

余青青,王普昶,赵丽丽,等. 7 个燕麦品种的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):34-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.008

7 个燕麦品种的 ISSR 遗传多样性分析

余青青¹, 王普昶², 赵丽丽¹, 陈 超¹, 唐华江¹, 李继伟³

(1. 贵州大学动物科学学院草业科学系, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省草业研究所, 贵州贵阳 550006;
3. 北京佰青源畜牧业科技发展有限公司, 北京 100020)

摘要:利用 ISSR 分子标记技术对贵州引种的 7 个燕麦品种进行遗传多样性分析。从 50 条引物中筛选出 17 条作为燕麦 ISSR 引物,总共扩增出 204 条条带,平均每个引物扩增出 12 条条带,其中具有多态性的条带有 103 条,平均每个引物扩增出多态性条带 6.06 条,多态性比率为 50.49%。用 Popgene32 软件计算出 7 个供试燕麦品种的遗传相似系数(GS)为 0.855~0.945,变幅为 0.09。其中,加燕 2 号和 Hay Wire 二者之间的遗传相似系数最大(0.945),亲缘关系较近,遗传差异最小;甘早和青海白燕麦遗传相似系数最小(0.855),亲缘关系较远,遗传差异最大,存在较高的遗传多样性。研究结果为贵州燕麦品种培育提供理论依据。

关键词:燕麦;品种;ISSR;遗传多样性;聚类分析;遗传相似系数

中图分类号: S512.603 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0034-03

燕麦(*Avena sativa* L.)别称玉麦,属禾本科(*Gramineae*)燕麦族(*Aveneae* Dumort)燕麦属(*Avena* L.),是重要的 1 年生牧草、饲料和粮食作物,为自花授粉植物^[1],主要分布在北半球温带地区的北美、欧洲、东部亚洲和大洋洲,播种面积和总产量仅次于小麦、水稻、玉米、高粱和大麦^[2]。燕麦主要分为 2 种,一种是裸燕麦,是主要的粮食作物,且具有重要的药用价值;另一种是皮(有壳)燕麦,含有丰富的营养价值,主要是饲用。燕麦的蛋白质、脂肪、矿质元素和维生素均高于小麦、水稻、玉米、高粱和大麦,钙、磷、铁、维生素 E 和赖氨酸的含量也都超过了其他谷类作物^[3]。

饲用燕麦是高寒牧区人工草地广泛种植的 1 年生草料兼用作物,具有适应性强、容易种植和饲用价值高等特点,在维系高寒牧区家畜越冬和抗灾保畜中发挥着重要的作用。在贵州,饲用燕麦的生长旺季是晚秋和冬春季,具有生长快、籽实产量高等特点,是解决贵州省草地生态畜牧业冬春季节饲草料短缺的优质牧草。但长期以来,贵州省缺乏当家燕麦品种,推广的品种主要从青海、甘肃、加拿大等地购进,所购进品种在该地适应性差、生产性能不稳定。且从外地购种影响因素较多,价格高,难以保证有长期、稳定、廉价的燕麦品种为农户所用,导致燕麦种子供不应求。因此,培育出适宜当地生长的早熟、高产、优质饲用燕麦新品种就显得尤为重要。

遗传多样性不仅仅表现在表型性状上的差异,更重要的是表现在蛋白质、染色体和 DNA 水平上的差异。分子标记的发展为从 DNA 水平检测品种及品系间的遗传多样性提供了

有利的工具。ISSR 技术是由 Zietkiewicz 等创建的一种新型的微卫星类分子标记技术,具有多态性、可重复性、低成本、易操作以及无须知道基因组序列等优点,广泛应用于多种作物和部分牧草的品种鉴定、系统分类、遗传多样性检测、基因定位和遗传图谱构建等研究^[4-6]。因此,本试验利用 ISSR 分子标记的方法对 7 个皮燕麦品种进行遗传多样性分析,研究不同品种之间的遗传差异,为饲用燕麦在贵州引种、遗传改良、品种培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料分别为甘早、Baler、加燕 2 号、青海白燕麦、Hay Wire、青引 2 号、甜燕 2 号,均由北京佰青源畜牧业科技发展有限公司提供。材料原产地及编号见表 1。

表 1 试验材料编号及原产地

编号	品种	原产地
1	甘早	甘肃山丹
2	Baler	加拿大
3	加燕 2 号	加拿大
4	青海白燕麦	青海
5	Hay Wire	加拿大
6	青引 2 号	青海
7	甜燕 2 号	加拿大

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 将材料播种于贵州大学试验场,待出苗后 20 d,每个材料随机取 20 个单株的幼嫩叶片 0.5 g 均匀混合,使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取植物总 DNA。用 1.0% 琼脂糖、Gold View 染色凝胶电泳检测质量,保存在 -20 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 燕麦 ISSR 分析

1.2.2.1 ISSR-PCR 反应体系建立及引物筛选 通过查阅相关文献资料^[7-11]以及预试验,最终确定最佳反应体系为

收稿日期:2017-05-10

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2014BAD23B03);国家自然科学基金(编号:31560664);贵州省科技支撑计划(编号:黔科合 NY 字[2014]3048 号、黔科合支撑[2016]2516 号)。

作者简介:余青青(1993—),男,贵州遵义人,硕士研究生,主要从事牧草种质资源及育种研究。E-mail:352548140@qq.com。

通信作者:赵丽丽,博士,副教授,主要从事牧草种质资源研究。E-mail:zhaolili_0508@163.com。

20 μL ; 2 \times Easy Taq PCR Super Mix 10 μL 、引物 1 μL 、DNA 模板 (15 ng/ μL) 2 μL 、ddH₂O 7 μL 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 ~ 56 $^{\circ}\text{C}$ (不同引物的温度不同) 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。ISSR 引物是根据加拿大哥伦比亚大学公布的 100 个引物序列, 选出 50 个交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 通过进一步预试验, 筛选引物。引物筛选以同一燕麦的 DNA 为模板, 设置不同的温度梯度, 将所有引物在不同的温度下进行 PCR 扩增, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选出条带清晰且具有多态性的引物作为此次燕麦 ISSR 的引物。

1.2.2.2 ISSR 扩增产物的检测 PCR 反应结束后, 将扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳中检测。电泳条件: 上样 7 μL , 1 \times TAE 电泳缓冲液, 120 V 的电压 32 min。电泳完毕后用 Bio-Rad 凝胶成像仪 Gel Doc XR+ 成像, 观测、保存并记录数据。

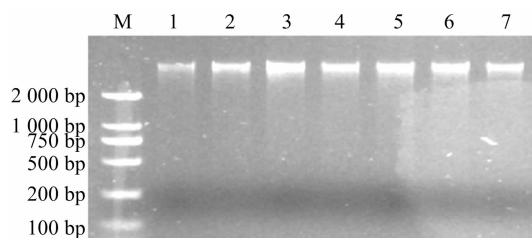
1.3 数据统计及分析

对 PCR 产物电泳的结果进行量化, 通常认为 ISSR 是显性标记, 同一条引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性, 在相同位移上有扩增带的记为 1, 无条带的记为 0, 记录清晰的电泳图谱条带, 统计多态性位点, 计算多态比率。所有数据统计利用 NTSYS2.1、Popgene 32、Excel 等软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的检测

DNA 电泳检测结果见图 1。电泳条带清晰且亮度高, 说明所提取的 DNA 纯度高, 没有被 RNA、蛋白质污染, 可以进行后续的研究工作。

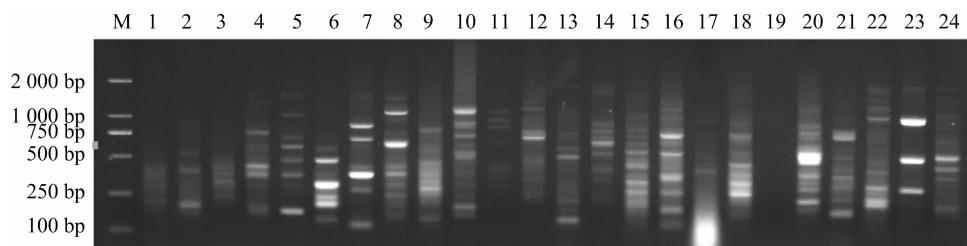


M—DM2000 DNA maker; 1—甘早; 2—Baler; 3—加燕 2 号; 4—青海白燕麦; 5—Hay Wire; 6—青引 2 号; 7—甜燕 2 号

图1 7 个燕麦品种基因组 DNA 提取检测结果

2.2 ISSR 引物筛选

同一燕麦的 DNA 在不同退火温度下进行 PCR 扩增, 从



M—DM2000 DNA maker; 1—UBC885; 2—UBC808; 3—UBC887; 4—UBC807; 5—UBC895; 6—UBC810; 7—UBC855; 8—UBC811; 9—UBC809; 10—UBC818; 11—UBC900; 12—UBC820; 13—UBC899; 14—UBC823; 15—UBC886; 16—UBC825; 17—UBC881; 18—UBC826; 19—UBC879; 20—UBC827; 21—UBC835; 22—UBC836; 23—UBC840; 24—UBC841

图2 退火温度为 54.6 $^{\circ}\text{C}$ 时 24 个 UBC 引物扩增产物检测结果

50 条 ISSR 引物中筛选出 17 条能够扩增出清晰条带且具有多态性的引物, 引物的详细序列见表 2。图 2 为退火温度 54.6 $^{\circ}\text{C}$ 时, 24 个 UBC 引物扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳获得的图谱。根据试验要求, 从图 2 中选出 7 号引物 UBC855 在 54.6 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度下扩增燕麦 DNA。其他引物的筛选过程与此相似。

表 2 17 条 ISSR 引物扩增结果

引物	序列 (5'→3')	扩增总 带数(条)	多态性条 带数(条)	多态性 比率(%)
UBC807	(AG) ₈ T	10	5	50.00
UBC810	(GA) ₈ T	13	6	46.15
UBC811	(GA) ₈ C	12	6	50.00
UBC813	(CT) ₈ T	13	7	53.85
UBC815	(CT) ₈ G	14	7	50.00
UBC820	(GT) ₈ C	14	8	57.14
UBC823	(TC) ₈ C	10	6	60.00
UBC835	(AG) ₈ CTC	15	8	53.33
UBC836	(AG) ₈ CTA	12	7	58.33
UBC840	(GA) ₈ CTT	11	7	63.64
UBC844	(CT) ₈ AGC	11	7	63.64
UBC852	(TC) ₈ AGA	12	6	50.00
UBC855	(AC) ₈ CTT	10	6	60.00
UBC868	(GAA) ₆	11	4	36.36
UBC888	CGTAGTCGT(CA) ₇	13	2	15.38
UBC895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	12	6	50.00
UBC900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	11	5	45.45
总计		204	103	
平均		12	6.06	50.49

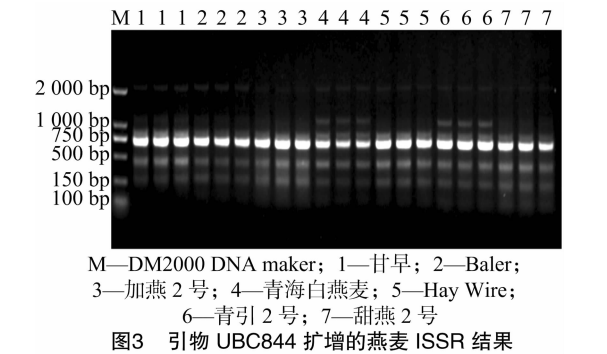
2.3 ISSR 引物扩增产物的多态性

利用 17 条 ISSR 引物对 7 个燕麦品种的 DNA 进行 PCR 扩增, 共获得 204 条清晰可辨的条带, 其中多态性条带 103 条, 平均多态性比率为 50.49%, 扩增的 DNA 片段集中在 200 ~ 2 000 bp, 部分扩增产物结果见图 3。平均每个引物扩增出 12 条带, 6.06 条具有多态性(表 2), 其中多态性最高的为 63.64% (引物 UBC844 和 UBC840), 低的只有 15.38% (引物 UBC888)。

本试验通过 3 次重复可以看出, 扩增出的 DNA 片段长度基本相同, 重复性较高, 只有较弱的条带重复性差。说明引物的重复性好, 可以继续后续的燕麦间遗传多样性研究, 以及品种间遗传距离的分析, 为燕麦引种及杂交育种奠定基础。

2.4 ISSR 标记的遗传相似性分析

采用 Popgene 32 软件计算燕麦品种间的遗传相似系数



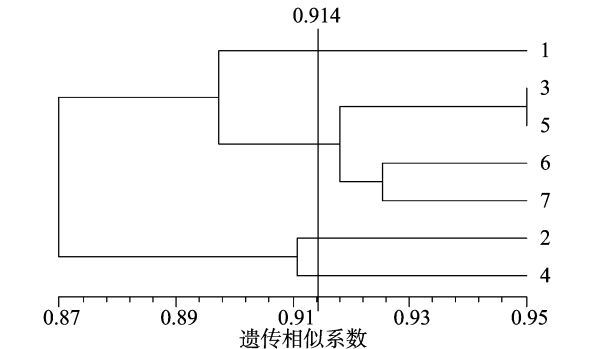
(GS 值),得到供试品种的相似性矩阵(表 3)。遗传相似系数越大,表明亲缘关系越近;遗传相似系数越小,表明亲缘关系越远。7 个燕麦品种的 GS 值为 0.855 ~ 0.945,变幅为 0.09。其中,加燕 2 号和 Hay Wire 二者之间的遗传相似系数最大(0.945),表明加燕 2 号和 Hay Wire 的亲缘关系较近,遗传差异最小;甘早和青海白燕麦遗传相似系数最小(0.855),表明甘早和青海白燕麦的亲缘关系较远,遗传差异最大,存在较高的遗传多样性。遗传相似性分析可知,供试品种之间有一定的遗传差异性。

表 3 基于 ISSR 标记的 7 种燕麦的遗传相似系数矩阵

品种	遗传相似系数					
	甜燕 2 号	青引 2 号	Hay Wire	青海白燕麦	加燕 2 号	Baler
青引 2 号	0.922					
Hay Wire	0.918	0.931				
青海白燕麦	0.858	0.872	0.891			
加燕 2 号	0.901	0.903	0.945	0.905		
Baler	0.856	0.858	0.862	0.913	0.881	
甘早	0.891	0.868	0.897	0.855	0.901	0.859

2.5 ISSR 标记聚类分析

根据遗传相似系数矩阵,利用 NTSYS 2.1 软件进行聚类分析。在遗传相似系数为 0.914 时,7 种燕麦分为 4 类(图 4),第 1 类为甘早,其产地为我国甘肃山丹;第 2 类包括加燕 2 号、Hay Wire、青引 2 号和甜燕 2 号,其中加燕 2 号、Hay Wire、甜燕 2 号原产地为加拿大;第 3 类为 Baler,其产地为加拿大;第 4 类为青海白燕麦,其产地为我国青海。聚类结果初步证实了 ISSR 分子标记对 7 种燕麦进行亲缘关系分析的可行性。



3 结论与讨论

燕麦表型性状的数量是有限的,容易受到外界环境的影

响,从传统的形态学分类方法来区分较难。分子标记能从 DNA 水平上检测遗传变异,被认为是物种亲缘关系研究的有力工具。刘欢等利用 8 个 ISSR 引物在 48 份燕麦材料中共获得 144 条扩增带,其中多态性条带 126 条,平均多态率为 86.1%^[7];王茅雁等利用 RAPD 标记对我国 21 份燕麦材料的遗传差异及类群划分的研究中,22 个多态性引物共扩增出 114 条条带,其中 85.1% 具有多态性^[12]。Pal 等用 RFLP 分析燕麦属 13 个种间存在 41% 的多态性^[13]。本研究从 50 个 ISSR 引物中筛选出 17 个多态性明显、条带清晰、反应稳定的引物,共扩增了 204 条谱带,多态性条带有 103 条,平均每个引物能扩增出 12 个条带,多态性比率为 50.49%。与以上研究结果相比,在检测技术上,本研究使用的技术是相对成熟的琼脂糖凝胶电泳检测,其检测结果比较可靠。另外,燕麦是自花授粉植物,利用 ISSR 标记分析的准确性也相对较高。在检测结果方面,各研究中相关的分子标记都能产生各自有效的多态性条带,但本研究揭示的燕麦品种间遗传差异相对较小,这可能是供试品种数量少和所选品种种性差异所致。

本研究利用 ISSR 技术所统计的遗传相似系数,能反映不同材料间的遗传距离及关系。供试的 7 个燕麦品种的遗传相似系数(GS)0.855 ~ 0.945,表明供试燕麦品种间遗传相似系数和遗传距离的变化范围相对较小。其中,加燕 2 号和 Hay Wire 二者之间的遗传相似系数最大(0.945),表明加燕 2 号和 Hay Wire 的亲缘关系较近,遗传差异最小,因为两者都来自同一原产地,育种时是否拥有共同祖先还须进一步查证;甘早和青海白燕麦遗传相似系数最小(0.855),表明甘早和青海白燕麦的亲缘关系较远,遗传差异最大,可能是因为 2 个品种来自不同的地方,由于地域、环境等差异造成品种间存在较大的遗传差异,又或者因其父母本之间具有相对较远的遗传距离。在植物杂交育种中,具有较大遗传距离的 2 个种或品种之间更容易获得遗传性状较多的杂交种。因此,在得知各品种间遗传距离的情况下,能够科学地指导杂交育种和品种改良的进行。总之,本研究主要针对贵州省目前引进的品种开展遗传差异鉴定,所得结果能较好地为贵州省燕麦育种提供理论依据。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志(第九卷第三分册)[M]. 北京:科学出版社,1987.

[2] 郑殿升,方嘉禾. 高品质小杂粮作物品种及栽培[M]. 北京:中国农业出版社,2009.

[3] 吕耀昌,郑殿升,赵 炜,等. 燕麦保健功能的开发利用[J]. 农产品加工,2011(3):8-9.

[4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.

[5] 魏臻武. 利用 SSR、ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱[J]. 草业学报,2004,13(3):62-67.

[6] 冯亮亮,唐 红,李 毅,等. 甘肃红砂不同种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 草业学报,2011,20(1):125-130.

[7] 刘 欢,慕 平,赵桂琴,等. 燕麦种质资源遗传多样性 ISSR 研究[J]. 草业学报,2012,21(4):116-124.

[8] 刘 君,赵 琴,杨志民. ISSR 分子标记对 9 种狗牙根的鉴定分

谢琮琮,许文武,李至敏,等. 蓝杆藻 ATCC 51142 中 α -酮戊二酸脱羧酶的克隆与表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):37-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.009

蓝杆藻 ATCC 51142 中 α -酮戊二酸脱羧酶的克隆与表达

谢琮琮¹, 许文武¹, 李至敏², 王小琴¹, 雷国风¹, 张伟¹, 黄婷¹, 李志敏¹

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院,江西南昌 330045; 2. 江西农业大学理学院,江西南昌 330045)

摘要: α -酮戊二酸脱羧酶催化 α -酮戊二酸的非氧化脱羧生成琥珀酸半醛,其在琥珀酸半醛脱氢酶的作用下转化为琥珀酸,蓝藻的三羧酸循环由于这 2 个酶的存在而变得完整。Blast 序列分析发现,蓝杆藻 ATCC 51142 中 *cce4227* 基因编码 α -酮戊二酸脱羧酶。为了证实 *cce4227* 基因编码蛋白的催化功能,从蓝杆藻 ATCC 51142 基因组中克隆 *cce4227* 基因,然后构建 pET28a-*cce4227* 表达质粒。将该质粒与 pTf16 分子伴侣质粒共转化 BL21(DE3)大肠杆菌感受态细胞后进行重组蛋白的诱导表达。利用镍亲和层析方法对 *cce4227* 蛋白进行分离纯化,得到纯度 >95% 的 *cce4227* 蛋白,菌体蛋白收率约为 12 mg/g。酶动力学测试表明,*cce4227* 蛋白是 1 个焦磷酸硫酸素 (TPP) 依赖型的 α -酮戊二酸脱羧酶。

关键词:蓝杆藻 ATCC 51142; α -酮戊二酸脱羧酶;基因克隆;重组表达;蛋白质纯化

中图分类号:S188 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)19-0037-03

蓝藻,别称蓝绿藻或蓝细菌,在藻类中是最简单、最原始的单细胞原核生物,也是目前发现的最早的光合释氧生物。蓝杆藻 ATCC 51142 是一种白天进行光合作用,夜间通过固氮作用产氮的固氮型蓝细菌^[1]。由于在蓝藻基因组中没有检测到 α -酮戊二酸脱氢酶基因^[2-3],长期以来学术界一直认为蓝藻没有经典的三羧酸循环途径。2011 年 Zhang 等研究发现,在聚球藻 PCC7002 中 *a2770* 和 *a2771* 基因分别编码 α -酮戊二酸脱羧酶和琥珀酸半醛脱氢酶,这 2 个酶的存在使得蓝藻的三羧酸循环变得完整^[4]。实际上,编码 α -酮戊二酸脱羧酶和琥珀酸半醛脱氢酶的基因存在于除少数海洋蓝藻外的大多数蓝藻中^[4]。

笔者所在研究组通过 Blast 序列分析,发现蓝杆藻 ATCC 51142 中 *cce4227* 基因与聚球藻 PCC7002 中 *a2770* 基因的同源性达到 81.8%,与集胞藻 PCC6803 中 *sll1981* 基因的同源

性为 76%。同样,集胞藻 PCC6803 中 *sll1981* 基因编码蛋白已被证明具有 α -酮戊二酸脱羧酶功能^[5-6]。因此本研究推测 *cce4227* 蛋白也具有 α -酮戊二酸脱羧酶的功能。

近年来生物合成可再生燃料的研究吸引了越来越多研究者的关注^[7]。其中,引人注目的是 Genomatica 公司的研究人员报道了基因工程大肠杆菌利用琥珀酸半醛生物合成 1,4-丁二醇^[8]。然而通过基因工程蓝藻生物合成 1,4-丁二醇的研究还未见报道。琥珀酸半醛正是 α -酮戊二酸脱羧酶催化 α -酮戊二酸非氧化脱羧生成的产物。因此对 α -酮戊二酸脱羧酶开展研究将为未来利用蓝藻生物合成 1,4-丁二醇提供理论基础。

本研究从蓝杆藻 ATCC 51142 基因组中扩增得到 *cce4227* 基因,将其连接到 pET28a 载体上构建得到 pET28a-*cce4227* 质粒。将该质粒与 pTf16 分子伴侣质粒共转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞后得到表达菌株。摇瓶培养表达菌株经阿拉伯糖和异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导后纯化得到 *cce4227* 重组蛋白。本研究为进一步阐明 *cce4227* 蛋白的催化功能及机制奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体 试验于 2017 年 11 月至 2018 年 1 月在江西农业大学生物科学与工程学院分子生物学实验室完成。

收稿日期:2018-02-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560250,31400054);江西省自然科学基金重大项目(编号:20161ACB21012);江西省教育厅科技研究重点项目(编号:JJ160353);江西农业大学国家级大学生创新创业训练项目(编号:201710410005)。

作者简介:谢琮琮(1993—),女,江西赣州人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:1547368064@qq.com。

通信作者:李志敏,博士,副教授,主要从事酶催化反应机理研究。

Tel: (0791) 83813459; E-mail: zmlizm@126.com。

析[J]. 草业学报,2012,21(6):159-165.

[9] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报,2004,39(2):19-21.

[10] 郭红媛,贾举庆,吕晋慧,等. 燕麦属种质资源遗传多样性及遗传演化关系 ISSR 分析[J]. 草地学报,2014,22(2):344-351.

[11] 刘欢,慕平,赵桂琴,等. 燕麦 ISSR 反应体系的建立与优化

[J]. 中国草地学报,2010,32(4):80-85.

[12] 王茅雁,傅晓峰,齐秀丽,等. 利用 RAPD 标记研究燕麦属不同种的遗传差异[J]. 华北农学报,2004,19(4):24-28.

[13] Pal N, Sandhu J S, Domier L L, et al. Development and characterization of microsatellite and RFLP-derived PCR-markers in oat[J]. Crop Science,2002,42(3):912-918.