

丁祥青,毕远洋,陈佳婷,等.抱茎金花茶(*Camellia tienii*)的叶绿体基因组特征分析[J].江苏农业科学,2022,50(23):33-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.23.005

抱茎金花茶(*Camellia tienii*)的叶绿体基因组特征分析

丁祥青¹,毕远洋¹,陈佳婷¹,向双²,练芳松³,李文芳³,吴丽君⁴,邹双全²

(1. 福建农林大学园林学院,福建福州 350002; 2. 福建农林大学林学院,福建福州 350002;

3. 福建省洋口国有林场,福建南平 353001; 4. 福建省林业科学研究院,福建福州 350012)

摘要:为明确抱茎金花茶(*Camellia tienii*)的叶绿体全基因组序列,本研究对抱茎金花茶的叶片高通量重测序数据进行叶绿体全基因组的组装和注释分析。抱茎金花茶叶绿体全基因组长为 156 591 bp,是典型的四分体结构,大单拷贝区(LSC)为 86 172 bp、小单拷贝区(SSC)为 18 275 bp、反向重复区(IRs)为 26 072 bp,序列已登录 GenBank (OL435568)。抱茎金花茶叶绿体基因组共预测注释 134 个基因,包括 88 个蛋白编码基因、38 个 tRNA 基因、8 个 rRNA 基因。叶绿体全基因组比较分析表明,抱茎金花茶结构与基因排序均保守,*rps16*、*ycf3*、*ycf4-cemA*、*ycf15-trnL-CAA* 和 *rrn5-trnR-ACG* 序列可作为开发金花茶植物 DNA 条形码研究热点。抱茎金花茶 cpDNA 中共有 67 个 SSR 位点,其中单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、六核苷酸重复数分别为 48、4、1、11、2 个。系统发育分析表明,抱茎金花茶在金花茶组中形成基部分支,和金花茶、显脉金花茶等互为姐妹类群,具有较近的亲缘关系。

关键词:抱茎金花茶;叶绿体基因组;亲缘关系;文库构建;序列比对;系统发育树

中图分类号:S685.140.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)23-0033-07

金花茶隶属于山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)金花茶组(sect. *Chrysantha* Chang)植物,是山茶花中唯一的珍稀金黄色花瓣类型^[1]。花开时呈杯、壶或碗状,花瓣呈亮丽的金黄色,十分夺目,花瓣蜡质似半透明,晶莹且油润,观赏价值极高,被誉为“植物界大熊猫”“幻想中的黄色山茶”,被列为我国一级或二级保护植物^[2]。同时,金花茶的叶、花等器官中含有多种活性成分,如多酚、多糖、黄酮类、皂苷、氨基酸等,在食品或中药中发挥重要作用。金花茶植物主要分布在我国南部亚热带季风气候区和越南北部热带季风区,属分布极为狭窄的植物种群,其狭窄栖息地的气候差异大,导致金花茶的花、叶形态变异丰富,迄今为止已发掘金花茶植物 42 种 5 变种^[3]。抱茎金花茶也称越南黄抱茎金花茶,是一种重要的金花茶植物,因其叶子和茎相抱而得名,其造型独特,花型优美,近年来在园林和园艺界颇受关注。

叶绿体基因组起源于古老的诱捕事件,原始的真核生物捕获并吞噬了古蓝藻成为内共生体,在漫长的进化过程中,蓝藻基因组由于大量基因转移到真核生物核基因组中导致其在遗传上依赖于真核生物而成为一质体基因组,真核生物也因此从异养转变为自养。植物叶绿体基因组(chloroplast DNA,简称 cpDNA)因进化极为保守通常为典型的环状双链四分体结构^[4-6],具有 1 个大单拷贝区(large single copy,简称 LSC)、1 个小单拷贝区(small single copy,简称 SSC)和 1 对反向重复区(inverted repeat,简称 IR)。被子植物叶绿体基因组通常基因结构、基因顺序和含量高度保守,加上结构简单、分子量小,具有易解析、极少发生重组和变异、母系遗传、进化路线独立等特点,在物种鉴定和亲缘关系研究等方面具有独特应用价值和发展前景^[7-8]。

前人对金花茶组植物的分类大都基于表型或者简单的分子标记,表型分类易受环境影响,片段序列分子标记不能完全反映 DNA 相应部位的碱基变异。此外,这些分析所涉及物种不够全面,使得金花茶植物鉴定困难、亲缘关系紊乱,给黄色山茶花种质创新带来巨大困难。现今山茶属系统发育关系尚存争议,虽然此前有 2 项重要研究^[9-10]揭示了部分山茶属植物的叶绿体基因组,为山茶属系统发育关系研究提供了证据,但山茶属系统发育的重

收稿日期:2022-01-05

基金项目:福建省林业科技项目(编号:2021FKJ24);福建省科技创新领军人才专项(编号:118/KRC16006A)。

作者简介:丁祥青(1997—),男,江西九江人,硕士研究生,主要从事园林植物与应用研究。E-mail:303596814@qq.com。

通信作者:邹双全,研究员,研究方向为森林培育和药用观赏植物栽培。E-mail:zou@fafu.edu.cn。

建仍缺乏大量信息^[11]。本研究首次利用 Illumina 测序数据对抱茎金花茶叶绿体全基因组进行了表征,抱茎金花茶叶绿体基因组序列的揭示将为山茶属系统发育、金花茶植物分子鉴定等研究提供大量信息位点。

1 材料与方法

1.1 文库构建和测序

本研究试验材料 2020 年采集于福建省洋口国有林场(117°48′54.18″E,26°47′30.16″N)。采用改良的十六烷基三甲溴化铵法(cetyltrimethylammonium bromide,简称 CTAB)从抱茎金花茶嫩叶中提取 DNA,用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 的浓度和质量,将高质量的 DNA 使用 Covaris 仪超声波打断,通过末端修复、DNA 片段 3′加 A、连接接头处理后,选取 270 bp 的 DNA 片段进行 PCR 扩增,对扩增产物进行引物二聚体去除后,用于构建文库。最后将质量检测合格的文库在 Illumina 平台进行测序。

1.2 序列拼接及注释

SOAPnuke 1.6.5 (<https://github.com/BGI-flexlab/SOAPnuke>) 用于过滤原始数据中的低质量序列,过滤参数为 $-n\ 0.05 -l\ 20 -q\ 0.4 -i -Q\ 2 -G -M\ 2 -A\ 0.5 -d$ 。本研究共获得了 19.03 Gb clean data。用 GetOrganelle 软件^[12]对 clean data 进行自动化组装。组装完成后用 Bandage 软件可视化,去除多余 contig 并编辑成环状,环状序列即为抱茎金花茶叶绿体全基因组序列。以凹脉金花茶(*Camellia impressinervis*) (NC022461)的全叶绿体基因组为参考,用 Plastid Genome Annotator 软件^[13]对抱茎金花茶叶绿体全基因组序列进行预测基因注释。用 Geneious 软件可视化注释结果并人工检查编码基因的起始密码子和终止密码子,得到抱茎金花茶全叶绿体基因组的最终注释结果 GenBank 文件。组装注释好的抱茎金花茶叶绿体全基因组 fasta 文件和 GenBank 文件提交至 NCBI GenBank 数据库(访问号为 OL435568),用 Organellar Genome DRAW (OGDRAW) 软件可视化抱茎金花茶叶绿体全基因组。

1.3 金花茶植物叶绿体基因组比较分析

从 NCBI GenBank 数据库下载山茶(*Camellia japonica*)等 5 个山茶属植物的叶绿体基因组数据,用在线网站 IRscope (<https://irscope.shinyapps.io/irapp/>)进行 IR 边界可视化分析。从 NCBI GenBank

数据库下载贵州金花茶(*Camellia huana*)等 9 个金花茶植物的叶绿体基因组数据(其中显脉金花茶 *Camellia euphlebia* 叶绿体基因组数据为笔者所在课题组测序组装注释并上传),用在线网站 mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>)进行叶绿体基因组比对可视化分析。使用本地 mafft 进行基因序列比对。

1.4 重复序列及 SSR 鉴定

用在线软件 REPuter 鉴定抱茎金花茶 cpDNA 中的重复序列,包括正向重复(F)、反向重复(R)、互补重复(C)和回文重复(P),最小重复设置为 30 bp,最小重复序列长度距离设置为 3。用在线网站 MISA (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>)进行简单重复序列(simple sequence repeat,简称 SSR)识别,将单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的最小重复数分别设置为 8、5、4、3、3、3、2 个 SSR 之间的最小距离设置为 100 bp。

1.5 系统发育树构建

从 NCBI GenBank 数据库下载大头茶(*Polyspora axillaris*)、长果大头茶(*Polyspora longicarpa*)和 18 个金花茶植物的叶绿体基因组序列。用本地 MAFFT 进行多序列比对,以大头茶(*Polyspora axillaris*)和长果大头茶(*Polyspora longicarpa*)为外类群用在线网站 CIPRES (<http://www.phylo.org/>)的 RAxML-HPC2 on XSEDE 构建系统发育树,用 Bootstrap method 进行自展值检验,设置 1 000 次重复。

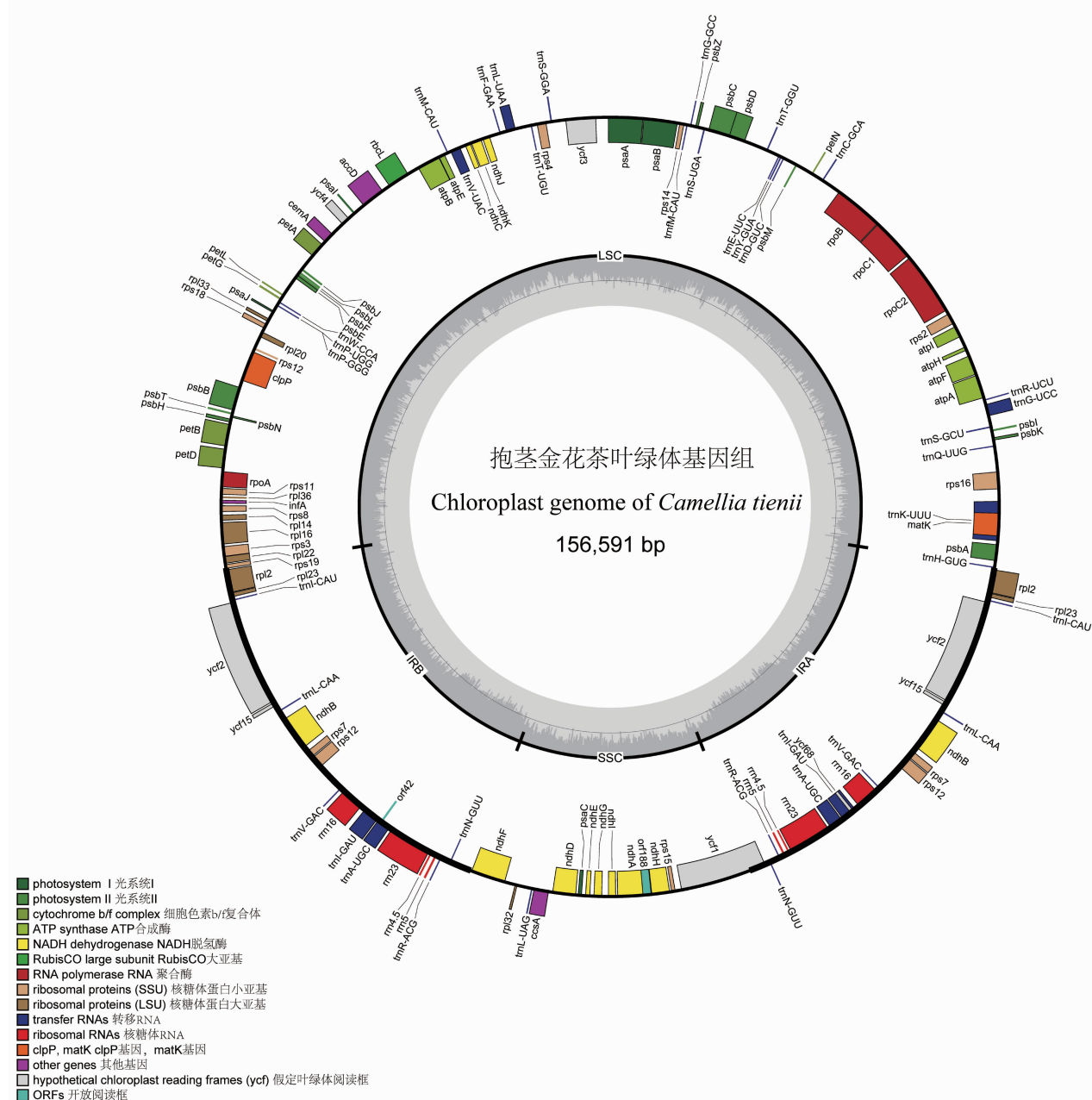
2 结果与分析

2.1 抱茎金花茶叶绿体基因组基本特征

抱茎金花茶叶绿体基因组为共价闭合的双链环状分子,全长 156 591 bp, LSC 为 86 172 bp、SSC 为 18 275 bp、IR 为 26 072 bp(图 1)。抱茎金花茶叶绿体基因组中共预测注释到 134 个基因(表 1),包括 88 个蛋白编码基因,38 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。88 个蛋白编码基因中包含 29 个与自我复制有关的基因,45 个与光合作用有关的基因,6 个其他编码蛋白质的基因和 8 个功能未知的基因。134 个基因中有 95 个基因是独特的,其余 39 个基因位于反向重复区,位于反向重复区的基因包含 17 个蛋白编码基因(1 个 *rps19*、1 个 *ycf1*、1 个 *ycf68*、2 个 *rpl2*、2 个 *rpl23*、2 个 *ycf2*、2 个 *ycf15*、2 个 *ndhB*、2

个 *rps7*、2 个 *rps12*), 14 个 tRNA 基因 (2 个 *trnI* - CAU、2 个 *trnL* - CAA、2 个 *trnV* - GAC、2 个 *trnL* - GAU、2 个 *trnA* - UGC、2 个 *trnR* - ACG、2 个 *trnN* - GUU) 和 8 个 rRNA 基因 (2 个 *rrn16*、2 个

rrn23、2 个 *rrn4*、5、2 个 *rrn5*)。抱茎金花茶叶叶绿体基因组中有 16 个基因含有 1 个内含子, 2 个 (*clpP*、*ycf3*) 基因含有 2 个内含子。抱茎金花茶全叶绿体基因组 GC 含量为 37.3%, AT 含量为 62.7%。



2.2 IR 边界的扩张与收缩

通过比较 6 种山茶属植物 (山茶、毛瓣金花茶、贵州金花茶、离蕊金花茶、凹脉金花茶、抱茎金花茶) 叶绿体基因组 IR 区与 LSC 和 SSC 区的边界, 发现山茶属植物的叶绿体基因组较为保守, 但总体上金花茶植物与山茶的叶绿体基因组边界存在一定差异 (图 2)。

叶绿体基因组最长的为毛瓣金花茶, 为 156 993 bp; 最短的为抱茎金花茶, 为 156 591 bp。其基因组长度的差异主要发生在 LSC 区, 相比于山茶, 5 种金花茶植物的 IR 区更长而 SSC 区更短, 表明金花茶植物在进化过程中叶绿体基因组 IR 区可能有一定扩张。6 个山茶属植物的 *rps19* 基因均跨越 LSC 和 IRb 边

表 1 抱茎金花茶叶绿体基因组注释基因

功能	家族	基因
自我复制	核糖体小亚基	<i>rps2, rps3, rps4, rps7^a, rps8, rps11, rps12^{ab}, rps14, rps15, rps16^b, rps18, rps19</i>
	rRNA	<i>rrn4. 5^a, rrn5^a, rrn16^a, rrn23^a</i>
	核糖体大亚基	<i>rpl12^{ab}, rpl14, rpl16^b, rpl20, rpl22, rpl23^a, rpl32, rpl33, rpl36</i>
	DNA 依赖性 RNA 聚合酶	<i>rpoA, rpoB, rpoC1^b, rpoC2</i>
	tRNA	<i>trnA - UGC^{ab}, trnC - GCA, trnD - GUC, trnE - UUC, trnF - GAA, trnG^b - CAU, trnG - GCC, trnG - UCC^b, trnH - GUG, trnI - CAU^a, trnI - GAU^{ab}, trnK - UUU^b, trnL - CAA^a, trnL - UAA^b, trnL - UAG, trnM - CAU, trnN - GUU^a, trnP - GGG, trnP - UGG, trnQ - UUG, trnR - ACG^a, trnR - UCU, trnS - GCU, trnS - GGA, trnS - UGA, trnT - GGU, trnT - UGU, trnV - GAC^a, trnV - UAC^b, trnW - CCA, trnY - GUA</i>
光合作用	ATP 合酶亚基	<i>atpA, atpB, atpE, atpF^b, atpH, atpI</i>
	NADH - 脱氢酶的亚基	<i>ndhA^b, ndhB^{ab}, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	细胞色素 b/f 复合物的亚基	<i>petA, petB^b, petD^b, petG, petL, petN</i>
	光系统 I 的亚基	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
	光系统 II 的亚基	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	二磷酸核酮糖氧合酶/羧化酶亚基	<i>rbcL</i>
其他	乙酰 - CoA - 羧化酶的亚基	<i>accD</i>
	包膜蛋白基因	<i>cemA</i>
	c 型细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>
	蛋白酶基因	<i>clpP^c</i>
	成熟酶基因	<i>matK</i>
	转录起始因子	<i>infA</i>
	假定叶绿体阅读框	<i>ycf1, ycf2^a, ycf3^c, ycf4, ycf15^a, ycf68</i>

注: a 表示 IR 中有 2 个基因拷贝; b 表示包含 1 个内含子的基因; c 表示包含 2 个内含子的基因。

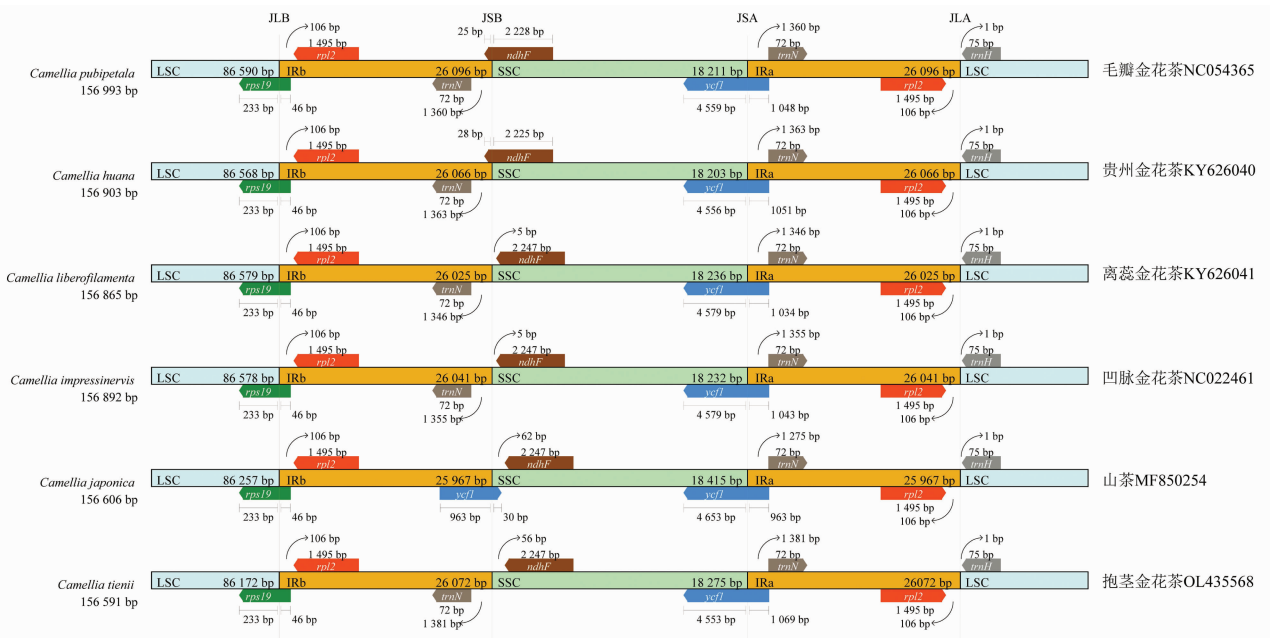


图 2 抱茎金花茶和其他 5 种山茶属物种叶绿体基因组的四分体边界对比

界;毛瓣金花茶和贵州金花茶的 *ndhF* 基因跨越 IRb 和 SSC,而其他 4 种植物的 *ndhF* 基因完全位于 SSC;*ycf1* 基因均跨越 SSC 和 IRa;*trnH* 基因均位于位于 LSC。

2.3 重复序列和 SSR 分析

重复序列分析结果如图 3 所示,抱茎金花茶叶绿体基因组含 36 条重复序列,其中有 21 条回文重复(P)和 15 条正向重复(F),重复序列长度范围为

30 ~ 64 bp。在抱茎金花茶叶绿体全基因组中检测到 67 个 SSRs 位点,包含 6 种碱基重复类型,其中单碱基重复 48 个、二碱基重复 4 个、三碱基重复 1 个、

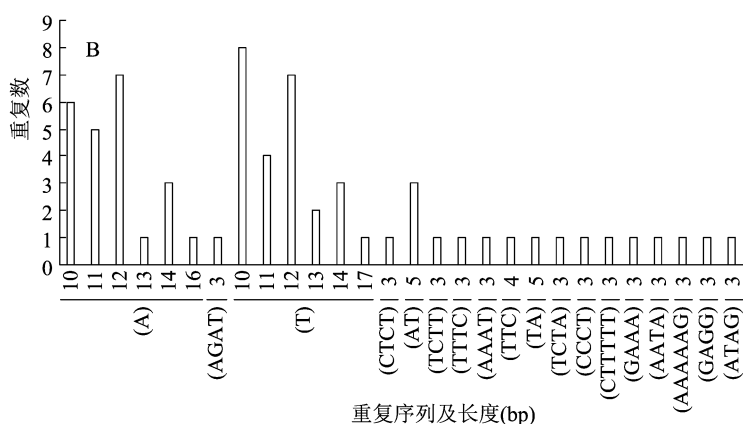
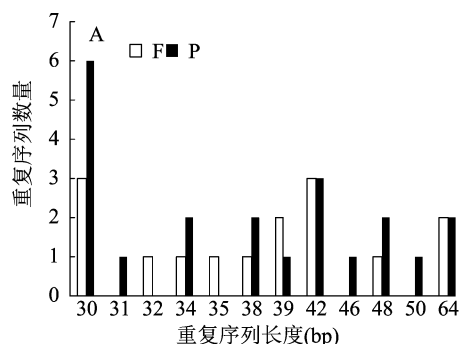


图3 抱茎金花茶叶绿体基因组 SSR 位点分布

2.4 金花茶植物叶绿体基因组比较

以毛瓣金花茶 (*Camellia pubipetala*) 叶绿体基因组序列为参考,对 9 种金花茶植物的叶绿体基因组序列进行了可视化比对分析 (图 4)。金花茶植物叶绿体基因组序列高度相似,表明其进化十分保守。但金花茶植物叶绿体基因组序列依然存在一些差异位点,且差异性表现为非编码区 > 编码区、LSC > SSC > IR。编码区存在较高差异的序列为 *rps16* 和 *ycf3* 基因,非编码区存在较高差异的序列为 *ycf4 - cemA*、*ycf15 - trnL - CAA* 和 *rnn5 - trnR - ACG*,这些高变异序列经后续深入研究有望成为金花茶植物可靠的分子标记。随后选取毛瓣金花茶和抱茎金花茶的 *ycf15 - trnL - CAA* 序列进行比对 (图 5),这段序列长度为 370 bp,在 215 bp 和 306 ~ 309 bp 的位置存在差异,可以有效区别毛瓣金花茶和抱茎金花茶,碱基差异可能是由于不同的生存环境造成。

2.5 系统进化分析

为了解析金花茶植物的系统发育关系,以大头茶和长果大头茶为外类群,利用 19 个金花茶物种的全叶绿体基因组构建系统发育树。结果 (图 6) 表明,金花茶 (NC024661)、小果金花茶、龙州金花茶、金花茶 (NC039645)、显脉金花茶组成的分支和抱茎金花茶的分支互为姊妹分支,具有较近的亲缘关系,且自展支持率为 68%。小黄花茶在金花茶组植物中形成一个基部分支,然后是抱茎金花茶。根据聚类结果,可以将所选金花茶植物归为 6 个大类。第 1 类为小黄花茶;第 2 类为抱茎金花茶、显脉金花茶这一分支;第 3 类为簇蕊金花茶;第 4 类为薄叶金花茶、小花进化茶、富宁金花茶、离蕊金花茶;第 5 类

四碱基重复 11 个、六碱基重复 2 个,混合型 SSR 1 个。67 个 SSR 中有 40 个位于基因间区,10 个位于内含子,17 个位于外显子。

为凹脉金花茶、东兴金花茶;第 6 类为顶生金花茶、毛瓣金花茶、贵州金花茶、崇左金花茶、四季金花茶。每一类的金花茶植物彼此间有较近的亲缘关系。

3 讨论与结论

本研究采用双末端测序策略对抱茎金花茶进行了基因组重测序,组装并注释了抱茎金花茶的全叶绿体基因组,这为金花茶植物的物种鉴定和亲缘关系等研究提供了数据支持。抱茎金花茶全叶绿体基因组大小、结构、基因组成和顺序、CG 含量等均与山茶属其他已报道的植物 (山茶、浙江红花油茶、凹脉金花茶等) 相似。分析发现,抱茎金花茶叶绿体基因组 *ndhD* 具有非标准起始密码子 ACG。一些山茶属植物 *atpB* 和 *atpE* 有 3 bp 的重叠区域,*psbC* 和 *psbD* 有 52 bp 的重叠区域^[10],而在抱茎金花茶中 *atpB* 和 *atpE* 的重叠区域为 4 bp,*psbC* 和 *psbD* 的重叠区域为 52 bp。此外,在抱茎金花茶中 *trnP - GGG* 和 *trnP - UGG* 重叠,这与油茶结论^[14]一致。值得注意的是,大多数山茶属植物叶绿体全基因组 GC 含量均为 37.3%,基因组的 GC 含量是判断物种间亲缘关系的重要指标^[15];在被子植物的很多类群中 *infA* 和 *rps16* 常从叶绿体基因组中丢失^[16],而在山茶属叶绿体基因组中这些基因依然保留;相比于禾本科 (132 bp) 和豆科 (287 bp)^[10],抱茎金花茶的重叠序列长度较短 (30 ~ 64 bp) 且数量相对较少,种种迹象均表明,山茶属植物叶绿体基因组的进化可能是缓慢而保守的。

简单重复序列 (SSR) 是指分布在整个基因组中 1 ~ 6 bp 的重复序列,是一种高效分子标记^[7,17]。在

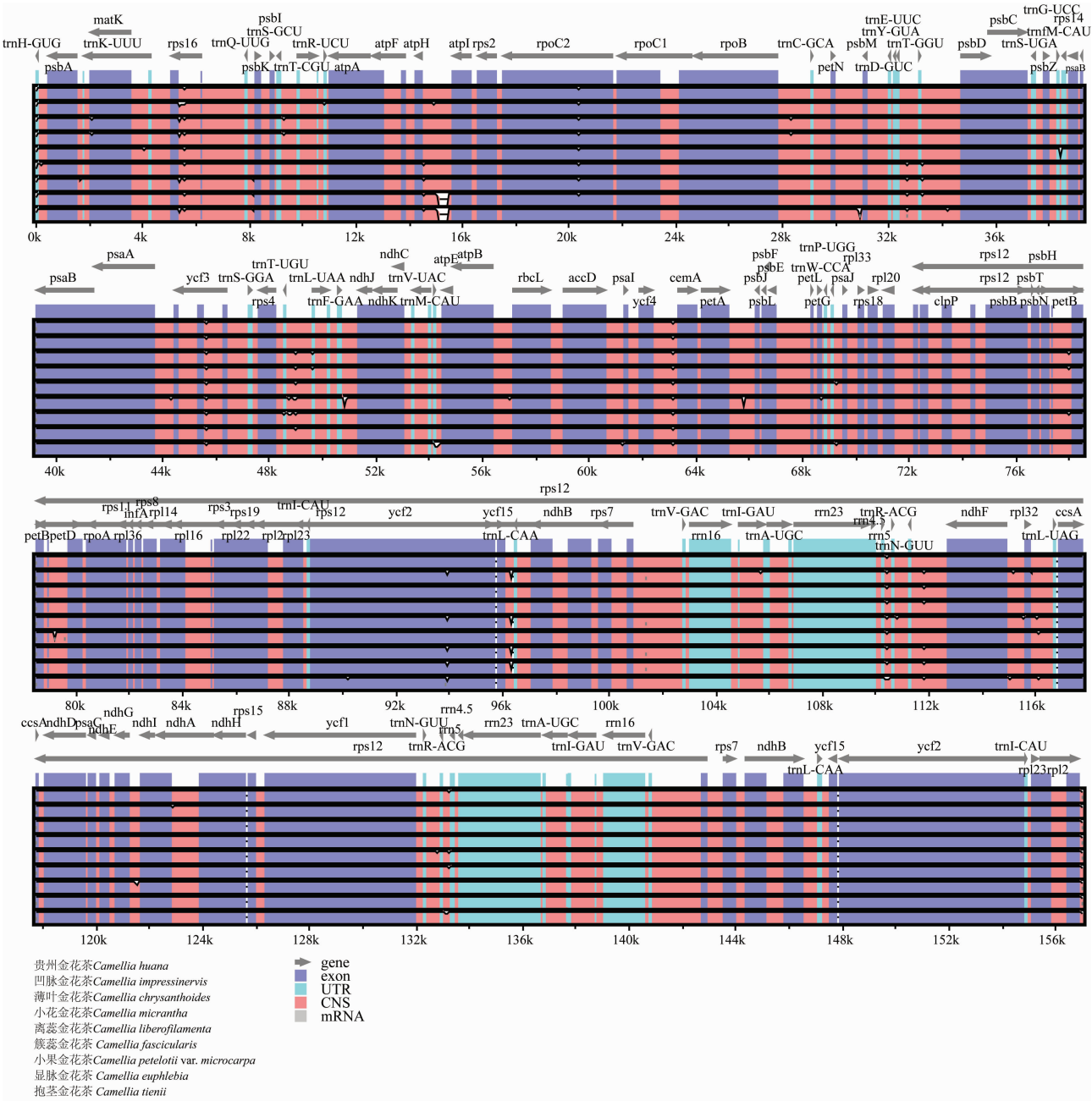


图 4 10 种金花茶植物叶绿体基因组序列比较分析

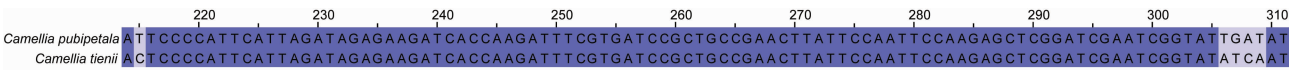


图 5 毛瓣金花茶和抱茎金花茶叶绿体基因组 ycf15-trnL-CAA 序列比对分析

抱茎金花茶 cpDNA 中发现 67 个 SSR 位点,出现最多的 SSR 为单碱基重复,全部由 A/T 组成,而在二至六碱基重复中也有明显的 A/T 碱基偏好性。在抱茎金花茶中检测到的 SSR 包含 6 种碱基重复类型,而在红花油茶中仅鉴定出了 A/T 单碱基重复类型^[4],表明同为山茶属的抱茎金花茶和红花油茶的叶绿体基因组序列存在较大差异。近年来,基于叶

绿体基因组筛选 DNA 条形码进行物种鉴定的技术日趋成熟^[18-19],陈莹等在进行金花茶组种间鉴别研究中发现 rpl16 系列和 psbA-tmH 序列能准确鉴别毛瓣金花茶^[20],本研究鉴定了 rps16、ycf3、ycf4-cemA、ycf15-trnL-CAA 和 rrn5-trnR-ACG 等高变异序列,这些序列的揭示能够为金花茶植物 DNA 条形码的开发提供大量信息位点。

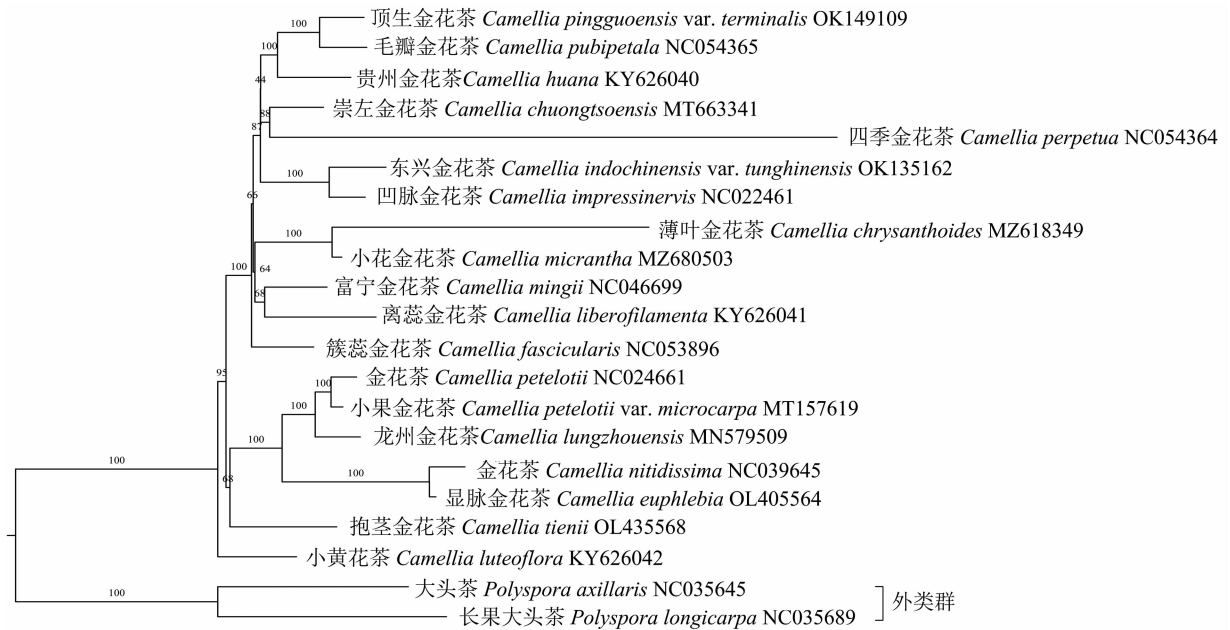


图6 抱茎金花茶等 19 个金花茶植物的叶绿体全基因组系统发育树

金花茶首次在我国广西发现,其金黄色、蜡质光泽的花瓣填补了山茶家族没有金黄色花的空白。研究者经过 30 多年的努力,明确了最适作为培育黄色系山茶花品种的杂交父母本分别为金花茶植物和山茶植物^[2]。由于金花茶植物表型、生境相似,难以分辨,大量杂交种存在鉴定困难、亲本不明、亲缘关系紊乱等问题,严重滞缓了黄色山茶花新品种的培育进程。因此,明确金花茶植物间的亲缘关系对于黄色山茶花的培育具有重要价值。肖丽梅通过对金花茶植物花粉形态聚类分析认为,毛籽金花茶与东兴金花茶的亲缘关系较近^[21];覃冬梅通过对金花茶叶片形态进行聚类分析认为,柠檬黄金花茶和四季金花茶亲缘关系较近^[22];刘付永清利用叶绿体小单拷贝序列对金花茶植物的系统发育关系进行研究,认为地理分布相近的金花茶植物亲缘关系也较近^[23]。本研究结果表明,抱茎金花茶和金花茶(NC024661)、小果金花茶、龙州金花茶、金花茶(NC039645)、显脉金花茶等亲缘关系较近,为杂交育种培育黄色山茶花奠定了相关理论基础。

参考文献:

- [1] 郑贺文. 基于 nrITS 序列及 ddRAD-seq 数据研究我国金花茶植物的系统发育关系[D]. 桂林:广西师范大学,2021.
- [2] 吴丽君,陈 达,陈文荣,等. 几种金花茶组植物的远缘杂交育种[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2018,47(1):32-37.
- [3] 吴丽君,郑惠成,陈文荣,等. 福建金花茶组植物引种栽培现状与思考[J]. 福建林业科技,2020,47(2):109-115.
- [4] 李 倩,郭其强,高 超,等. 贵州威宁红花油菜的叶绿体基因组特征分析[J]. 园艺学报,2020,47(4):779-787.
- [5] 李泳潭,张 军,黄亚丽,等. 杜梨叶绿体基因组分析[J]. 园艺学报,2020,47(6):1021-1032.
- [6] 杨亚蒙,焦 健,樊秀彩,等. 桑叶葡萄叶绿体基因组及其特征分析[J]. 园艺学报,2019,46(4):635-648.
- [7] 郑 伟,张 卉,王钦美,等. 大花君子兰叶绿体基因组及其特征[J]. 园艺学报,2020,47(12):2439-2450.
- [8] Gu L, Su T, An M T, et al. The complete chloroplast genome of the vulnerable *Oreocharis esquirolii* (Gesneriaceae): structural features, comparative and phylogenetic analysis [J]. Plants, 2020, 9(12):1692.
- [9] Li W, Zhang C P, Guo X, et al. Complete chloroplast genome of *Camellia japonica* genome structures, comparative and phylogenetic analysis[J]. PLoS One, 2019, 14(5):e0216645.
- [10] Huang H, Shi C, Liu Y, et al. Thirteen *Camellia* chloroplast genome sequences determined by high-throughput sequencing: genome structure and phylogenetic relationships [J]. BMC Evolutionary Biology, 2014, 14:151.
- [11] Yang J B, Yang S X, Li H T, et al. Comparative chloroplast genomes of *Camellia* species[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e73053.
- [12] Jin J J, Yu W B, Yang J B, et al. GetOrganelle: a simple and fast pipeline for de novo assembly of a complete circular chloroplast genome using genome skimming data[EB/OL]. (2018-03-14) [2021-12-15]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/256479v3.full.pdf+html>.
- [13] Qu X J, Moore M J, Li D Z, et al. PGA: a software package for rapid, accurate, and flexible batch annotation of plastomes [J]. Plant Methods, 2019, 15:50.
- [14] Zhang W, Zhao Y L, Yang G Y, et al. Determination of the evolutionary pressure on *Camellia oleifera* on Hainan Island using

张志国,丁寒雪,蒋成娣,等. 重瓣萱草 *AGAMOUS* 基因的克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(23):40-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.23.006

重瓣萱草 *AGAMOUS* 基因的克隆与表达分析

张志国^{1,2}, 丁寒雪¹, 蒋成娣¹, 张世杰¹, 王艺程¹, 秦巧平¹, 刘翔¹

(1. 上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海 201400; 2. 金华花卉苗木产业研究院, 浙江金华 321000)

摘要: *AGAMOUS* (*AG*) 基因是花发育 ABC 模型中的 C 类基因, 通过对各类观赏植物的重瓣化诱导研究发现, C 类基因突变会诱导产生重瓣花。萱草作为园林景观的应用植物, 其花型补充改造一直是育种研究的重要目标之一。以单瓣萱草品种秋红、重瓣萱草 AH6 为试验材料, 克隆 C 类基因 *AG* 的全长 cDNA, 分别将其命名为 *qhHfAG*、*ahHfAG*, 并进行生物信息学分析, 用 Real-time PCR 分析其表达模式。结果表明, *HfAG* 全长为 624 bp, 编码 207 个氨基酸, 具有典型的植物 MADS-box 基因结构, 但是与其他物种相比缺少 *AG* 基序 II。与单瓣品种相比, 重瓣品种中部分氨基酸位点发生了变化, 这也导致重瓣品种该蛋白的疏水性、不稳定指数和二级结构发生了改变, 推测这可能是导致重瓣表型的原因。Real-time PCR 分析结果表明, 在不同瓣化程度的萱草品种中, *HfAG* 基因在花器官中的相对表达量有差异。研究首次从萱草中克隆出 *AG* 基因并进行分析, 并对单瓣、重瓣萱草基因序列进行比较, 进一步探究 C 类基因在重瓣表型萱草培育中发挥的功能, 为通过基因工程手段开展萱草重瓣育种奠定了基础。

关键词: 萱草; *AGAMOUS* 基因; 重瓣花; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S682.1+90.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)23-0040-09

花发育的 ABC 模型是一种成花模型, 描述了在花的不同部位, 不同转录因子对花器官形成的作用。其中 C 类基因主要控制心皮、雄蕊的发育, *AGAMOUS* (*AG*) 是拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中唯一的 C 类基因, 也是第一个被分离的 MADS-box 基因^[1]。迄今, 人们已经从不同植物中克隆并鉴定了

很多 *AG* 同源基因, 尽管这些基因在序列上存在些许差异, 但功能是基本保守的^[2]。*AG* 基因的主要功能包括以下几个方面: 抑制 A 功能基因在第 3 轮、第 4 轮中的异常表达; 在前期调控雄蕊、心皮和胚珠的正常发育; 在后期控制细胞分化, 终止花分生组织的分化以保证花器官的特征和数量^[3]。1990 年 Yanofsky 等通过 T-DNA 插入突变技术, 获得了 *AG* 基因突变的重瓣表型拟南芥 (图 1), 其 6 枚雄蕊被 6 枚花瓣取代, 与 4 枚正常的花瓣形成了具有 10 枚花瓣的突变体, 而心皮也被 4 枚萼片和 10 枚花瓣取代, 具有花中花的整体表型^[1]; 同年, Carpenter 等通过转座子诱变试验, 获得了 10 种花器官同源异型突变的金鱼草 (*Antirrhinum majus*), 其中 *pleniflora-624*、*pleniflora-625* 和 *pleniflora-626* 的表型非常相

收稿日期: 2021-12-24

基金项目: 上海市农业农村委员会科技兴农项目 (编号: 2019-02-08-00-08-F0110); 上海应用技术大学科技处引进人才科研启动项目 (编号: 39120K196025-A06); 沪农科推字 (2019) 第 1-8 号 (编号: 262201210095-A06)。

作者简介: 张志国 (1957—), 男, 山东滨州人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为园林植物育种。E-mail: zgzhang@sit.edu.cn。

通信作者: 刘翔, 博士, 副研究员, 研究方向为倍性育种与分子育种。E-mail: liuxiang@sit.edu.cn。

the complete chloroplast genome sequence [J]. PeerJ, 2019, 7: e7210.

[15] 周晓君, 张凯, 彭正锋, 等. 矮牡丹与芍药属其他 5 个种叶绿体基因组特征的比较 [J]. 林业科学, 2020, 56(4): 82-88.

[16] 王玲, 董文攀, 周世良. 被子植物叶绿体基因组的结构变异研究进展 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(6): 1282-1288.

[17] 杜久军, 左力辉, 刘易超, 等. 裂叶榆叶绿体基因组及 CP-SSR 位点分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(6): 1187-1196.

[18] 温贝贝, 邓丽, 叶霞, 等. DNA 条形码在山茶属近缘植物鉴别中的应用 (英文) [J]. 广东农业科学, 2017, 44(1): 55-65.

[19] 苏玥, 刘娟娟, 完斌, 等. 乳苣叶绿体基因组特征及其系统发育分析 [J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(6): 33-42.

[20] 陈莹, 郭蓓琳, 姚丽敏, 等. 基于 DNA 条形码进行金花茶组种间鉴别 [J]. 种子, 2021, 40(2): 139-142.

[21] 肖丽梅. 金花茶组植物开花生物学特性及花粉粒形态初步研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2019.

[22] 覃冬梅. 6 种金花茶叶片表型和 SCoT 遗传多样性研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2020.

[23] 刘付永清. 基于叶绿体 SSC 序列的金花茶植物系统发育研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2015.