

TaDEP1 基因在普通六倍体小麦 及其供体种中的保守与分化

张 镨^{1,2}, 李爱丽², 张 兰², 赵光耀², 孔秀英², 贾继增², 徐吉臣¹, 毛 龙²

(¹北京林业大学生物科学与技术学院/林木育种国家工程实验室/林木、花卉遗传育种教育部
重点实验室/国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京 100083; ²中国农业
科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081)

摘要:根据已知小麦正源基因 *TaDEP1* cDNA 序列设计引物, 成功克隆了小麦 *TaDEP1* 基因组序列, 发现该基因包含 5 个外显子, 4 个内含子。通过比较该基因在六倍体普通小麦 A、B、D 基因组中的差异, 筛选出可以区分 A、B、D 基因组的分子标记 Ta956。以中国春缺体-四体系为材料, 利用该标记将 *TaDEP1* 基因定位于小麦 5A、5B 和 5D。进一步将 Ta956 扩增的基因组片段在六倍体 A、B、D 基因组和二倍体小麦以及四倍体小麦的同源基因组间进行比较, 发现内含子区域变异较大, 特别是六倍体小麦 B 和 D 基因组。进一步对 *TaDEP1* 编码蛋白分析显示 *TaDEP1*-D 的预测功能域明显区别于 *TaDEP1*-A 和 *TaDEP1*-B, 表明 *TaDEP1* 功能可能具有基因组特异性。筛选的区分不同基因组特异分子标记则为今后的品种鉴定提供了依据。

关键词:小麦; *TaDEP1*; 染色体定位; 序列分析

Conservation and Divergence of *TaDEP1* Genes in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and its Donor Species

ZHANG Kai^{1,2}, LI Ai-li², ZHANG Lan², ZHAO Guang-yao²,
KONG Xiu-ying², JIA Ji-zeng², XU Ji-chen¹, MAO Long²

(¹National Engineering Laboratory for Tree Breeding/Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees
and Ornamental Plants, Ministry of Education/The Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of
State Forestry Administration/College of Biological Sciences and Biotechnology Beijing Forestry University, Beijing
100083; ²National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/
Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The cloning of the genomic sequence of the wheat orthologous gene *TaDEP1* which contains five exons and 4 introns were studied. Genomic sequence comparison revealed a region that can be used as molecular marker (Ta956) to distinguish homoeoalleles of hexaploid wheat. Ta956 was used to map *TaDEP1* to wheat chromosomes 5A, 5B, and 5D by using Chinese Spring nulli-tetrasomic lines. Sequences corresponding to Ta956 were then isolated and sequenced from hexaploid wheat, its putative donor species and tetraploid wheat. Sequence comparison showed that most variations were present at introns, particularly between the B and D homoeoalleles. Domain analysis showed that proteins from the D genome of hexaploid wheat was more different to those on the A and D genomes, suggesting functional divergence among *TaDEP1* proteins from the A, B, and D genomes. The potential of using Ta956 as a marker for variety identification is discussed.

Key words: Wheat; *TaDEP1*; Chromosomal localization; Sequence analysis

收稿日期: 2011-01-28 修回日期: 2011-04-22

基金项目: 国家“973”计划 (2010CB125900, 2009CB118300)

作者简介: 张镨, 硕士生, 主要研究方向: 植物抗逆分子遗传学。E-mail: zhangkaisduedu@163.com

通讯作者: 毛龙, 研究员, 主要研究方向: 植物分子遗传学。E-mail: maolong@caas.net.cn

徐吉臣, 教授, 主要研究方向: 植物分子遗传学。E-mail: jcxu282@sina.com

随着全球人口不断增加,粮食紧缺问题越来越严重,培育高产稳产的粮食作物成为目前农业生物学研究的重要课题之一。水稻等模式作物的研究已发现许多重要的基因与作物的产量性状相关,特别是与穗部发育相关的性状,如千粒重、有效穗数和每穗粒数等。目前已经有 200 多个粒重 QTL 得到定位,其中 *GW2* 基因功能缺失会导致子粒宽度和重量及产量的增加,在控制水稻颖壳大小、粒重和产量中起重要作用。作为一个新的 *E3* 泛素连接酶,*GW2* 可能参与了降解促进细胞分裂的蛋白,从而调控水稻谷壳大小、控制粒重以及产量^[1]。而水稻高产相关基因 *Gnla* (*OsCKX2*),则编码一种降解细胞分裂素的酶。降低 *Gnla* 的表达,增加细胞分裂素累积,可导致水稻发育旺盛,穗粒数增多,使该基因改良品种产量大幅提高,且具备抗倒伏等优良特性^[2]。

已有研究表明,直向同源基因(orthologous gene)在不同物种中的功能可能发生分化。研究直向同源基因的功能分化是发现基因新功能的一条有效途径。同为禾谷类的小麦,在穗部性状方面与水稻类似,因而构成基因的同源性也比较高。如以水稻 *OsGW2* 序列为基础,通过比较基因组学结合同源克隆的方法获得了小麦同源基因 *TaGW2*,并发现了可以提高小麦千粒重 3.1g 的优异等位变异^[3]。不仅如此,水稻 *GW2* 在玉米中的同源基因 *ZmGW2* 也被证明具有控制玉米粒型和粒重的功能^[4]。同样,水稻 *OsCKX11* 的小麦同源基因 *TaCKX2*^[5] 以及水稻 *OsCKX5* 在小麦中的同源基因 *TaCKX5*^[6] 都具有类似的重要功能。这些实例表明同源克隆方法能快速有效地在相关目标物种中发现重要功能基因。

水稻 *DEP1* 基因是人们在水稻驯化过程中筛选获得的控制水稻产量的有益突变,能促进细胞分裂,使稻穗变密、枝梗数增加、每穗子粒数增多,达到提高水稻产量 15%~20% 的效果。目前在我国东北和长江中下游地区大面积种植的直立和半直立穗型的高产水稻品种都含有突变的 *dep1* 基因,表明 *dep1* 基因已在我国水稻增产中发挥了关键作用^[7]。Huang 等^[7] 分离了 *OsDEP1* 在普通六倍体小麦、大麦、普通小麦二倍体供体种乌拉尔图(AA)中的同源基因 *TaDEP1*、*HvDEP1*、*TuDEP1* 的 cDNA *TaDEP1*、*HvDEP1*、*TuDEP1* 与水稻 *dep1* 基因在 C 端具有相似的结构。为了验证 *dep1* 基因在其他禾本科作物中的功能,利用 RNAi 干涉沉默普通小麦 *TaDEP1* 基因,结果使小麦的穗变稀,穗粒数减少。小麦穗的疏密、穗粒数的多少是决定小麦产量的重要

因素,因此证明 *dep1* 基因不只在水稻增产中发挥重要的作用,在小麦中也具有类似的功能。表明在禾本科作物中,*DEP1* 基因具有功能上的保守性。

小麦是世界上总产量第二的粮食作物,它广泛种植于世界各地。小麦及其原始供体亲本种类很多。除含有 AA、BB、DD 3 种基因组的异源六倍体普通小麦外,还有二倍体、四倍体小麦等,分别由 AA、SS、DD 或 AABB 等基因组组成。比较发现,二倍体 AA 基因组小麦供体种穗短小,二倍体 SS 基因组小麦供体种粒大、稀疏,二倍体 DD 基因组小麦供体种穗细长、粒小。从外观上看,六倍体普通小麦的穗部形态与二倍体 AA 基因组相似度更高一些。鉴于 *TaDEP1* 基因在六倍体小麦中的功能已初步确定,为最终了解 *DEP1* 基因对小麦穗型发育的影响,本研究通过筛选 *TaDEP1* 基因组特异区段序列信息,对六倍体小麦 *TaDEP1* 基因的基因组序列及 cDNA 序列进行基因组分类,通过六倍体 A、B、D 之间以及与二倍体、四倍体小麦同源基因组进行比较,探讨 *TaDEP1* 基因在六倍体不同基因组间及其供体种中的多态性情况,为 *TaDEP1* 优异等位基因挖掘提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

普通六倍体小麦的二倍体供体种有乌拉尔图小麦(*Triticum urartu*, UR102, AA)、拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*, Y2041, SS)、粗山羊草(*Ae. tauschii*, Ae50, DD);四倍体小麦有野生二粒小麦(*T. dicoccoides*, DS9, AABB)、圆锥小麦(*T. turgidum*, TG2, AABB);六倍体小麦有中国春(*T. aestivum*, AABBDD)以及以中国春为背景的缺体四体材料(由中国农业科学院中国农业部种质资源与生物技术重点开放实验室贾继增研究员提供),植物材料均种植于中国农业科学院温室。

1.2 DNA 的提取

自植物的幼嫩叶片中提取基因组 DNA, DNA 提取采用 Sharp 等^[8] 提出并经 Devos 等^[9] 改进的酚-氯仿法。

1.3 RNA 的提取及反转录 cDNA

参照 TIANGEN 公司 RNA 提取试剂盒的方法提取 RNA, Promega 公司反转录试剂盒(M-MLV)反转录 cDNA。

1.4 PCR 扩增

PCR 扩增反应体系总体积为 20 μ l, 其中 10 \times PCR 缓冲液 2 μ l, 5mmol/L dNTPs 1 μ l, Mg^{2+} 1 μ l,

5mmol/L 前后引物各 1 μ l, 20ng/ μ l 模板 DNA 1 μ l, 2U/ μ l 高保真 DNA 聚合酶 0.5 μ l, ddH₂O 12.5 μ l, 空白对照用 ddH₂O 代替模板 DNA。扩增反应在 PCR 仪上按下列程序进行: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1min, 60 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物根据目的不同, 分别用 1.5% 或 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 基因片段的克隆、测序及序列分析

将扩增的特异性条带切胶回收, 连接到 pGEM-Teasy 载体上 (Promega 公司), 采用热激法转化 Top10 感受态细胞 (TransGen 公司)。提取阳性克隆的质粒, 送至生工生物工程有限公司进行 DNA 测序。获得序列采用 Clustalx 和 GeneDoc 软件进行拼接、比对。

2 结果与分析

2.1 *TaDEP1* 基因组序列的获得及结构分析

小麦 *TaDEP1* cDNA 序列 (GenBank 号: FJ039902.1)

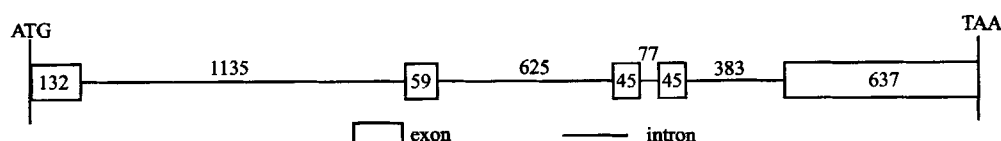


图 1 小麦 *TaDEP1* 基因结构

Fig. 1 The gene structure of *TaDEP1*

2.2 *TaDEP1* 基因的染色体定位

普通小麦是异源六倍体, 包含 A、B、D 3 个基因组。为分析 3 个基因组中 *TaDEP1* 基因的序列差异, 依据上述测得的六倍体小麦中国春 *TaDEP1* 基因序列, 以 500bp 左右大小为间隔区设计特异引物 (表 1), 并以此 6 对引物组合分别对六倍体小麦中

包含一个完整 888 bp 开放阅读框, 编码一个含有 295 个氨基酸的蛋白质。利用这个序列设计包含 *TaDEP1* 完整开放阅读框的特异引物: 正向引物 TaF: 5' - ATGGGGGAGGGCGCGGTGGTGGTGC - 3'; 反向引物 TaR: 5' - TTAACACAGGCACCCGCCAGCACAG - 3'。以六倍体小麦中国春的基因组 DNA 为模版, 利用 *TaDEP1* 基因的特异引物进行 PCR 扩增。

回收克隆扩增片段并对一个 3138bp 的克隆进行了完整测序。结果发现该片段与水稻 *OsDEP1* 基因在氨基酸水平的相似率为 50%, 与已报导的小麦 *TaDEP1* cDNA 序列 DNA 水平的一致率达到 99%, 表明所获得的序列为 *TaDEP1* 的基因组序列。与 cDNA 序列比较发现, 小麦 *TaDEP1* 基因包含 5 个外显子和 4 个内含子 (图 1)。除了内含子大小有所区别外, 与水稻中的 *DEP1* 基因的结构基本一致^[7]。

国春基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果如图 2 所示, 引物组合 Ta956F/Ta956R 能够从基因组 DNA 中扩增出 3 条不同大小的带型, 由大到小分别命名为 TaDEP1-1、TaDEP1-2、TaDEP1-3, 可能分别来自 A、B、D 3 个不同的基因组。

表 1 *TaDEP1* 基因组 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification of *TaDEP1* DNA fragments

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	起始位置 Initial position	终止位置 End position	片段长度 (bp) Size	退火温度 ($^{\circ}$ C) Tm
Ta68F	TGGAGGTGCAGATCCTTGACCGC	68	564	497	60
Ta68R	GTACATCCATGGCAGACCCAAAGAG				
Ta540F	CTCTTTGGGTGTGCCATGGATGTAC	540	992	453	55
Ta540R	GCTCCTGCTTTAAACAAAGTTACTA				
Ta956F	GCTTTAGAATCATAGTAACCTTTGTT	956	1568	613	51
Ta956R	ACAGACTAATCCATACATATGGCAA				
Ta1544F	TTGCCATATCTATGGATTACTCTGT	1544	2122	579	52
Ta1544R	GGACCGGTGCTTCCTTTTGTACTG				
Ta2097F	GCACTAACAAAAGGAAGCACCGGTC	2097	2478	382	55
Ta2097R	TAGGCATTGGCAGGAGCAGCACACC				
Ta2440F	ATATGTGCTTCATGGCTGCTGCT	2440	2967	528	61
Ta2440R	TCCGCATCCGTCTGTACAGTTTTTG				

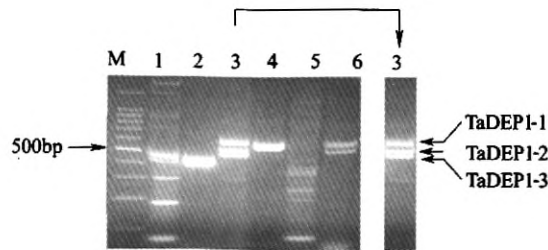


图2 中国春 *TaDEP1* 基因组特异片段 PCR 扩增
Fig.2 PCR amplification of genome specific DNA fragments of *TaDEP1* from Chinese Spring

M: lambda DNA 100bp marker; 1: 引物组合 Ta68F/Ta68R; 2: 引物组合 Ta540F/Ta540R; 3: 引物组合 Ta956F/Ta956R; 4: 引物组合 Ta1544F/Ta1544R; 5: 引物组合 Ta2097F/Ta2097R; 6: 引物组合 Ta2440F/Ta2440R

为确定 3 个片段分别来自哪个基因组, 本研究利用引物组合 Ta956F/Ta956R 对中国春及其缺体四体材料进行了 PCR 扩增, 该引物组合在中国春中共扩增出 3 条带, 而在缺体四体 N5AT5B、N5AT5D、N5BT5A、N5BT5D、N5DT5A 中均只扩增出 2 条带, 表明小麦 *TaDEP1* 基因位于第 5 同源群(图 3)。其中 5A 缺体四体缺失对应于中国春中的 TaDEP1-2,

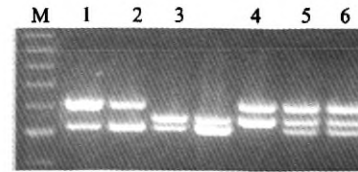


图3 利用中国春缺体四体材料定位 *TaDEP1* 基因组特异片段
Fig.3 Chromosomal location of *TaDEP1* fragments using nulli-tetrasomic lines

M: 100bp marker; 1: N5AT5B; 2: N5AT5D; 3: N5BT5A; 4: N5BT5D; 5: N5DT5A; 6: Chinese Spring (AABBDD)

表明该片段位于 5A 染色体上。同样, TaDEP1-1 和 TaDEP1-3 被分别定位在 5B 和 5D 染色体上。

为进一步了解 *TaDEP1* 在染色体上的精确位置, 本研究对 *TaDEP1* 在 GrainGene 上采用缺失体定位的小麦 EST 进行了比较^[10]。结果发现, *TaDEP1* 与已定位的 EST BE494875 标记在 DNA 水平上的同源性为 96% (235/243)。该缺失体定位表明 *TaDEP1* 基因位于小麦染色体第 5 同源群, 分别位于 5AL 上已开发的 Xksu012BE404462 和 Xksu035BE407068 两个分子标记之间, 以及 5BL 上 Xksu035BE407068 和 Xksu002BE403217 之间^[10]。

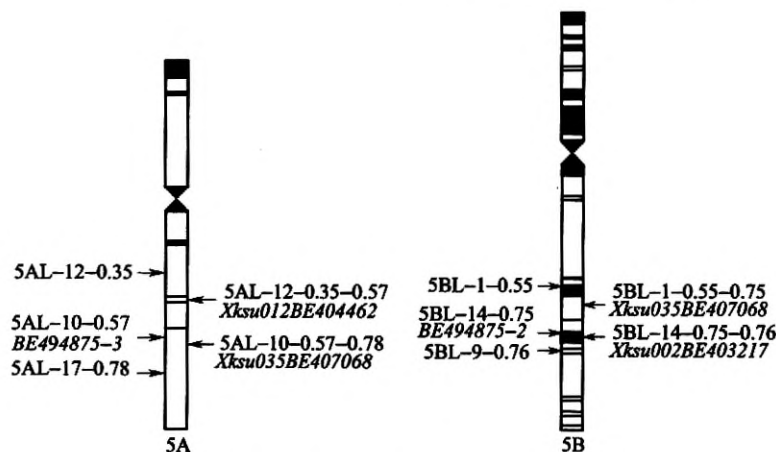


图4 *TaDEP1* EST 在 Bin-map 上的位置^[10]

Fig.4 Location of *TaDEP1* on wheat Bin-maps^[10]

染色体 Bin-map 中, 正体为缺失点位置, 斜体为 EST 号

Vertical letters indicate breakpoints; Italics are EST accession number on the wheat Bin-map

2.3 六倍体普通小麦和二倍体供体种及四倍体小麦中 *TaDEP1* 基因组特异片段克隆及序列分析

由于 Ta956F/Ta956R 能够区分中国春中 A、B、D 3 个基因组中 *TaDEP1* 序列, 本研究用其分别对二倍体乌拉尔图小麦 (AA)、拟斯卑尔脱山羊草 (SS) 和粗山羊草 (DD); 四倍体小麦野生二粒小麦

(AABB)、圆锥小麦 (AABB) 进行扩增。结果显示二倍体小麦中的 *DEP1* 基因片段与六倍体中的同源片段大小并不完全一致(图 5)。

本研究对六倍体小麦 3 个片段以及二倍体小麦中的 *DEP1* 片段分别克隆并测序, 发现六倍体小麦的 3 个片段大小分别为 554bp (Ta-A)、613bp (TaB)、

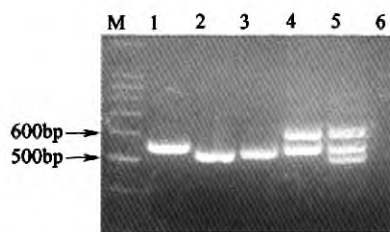


图5 引物组合 Ta956F/Ta956R 在六倍体普通小麦和二倍体供体种及四倍体小麦中的扩增结果
Fig.5 PCR amplification of *TaDEP1* fragment from diploid, tetraploid and hexaploid wheat using primers Ta956F and Ta956R

M:100bp marker;1:乌拉尔图小麦(AA);2:拟斯卑尔脱山羊草(SS);3:粗山羊草(DD);4:野生二粒小麦(AABB);5:圆锥小麦(AABB);6:中国春(AABBDD)

M:100 bp marker;1: *T. urartu* (AA);

2: *Ae. speltoides* (SS);3: *Ae. tauschii* (DD);

4: *T. dicoccoides* (AABB);5: *T. turgidum* (AABB);

6: Chinese Spring (AABBDD)

516bp(*Ta-D*)。这些片段中存在一个完整的外显子,即 *TaDEP1* 基因第二外显子,共 60 个碱基(图 6 红色方框所示)。在其编码序列的第 33 位碱基上 3 个不同来源的序列存在一个 SNP(single nucleotide polymorphism)位点(*Ta-A* 为 G,而 *Ta-B* 和 *Ta-D* 为 A)(图 6 黑色箭头所示),密码子分析显示,该 SNP 位点在六倍体小麦 3 个基因组间属于同义突变,即碱基的变化并未改变该区段 *TaDEP1* 基因所编码的氨基酸序列。在扩增片段的内含子区域,序列间差异较大。在区段 260~360bp 处,*Ta-A* 和 *Ta-D* 相比 *Ta-B* 存在 96 碱基的缺失(图 6 两个星号之间区域所示);在区段 560~580bp 处,*Ta-B* 和 *Ta-D* 相比 *Ta-A* 存在 21 个碱基和 9 个碱基的缺失(图 6 黑色线条所示)。

在 3 个小麦二倍体供体种中,*DEP1* 基因在乌拉尔图小麦(AA)、拟斯卑尔脱山羊草(SS)、粗山羊草(DD)3 个物种间的保守性较高,特别是二倍体小麦供体种 SS 与 DD 间,DNA 水平同源性达到了 95.3%。扩增区段外显子区域在 3 个二倍体间除了之前所述同义突变(图 6 黑色箭头所示)外,还出现了另一个 SNP 位点(C-T)(图 6 白箭头所示),但仍属于同义突变。扩增区段的内含子区域,二倍体乌拉尔图小麦(AA)相比二倍体拟斯卑尔脱山羊草(SS)和粗山羊草(DD)则分别在 60 bp 处有一段碱基缺

失(图 6 虚线所示)和 200~500bp 处存在几个 SNP 位点(图 6),因此造成二倍体小麦供体种(AA)与 SS 和 DD 间的序列同源性相对较低,分别为 83.4%(AA 与 SS 间)和 82.8%(AA 与 DD 间)。

在 2 个四倍体小麦品种中,圆锥小麦(*TtAABBA*)和野生二粒小麦(*TdAABB-A*)仅在第 58bp 出现了一个 SNP 位点(C-T);*TdAABB-B* 和 *TtAABB-B* 在第 416bp 有 1 个 SNP(A-G)。在区段 260~360bp 处,*TtAABB-A* 相比 *TtAABB-B* 存在 96 碱基的缺失(图 6 两个星号之间区域所示);在区段 560~580 处,*TtAABB-B* 相比 *TtAABB-A* 存在 21 个碱基和 9 个碱基的缺失(图 6 黑色线条所示)。*TdAABB-A* 和 *TdAABB-B* 序列间的差异与 *TtAABB-A* 和 *TtAABB-B* 序列差异基本一致。

最后对 3 个二倍体供体种以及四倍体小麦中的 *DEP1* 基因片段序列与六倍体小麦对应的 A、B、D 3 个基因组的同源序列进行了比较(图 6),结果显示,*TdAABB-A* 与 *Ta-A* 序列在此区段序列完全一致;*TtAABB-A* 与 *Ta-A* 仅在第 58bp 出现了 1 个 SNP 位点(C-T);AA 与 *Ta-A* 只有内含子中的 4 个 SNP 位点;DD 与 *Ta-D* 在此区段的内含子区域发生了几处变化,包括 *Ta-D* 中相比二倍体 DD 出现了 1 个 15 bp 的缺失(图 6 虚线所示),另有 2 个 SNP 位点;*TdAABB-B* 与 *Ta-B* 仅在 485bp 有 1 个 SNP(A-G);*TtAABB-B* 与 *Ta-B* 相比,仅在 123bp 有 1 个 SNP(G-C);而 *Ta-B* 相比二倍体 SS 在此区段则出现了较大范围的差异,包括 *Ta-B* 在内含子中 1 个 10 碱基区段(图 6 虚线所示)的缺失,1 个 96 bp(图 6 星号之间所示区域)的插入,另外还存在多处 SNP 位点。这说明在进化过程中,六倍体小麦的 B、D 基因组相比 A 基因组,在内含子区域出现了更大程度的变化。

2.4 序列变化对 *TaDEP1* 蛋白功能的可能影响

利用所获得的 Ta956F/Ta956R 区段序列信息,本研究成功地将从六倍体小麦 A、B、D 3 个基因组 *TaDEP1* cDNA 序列区分为 *Ta-A*、*Ta-B*、*Ta-D* 3 种序列,并与二倍体 AA、SS、DD 中相应的氨基酸编码序列进行类似性分析(表 2)。结果发现六倍体的 *Ta-D* 与 *Ta-A*、*Ta-B* 间的氨基酸编码序列同源性较低,分别为 93.4% (*Ta-D* 与 *Ta-A* 间)和 91.0% (*Ta-D* 与 *Ta-B* 间)。说明 D 基因组在蛋白水平上可能与 A、B 两个基因组相差较大。

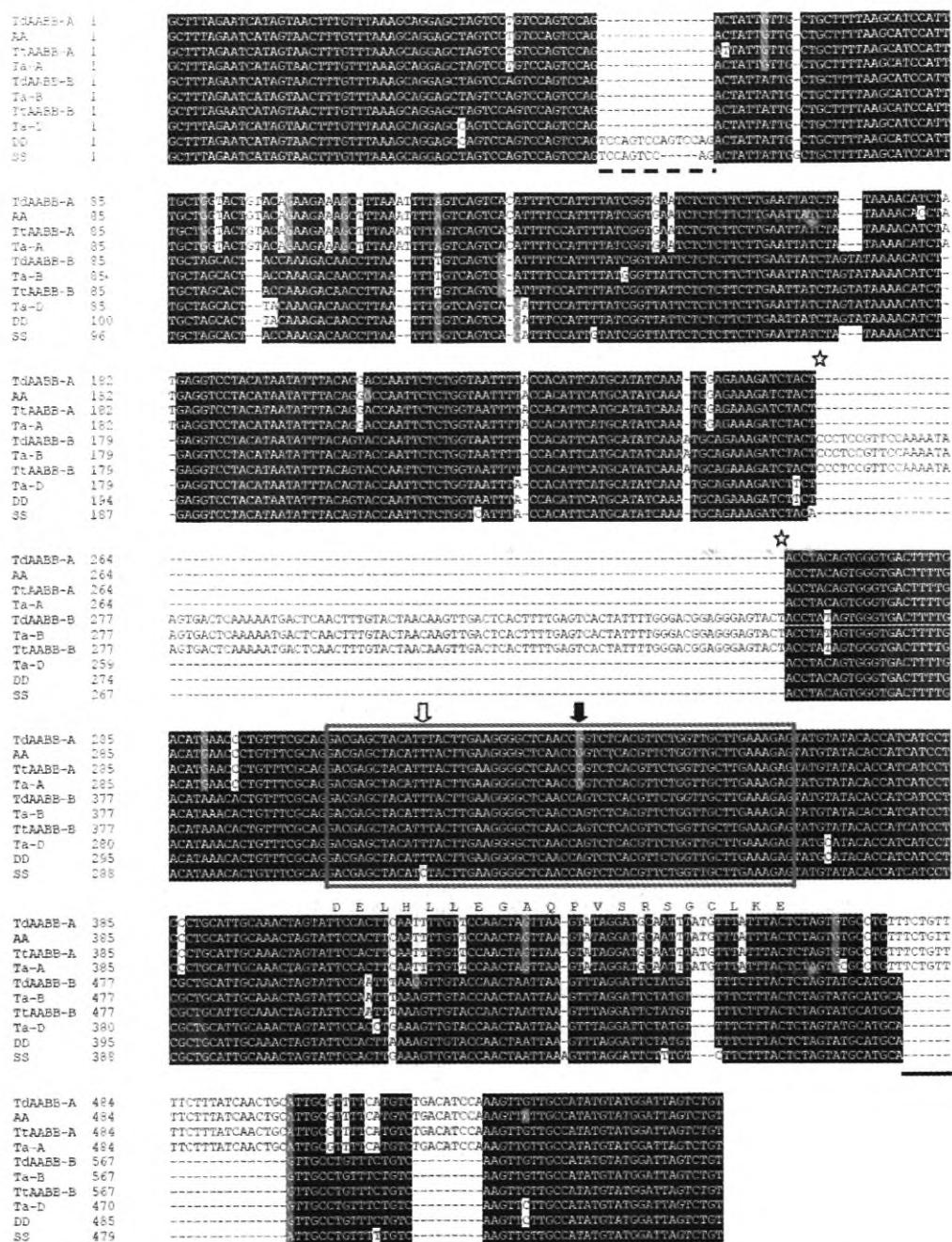


图6 六倍体普通小麦和二倍体供体种及四倍体小麦中 *DEPI* 基因片段序列的比较

Fig. 6 Multiple sequence alignment of *DEPI* sequences from diploid, tetraploid and hexaploid wheat
 Ta-A, Ta-B, Ta-D 分别为六倍体小麦中国春 AA, BB, DD 基因组 *DEPI* 特异片段; AA, SS, DD 分别为乌拉尔图小麦、拟斯卑尔脱山羊草、粗山羊草基因组 *DEPI* 特异片段; TdAABB-A, TdAABB-B 为野生二粒小麦 AA, BB 基因组 *DEPI* 特异片段; TlAABB-A, TlAABB-B 为圆锥小麦 AA, BB 基因组 *DEPI* 特异片段。红色方框为 *DEPI* 第二外显子区; 虚线为二倍体 SS, DD 基因组序列插入位置; 星号之间区域为六倍体小麦中 Ta-B、野生二粒小麦中 TdAABB-B 和圆锥小麦中 TlAABB-B 序列插入位置; 实线为二倍体 AA、六倍体小麦中 Ta-A、野生二粒小麦中 TdAABB-A 和圆锥小麦中 TlAABB-A 序列插入位置; 黑色箭头为六倍体小麦 A 基因组、二倍体小麦 AA 基因组、野生二粒小麦中 TdAABB-A 和圆锥小麦中 TlAABB-A 在外显子区域中的同义突变; 白色箭头为二倍体小麦 SS 基因组在外显子区域中的同义突变
 Ta-A, Ta-B and Ta-D are from Chinese Spring A, B, and D genomes; AA, SS and DD are respectively from *T. urartu*, *Ae. speltoides* and *Ae. tauschii*. Red box, the second exon of *TaDEPI*; Dotted line, insert region of diploid wheat SS, DD; Stars, insert region of Ta-B, TdAABB-B and TlAABB-B; Line, insert region of diploid wheat AA, Ta-A, TdAABB-A and TlAABB-A; Black arrow, synonymous mutation in the exon of the hexaploid and diploid A genome; White arrow, synonymous mutation in the exon of the SS genome

表 2 小麦 *DEP1* 蛋白相似性比较Table 2 Pair-wise sequence similarity between *DEP1* proteins (%)

	AA	SS	DD	Ta-A	Ta-B
SS	92.5				
DD	95.1	94.0			
Ta-A	93.1	95.3	93.4		
Ta-B	90.8	95.2	91.0	96.3	
Ta-D	95.1	94.0	99.3	93.4	91.0

进一步通过 ScanProsite 对上述六倍体小麦 3 个基因组 *TaDEP1* 基因氨基酸编码序列进行结构域预

测,结果发现 Ta-D 的蛋白结构域与 Ta-A 和 Ta-B 的蛋白结构域相差较大,暗示其有可能在蛋白功能上发生变化(图 7)。

将 3 个二倍体小麦中的 *DEP1* 蛋白序列与六倍体小麦对应的 A、B、D 3 个基因组的同源蛋白序列进行比较(表 3),结果显示,二倍体 DD 和六倍体小麦 DD 基因组的蛋白同源性最高,达 99.3%;二倍体小麦供体种 AA 和六倍体小麦 AA 基因组的蛋白同源性最低,只有 93.1%。这说明六倍体小麦中的 DD 基因组,作为最后加入的基因组,仍保留着较多二倍体 DD 的序列信息。

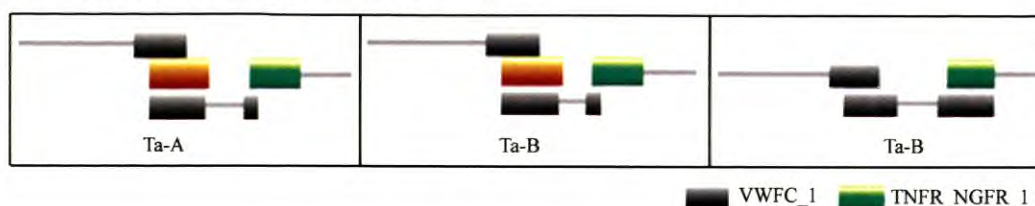


图 7 六倍体小麦 A、B、D 基因组蛋白主要功能域

Fig. 7 Predicted domains of *DEP1* proteins from wheat A, B, and D genomes

VWFC_1 和 TNFR_NGFR_1 为 ScanProsite 预测的未知功能结构域

VWFC_1 and TNFR_NGFR_1 are unknown functional domains predicted by ScanProsite

本研究进一步对 GenBank 中已有 *TuDEP1* (ACT78691)、*TaDEP1* (ACI25444) 和本实验室克隆的分别来自六倍体小麦 3 个基因组的 *TaDEP1* 以及二倍体小麦 *DEP1* 所编码的氨基酸序列进行了比较。结果发现 GenBank 获得的 *TaDEP1* 蛋白序列与所克隆的 Ta-A 的 *DEP1* 蛋白在氨基酸水平上的同源性达到 99.7%。所以,这两个序列应都是六倍体小麦 A 基因组所编码。GenBank 获得的 *TuDEP1* 与所克隆的 AA-*DEP1* 氨基酸水平同源性仅为 89.2%,由此推测这可能是由不同乌拉尔图小麦(AA)种间序列差异较大引起的。

3 讨论

已有研究表明,小麦中大部分与驯化和产量形成有关的 QTL 位点都聚集在第 1 和第 5 同源群染色体上^[11-12],其中 5A 染色体上,已发现存在控制穗长、穗粒数、穗粒重等控制小麦产量性状的主效 QTL 位点区域^[13-14]。本研究通过中国春缺体四体系,结合 Bin Map 方法,成功将 *TaDEP1* 基因定位到了小麦染色体 5AL 和 5BL 上,为今后结合 5AL、5BL 上已知产量性状相关 QTL,研究 *TaDEP1* 基因功能提供了基础。利用缺失体对 EST 进行所谓的 Bin Map 是通过传统的 RFLP 方法实现的。而该方法不能够

检测到 *TaDEP1* 在 5D 染色体上的拷贝,从另一方面说明了六倍体小麦中 D 基因组的 *TaDEP1* 蛋白编码序列与 A、B 基因组的区别较大。

一般认为,普通六倍体小麦起源首先是通过含 AA 基因组的二倍体小麦供体种与含 SS 基因组的二倍体小麦供体种杂交,经染色体加倍形成异源四倍体 AABB,之后又与含 DD 基因组的二倍体小麦供体种杂交,再经染色体加倍合成的。将六倍体小麦基因组特异的 *TaDEP1* 蛋白序列 Ta-A、Ta-B、Ta-D 和二倍体供体种 AA、SS、DD 的 *DEP1* 蛋白序列进行同源性比较,发现 A、B、D 基因组特异的 *TaDEP1* 在氨基酸水平上均发生了不同程度的变化,其中 Ta-A 变化最大,Ta-D 变化最小,说明六倍体小麦形成过程中各基因组在氨基酸水平上发生了一系列的分化。

许多研究表明,多数基因在物种进化过程中,基因中内含子的位置相对保守,但其内含子的长度及序列则变化较大。小麦的 *DEP1* 基因也显示出这一特点。序列比较显示,普通六倍体小麦中的 3 个等位基因在内含子区域存在较大的差异,除了 SNP 的变化,还有大片段的插入和缺失。同样的情况也发生在六倍体小麦的每个基因组与其二倍体祖先的 *DEP1* 基因序列之间。作为真核生物基因的重要组

成部分,内含子的存在可以影响基因的表达水平,因为其剪接过程会影响 mRNA 新陈代谢的多个阶段,包括转录^[15-16]、pre-mRNA 的加工^[17]、mRNA 的出核运输^[18]、翻译^[19]和无义衰变^[20]等。一些研究表明,基因中内含子的存在可以影响基因表达的效率,如水稻蜡质基因的第一内含子,可以影响蜡质基因所编码淀粉合成酶的表达,进而影响直链淀粉的合成^[21]。邻氨基苯甲酸磷酸核糖基化转移酶基因的两个内含子都可以提高报告基因的转录效率,进而提高报告基因的表达^[22]。

结合作物多样性和遗传多样性的研究^[11,23-24]可以推测,六倍体小麦中的 A 基因组由于携带更多的控制重要性状的关键基因,在进化和育种过程中的选择压力较大,从而出现了保守的表达调控模式和基因遗传信息的多样性。而六倍体小麦中的 D 基因组作为最后加入六倍体小麦的基因组,可能在小麦 *DEP1* 基因功能上并不发挥主效基因的作用,因而使其在很大程度上保留了原始供体种的遗传信息,并可能只通过内含子修饰在调控模式上发生了改变。有关普通小麦作为异源六倍体通过这些修饰作用调控同源基因的表达、协调基因功能互作的研究还需更多的实验加以验证。

参考文献

- [1] Song X J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase [J]. *Nat Genet*, 2007, 39 (5): 623-630
- [2] Ashikari M, Sakakibara, Lin S, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production [J]. *Sci*, 2005, 309 (5735): 741-745
- [3] Su Z, Hao C, Wang L, et al. Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 122 (1): 211-223
- [4] Li Q, Li L, Yang X, et al. Relationship, evolutionary fate and function of two maize co-orthologs of rice GW2 associated with kernel size and weight [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 143
- [5] 张磊, 张宝石, 周荣华, 等. 小麦细胞分裂素氧化/脱氢酶基因 (*TaCKX2*) 的克隆及其遗传作图 [J]. *作物学报*, 2007, 33 (9): 1419-1425
- [6] 张磊, 张宝石, 周荣华, 等. 小麦细胞分裂素氧化/脱氢酶基因 (*TaCKX5*) 的克隆及其染色体定位 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41 (3): 636-642
- [7] Huang X, Qian Q, Liu Z, et al. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice [J]. *Nat Genet*, 2009, 41 (4): 494-497
- [8] Sharp P, Chao S, Desai S, et al. The isolation, characterization and application in the Triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homoeologous chromosome arm [J]. *Theor Appl Genet*, 1989, 78 (3): 342-348
- [9] Devos K M, Gale M D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84 (5): 567-572
- [10] Qi L, Echalié B, Friebe B, et al. Molecular characterization of a set of wheat deletion stocks for use in chromosome bin mapping of ESTs [J]. *Funct Integr Genom*, 2003, 3 (1-2): 39-55
- [11] Peng J, Ronim Y, Fahima T, et al. Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (5): 2489-2494
- [12] Börner A, Schumann E, Furst A, et al. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105 (6-7): 921-936
- [13] Jantasuriyarat C. Identification and mapping of genetic loci affecting the free-threshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108 (2): 261-273
- [14] Kato K, Miura H, Sawada S. Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101 (7): 1114-1121
- [15] Sleckman B P, Gorman J R, Alt F W. Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements [J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 459-481
- [16] Chang KC. Critical regulatory domains in intron 2 of a porcine sarcomeric myosin heavy chain gene [J]. *Muscle Res Cell Motil*, 2000, 21 (5): 451-461
- [17] Manley J L. Nuclear coupling: RNA processing reaches back to transcription [J]. *Nat Struct Biol*, 2002, 9 (11): 790-791
- [18] Rafiq M, Suen C K, Choudhury N, et al. Expression of recombinant human ceruloplasmin—an absolute requirement for splicing signals in the expression cassette [J]. *FEBS Lett*, 1997, 407 (2): 132-136
- [19] Braddock M, Muckenthaler M, White M R, et al. Intron-less RNA injected into the nucleus of *Xenopus* oocytes accesses a regulated translation control pathway [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22 (24): 5255-5264
- [20] Lorkovic Z J, Wicczorek Kirk D A, Lambermon M H, et al. Pre-mRNA splicing in higher plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5 (4): 160-167
- [21] 蔡秀玲, 王宗阳. 水稻蜡质基因 5' 非翻译区一个与调控有关的内含子 [J]. *植物生理学报*, 1997, 23 (3): 257-261
- [22] Haridas V, Kim S, Nishimura G, et al. Avicinylation (thioesterification): A protein modification that can regulate the response to oxidative and nitrosative stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (29): 10088
- [23] 刘旭, 郑殿生, 董玉琛, 等. 中国农作物及其野生近缘植物多样性研究进展 [J]. *植物遗传资源学报*, 2008, 9 (4): 411-416
- [24] 刘旭, 黎裕, 曹永生, 等. 中国禾谷类作物种质资源地理分布及其富集中心研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10 (1): 1-8

作者: 张锴, 李爱丽, 张兰, 赵光耀, 孔秀英, 贾继增, 徐吉臣, 毛龙, ZHANG Kai, LI Ai-li, ZHANG Lan, ZHAO Guang-yao, KONG Xiu-ying, JIA Ji-zeng, XU Ji-chen, MAO Long

作者单位: 张锴, ZHANG Kai (北京林业大学生物科学与技术学院/林木育种国家工程实验室/林木、花卉遗传育种教育部重点实验室/国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京100083; 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京100081), 李爱丽, 张兰, 赵光耀, 孔秀英, 贾继增, 毛龙, LI Ai-li, ZHANG Lan, ZHAO Guang-yao, KONG Xiu-ying, JIA Ji-zeng, MAO Long (中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京, 100081), 徐吉臣, XU Ji-chen (北京林业大学生物科学与技术学院/林木育种国家工程实验室/林木、花卉遗传育种教育部重点实验室/国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京, 100083)

刊名: 植物遗传资源学报 ISTIC PKU

英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources

年, 卷(期): 2011, 12(6)

参考文献(24条)

1. Braddock M; Muckenthaler M; White M R Intron-less RNA injected into the nucleus of *Xenopus* oocytes accesses a regulated translation control pathway[外文期刊] 1994(24)
2. Rafiq M; Suen C K; Choudhury N Expression of recombinant human ceruloplasmin—an absolute requirement for splicing signals in the expression cassette[外文期刊] 1997(02)
3. Manley J L Nuclear coupling: RNA processing reaches back to transcription 2002(11)
4. Chang KC Critical regulatory domains in intron 2 of a porcine sarcomeric myosin heavy chain gene[外文期刊] 2000(05)
5. Sleckman B P; Gorman J R; Alt F W Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements[外文期刊] 1996
6. Kato K; Miura H; Sawada S Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat[外文期刊] 2000(07)
7. Jantasuriyarat C Identification and mapping of genetic loci affecting the free-threshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.) [外文期刊] 2004(02)
8. Borner A; Schumann E; Furste A Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) 2002(6-7)
9. Peng J; Ronim Y; Fahima T Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat 2003(05)
10. Qi L; Echalié B; Friebe B Molecular characterization of a set of wheat deletion stocks for use in chromosome bin mapping of ESTs 2003(1-2)
11. Devos K M; Gale M D The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat[外文期刊] 1992(05)
12. Sharp P; Chao S; Desai S The isolation, characterization and application in the Triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homoeologous chromosome arm[外文期刊] 1989(03)
13. Huang X; Qian Q; Liu Z Natural variation at the DEPI locus enhances grain yield in rice[外文期刊] 2009(04)
14. 张磊; 张宝石; 周荣华 小麦细胞分裂素氧化/脱氢酶基因(TaCKX5)的克隆及其染色体定位 2008(03)
15. 张磊; 张宝石; 周荣华 小麦细胞分裂素氧化/脱氢酶基因(TaCKX2)的克隆及其遗传作图[期刊论文]-作物学报 2007(09)
16. 刘旭; 黎裕; 曹永生 中因禾谷类作物种质资源地理分布及其富集中心研究 2009(01)
17. 刘旭; 郑殿生; 董玉琛 中国农作物及其野生近缘植物多样性研究进展[期刊论文]-植物遗传资源学报 2008(04)
18. Haridas V; Kim S; Nishimura G Avicinylation(thioesterification): A protein modification that can regulate the response to oxidative and nitrosative stress[外文期刊] 2005(29)
19. 蔡秀玲; 王宗阳 水稻蜡质基因5'非翻译区一个与调控有关的内含子 1997(03)
20. Lorkovic Z J; Wieczorek K; Kirk D A; Lamberman M H PremRNA splicing in higher plants 2000(04)
21. Li Q; Li L; Yang X Relationship, evolutionary fate and function of two maize co-orthologs of rice GW2 associated with kernel size and weight 2010
22. Su Z; Hao C; Wang L Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [外文期刊] 2011(01)
23. Ashikari M; Sakakibara; Lin S Cytokinin oxidase regulates rice grain production[外文期刊] 2005(5735)
24. Song X J; Huang W; Shi M A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase[外文期刊] 2007(05)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201106019.aspx