

薏苡 *CISAD*、*CIFAD2* 基因单倍型鉴定与 相关脂肪酸关联分析

尚 昆¹, 付瑜华¹, 李秀诗¹, 蒙秋伊¹, 杨玲玲¹, 朱加保²

(¹贵州省农业科学院贵州省亚热带作物研究所, 贵阳 550025; ²安徽省农业科学院棉花研究所, 合肥 230031)

摘要: 薏苡仁油是薏苡仁主要功能性物质之一, 脂肪酸是其重要组成部分。以中国9个省份的190份薏苡种质为材料, 检测其种仁硬脂酸、油酸、亚油酸含量, 分析 *CISAD*、*CIFAD2* 基因序列多态性并鉴定单倍型, 进行脂肪酸含量单倍型关联分析。结果表明, 不同薏苡种质种仁3种脂肪酸含量存在广泛变异, 变异系数为15.84%~23.05%, 遗传多样性指数为5.22~5.23, 其中油酸含量最高, 硬脂酸含量最低, 各脂肪酸组分间呈极显著正相关。*CISAD*和*CIFAD2*内部各有14个和3个SNP, 分别鉴定到5个单倍型组合, *CISAD*基因单倍型Hap3和*CIFAD2*基因单倍型Hap1分别与参考基因组一致。*CISAD*基因单倍型Hap3与硬脂酸含量显著关联且具有负效应, 利于硬脂酸向油酸转化。*CIFAD2*基因单倍型Hap1利于亚油酸的积累, 而Hap2与亚油酸含量显著关联且具有负效应, 不利于亚油酸的合成。在2个基因内部各鉴定到1个关键SNP位点, 分别是形成SAD和FAD2酶活性差异的关键位点。研究结果将为高油薏苡优良品种的选育、分子标记开发和相关分子机制解析提供理论基础。

关键词: 薏苡; 脂肪酸; 单倍型; 硬脂酸脱饱和酶SAD基因; 油酸脱饱和酶FAD2基因

Haplotype Identification of *CISAD/CIFAD2* and Association Analysis of Related Fatty Acids in *Coix lacryma-jobi* L.

SHANG Kun¹, FU Yuhua¹, LI Xiushi¹, MENG Qiuyi¹, YANG Lingling¹, ZHU Jiabao²

(¹Guizhou Institute of Subtropical Crops, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550025;

²Cotton Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract: Coicis oil is one of the main functional substances of coix seed, and fatty acid is an important component. The contents of stearic acid, oleic acid and linoleic acid in seed kernels of 190 coix germplasm from 9 provinces in China were detected. *CISAD* and *CIFAD2* sequences polymorphisms were analyzed and the haplotypes were identified. The haplotype association analysis of fatty acid content was carried out. The results showed that there were wide variations in the content of three fatty acids in the seeds of different coix germplasm, the coefficient of variation was 15.84% - 23.05%, and the genetic diversity index was 5.22 - 5.23, among which the content of oleic acid was the highest and the content of stearic acid was the lowest, and there was a very significant positive correlation between the fatty acid components. There were 14 SNPs and 3 SNPs in

收稿日期: 2024-01-31 网络出版日期: 2024-08-19

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240131003>

第一作者研究方向为作物遗传育种, E-mail: shangkun3628@163.com

通信作者: 付瑜华, 研究方向为种质资源与分子育种, E-mail: fufu6699@aliyun.com

基金项目: 国家自然科学基金(32360480); 贵州省农业科学院国基后补助项目([2021]24); 贵州省农业科学院种质资源项目([2023]008); 贵州省农业科学院青年科技基金项目([2020]06); 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室(贵州大学)开放课题基金资助项目(黔教合KY字[2022]368)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32360480); Guizhou Academy of Agricultural Sciences Post National Foundation Subsidy Projects ([2021] 24); Germplasm Resources Project of Guizhou Academy of Agricultural Sciences ([2023] 008); Guizhou Academy of Agricultural Sciences Youth Science and Technology Fund Project ([2020] 06); Open Project Fund of Key Laboratory of Plant Resources Protection and Germplasm Innovation of the Ministry of Education (Guizhou University) (Qianjiaohu KY [2022] 368)

CISAD and *CIFAD2*, respectively, and 5 haplotype have been identified. The *CISAD* haplotype Hap3 and *CIFAD2* haplotype Hap1 are consistent with the reference genome, respectively. Hap3 of *CISAD* was significantly associated with stearic acid content and had a negative effect on the conversion of stearic acid to oleic acid. Hap1 of *CIFAD2* was favorable for linoleic acid accumulation, while Hap2 was significantly associated with linoleic acid content and had negative effects on linoleic acid synthesis. One key SNP locus was identified in each of the two genes, which was the key locus to the difference of SAD and FAD2 enzyme activity. The results will provide a theoretical basis for the breeding of high oil coix varieties, as well as the development of molecular markers and the analysis of related molecular mechanisms.

Key words: *Coix lacryma-jobi* L.; fatty acids; haplotypes; stearic acid desaturase *SAD* gene; oleic acid desaturase *FAD2* gene

薏苡 (*Coix Lacryma-jobo* L.) 为禾本科玉蜀黍族薏苡属一年生或多年生草本植物, 起源于亚洲热带地区, 据考证, 薏苡在我国的种植历史可以追溯到 28000 年前^[1], 其种仁主要被用来食用和酿酒^[2]。薏苡仁也是古老的中药材, 收录于《神农本草经》和《本草纲目》等药典古籍中。薏苡仁油是薏苡仁重要的营养成分和药用品质构成因子^[3], 主要成分为中性油脂, 其中, 甘油三酯占 90% 以上, 甘油二酯约 5%, 与芝麻油组成相似^[4]。组成薏苡仁甘油三酯的脂肪酸主要为油酸 (49.4%)、亚油酸 (28.8%)、棕榈酸 (13.5%) 和硬脂酸 (3.6%)^[5]。植物种子油脂合成是一个复杂的生物过程^[6], 研究人员开展了其分子机制研究^[7-8], 鉴定了一批油脂合成关键基因和转录因子^[9-10]。硬脂酸脱饱和酶 (SAD, stearyl-ACP desaturase) 和内质网油酸脱饱和酶 (FAD2, fatty acid desaturation 2) 是植物不饱和脂肪酸油酸和亚油酸合成的关键酶, 分别催化硬脂酸到油酸、油酸到亚油酸的反应, 利用基因工程技术已在多种植物中验证了 *SAD* 或 *FAD2* 基因功能^[11-14]。付瑜华等^[15]克隆了薏苡 *SAD* 和 *FAD2* 基因, 发现 *CIFAD2* 无内含子, *CISAD* 有两个内含子。

关联分析是挖掘性状相关功能位点的有利工具, 具有分辨率高、花费时间少 (不用构建分离群体) 和广度大的优点^[16], 已成为植物基因研究的常用工具。研究人员在多种植物中开展了候选基因与表型性状相关性分析, 如玉米中, 类胡萝卜素合成关键基因 *IcyE*^[17]、*crtRBI*^[17-18] 与类胡萝卜素含量和胚乳颜色具有相关性, 基因 *al*、*c2*、*whp1*^[19] 和 *bx1*^[20] 与玉米抗虫性具有相关性; 水稻中, *GluA* 和 *GluB1* 与谷蛋白含量显著相关^[21]; 高粱中, 油菜素内酯信号通路基因 *BKII* 与 6 个植物特征表型均相关^[22]。多个遗传变异位点的不同组合形成了丰富

的物种单倍型^[23], 并逐渐成为解析物种基因型与表型联系的有效工具^[24]。研究者通过分析小麦淀粉分支酶基因 *TaSBEs* 单倍型, 成功获得直链淀粉含量较高的优异单倍型, 并通过基因编辑技术进一步进行了验证^[25]。张紫晋等^[26]鉴定到青稞主效休眠基因 4 种关键单倍型组合, 为青稞生产应用及种植区域选择提供了理论参考。利用特异单倍型进行分子标记辅助选择, 在育种过程中选择基因和影响性状变异的功能域, 保证了分子标记辅助育种的效率。

目前, *SAD* 和 *FAD2* 基因在诸多作物中的表达模式均已被揭示, 但在薏苡脂肪酸积累途径中的调控机制尚未被解析。因此, 本研究拟利用我国西南地区薏苡种质资源发掘 *CISAD* 和 *CIFAD2* 的 SNPs 鉴定单倍型, 并采用关联分析研究策略, 分别分析这些单倍型与硬脂酸、油酸和亚油酸的关联性, 为解析薏苡脂肪酸的分子机制和开发相关分子标记用于薏苡高油分子标记辅助育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

190 份薏苡供试材料由贵州省亚热带作物研究所收集保存, 其中 72 份来自云南, 46 份来自贵州, 29 份来自广西, 14 份来自四川, 10 份来自浙江, 5 份来自江苏, 湖北、安徽、福建各有 1 份, 另有 11 份来源不详 (表 1)。所有材料均在 2022 年种植于贵州省亚热带作物研究所试验基地, 田间种植采用随机区组试验, 双行区, 行长 5 m, 行距 0.6 m, 株距 0.6 m, 于植株苗期采集叶片, 保存于 -20 °C 冰箱中备用, 于植株成熟期, 收集每个材料 5 个植株上的籽粒, 晾晒后 4 °C 保存。

表1 190份薏苡材料名称及来源

Table 1 Names and source of 190 coix materials

序号 No.	名称 Name	分类 Classification	来源 Source	序号 No.	名称 Name	分类 Classification	来源 Source
1	泗县白薏米	地方种	安徽省泗县	39	平塘棕薏苡	野生种	贵州省平塘县
2	蒲城薏仁	地方种	福建省蒲城县	40	民建薏米-1	地方种	贵州省兴仁市
3	天峨棕薏苡	野生种	广西省天峨县	41	屯脚褐薏苡	野生种	贵州省兴仁市
4	天峨薏苡-1	野生种	广西省天峨县	42	安顺薏米	地方种	贵州省安顺市
5	天峨薏苡-2	野生种	广西省天峨县	43	兴仁白六谷-1	地方种	贵州省兴仁市
6	天峨薏苡-3	野生种	广西省天峨县	44	安顺薏苡	野生种	贵州省安顺市
7	凤山黑薏苡-1	野生种	广西省凤山县	45	兴仁棕薏米	地方种	贵州省兴仁市
8	凤山棕薏苡	野生种	广西省凤山县	46	碧痕薏苡	地方种	贵州省晴隆县
9	凤山黑薏苡-2	野生种	广西省凤山县	47	晴隆褐薏苡	野生种	贵州省晴隆县
10	凤山黑薏苡-3	野生种	广西省凤山县	48	民建棕薏米	地方种	贵州省兴仁市
11	凤山大灰薏苡	野生种	广西省凤山县	49	青岩棕薏苡	野生种	贵州省贵阳市
12	长州深棕薏苡	野生种	广西省凤山县	50	下山白五谷-1	地方种	贵州省兴仁市
13	德胜薏苡	野生种	广西省宜州市	51	民建褐薏苡	野生种	贵州省兴仁市
14	阳朔棕薏苡-1	野生种	广西省桂林市	52	碧痕白薏米-1	地方种	贵州省晴隆县
15	阳朔棕薏苡-2	野生种	广西省桂林市	53	民建薏苡	地方种	贵州省兴仁市
16	桂平黄白薏苡	野生种	广西省桂平市	54	青岩白薏米	地方种	贵州省贵阳市
17	桂平灰褐薏苡	野生种	广西省桂平市	55	下山白五谷-2	地方种	贵州省兴仁市
18	平南薏苡	野生种	广西省平南县	56	龙广薏米-1	地方种	贵州省兴义市
19	横县灰薏苡	野生种	广西省横县	57	安顺褐薏苡	野生种	贵州省安顺市
20	横县褐薏苡-1	野生种	广西省横县	58	龙广薏米-2	地方种	贵州省兴义市
21	横县褐薏苡-2	野生种	广西省横县	59	安龙六谷	地方种	贵州省安龙县
22	灵山灰薏苡	野生种	广西省灵山县	60	紫云薏米	地方种	贵州省紫云县
23	防城港褐薏苡-1	野生种	广西省防城港市	61	碧痕白薏米-2	地方种	贵州省晴隆县
24	防城港褐薏苡-2	野生种	广西省防城港市	62	民建薏米-2	地方种	贵州省兴仁市
25	防城港褐薏苡-3	野生种	广西省防城港市	63	屯脚薏米	地方种	贵州省兴仁市
26	广西褐薏苡-1	野生种	广西省	64	贵州棕薏苡-1	野生种	贵州省
27	广西褐薏苡-2	野生种	广西省	65	兴仁白六谷-2	地方种	贵州省兴仁市
28	广西褐薏苡-3	野生种	广西省	66	贵州褐薏米	地方种	贵州省
29	广西褐薏苡-4	野生种	广西省	67	贵州黄白薏米-1	地方种	贵州省
30	广西褐薏苡-5	野生种	广西省	68	贵州棕薏苡-2	野生种	贵州省
31	西林薏米	地方种	广西省西林农场	69	贵州黄白薏米-2	地方种	贵州省
32	江口棕薏苡	野生种	贵州省铜仁市	70	贵州棕薏米-1	地方种	贵州省
33	孟关薏米	地方种	贵州省贵阳市	71	贵州黄白薏米-3	地方种	贵州省
34	小河薏苡	野生种	贵州省贵阳市	72	贵州棕薏米-2	地方种	贵州省
35	黔陶薏苡	野生种	贵州省贵阳市	73	贵州黄白薏米-4	地方种	贵州省
36	青岩薏苡	野生种	贵州省贵阳市	74	贵州黄白薏米-5	地方种	贵州省
37	惠水棕薏米	地方种	贵州省惠水县	75	花溪棕薏苡	野生种	贵州省贵阳市
38	贵阳棕薏苡	野生种	贵州省贵阳市	76	晴隆棕薏米	野生种	贵州省晴隆县

表 1 (续)

序号 No.	名称 Name	分类 Classification	来源 Source	序号 No.	名称 Name	分类 Classification	来源 Source
77	晴隆白薏米	野生种	贵州省晴隆县	116	师宗褐薏苡	野生种	云南省师宗县
78	建始白薏苡	野生种	湖北省建始县	117	宜良棕薏苡	野生种	云南省宜良县
79	江苏棕薏苡-1	野生种	江苏省	118	宜良白薏苡	地方种	云南省宜良县
80	江苏棕薏苡-2	野生种	江苏省	119	汤池薏苡	野生种	云南省昆明市
81	江苏褐薏苡-1	野生种	江苏省	120	禄丰褐薏苡	野生种	云南省禄丰县
82	江苏棕薏苡-3	野生种	江苏省	121	禄丰棕薏苡	野生种	云南省禄丰县
83	江苏褐薏苡-2	野生种	江苏省	122	弥渡棕薏苡-1	野生种	云南省弥渡县
84	NA011(名称不详)	地方种	不详	123	弥渡棕薏苡-2	野生种	云南省弥渡县
85	NA017(名称不详)	地方种	不详	124	弥渡褐薏苡	野生种	云南省弥渡县
86	NA018(名称不详)	地方种	不详	125	洱源棕薏苡-1	野生种	云南省洱源县
87	NA021(名称不详)	地方种	不详	126	洱源棕薏苡-2	野生种	云南省洱源县
88	NA023(名称不详)	地方种	不详	127	洱源薏苡-1	地方种	云南省洱源县
89	NA025(名称不详)	野生种	不详	128	洱源薏苡-2	野生种	云南省洱源县
90	NA026(名称不详)	野生种	不详	129	腾冲棕薏米	地方种	云南省保山市
91	NA027(名称不详)	野生种	不详	130	腾冲褐薏苡	野生种	云南省保山市
92	NA032(名称不详)	野生种	不详	131	腾冲棕薏苡-1	野生种	云南省保山市
93	NA033(名称不详)	地方种	不详	132	腾冲棕薏苡-2	野生种	云南省保山市
94	NA034(名称不详)	地方种	不详	133	弄璋褐薏苡-1	野生种	云南省盈江县
95	四川褐薏苡-1	野生种	四川省	134	弄璋褐薏苡-2	野生种	云南省盈江县
96	四川灰白薏米	野生种	四川省	135	弄璋棕薏苡	野生种	云南省盈江县
97	四川深棕薏苡	野生种	四川省雅安市	136	陇川薏苡	野生种	云南省瑞丽市
98	四川褐薏苡-2	野生种	四川省雅安市	137	勐卯薏苡-1	野生种	云南省瑞丽市
99	四川褐薏苡-3	野生种	四川省	138	勐卯薏苡-2	野生种	云南省瑞丽市
100	四川棕薏苡-1	野生种	四川省农业大学	139	瑞丽褐薏苡	野生种	云南省瑞丽市
101	四川棕薏苡-2	野生种	四川省农业大学	140	瑞丽棕薏苡	野生种	云南省瑞丽市
102	四川褐薏苡-4	野生种	四川省农业大学	141	瑞丽灰薏苡	野生种	云南省瑞丽市
103	四川褐薏苡-5	野生种	四川省农业大学	142	芒市薏苡	野生种	云南省芒市
104	四川棕薏苡-3	野生种	四川省农业大学	143	临沧褐薏苡	野生种	云南省临沧市
105	四川黄白薏苡	野生种	四川省农业大学	144	耿马褐薏苡	野生种	云南省耿马县
106	四川棕薏米	地方种	四川省农业大学	145	勐海棕薏苡-1	野生种	云南省勐海县
107	四川棕薏苡-4	野生种	四川省农业大学	146	勐海棕薏苡-2	野生种	云南省勐海县
108	四川棕薏苡-5	野生种	四川省农业大学	147	勐海褐薏苡	野生种	云南省勐海县
109	富源棕薏米	地方种	云南省富源县	148	景洪灰薏苡	野生种	云南省景洪市
110	曲靖棕薏苡	野生种	云南省曲靖市	149	景洪褐薏苡-1	野生种	云南省景洪市
111	富源褐薏苡	野生种	云南省富源县	150	勐腊棕薏苡	野生种	云南省勐腊县
112	陆良薏苡	野生种	云南省陆良县	151	景洪褐薏苡-2	野生种	云南省景洪市
113	师宗灰薏苡	野生种	云南省师宗县	152	勐海棕薏苡	野生种	云南省勐海县
114	师宗棕薏苡-1	野生种	云南省师宗县	153	澜沧褐薏苡	野生种	云南省普洱市
115	师宗棕薏苡-2	野生种	云南省师宗县	154	澜沧棕薏米	地方种	云南省普洱市

表1(续)

序号 No.	名称 Name	分类 Classification	来源 Source	序号 No.	名称 Name	分类 Classification	来源 Source
155	个旧褐薏苡	野生种	云南省个旧县	173	云南棕薏米	地方种	云南省
156	马关棕薏苡	野生种	云南省马关县	174	云南灰棕薏苡-1	野生种	云南省
157	文山灰薏米	地方种	云南省文山县	175	云南灰棕薏苡-2	野生种	云南省
158	云南棕薏苡	野生种	云南省大理市	176	云南黄薏米-1	地方种	云南省
159	丘北棕薏米	地方种	云南省丘北县	177	云南褐薏苡-2	野生种	云南省
160	师宗棕薏米	地方种	云南省师宗县	178	云南褐薏苡-3	野生种	云南省
161	红河白薏米	地方种	云南省弥勒市	179	云南褐薏苡-4	野生种	云南省
162	师宗褐薏苡-1	野生种	云南省师宗县	180	云南黄薏米-2	地方种	云南省
163	师宗褐薏苡-2	野生种	云南省师宗县	181	泰顺白薏米-1	地方种	浙江省泰顺县
164	师宗褐薏苡-3	野生种	云南省师宗县	182	缙云白薏米-1	地方种	浙江省缙云县
165	罗平白薏米	地方种	云南省罗平县	183	武义白薏米	地方种	浙江省武义县
166	罗平棕薏苡	野生种	云南省罗平县	184	泰顺白台湾薏苡	野生种	浙江省泰顺县
167	曲靖褐薏苡	野生种	云南省曲靖市	185	泰顺白薏米-2	地方种	浙江省泰顺县
168	曲靖棕薏米	地方种	云南省曲靖市	186	缙云白薏米-2	地方种	浙江省缙云县
169	师宗褐薏苡-4	野生种	云南省师宗县	187	缙云白薏米-3	地方种	浙江省缙云县
170	云南黄白薏苡	地方种	云南省曲靖市	188	浙江褐薏米	地方种	浙江省
171	云南褐薏苡-1	野生种	云南省	189	浙江褐薏苡	野生种	浙江省
172	云南小珠薏苡	野生种	云南省	190	浙江白薏米	野生种	浙江省

1.2 试验方法

1.2.1 脂肪酸提取 供试材料薏苡籽粒进行脱壳,种仁脂肪酸甲酯化方法及气相色谱条件按照GB5009.168-2016《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》(<https://www.nssi.org.cn/nssi/front/107117043.html>)方法进行,硬脂酸、油酸和亚油酸含量通过其标准品(Sigma公司)建立的标准曲线进行绝对定量计算获得,共设置3个生物学重复。

1.2.2 DNA提取及基因序列扩增 采用CTAB法提取薏苡叶片DNA,用1%琼脂糖胶电泳检测浓度,保存于-20℃备用。对190份薏苡材料进行*CIFAD2*和*CISAD*两个基因基因组序列扩增,扩增引物序列见表2^[15]。PCR反应体系均为50 μL,包括15 μL ddH₂O,25 μL的2× Ex Taq Buffer(Takara),1 μL dNTP Mix(10mmol/L),1 μL Ex Taq(Takara),5 μL DNA,各1.5 μL的正反向引物(10×)。PCR反应条件为94℃ 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 90 s(*CIFAD2*)或3 min(*CISAD*),30次循环;72℃ 10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,用胶回收试剂盒(OMEGA)回收目的片段,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

表2 本研究引物序列

Table 2 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
CIFAD2 -F	AGCAAATGGGTGCTGGC
CIFAD2 -R	CCGTCTCGGCTCTGCAA
CISAD-1F	CTCCCATTGCCTCCAG
CISAD-1R	CTGAAGAGTTCAATGGTC
CISAD-2F	TCGTAGTACTCTCTGCATC
CISAD-2R	CTGTCTCCTCAGCAGTC
CISAD-3F	CTCAGAGAACGTGCCAAG
CISAD-3R	CAAGCAGTCGTCGCAATG

1.2.3 单倍型鉴定分析 利用MEGA 11软件^[27]对190份薏苡*CIFAD2*和*CISAD*基因序列进行BLAST比对(参考基因组为贵州省主栽薏苡品种兴仁小白壳,数据暂未发表),获取基因内部SNP变异信息,剔除次等位基因频率在0.05以内的位点(MAF < 0.05),保留位于基因外显子的位点,利用R程序包geneHap^[28]进行单倍型鉴定。将在全部供试材料单倍型类型中占比>5%的单倍型认定为有效单倍型,采用R程序包geneHap分析不同单倍型与薏苡

种仁硬脂酸、油酸和亚油酸含量差异,采用 R 程序包 Haplo.Stats^[29] 进行单倍型与各脂肪酸含量关联分析,采用 Bonferroni 校正法确定关联显著性阈值 ($P = \text{单倍型数量}/0.05$)。

2 结果与分析

2.1 脂肪酸组成分析

190 份薏苡种仁 3 种脂肪酸中油酸含量 > 亚油酸含量 > 硬脂酸含量,相互差异显著,且存在极显著正相关性(表 3, 图 1)。3 种脂肪酸的变异系数在

15.84% ~ 23.05% 之间,硬脂酸变异系数最大,遗传多样性指数为 5.22 ~ 5.23,说明 190 份薏苡种质 3 种脂肪酸含量遗传多样性较为丰富。油酸含量较高的薏苡种质为:小河薏苡(34)、四川深棕薏苡(97)、碧痕薏苡(46)。亚油酸含量较高的薏苡种质为:洱源薏苡-1(127)、洱源薏苡-2(128)、小河薏苡(34)。硬脂酸含量较高的薏苡种质为:洱源薏苡-1(127)、云南黄白薏苡(170)、小河薏苡(34)。这些薏苡种质资源可作为高脂肪酸薏苡种质创新和品种改良的亲本选择。

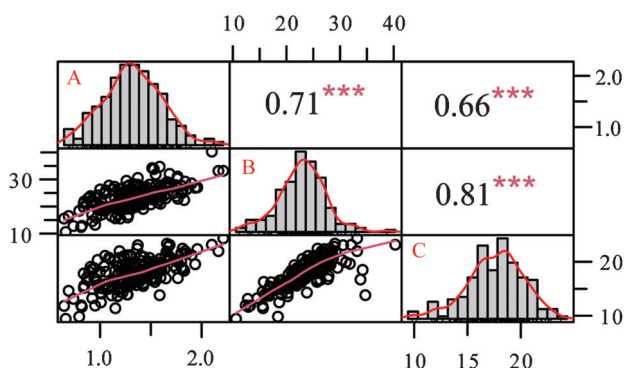
表 3 190 份薏苡种质种仁 3 种脂肪酸含量统计分析

Table 3 Statistical analysis of three fatty acid content in 190 coix germplasm

脂肪酸 Fatty acid	均值 Mean value	最小值 Minimum value	最大值 Maximum value	标准差 Standard deviation	极差 Range	变异系数(%) Coefficient of variation	遗传多样性指数 Shannon index of genetic diversity
油酸(mg/g) Oleic acid	23.12 A	10.60	40.29	4.65	29.69	20.09	5.23
亚油酸(mg/g) Linoleic acid	17.71 B	9.43	24.35	2.81	14.93	15.84	5.23
硬脂酸(mg/g) Stearic acid	1.32 C	0.65	2.21	0.31	1.57	23.05	5.22

数据后不同大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

There was significant difference between different capital letters ($P < 0.05$)



A: 硬脂酸; B: 油酸; C: 亚油酸; 图中横、纵坐标数值代表表型数据, ***表示在 $P < 0.001$ 水平下显著

A: Stearic acid; B: Oleic acid; C: Linoleic acid; In the figure, the transverse and longitudinal values represent the phenotypic data, *** indicate significant differences at the $P < 0.001$ level

图 1 190 份薏苡种质 3 种脂肪酸含量分布

Fig. 1 Distribution of three fatty acid content in 190 coix germplasm

2.2 *CISAD* 和 *CIFAD2* 基因序列多态性

通过对 190 份薏苡 *CISAD* 和 *CIFAD2* 基因序列 BLAST 比对,发现 2 个基因的外显子、内含子区域存在 SNP 变异。*CIFAD2* 基因存在 3 个 SNP,包含 1 个非同义突变(丙氨酸→缬氨酸),2 个同义突变,均处于外显子内。*CISAD* 基因存在 14 个 SNP,11 个位于

内含子,3 个位于外显子,其中 2 个为非同义突变(精氨酸→甲硫氨酸,脯氨酸→苏氨酸),1 个为同义突变(表 4)。

2.3 *CISAD* 和 *CIFAD2* 基因单倍型鉴定

基于 190 份薏苡 *CISAD* 和 *CIFAD2* 基因外显子 SNP 信息,对各基因单倍型进行鉴定,共获得 10 种单倍型,*CISAD* 基因和 *CIFAD2* 基因各 5 种(表 5)。在 *CISAD* 基因中,除 Hap5 外,其余 4 种单倍型频率分布较为平均,主要单倍型 Hap1 在全部供试材料中占比为 31.05%,其次为 Hap2 单倍型,占比 26.84%,Hap3 与参考基因组相同。在 *CIFAD2* 基因中,主要单倍型 Hap1 占比达 80% 以上,远高于其他单倍型,并与参考基因组单倍型一致。

2.4 *CISAD* 和 *CIFAD2* 基因单倍型脂肪酸含量差异分析

对全部供试材料单倍型类型中占比 > 5% 的单倍型脂肪酸含量进行差异分析,由图 2 可知,*CISAD* 基因的 4 种单倍型(Hap1~4)中,对于硬脂酸,Hap1 与 Hap2、Hap4, Hap3 与 Hap2、Hap4 之间均存在极显著差异,而对于油酸和亚油酸,Hap1~4 之间均无显著差异。*CIFAD2* 基因的 3 种单倍型(Hap1~3)中,对于硬脂酸和亚油酸,各单倍型之间均无显著差异,

而对于油酸,单倍型 Hap1 和 Hap2 存在显著差异。不同单倍型 *CISAD*、*CIFAD2* 基因分别形成了差异显

著的硬脂酸和油酸含量,这与前人对 *SAD* 和 *FAD2* 的基因功能研究结果一致^[11-14]。

表 4 SNP 变异信息

Table 4 SNP variation information

基因 Gene	标记 Marker	位置(bp) Position	等位基因型 Allelotype	区域 Region	突变类型 Mutation type
<i>CISAD</i>	SNP101	101	G/T	外显子	精氨酸→甲硫氨酸
	SNP142	142	A/G	内含子	-
	SNP645	645	A/G	内含子	-
	SNP691	691	C/G	内含子	-
	SNP1226	1226	C/T	内含子	-
	SNP1318	1318	A/G	内含子	-
	SNP1387	1387	A/C	内含子	-
	SNP1388	1388	C/T	内含子	-
	SNP1731	1731	C/T	内含子	-
	SNP2987	2987	A/G	内含子	-
	SNP3668	3668	C/G	内含子	-
	SNP3906	3906	C/T	内含子	-
	SNP4175	4175	A/C	外显子	脯氨酸→苏氨酸
	SNP4291	4291	C/G	外显子	同义
	<i>CIFAD2</i>	SNP200	200	C/T	外显子
SNP933		933	C/T	外显子	同义
SNP972		972	G/T	外显子	同义

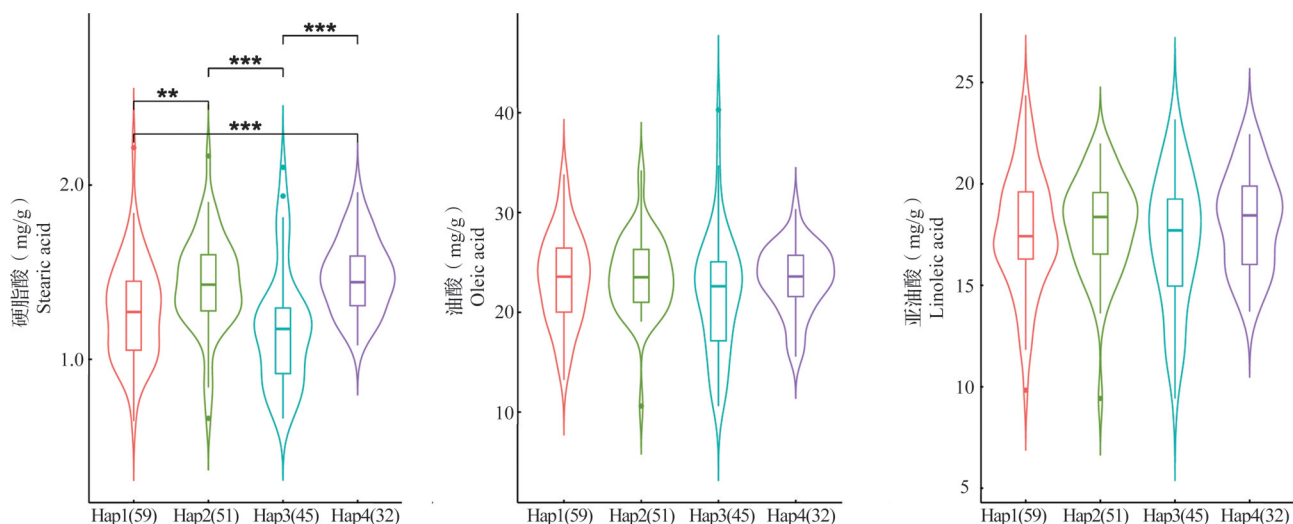
-表示突变位于内含子区域,不导致氨基酸改变

- indicates that the mutation is located in the intron region and does not cause an amino acid change

表 5 *CISAD* 和 *CIFAD2* 基因单倍型

Table 5 Haplotypes of *CISAD* and *CIFAD2*

基因 Gene	单倍型数目 Number of haplotype	单倍型 Haplotype	基因型 Genotype	频数 Frequency	占比(%) Proportion
<i>CISAD</i>	5	Hap1	TAC	59	31.05
		Hap2	TCG	51	26.84
		Hap3	TAG	45	23.68
		Hap4	TCC	32	16.84
		Hap5	GAC	3	1.58
<i>CIFAD2</i>	5	Hap1	CCG	153	80.53
		Hap2	TTT	17	8.95
		Hap3	TCG	13	6.84
		Hap4	TCT	6	3.16
		Hap5	CTG	1	0.53



括号内数字表示属于该单倍型材料的数量; *: 在 $P < 0.05$ 水平上差异显著; **: 在 $P < 0.01$ 水平上差异显著; 下同
The numbers in parentheses indicate the amount of material belonging to that haplotype; *: Significant differences at the $P < 0.05$ level;
**: Significant differences at the $P < 0.01$ level; The same as below

图 2 *CISAD* 基因 4 种单倍型的 3 种脂肪酸含量差异分析

Fig. 2 Analysis of differences in the content of 3 fatty acids among 4 haplotypes of *CISAD*

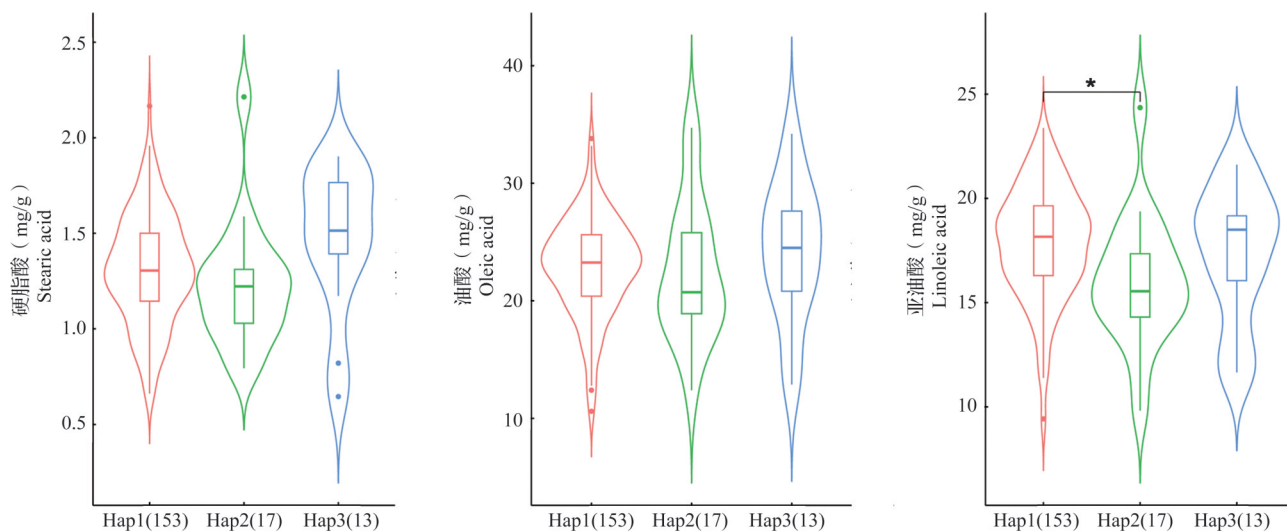


图 3 *CIFAD2* 基因 3 种单倍型的 3 种脂肪酸含量差异分析

Fig. 3 Analysis of differences in the content of 3 fatty acids among 3 haplotypes of *CIFAD2*

2.5 单倍型与脂肪酸含量关联分析

将全部供试材料单倍型类型中占比 > 5% 的单倍型与 3 种脂肪酸含量进行关联分析, 并通过 Bonferroni 校正法确定显著性阈值。由表 6 可知, *CISAD* 单倍型 Hap2~4 与硬脂酸均表现为显著关联,

其中 Hap2、Hap4 具有正效应, Hap3 具有负效应。*CIFAD2* 单倍型 Hap2 与亚油酸显著关联, 且具有负效应。其余单倍型与脂肪酸之间均无关联显著性, 关联分析结果与各单倍型脂肪酸含量差异分析结果一致。

表6 单倍型与脂肪酸含量关联分析结果

Table 6 Results of the association analysis between haplotypes and fatty acid content

基因 Gene	单倍型 Haplotype	单倍型频率 Haplotype frequency	硬脂酸 Stearic acid		油酸 Oleic acid		亚油酸 Linoleic acid	
			效应值 Effect value	P值 P-value	效应值 Effect value	P值 P-value	效应值 Effect value	P值 P-value
			<i>CISAD</i>	Hap1	0.311	-1.622	0.105	0.448
	Hap2	0.268	3.138	0.002*	0.995	0.320	0.759	0.448
	Hap3	0.237	-4.377	0.00001*	-2.081	0.037	-1.170	0.242
	Hap4	0.168	3.318	0.001*	0.371	0.711	0.810	0.418
<i>CIFAD2</i>	Hap1	0.805	-1.200	0.230	-1.160	0.246	1.721	0.085
	Hap2	0.089	-1.834	0.067	-1.189	0.234	-3.031	0.002*
	Hap3	0.068	2.191	0.028	0.988	0.323	-0.282	0.778

3 讨论

基因序列多态性是物种遗传多样性形成的分子基础, SNP是最常见的多态性遗传变异标记之一^[30-31]。本研究对190份薏苡种质 *CISAD* 和 *CIFAD2* 基因序列进行分析, 在两个基因内部分别发现了14个和3个SNP, 表明 *CISAD* 和 *CIFAD2* 存在较为丰富的序列多态性。事实上, 研究人员已在众多作物油脂相关基因内部检测到关键SNP变异, 如玉米籽粒油酸含量与 *ZmSADI* 基因相关, 该基因活性受到CDS区1个非同义SNP和3'非翻译区1个5 bp Indel 变异的影响^[32]; 大豆油脂相关基因 *GmDGK7* 和 *GmTPR* 中各存在1个SNP, 其基因型的改变与硬脂酸、油酸和亚油酸含量均显著关联^[33], 这与本研究鉴定到的SNP可能是形成薏苡脂肪酸含量多样性丰富的遗传基础结果一致。

单倍型分析通常基于一组连锁的SNP位点组合, 其包含的遗传信息较单个SNP更为丰富^[34], 因此育种家更青睐于通过鉴定优异单倍型材料来推进作物种质资源创新利用和提质增效。本研究鉴定到 *CISAD* 基因4种主要单倍型和 *CIFAD2* 基因3种主要单倍型, 发现 *CISAD* 和 *CIFAD2* 单倍型分别仅在硬脂酸、亚油酸含量中存在显著性差异, 印证了 *CISAD* 和 *CIFAD2* 基因分别催化硬脂酸到油酸、油酸到亚油酸的功能。另外, *CISAD* 单倍型 Hap1 和 Hap3 的硬脂酸含量极显著低于 Hap2 和 Hap4, 表明 Hap1 和 Hap3 型 *CISAD* 基因更利于硬脂酸向油酸转化, 结合关联分析结果, 进一步确定 Hap3 为硬脂酸脱饱和酶活性优异单倍型, 包含1个非同义SNP位点(SNP4175), 是硬脂酸脱饱和酶活性变化的关

键位点。*CIFAD2* 单倍型 Hap1 的亚油酸含量显著高于 Hap2, 且关联分析表明 Hap2 对亚油酸含量具有显著负效应, 因此, *CIFAD2* 单倍型为 Hap1 的薏苡种质可作为高油品种选育的亲本材料, 其中1个非同义SNP位点(SNP200)是内质网油酸脱饱和酶活性差异的关键位点。

参考文献

- [1] Liu L, Duncan N A, Chen X C, Cui J X. Exploitation of job's tears in paleolithic and neolithic China: Methodological problems and solutions. *Quaternary International*, 2019, 529: 25-37
- [2] Liu L, Li Y Q, Zhao Y N, Chen X C, Gu W F. Beyond subsistence: Evidence for red rice beer in 8000-year old Neolithic burials, north China. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 2023, 51: 104168
- [3] Weng W F, Peng Y, Pan X, Yan J, Li X D, Liao Z Y, Cheng J P, Gao A J, Yao X, Ruan J J, Zhou M L. Adlay, an ancient functional plant with nutritional quality, improves human health. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1019375
- [4] Lu H C, Jiang P L, Hsu L R, Chyan C L, Tzen J T. Characterization of oil bodies in adlay (*Coix lachryma-jobi* L.). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2010, 74 (9): 1841-1847
- [5] 丁怡, 唐星. 柱前衍生 HPLC 法测定薏苡仁油中的脂肪酸含量. *药物分析杂志*, 2004 (3): 249-252
Ding Y, Tang X. Detection of fatty acid in oleum coicis by pre-column derivation HPLC. *Pharmaceutical Analysis*, 2004 (3): 249-252
- [6] Philip D B, Sten S, John O. Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2013, 16 (3): 358-364
- [7] Porokhvinova E A, Matveeva T V, Khafizova G V, Bemova V D, Doubovskaya A G, Kishlyan N V, Podolnaya L P,

- Gavrilova V A. Fatty acid composition of oil crops: Genetics and genetic engineering. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2022, 69(6): 2029-2045
- [8] He M, Qin C X, Wang X, Ding N Z. Plant unsaturated fatty acids: Biosynthesis and regulation. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 390
- [9] Fan K J, Qin Y H, Hu X L, Xu J D, Ye Q Z, Zhang C Y, Ding Y Y, Li G, Chen Y, Liu J, Wang P Q, Hu Z H, Yan X C, Xiong H R, Liu H, Qin R. Identification of genes associated with fatty acid biosynthesis based on 214 safflower core germplasm. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 763
- [10] Wang J, Qi F Y, Zheng Z, Sun Z Q, Tian M D, Wang X, Huang B Y, Dong W Z, Zhang X Y. Global transcriptome analyses provide into several fatty acid biosynthesis-related genes in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Tropical Plant Biology*, 2021, 14: 267-282
- [11] Du H W, Huang M, Hu J Y, Li J S. Modification of the fatty acid composition in *Arabidopsis* and maize seeds using a stearyl-acyl carrier protein desaturase-1 (*ZmSAD1*) gene. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 137-146
- [12] Shi J H, Lang C X, Wang F L, Wu X L, Liu R H, Zheng T, Zhang D Q, Chen J Q, Wu G T. Depressed expression of *FAE1* and *FAD2* genes modifies fatty acid profiles and storage compounds accumulation in *Brassica napus* seeds. *Plant Science*, 2017, 263: 177-182
- [13] Yang J, Xing G J, Niu L, He H L, Guo D Q, Du Q, Qian X Y, Yao Y, Li H Y, Zhong X F, Yang X D. Improved oil quality in transgenic soybean seeds by RNAi-mediated knockdown of *GmFAD2-1B*. *Transgenic Research*, 2018, 27(2): 155-166
- [14] Zhao N, Zhang Y, Li Q Q, Li R F, Xia X, Qin X, Guo H H. Identification and expression of a stearyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 87: 9-16
- [15] 付瑜华, 蒙秋伊, 李秀诗, 杨小雨, 敖茂宏, 周祥, 申刚, 刘凡值. 薏苡油脂合成关键基因克隆及其生物信息学分析. *南方农业学报*, 2020, 51(3): 485-495
Fu Y H, Meng Q Y, Li X S, Yang X Y, Ao M H, Zhou X, Shen G, Liu F Z. Cloning and bioinformatic analysis of key lipid synthesis genes from *Coix lacryma-jobi*. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(3): 485-495
- [16] 杨小红, 严建兵, 郑艳萍, 余建明, 李建生. 植物数量性状关联分析研究进展. *作物学报*, 2007, 33(4): 523-530
Yang X H, Yan J B, Zheng Y P, Yu J M, Li J S. Reviews of association analysis for quantitative traits in plants. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(4): 523-530
- [17] Zunjare R U, Hossain F, Muthusamy V, Baveja A, Chauhan H S, Thirunavukkarasu N, Saha S, Gupta H S. Influence of rare alleles of β -carotene hydroxylase and lycopene epsilon cyclase genes on accumulation of provitamin A carotenoids in maize kernels. *Plant Breeding*, 2017, 136(6): 872-880
- [18] Muthusamy V, Hossain F, Thirunavukkarasu N, Rsc S S F. Genetic analyses of kernel carotenoids in novel maize genotypes possessing rare allele of beta-carotene hydroxylase gene. *Cereal Research Communications*, 2016, 44(4): 1-12
- [19] Szalma S J, Buckler E S, Snook M E, McMullen M D. Association analysis of candidate genes for maysin and chlorogenic acid accumulation in maize silks. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110(7): 1324-1333
- [20] Butrón A, Chen Y C, Rottinghaus G E, McMullen M D. Genetic variation at *bx1* controls DIMBOA content in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 120(4): 721-734
- [21] Zhang W T, Sun J, Zhao G X, Wang J G, Liu H L, Zheng H L, Zhao H W, Zou D T. Association analysis of the glutelin synthesis genes *GluA* and *GluB1* in a *Japonica* rice collection. *Molecular Breeding*, 2017, 37(10): 129
- [22] Perez M B M, Zhao J, Yin Y H, Hu J Y, Fernandez M G S. Association mapping of brassinosteroid candidate genes and plant architecture in a diverse panel of *sorghum bicolor*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 127(12): 2645-2662
- [23] Fan H C, Wang J, Potanina A, Quake S R. Whole-genome molecular haplotyping of single cells. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(1): 51-57
- [24] 于欢, 陈伊洁, 刘康林, 张帆. 单倍型分析软件 HaploAssistant 包的开发与应用. *分子植物育种*, 2024, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231120.1141.010.html>
Yu H, Chen Y J, Liu K L, Zhang F. Development and application of a haplotype analysis R package (HaploAssistant). *Molecular Plant Breeding*, 2024, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231120.1141.010.html>
- [25] 王明洋. 小麦淀粉分支酶基因 *TaSBEs* 单倍型及基因编辑研究. 泰安: 山东农业大学, 2023
Wang M Y. Haplotype analysis and gene editing of wheat starch branching enzyme *TaSBEs*. Taian: Shandong Agricultural University, 2023
- [26] 张紫晋, 蒲邓佳, 边巴卓玛, 彭君, 江迪, 粟永英, 陈静. 青稞主效休眠基因单倍型分布及利用. *麦类作物学报*, 2023, 43(12): 1552-1557
Zhang Z J, Pu D J, Bianba Z M, Peng J, Jiang D, Su Y Y, Chen J. Distribution and application of haplotypes of major dormancy genes in hullless barley. *Journal of Triticeae Crops*, 2023, 43(12): 1552-1557
- [27] Koichiro T, Glen S, Sudhir K. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027
- [28] Zhang R, Jia G, Diao X. GeneHapR: An R package for gene haplotypic statistics and visualization. *BMC Bioinformatics*, 2023, 24(1): 199
- [29] Schaid D J, Rowland C M, Tines D E, Jacobson R M, Poland G A. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American Journal of Human Genetics*, 2002, 70(2): 425-434
- [30] Stephens J C, Schneider J A, Tanguay D A, Choi J, Acharya

- T, Stanley S E, Jiang R, Messer C J, Chew A, Han J H, Duan J, Carr J L, Lee M S, Koshy B, Kumar A M, Zhang G, Newell W R, Windemuth A, Xu C B, Kalbflesch T S, Shaner S L, Arnold K, Schulz V, Drysdale C M, Nandabalan K, Judson R S, Ruano G, Vovis G F. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*, 2001, 293(5529): 489-493
- [31] 张洪映,毛新国,景蕊莲,谢惠民,昌小平.小麦 *TaPK7* 基因单核苷酸多态性与抗旱性的关系.作物学报, 2008, (9): 1537-1543
- Zhang H Y, Mao X G, Jing R L, Xie H M, Chang X P. Relationship between single nucleotide polymorphism of *TaPK7* gene and drought tolerance in wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, (9): 1537-1543
- [32] Han Y J, Xu G, Du H W, Hu J Y, Liu Z J, Li H, Li J S, Yang X H. Natural variations in stearoyl-acyl desaturase genes affect the conversion of stearic to oleic acid in maize kernel. *Theoretical and Applied Genetics*, 2017, 130 (1): 151-161
- [33] 陆亮,贺建波,苗龙,王晓婷,刘方东,王新通,盖钧镒,李艳.大豆 *GmDGK7* 和 *GmTPR* 基因与油脂相关性状的关联分析.大豆科学, 2015, 34(6): 938-944
- Lu L, He J B, Miao L, Wang X T, Liu F D, Wang X T, Gai J Y, Li Y. Association of *GmDGK7* and *GmTPR* genes with oil related traits in soybean. *Soybean Science*, 2015, 34 (6) : 938-944
- [34] 李战,王影,于莉莉,陈伊洁,于欢,王俊,邱丽娟.脂肪酸去饱和酶 FAD3 蛋白特征及其在大豆中的遗传演化分析.大豆科学, 2023, 42(4): 396-405
- Li Z, Wang Y, Yu L L, Chen Y J, Yu H, Wang J, Qiu L J. Protein feature and genetic evolution analysis of fatty acid desaturase FAD3 in soybean. *Soybean Science*, 2023, 42 (4) : 396-405