

小麦 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *TaSDIR1-D* 克隆与功能分析

王瑞同¹, 王景一², 毛新国², 吕小平², 刘惠民¹, 景蕊莲²

(¹山西大学生物工程学院, 太原 030000; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 具有 RING 结构域的 E3 泛素连接酶 SDIR1 (Salt-and drought induced really interesting new gene finger1) 在植物信号调节通路中发挥着重要的作用。本研究克隆得到小麦 *TaSDIR1-D* 基因, 基因组序列全长 4070 bp, 其中编码区上游为 1443 bp, 编码区为 2352 bp, 3' 端非编码区 (UTR) 为 275 bp; 该基因编码区 cDNA 序列长度为 849 bp, 预测其编码 282 个氨基酸, 包括 2 个跨膜结构域和 1 个保守的 RING 型 finger 结构域。以野生近缘种的二倍体、四倍体和六倍体普通小麦及一套由中国春为背景的缺-四体为材料, 将基因定位在染色体 4D 上; 小麦抽穗期 *TaSDIR1-D* 在旗叶中的表达量最高; 在 NaCl、ABA、PEG 及 4 °C 非生物胁迫诱导下, 小麦 *TaSDIR1-D* 均上调表达, 可能参与植物抗逆调节通路; 通过检测 32 份多态性较高的小麦材料 *TaSDIR1-D* 基因序列多态性, 共检测到 2 个 SNP, 基因的编码区和上游序列中各存在 1 个核苷酸变异, 其中编码区的核苷酸变异位点 (G/A) 位于第 4 外显子上, 为非同义突变, 使精氨酸 (Arg) 变为组氨酸 (His)。2 个 SNP 组成两种单倍型, 根据 -583 bp 处的 SNP (T/C) 设计分子标记 SNP-583, 扫描自然群体 262 份材料的基因型, 将其分为 2 种单倍型, 分别与千粒重、倒二节长和穗长显著相关或极显著相关, 单倍型 Hap-4D-2 为提高千粒重的优异单倍型。研究结果为小麦分子育种提供了理论依据和基因资源。

关键词: *TaSDIR1-D*; RING 型 E3 泛素连接酶; 抗逆性; 分子标记; 关联分析

Cloning and Functional Analysis of a RING-type E3 Ubiquitin Ligase Gene *TaSDIR1-D* in Wheat

WANG Rui-tong¹, WANG Jing-yi², MAO Xin-guo², CHANG Xiao-ping², LIU Hui-min¹, JING Rui-lian²

(¹ College of Bioengineering, University of Shanxi, Taiyuan 030000;

² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: A RING-type E3 ubiquitin ligase SDIR1 (Salt-and drought induced really interesting new gene finger1), which plays a pivotal role in plants signaling pathway. *TaSDIR1-D* was isolated from genome D of wheat (*Triticum aestivum* L.). The full length of *TaSDIR1-D* was 4070 bp, including a 1443 bp upstream fragment of the coding region, 2352 bp coding region, 275 bp 3' UTR. The gene cDNA sequence length of the coding region was 849 bp, which encoded 282 amino acids, including two transmembrane domains and a relatively conserved RING finger domain. *TaSDIR1-D* was located on the chromosome 4D by using wheat wild relatives and a set of nullisomic-tetrasomic lines of Chinese Spring. *TaSDIR1-D* showed the highest expression level in flag leaves during heading stage. *TaSDIR1-D* was up-regulated by NaCl, ABA, PEG and 4 °C treatments, which suggested that *TaSDIR1-D* may be involved in plant abiotic stress signaling pathway. By detecting the polymorphism of *TaSDIR1-D* gene sequence in 32 hexaploid wheat accessions, two SNPs were detected in the full-length sequence. One was identified in the promoter region, another in the fourth exon (G/A), which led to amino acid Arg change into His. In a natural population consisted of 262 accessions, two haplotypes of *TaSDIR1-D* were detected by SNP-583, a SNP marker developed from the SNP (T/C) at -583 bp, which were significantly or very significantly correlated with 1000-grain weight, length of penultimate node and spike length. Hap-4D-2 is considered as a potential superior haplotype for increasing

收稿日期: 2018-03-09 修回日期: 2018-04-04 网络出版日期: 2018-06-08

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180608.1153.001.html>

基金项目: 国家自然科学基金 (31271720); 中国农业科学院科技创新工程协同创新任务 (CAAS-XTX2016019)

第一作者研究方向为小麦基因资源挖掘与功能验证。E-mail: wangruitong2016@163.com

通信作者: 景蕊莲, 研究方向为作物抗逆生物学。E-mail: jingruilian@caas.cn

1000-grain weight. The results provide a theoretical basis and genetic resources for wheat molecular breeding.

Key words: *TaSDIR1*; RING E3 ubiquitin ligase; abiotic stress tolerance; functional marker; association analysis

小麦是我国的三大主要粮食作物之一,在保障粮食安全中占有至关重要的作用,小麦的生长发育、代谢过程及最终的产量与周围的环境有着密不可分的关系^[1],在生长过程中会不可避免地遭受各种逆境胁迫,包括生物胁迫和非生物胁迫,其中后者包括干旱、高温、盐碱和低温等^[2-3]。非生物胁迫是导致全球粮食减产的主要因素之一,它将导致植物在形态建成及生理生化发育等一系列过程中发生变化,同时植物通过不同的生理代谢和信号传导等调控机制来适应非生物胁迫^[4]。研究表明,26S 泛素蛋白酶体途径是植物体内最精细的调控体系之一,对植物的生长发育起着极为重要的作用^[5]。

大量研究表明,植物通过泛素蛋白酶体途径降解靶蛋白,从而维持自身正常的生长发育及代谢调控途径^[6]。泛素蛋白酶体途径包括泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3 及泛素化底物等参与的一系列反应^[5],其中 E3 泛素连接酶决定目标靶蛋白的特异性识别,在此过程中发挥至关重要的作用。E3 泛素连接酶主要分为 3 大类:HECT 结构域家族、RING 结构域家族及 U-box 蛋白家族^[7]。RING 结构域家族最显著的特点是具有环指结构域 Cys-X₂-Cys-X₍₉₋₃₉₎-Cys-X₍₁₋₃₎-HisX₍₂₋₃₎-Cys-X₂-Cys-X₍₄₋₄₈₎-Cys-X₂-Cys(Cys 表示半胱氨酸,His 表示组氨酸,X 表示任意氨基酸)^[8]。

有研究表明,RING 型 E3 连接酶参与逆境胁迫应答及籽粒发育调控^[9-12]。SDIR1 (Salt-and drought induced really interesting new gene finger1) 是一个具有 RING 型结构域的 E3 泛素连接酶,植物中首次从拟南芥中分离得到 *AtSDIR*,该基因通过 ABA 途径上调表达响应外界的干旱和盐胁迫逆境^[13-14]。本研究克隆了小麦 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *TaSDIR1-D*,分析其在小麦不同生长发育时期不同组织部位的表达量,以及在非生物胁迫条件下的表达模式,根据基因核苷酸序列多态性开发分子标记,分析 *TaSDIR1-D* 多态性与农艺性状的关系,寻找优异单倍型,为小麦株型及产量改良提供理论依据和技术,为抗逆育种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料及生长条件

以普通六倍体小麦品种旱选 10 号为材料,进行基因克隆及不同胁迫条件下的表达模式分析。利用

9 份二倍体野生近缘种材料,包括 3 份乌拉尔图小麦(AA, *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan): UR208、UR209 和 UR204;3 份拟斯卑尔脱山羊草(BB, *Aegilops speltoides* Tausch): Y2017、Y2041 和 Y2033;3 份粗山羊草(DD, *Aegilops tauschii* Coss.): Ae38、Ae46 和 Y57;3 份四倍体野生近缘种野生二粒小麦(AABB, *Triticum dicoccoides* (Körn.) Körn. ex Schweinf.),分别是 DS1、DS5 和 DS6,以及一套以中国春为背景的缺-四体材料进行基因的染色体定位。用一套由 32 份多态性较高的六倍体小麦组成的自然群体进行基因序列多态性检测,包括 7 份农家种和 25 份现代育成种。用由 262 份普通六倍体小麦材料构成的自然群体进行基因单倍型与农艺性状的关联分析,该群体材料主要来自我国的北部冬麦区和黄淮冬麦区。

自然群体在 2010-2012 年 3 个生长季分别种植在中国农业科学院作物科学研究所的顺义和昌平试验基地,其中 2011 年只在顺义基地播种。田间的水分管理分为干旱胁迫(雨养)和灌溉两种条件,干旱胁迫为全生育期依靠雨养,灌溉分别在越冬前、孕穗期及开花期灌溉(750 m³/hm²),3 个生长季的降水量分别为 131 mm、180 mm 和 158 mm。每份材料种植在行长 2 m、行距 0.3 m 的 4 行小区,每行均匀点播种子 40 粒。收获后,每份材料随机取 5 株,考察株高、穗长、穗下节长、倒二节长和千粒重等农艺性状。

1.2 目的基因克隆

参照拟南芥同源基因 *AtSDIR1* (At3g55530) 的氨基酸序列^[13],在 URGI 数据库中进行比对分析,在小麦 D 基因组中获得一个与其同源性较高的基因序列,命名为 *TaSDIR1-4D*。利用 Integrated DNA Technologies (<http://sg.idtdna.com/pages>) 设计特异性扩增引物 SDIR1-D-F 和 SDIR1-D-R,以及扩增基因编码区 cDNA 的引物 SDIR1-D-c-F 和 SDIR1-D-c-R(表 1)。

以小麦品种旱选 10 号 DNA 为模板,利用高保真酶 TransStart Fast *Pfu* DNA polymerase (TRANS-GEN,北京)进行 PCR 扩增。扩增体系为 15 μL,分别包括 5 U/μL 的 TransStart Fast *Pfu* 0.3 μL,5 × *Pfu* buffer 3 μL,2.5 mmol/L 的 dNTP 1.2 μL,50 ng/μL 的模板 DNA 1 μL,稀释成 10 μmol/L 的正、反向引物各 0.5 μL,剩余用 ddH₂O 补足。PCR 反应程序为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 2 min,35 个循环;72 °C 10 min。将 PCR 扩增产物在 1.2%

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the research

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	引物用途 Purpose of primer
SDIR1-D-F	GATCGGGTCGTGACATCGATTGTGTC	基因组特异引物
SDIR1-D-R	GACTAGACAGCGTGTGTTGTTGCGG	
SDIR1-DF2	CTTTCCGCCGCTTGTTCGATTAC	测序引物
SDIR1-DF3	TGAATCCGGCAAGGAGGTAATGAATAAATG	
SDIR1-DF4	GAGCAAATCTCAAACACATCGAGTAGAG	
SDIR1-DR2	GAACCCATCTTACACCTGCTGGAAG	
SDIR1-DR3	CTTTAGTCAGCCGTGCTAGTACCATAAC	cDNA 引物
SDIR1-D-c-F	GTGGACACCATGAGCTTTGTGTTCC	
SDIR1-D-c-R	CACCATGGCATCCATTTCACCACC	
SDIR1-D-qF	CCAACCATAGCCCTTGCTTCGAGG	荧光定量引物
SDIR1-D-qR	GTCATAGAAGGAGCATGTGGCTATTGTCTG	
D- <i>Nde</i> I-F	TGTTTATAAGTATGTATTGATATTATTATGTGCTGTG	SNP-583 标记酶切引物
D- <i>Nde</i> I-R	GCAGCATTTAATCTTACCCATCACATAT	

琼脂糖凝胶上电泳分离,切取目的片段,用琼脂糖凝胶 DNA 试剂盒进行回收纯化。将回收的 PCR 产物与 *pEASY-Blunt* (TRANSGEN, 北京) 克隆载体连接,把连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞,挑取至少 12 个阳性克隆,提取质粒测序。采用同样的方法对 32 份多态性小麦材料进行测序。

以小麦幼苗的第一链 cDNA 为模板,用高保真酶 TransStart Fast *Pfu* DNA polymerase (TRANSGEN, 北京) 进行 RT-PCR 扩增,分离目标基因的编码区 cDNA 序列,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 产物,切胶回收并进行测序,进一步确定 *TaSDIR1-D* 基因的编码区 cDNA 序列。用 DNAMAN 软件将测序得到的编码区 cDNA 序列与基因组序列进行比对,分析基因结构及编码的氨基酸序列;在 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 进行蛋白结构预测和功能分析。

1.3 目的基因 DNA 序列多态性分析

利用 DNASTAR Lasergene7.1 中 Seqman 软件对测序所得序列进行拼接组装,分析 32 份不同材料中 DNA 序列的多态性位点。

1.4 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR

使用 TRIzol 法提取小麦 RNA,用反转录试剂盒 (TIANGEN, 北京) 根据其操作步骤用反转录酶将 1 μ g 的小麦 RNA 反转录形成 cDNA。采用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 提供的方法和 ABI7500 荧光定量 PCR 仪运行实时定量 PCR 反应,检测基因表达水平。

1.5 分子标记开发

根据序列比对分析结果,在 *TaSDIR1-D* 基因编码区上游的多态性变异位点, -583 bp (T/C) 处设计

dCAPS 分子标记,并命名为 SNP-583。在该核苷酸差异位点附近引入 1 个错配碱基,形成可以用限制性内切酶 *Nde* I 识别的酶切位点。在该多态性位点附近设计 1 对扩增引物 D-*Nde* I-F 和 D-*Nde* I-R (表 1)。以基因组 DNA 为模板,利用 *TaSDIR1-D* 的基因组特异性引物 SDIR1-D-F 和 SDIR1-D-R 进行第 1 轮 PCR,将 PCR 产物用 ddH₂O 稀释 100 倍后作为第 2 轮 PCR 的模板。第 2 轮 PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。吸取 3 μ L 的第 2 轮 PCR 产物用限制性内切酶 *Nde* I 在 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h,将酶切产物用 4% 的琼脂糖凝胶电泳分离,根据酶切后的片段大小分析不同小麦材料的基因型。

1.6 关联分析

利用 dCAPS 分子标记 SNP-583 检测自然群体材料的基因型。根据扫描结果,将 262 份自然材料分为 2 种单倍型。运用 TASSEL2.1 软件中的 GLM (general liner model) 程序,把群体结构 (Q) 作为协变量,将 *TaSDIR1-D* 的基因型和表型性状进行关联分析。并用 SPSS 19.0 软件进行方差分析,检测不同单倍型性状的差异显著性。

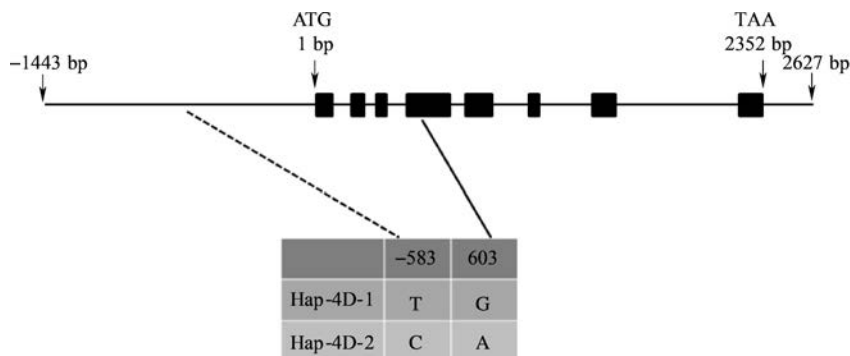
2 结果与分析

2.1 *TaSDIR1-D* 克隆及序列分析

以早选 10 号为材料,克隆的 *TaSDIR1-D* 基因序列全长为 4070 bp。该序列包括基因的编码区上游为 1443 bp,编码区为 2352 bp,3' 端非编码区 (UTR) 为 275 bp。该基因编码区包括 8 个外显子和 7 个内含子 (图 1),其中编码区 cDNA 序列全长 849 bp,编码 282 个氨基酸,包含 2 个跨膜结构域和 1 个相对

保守的 RING 型 finger 结构域(图 2)。对 32 份高多态性小麦材料目标基因进行测序,在基因的全长序列中共检测到 2 个 SNP,其中一个位于编码区上游序列,另一个位于编码区,根据两个多态性位点,在小麦

中检测到 2 种单倍型,即 Hap-4D-1 和 Hap-4D-2 (图 1)。编码区的 SNP 位点位于第 4 外显子上,为非同义突变,造成氨基酸的改变,使精氨酸(Arg) 改变为组氨酸(His)。



ATG 和 TAA 分别表示起始和终止密码子;Hap-4D-1 和 Hap-4D-2 表示 2 种单倍型
ATG and TAA are the initiation and termination codon respectively, Hap-4D-1 and Hap-4D-2 are two haplotypes

图 1 *TaSDIR1-D* 基因序列多态性

Fig. 1 Sequence polymorphism of *TaSDIR1-D* gene

1	ATGAGCTTTGTGTCGGGGCAGCGGGCCACATCGAGGCGGTGCTTCCAGGGTTCGCCACGAGCCCGTGCATGCGGATTCAT
1	M S F V F R G S R A D I E A G G F P G F A T E R R A M R I H
91	GCCGGGGGGCGCGGTGAACAGCAATTCCTTAGCTTTCTTGTAAGTGTCTGTTCTGTTTCATGGTACTGAGCTCGCACCAGATGCT
31	A G G R P V N S N S L A F L V T V L V L F M V L S S H Q M S
TM1	
181	CCGAACCTTTTGTGATGGTCTTAGGTGTCTCTATGGCCACGAGCTTAGGATGACGCTACATGCCAGCTCCAAAGCGAG
61	P N F L L W M V L G V F L L A T S L R M Y A T C Q Q L Q A Q
TM2	
271	TCTCAAGCTCATGCTGCAGACGGCAACGGCTTCTTGGAGCGACAGAGTTGCGGGTGCATGCCGCCAACATAGCCCTTCTCGAGG
91	S Q A H A A D G N G F L G R T E L R V H V P P T I A L A S R
361	GGCGGTGCAAGCCTTAGACTCCAACTGCTCTGCTTGACCGCGAGTTTGATGATTAGATTATGATGCTCTCAGAGCGCTAGATACC
121	G R L Q S L R L Q L A L L D R E F D D L D Y D A L R A L D T
451	GACAATAGCCACATGCTCTCTATGACTGAAGAAGAAATAAATCTGCTGTTTTCAGATACAACTTCAGGCGCAGCAGAGGAGC
151	D N S P H A P S M T E E E I N T L P V F R Y K L Q A Q Q R S
541	ACCCCTATCGAAATAGTAGTGACGGGCCATCTGAACCAITGGTTTCTCTCTGAATCCGGCAAGGAGAAAAAGCAAGCAGCATGCA
181	T P Y R N S S D G P S E P L V S S P E S G K E K K Q D A D A
631	ACAAGCAAAATGACAGAGGATGAGTGAAGTGTGCTTAGAGCAAGTTGGCGGGTGAATGAGAGCCTGCCATGCTTG
211	T S K M T E D E L T C S V C L E Q V V A G D L L R S L P C L
721	CATCGGTTTCATGTAAGTCAITGATGTTGCGCAACAGGAACATGCCGATCTGCAAGCACCAGGTCAGCGAGTGTGGCGT
241	H R F H V N C I D P W L R Q Q G T C P I C K H Q V S D V W R
RING finger Domain	
811	GGCGCGGACGGTGGTGAATGGATGCCATGGTGTA
271	G A G S G G E M D A M V *

TM1 和 TM2: 预测的 2 个跨膜结构域;方框内 CGC(R) 变为 CAC(H) 表示此处精氨酸变成组氨酸;

RING finger domain: 高度保守的 RING finger 结构域,黑点表示保守的 Cys 和 His 残基

TM1 and TM2: the two putative transmembrane domains, CGC(R)→CAC(H): Arginine mutation to Histidine,

RING finger domain is the highly conserved RING finger domain, and black dots indicate conserved Cys and His residues

图 2 *TaSDIR1-D* 基因的 ORF 序列及其编码的氨基酸序列

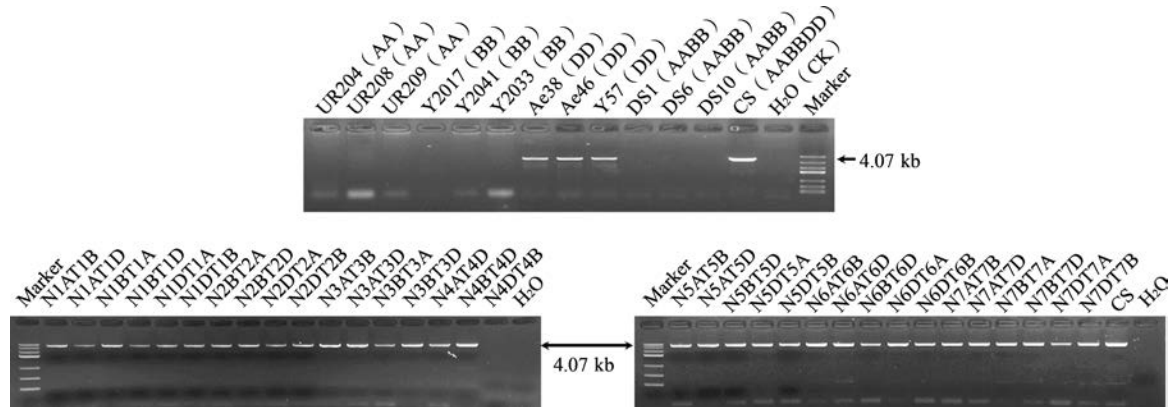
Fig. 2 Open reading frame sequence and putative amino acids of *TaSDIR1-D*

2.2 染色体定位

利用 *TaSDIR1-D* 基因组的特异引物 SDIR1-D-F 和 SDIR1-D-R, 分别对 9 份二倍体材料、3 份四倍体材料、1 份普通六倍体小麦材料以及一套由中国春为背景的缺-四体材料进行 PCR 扩增检测, 将 *TaSDIR1-D* 定位在染色体 4D 上(图 3)。

2.3 *TaSDIR1-D* 组织特异性表达

对小麦品种早选 10 号抽穗期的不同组织器官取样, 包括根、叶、叶鞘、茎节、节间和穗, 表达模式分析结果显示, 该基因在抽穗期的各个组织器官中均有表达, 但在旗叶中的表达量显著高于其他部位(图 4)。



AA:乌拉尔图小麦;BB:拟斯卑尔托山羊草;DD:粗山羊草;AABB:四倍体小麦;AABBDD:六倍体小麦
AA:*Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan, BB:*Aegilops speltoides* Tausch, DD:*Aegilops tauschii* Coss.,
AABB:*Triticum dicoccoides*(Körn.) Körn. ex Schweinf., AABBDD:Hexaploid wheat, Marker:Marker III

图3 *TaSDIR1-D* 基因的染色体定位

Fig. 3 Chromosome location of *TaSDIR1-D* gene

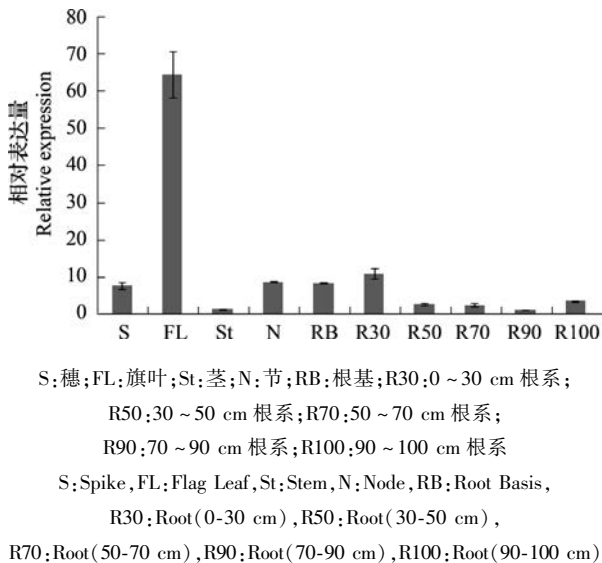


图4 小麦抽穗期 *TaSDIR1-D* 在组织器官中的表达模式

Fig. 4 Expression pattern of *TaSDIR1-D* in wheat tissues and organs at heading stage

2.4 非生物胁迫下 *TaSDIR1-D* 表达模式

为了研究 *TaSDIR1-D* 对不同非生物胁迫的应答情况,以 *GAPDH* 基因作为内参,通过 NaCl、ABA、PEG 和 4 °C 4 种非生物胁迫处理小麦幼苗,分析 *TaSDIR1-D* 在不同胁迫处理下的表达模式。在 NaCl 处理条件下, *TaSDIR1-D* 在 24 h 和 48 h 的表达量明显高于其他时间点,约是对照的 8 倍左右(图 5A)。在外源 ABA 的处理条件下, *TaSDIR1-D* 的表达量在 0.5 h 达到最高水平,随后表达量逐渐下降,到 6 h 形成第 2 个上调表达小高峰,随后表达量再次逐渐回落(图 5B)。在 PEG 处理条件下, *TaSDIR1-D* 在处理后的 12 h 表达量最高,随后下降(图 5C)。在 4 °C 胁迫处理 0.5 h 时形成第 1 个上调表达小高峰,随后

表达量有所下降,在 24 h 表达量再次上升,到 48 h 达到最高水平,随后再次下降(图 5D)。以上结果中,尽管 *TaSDIR1-D* 在 4 种非生物胁迫条件下表达模式不同,但表达量都有上调,表明其参与了小麦对逆境胁迫的应答,可能与提高抗逆性相关。

2.5 *TaSDIR1-D* 功能标记开发

在 *TaSDIR1-D* 基因的全长序列中共检测到 2 个核苷酸多态性变异位点,由于编码区的 SNP(G/A)与编码区上游的 SNP(T/C)完全连锁,所以选择在编码区上游序列的-583 bp 处设计 dCAPS 标记,命名为 SNP-583,引物为 D-*Nde* I-F 和 D-*Nde* I-R,扩增产物为 215 bp。选择 *Nde* I(CA[▼]TATG)酶切扩增产物,在该位点为 C 的材料中,扩增产物可被 *Nde* I 酶切成 189 bp 和 26 bp 两条带,而在差异位点为 T 的材料中,扩增产物不含有 *Nde* I 酶切位点,不能被酶切,检测结果为单一条带(图 6)。

2.6 单倍型与农艺性状的关系

利用分子标记 SNP-583 扫描小麦自然群体的 262 份材料,根据扫描结果,供试材料分为 2 种单倍型,即 Hap-4D-1 和 Hap-4D-2(图 1),所占比率分别为 90% 和 10%。关联分析结果表明,在 3 年 5 点 10 种环境条件下,该标记与千粒重、倒二节长显著或极显著相关;除 2012 年昌平旱地外,在其他 9 种环境条件下,该标记与穗长也呈显著或极显著相关(表 2)。

对不同单倍型材料性状的方差分析结果表明,在 10 种环境条件下,具有单倍型 Hap-4D-2 的材料千粒重均显著高于 Hap-4D-1 的材料(图 7A)。单倍型 Hap-4D-2 材料的倒二节长要比 Hap-4D-1 的短,同样在 10 种环境条件下的差异达到了显著水平(图 7B)。单倍型 Hap-4D-2 材料的穗长要比 Hap-

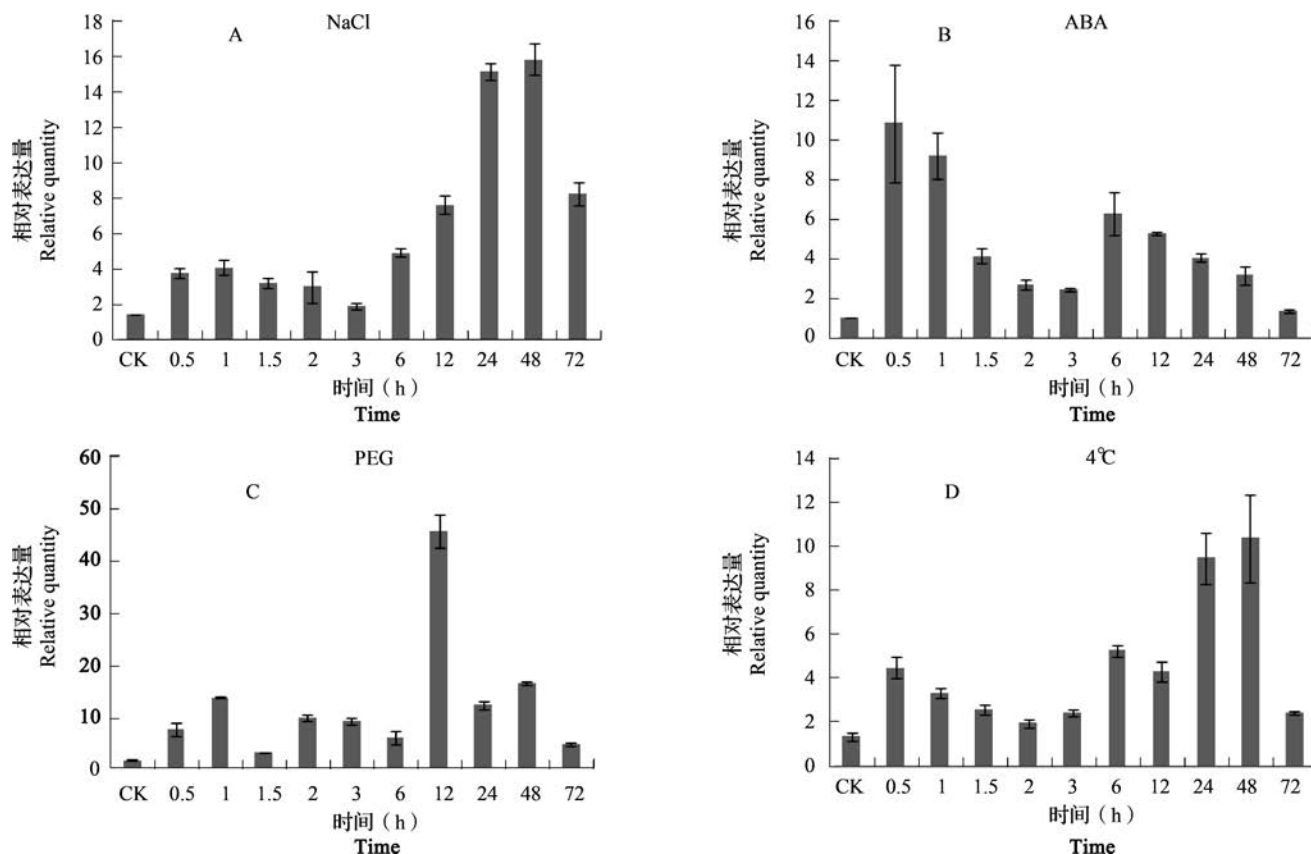
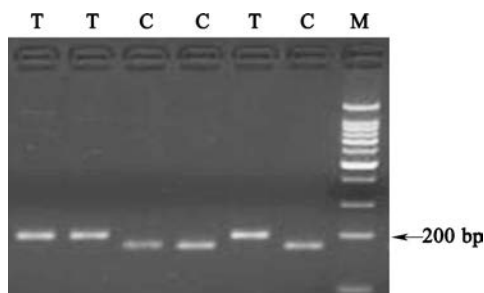


图5 小麦幼苗 *TaSDIR1-D* 在非生物胁迫条件下的表达谱

Fig. 5 Expression patterns of *TaSDIR1-D* under abiotic stress conditions in wheat seedling



PCR 产物用 *Nde* I 酶切后的电泳结果; -583 bp 处碱基为 T 的 PCR 产物不能被酶切, 该处碱基为 C 的 PCR 产物可以被酶切

The PCR product was digested with *Nde* I,
The PCR product with base T at -583 bp cannot be digested,
but with base C can be digested, M was 100 bp DNA Ladder

图6 *TaSDIR1-DdCAPS* 标记 SNP-583 的扩增产物酶切图谱

Fig. 6 Digestion map of amplified product of dCAPS marker SNP-583 of *TaSDIR1-D* gene

4D-1 的长, 在除了 2011-SY-DS、2012-CP-DS 和 2012-SY-DS 之外的 7 种环境条件下, 两种单倍型的穗长差异都达到了显著水平(图 7C)。因此, 对于小麦的农艺性状千粒重、倒二节长和穗长, Hap-4D-2 是优异单倍型。

3 讨论

泛素化在植物生长发育和信号传导过程中发挥着重要的作用。研究发现, E3 泛素连接酶 SDIR1 在拟南芥^[14]、水稻^[15]、玉米^[16]、葡萄^[17]和烟草^[18]等单子叶和双子叶植物中都存在并且都可以通过响应非生物胁迫来提高植物的抗逆性。在拟南芥中, *SDIR1* 过表达植株与野生型相比, 在种子的萌发期和后期生长过程中表现出对 ABA 及盐的超敏感性, 并且在干旱条件下, *SDIR1* 过表达植株比野生型的气孔开张程度要小, 使其蒸腾作用降低并提高耐旱性^[19]。水稻中 *SDIR1* 过表达植株与野生型植株经过干旱处理后, 过表达植株的存活率明显高于野生型^[15]。本研究结果也表明, 小麦 *TaSDIR1-D* 响应逆境胁迫上调表达, 说明 E3 泛素连接酶 SDIR1 在植物的抗逆生理过程中行使了重要的功能, 对于改良作物抗旱性具有重要意义。

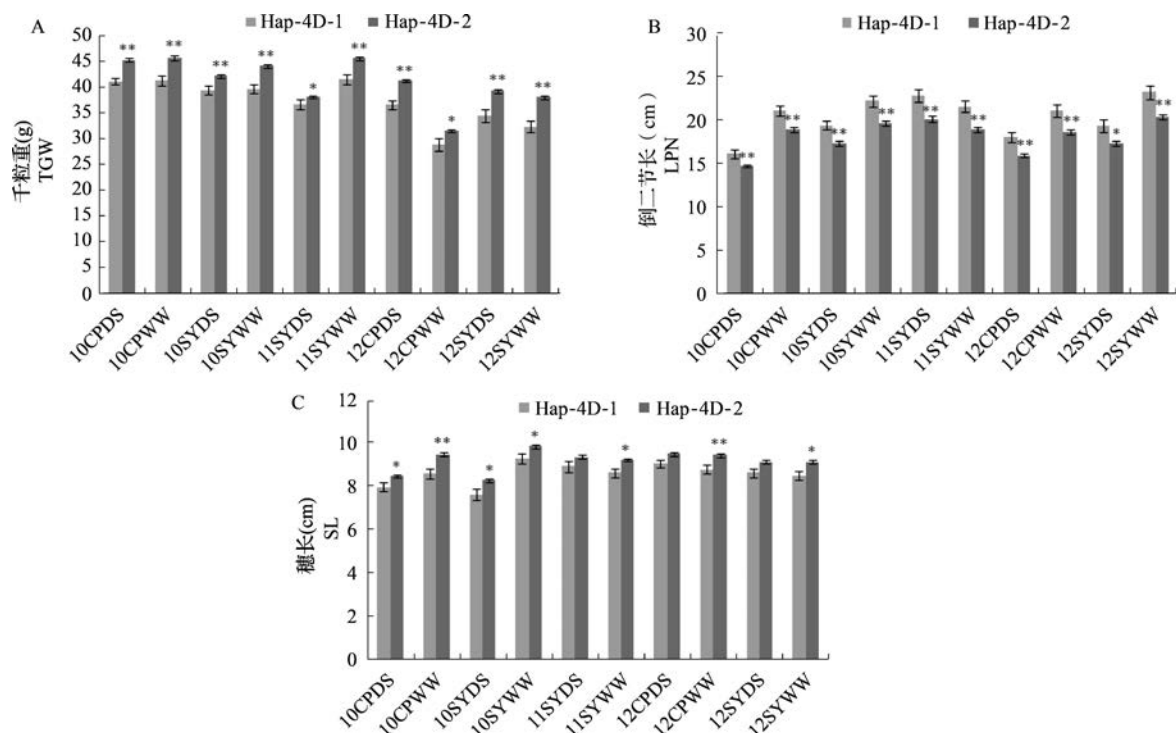
小麦 *TaSDIR1-D* 基因由 7 个内含子和 8 个外显子组成, 编码 282 个氨基酸。通过软件预测分析发现, *TaSDIR1-D* 蛋白在 N 端含有 2 个跨膜结构域, 在 C 端含有 1 个保守的 RING finger 结构域。在拟南芥、

表 2 *TaSDIR1-4D* 在 10 种植环境条件下与农艺性状的关联分析

Table 2 *TaSDIR1-4D* haplotypes associated with agronomic traits in 10 environments

年份 Year	地点 Site	条件 Water condition	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value		
			千粒重 TGW	倒二节长 LPN	穗长 SL
2010	昌平 CP	干旱 DS	0.0014 ***	0.0175 *	0.0051 **
	昌平 CP	灌溉 WW	3.21E-04 ***	0.0105 *	3.18E-04 ***
	顺义 SY	干旱 DS	0.0138 *	0.0292 *	0.0058 **
	顺义 SY	灌溉 WW	4.34E-05 ***	0.0155 *	0.0186 *
2011	顺义 SY	干旱 DS	0.0344 *	0.0402 *	0.0319 *
	顺义 SY	灌溉 WW	2.62E-04 ***	0.0348 *	0.0091 **
2012	昌平 CP	干旱 DS	1.65E-05 ***	0.0098 **	n. s.
	昌平 CP	灌溉 WW	0.0130 *	0.0137 *	0.0080 **
	顺义 SY	干旱 DS	3.86E-05 ***	0.0357 *	0.0371 *
	顺义 SY	灌溉 WW	9.38E-06 ***	0.0106 *	0.0113 *

TGW:1000-grain weight, LPN: length of penultimate node, SL: spike length, n. s.: not significant, CP: Changping, SY: Shunyi, WW: well-watered, DS: drought-stressed, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, the same as below



10CPDS;2010 年昌平旱地;10CPWW;2010 年昌平水地;10SYDS;2010 年顺义旱地;10SYWW;2010 年顺义水地;11SYDS;2011 年顺义旱地;11SYWW;2011 年顺义水地;12CPDS;2012 年昌平旱地;12CPWW;2012 年昌平水地;12SYDS;2012 年顺义旱地;12SYWW;2012 年顺义水地
10CPDS;drought-stressed condition of Changping in 2010,10CPWW:well-watered condition of Changping in 2010,
10SYDS;drought-stressed condition of Shunyi in 2010,10SYWW:well-watered condition of Shunyi in 2010,
11SYDS;drought-stressed condition of Shunyi in 2011,11SYWW:well-watered condition of Shunyi in 2011,
12CPDS;drought-stressed condition of Changping in 2012,12CPWW:well-watered condition of Changping in 2012,
12SYDS;drought-stressed condition of Shunyi in 2012,12SYWW:well-watered condition of Shunyi in 2012

图 7 *TaSDIR1-D* 两种单倍型的农艺性状比较

Fig. 7 Comparison of the agronomic traits with two haplotypes of *TaSDIR1-D*

水稻和玉米等其他植物中的研究表明,SDIR1 都含有一个保守的 RING fing 结构域,且具有 E3 泛素连接酶的功能,当拟南芥中 SDIR1 的 RING fing 结构域被破坏后,泛素反应结果显示其 E3 泛素连接酶

的活性完全消失^[13]。因此,我们推测在小麦的 SDIR1 中,完整的 RING fing 结构是其 E3 泛素连接酶保持活性的必要条件。

通过检测 *TaSDIR1-D* 基因序列的多态性,发现

位于第4外显子的603 bp处的核苷酸变异引起了氨基酸的改变,使精氨酸(Arg)改变为组氨酸(His),且*TaSDIR1-D*的两种单倍型在此处存在氨基酸的差异。通过对DNA骨架结合功能,RING型E3泛素连接酶折叠结构^[8]的研究,同时结合精氨酸和组氨酸的性质特征方面的差异,我们推测*TaSDIR1-D*两种单倍型之间此处氨基酸的差异造成了RING型E3泛素连接酶折叠结构的不同,进而使两种单倍型的功能有所差异。

对小麦抽穗期不同组织部位的表达模式分析结果表明,*TaSDIR1-D*在小麦的各个组织中均有分布,而在抽穗期旗叶中的表达量明显高于其他组织。此现象暗示着在此时期该基因可能在旗叶中发挥非常重要的作用,旗叶通过光合作用参与穗部的形态建成和籽粒发育过程。有研究发现,小麦穗发育相关基因*TaSPL20-D*的单倍型与小麦的千粒重及株高相关联^[20],而在抽穗期*TaSDIR1-D*基因的表达量在旗叶中升高,可能为小麦的穗部生长发育提供了优良条件,从而影响小麦产量。

千粒重是小麦产量的重要因素,受到育种家们的高度关注^[21-23]。小麦植株倒二节的缩短可能降低株高,提高抗倒伏能力,最终影响产量。根据对*TaSDIR1-D*基因序列的多态性分析,小麦自然群体的262份材料拥有两种单倍型,关联分析结果显示*TaSDIR1-D*的单倍型与千粒重、倒二节长和穗长等表型性状相关。不过,由于基因在染色体上的连锁关系,与*TaSDIR1*相邻的基因或者周围基因组区段上的基因也都有可能与千粒重、倒二节长和穗长显著相关,实际情况尚有待研究。Zhang等^[20]研究结果表明,小麦在长期的进化过程中,呈现株高降低,单株穗数减少和千粒重逐渐增加的趋势,本研究结果中,拥有单倍型Hap-4D-2的材料千粒重较大、倒二节较短和穗子较长,两个研究结果的趋势相同,说明*TaSDIR1-D*优异单倍型Hap-4D-2的分子标记SNP-583可以用于对目标性状的选择,提高小麦育种选择效率。

参考文献

- Boyer J S. Plant productivity and environment. *Science*, 1982, 218:443-448
- Xiong L M, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, 2002, 14: S165-S183
- Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53: 247-273
- Knight H, Knight M R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, 2001, 6: 262-267
- Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 555-590
- Yu F F, Xie Q. Non-26S proteasome endomembrane trafficking pathways in ABA signaling. *Trends in Plant Science*, 2017, 22: 976-985
- Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama K I. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 33111-33120
- Deshaies R J, Joazeiro C A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review Biochemistry*, 2009, 78: 399-434
- Lim C W, Lee S C. Pepper protein phosphatase type 2C, CaADIP1 and its interacting partner CaRLP1 antagonistically regulate ABA signalling and drought response. *Plant Cell and Environment*, 2016, 39: 1559-1575
- Oh T R, Kim J H, Cho S K, Ryu M Y, Yang S W, Kim W T. AtAIRP2 E3 ligase affects ABA and high-salinity responses by stimulating its ATP1/SDIRIP1 substrate turnover. *Plant Physiology*, 2017, 174: 2515-2531
- Qin L, Zhao J J, Li T, Hou J, Zhang X Y, Hao C Y. *TaGW2*, a Good Reflection of Wheat Polyploidization and Evolution. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 318
- Zhang N, Yin Y J, Liu X Y, Tong S M, Xing J W, Zhang Y, Pudake R N, Izquierdo E M, Peng H R, Xin M M, Hu Z R, Ni Z F, Sun Q X, Yao Y Y. The E3 ligase TaSAP5 alters drought stress responses by promoting the degradation of DRIP proteins. *Plant Physiology*, 2017, 175: 1878-1892
- Zhang H W, Cui F, Wu Y R, Lou L J, Liu L J, Tian M M, Ning Y S, Shu K, Tang S Y, Xie Q. The RING finger ubiquitin E3 ligase SDIR1 targets SDIR1-INTERACTING PROTEIN1 for degradation to modulate the salt stress response and ABA signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2015, 27: 214-227
- Zhang Y Y, Li Y, Gao T, Zhu H, Wang D J, Zhang H W, Ning Y S, Liu L J, Wu Y R, Chu C C, Guo H S, Xie Q. *Arabidopsis* SDIR1 enhances drought tolerance in crop plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2008, 72: 2251-2254
- Gao T, Wu Y R, Zhang Y Y, Liu L J, Ning Y, Wang D J, Tong H N, Chen S Y, Chu C C, Xie Q. *OsSDIR1* overexpression greatly improves drought tolerance in transgenic rice. *Plant Molecular Biology*, 2011, 76: 145-156
- Xia Z L, Liu Q J, Wu J Y, Ding J Q. ZmRFP1, The putative ortholog of SDIR1, encodes a RING-H2 E3 ubiquitin ligase and responds to drought stress in an ABA-dependent manner in maize. *Gene*, 2012, 495: 146-153
- Tak H, Mhatre M. Molecular characterization of *VvSDIR1* from *Vitis vinifera* and its functional analysis by heterologous expression in *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma*, 2013, 250: 565-576
- Xia Z L, Su X H, Liu J J, Wang M P. The RING-H2 finger gene 1 (*RHFI*) encodes an E3 ubiquitin ligase and participates in drought stress response in *Nicotiana tabacum*. *Genetica*, 2013, 141: 11-21
- Zhang Y Y, Yang C W, Li Y, Zheng N Y, Chen H, Zhao Q Z, Gao T, Guo H S, Xie Q. SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2007, 19: 1912-1929
- Zhang B, Xu W N, Liu X, Mao X G, Li A, Wang J Y, Chang X P, Zhang X Y, Jing R L. Functional conservation and divergence among homoeologs of *TaSPL20* and *TaSPL21*, two SBP-Box genes governing yield-related traits in hexaploid wheat. *Plant Physiology*, 2017, 174: 1177-1191
- Yue A Q, Li A, Mao X G, Chang X P, Li R Z, Jing R L. Identification and development of a functional marker from 6-*SFT-A2* associated with grain weight in wheat. *Molecular Breeding*, 2015, 35: 63
- 李韬, 骆孟, 钱丹, 董晶晶, 顾世梁. 抗赤霉病小麦地方品种黄方柱和海盐种 EMS 突变体的变异分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(6): 1092-1098
- 黄琛, 张锦鹏, 刘伟华, 杨欣明, 李秀全, 鲁玉清, 李立会, 高爱农. 普通小麦-冰草 6P 染色体中间插入易位系的鉴定. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4): 606-611