

doi: 10.3969/j.issn.2095-1914.2012.03.011

蓖麻 *LPAAT* 基因序列的 SNPs 及与油脂的相关性

徐宸敏¹ 刘小烛¹ 刘爱忠²

(1. 西南林业大学林学院, 云南 昆明 650224; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部, 云南 昆明 650223)

摘要: *LPAAT* 对蓖麻储存油脂 (triacylglycerols, TAG) 的合成调控具有重要作用。为了研究蓖麻 *LPAAT* 的多态性, 参考 GenBank 中编码蓖麻 *LPAAT* 的基因组序列设计引物, 对来自 32 个不同地区蓖麻种质的 *LPAAT* 进行测序, 获得长约 804 bp 的基因组序列。多态分析表明: 在 804 bp 的区间内共发现 2 个 SNP 和 3 个 InDel, SNP 频率为 1/161 bp, 多样性指数 P_i 为 0.000 67。在外显子区域, 有 1 个 SNP 和 2 个 InDel, 其中 2 个为同义突变, 1 个为错意突变。结果表明, 基因 *LPAAT* 的 exon10 与种子油脂含量有明显相关性。

关键词: 蓖麻; 单核苷酸多态性; *LPAAT*; 油脂

中图分类号: S330; Q943

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2012)03-0051-04

Correlation Between Single Nucleotide Polymorphisms of *LPAAT* Gene Sequence and Oil Content of *Ricinus communis*

XU Chen-min¹, LIU Xiao-zhu¹, LIU Ai-zhong²

(1. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming Yunnan 650224, China;

2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Kunming Yunnan 650223, China)

Abstract: The *LPAAT* gene of *Ricinus communis* plays an important role in synthesizing and regulating the fatty acid (triacylglycerols, TAG). In order to study the diversity of *LPAAT* gene in *R. communis*, the *LPAAT* sequencing of the *R. communis* germplasm collected from 32 different areas was conducted by referring the *LPAAT* gene sequencing primers of *R. communis* in the GenBank, and a genomic sequence with 804bp was obtained. The results from the diversity analyses showed that there were 2 SNPs and 3 InDels among the 804bp sequence, the SNP frequency was 1/161bp, and the nucleotide diversity index (P_i) was 0.000 67. There were 1 SNP and 2 InDels located at exon, two of them were nonsense mutations; the other one was missense mutation. The results showed that the exon 10 of *LPAAT* gene was related to the oil content of *R. communis*.

Key words: *Ricinus communis*; single nucleotide polymorphism (SNP); *LPAAT*; oil

蓖麻 (*Ricinus communis* L.) 是大戟科多年生二倍体植物 ($2n = 20$), 具有适应性强、不与粮食争地等特征, 其种子油脂成分富含的蓖麻油酸可转化为优质的生物柴油, 近年来, 在生物柴油的开发和产业化发展中受到国内外的高度关注^[1-2]。然而, 迄今为止, 蓖麻尚未形成真正的高产品种, 发展高产

优质品种是当前实现产业化发展的关键, 其前提是了解蓖麻种子油脂在种子发育过程中积累的遗传机制。三酯酰甘油 (triacylglycerols, TAG) 是植物种子 (或果实) 中油脂储存的主要形式。植物体内 TAG 的生物合成 (或装配) 主要是通过肯尼迪途径 (Kennedy pathway, KP) 实现的^[3-4]。甘油磷酸酯酰

收稿日期: 2011-12-30

基金项目: 国家自然科学基金 (30871548) 项目资助; 中国科学院“百人计划”择优支持基金 (KSCX2-Y-GW-035-1) 项目资助。

第1作者: 徐宸敏 (1985—), 女, 硕士生。研究方向: 植物学、植物生物技术。E-mail: xuchenmin09@gmail.com。

通信作者: 刘爱忠 (1969—), 男, 研究员, 博士生导师。研究方向: 植物学、分子遗传与育种。E-mail: aizhongliu@gmail.com。

转移酶(1-acyl-acyl-glycerol-3-phosphate-acyltransferase, LPAAT)是TAG油脂组装途径的第2个酶,其主要功能体现在:三磷酸甘油和酰基辅酶A(Acyl-CoA)在GPAT的催化下反应生成溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid,简称LPA)和CoA;LPA和Acyl-CoA在LPAAT的催化下反应生成磷脂酸(phosphatidic acid,简称PA)和CoA^[4]。

通过采用RAPD、AFLP、ISSR、SSR、SNP等多种分子标记方法研究表明,蓖麻的遗传多样性普遍较低^[5-9]。SNP作为第3代分子标记,是分布最广泛、存在数量最多且标记密度最高的一种遗传多样性标记方法,易于快速且高通量地进行基因分型。SNP的检测既可用DNA芯片进行高通量自动化操作,又能用低成本的PCR方法实现。所以,基于SNP的分子标记日益成为遗传学及分子标记辅助育种的一个有力工具^[10]。

近年来LPAAT基因在动植物中的功能已逐步得到验证^[4-6],但在遗传多样性方面的研究则较少。本研究根据已报道的蓖麻LPAAT基因序列设计1对特异性引物,以来自不同地区的32份蓖麻为材料,结合PCR产物测序和克隆测序技术,比较序列差异,寻找单核苷酸多态性SNP位点和相应编码的氨基酸变异位点,获取相关生物学信息,分析单核苷酸变异与油脂数量性状的相关性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以购至美国国家种质资源库的32份蓖麻为试材,试材来源分别为:叙利亚2个、阿尔及利亚2个、摩洛哥2个、巴基斯坦2个、土耳其3个、前苏联2个、南非2个、马达加斯加1个、伊朗3个、印度3个、扎伊尔2个、阿富汗1个、俄罗斯1个、越南1个、贝宁1个、埃及1个、德兰瓦市1个、希腊1个、中国1个,共计来自19个国家和地区,具有广泛的多样性。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取及检测 剥掉蓖麻的果皮,盛于放有滤纸的培养皿中,加入少量清水,暗培养48 h后,光照培养4~5 d;萌芽后种植于西双版纳热带植物园昆明分部的温室中,出苗后14 d左右采集幼嫩叶片(约100 mg),共采集32份,用液氮及时速冻后保存于-80℃的超低温冰箱中备用。采用改良CTAB法提取DNA^[11],1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。用紫外分光光度计(Beckman, DU800)测量DNA浓度。根据检测结果,将各样品

的DNA浓度调整至10 ng/μL,-20℃保存备用。

1.2.2 引物设计及PCR扩增 根据GenBank公布的LPAAT基因序列(NW_002994515),利用Primer 5.0和Oligo 6.0软件设计一对特异性引物LPAAT F:5'-ATTAAACGGCATTGATGAAGG3';LPAAT R:5'-CAGGCACGGTTGATACATTCTA3'。所扩增序列包括第9、10两个内含子的全部碱基,9、11两个外显子的部分碱基和第10个外显子的全部碱基。引物由北京精塞顿生物技术有限公司合成。

PCR扩增体系20 μL: dd H₂O 12.5 μL, 10×buffer 2.0 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 0.7 μL, dNTP (10 mmol/L) 2 μL, 引物(10 μmol/L)各1 μL, Tag酶0.5 U, DNA模板(10 ng/μL) 2 μL。扩增条件:95℃变性3 min;95℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸1 min,共36个循环;72℃延伸7 min,4℃保存。产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR产物测序、克隆及比对 将PCR扩增产物纯化后送至上海生物工程有限公司测序。对不同基因型个体的PCR产物于1%琼脂糖凝胶上电泳后回收纯化,将产物连接到T质粒上,转化至DH5α大肠杆菌感受态细胞中,涂布在含X-gal、IPTG和Amp的LB固体培养基上,37℃培养12~24 h,随机挑取白色阳性菌落,接种于含Amp的液体LB培养基中,振荡过夜培养。经菌液PCR鉴定后筛选阳性转化子送至上海生物工程有限公司测序。将所测的序列结果在NCBI网站上通过Blast n进行序列相似性分析,用MEGA和DNAsp软件进行序列比较分析。

1.2.4 种质油脂含量的测定 用核磁共振脂肪测定仪(Soxtec 2050, Denmark)测定蓖麻种子的总油脂含量,32个供试样品均取5粒种子总油脂含量的平均值。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增产物

用所设计的引物LPAAT F和LPAAT R,分别以32份蓖麻叶片的DNA为模板进行PCR扩增。部分所得PCR产物的琼脂糖电泳检测结果表明,扩增片段与目的片段大小一致且特异性很好(图1)。

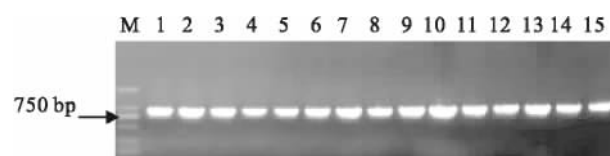


图1 LPAAT基因的PCR扩增产物

2.2 测序及同源性分析

PCR 产物测序后,发现部分序列有套峰,所以采用单克隆测序。结果共得到 38 个 *LPAAT* 片段,长度约为 804 bp。经 MEGA 去除因测序引起的不准确序列后,余下 804 bp 为准确可靠的结果。分别将这些序列与 NCBI 上公布的蓖麻 *LPAAT*(NW_002994515) 比对,其同源性均在 99% 以上,说明克隆的序列为目的序列。

2.3 *LPAAT* 基因的 SNPs 分析

运用 MEGA 软件,对所克隆的序列进行 SNP 分析,在 804 bp 的区间内共检测到 5 个单核苷酸变异位点,SNP 频率为 1/161 bp; 在外显子区域,有 1 个 SNP 和 2 个 InDel,其中 1 个 SNP 和 1 个 InDel 为同义突变,另 1 个 InDel 为错意突变(T/-),该错意突变位于蓖麻 *LPAAT* 基因全长的 exon10 区域; 一个 SNP 和 1 个 InDel 在内含子区域(表 2)。

表 2 *LPAAT* 基因片段单核苷酸变异位点

项目	变异位点 1	变异位点 2	变异位点 3	变异位点 4	变异位点 5
位点	44	68	561	651	652
类型	A/C	InDel	A/G	InDel	InDel
位置	intron9	intron9	exon10	exon10	exon10

2.4 *LPAAT* 基因的遗传多样性分析

运用 DNAsp5.0 软件分析所得序列。多样性指数 P_i 为 0.000 67,每个位点变异频率(Theta)为 0.000 53。InDel 单倍型 3 个,InDel 单倍型多样性 0.294。

2.5 *LPAAT* 与油脂含量的关系

32 个不同来源蓖麻种质的总油脂含量测定结果见表 1。

表 1 供试材料名称和总油脂含量

供试品种来源	品种名称	总油脂含量 / %	供试品种来源	品种名称	总油脂含量 / %
叙利亚	IS1	45.843	伊朗	IR1	49.727
叙利亚	IS2	48.216	伊朗	IR2	52.042
阿尔及利亚	AL1	44.274	伊朗	IR3	49.252
阿尔及利亚	AL2	44.707	印度	IN1	52.180
摩洛哥	MO1	53.028	印度	IN2	49.727
摩洛哥	MO2	49.769	印度	IN3	45.476
巴基斯坦	PA1	51.043	扎伊尔	ZA1	46.759
巴基斯坦	PA2	50.465	扎伊尔	ZA2	48.944
土耳其	TU1	50.014	阿富汗	AF1	50.161
土耳其	TU2	47.785	俄罗斯	RU	48.866
土耳其	TU3	46.797	越南	VII	49.606
前苏联	FS1	52.340	贝宁	BE1	49.606
前苏联	FS2	52.582	埃及	EG1	50.772
南非	SA1	48.750	德兰士瓦	TR1	49.031
南非	SA2	50.187	希腊	GR1	52.621
马达加斯加	MA1	44.633	中国	CHI	50.161

3 组 exon10 SNP 基因型的种子平均油脂含量分别为 49.572% (T/T)、49.176% (T/-)、46.718% (-/-)。经 SPSS 成对双样本均值分析表明: T/T 和 T/-、T/- 和 -/- 之间无显著性差异, P 值分别是 0.058 2、0.303 6 ($P > 0.01$); 而 T/T 和 -/- 之间 P 值为 0.000 2, $P < 0.01$, 表明这 2 种基因型的含油量有显著性差异。

3 讨论

SNP 在植物基因组中广泛存在,在水稻(*Oryza sativa*) 品种日本晴和 9311 中,利用全基因组测序数据已经获得了 5 019 016 个 SNP 位点,平均 539 bp 中存在一个 SNP 位点^[12]。SNP 广泛分布于基因的表达调控区域,内含子及外显子区域,可能和基因的功能直接相关^[13]。本研究中 *LPAAT* 基因的 SNP 频率(1/161 bp) 是世界范围内蓖麻种质 SNP 频率(1/737bp) 的 4.6 倍^[9],说明 *LPAAT* 基因相对整个蓖麻基因组的遗传变异大。但 *LPAAT* 基因的遗传多样性仍然较低,这与蓖麻品种本身有极大关系。

通过分子克隆技术已证明, *LPAAT* 分布在低等生物、高等植物和哺乳动物等不同的生物物种中^[14-16],说明其分布广泛,种类繁多,且在发育和代谢过程中起着关键性的作用。分析表明,第 651、652 位的 InDel 导致苏氨酸插入,这显著提高了蓖麻油脂的含量,说明蓖麻的油脂含量与 *LPAAT* 基因的 exon10 显著相关。因为脂肪酸合成是一个多步酶促反应, *LPAAT* 作为植物油脂合成下游的一个关键酶可能起着限制性作用,所以 *LPAAT* 基因的错意突变能显著影响蓖麻总油脂含量。油脂合成和储存是多基因共同作用的结果,也可能由于本研究样本量较小而得出上述结论,进一步研究应扩大样本容量,研究 *LPAAT* 基因其他 SNPs 与油脂含量的相关性也是必要的,同时与其他影响蓖麻油脂合成基因(如: *G3PDH*、*G3PAT* 等)的 SNPs 相联系。

由于 *LPAAT* 对蓖麻的脂肪酸合成有关键作用,该基因的 SNPs 研究可以应用于脂肪酸合成的遗传连锁分析(linkage analysis) 及关联分析(association analysis) 中,用于脂肪酸关键基因的定位^[17]。本研究探讨了基因与个体表型特征(脂肪酸含量)的相关性,为蓖麻种群结构研究提供了方法参考;同时用 SNP 评估 *LPAAT* 基因在蓖麻种质中的遗传多样性;为关联分析、高密度遗传图谱构建、基因的精确定位及分子辅助育种奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] 张锡顺,杨建国,杨若涵,等. 蓖麻数量性状遗传距离与杂种优势关系的研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(3): 633-640.
- [2] Chan A P, Vrabtree J, Zhao Q, et al. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis* L. [J]. Nature Biotechnology 2010 9: 951-959.
- [3] Johnathan A N. The production of unusual fatty acids in transgenic plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2007, 58: 295-319.
- [4] Zou J T, Katavic V, Giblin E M, et al. Modification of seed oil content and acyl composition in the Brassicaceae by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene [J]. Plant Cell, 1997 9: 909-923.
- [5] Gajera B B, Kumar N, Singh A S, et al. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers [J]. Industrial Crop and Products 2010 30: 491-498.
- [6] 黄文霞,何觉民,朱宏波,等. 蓖麻种质资源遗传多样性 ISSR 分析[J]. 西北农业学报, 2001, 17(1): 182-184, 187.
- [7] Gerard A, Amber W, Pablo D R, et al. Worldwide genotyping of castor bean germplasm (*Ricinus communis* L.) using AFLPs and SSRs [J]. Genetic Resources and Crop Evolution 2008 55(3): 365-378.
- [8] Qiu L J, Yang C, Liu A Z, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in castor (*Ricinus communis* L.) [J]. Plant Biology 2010 10: 278.
- [9] Foster J T, Chan A P, Keim P, et al. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. Plant Biology 2010 10(13): 1-13.
- [10] 王强,李卫真,张永云. SNPs 技术的研究进展及应用[J]. 四川畜牧兽医 2010(8): 30-33.
- [11] 谭美莲,姜兴华,严明芳,等. 蓖麻 DNA 的提取及 SRAP 反应体系的建立 [J]. 中国油料植物学报, 2009 31(4): 531-536.
- [12] 张玲,李伟,谢崇华. 水稻单核苷酸多态性研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(34): 10955-10957, 11033.
- [13] 周锦,刘义飞,黄宏文. 基于 EST 数据库进行 SNP 分子标记开发的研究进展及在猕猴桃属植物中的应用研究 [J]. 热带亚热带植物学报 2011 19(2): 184-194.
- [14] Kim H U, Huang H C. Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology 2004 134(3): 1206-1216.
- [15] Li D, Yu L, Wu H, et al. Cloning and identification of the human LPAAT-zeta gene, a novel member of the lysophosphatidic acid acyltransferase family [J]. Human Genet 2003 114: 438-442.
- [16] Kumar R R, Santha I M. Isolation and characterization of plastidial localized, seed expressive lysophosphatidyl acyl transferase (LPAAT) cDNA from *Brassica juncea* L. [J]. Plant Biochem Biotech 2009 18(2): 225-228.
- [17] 于冰筠,胡丽莉. 华南地区汉族人群 *MDR1* 基因单核苷酸多态性研究 [J]. 中山大学学报, 2011, 50(2): 93-98.

(责任编辑 张 坤)

(上接第 50 页)

[参 考 文 献]

- [1] 徐锦堂,郭顺星. 天麻与紫萁小菇和蜜环菌营养关系及其在栽培中的应用 [J]. 医学研究通讯, 1991, 20(10): 31-32.
- [2] 程立君,陈玉惠,徐畅,等. 昭通天麻种子萌发菌的筛选 [J]. 安徽农业科学 2009 37(28): 13600-13602.
- [3] 徐锦堂. 天麻栽培学 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993: 184-222.
- [4] 孙士青,陈贵虹. 不同蜜环菌对天麻生物产量及天麻素含量的影响 [J]. 山东科技 2003 16(2): 7-10.
- [5] 陈明义,李福后,边银丙. 蜜环菌不同菌株对天麻产量的影响 [J]. 食用菌学报 2004 11(1): 46-48.
- [6] 兰进,徐锦堂,李京淑. 蜜环菌侵染天麻的放射自显影研究 [J]. 核农学报 1996 10(2): 123-125.
- [7] 徐锦堂,范黎. 天麻种子原球茎和营养繁殖茎被菌根真菌定殖后的细胞分化 [J]. 植物学报 2001 43(10): 1003-1010.
- [8] 冯云利,程立君,陈玉惠,等. 云南昭通天麻共生蜜环菌优良菌株筛选 [J]. 西南林学院学报 2009 29(2): 37-39.
- [9] 王绍柏. 蜜环菌材对天麻产量和质量的影响 [J]. 菌物系统 2001 20(3): 408-412.

(责任编辑 张 坤)