1468–1472.

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为 2013—2014 年采自不同地区的 18 份红豆杉种质资源(表 1),取其幼嫩叶片迅速置于液氮中速冻,带回实验室后置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。试验用的 80 对 SCoT 分子标记引物序列分别参照 Collard 等^[15] 和 Luo 等^[22] 设计的引物合成,所有引物由上海生工生物工程公司合成。dNTPs、DL2000 marker 和 *Taq* DNA 聚合酶以及其他试剂均购自天根生化科技(北京)有限公司。

表 1 红豆杉试验材料及来源

编号	名称	采集地点
1	神龙湾	山西省平顺县
2	双底	山西省陵川县
3	获嘉	河南省获嘉县
4	黑龙沟	河南省济源市
5	西坪	河南省济源市
6	柴家沟	河南省卢氏县
7	平顶山-1	河南省平顶山市
8	平顶山-2	河南省平顶山市
9	石鼓	河南省南召县
10	毛河	河南省卢氏县
11	尧山	河南省鲁山县
12	宣恩	湖北省宣恩县
13	北禅-1	甘肃省徽县
14	北禅-2	甘肃省徽县
15	天水	甘肃省天水市
16	两当	甘肃省两当县
17	贵阳	贵州省贵阳市
18	猫儿山	重庆猫儿山

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 采用改良的 CTAB 法^[23] 提取 DNA,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,同时用岛津 BioSpec-nano 型超微量分光光度计分析仪检测 DNA 样品质量和浓度。模板 DNA 稀释至 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$,置于 -20°C 保存备用。

1.2.2 SCoT-PCR 扩增 PCR 扩增在 ABI Veriti 梯度 PCR 扩增仪上进行。采用 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的反应体系,其中含 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 模板 DNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{buffer}$ (含 Mg^{2+}) $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 5 U Taq DNA 聚合酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ dNTPs $0.5\text{ }\mu\text{L}$,加 ddH_2O 至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增程序为 94°C 预变性 4 min ; 95°C 变性 50 s ,复性退火(温度随引物而定) 1 min , 72°C 延伸 5 min ,共 36 个循环; 72°C 延伸 8 min 。扩增反应结束后,取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$,染色后在紫外凝胶成像系统上拍照保存。

1.3 数据统计与分析

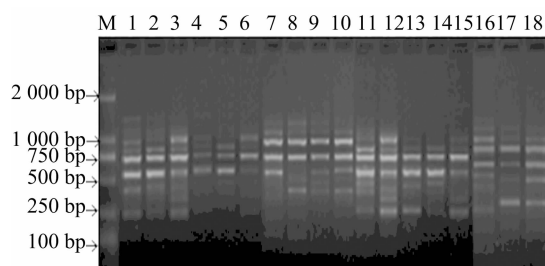
SCoT 产物按条带的有无分别赋值,在相同迁移位置有带记为 1,无带记为 0,建立 SCoT 标记的 0、1 矩阵。把得到的 0、1 矩阵输入 NTSYS-pc2.10e 计算遗传相似性系数,并进行 UPGMA 聚类分析,构建树状图,分析样品间亲缘关系。利用 NTSYS-pc2.10e 软件将遗传相似系数进行 Dcenter 数据转化,求其特征量和特征向量,得到主坐标分析图,进行主坐标

分析。

2 结果与分析

2.1 SCoT 扩增片段多态性分析

从 80 条引物中筛选出重复性好、扩增条带清晰、多态性强的 SCoT 引物 19 条。利用这 19 条引物对 18 份红豆杉种质资源进行扩增,每条引物可扩增出 4~14 条带,平均多态性条带为 5~10 条。扩增出的 DNA 带的大小介于 $100\sim1\,800\text{ bp}$,其中代表性扩增图谱见图 1。19 条引物共扩增出 134 个 DNA 位点,其中 97 个位点具有多态性,多态性比例为 72.4%,说明供试的样品遗传多样性比较丰富,多态性最高的是引物 SCoT8 和 SCoT31,均达到 100%,多态性最低的是引物 SCoT17,为 42.86%(表 2)。



M—DL2000; 1~18—材料编号同表 1

图 1 引物 SCoT24 对 18 份红豆杉种质 PCR 扩增结果

表 2 SCoT 扩增结果统计

引物名称	引物序列 (5'→3')	总条带数	多态性条带数	多态性比率(%)
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCA	4	3	75.00
SCoT5	CAACAATGGCTACCACCG	6	4	66.67
SCoT6	CAACAATGGCTACCACCT	8	7	87.50
SCoT8	CAACAATGGCTACCACCG	4	4	100.00
SCoT10	CAACAATGGCTACCACCT	7	5	71.43
SCoT11	CAACAATGGCTACCACGA	10	8	80.00
SCoT14	ACCATGGCTACCACCGGC	9	5	55.56
SCoT17	ACGACATGGCGACCCACA	7	3	42.86
SCoT19	AACCATGGCTACCACCAC	5	3	60.00
SCoT24	ACCATGGCTACCACCGTG	5	4	80.00
SCoT27	CCATGGCTACCACCGGCC	8	6	75.00
SCoT31	CAACAATGGCTACCAGCA	7	7	100.00
SCoT35	CAACAATGGCTACCACCA	11	8	72.73
SCoT36	CAATGGCTACCACTAGCC	9	5	55.56
SCoT42	ACAATGGCTACCACTGGC	5	3	60.00
SCoT44	ACAATGGCTACCACTGCG	10	7	70.00
SCoT51	ACAATGGCTACCACTACG	6	5	83.33
SCoT55	ACGACATGGCGACCAACG	8	6	75.00
SCoT59	ACGACATGGCGACCATCG	5	4	80.00
平均		7.05	5.1	73.19
总计		134	97	

2.2 相似系数分析

用 NTSYS-pc2.10e 软件计算红豆杉种质间的 Jaccard 遗传相似系数(表 3)。表 3 结果表明:18 个不同地区红豆杉种质间的遗传相似系数范围在 0.31~0.89 之间。其中河南济源黑龙沟的 4 号与河南济源西坪村的 5 号相似系数为 0.89,河南卢氏县柴家沟的 6 号与河南卢氏县毛河村的 10

号、甘肃徽县北禅寺-2 的 14 号的相似系数都为 0.89,表明 4 号与 5 号、6 号与 10 号、6 号与 14 号的亲缘关系较近。河南获嘉县的 3 号与重庆猫儿山的 18 号相似系数为最小,为 0.31,说明 3 号与 18 号亲缘关系最远。

表 3 18 份红豆杉种质间的 Jaccard 遗传相似系数

材料编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1.00																	
2	0.78	1.00																
3	0.83	0.72	1.00															
4	0.43	0.56	0.52	1.00														
5	0.45	0.47	0.63	0.89	1.00													
6	0.61	0.63	0.54	0.62	0.64	1.00												
7	0.53	0.55	0.52	0.88	0.77	0.65	1.00											
8	0.80	0.82	0.67	0.50	0.53	0.69	0.64	1.00										
9	0.32	0.44	0.38	0.87	0.76	0.65	0.78	0.38	1.00									
10	0.51	0.54	0.42	0.74	0.71	0.89	0.73	0.58	0.70	1.00								
11	0.62	0.63	0.67	0.76	0.84	0.68	0.61	0.59	0.65	0.67	1.00							
12	0.52	0.62	0.56	0.83	0.71	0.48	0.72	0.45	0.73	0.56	0.68	1.00						
13	0.40	0.47	0.63	0.67	0.78	0.85	0.55	0.53	0.66	0.74	0.72	0.50	1.00					
14	0.54	0.64	0.44	0.71	0.62	0.89	0.73	0.58	0.70	0.87	0.67	0.57	0.72	1.00				
15	0.63	0.60	0.55	0.35	0.37	0.78	0.36	0.56	0.34	0.67	0.53	0.32	0.66	0.67	1.00			
16	0.66	0.56	0.50	0.67	0.69	0.85	0.76	0.73	0.55	0.83	0.74	0.54	0.67	0.81	0.64	1.00		
17	0.56	0.57	0.61	0.84	0.78	0.63	0.79	0.50	0.77	0.65	0.60	0.72	0.67	0.62	0.53	0.56	1.00	
18	0.36	0.51	0.31	0.75	0.74	0.78	0.60	0.58	0.73	0.88	0.67	0.56	0.70	0.78	0.65	0.73	0.61	1.00

2.3 聚类分析

根据遗传相似系数,采用 UPGMA 系统聚类法构建了红豆杉试材间的遗传关系聚类图(图 2)。从聚类图(图 2)来看,在相似系数 0.53 为阈值时,可将所有供试材料分为 I 和 II 两大类。I 类包括 4 份材料,分别为神龙湾的 1 号、双底村的 2 号、获嘉县的 3 号和平顶山-2 的 8 号;II 类包括 14 份材

料。在阈值约为 0.61 时,II 类又可分成 II a 和 II b 两个亚类,其中 II a 亚类包括黑龙沟的 4 号、西坪村的 5 号、平顶山-1 的 7 号、石鼓村的 9 号、宣恩县的 12 号、贵阳的 17 号等 6 份材料;II b 亚类包括柴家沟的 6 号、毛河村的 10 号、尧山的 11 号、北禅寺-1 的 13 号、北禅寺-2 的 14 号、天水的 15 号、两当县的 16 号、猫儿山的 18 号等 8 份材料。

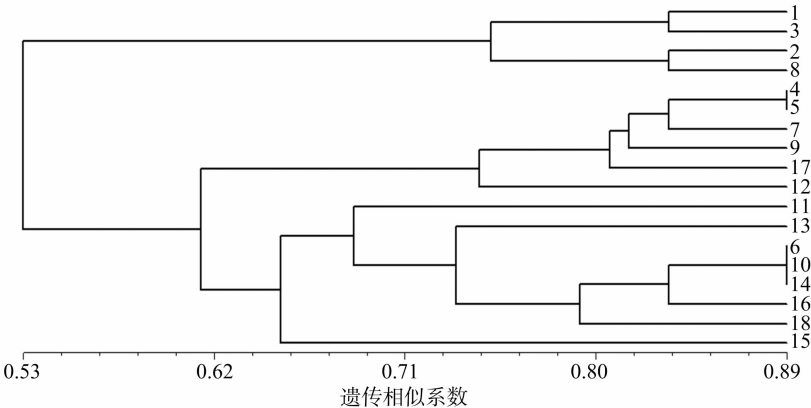


图2 18 份红豆杉种质 SCoT 标记聚类分析

2.4 主坐标分析

根据 18 份红豆杉材料 SCoT 标记产生的数据进行主坐标分析,绘制三维散点图(图 3)。从主坐标图(图 3)可看出,18 份红豆杉材料被分为 3 组,第 1 组为 1 号、2 号、3 号和 8 号,位于主坐标图的右方;第 2 组为 4 号、5 号、7 号、9 号、12 号和 17 号,位于主坐标图的左方;第 3 组为 6 号、10 号、11 号、13 号、14 号、15 号、16 号和 18 号,分布在主坐标图的中间偏下方。其中第 2、3 组距离相对较近,它们与第 1 组距离较远,但第 3 组的 15 号与第 1 组距离较近。主坐标分析结果显示,第 1 组红豆杉与第 2、3 组红豆杉在分子水平上表现出了较大的遗传差异,主坐标分析可以从不同方向、不同层面更加直观地

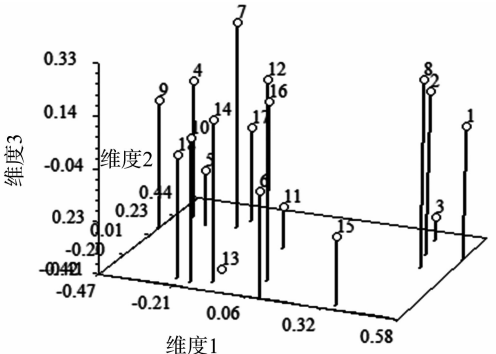


图3 18 份红豆杉种质资源主坐标分析三维散点图

显示各材料间的关系。

3 结论与讨论

SCoT 标记是一种基于翻译起始位点的目标分子标记新技术,SCoT 单引物在 PCR 反应中充当上下游引物的角色,从而使得引物结合位点之间的片段得以有效扩增,可获得丰富的遗传信息^[24-25],所以其在红豆杉的遗传多样性和亲缘关系分类上具有一定的可靠性。本研究将 SCoT 标记技术应用于红豆杉材料的 DNA 多态性鉴定,在红豆杉各材料内均检测到较丰富的多态性,选用的 19 条 SCoT 引物具有很高的多态性,平均多态率达到 73.19%。SCoT 标记与功能基因相关,能在红豆杉各材料之间检测出较丰富的遗传多态性,这与红豆杉各资源间具有较丰富的多态性相一致,是进一步开发特定功能基因标记和建立分子标记辅助育种技术体系的基础。

从本试验聚类结果可以看出,在 I 组的 4 个红豆杉材料中,8 号平顶山-2 红豆杉经中国科学院植物研究所鉴定为东北红豆杉,这 4 份红豆杉材料聚为一个类群,说明它们亲缘关系较近,同属于东北红豆杉体系;在第 II 类的 II a 亚类中,有 6 份红豆杉材料聚为一个类群,其中 7 号平顶山-1 和 9 号石鼓村红豆杉经中国科学院植物研究所鉴定为南方红豆杉,说明这个类群中的 6 份红豆杉和南方红豆杉具有密切的渊源,构成独特的遗传资源。在第 II 类的 II b 亚类中,有 8 份红豆杉材料聚为一个类群,其中 6 号柴家沟红豆杉经中国科学院植物研究所鉴定为中国红豆杉,说明这个类群中的 8 份红豆杉和秦岭一带的中国红豆杉遗传关系较近。

由以上分析可知,本试验的 SCoT 分子标记数据在一定程度上反映了不同材料红豆杉地理分布情况,说明地理因素对红豆杉的亲缘关系有很大影响;但是,有些地理距离远而遗传距离却比较相近,这可能与具有相似的环境条件和常年的引种有关。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴:第 1 册[M]. 北京:科学出版社,1972:332.
- [2] 李先琨,向悟生,欧祖兰,等. 濒危植物南方红豆杉种群克隆生长空间格局与动态[J]. 云南植物研究,2003,25(6):625-632.
- [3] Wani M C, Tayl H L, Wan M E, et al. Plant antitumor agent; The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. American Chem Soci, 1971, 93(2): 2325-2327.
- [4] 臧敏,卞新民. 江西三清山珍稀濒危植物考察研究[J]. 武汉植物学研究,2003,21(6):515-520.
- [5] Zhou Q X, Ge S, Yue Z S, et al. Genetic variation and relationships within *Taxus* and between the genus and *Pseudotaxus* in China[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1998, 36(4):323-332.
- [6] 李乃伟,贺善安,束晓春,等. 基于 ISSR 标记的南方红豆杉野生种群和迁地保护种群的遗传多样性和遗传结构分析[J]. 植物资源与环境学报,2011,20(1):25-30.
- [7] 李乃伟,束晓春,何树兰,等. 南方红豆杉的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 西北植物学报,2010,30(12):2536-2541.
- [8] 王艇,苏应娟,黄超. 红豆杉科及其相关类群的 RAPD 分析[J]. 中山大学学报,2000,39(5):129-130.
- [9] 王誉茜,姜卫兵,魏家星. 红豆杉在城乡园林绿化中的开发应用[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):180-183.
- [10] 赵赞鑫,张欢,邓百万,等. 红豆杉内生真菌产紫杉醇的培养基优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):389-392.
- [11] 谢美华,李霖,李雪玲,等. 云南红豆杉叶斑病原菌的分离鉴定和生物学特性[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):146-149.
- [12] 张雪梅,李德铎,高连明. 南方红豆杉谱系地理学研究[J]. 西北植物学报,2012,32(10):1983-1989.
- [13] Miao Y C, Lang X D, Zhang Z Z, et al. Phylogeography and genetic effects of habitat fragmentation on endangered *Taxus yunnanensis* in southwest China as revealed by microsatellite data[J]. Plant Biol, 2014, 16(2):365-374.
- [14] 吴琼,段小群,陈旭,等. 基于高通量测序的红豆杉 EST-SSRs 标记研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(24):3728-3733.
- [15] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism; a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27(1): 86-93.
- [16] 熊发前,唐荣华,陈忠良,等. 目标起始密码子多态性(SCoT):一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术[J]. 分子植物育种,2009,7(3):635-638.
- [17] Andersen J R, Lubberstedt T. Functional markers in plant[J]. Trends Plant Sci, 2003, 8(11):554-560.
- [18] 陆才瑞,喻树迅,于霁雯,等. 功能型分子标记(ISAP)的开发及评价[J]. 遗传,2008,30(9):1207-1216.
- [19] 熊发前,蒋蓓,钟瑞春,等. 目标起始密码子多态性(SCoT)分子标记技术在花生属中的应用[J]. 作物学报,2010,36(12):2055-2061.
- [20] 陈虎,何新华,罗聪,等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析[J]. 园艺学报,2010,37(10):1651-1654.
- [21] Luo C, He X H, Chen H, et al. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers[J]. Biochem Syst Ecol, 2010, 38(6):1176-1184.
- [22] Luo C, He X H, Chen H, et al. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39(4/5/6):676-684.
- [23] 刘杰,高连明. 红豆杉属植物三种不同总 DNA 提取方法的分析比较[J]. 广西植物,2011,31(2):244-249.
- [24] 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]. Theor Appl Genet, 2001, 103(2/3):455-461.
- [25] Hu J, Vick B A. Target region amplification polymorphism; a novel marker technique for plant genotyping[J]. Plant Mol Bio Rep, 2003, 21(3):289-294.