

紫竹不同栽培类型 *PPO* 基因片段克隆及其 SNP 分析

肖国辉, 王 弋, 娄永峰, 林新春, 郭小勤, 方 伟

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 根据已报道的禾本科 Poaceae 植物 *PPO* 基因的保守序列 (CuA 和 CuB 区) 设计 1 对引物, 分别从紫竹 *Phyllostachys nigra* 9 个不同栽培变型中克隆到 *PPO* 基因片段。序列分析显示: 9 个序列彼此间核苷酸水平上一致性达到 92.35%, 氨基酸水平上的一致性达到 81.83%。在某些栽培类型, 一年紫和沟槽紫, 该基因存在提前终止的现象。所获得的 9 条序列间存在明显的单核苷酸多态性 (SNP) 位点, 多数位点引起非同义突变。根据所测得的序列对紫竹不同栽培类型的亲缘关系进行了遗传多样性分析。图 2 表 3 参 20

关键词: 植物学; 紫竹; *PPO* 基因; 单核苷酸多态性 (SNP); 遗传多样性

中图分类号: S722 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2013)04-0511-06

Cloning and SNP analysis of *PPO* genes with cultivars of *Phyllostachys nigra*

XIAO Guohui, WANG Yi, LOU Yongfeng, LIN Xinchun, GUO Xiaoqin, FANG Wei

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Polyphenol oxidase (*PPO*) fragments were cloned from cultivars of *Phyllostachys nigra* using a pair of primers designed according to a conserved region (CuA and CuB) of a *PPO* gene sequence in Poaceae family and analyzed with a sequence analysis. The genetic relationship of cultivars was also analyzed based on these fragments using DNAMAN software. Results of the sequence analysis showed that identity was 92.35% in nucleotide acid and 81.83% in amino acid. A truncated protein of the gene was found in some cultivars of *P. nigra*, such as 'One-year-purple' and 'Purple Groove'. Single-nucleotide polymorphism (SNP) sites were also found among these sequences. This could lead to non-synonymous mutations. [Ch, 2 fig. 3 tab. 20 ref.]

Key words: botany; *Phyllostachys nigra*; polyphenol oxidase (*PPO*) gene; single-nucleotide polymorphism (SNP); genetic relationship

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, *PPO*) 是一种以铜为辅基的末端氧化还原酶, 可以催化酚类上的羟基, 使它们转化为醌类或催化多酚类变为氧合醌^[1-2], 与植物的生物合成^[3]、光合作用^[4]、抗逆性^[5]和褐化^[6-7]等方面有关。目前, 国内外已经先后从禾本科 Poaceae 植物, 如水稻 *Oryza sativa*^[8], 小麦 *Triticum aestivum*^[9], 玉米 *Zea mays*^[1] 等植物中获得了该基因, 并对其基因结构、功能、分布情况进行了分析, 且水稻中的该基因已被开发成功能标记, 并用于水稻种质资源的鉴定^[8]。在竹类植物中该基因的研究报道还很少^[7,10]。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指一物种不同个体在基因组水平上由单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性, 其分布广, 信息量大, 易于检测和统计分析, 已发展成为第 3 代基因遗传标记^[11]。基于上述特点, SNP 标记研究在草本植物中已大规模展开^[12]。近些年来, SNP 研究开始应用到林木等多年生木本植物中, 并在部分树种中取得初步进展^[13-16]。本实验从紫竹 *Phyl-*

收稿日期: 2012-08-02; 修回日期: 2012-10-17

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目 (2007C22081); 浙江农林大学科研发展基金面上资助项目 (2007FR025)

作者简介: 肖国辉, 从事植物分子生物学研究。E-mail: xgh15970626684@126.com。通信作者: 郭小勤, 副教授, 博士, 从事植物分子生物学研究。E-mail: xqguo@zafu.edu.cn

lostachys nigra 9 个不同栽培类型中分别克隆了该基因的片段, 并对其序列进行了分析, 发掘了其中的 SNP 位点和相应编码的氨基酸变异位点, 揭示了该基因在紫竹不同栽培类型中的遗传多态性, 为克隆竹类植物中该基因的全长序列, 丰富构建竹类植物基因图谱标记, 分析和研究紫竹 9 个不同栽培类型的遗传多样性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料及试剂

从浙江农林大学翠竹园采集紫竹不同栽培类型的幼嫩叶片(表 1)。采集后用液氮速冻, 放入-70 ℃ 冰箱保存。菌株 *Escherichia coli* DH-5 α 和质粒回收试剂盒购自于上海生工技术服务有限公司。载体、反转录试剂、聚合酶链式反应(PCR)试剂均购自宝生物公司。胶回收试剂盒购自北京鼎国公司。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 及基因组 DNA 提取 采用 TRIZOL 法提取总核糖核酸(RNA), 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取紫竹叶片基因组 DNA。

1.2.2 cDNA 第 1 链合成 反转录体系及条件: 1.5 μ g 模板 RNA, 4 μ L 5 $\times$ 反转录缓冲液, 2 μ L 脱氧核苷三磷酸 (2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹), 0.5 μ L RNA 酶抑制剂 (20 $\times$ 16.67 nkat), 50 pmol 寡聚胸苷酸, 2.0 μ L AMV 反转录酶(10 $\times$ 16.67 nkat), 10 μ L 二乙基焦磷酸胺处理水, 反应条件为: 室温 10 min, 42 ℃ 保温 60 min, 冰水冷却 2 min, 最后-20 ℃ 保存。

1.2.3 紫竹 *PPO* 基因克隆及系统进化关系分析 根据水稻、小麦和玉米等禾本科植物 *PPO* 基因序列的保守区域 (CuA 和 CuB 结合区), 设计了 PPO1

表 1 实验材料
Table 1 Samples for test

编号	栽培类型	形态特征
1	一年紫	新竹当年即长黑色斑点, 秆变为紫黑色
2	二年紫	新竹竹竿于第 2 年开始变紫色
3	三年紫	新竹竹竿第 3 年呈现紫黑色
4	大紫竹	竹竿比一般的紫竹粗壮
5	日本紫竹	新竹竿当年变紫, 颜色淡
6	台湾紫竹	新竹竿当年变紫, 颜色很深
7	花叶紫竹	叶片有白色条纹
8	沟槽紫竹	竹竿仅沟槽为紫色
9	毛金竹	竹秆不变紫

引物, PPO1 正为 5'-TTCGCGCTGCCGTTCTGGAA-3', PPO1 反为 5'-GATGTGCCACATGCCGTCGA-3'。聚合酶链式反应 (PCR) 反应程序分别为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 38 ℃ 循环, 72 ℃ 5 min, 10 ℃ 保存。用鼎国 XA014-1 胶回收试剂盒对目的片段进行回收纯化, 连接到 pMD20 质粒载体上, 转化后进行蓝白斑筛选, 挑取白斑进行 PCR 和酶切检测, 选取阳性克隆进行测序。所得序列应用 DNAMAN 软件中的 ClustalW 进行系统进化关系分析。

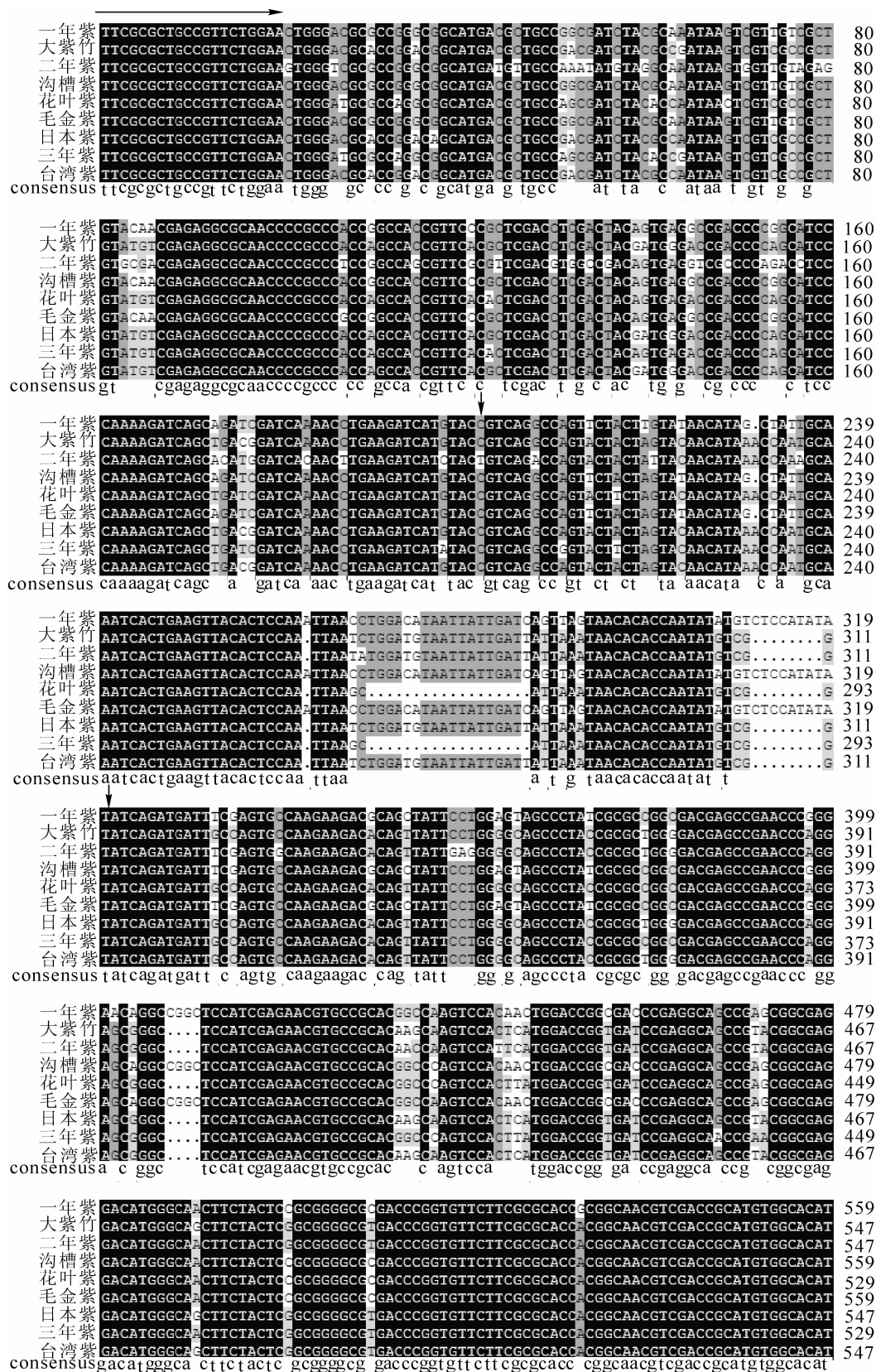
2 结果和分析

2.1 *PPO* 基因片段克隆及序列分析

以 PPO1 为特异引物对一年紫和台湾紫 cDNA 及其紫竹不同栽培变型及种源的基因组 DNA 进行扩增。序列分析结果表明: 从台湾紫竹中获得大小为 438 bp 的 cDNA 片段, 从一年紫中获得大小为 442 bp 的 cDNA 片段。而从紫竹不同栽培变型及种源中获得 3 种大小分别为 529, 547 及 559 bp 的基因组 DNA 片段, 这些序列大小间的差异主要是由于该基因第 2 内含子长度不一造成的, 花叶紫和三年紫中该基因的第 2 内含子缺失 26 bp, 大紫竹、二年紫、日本紫及台湾紫均缺失 8 bp, 且这不同来源的 6 个片段均在第 3 外显子的同一位置缺失 4 bp(图 1)。

对所获得的序列进行同源性分析, 发现 9 个序列彼此之间的同源性均达到 92% 以上, 尤其在可扩增出同样大小片段的样本间该序列间的差异非常小, 仅存在个别碱基的差异, 如台湾紫、日本紫和大紫竹中均可扩增出 547 bp 的片段, 彼此间仅存在 2 个碱基的差异。

运用生物信息学软件将所获得的 9 个序列翻译成氨基酸, 序列比对发现, 台湾紫、日本紫和大紫竹



2 个横箭头表示上下游引物, 2 个竖箭头间的序列为第 2 内含子序列

图 1 紫竹不同栽培类型中 PPO 基因的序列比对

Figure 1 Alignment between the sequences of amplified products among cultivated forms

中该基因的氨基酸序列间存在 2 个氨基酸的差异, 而花叶紫和三年紫的该基因间存在 4 个氨基酸的差异。有一点值得注意的是, 由于一年紫、毛金竹及沟槽紫的氨基酸序列中发现了提前终止的现象, 因此, 在编码区也只有 1 个氨基酸的差异。由于氨基酸序列的提前终止, 故在该 3 条氨基酸序列中并未发现 CuB 结合区, 而在其他栽培类型的该基因的氨基酸序列中同时含有 CuA 和 CuB 结合区, 暗示着这 3 个栽培类型中该基因的功能与其他栽培类型中存在差异。

2.2 PPO 基因片段 SNP 分析

各 SNP 位点在不同实验样本间多态分布不均衡, 本研究检测到该基因丰富的多态性应该与实验材料的选择有一定的关系。对所获得的 9 个序列的编码区进行分析发现, 导致 9 个序列之间多态性差异较大的主要有 2 个原因: 一是序列间本身存在较大的差异, 如二年紫中该基因的序列与其他栽培类型中的都存在明显差异; 二是序列间存在较多的 SNP 位点, 在所测得的 9 条序列中(529~559 bp), 共存在 54 个 SNP 位点, 多态性频率为 1 SNP/10.4 bp, 其中转换型 SNP 占 59%, 仅有 1 个 SNP 属于单碱基缺失。外显子与内含子中 SNP 出现的频率相似, 分别为 1 SNP/10.2 bp 和 1 SNP/10.8 bp。这些 SNP 位点在一些栽培类型中可能并不成为 SNP, 如台湾紫、日本紫和大紫竹中该基因序列仅存在 2 个碱基的差异(表 2), 均为 A/G 转换类型, 且这 2 个 SNP 均导致氨基酸序列的不同(表 3), 属于非同义编码 cSNP; 一年紫、毛金竹和沟槽紫中该基因序列的差异存在转换(A/G)及颠换(A/T 及 A/C), 其中的 3 个 SNP 属于同义编码 cSNP(表 3); 花叶紫和三年紫中该基因序列的差异也是由转换(A/G 及 T/C)及颠换(G/C)造成的。继而, 我们对同一栽培类型的不同单株的序列进行了分析, 发现也存在 SNP 位点, 如从毛金竹的 3 个单株中获得的该基因的序列间存在 6 个 SNP 位点, 其中的 5 个均属于非同义编码 cSNP; 一年紫中不同单株间该基因的序列也存在 SNP 现象。由此可见, 紫竹的遗传信息比较复杂。

表 2 PPO 基因片段单核苷酸变异

Table 2 Variation of single nucleotides in the segment of PPO gene

栽培类型	单核苷酸变异位点					栽培类型	单核苷酸变异位点	
	107e	220i	401e	436e	532e		38e	64e
一年紫	A	T	A	A	C	日本紫	A	A
沟槽竹	A	A	G	C	A	台湾紫	G	A
毛金竹	G	A	G	A	A	大紫竹	G	G

栽培类型	单核苷酸变异位点							
	64e	69e	198e	211i	437e	442e	470e	479e
三年紫	G	G	A	G	A	A	G	T
花叶紫	A	C	G	A	G	G	C	C

说明: e 表示外显子区, i 表示内含子区。

表 3 PPO 基因片段氨基酸变异

Table 3 Variation of amino acids in the segment of PPO gene

栽培类型	氨基酸变异位点	栽培类型	氨基酸变异位点		栽培类型	氨基酸变异位点			
	36		13	22		22	23	66	117
一年紫	H	日本紫	S	N	三年紫	D	K	I	N
勾槽竹	H	台湾紫	G	N	花叶紫	N	N	M	S
毛金竹	R	大紫竹	G	D					

2.3 克隆基因片段的遗传多样性分析

运用 DNAMAN 软件对所获得的 9 个序列进行聚类(图 2), 结果显示: 二年紫与其他栽培类型亲缘关系最远, 单列为一类。一年紫、毛金竹和沟槽紫归为一类, 其他 5 个栽培类型归为一类。

3 讨论

从 PPO 基因同源性比较的结果来看, 该基因具有种特异性及其栽培类型特异性, 而且栽培类型间的差异有时更大于种间的差异。更难理解的是, 同一栽培类型的不同单株间也存在差异。本实验结果证实, 台湾紫竹与毛竹 *Phyllostachys edulis* 原变种中该基因氨基酸序列的同源性为 91.78%, 而一年紫与花叶紫中该基因的氨基酸序列的同源性仅为 60.81%, 同一栽培类型不同单株间该基因的氨基酸序列的同源性均较高, 都达到 99% 以上。

本实验从紫竹不同栽培类型中获得的 9 条序列间存在序列上的差异, 也存在丰富的 SNP 变异位点及由此引起的氨基酸

变异位点, 说明了该基因在紫竹不同栽培类型间存在丰富的多态性。在这些 SNP 位点中, 转换的比例明显高于颠换的比例, 且以 A/G 转换居多, 并非是常见的 T/C 转换^[17]。一半的 SNP 位点会引起非同义突变, 这些非同义突变位点基本都是由三联体密码的第 3 个密码子发生变异而导致的, 因此也支持了众多研究者提出的三联体密码子中第 3 个密码子承受着比前 2 个密码子更大的选择压力的观点。同时, SNP 位点的非同义突变也可能与不同栽培类型种变异有关。

SNP 是由单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性, 具有丰富的位点、比较高的遗传稳定性等优点, 因此, 可用于分析亲缘关系较近的近缘种及不同基因型的品种。林木植物树体高大、生活周期长, 栽培程度低、基因组巨大、基因杂合程度高, 构建足够大的近等基因系来高分辨率地检测 QTL (quantitative trait locus) 非常困难, 而 SNP 标记可检测基因内与目的性状关联的特定碱基, 因此可直接应用于林木育种实践中家系内和家系间的选择^[18]。丛郁等^[19]对梨属 *Pyrus* 植物 AMT1;2 基因片段进行了 SNP 分析, 发现了 SNP 位点及相应的氨基酸变异位点, 表明该基因在梨属植物中存在遗传多态性, 但这种遗传多样性用其他的如扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 和简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 分子标记无法区分。与此相似, 本实验所选用的材料用 AFLP 及简单重复序列 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 等分子标记也未能揭示其遗传多样性 (私人通信), 但通过直接测序的方法可以直接揭示这些不同的栽培类型间的基因组确实存在显著差异。Germano 等^[20]对云杉 *Picea* 种间的序列分析, 也发现了 SNP, 并鉴定出 3 个近缘种间的多态性, 表明 SNP 比其他类型分子标记能提供更多的特殊性标记, 可以更快速地用于分子育种。

参考文献:

- [1] 王曼玲, 胡中立, 周明全, 等. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学通报, 2005, **22**(2): 215 – 222.
WANG Manling, HU Zhongli, ZHOU Mingquan, *et al.* Advances in research of polyphenol oxidase in plants[J]. *Chin Bull Bot*, 2005, **22**(2): 215 – 222.
- [2] ALFRED M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places a review [J]. *Phytochemistry*, 2006, **67**: 2318 – 2331.
- [3] NAKAYAMA T, SATO T, FUKUI Y, *et al.* Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration[J]. *FEBS Lett*, 2002, **499**(1/2): 107 – 111.
- [4] VAUGHN K C, LAX A R, DUKE S. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function[J]. *Plant Physiol*, 1988, **72**: 6496 – 6531.
- [5] PARTINGTON J C, BOLWELL G P, SMITH C. Changes in the location of polyphenol oxidase in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber during cell death in response to impact injury: comparison with wound tissue [J]. *Planta*,

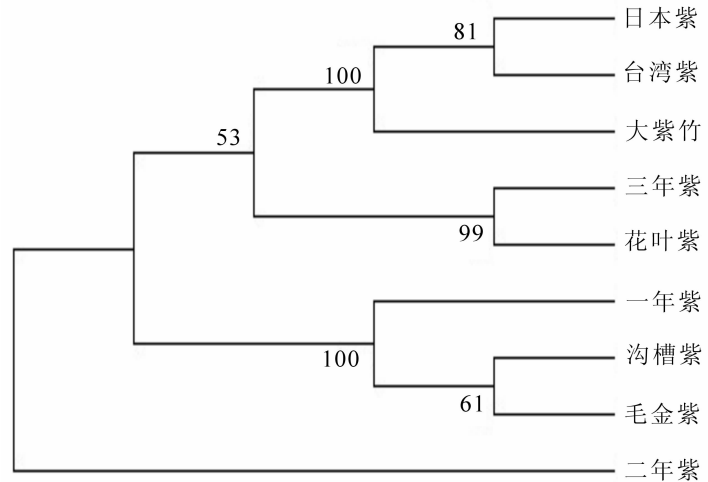


图 2 紫竹不同栽培类型及种源的聚类结果

Figure 2 A dendrogram of samples test based on the sequence

- 1999, **207**: 449 – 460.
- [6] ZHOU Y, DAHLER J M, WILLS R B, *et al.* The enzymes associated with blackheart development in pineapple [J]. *Food Chem*, 2003, **80**: 565 – 572.
- [7] 王弋, 郭小勤, 姜永峰, 等. 紫竹多酚氧化酶基因克隆及其表达[J]. 浙江林学院学报, 2010, **27**(5): 781 – 785.
WANG Yi, GUO Xiaoqin, LOU Yongfeng, *et al.* Cloning and expression of polyphenol oxidase (PPO) in *Phyllostachys nigra* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2010, **27**(5): 781 – 785.
- [8] 杨杰, 曹卿, 王军, 等. 水稻多酚氧化酶基因功能标记的开发与应用[J]. 中国水稻科学, 2011, **25**(1): 37 – 42.
YANG Jie, CAO Qing, WANG Jun, *et al.* Development and application of functional markers for polyphenol oxidase (PPO) alleles in rice [J]. *Chin J Rice Sci*, 2011, **25**(1): 37 – 42.
- [9] 杨凤萍, 梁荣奇. 小麦多酚氧化酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, **23**(1): 209 – 214.
YANG Fengping, LIANG Rongqi. Advance in polyphenol oxidases (PPO) of wheat [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2007, **23**(4): 209 – 214.
- [10] 郭小勤, 李犇, 阮晓赛, 等. 利用 ACGM 分子标记研究 10 个毛竹不同栽培变种的遗传多样性[J]. 林业科学, 2009, **45**(4): 28 – 32.
GUO Xiaoqin, LI Ben, RUAN Xiaosai, *et al.* Genetic diversity of ten *Phyllostachys edulis* cultivars with ACGM markers [J]. *Sci Silv Sin*, 2009, **45**(4): 28 – 32.
- [11] 黄代新, 张林, 吴梅筠. 单核苷酸多态性研究进展[J]. 法医学杂志, 2001, **17**(2): 122 – 125.
HUANG Daixin, ZHANG Lin, WU Meiyun. Recent progress of study on single nucleotide polymorphisms [J]. *J For Med*, 2001, **17**(2): 122 – 125.
- [12] RAFALSKI J A. Novel genetic mapping tools in plants: SNP and LD based approaches [J]. *Plant Sci*, 2002, **162**(3): 329 – 333.
- [13] POT D, MCMILLAN L, ECHT C, *et al.* Nucleotide variation in genes involved in wood formation in two pine species [J]. *New Phytol*, 2005, **167**(1): 101 – 112.
- [14] INGVARSSON P K. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula*, Salicaceae) [J]. *Genetics*, 2005, **169**(2): 945 – 953.
- [15] KRUTOVSKY K V, NEALE D B. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in cold-hardiness-and wood quality-related candidate genes in Douglas fir [J]. *Genetics*, 2005, **171**(4): 202–2041.
- [16] HEUERTZ M, de PAOLI E, KÄLLMAN T, *et al.* Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst] [J]. *Genetics*, 2006, **174**(4): 2095 – 2105.
- [17] 唐立群, 肖层林, 王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展[J]. 中国农学通报, 2012, **28**(12): 154 – 158.
TANG Liqun, XIAO Cenglin, WANG Weiping. Research and application progress of SNP markers [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, **28**(12): 154 – 158.
- [18] GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S C, ERSOZ E, BROWN G R, *et al.* DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. [J]. *Genetics*, 2006, **172**(3): 1915 – 1926.
- [19] 丛郁, 杨顺瑛, 宋志忠, 等. 杜梨铵转运蛋白基因的克隆表达及在梨属植物中的 SNP 分析[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(10): 1942 – 1950.
CONG Yu, YANG Shunying, SONG Zhizhong, *et al.* Cloning and expression analysis of an ammonium transporter gene in *Pyrus betulaeifolia* and its SNP analysis in *Pyrus* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2011, **31**(10): 1942 – 1950.
- [20] GERMANO J, KLEIN A S. Species-specific nuclear and chloroplast single nucleotide polymorphisms to distinguish *Picea glauca*, *P. mariana* and *P. rubens* [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **99**: 37 – 49.