

李晨辉,赵子捷,陈文烨,等. 43 种植物 *CaM1* 基因密码子使用特征及遗传差异分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):28–32.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.05.008

43 种植物 *CaM1* 基因密码子使用特征及遗传差异分析

李晨辉¹, 赵子捷², 陈文烨³, 焦义然³, 杨帆⁴, 刘永伟⁴, 董福双⁴, 杜进民³, 周硕⁴

(1. 河北菲尼斯生物技术有限公司, 河北石家庄 050035; 2. 山西农业大学信息学院, 山西太谷 030800;

3. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050000;

4. 河北省农林科学院遗传生理研究所/河北省植物转基因中心, 河北石家庄 050051)

摘要:为深入了解不同类植物 *CaM1* 基因(calmodulin 1, 简称 CaM1)在抵抗逆境进化过程所形成的密码子的使用特征和遗传差异。运用 CodonW、BioEdit 和 MEGA 软件对 43 种植物序列进行分析,并构建系统发育树。结果表明, *CaM1* 基因对密码子的使用具有极强的偏好性, CUC、AUC、UCU、CCA、ACU、UGA 为其最优密码子, 禾本目植物更偏好使用 G/C 碱基。G、C 碱基含量和位置是引起 *CaM1* 基因密码子偏性的主要原因。遗传距离分析表明, 山柑目与白花菜目之间的亲缘关系最近, 豆目和无患子目间的亲缘关系次之, 与聚类分析结果相符。

关键词: *CaM1*; 密码子偏性; 遗传距离; 亲缘关系

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)05–0028–04

植物体内存在众多的信号通路, 其中钙离子介导的细胞生命活动是其重要的调节机制之一^[1]。钙调素(calmodulin, 简称 CaM) 不仅参与信号转导^[2], 其活化后还能结合多种酶来调节酶活性, 形成相应的生理生化反应, 从而对植物细胞分裂、伸长、生长、发育和抗逆等活动进行调节^[3], 并对花粉萌发和花粉管伸长具有促进作用^[4]。在一种植物体内, 可存在多种 CAM 亚型基因, 且不同亚型基因间的序列具有高度的同源性, 但存在的这些差异也使其不同的亚型具有相应的生理功能^[5–6]。脱氧核糖核酸或核糖核酸与其编码蛋白之间的关系可以通过密码子来表示^[7]。一共有 64 种遗传密码来编码 20 种氨基酸^[8], 这种编码同一个氨基酸的密码子称为同义密码子, 在翻译成氨基酸的整个环节中, 基因对同义密码子的使用具有不平衡性, 还存在物种的差异性等特征^[9]。基因密码子偏好性的研究有利于基因水平转移及其家族分化的研究^[10]。因此, *CaM1* 基因密码子偏好性的分析能更好地揭示其在系统分类研究中的有效性。

在同一种植物体的不同组织和不同发育阶段, *CaM* 基因的表达存在差异^[11]。程玉豆等克隆出鸭梨 *CaM* 基因 2 种亚型(命名为 *PbCaM1* 和 *PbCaM2*), 发现这 2 种亚型在成叶、盛花期花瓣及幼果期的表达量较高^[12]。郭丽君发现美国山核桃 *CaM* 基因在不同组织和发育阶段也不一致, 在叶中的表达量最高, 其次分别是嫩叶和内茎^[13]。赵芊等在研究拟南芥 7 个 *CaM* 亚型基因时发现, 不同亚型的表达量均受到细菌信号

3-羧基辛酰基高丝氨酸内酯不同程度的诱导, 且野生型 *CaM1* 基因处理 6 h 达到表达高峰^[5]。薛敏等在非生物胁迫条件下, 克隆出沙冬青 *CaM1* 基因, 通过 RT-PCR 方法证实其在低温、干旱和盐胁迫下表达水平上调^[14]。赵晶等发现灰皮支黑豆和感病品种辽豆 15 根部在线虫侵染后的第 5 天, 抗感品种的 *CaM1* 基因的表达量最高^[15]。

对植物 *CaM1* 基因在不同条件下的表达量进行深入研究, 对揭示钙离子参与的信号通路有重要意义, 但目前为止还未见 *CaM1* 基因密码子使用模式的报道, 这对后期开展异源表达和遗传转化相关试验都是不利的。本研究以 43 种植物 *CaM1* 基因密码子使用特征为切入点进行其进化和分类的研究, 通过 CodonW 分析了 43 种(12 类)植物 *CaM1* 基因密码子偏好性, 运用 Bioedit 和 MEGA 软件对遗传距离和亲缘关系进行分析, 以期为 *CaM1* 基因在植物中的进化和分类提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验的时间和地点

本试验于 2017 年进行, 目的基因的搜集在河北科技大学生物科学与工程学院完成, 生物信息学分析在河北菲尼斯生物技术有限公司和河北省农林科学院遗传生理研究所完成。

1.2 目的基因的导入

本研究所用基因资料都来源于 Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>) 数据库, 43 种植物 *CaM1* 基因含有禾本目、蔷薇目、管状花目、白花菜目、山柑目、伞形目、茄目、豆目、菊目、鼠李目、无患子目和芸香目。43 种植物 *CaM1* 基因序列都是完整的编码区序列, 序列全长为 450 bp。如表 1 所示, 利用 MEGA 6.0 对上述序列进行碱基分析。

1.3 不同密码子使用偏性指标分析

利用 CodonW 软件计算 ENc、GC、GC_{3s}、CBI 和相对同义密码子使用度(relative synonymous coon usage, RSCU) 的值, 分析 *CaM1* 基因密码子使用偏性; 并计算 GC、GC_{3s}、蛋白质亲水

收稿日期: 2017–11–30

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(编号: 31600216); 河北省自然科学基金青年基金(编号: C2017301066); 河北省现代农业创新工程项目(编号: 2019–4–8)。

作者简介: 李晨辉(1984—), 男, 河北保定人, 博士, 工程师, 主要从事生物工程研究。E-mail: li.chen.hui@163.com。

通信作者: 杜进民, 博士, 教授, 主要从事生物技术研究, E-mail: 13933106571@163.com; 周硕, 博士, 副研究员, 主要从事植物分子遗传学研究, E-mail: zhoushuobio@163.com。

表 1 不同植物 *CaMI* 基因序列的相关信息

物种	登录号	碱基组成(%)				<i>ENc</i> 值	<i>GC</i> 值	<i>GC</i> _{3s} 值	<i>CBI</i> 值
		T	C	A	G				
小麦	U48242.1	20.9	22.0	26.4	30.7	43.32	0.528	0.664	0.066
玉米	NM_001294152.1	15.3	28.4	25.1	31.1	29.15	0.597	0.893	0.220
水稻	AF042840.1	14.0	29.1	25.3	31.6	32.33	0.609	0.929	0.245
二穗短柄草	XM_010230389.1	16.0	26.2	26.9	30.9	37.41	0.573	0.821	0.104
大麦	M27303.1	17.1	26.4	26.2	30.2	33.24	0.568	0.800	0.168
甘蔗	GQ246455.1	20.4	23.8	25.8	30.0	42.67	0.539	0.702	0.023
节节麦	XM_020321372.1	14.7	28.0	26.4	30.9	31.16	0.591	0.864	0.143
小米	XM_004961610.2	18.2	25.1	25.3	31.3	37.86	0.566	0.793	0.258
蒺藜状苜蓿	AF494219.1	24.2	19.1	28.9	27.8	52.29	0.470	0.507	0.092
苹果	X60738.1	23.6	19.3	26.7	30.4	58.41	0.499	0.614	0.002
白梨	KJ008979.1	22.9	17.6	28.0	31.6	57.23	0.492	0.593	-0.126
巴旦木	XM_007209676.2	25.1	15.6	30.0	29.3	40.58	0.450	0.464	0.000
花生	KF431828.1	22.2	22.0	26.4	29.3	43.26	0.515	0.621	0.133
豌豆	U13882.1	23.6	18.7	30.2	27.6	52.10	0.463	0.486	0.002
木豆	XM_020349656.1	22.2	20.7	28.2	28.9	53.17	0.497	0.586	0.028
芸豆	JX869966.1	22.7	20.2	26.9	30.2	41.53	0.506	0.593	0.066
绿豆	L20691.1	22.2	21.1	26.9	29.8	51.07	0.510	0.614	0.066
番茄	NM_001324485.1	24.2	18.0	29.3	28.4	49.13	0.465	0.486	0.028
马铃薯	U20297.1	24.7	18.2	29.3	27.8	43.50	0.461	0.486	-0.011
芝麻	XM_011082170.2	21.8	20.4	27.8	30.0	50.40	0.506	0.619	0.057
矮牵牛	M80836.1	25.8	16.7	30.0	27.6	44.14	0.443	0.414	-0.126
小盐芥	AK353342.1	21.3	19.8	31.1	27.8	51.69	0.477	0.536	0.089
萝卜	XM_018627697.1	22.0	19.3	29.6	29.1	56.52	0.485	0.571	0.180
芜菁	XM_009106956.2	19.8	21.6	29.1	29.6	52.84	0.512	0.643	0.192
醉蝶花	XM_010523293.1	16.9	22.9	29.3	30.9	49.27	0.538	0.709	0.252
拟南芥	NM_123137.4	21.8	20.0	31.8	26.4	48.17	0.465	0.500	0.204
亚麻荠	XM_010437385.1	22.0	19.8	31.8	26.4	50.37	0.463	0.493	0.217
人参	FJ825754.1	23.8	18.9	27.8	29.6	58.53	0.485	0.550	0.066
细香芹菜	AF064552.1	25.2	18.5	29.1	27.2	54.57	0.458	0.475	0.052
胡萝卜	AY656692.1	22.9	18.4	29.1	29.6	56.77	0.483	0.557	0.002
簇生椒	X97558.1	23.6	19.0	28.7	28.7	56.06	0.478	0.511	0.047
烟草	XM_016611641.1	25.3	16.4	28.2	30.0	46.24	0.465	0.514	-0.049
大豆	NM_001251308.1	23.6	18.7	28.0	29.8	56.10	0.485	0.564	-0.075
狭叶羽扇豆	XM_019591550.1	24.2	17.8	29.1	28.9	55.59	0.468	0.500	0.015
鹰嘴豆	XM_012713771.1	24.7	16.7	33.8	24.9	61.00	0.416	0.350	-0.023
向日葵	U79736.1	24.9	17.6	28.0	29.6	41.17	0.474	0.521	0.015
甜菊	AF474074.1	26.4	15.6	31.1	26.9	54.73	0.421	0.367	0.050
葡萄	XM_019221615.1	23.8	16.4	29.8	30.0	61.00	0.465	0.493	-0.049
枣	XM_016032951.1	23.3	19.1	29.1	28.4	57.03	0.477	0.514	0.041
荔枝	KY475580.1	23.6	18.7	29.8	28.0	54.90	0.468	0.486	0.053
冬青	KX379686.1	24.4	17.6	28.0	30.0	59.28	0.477	0.525	-0.077
红果榿木	KF643240.1	25.1	17.1	28.9	28.9	46.52	0.461	0.457	-0.075
克莱门柚	XM_006430371.1	24.0	18.9	28.2	28.9	52.93	0.481	0.550	0.079

注:*ENc* 表示有效密码子数;*GC* 表示 *GC* 含量;*GC*_{3s} 表示密码子第 3 位的 *GC* 含量;*CBI* 表示密码子偏爱指数。

性(*Gravy*)、芳香族氨基酸比例(*Aromo*)与 *CBI*、*ENc* 的相关系数,分析影响 *CaMI* 基因密码子使用偏性的因素。

1.4 遗传距离和系统发育树的构建

利用 BioEdit 软件对 43 种植物 *CaMI* 基因 cDNA 序列进行比对,将比对结果保存为 fasta 格式,通过 MEGA 软件中 Kimura 双参数模型计算遗传距离。利用 MEGA 软件的邻近法建立系统发育树,并通过自举检验法(Bootstrap method = 1 000)校正。

2 结果与分析

2.1 不同植物 *CaMI* 基因序列碱基特征

如表 1 所示,编码 *CaMI* 基因的 43 种植物的核苷酸全长均是 450 bp。在 ATCG 碱基分布中,禾本目的小麦、玉米、水稻、二穗短柄草、大麦和甘蔗,蔷薇目的节节麦、小米、花生、芸豆和绿豆,管状花目的芝麻,白花菜目的芜菁和醉蝶花,上述物种的 A + T 碱基含量均低于 G + C 碱基含量,其余物种 G +

C 碱基含量高于 A + T 碱基含量,表明 *CaMI* 基因更倾向于使用 G 或 C 碱基。

2.2 密码子使用偏性指标及其影响因素分析

如表 1 所示,玉米的 *ENc* 值最小,为 29.15,且禾本目其余植物的 *ENc* 值也明显小于其他植物,表明禾本目的植物对密码子使用具有较强的偏好性,43 种植物中,只有 12 种植物的 *ENc* 值高于 55,*ENc* 值最高的植物为鹰嘴豆和葡萄 (*ENc* = 61.00),表明大多数植物 *CaMI* 基因对同义密码子的使用具有较强的偏好性。禾本目植物的 GC 含量值和密码子第 3 位的 GC 含量值是所有植物中最高的,表明禾本目植物偏爱使用 G、C 碱基。在 43 种植物中,禾本目的玉米、水稻、蔷薇目的小米,白花菜目的醉蝶花,山柑目的拟南芥、亚麻荠的 *CBI* 值均大于 0.2,禾本目的二穗短柄草、大麦,蔷薇目的节节麦、花生,白花菜目的萝卜、芜菁的 *CBI* 值均大于 0.1,其余植物的 *CBI* 值接近 0,表明禾本目、蔷薇目、白花菜目和山柑目的 *CaMI* 基因密码子使用偏好性大于其他植物。同义密码子相对使用度的结果表明,43 种植物对 CUC、AUC、UCU、CCA、ACU、UGA(终止密码子)、CAU 和 UGC 具有极强的偏好性 (*RSCU* > 1.5),除上述密码子外,禾本目植物更偏向使用

GUC、UCC、UCG、AGC、ACC、UAC、CAG、GAG、CGC、GGC (*RSCU* > 1.5),这与其他 11 种分类植物密码子的使用特征不一致。如表 2 所示,GC 含量和密码子第 3 位的 GC 含量均与密码子偏爱指数呈极显著正相关,但与有效密码子数呈极显著负相关,表明 G、C 碱基的含量和位置对 *CaMI* 基因密码子偏性具有重要影响。

表 2 偏性指标与影响因素的相关系数

指标	相关系数			
	<i>GC</i> _{3s}	<i>GC</i>	<i>Gravy</i>	<i>Aromo</i>
<i>CBI</i>	0.600 **	0.596 **	0.164	0.013
<i>ENc</i>	-0.690 **	-0.701 **	-0.115	-0.157

注: ** 表示在 0.01 水平上极显著相关。

2.3 不同植物 *CMAI* 基因的遗传距离分析

不同植物种群间 Kimura 双参数距离如表 3 所示,各分类群体间遗传距离变异区间在 0.11 ~ 0.22 之间波动,其中山柑目和白花菜目之间的遗传距离最近,双参数距离值为 0.11,其次是豆目和无患子目。白花菜目与菊目、山柑目与芸香目之间的遗传距离最远,双参数距离值均为 0.22,其次是豆目与菊目、白花菜目与管状花目、白花菜目与芸香目。

表 3 基于 Kimura 双参数模型建立的种群间遗传距离

分类	遗传距离											
	禾本目	蔷薇目	管状花目	白花菜目	山柑目	伞形目	茄目	豆目	菊目	鼠李目	无患子目	芸香目
禾本目												
蔷薇目	0.17											
管状花目	0.18	0.18										
白花菜目	0.17	0.19	0.21									
山柑目	0.19	0.19	0.19	0.11								
伞形目	0.20	0.18	0.18	0.20	0.20							
茄目	0.19	0.18	0.15	0.20	0.19	0.18						
豆目	0.21	0.18	0.17	0.20	0.17	0.16	0.16					
菊目	0.21	0.20	0.17	0.22	0.20	0.19	0.20	0.21				
鼠李目	0.20	0.17	0.18	0.20	0.19	0.15	0.18	0.16	0.21			
无患子目	0.18	0.17	0.17	0.20	0.18	0.15	0.17	0.14	0.18	0.15		
芸香目	0.20	0.18	0.19	0.21	0.22	0.17	0.18	0.18	0.19	0.16	0.16	

2.4 不同植物 *CMAI* 基因的聚类分析

如图 1 所示,43 种植物明显分为 5 类:禾本目(小麦、玉米、二穗短柄草、大麦、甘蔗)和蔷薇目(节节麦、小米、花生、芸豆、绿豆)间的亲缘关系较近;蔷薇目(蒺藜状苜蓿、豌豆、木豆)与豆目(大豆、狭叶羽扇豆、鹰嘴豆)和无患子目(冬青)间的亲缘关系较近;蔷薇目(苹果、白梨),伞形目(人参、西芹、芹菜),鼠李目(葡萄、枣)和芸香目(克莱门柚)间的亲缘关系较近;管状花目(番茄、马铃薯、矮牵牛)和茄目(簇生椒、烟草)间的亲缘关系较近;白花菜目(小盐芥、萝卜、芜菁、醉蝶花)和山柑目(拟南芥、亚麻荠)间的亲缘关系较近,且同一目下的各个植物间的亲缘关系更近。

3 讨论与结论

密码子偏好性的研究为了解物种起源于进化、目的基因的改造、推测未知基因表达水平及预测目的基因最佳宿主奠定了理论基础^[16-17],同时为转基因研究中的甲基化能否引起基因表达量下降或基因沉默提供参考^[18]。

本研究通过分析 43 种不同植物的密码子使用特征,发现其有效密码子数(29.15 ≤ *ENc* ≤ 61.00)和密码子偏爱指数这

2 种指标表明不同植物 *CaMI* 基因对密码子的使用具有极强的偏好性,通过 GC 含量、密码子第 3 位的 GC 含量和同义密码子相对使用度这 3 种指标证实不同植物 *CaMI* 基因对 G、C 碱基的使用有极强的偏好性,尤其是对终止密码子 UGA,以及 CUC、AUC、UCU、CCA、ACU 密码子的使用。禾本目与其他分类植物相比,更倾向于使用 G/C 结尾的碱基,引起其 *GC*_{3s} 值远远高于其他植物,且 GUC、UCC、UCG、AGC、ACC、UAC、CAG、GAG、CGC、GGC 为其最主要的偏爱密码子。分析影响 *CaMI* 基因密码子使用偏性的原因发现,G、C 碱基的含量和位置对 *CaMI* 基因密码子偏性具有重要影响。关于影响密码子偏好性的原因,有研究报道,反转录形成的 cDNA 序列长度、转运 RNA 丰度、突变和自然选择等都可造成基因对某些密码子的使用具有极强的偏好性^[19]。GC 碱基含量会造成同义密码子在使用上具有偏好性的特点,且其偏好性越强,发现该基因以 G/C 碱基结尾的可能性越大,而且 *GC*_{3s} 对该基因密码子偏好性有主导作用^[20]。每种生物都有可能面临非自然选择压力,这种非自然选择压力会促使物种的密码子第 3 位碱基种类发生变化^[21]。苏丽艳等发现苹果 *CaM* 基因有响应损伤、高温、低氧等非生物胁迫的能力,在适应胁迫环境初期

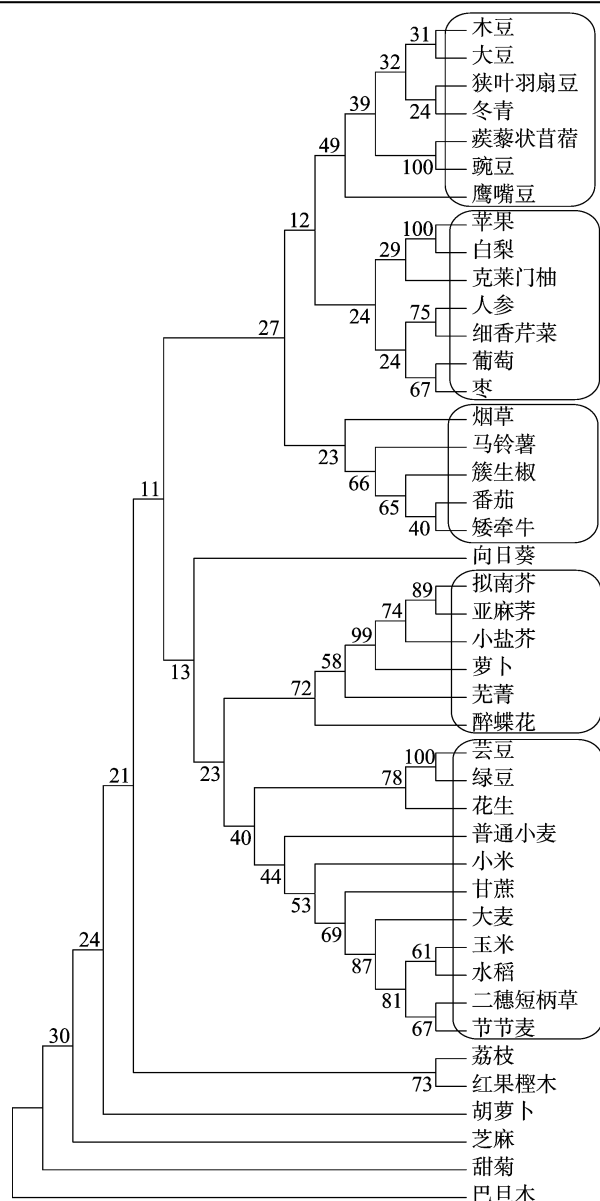


图1 基于邻近法的聚类树状图

过程中不可或缺^[22]。在体温胁迫下,茶树 CaM 蛋白也可介导钙信号从而提高适应低温环境的能力^[23]。赵存鹏等发现棉花在胁迫处理后,转入 *CaM* 基因能提高棉花抵御低温的能力^[24]。

基因 DNA 水平上的分析更有利于基因功能信息的获取,本研究分析 12 种不同分类植物 *CaMl* 基因的遗传距离发现,山柑目与白花菜目之间的遗传距离值最小,其次是豆目和无患子目,这与基于邻近法构建的聚类图一致,表明遗传距离和聚类分析都能描述物种间的亲缘关系。*CaMl* 基因密码子使用特征的确定为研究影响植物抗逆因素及开展抗逆品质改良奠定基础,并为深入建立转基因表达系统提供最优密码子的理论依据。

本研究分析了 43 种植物 *CaMl* 基因密码子使用特征,发现不同类植物 *CaMl* 基因对密码子的使用具有较强的偏好性,尤其偏好使用 G/C 碱基,CUC、AUC、UCU、CCA、ACU 和 UGA 为最优密码子,禾本目植物更偏向使用 G/C 结尾的碱基。G、C

碱基的含量和位置是影响 *CaMl* 基因密码子偏性的主要原因。遗传距离分析得出的亲缘关系与系统发育结果一致。

参考文献:

- [1] Kudla J, Batistic O, Hashimoto K. Calcium signals; the lead currency of plant information processing [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22 (3): 541 - 563.
- [2] Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Communicating with calcium [J]. *The Plant Cell*, 1999, 11 (4): 691 - 706.
- [3] 张俊红. CaM 对增强 UV - B 辐射小麦幼苗抗氧化系统调控的研究 [D]. 临汾: 山西师范大学, 2010.
- [4] Yang X E, Wang S S, Wang M, et al. *Arabidopsis thaliana* calmodulin-like protein CML24 regulates pollen tube growth by modulating the actin cytoskeleton and controlling the cytosolic Ca^{2+} concentration [J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86 (3): 225 - 236.
- [5] 赵 芊, 张 超, 刘 方, 等. 钙调素参与细菌信号 3 - 羧基辛酰基高丝氨酸内酯对拟南芥主根生长的调控 [J]. *植物生理学报*, 2016, 52 (6): 933 - 940.
- [6] 刘 伟. 小麦与叶锈菌互作过程中 CaM 的亚细胞定位和 CaM 亚型的抗体制备 [D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [7] 刘庆坡, 薛庆中. 遗传密码子及其应用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22 (11): 851 - 855.
- [8] 周 丹, 薛仁余, 张晓峰, 等. 鲤和斑马鱼 *HOX* 基因家族同义密码子使用偏性的分析 [J]. *水产学杂志*, 2013, 26 (2): 19 - 25.
- [9] 朱孝轩, 朱英杰, 宋经元, 等. 基于全基因组和转录组分析的赤芝密码子使用偏好性比较研究 [J]. *药学报*, 2014, 49 (9): 1340 - 1345.
- [10] Wei L, He J, Jia X, et al. Analysis of codon usage bias of mitochondrial genome in *Bombyx mori* and its relation to evolution [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2014, 14: 262.
- [11] 刘新颖, 王晓杰, 薛 杰, 等. 小麦钙调素新亚型 TaCaM5 的克隆及表达分析 [J]. *作物学报*, 2010, 36 (6): 953 - 960.
- [12] 程玉豆, 葛文雅, 闫洪波, 等. ‘鸭梨’钙调素基因的克隆与表达分析 [J]. *河北农业大学学报*, 2016, 39 (2): 58 - 63.
- [13] 郭丽君. 美国山核桃 *CaM* 基因的克隆及在盐胁迫下的表达 [D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
- [14] 薛 敏, 王雪峰, 王志林, 等. 沙冬青 *AmCaMl* 基因的克隆及其功能初步分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16 (6): 1315 - 1320.
- [15] 赵 晶, 王媛媛, 朱晓峰, 等. 线虫胁迫下大豆钙调蛋白基因的表达分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39 (1): 91 - 98.
- [16] 吴宪明, 吴松峰, 任大明, 等. 密码子偏性的分析方法及相关研究进展 [J]. *遗传*, 2007, 29 (4): 420 - 426.
- [17] 宗秋芳, 戴开宇, 刘 颖, 等. 猪氨肽酶 N (*APN*) 基因密码子偏好性分析 [J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2016, 37 (2): 45 - 50, 73.
- [18] 张 乐, 金龙国, 罗 玲, 等. 大豆基因组和转录组的核基因密码子使用偏好性分析 [J]. *作物学报*, 2011, 37 (6): 965 - 974.
- [19] Liu G, Wu J, Yang H, et al. Codon usage patterns in *Corynebacterium glutamicum*: mutational bias, natural selection and amino acid conservation [J]. *Comparative and Functional Genomics*, 2010: 343569.
- [20] Carlini D B, Chen Y, Stephan W. The relationship between third - codon position nucleotide content, codon bias, mRNA secondary

陆秀娟,潘虹,李祥栋,等. 薏苡种质资源 ISSR 分子标记筛选及亲缘关系分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):32-36.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.05.009

薏苡种质资源 ISSR 分子标记筛选及亲缘关系分析

陆秀娟^{1,2}, 潘虹^{1,2}, 李祥栋^{1,2}, 魏心元^{1,2}, 陆平³, 石明¹

(1. 贵州省薏苡工程技术研究中心, 贵州兴义 562400; 2. 贵州黔西南喀斯特区域发展研究院, 贵州兴义 562400;
3. 中国农业科学院作物研究所, 北京 100081)。

摘要:利用 ISSR 标记对 92 份薏苡种质进行遗传多样性分析, 结果表明, 从 100 条 ISSR 通用引物中筛选出 11 条多态性较好的引物, 共扩增出 49 条多态性条带, 多态性条带占各自总条带的比例为 66.6% ~ 100.0%; 非加权组平均法 (UPGMA) 和主成分分析法 (PCA) 对 92 份薏苡种质的聚类结果一致, 均分为 3 个类群, 云南、贵州、福建 3 个省份的种质表现出比较丰富的遗传多样性, 其他省份的多样性水平相对较低。

关键词:ISSR 标记; 遗传多样性; 种质资源; 薏苡; 类群; 主成分分析

中图分类号: S519.024 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)05-0032-05

种质资源的遗传多样性是育种的基础, 科学、准确地评价种质资源的遗传多样性, 从整体上把握物种资源的遗传变异信息及亲缘关系远近, 可有针对性地选择合适亲本, 为遗传育种工作提供有益参考。

薏苡 (*Coix lacryma-jobi* L.) 是禾本科薏苡属 1 年生或多年生草本植物, 是重要的药食同源作物之一。目前, 薏苡属作物在世界范围内约有 10 个种或变种, 《我国植物志》将薏苡属分为 5 个种 4 个变种^[1]。DNA 分子标记是研究遗传多样性和亲缘关系的重要工具, 近年来, Qin 等采用扩增片段长度多态性 (AFLP)、相关序列扩增多态性 (SRAP)、简单重复序列标记 (SSR) 等分子标记方法对薏苡种质进行筛选应用^[2-5]。Ma 等利用 17 对 SSR 引物聚类分析来自我国和韩国的 79 份薏苡种质资源时发现, 我国薏苡和韩国薏苡有着比较远的亲缘关系, 大部分我国薏苡聚为 1 类, 而所有的韩国薏苡被聚为 1 类^[6]。江忠东等以薏苡 (原变种)、念珠薏苡 (变种)、薏米、水生薏苡、小珠薏苡等 42 份薏苡属植物为材料, 筛选出 5 对与落粒性基因相关的 STS 引物, 并对薏苡属植物的 DNA 多样性进行了分析, 根据 DNA 多态性特征讨论了薏

苡属植物的遗传进化关系^[7]。当前, 薏苡的基因组信息尚未公布, 相关遗传性研究所用的标记数量极为有限。简单重复序列区间标记 (inter-simple sequence repeats, ISSR) 由于不需要知道研究材料的遗传背景, 多态性高、操作简单, 现已被广泛应用于多种植物的遗传多样性研究^[8-12]。本研究通过筛选 ISSR 分子标记, 对薏苡种质遗传多样性和亲缘关系进行分析, 以期对薏苡优异资源的挖掘、品种改良和分子鉴定提供理论与技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试薏苡种质材料共 92 份, 其中, 86 份来自我国贵州、云南、福建等省份, 5 份来自老挝, 1 份来自韩国, 详见表 1。

1.2 DNA 提取

取薏苡饱满籽粒, 采用苗盘育苗; 待生长至 3 ~ 4 叶, 采用天根植物新型基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 紫外分光光度法检测 DNA 浓度。

1.3 ISSR 扩增

将 DNA 稀释至 30 ~ 50 ng/μL 再进行扩增。PCR 反应体系为 20 μL: 2 × Taq PCR MasterMix 10 μL, 10 μmol/L 引物 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 8.0 μL。反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 45 ~ 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。12 °C 保存, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行 ISSR 分型检测, ISSR 引物来自网络公布的 100 条通用引物, 均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

收稿日期: 2018-04-23

基金项目: 贵州省科技计划 (编号: 黔科合重大专项字 [2014] 6023、黔科合支撑 [2016] 2608); 贵州省高层次创新型人才培养项目 (编号: 黔科合人才 [2015] 4016)。

作者简介: 陆秀娟 (1989—), 女, 布依族, 贵州册亨人, 从事作物栽培与生物技术研究。E-mail: lowaterve_643@126.cm。

通信作者: 李祥栋, 农艺师, 从事植物生理与分子调控研究, E-mail: lixiangdongsjji@163.com; 石明, 研究员, 从事作物遗传育种研究, E-mail: shiming1616@126.com。

structure and gene expression in the drosophilid alcohol dehydrogenase genes *Adh* and *Adhr* [J]. Genetics, 2001, 159 (2): 623-633.

[21] 时慧, 王玉, 杨路成, 等. 茶树抗寒调控转录因子 ICE1 密码子偏性分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(7): 1341-1352.

[22] 苏丽艳, 田爱梅, 陶贵荣, 等. 苹果 *MdCaM* 的克隆及其对果实采

后非生物胁迫的响应 [J]. 华北农学报, 2017, 32(1): 47-52.

[23] Wang X C, Zhao Q Y, Ma C L, et al. Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 415.

[24] 赵存鹏, 郭宝生, 王凯辉, 等. 通过转 *CaM* 基因提高了棉花抗寒性 [J]. 棉花学报, 2016, 28(3): 234-241.