

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00613

小麦近缘种低分子量麦谷蛋白亚基基因 *Glu-B3* 克隆及系统发育分析

王林海¹, 周敏², 李慧玲³, 何中虎^{1,4}, 夏先春¹

1. 中国农业科学院作物科学研究所, 国家小麦改良中心, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081;
2. 北京农学院, 北京 102206;
3. 河北省廊坊市种子管理站, 廊坊 065000;
4. 国际玉米小麦改良中心(CIMMYT)中国办事处, 北京 100081

摘要: 发掘小麦近缘种低分子量麦谷蛋白基因, 可为小麦品质改良提供更多的基因资源。文章利用 *Glu-B3* 位点特异性标记 LB1F/LB1R、LB2F/LB2R、LB3F/LB3R 和 LB4F/LB4R, 对普通小麦 B 染色体组的 7 个可能供体近缘种, 即硬粒小麦(*T. durum*)、栽培二粒小麦(*T. dicoccum*)、野生二粒小麦(*T. dicoccoides*)、拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*)、高大山羊草(*Ae. longissima*)、西尔斯山羊草(*Ae. searsii*)和双角山羊草(*Ae. bicornis*)共 20 份材料进行 PCR 扩增, 克隆小麦近缘种中 *GluB3-1*、*GluB3-2*、*GluB3-3* 和 *GluB3-4* 基因的等位变异, 并对 *Glu-B3* 位点基因进行系统发育分析。共获得 16 个新等位变异, 其中 *GluB3-1* 基因的新等位变异 1 个, 命名为 *GluB3-16*, 其推导氨基酸分子量为 39.2 kDa; *GluB3-3* 的新等位变异有 3 个, 分别命名为 *GluB3-35*、*GluB3-36* 和 *GluB3-37*, 其推导氨基酸分子量为 44.5 kDa(*GluB3-36*)或 44.6 kDa(*GluB3-35* 和 *GluB3-37*); *GluB3-4* 的新等位变异 12 个, 分别命名为 *GluB3-46*、*GluB3-47*、*GluB3-48*、*GluB3-49*、*GluB3-410*、*GluB3-411*、*GluB3-412*、*GluB3-413*、*GluB3-414*、*GluB3-415*、*GluB3-416* 和 *GluB3-417*, 其推导氨基酸分子量变化在 38.6(*GluB3-414*)~ 42.5 kDa(*GluB3-413*)之间; 16 个新等位变异都包含单一的完整开放阅读框, 具有低分子量麦谷蛋白亚基的典型结构。文章进一步拓展了低分子量麦谷蛋白基因资源, 揭示不同 *Glu-B3* 基因的进化过程不完全相同, 为有效地利用小麦近缘种材料和转基因育种提供了新的基因资源。

关键词: 普通小麦; 小麦近缘种; 低分子量麦谷蛋白亚基; *Glu-B3*; 系统发育

Cloning and phylogenetic analysis of low-molecular-weight glutenin subunit genes at *Glu-B3* locus in common wheat relative species

WANG Lin-Hai¹, ZHOU Min², LI Hui-Ling³, HE Zhong-Hu^{1,4}, XIA Xian-Chun¹

1. Institute of Crop Science, National Wheat Improvement Center/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China;
2. Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;
3. The Department of Seed Administration, Langfang 065000, China;
4. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) China Office, Beijing 100081, China

收稿日期: 2009-10-15; 修回日期: 2009-12-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z1A7, 2006AA100102)和国家自然科学基金项目(编号: 30830072)资助

作者简介: 王林海(1979-), 男, 博士, 研究方向: 作物遗传育种。E-mail: linhai7960@126.com

通讯作者: 周敏(1962-), 女, 副教授, 研究方向: 作物遗传育种。Tel: 010-80799405; E-mail: zmskx@yahoo.com.cn

夏先春(1963-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 小麦遗传育种。Tel: 010-82108610; E-mail: xiaxianchun@caas.net.cn

Abstract: The common wheat relative species are important germplasm for wheat breeding. In the present study, novel allelic variants at *Glu-B3* locus were cloned to provide gene resources for wheat quality improvement. Four *Glu-B3*-locus specific primer sets LB1F/LB1R, LB2F/LB2R, LB3F/LB3R, and LB4F/LB4R were employed to isolate novel allelic variants of *GluB3-1*, *GluB3-2*, *GluB3-3*, and *GluB3-4* from seven common wheat relative species, i.e., *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *Aegilops longissima*, *Ae. searsii*, *Ae. Bicornis*, and *Ae. speltoides*, and the software MEGA 4 was used to construct a phylogenetic tree. In total, 16 novel allelic variants of *GluB3-1*, *GluB3-3*, and *GluB3-4* genes were isolated from the seven common wheat relative species, designated *GluB3-16*, *GluB3-35*, *GluB3-36*, *GluB3-37*, *GluB3-46*, *GluB3-47*, *GluB3-48*, *GluB3-49*, *GluB3-410*, *GluB3-411*, *GluB3-412*, *GluB3-413*, *GluB3-414*, *GluB3-415*, *GluB3-416* and *GluB3-417*, respectively. In detail, *GluB3-16* was cloned from *T. dicoccoides* with LB1F/LB1R, and the molecular weight of the deduced amino acid was 39.2 kDa. *GluB3-35*, *GluB3-36*, and *GluB3-37* were isolated from *T. durum* and *T. dicoccum* with the primer set LB3F/LB3R, and the molecular weights of their deduced peptides were 44.5 kDa (*GluB3-36*) and 44.6 kDa (*GluB3-35* and *GluB3-37*). The molecular weight of deduced peptides of *GluB3-4* ranged from 38.6 kDa (*GluB3-414*) to 42.5 kDa (*GluB3-413*). All the 16 new allelic variants showed a single open reading frame (ORF), and their deduced amino-acid sequences had a typical sequence structure of LMW-GS. The allelic variants at *Glu-B3* locus identified in common wheat relative species provide potential gene resources for wheat quality breeding and gene transformation. The results suggested that these *Glu-B3* genes originated from different evolution processes.

Keywords: *Triticum aestivum* L.; wheat related species; LMW-GS; *Glu-B3*; phylogenetics

随着生产的发展和生活水平的不断提高, 高产与优质已成为我国小麦生产的两个主要目标。尽管我国品质育种取得了较好进展, 但我国适合制作优质面包的硬质、高蛋白的强筋小麦品种还很少, 适合制作优质饼干、糕点的软质、低蛋白的弱筋型小麦极缺, 大多为中间类型^[1]。因此加强小麦品质相关性状的基础研究, 特别是对贮藏蛋白的研究, 对培育优质小麦品种具有重要意义。小麦面筋蛋白是决定面团黏弹性的主要因素, 其主要由麦谷蛋白和醇溶蛋白组成。低分子量麦谷蛋白(Low-molecular-weight glutenin subunits, LMW-GS)是麦谷蛋白的重要组成部分, 主要由位于第一同源群染色体短臂 *Glu-3* 位点(*Glu-A3*、*Glu-B3* 和 *Glu-D3*)的基因家族编码^[2,3], 对面筋延展性起着重要作用。根据 Southern 杂交分析推测, 六倍体小麦的 LMW-GS 总拷贝数在 10~15^[4]至 35~40^[5]之间, 基因家族多拷贝和高度相似性是鉴定不同位点基因的重要障碍^[6~8]。

近年来, 随着对一些低分子量麦谷蛋白编码基因的深入研究^[6,7], 为进一步挖掘小麦近缘种基因资源提供了重要信息。小麦近缘种中含有广泛的基因变异, 能够为小麦育种提供优异的基因资源, 如抗逆、抗病及提高光合效率等^[9~11]。从小麦近缘种中克隆和鉴定低分子量麦谷蛋白基因, 有可能获得对普通小麦品质改良有重要价值的基因资源。然而,

由于近缘种低分子量麦谷蛋白基因克隆较为困难, 目前仅对 A 和 D 组的供体研究较多, 并揭示了较为广泛的变异^[12~16]。普通小麦 B 组染色体的低分子量麦谷蛋白及其编码基因组成较为复杂^[6], 且其起源问题一直存在较大争议, 虽然已在形态学、染色体配对、分子标记^[17~20]等方面进行了广泛的研究, 高大山羊草(*Ae. Longissima*, *S^lS^l*)、西尔斯山羊草(*Ae. searsii*, *S^sS^s*)、双角山羊草(*Ae. bicornis*, *S^bS^b*)、拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*, *SS*)都曾被认为是其可能供体, 但都缺乏充分的证据, 因而对该基因组近缘种 *Glu-B3* 位点基因的研究较少。普通小麦 B 组染色体起源与进化的复杂性, 也为小麦育种提供了丰富的种质资源, 为育种者挖掘和利用一些特有基因提供了可能。在我们先前的研究中, 利用设计的特异性标记分别获得了 4 个 *Glu-B3* 和 6 个 *Glu-D3* 位点基因, 并进一步分析了这些基因与蛋白亚基之间的关系^[7,8,21], 为进一步研究基因等位变异打下了基础。

本文根据以前的研究结果^[21], 利用 *Glu-B3* 位点特异性标记 LB1F/LB1R、LB2F/LB2R、LB3F/LB3R 和 LB4F/LB4R 对普通小麦 B 组染色体的可能供体进行分析, 克隆小麦近缘种中 *Glu-B3* 基因的新等位变异, 挖掘低分子量麦谷蛋白基因资源, 并为 B 组染色体进化研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料包括 20 份含有普通小麦 B 染色体组可能供体的近缘种材料: 硬粒小麦(*T. durum*, *AABB*)、栽培二粒小麦(*T. dicoccum*, *AABB*)、野生二粒小麦(*T. dicoccoides*, *AABB*)、高大山羊草(*Ae. longissima*, *S^lS^l*)、西尔斯山羊草(*Ae. searsii*, *S^sS^s*)和双角山羊草(*Ae. bicornis*, *S^bS^b*)各 3 个系、拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*, *SS*)2 个系(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[22]。每个材料提取 2 份, 每份取 1 个籽粒提取 DNA。

1.2.2 小麦近缘种中 *Glu-B3* 基因的克隆

用本课题组开发的 4 对 *Glu-B3* 位点特异性引物(LB1F/LB1R、LB2F/LB2R、LB3F/LB3R 和 LB4F/LB4R)对 20 份普通小麦近缘种材料进行扩增, 其中

LB1F/LB1R 的目标产物约为 1 200 bp, LB2F/LB2R 的目标产物约为 1 400 bp, LB3F/LB3R 的目标产物约为 1 300 bp, LB4F/LB4R 的目标产物约为 1 600 bp^[21]。

目标 PCR 产物克隆至 pEASY-T1 载体上进行测序。为减少或排除克隆测序缺陷^[23], 回收的 PCR 产物也用于测序。每个样品的测序重复 3~6 次(送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序)。核苷酸序列及推导氨基酸序列比对分析用 DNAMAN (www.lynnon.com)和 Bioedit 7.0 (http://www.mbio.ncsu.edu)软件。

1.2.3 引物设计及 PCR 扩增

在基因 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 的编码区域, 根据各个基因等位变异的一致序列, 分别设计 1 对引物, 用于分析所克隆基因在小麦近缘种中的分布特点。引物序列及 PCR 扩增条件见表 2。

1.2.4 系统发育树的构建

本研究从小麦近缘种中共获得 16 个新的 *Glu-B3* 基因等位变异, 连同从普通小麦中克隆到的 17 个

表 1 克隆 *Glu-B3* 位点基因所用的小麦近缘种材料及克隆的等位基因

物种名称	基因组	品系	来源	<i>Glu-B3</i> 位点的基因			
				<i>GluB3-1</i>	<i>GluB3-2</i>	<i>GluB3-3</i>	<i>GluB3-4</i>
硬粒小麦	<i>AABB</i>	Nopoleon	NFCRI	/	/	<i>GluB3-35</i>	<i>GluB3-46</i>
<i>T. durum</i>		Spectra	NFCRI	/	/	<i>GluB3-35</i>	<i>GluB3-46</i>
		Plenty	NFCRI	/	/	<i>GluB3-35</i>	<i>GluB3-46</i>
栽培二粒小麦	<i>AABB</i>	DM28	NFCRI	/	/	<i>GluB3-36</i>	<i>GluB3-47</i>
<i>T. dicoccum</i>		DM37	NFCRI	/	/	<i>GluB3-32</i>	<i>GluB3-44</i>
		DM47	NFCRI	/	/	<i>GluB3-37</i>	<i>GluB3-45</i>
野生二粒小麦	<i>AABB</i>	DS6	NFCRI	<i>GluB3-14</i>	<i>GluB3-23</i>	/	<i>GluB3-48</i>
<i>T. dicoccoides</i>		DS7	NFCRI	<i>GluB3-16</i>	<i>GluB3-23</i>	/	<i>GluB3-41</i>
		DS8	NFCRI	<i>GluB3-15</i>	<i>GluB3-23</i>	/	<i>GluB3-49</i>
拟斯卑尔脱山羊草	<i>SS</i>	Le49	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-410</i>
<i>Ae. speltoides</i>		PI226616	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-411</i>
高大山羊草	<i>S^lS^l</i>	Y152	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-412</i>
<i>Ae. longissima</i>		Y155	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-413</i>
		P107	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-414</i>
西尔斯山羊草	<i>S^sS^s</i>	PI599121	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-415</i>
<i>Ae. searsii</i>		PI599122	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-415</i>
		PI599133	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-415</i>
双角山羊草	<i>S^bS^b</i>	CW14250	CIMMYT	/	/	/	<i>GluB3-416</i>
<i>Ae. bicornis</i>		CW14266	CIMMYT	/	/	/	<i>GluB3-416</i>
		C70	CIMMYT	/	/	/	<i>GluB3-417</i>

“/”表示在对应的品系中没有获得相应的基因; NFCRI: 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程; CIMMYT: 国际玉米小麦改良中心。

表 2 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 基因编码区域引物及 PCR 扩增条件

引物	序列 (5' → 3')	扩增基因*	PCR 条件		
BFN1	ACAGCAACCATGTTCACAA	<i>GluB3-1</i>	94	35 s, 58	35 s, 72 90 s
BRN1	TGCTGCGAAAATGATGGC				
BFN2	ATCCAACAACAACCACAACCATATT	<i>GluB3-2</i>	94	35 s, 58	35 s, 72 90 s
BRN2	CTGTTGGGGTTGCTGCTGAG				
BFN3	CACCATGAAGACCTTCCTCA	<i>GluB3-3</i>	94	35 s, 59	35 s, 72 90 s
BRN3	CTATACAACGGCACATTAACATT				

*基因序列参见文献[21]。

Glu-B3 基因序列(*GluB3-11*、*GluB3-12*、*GluB3-13*、*GluB3-14*、*GluB3-15*、*GluB3-21*、*GluB3-22*、*GluB3-23*、*GluB3-31*、*GluB3-32*、*GluB3-33*、*GluB3-34*、*GluB3-41*、*GluB3-42*、*GluB3-43*、*GluB3-44* 和 *GluB3-45*)用于构建系统发育树^[21]。所有的基因序列首先应用软件 ClustalW 1.83 进行比对, 比对后用于系统发育树的构建。用软件 MEGA 4 构建邻位相连树(Neighbour-joining tree)和最大简约树(Maximum-parsimony tree), 自举测试(Bootstrap testing)均为 1 000 次重复, 在前一种算法中, 缺位(gap)只在两两比对时才被去除; 而对于后一种算法, 所有的位点都被当作有意义的字符而包括在运算过程中。另外, 应用 PHYLIP 软件包, 还以默认的参数构建了一个最大似然树(Maximum-likelihood tree)。

2 结果与分析

2.1 小麦近缘种中 *Glu-B3* 基因的等位变异

在 20 个材料中, 引物 LB1F/LB1R 仅能在野生二粒小麦的 3 个品系和西尔斯山羊草的 3 个品系中获得扩增产物(图 1A)。经测序发现, 在野生二粒小麦 DS6 中获得的序列与 *GluB3-14* 完全一致; 在 DS8 中获得序列与 *GluB3-15* 完全一致; 在 DS7 中获得了一个新的等位变异, 命名为 *GluB3-16*(GenBank 登录号: FJ824786), 其序列与 *GluB3-15* 高度一致, 仅在中间重复区域多出一个密码子 CAA; 在 3 个西尔斯山羊草中获得的序列与基因 *GluB3-1* 的差异较大, 而与基因 *GluB3-4* 的等位变异 *GluB3-415* 序列一致。

引物 LB2F/LB2R 仅能在 3 个野生二粒小麦系

中获得扩增产物(图 1B), 所获得的 3 条序列与从普通小麦中获得的 *GluB3-23* 完全一致。

引物 LB3F/LB3R 仅能在 3 个硬粒小麦系和 3 个野生二粒小麦系中获得扩增产物(图 1C), 共获得 3 个新等位变异, 分别命名为 *GluB3-35*、*GluB3-36* 和 *GluB3-37*(GenBank 登录号: FJ824787、FJ824788 和 FJ824789)。其中, *GluB3-35* 存在于 3 个硬粒小麦品系中, *GluB3-36* 和 *GluB3-37* 分别存在于野生二粒小麦材料 DM28 和 DM47 中, 而在 DM37 中获得的序列与普通小麦的 *GluB3-32* 完全一致。

引物 LB4F/LB4R 在 20 份材料中获得了 12 个 *GluB3-4* 基因的新等位变异(图 1D)。其中, 在 3 个硬粒小麦中获得 1 个等位变异, 命名为 *GluB3-46*(GenBank 登录号: FJ824790), 它与普通小麦中 5 个等位变异(*GluB3-41*、*GluB3-42*、*GluB3-43*、*GluB3-44* 和 *GluB3-45*)的序列相似性在 99.3%~99.4%之间; 在 3 个栽培二粒小麦中, 从 DM28 中获得一个等位变异 *GluB3-47*(GenBank 登录号: FJ824791), 它与普通小麦中等位变异的序列相似性在 99.2%~99.9%之间; 在 3 个野生二粒小麦中, 从 DS6 和 DS8 中各获得一个等位变异, 分别命名为 *GluB3-48*(GenBank 登录号: FJ824792)和 *GluB3-49*(GenBank 登录号: FJ824793), 其与普通小麦中等位变异的相似性在 99.1%~99.9%之间, 而从 DS7 中获得的序列与 *GluB3-41* 完全一致; 在两个拟斯卑尔脱山羊草 Le49 和 PI226616 中, 各获得一个等位变异, 分别命名为 *GluB3-410*(GenBank 登录号: FJ824794)和 *GluB3-411*(GenBank 登录号: FJ824795), 它们与普通小麦中等位变异的相似性在 94.7%~95.3%之间; 在 3 个高大山羊草中获得了 3 个等位变异, 分别命名为 *GluB3-412*(GenBank 登录号: FJ824796)、*GluB3-413*(GenBank 登录号: FJ824797)

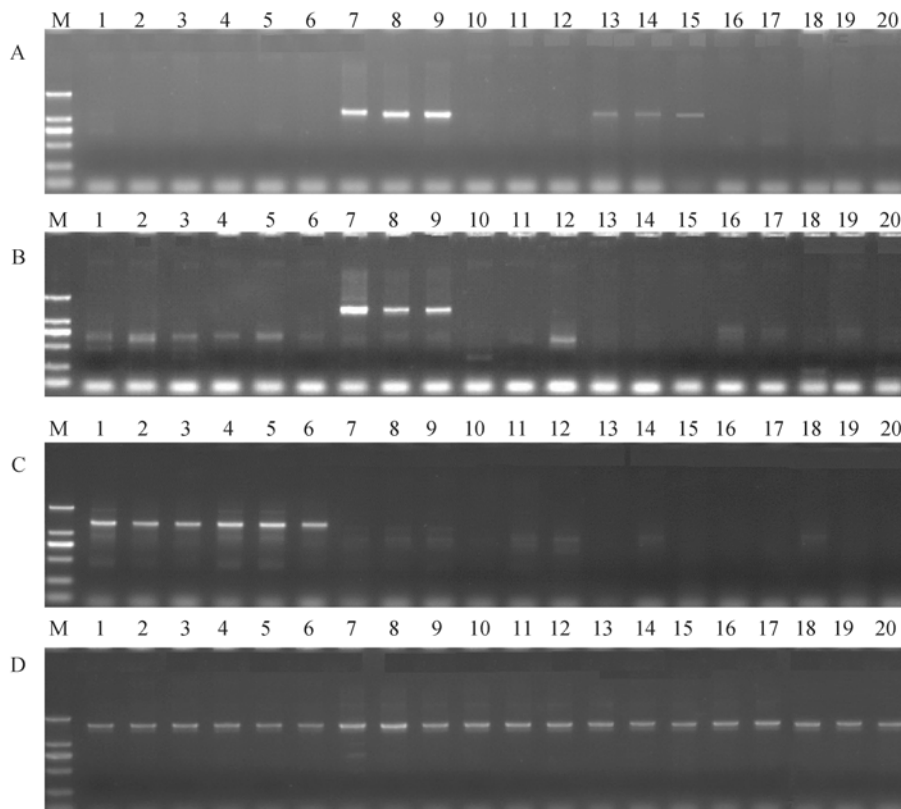


图 1 *Glu-B3* 位点基因特异性引物在普通小麦近缘种中的扩增产物电泳检测

A: 引物 LB1F/LB1R 扩增产物; B: 引物 LB2F/LB2R 扩增产物; C: 引物 LB3F/LB3R 扩增产物; D: 引物 LB4F/LB4R 扩增产物。1: Nopoleon; 2: Spectra; 3: Plenty; 4: DM28; 5: DM37; 6: DM47; 7: DS6; 8: DS7; 9: DS8; 10: Y152; 11: Y155; 12: P107; 13: PI599121; 14: PI599122; 15: PI599133; 16: CWI4250; 17: CWI4266; 18: C70; 19: Le49; 20: PI226616; M: DL2000 DNA Marker(100、250、500、750、1 000 和 2 000 bp)。

和 *GluB3-414*(GenBank 登录号: FJ824798), 它们与普通小麦中等位变异的相似性在 94.8%~96.7%之间; 在 3 个西尔斯山羊草中获得了一个新等位变异 *GluB3-415*(GenBank 登录号: FJ824799), 其与普通小麦中 5 个等位变异的相似性在 94.9%~95.0%之间; 在双角山羊草中, CWI4250 和 CWI4266 含有相同的新等位变异 *GluB3-416*(GenBank 登录号: FJ824800), 而 C70 含有新等位变异 *GluB3-417*(GenBank 登录号: FJ824801), 这 3 个等位变异与普通小麦中等位变异的相似性在 96.8%~97.0%之间。

从对 20 个近缘种材料的扩增及测序结果上看, 基因 *GluB3-1*、*GluB3-2*、*GluB3-3* 与 *GluB3-4* 有明显区别, 似乎 *GluB3-1* 和 *GluB3-2* 仅存在于野生二粒小麦中, 而 *GluB3-3* 则为栽培二粒小麦和硬粒小麦所共有(图 1)。为分析这一现象是否因引物选择性扩增所造成, 分别用基因 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 编码区域引物, 对 20 个材料进行 PCR 扩增。电泳结果显示, *GluB3-2* 和 *GluB3-3* 编码区域引物(BFN2/BRN2 和

BFN3/BRN3)的扩增产物与基因特异引物 LB2F/LB2R 和 LB3F/LB3R 的扩增结果一致(图 2: B、C), 测序结果也显示所扩增的片段为目标片段。*GluB3-1* 的编码区域引物(BFN1/BRN1)除能在野生二粒小麦中获得产物外, 其在西尔斯山羊草和拟斯卑尔脱山羊草中也能扩增出产物, 但西尔斯山羊草中产物的分子量明显大于目标带(图 2A), 对扩增产物测序后发现, 其在西尔斯山羊草的产物属于基因 *GluB3-4* 的等位变异, 而在拟斯卑尔脱山羊草中的产物由于片段较小(约 200 bp), 考虑到低分子量麦谷蛋白之间及其与部分醇溶蛋白基因的序列相似性较高, 还不能确定其属于哪个基因。然而, 由于此引物的扩增区域位于基因的中间重复区, 推测它很可能产生了非特异扩增。

2.2 小麦近缘种 *Glu-B3* 基因等位变异推导的氨基酸特征

本研究获得的 16 个 *Glu-B3* 等位变异都包含完整的编码区域, 包括起始密码子 ATG 和典型的双终

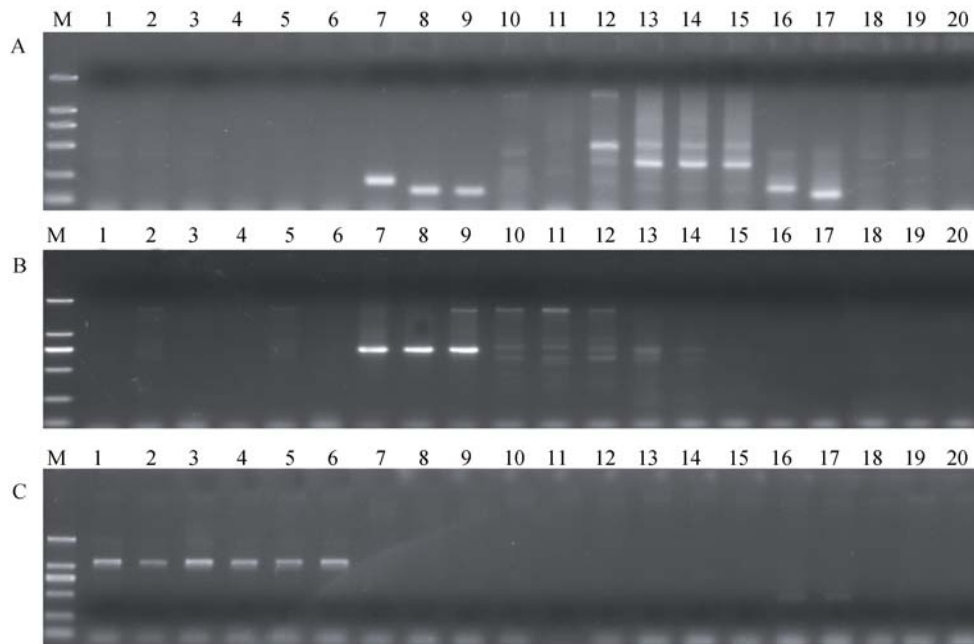


图 2 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 基因编码区域引物在普通小麦近缘种中的 PCR 产物

A: 引物 BFN1/BRN1 扩增产物; B: 引物 BFN2/BRN2 扩增产物; C: 引物 BFN3/BRN3 扩增产物。1: Nopoleon; 2: Spectra; 3: Plenty; 4: DM28; 5: DM37; 6: DM47; 7: DS6; 8: DS7; 9: DS8; 10: Y152; 11: Y155; 12: P107; 13: PI599121; 14: PI599122; 15: PI599133; 16: CWI4250; 17: CWI4266; 18: C70; 19: Le49; 20: PI226616; M 为 DNA Ladder 2000(100、250、500、750、1 000 和 2 000 bp)。

止密码子序列, 其中, 终止密码子序列在 1 个 *GluB3-1* 和 12 个 *GluB3-4* 的新等位变异中为 TGATAA, 在 3 个 *GluB3-3* 的新等位变异中为 TAATAA。其推导氨基酸序列都具有典型的低分子量麦谷蛋白序列特征, 包含 20 个氨基酸的信号肽、N-端保守序列、富含谷氨酰胺的中间重复序列和 C-端保守区等 4 个区域。

GluB3-16 的推导氨基酸序列的分子量为 39.2 kDa, 其与 *GluB3-15* 的推导氨基酸序列高度一致, 前者仅在中间重复区比后者多出一个谷氨酰胺残基(Gln)。*GluB3-35*、*GluB3-36* 和 *GluB3-37* 推导的多肽链分别命名为 BP3-5、BP3-6 和 BP3-7, 其分子量为 44.5 kDa (BP3-6) 和 44.6 kDa (BP3-5 和 BP3-7); 三者与基因 *GluB3-3* 在普通小麦中等位变异推导的氨基酸序列 (BP3-1、BP3-2、BP3-3、BP3-4) 长度一致, 其相似性在 97.6%~99.7% 之间。在结构上, 三者的 N-末端都为 MENSHP-; 在 C-末端保守区, BP3-7 序列为 -GIGTG VGGY, 其他两个为 -GVGTGVGGY (图 3)。

基因 *GluB3-4* 的 12 个新等位变异的推导肽链分别命名为 BP4-6、BP4-7、BP4-8、BP4-9、BP4-10、BP4-11、BP4-12、BP4-13、BP4-13、BP4-15、BP4-16 和 BP4-17, 其氨基酸残基数目在 340 (BP4-14)~371 (BP4-13) 之间,

分子量变化在 38.6 (BP4-14)~42.5 kDa (BP4-13) 之间。与普通小麦基因 *GluB3-4* 推导的氨基酸序列 (BP4-1、BP4-2、BP4-3、BP4-4 和 BP4-5) 的相似性在 91.3% (BP4-15 与 BP4-1、BP4-2、BP4-3 和 BP4-4)~100% (BP4-8 与 BP4-5、BP4-9 与 BP4-4) 之间。与 BP4-1 相比, 二倍体近缘种中等位基因的推导氨基酸除具有较多的单个氨基酸残基变异外, 还具有较多的缺失或插入 (图 4 和表 3)。其中, BP4-10 和 BP4-11 分别在 4 个位置产生了缺失或插入, 使其推导氨基酸肽链序列的长度分别达到 364 和 363 个氨基酸; BP4-13 在第 100 和第 142 个氨基酸后, 分别出现 24 个和 7 个氨基酸的插入, 使其肽链长度达到 371 个氨基酸, 这也是所有等位变异中氨基酸个数最多的一个。在 N-末端保守区, BP4-12、BP4-16 和 BP4-17 的氨基酸序列为 METSHIL-, BP4-15 为 METSYIP-, 其他的 8 个都为 METSHIP-。在 C-末端保守区, BP4-10 和 BP4-11 的氨基酸序列为 -GVGTQVGAY, 其余的都为 -GVGTRVGAY。在所有的 12 个推导氨基酸序列中, 除 BP4-13 的第 8 个半胱氨酸 (Cys) 位置为精氨酸 (Arg) 外, 其他的序列都包含 8 个典型的半胱氨酸残基。

BP3-1	MKTFLIFALLAVAATS A IAQMENSHIPGLERPSQQQPLPPQQTLSHHQQQQPIQQQPHQFPQQQP C SQQQ	70
BP3-2H.....	70
BP3-3T.....	70
BP3-4H.....	70
BP3-5H.....	70
BP3-6H.....	70
BP3-7	70
BP3-1	QQPPLSQQQQPPFSQQQQPPFSQQQQPVLPQQPSFSQQQLPPFSQQQQPPFSQQQQPVLPQQPSFSQQQL	140
BP3-2	140
BP3-3	140
BP3-4	140
BP3-5	140
BP3-6	140
BP3-7L.....	140
BP3-1	PPFSQQQLPPFLQQQQPVLPQQPPFSQQQLPPFSQQQLPPFSQQQQPVLPQQPPFSQQ- Q QQPILPQQPPFS	209
BP3-2S.....	209
BP3-3S.....	209
BP3-4S.....	209
BP3-5S.....	209
BP3-6S.....	209
BP3-7S.....P.....	209
BP3-1	QQQQPVLL Q QQIPFVHPSILQQLNP C KVFLQQ C SPVAMPQSLARSQMLQQR S CHVMQQ C CCQLPQIPQ	279
BP3-2H.....	279
BP3-3S.....	279
BP3-4S.....	279
BP3-5H.....	279
BP3-6S.....	279
BP3-7H.....S.....	279
BP3-1	QSRYEAIRAIVYSIILQE Q QQVQGSIQ T QQQQP Q QLG Q CVSQPQQQLQQQLGQQP Q QQQLAQGTFLQPHQ	349
BP3-2S.....	349
BP3-3S.....	349
BP3-4S.....	349
BP3-5S.....	349
BP3-6S.....H.....	349
BP3-7T.....S.....	349
BP3-1	IAQLEVMTSIALRTLPT M CNVNVPLRYRTTTRVPFGVGTGVGGY	392
BP3-2	392
BP3-3S.....	392
BP3-4	392
BP3-5	392
BP3-6	392
BP3-7I.....	392

图 3 近缘种中 3 个 *GluB3-3* 位点新等位变异推导的氨基酸序列(BP3-5~BP3-7)和普通小麦中 4 个 *GluB3-3* 等位变异推导的氨基酸序列(BP3-1~BP3-4)比对
 半胱氨酸残基被加粗并下划线, 圆点指示与 BP3-1 的共有序列, 短横线标示缺失或插入, 突变位置以对应氨基酸标出; ▼指示 N 末端保守区的起始点; ▽指示 N 末端重复区的起始点; ↓指示 C 末端区的 3 个亚区(即半胱氨酸富集区、谷酰胺富集区和末端保守区)起始点。

BP4-1	MKTFLIFALLAVAATS A IAQ M ETSHIP S LEKPLQQQPLP L QQILWYQQQQPIQQQ-----PQPFPQQ P C	65
BP4-2	65
BP4-3	65
BP4-4	65
BP4-5	65
BP4-6	65
BP4-7	64
BP4-8	65
BP4-9	65
BP4-10I.G.....G.N.S.....Q.....H.....	65
BP4-11I.G.....G.N.S.....Q.....H.....	65
BP4-12I.....L.....L.....H.....	65
BP4-13G.....S.....R.....H.E.....P.....	65
BP4-14S.....H.....PIQQQ.....	70
BP4-15F.....Y.G.....S.....H.....	65
BP4-16L.....H.....	65
BP4-17L.....H.....	65
BP4-1	SQQQQP--PLSQQQQPPFSQQQ-PPFSQQQQPILPQQP-----PFSQQQQQFPQQQQPLLP	118
BP4-2L.....V.....	118
BP4-3L.....V.....	118
BP4-4V.....	118
BP4-5L.....V.....	111
BP4-6V.....	118
BP4-7	117
BP4-8L.....V.....	111
BP4-9V.....	118
BP4-10QQP.....S.....V.....PFSQQQP-----P-----P.....	126
BP4-11Q-P.....S.....V.....PFSQQQP-----P-----P.....	125
BP4-12Q.....Q.....V.....Q.P.....	106
BP4-13Q.....V.....PFWQQQQPVLPQQP.....P.....L.....	132
BP4-14V.....PVSQQQQP-----	131

BP4-15	...L...V...E...PP.S...	112
BP4-16	...I...V...	111
BP4-17	...I...V...	111
BP4-1	QQPPFSQQQPPFSQQQQ-----PPFSQQ-----QQQPILLQQPPFSQHQQPVLPPQQQIPSVQPSIL	175
BP4-2P	175
BP4-3P	175
BP4-4P	175
BP4-5I.....Q.IP	168
BP4-6P	175
BP4-7P	174
BP4-8I.....Q.IP	168
BP4-9P	175
BP4-10PFLPQQ.....P.....Y.H	189
BP4-11PFLPQQ.....P.....Y.H	188
BP4-12PVLPPQ.....P	169
BP4-13I.....VLP.....SPFLPQQ.....S.R.....L.....F	196
BP4-14VLP	165
BP4-15	..Q.VLP.....ILP.....L	160
BP4-16PVLPPQ.....R.....P	174
BP4-17PVLPPQ.....R.....P	174
BP4-1	QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSLARSQMLWQSSCHVMQQQCCRQLPQIPEQSRYDAIRAIYSIVLQEQQ	245
BP4-2	245
BP4-3	245
BP4-4T	245
BP4-5	238
BP4-6	245
BP4-7	244
BP4-8	238
BP4-9T	245
BP4-10T.....Q.....R	259
BP4-11T.....Q.....R	258
BP4-12K	239
BP4-13Q.....R	266
BP4-14I.....Q	235
BP4-15Q.....K.L.....Q	230
BP4-16	244
BP4-17N	244
BP4-1	----HGQGLNQPQQQPQQSVQGVSQPQQQKQLGQCFSFQQPQQQLGQWPQ-----QQVPQGTLL	303
BP4-2	303
BP4-3	303
BP4-4	303
BP4-5	296
BP4-6	303
BP4-7	302
BP4-8	296
BP4-9	303
BP4-10	---Q...F.....E	317
BP4-11	---Q...F...L.....E	316
BP4-12	297
BP4-13F.....R.....S.....H.S.S	324
BP4-14I	293
BP4-15	QQQQ...F.....P.....N.....QLGQWPQQ	300
BP4-16D	302
BP4-17D	302
BP4-1	QPHQIAQLEVMTSIALRTLPTMCSVNVPVYGTITVFPFGVTRVGAY	350
BP4-2	350
BP4-3	350
BP4-4	350
BP4-5	343
BP4-6	350
BP4-7	349
BP4-8	343
BP4-9	350
BP4-10M.....S.....Q	364
BP4-11M.....S.....Q	363
BP4-12	344
BP4-13R.....S	371
BP4-14	340
BP4-15L.....S	347
BP4-16	349
BP4-17	349

图 4 近缘种中 *GluB3-4* 位点 12 个新等位变异推导的氨基酸序列 (BP4-6~BP4-17) 与在普通小麦中的 5 个 *GluB3-4* 等位变异推导的氨基酸序列 (BP4-1~BP4-5) 比对

半胱氨酸残基被加粗并下划线, 半胱氨酸残基突变位置被加了阴影, 圆点指示与 BP4-1 的共有序列, 短横线标示缺失或插入, 突变位置以对应氨基酸标出, ▼ 指示 N 末端保守区的起始点; ▽ 指示 N 末端重复区的起始点; ↓ 指示 C 末端的 3 个亚区 (即半胱氨酸富集区、谷酰胺富集区和末端保守区) 起始点。

表 3 近缘种中 12 个 *GluB3-4* 位点新等位变异推导的肽链与 BP4-1 差异比较

推导肽链	单氨基酸突变(个)	缺失/插入氨基酸(个)												
		55 ^a	71	85	94	100	108	109	113	136	142	143	245	294
BP4-6	2													
BP4-7	0	-1												
BP4-8	6						-7							
BP4-9	2													
BP4-10	20		+2			+7		-1		+6				
BP4-11	21		+1			+7		-1		+6				
BP4-12	7			+1	-7			-6		+6				
BP4-13	28					+14					+7			
BP4-14	9	+5				+8					-23			
BP4-15	28									-6			-9	+4
BP4-16	7							-7		+6				
BP4-17	8							-7		+6				

^a 对应于普通小麦 BP4-1 序列的氨基酸位置, 其他相同; “+” 代表在对应氨基酸后面有插入; “-” 代表在对应氨基酸后面有缺失。

2.3 普通小麦及其近缘种中 *Glu-B3* 基因的系统发育关系

应用软件 MEGA 和 PHYLIP 构建了 3 个基于不同算法的进化树, 其相似程度较高, 其中仅拟斯卑尔脱山羊草与双角山羊草在最大简约法与邻位链接法或最大似然法中的位置交换, 因而本文仅列出其中的邻位相连树(图 5)。本研究共涉及 4 个 *Glu-B3* 基因, 其中 *GluB3-4* 的等位变异最多, 达 12 个, 分布在所有的 7 个近缘种中。从图 5 可以看出, 4 个基因的等位变异分别聚成一簇, 自举值都达到 100, 说明这 4 个基因在进化过程中分别有自己的特征和取向, 也可能暗示其来源于不同的祖先。在 *GluB3-4* 的基因簇中, 所有的栽培二粒小麦、野生二粒小麦和硬粒小麦等四倍体近缘种与普通小麦首先聚成一个多倍体簇, 自举值为 100。在这一簇中, 有 3 个小的分枝分别含有栽培二粒小麦、野生二粒小麦和普通小麦的印迹, 说明三者的亲缘关系较近。硬粒小麦虽然单独成为一个分枝, 但从其在进化树上的位置来看, 其与以上 3 个种的关系都较近, 揭示了这 4 个物种的直系同源关系。在与二倍体近缘种的关系中, 双角山羊草与多倍体簇关系较近, 其次是拟斯卑尔脱山羊草, 关系最远的为西尔斯山羊草; 高大山羊草基因在进化树上的分布较为复杂, 其等位变异 *GluB3-412* 和 *GluB3-414* 与多倍体簇的进化关系较近, 而 *GluB3-413* 则稍远, 与拟斯卑尔脱山羊草处于同一层次。

在所研究的近缘种中, 基因 *GluB3-1* 和 *GluB3-2* 的等位变异仅在野生二粒小麦中得到, 且在序列上

与普通小麦极为相似或相同, 进一步揭示了野生二粒小麦与普通小麦间的亲缘关系。基因 *GluB3-3* 的等位变异仅能从栽培二粒小麦和硬粒小麦中获得, 从进化树上可以看出三者的亲缘关系较近。

3 讨论

本研究从普通小麦 B 组染色体的可能供体中, 克隆了 16 个新的等位变异。将这些等位变异与 GenBank 上的序列比对发现, GenBank 上相应的序列与从四倍体近缘种获得的等位变异具有高度的一致性, 而与从二倍体近缘种获得的 8 个等位变异的一致性较低。例如, 与 *GluB3-410* 和 *GluB3-411* 最高的相似性仅为 95.4% 或 95.7%, 与其他 6 条序列的相似性则更低。这进一步说明目前对普通小麦 B 组染色体可能供体中低分子量麦谷蛋白基因研究的缺乏。

根据成熟蛋白序列 N-末端的结构组成特点, 低分子量麦谷蛋白可以划分为 LMW-m、LMW-s 和 LMW-i 等 3 种类型, 分别对应于 N-末端氨基酸残基甲硫氨酸(Met)、丝氨酸(Ser)和异亮氨酸(Ileu)^[24]。基因 *GluB3-4* 新等位变异的推导肽链中, BP4-12、BP4-16 和 BP4-17 的 N-末端氨基酸序列为 METSHIL-, BP4-15 为 METSYIP-, 其余的为 METSHIP-, 因而理论上都应归为 LMW-m 类型; 在 C-末端保守区, BP4-10 和 BP4-11 的氨基酸序列为 -GVGTQVGAY, 其余的为 -GVGTRVGAY。基因 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 新等位变异的推导氨基酸都为 LMW-s 型。16 个新等位变异的推导氨基酸中, 仅 BP4-13 的第 8 个半胱氨酸(Cys)位置为精氨酸(Arg), 进一步说明了低分子

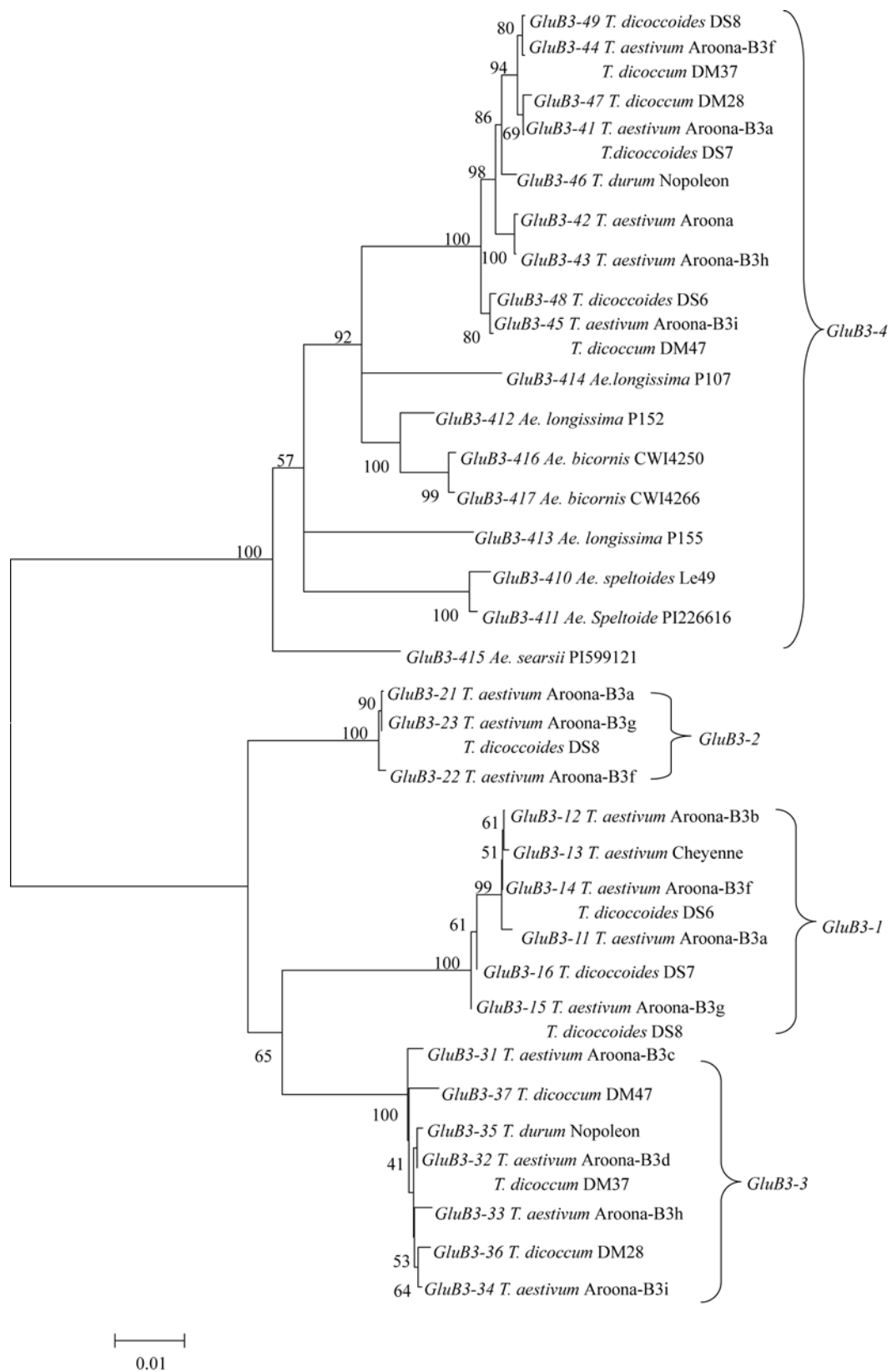


图 5 普通小麦及其近缘种 *Glu-B3* 位点等位变异的系统发育树

该系统发育树用 MEGA 4 软件基于邻位相连算法构建, 包含 *Glu-B3* 位点的 4 个基因及其等位变异。每个等位变异都标示出基因名称、物种名称和品系名称(标识号)。每一分支点上的数字为自举值, 图旁的标尺代表每一个位点的核苷酸替换率。

量麦谷蛋白序列中半胱氨酸的保守性。然而,在推导氨基酸序列长度上,从二倍体近缘种获得的等位变异具有较大的变异,如 BP4-10、BP4-11 和 BP4-13 的序列长度分别为 364、363 和 371 个氨基酸。一般认为,较长的低分子量麦谷蛋白序列中间重复区域对小麦面粉的品质性状有着积极影响^[23,25],因而对这些基因的作用有必要进一步分析。

关于普通小麦的起源,目前主要的观点认为它是经过两次遗传事件由其二倍体祖先进化而成的^[20,26-28]。首先发生的遗传事件是乌拉尔图小麦(*T. urartu*, 基因组为 A^uA^u, 普通小麦的 A 基因组供体)与拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*, 基因组为 SS, 一般被认为是普通小麦 B 基因组的供体)或者其近缘物种杂交并随后染色体加倍,最终形成野生二粒小麦(*T. dicoccoides*, AABB)。随后,栽培二粒小麦(*T. dicoccum*, AABB, 由野生二粒小麦驯化而成)与粗山羊草(*Ae. tauschii*, DD, 普通小麦的 D 基因组供体)杂交而生成六倍体普通小麦(基因组为 AABBDD)。除了普通小麦的祖先种外,另外几个物种也与其存在紧密的亲缘关系,如硬粒小麦(*T. durum*, AABB),也认为是由野生二粒小麦驯化而来,与栽培二粒小麦有着很近的亲缘关系^[29,30]。本研究中,基因 *GluB3-4* 的等位变异分布广泛,存在于所有研究的近缘种中,特别是在栽培二粒小麦和野生二粒小麦中都获得了与普通小麦一致的等位变异,这可能说明普通小麦中的等位变异发生在该物种形成之前。在与二倍体近缘种的关系上,本研究发现基因 *GluB3-4* 并不是与拟斯卑尔脱山羊草最近,相对而言,与双角山羊草和部分高大山羊草显得更近。然而,考虑到各个二倍体与普通小麦等位变异间的相似性差异不大,还不能确定普通小麦基因 *GluB3-4* 的二倍体祖先,这一方面说明了 B 组染色体,尤其是 1B 染色体上低分子量麦谷蛋白基因进化的复杂性,另一方面也支持 B 组染色体起源于多个二倍体山羊草祖先的假设^[31]。

值得注意的是,基因 *GluB3-1* 和 *GluB3-2* 的等位变异仅出现在野生二粒小麦中,却没有在栽培二粒小麦和硬粒小麦中发现,而 *GluB3-3* 的等位变异则仅出现在栽培二粒小麦和硬粒小麦中。很明显,这 3 个 *Glu-B3* 基因的进化特点难以用传统上普通小麦进化模式解释,说明不同 *Glu-B3* 基因的进化机制可能不同。此外,这 3 个基因在所研究的二倍体近缘种中都没有克隆到新等位变异,根据分析的结果,它

们很可能不是由所研究的二倍体物种直接进化而来。考虑到 B 组染色体进化的复杂性及低分子量麦谷蛋白基因间的高度相似性^[6-8],很可能该基因位在进化过程中有其他染色体组供体的基因渗入,因而若要了解其起源,需进一步分析更多的近缘种,包括其他染色体的可能供体。从序列和进化树上看,与硬粒小麦相比,栽培二粒小麦和野生二粒小麦与普通小麦的亲缘更近。以上这些结果进一步证明了栽培二粒小麦和野生二粒小麦与普通小麦紧密的进化关系,同时进一步验证了普通小麦可能有多个四倍体祖先的推论^[32]。

参考文献(References):

- [1] 何中虎,林作楫,王龙俊,肖志敏,万富世,庄巧生. 中国小麦品质区划研究. 中国农业科学, 2002, 35(4): 359-364.
- [2] Payne PI, Seekings JA, Worland AJ, Jarvis MG, Holt LM. Allelic variation of glutenin subunits and gliadins and its effect on bread-making quality in wheat: Analysis of F₅ progeny from Chinese Spring × Chinese Spring (Hope 1A). *J Cereal Sci*, 1987, 6(2): 103-118.
- [3] Singh NK, Shepherd KW. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group-1 chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 75(6-7): 628-641.
- [4] Harberd NP, Bartels D, Thompson RD. Analysis of the gliadin multigene loci in bread wheat using nullisomic-tetrasomic lines. *Mol Gen Genet*, 1985, 198(2): 234-242.
- [5] Cassidy BG, Dvorak J, Anderson OD. The wheat low-molecular-weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. *Theor Appl Genet*, 1998, 96(6-7): 743-750.
- [6] D'Ovidio R, Masci S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J Cereal Sci*, 2004, 39: 321-339.
- [7] Zhao XL, Xia XC, He ZH, Gale KR, Lei ZS, Appels R, Ma WJ. Characterization of three low-molecular-weight *Glu-D3* subunit genes in common wheat. *Theor Appl Genet*, 2006, 113(7): 1247-1259.
- [8] Zhao XL, Xia XC, He ZH, Lei ZS, Appels R, Yang Y, Sun QX, Ma WJ. Novel DNA variations to characterize low molecular weight glutenin *Glu-D3* genes and develop STS markers in common wheat. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(3): 451-460.
- [9] Levy AA, Galili G, Feldman M. Polymorphism and genetic control of high molecular weight glutenin subunits in wild tetraploid wheat *Triticum turgidum* var. *dicoccoides*. *Heredit*, 1988, 61(1): 63-72.

- [10] Valkoun JJ. Wheat pre-breeding using wild progenitors. *Euphytica*, 2001, 119(1–2): 17–23.
- [11] Xu SS, Khan K, Kindworth DL, Faris JD, Nygard G. Chromosomal location of genes for novel glutenin subunits and gliadins in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*). *Theor Appl Genet*, 2004, 108(7): 1221–1228.
- [12] Li XH, Wang AL, Xiao YH, Yan YM, He ZH, Appels R, Ma WJ, Hsam SLK, Zeller FJ. Cloning and characterization of a novel low molecular weight glutenin subunit gene at the *Glu-A3* locus from wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*). *Euphytica*, 2008, 159(1–2): 181–190.
- [13] Lafiandra D, Margiotta B, Colaprico G, Masci S, Roth MR, MacRitchie F. Introduction of the D-genome related high and low-Mr glutenin subunits into durum wheat and their effect on technological properties. In: Shewry PR, Thatam AS, eds. *Wheat Gluten*. Royal Society of Chemistry, UK, 2000, 51–54.
- [14] Pflüger LA, D'Ovidio R, Margiotta B, Pena R, Mujeeb-Kazi A, Lafiandra D. Characterisation of high- and low-molecular weight glutenin subunits associated to the D genome of *Aegilops tauschii* in a collection of synthetic hexaploid wheats. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(8): 1293–1301.
- [15] An X, Zhang Q, Yan Y, Li Q, Zhang Y, Wang A, Pei J, Tian J, Wang H, Hsam SLK, Zelle FJ. Cloning and molecular characterization of three novel LMW-i glutenin subunit genes from cultivated einkorn (*Triticum monococcum* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113(3): 383–395.
- [16] Zhao XL, Yang Y, He Z H, Lei ZS, Ma W, Sun QX, Xia XC. Characterization of novel LMW-GS genes at *Glu-D3* locus of chromosome 1D in *Aegilops tauschii*. *Hereditas*, 2008, 145(5): 238–250.
- [17] 陈佩度, Gill BS. 四倍体小麦染色体 4A 和 B, G 染色体组的起源. *作物学报*, 1984, 10(3): 146–153.
- [18] Kimber G, Athwal RS. A reassessment of the course of evolution of wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(4): 912–915.
- [19] Daud HM, Gustafson JP. Molecular evidence for *Triticum speltoides* as a B-genome progenitor of wheat. *Genome*, 1996, 39(3): 543–548.
- [20] Feuillet C, Penger A, Gellner K, Mast A, Keller B. Molecular evolution of receptor-like kinase genes in hexaploid wheat. Independent evolution of orthologs after polyploidization and mechanisms of local rearrangements at paralogous loci. *Plant Physiol*, 2001, 125(3): 1304–1313.
- [21] Wang LH, Zhao XL, He ZH, Ma W, Appels R, Peña RJ, Xia XC. Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit *Glu-B3* genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2009, 118(3): 525–539.
- [22] Gale KR, Ma W, Zhang W, Rampling L, Hill AS, Appels R, Morris P, Morrel M. Simple high-throughput DNA markers for genotyping in wheat. In: Eastwood R, Hollamby G, Rathjen T, Gororo N (eds.) *Proceedings of 10th Australian wheat breeding assembly*, Wheat Breeding Society of Australia, Mildura, VIC, 16–21 September 2001, 26–31.
- [23] Masci S, D'Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda DD. Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiol*, 1998, 118(4): 1147–1158.
- [24] Lew EJJ, Kuzmicky DD, Kasarda DD. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem*, 1992, 69(5): 508–515.
- [25] Masci S, D'Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda DD. A 1B coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats show strong similarity to subunits present in some bread wheat cultivars. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(3–4): 396–400.
- [26] Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8133–8138.
- [27] Gu YQ, Coleman-Derr D, Kong XY, Anderson OD. Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four *Triticeae* genomes. *Plant Physiol*, 2004, 135(1): 459–470.
- [28] Petersen G, Seberg O, Yde M, Berthelsen K. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39(1): 70–82.
- [29] Luo MC, Yang ZL, You FM, Kawahara T, Waines JG, Dvorak J. The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(6): 947–959.
- [30] Jauhar PP. Meiotic restitution in wheat polyhaploids (amphihaploids): a potent evolutionary force. *J Heredity*, 2007, 98(16): 188–193.
- [31] Liu B, Segal G, Rong JK, Feldman M. A chromosome-specific sequence common to the B genome of polyploid wheat and *Aegilops searsii*. *Plant Sys E*, 2003, 241(1–2): 55–66.
- [32] He XY, He ZH, Morris CF, Xia XC. Cloning and phylogenetic analysis of polyphenol oxidase genes in common wheat and related species. *Genet Resour Crop Evol*, 2009, 56(3): 311–321.

作者: 王林海, 周敏, 李慧玲, 何中虎, 夏先春, WANG Lin-Hai, ZHOU Min, LI Hui-Ling, HE Zhong-Hu, XIA Xian-Chun

作者单位: 王林海, 夏先春, WANG Lin-Hai, XIA Xian-Chun(中国农业科学院作物科学研究所, 国家小麦改良中心, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京100081), 周敏, ZHOU Min(北京农学院, 北京, 102206), 李慧玲, LI Hui-Ling(河北省廊坊市种子管理站, 廊坊, 065000), 何中虎, HE Zhong-Hu(中国农业科学院作物科学研究所, 国家小麦改良中心, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京100081; 国际玉米小麦改良中心, CIMMYT, 中国办事处, 北京, 100081)

刊名: 遗传 

英文刊名: HEREDITAS

年, 卷(期): 2010, 32(6)

被引用次数: 0次

参考文献(32条)

1. 何中虎, 林作楫, 王龙俊, 肖志敏, 万富世, 庄巧生. 中国小麦品质区划研究 2002(4)
2. Payne PI, Seekings JA, Worland AJ, Jarvis MG, Holt LM. Allelic variation of glutenin subunits and gliadins and its effect on bread-making quality in wheat: Analysis of F5 progeny from Chinese Spring × Chinese Spring (Hope 1A) 1987(2)
3. Singh NK, Shepherd KW. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group-1 chromosomes 1988(6-7)
4. Harberd NP, Bartels D, Thompson RD. Analysis of the gliadin multigene loci in bread wheat using nullisomic-tetrasomic lines 1985(2)
5. Cassidy BG, Dvorak J, Anderson OD. The wheat low-molecular-weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure 1998(6-7)
6. D'Ovidio R, Masci S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten 2004
7. Zhao XL, Xia XC, He ZH, Gale KR, Lei ZS, Appels R, Ma WJ. Characterization of three low-molecular-weight Glu-D3 subunit genes in common wheat 2006(7)
8. Zhao XL, Xia XC, He ZH, Lei ZS, Appels R, Yang Y, Sun QX, Ma WJ. Novel DNA variations to characterize low molecular weight glutenin Glu-D3 genes and develop STS markers in common wheat 2007(3)
9. Levy AA, Galili G, Feldman M. Polymorphism and genetic control of high molecular weight glutenin subunits in wild tetraploid wheat *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* 1988(1)
10. Valkoun JJ. Wheat pre-breeding using wild progenitors 2001(1-2)
11. Xu SS, Khan K, Kindworth DL, Faris JD, Nygard G. Chromosomal location of genes for novel glutenin subunits and gliadins in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*) 2004(7)
12. Li XH, Wang AL, Xiao YH, Yan YM, He ZH, Appels R, Ma WJ, Hsam SLK, Zeller FJ. Cloning and characterization of a novel low molecular weight glutenin subunit gene at the Glu-A3 locus from wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*) 2008(1-2)
13. Lafiandra D, Margiotta B, Colaprico G, Masci S, Roth MR, MacRitchie F. Introduction of the D-genome related high and low-molecular-weight glutenin subunits into durum wheat and their effect on technological properties 2000
14. Pflüger LA, D'Ovidio R, Margiotta B, Pena R, Mujeeb-Kazi A, Lafiandra D. Characterisation of high- and low-molecular weight glutenin subunits associated to the D genome of *Aegilops tauschii* in a collection of synthetic hexaploid wheats 2001(8)
15. An X, Zhang Q, Yan Y, Li Q, Zhang Y, Wang A, Pei J, Tian J, Wang H, Hsam SLK, Zeller FJ. Cloning and molecular characterization of three novel LMW-i glutenin subunit genes from cultivated einkorn (*Triticum monococcum* L.) 2006(3)
16. Zhao XL, Yang Y, He ZH, Lei ZS, Ma W, Sun QX, Xia XC. Characterization of novel LMW-GS genes at Glu-D3 locus of chromosome 1D in *Aegilops tauschii* 2008(5)
17. 陈佩度, Gill BS. 四倍体小麦染色体4A和B, G染色体组的起源 1984(3)
18. Kimber G, Athwal RS. A reassessment of the course of evolution of wheat 1972(4)
19. Daud HM, Gustafson JP. Molecular evidence for *Triticum speltoides* as a B-genome progenitor of wheat 1996(3)
20. Feuillet C, Penger A, Gellner K, Mast A, Keller B. Molecular evolution of receptor-like kinase genes in hexaploid

wheat. Independent evolution of orthologs after polyploidization and mechanisms of local rearrangements at paralogous loci 2001(3)

21. Wang LH, Zhao XL, He ZH, Ma W, Appels R, Pe(n) a RJ, Xia XC Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit Glu-B3 genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.) 2009(3)
22. Gale KR, Ma W, Zhang W, Rampling L, Hill AS, Appels R, Morris P, Morrel M Simple high-throughput DNA markers for genotyping in wheat 2001
23. Masci S, D' Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda DD Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer 1998(4)
24. Lew EJJ, Kuzmicky DD, Kasarda DD Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing 1992(5)
25. Masci S, D' Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda DD A 1B coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats show strong similarity to subunits present in some bread wheat cultivars 2000(3-4)
26. Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat 2002(12)
27. Gu YQ, Coleman-Derr D, Kong XY, Anderson OD Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes 2004(1)
28. Petersen G, Seberg O, Yde M, Berthelsen K Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*) 2006(1)
29. Luo MC, Yang ZL, You FM, Kawahara T, Waines JG, Dvorak J The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication 2007(6)
30. Jauhar PP Meiotic restitution in wheat polyploids (amphihaploids): a potent evolutionary force 2007(16)
31. Liu B, Segal G, Rong JK, Feldman M A chromosome-specific sequence common to the B genome of polyploid wheat and *Aegilops searsii* 2003(1-2)
32. He XY, He ZH, Morris CF, Xia XC Cloning and phylogenetic analysis of polyphenol oxidase genes in common wheat and related species 2009(3)

相似文献(10条)

1. 学位论文 贺丹霞 普通小麦及其近缘种抗病性和胚乳贮藏蛋白多样性分析 2006

优质抗病是重要的育种目标, 遗传基础狭窄已成为制约普通小麦育种的瓶颈, 小麦近缘种和古老地方品种蕴藏可供利用的优异基因。本研究选用90年代初做过田间流行小种抗病性鉴定的种质资源79份, 涉及小麦属(*Triticum* L.)内具有A、AB、AG和ABD基因组的11个物种和山羊草属(*Aegilops* L.)的D基因组物种粗山羊草(*Ae. tauschii* Coss.)。开展了目前小麦白粉病和条锈病流行小种抗性鉴定和基因推导工作, 以及高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)组成分析和醇溶蛋白遗传多样性研究。以筛选优质抗病资源, 同时探讨不同基因组物种在抗病性和胚乳贮藏蛋白多样性方面的差异。取得以下主要结果: 1、抗性鉴定筛选出可用于普通小麦改良的有效抗锈资源, 其中野生一粒小麦B05、硬粒小麦DR3等材料高抗两种病害。具有AA基因组的材料抗性保持较好, 对AA基因组物种B03、M04和M05接种21个不同毒性的白粉病菌系, 基因推导发现其抗谱较宽, 含有未知新抗白粉病基因。对14份材料进行31个条锈病生理小种苗期基因推导, 发现B05、小白麦、老芒麦和陕西白, 高抗25个以上的小种, 含有未知抗条锈基因。构建栽培一粒小麦M04(感白粉)×M05(抗白粉)和栽培一粒小麦M04(感条锈)×野生一粒小麦B05(抗条锈)F₂分离群体, 并进行遗传分析, 结果表明, M05对E09和E21的抗性由一个显性抗白粉病基因控制(表3-6和表3-7), B05对CY32的抗性由一个隐性抗条锈病基因控制(表3-10)。对小麦近缘种和地方品种的抗病性变异进行了讨论。2、应用SDS-PAGE, 对不同基因组物种共63份材料进行: HMW-GS分析, 出现27种等位变异, 形成31种组合。Glu-A1位点共出现6种亚基类型, 以1和2' *频率最高。其中野生一粒小麦B01和B03中出现了迁移率比1亚基小的新亚基A1。Glu-B1位点出现9种亚基类型, 以7+8和6+8频率最高。具有G基因组物种出现3种变异类型。其中阿拉特小麦AR3中出现了迁移率远小于10和12亚基的新亚基G12。1. 普通小麦Glu-D1位点出现2+12和5+10两种亚基类型, 以2+12频率最高; 粗山羊草中Glu-D1位点出现了2+10和2+12. 4等多种类型。筛选出含有优质亚基的材料, 如普通小麦兴资9104具有5+10, 17+18, 栽培二粒小麦DM36含有14+15。对不同基因组物种HMW-GS的多样性及其与品质改良和基因组进化的关系进行了讨论。3、应用A-PAGE方法, 对63份不同基因组物种材料进行了醇溶蛋白遗传多样性分析, 共出现99条迁移率不同的谱带(表5-1和图5-3), 变异范围为9~30条, 总体多态性信息指数达到0.984, 以 ω 区最高, γ 和 β 次之, α 区最低。发现AA、AABB、AAGG基因组在 α 区的多态性信息指数均比小麦地方品种高, 而经过广泛杂交改良的优质抗病高代品系在 α 区多样性接近近缘种平均水平。谱带分布频率分析发现了一些基因组特异谱带, 高频带主要出现在(ω 、 γ 和 β 区, 而 α 区出现的谱带主要为低频带。聚类分析发现近缘种与普通小麦高代品系聚类有交叉, 相同基因组构成的物种没有完全聚在一起, 对小麦近缘种的醇溶蛋白分布规律及其在品质育种中的应用前景进行了讨论。比较不同基因组物种在抗病性和种子胚乳贮藏蛋白方面的多样性, 得到以下主要结论。

1、筛选出具有育种应用潜力的优质抗源, 如普通小麦兴资9104、栽培二粒小麦DM32、野生一粒小麦: M05和阿拉特小麦AR1等材料高抗两种病害, 同时含有优质HMW-GS和特异醇溶蛋白谱带。

2、发现了具有育种潜力或者与基因组进化密切相关的基因位点。在M05中发现了一个显性抗白粉病基因, 在B05中发现了一个隐性抗条锈病基因, 在B01和B03中发现了比1迁移率小的新亚基, 在AR3中发现了比10和12迁移率大的新亚基, 发现了一些物种特异或者基因组特异的醇溶蛋白谱带。

3、利用近缘种改良栽培小麦重点在于拓宽 α 区醇溶蛋白的遗传基础, 可以兼顾优质、抗病等重要目标性状。

4、小麦地方品种和小麦近缘种在抗病性、HMW-GS和醇溶蛋白谱带上都具有明显的种间、种内差异, 同时存在明显的品种内抗病性异质性和胚乳贮藏蛋白异质性。

2. 学位论文 秦建英 利用普通小麦一节一节麦八倍体将小麦近缘种染色体快速导入普通小麦的研究 1996

3. 学位论文 李少芳 小麦近缘种HMW-GS基因的克隆、表达与分子特征研究 2005

高分子量麦谷蛋白是决定小麦品质的重要因素之一。近年来, 通过遗传工程来改变小麦HMW-GS的组成已成为改良小麦品质的重要手段。小麦的近缘种中含有丰富的HMW-GS等位基因, 这些基因是小麦品质改良的宝贵基因资源。赖草属(*Leymus*)、偃麦草属(*Thinopyrum=Elytrigia*)和冰草属(*Agropyron*)都是小麦的重要近缘属, 其中的许多种已与小麦杂交成功并应用于品种改良。本研究以赖草属、偃麦草属和冰草属植物为材料, 进行了高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)组成、基因克隆和分子特征研究, 得到以下主要结果。

1、利用SDS-PAGE对赖草属的赖草(*L. secalinus*)、大赖草(*L. racemosus*)、多枝赖草(*L. multicaulis*)、毛穗赖草(*L. paboanus*)和滨麦(*L. mollis*)、偃麦草属的灯芯偃麦草(*Th. junceum*)、冰草属的冰草(*A. cristatum*, 包括二倍体、四倍体和六倍体3种倍性类型)等7个物种、9份材料的HMW-GS组成进行了分析。结果显示, 在赖草属的5个种中, HMW-GS的

分子量都较大,除了毛穗赖草中有一个亚基的迁移率与普通小麦(*Triticum aestivum*)的Bx7亚基相近外,其余亚基的迁移率都慢于Dx2亚基;在灯芯偃麦草和三种倍性类型的冰草中,HMW-GS亚基的分子量都较小,除了灯芯偃麦草中的一个亚基的迁移率与Dy12亚基相近外,其余亚基的迁移率都位于普通小麦的低分子量麦谷蛋白区。另外,由于这些野生种多为异花授粉植物,所以在不同的种子中往往表达不同数目和大小HMW-GS。

2、利用GenomicPCR方法,从上述7个小麦近缘种中克隆了20个HMW-GS基因,其中的18个基因获得了全长编码区序列。这些基因均属第一次被克隆。序列分析表明,克隆的20个HMW-GS基因中,8个属于x-型亚基基因,12个属于y-型亚基基因;18个全长编码区序列中5个具有完整的开放阅读框,其余13个在中间重复区出现终止密码子突变。基因结构分析表明,虽然这些来自小麦近缘物种的HMW-GS基因与来自普通小麦的同类基因在序列上有很高的同源性,但在中间重复区的长短、编码半胱氨酸的数目与位置等方面都有一些明显不同于普通小麦的结构特征。例如,多枝赖草的Lmox2亚基在N端只有1个Cys;滨麦的Lmoy2亚基中间重复区具有两个Cys;二倍体冰草的Bty2和Bty4的N端与已知y-型亚基的N端相比缺失了10个氨基酸序列,等等。这些结构新颖的HMW-GS等位基因在小麦品质改良中可能具有重要的应用价值。

3、具有开放阅读框的Lmox1、Lrax1和Jy基因在大肠杆菌中得到了表达产物。

4、用PCR方法从滨麦、多枝赖草、大赖草中克隆了6个HMW-GS基因启动子序列,其中4个属于y-型亚基基因的启动子,两个属于x-型亚基基因的启动子。序列对比表明,赖草属HMW-GS基因的启动子序列与小麦同类基因的启动子具有很高的同源性。4个启动子序列具有完整的调控区域,2个启动子序列在某些调控元件中有个别碱基的突变。

5、根据HMW-GS的N端序列比较,发现赖草属的Lsex1、Lpax1、Lmox1、Lmux1、Lrax1和Lmoy2亚基与偃麦草属的E(或J)基因组编码的亚基同源性很高,推测赖草属的未知染色体组Xm可能与E染色体组同源。

6、通过全长序列的比较,克隆的这些HMW-GS基因中有4个同源性很高的基因,这4组基因分别是:Lsex1、Lpax1、Lmox1、Lmux1和Lrax1;Bty1、Bfy1和Bsy1;Lpay1、Lmoy1和Bsy3;Bsy2、Bty3和Jy。各组内基因之间的同源性高达99%,甚至完全相同。

7、基于C端序列分析,发现某些y-型亚基(例如:Jy、Bty3、Bsy2、Bty1、Bty2、Bty4、Bfy1和Bsy1)并没有典型的y-型亚基的C端序列,甚至与x-型亚基更相似。推测这些介于x-型和y-型之间的亚基很可能是一种进化上较原始的类型。

8、x-型和y-型亚基的C端序列比较发现,两种类型的亚基之间主要有7个氨基酸的差别。而这7个氨基酸在x-型亚基和古老的大麦高分子量麦谷蛋白亚基中是非常保守的,而在y-型亚基中是多变的。由此推测,y-型亚基基因的C端可能是由原始的x-型亚基基因的C端通过突变的积累自然选择分化而来的。

4. 期刊论文 [英加, 陈佩度, 刘大钧, Ying Jia, Chen Peidu, Liu Dajun 将外源染色体加速导入普通小麦的研究 - 南京农业大学学报](#)

1999, 22(4)

用普通小麦-节节麦八倍体(2n=56, AABBDDDD)作母本与3种由四倍体小麦和野生二倍体物种合成的异源六倍体,即硬粒小麦-簇毛麦(2n=42, AABBVV),硬粒小麦-单芒山羊草(2n=42, AABBMMu)和波斯小麦-小伞山羊草(2n=42, AABBCCu)杂交,其杂交结实率分别为39.0%, 23.1%和10.0%。对所获F1杂种的根尖细胞染色体进行C-分带,从中选出添加有一套外源物种配子染色体的七倍体杂种,对3种七倍体杂种进行套袋自交,其自交结实率分别为4.2%, 3.7%和3.6%。在F2代中具有45条染色体的植株最多,含43和48条染色体的植株最少,并对杂种各类配子的传递规律和产生附加系的方法进行了讨论。

5. 学位论文 [安学丽 小麦近缘种谷蛋白新亚基鉴定与编码基因克隆及其分子进化分析](#) 2006

小麦谷蛋白是贮藏蛋白中的主要成分,由高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)和低分子量谷蛋白亚基(LMW-GS)两部分组成。HMW-GS与LMW-GS的含量及组成可直接影响小麦面粉的加工和烘烤品质。研究显示,粗山羊草(*Aegilops tauschii*, DD, 2n=2x=14)的Glu-1Dt位点编码的HMW-GS变异类型丰富,且大多为普通小麦中尚未发现的新类型。栽培一粒小麦(*Triticum monococcum* L., AmAn, 2n=2x=14)的Glu-1Am位点编码的LMW-GS等位基因出现的变异频率也非常高,因此从小麦近缘种中寻找新的候选优质谷蛋白基因对小麦品质改良具有重要意义。本研究以粗山羊草和栽培一粒小麦为材料,利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、等电聚焦双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(IEF×SDS-PAGE)、高效毛细管电泳(HPCE)、反相高效液相色谱(RP-HPLC)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)等多种方法对HMW-GS和LMW-GS进行分离和鉴定,然后设计等位基因特异PCR(AS-PCR)引物对其编码基因进行分子克隆、序列测定与结构比较,分析贮藏蛋白基因家族的分子进化关系和预测谷蛋白的二级结构特征,并将来自粗山羊草和硬粒小麦的HMW-GS编码基因连接到表达载体上,使其在E. coli中高效表达,初步探讨其表达特性。主要研究结果如下:

1. 粗山羊草HMW谷蛋白新亚基的分离与鉴定。利用SDS-PAGE,在粗山羊草T16、T132和T128中初步鉴定出了3个新的x-型HMW-GS,分别命名为1Dx1.6t、1Dx3t和1Dx5.2t,同时发现一些新的亚基组合,如1Dx1.6t+1Dy12.0.1t、1Dx3t+1Dy10.1t和1Dx5.2t+1Dy12t。然后采用IEF×SDS-PAGE、HPCE和RP-HPLC三种分离方法对以上新亚基和亚基组合进一步表征和鉴定。结果发现,2-DE分离除1Dy12t和1Dy10.1t亚基外,其他亚基均分离出不同的多个蛋白组分,1Dx型亚基一般包括2-4个蛋白点。同时,在HPCE图谱中,这些亚基多表现为一个主峰加1-2个副峰,由此推测这些HMW-GS可能存在蛋白质的翻译后修饰。对粗山羊草HMW-GS的RP-HPLC分析表明,1Dx亚基疏水性大于1Dy亚基,这反映了它们理化性质的不同。MALDI-TOF-MS测定的1Dx1.6t、1Dx3t和1Dx5.2t亚基的精确分子量分别为88565.8Da、86934.5Da和86651.2Da。

2. 粗山羊草HMW-GS编码基因的分子克隆、序列比较和进化分析。根据HMW-GS编码基因5'和3'端的保守序列,设计了一对扩增1Dx型亚基的AS-PCR引物,以含有新亚基的粗山羊草T16、T132和T128的基因组DNA为模板扩增,均获得了约2500bp左右的单一条带,分别回收并克隆到T-Easy载体上,DNA测序后得到1Dx1.6t、1Dx3t和1Dx5.2t亚基编码基因的全序列,分别命名为1Dx1.6t、1Dx3t和1Dx5.2t。基因1Dx3t和1Dx5.2t已登录GenBank,编号为DQ307383和DQ307384。

1Dx1.6t、1Dx3t和1Dx5.2t的DNA序列全长为2541bp、2514bp和2514bp,以ATG起始密码子开始,双终止密码子TGATAG结束,分别编码845个、836个和836个氨基酸残基。推导的氨基酸序列具有典型的HMW-GS的序列特征,由21个氨基酸的信号肽、89个氨基酸的N-端(3个Cys)、3肽、六肽和九肽构成的中央重复区和42个氨基酸的C-端(1个Cys)四个部分组成。氨基酸序列比较显示:1Dx5.2t与优质亚基1Dx5的相似性较高,都含有5个Cys,1Dx5.2t亚基的额外Cys位于重复区第278位,此外预测的二级结构中β转角的含量均较高,因此该基因很有可能是优质候选基因。1Dx1.6t和1Dx3t亚基氨基酸序列推导的成熟蛋白的分子量,均比质谱测得的种子中亚基的精确分子量小,其差异在270.3-787.5Da之间,进一步表明这些x-型HMW-GS亚基可能存在翻译后修饰,如糖基化或磷酸化等。另外,三个亚基基因序列中存在着丰富的单核苷酸多态性(SNPs),共检测到29个SNPs,其中有义突变为63%,多数为谷氨酰胺/甘氨酸→精氨酸突变。进化分析表明:来自粗山羊草的x-型亚基与普通小麦中的1Dx亚基同源性很高,基因和氨基酸序列的相似性达到97%-99%。

3. 克隆基因的原核表达。设计两对不含有信号肽的表达引物,分别扩增硬粒小麦Simeto中的y-型亚基基因1By8和粗山羊草的1Dy12.2t(已由本实验室克隆)及x-型亚基基因1Dx1.6t、1Dx3t和1Dx5.2t,扩增片断克隆到表达载体pET28a或pET30a上,转化表达菌株BL-21(DE3)pLysS与Rosetta(DE3)pLysS。IPTG诱导后,以上五个HMW-GS编码基因均在E. coli中获得了高效表达。SDS-PAGE分析表明,体外表达的蛋白与种子中的HMW-GS迁移率基本相同。Western检测显示,E. coli中表达的蛋白和种子蛋白均与HMW-GS多克隆抗体出现较强的杂交信号。这些体外表达的蛋白纯化后,可进行亚基功能的进一步鉴定。

4. 栽培一粒小麦LMW-GS编码基因的鉴定、分子克隆与进化分析。通过SDS-PAGE,在栽培一粒小麦Mo-M1、Mo-M3和Mo-M5中鉴定出三个新的LMW-GS,命名为LMW-M1、LMW-M3和LMW-M5。利用MALDI-TOF-MS获得了它们的精确分子量。以一对LMW-GS的AS-PCR引物对编码基因进行扩增,测序后得到完全DNA序列,包括上游、开放阅读框和下游,均无内含子。根据推导出的氨基酸序列,三个基因即LMW-M1、LMW-M3、LMW-M5均编码LMW-i型亚基,分子量在38520.6Da-38720.8Da之间,小于质谱测定的分子量。三个基因已登录GeneBank,编号为DQ307388、DQ307389和DQ345449。氨基酸序列比较显示,它们与普通小麦中已克隆的LMW-i型亚基具有较高的相似性,但同时也具有独特的特征。尤其在LMW-M5基因的C-端,除了含有8个保守的半胱氨酸残基之外,还发现一个额外半胱氨酸残基。这是首次报道的含有九个半胱氨酸残基的LMW-i型亚基,半胱氨酸残基的增加会提高谷蛋白的粘弹性,因此LMW-M5可能为优质亚基。LMW-GS二级结构预测显示:N-端保守区和中央重复区的氨基酸大部分或全部形成β转角或无规则卷曲;C-端保守区氨基酸则主要形成α螺旋、β折叠和β转角;四种构象单元中,α螺旋和β折叠含量很少,β转角较多。此外,在三个基因中共发现25个SNPs和一个插入缺失(InDel)s突变。分子进化分析表明:LMW-i型基因与LMW-m和LMW-s型基因差异较大,从LMW-GS基因家族中分化出来的时间较早,大约在12.92亿年前,而Am和A基因组的分化时间为3.98亿年前。

6. 学位论文 [王彩华 普通小麦-中间偃麦草抗条锈病基因簇的克隆与鉴定](#) 2006

小麦条锈病是由小麦条锈菌引起的世界性重要的低温型病害,是限制小麦生产的重要因素之一。中国是世界上最大的小麦条锈病流行区,是我国黄淮及长江流域小麦的主要病害。小麦条锈菌专化性强,生理小种变异快,随着新的条锈菌生理小种的产生,已有抗病基因不断“丧失”抗性,需要寻找和引进新的抗条锈基因,以不断改进和提高小麦栽培品种的抗病性,满足生产需要。小麦近缘种中含有丰富的抗病基因。中间偃麦草(*Thinopyrum intermedium*, 2n=42)是小麦中一个野生近缘种,具有多花、多实、优质、耐低温、抗病(锈病、黄矮病、条纹花叶病、白粉病)等诸多优良性状特点,易与小麦杂交,被广泛用于小麦育种研究中。42是由普通小麦与中间偃麦草合成的双二倍体,含有新的抗条锈基因,将中4与普通小麦杂交,将中4携带的抗条锈基因转移到普通小麦中,创建小麦新种质,具有重要理论与现实意义。

本研究采用回交转育方法,通过对普通小麦中国春Ph1b突变体与无芒中4杂交、回交转育所获得的F₂>5代或F₂<6>代材料进行苗期抗条锈性鉴定,并以抗病亲本中4和感病亲本中国春作对照,从90个株系中选出19个对小种CY31表现为免疫或高抗的株系,3年鉴定结果一致,而轮回亲本中国春对CY31表现高感,表明中4所携带的中间偃麦草的抗条锈基因已导入到普通小麦中国春中,且抗性基因表达有效和抗性稳定。

对这19个抗性稳定株系进行了根尖体细胞有丝分裂中期的染色体镜检。结果显示,镜检株系的染色体数目均为偶数,即分别为2n=42, 44, 46, 48等,从中筛选到1个染色体数为2n=44的株系(编号为4-2-2-4-2)和1个染色体数为2n=42的株系(编号为4-2-2-4-4)。初步推测株系4-2-2-4-4为普通小麦,中间偃麦草附加系,株系4-2-2-4-2为普通小麦,中间偃麦草异位系。

采用原位杂交技术,以生物素标记的中间偃麦草DNA为探针,以中国春DNA为封闭,进行了荧光原位杂交。结果表明,株系4-2-2-4-2中有2条染色体完全显示绿色荧光,故判定来自中间偃麦草的染色体,从而证实该株系为普通小麦-中间偃麦草附加系;株系4-2-2-4-4的染色体数为2n=42条,其中有2条染色体显示绿色荧光,判定这2对染色体被中间偃麦草的染色体所替换,证实该株系为小麦-中间偃麦草异位系。田间农艺性状观察表明,附加系田间株高为73cm,综合性状良好,异位系的株高为65cm,综合性状很好。建议作为抗条锈育种的抗源加以利用。采用RAPD技术,对所获得的异位系及其小麦亲本进行了RAPD分析,从35个随机引物中筛选出1个特异性引物,序列为5'-GGGCCACTCA-3',该引物在抗性亲本中4和异位系中均能稳定扩增出一条约1500bp左右的片段,而亲本中国春中则没有该带,有待于确定与抗性的连锁性。

7. 期刊论文 [刘建辉, 荆奇, 石祖梁, 姜东, 曹卫星, 戴廷波, LIU Jian-hui, JING Qi, SHI Zu-liang, JIANG Dong, CAO Wei-xing, DAI Ting-bo](#)

小麦不同近缘种籽粒蛋白质积累及其关键酶活性的研究 - 麦类作物学报 2007, 27(6)

为明确小麦不同近缘种籽粒蛋白质积累的演进规律,以二倍体野生一粒小麦(*T. boeoticum*)、栽培一粒小麦(*T. monococcum*)、节节麦(*Ae. tauschii*)和藜麦(*S. cereale*)、四倍体野生二粒小麦(*T. dicoccoides*)、栽培二粒小麦(*T. dicoccum*)和硬粒小麦(*T. durum*)、六倍体普通小麦(*T. aestivum*)扬麦9号、豫麦34和扬麦158为材料,采用盆栽试验研究了小麦不同近缘种籽粒蛋白质积累的动态变化及相关酶活性的差异。结果表明,与六倍体普通小麦相比,二倍体和四倍体材料籽粒产量和蛋白质产量低,但蛋白质含量高,其灌浆初期氮代谢能力较强,硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸丙酮酸转氨酶(GPT)活性较高,蛋白质积累速度快;除藜麦外,其他二倍体和四倍体材料蛋白质合成关键酶活性下降早而快;在灌浆中后期低于普通小麦,蛋白质积累的功能期较短。因此,普通小麦灌浆后期较高的氮代谢酶活性和较长的持续期是提高籽粒产量和蛋白质合成的重要生理原因。

8. 学位论文 [何心尧 普通小麦及其近缘种籽粒多酚氧化酶活性与黄色素含量相关基因的克隆与功能标记开发](#) 2008

颜色性状是小麦品质评价的重要指标, 对面制品的表观色泽有着重要影响, 研究面粉颜色性状形成的分子机理对于小麦品质改良具有重要意义。本研究选用217份中国冬麦区的主栽品种、342份CIMMYT春麦材料、100份CIMMYT硬粒小麦品种以及47份小麦近缘种材料, 以籽粒多酚氧化酶(polyphenoloxidase, PPO)活性与黄色素含量为目标性状, 应用电子克隆结合PCR扩增的方法, 克隆与颜色性状紧密相关的PPO和八氢番茄红素合成酶(Phytoenesynthase, PSY)基因并分析其在不同品种中的等位变异, 根据各等位基因之间的序列差异开发可用于分子标记辅助选择的功能标记, 并分析了这些材料基因型与表型之间的关系。

主要结果如下:

1. 克隆了普通小麦2A和2D染色体上的PPO基因Ppo-A1与Ppo-D1的全长编码序列, 两者均含有3个外显子和2个内含子以及一个1731bp的开放读码框。针对Ppo-D1位点的等位变异epo-D1a和Ppo-D1b分别开发了显性标记PP016和PP029。通过对217份中国冬小麦品种的检测, 发现PP016所扩增的713bp条带与低PPO活性相关, 而PP029扩增的490bp条带与高PPO活性相关。应用中国春缺体-四体及双端体材料, 将PP016定位在2DL染色体。在中优9507/CA9632的71个DH系中, 将PP016与PP029定位在2D染色体的长臂上, 并与2DL染色体上的SSR标记Xwmc41紧密连锁, 遗传距离为2cM。在该DH群体中进行QTL分析, 检测到了一个与PP016和PP029共分离的主效QTL, 在3个不同环境中可解释9.6~24.4%的表型变异。根据Ppo-A1两个等位变异的序列差异设计了一个共显性标记PP033, 可以与标记PP016在同一体系中扩增, 构建多重PCR体系。

2. 根据普通小麦Ppo-A1和Ppo-D1的基因序列设计引物, 在普通小麦的近缘种中鉴定并克隆了7个新的等位变异。其中5个来自于Ppo-A1位点, 即印Ppo-A1C(来自于乌拉尔图小麦)、Ppo-A1d(野生一粒小麦)、Ppo-A1e,(栽培一粒小麦和硬粒小麦)、Ppo-A1f(野生二粒小麦)和Ppo-A1g(硬粒小麦); 2个来自于Ppo-D1位点, 即印Ppo-D1c和Ppo-A1d(均来自于粗山羊草)。这7个新等位变异与普通小麦中的4个等位变异具有相似的基因结构, 即均含有3个外显子和2个内含子, 并且除Ppo-A1g和Ppo-D1d以外的9个等位变异都含有一个1731bp的开放读码框, 编码577个氨基酸的多肽链。Ppo-A1g的下游序列在本实验中没有克隆到; 在Ppo-D1d的第三外显子处有一段73bp缺失, 导致移码突变和翻译提前终止, 产生一段较短的466个氨基酸的多肽序列。

3. 以玉米八氢番茄红素合成酶(Phytoenesynthase, PSY)基因PSY1的mRNA序列为探针, 获得了普通小麦7A染色体上PSY1基因Psy-A1的全长序列。Psy-A1的基因组DNA序列由4175个碱基对组成, 包括6个外显子和5个内含子, 以及部分5'和3'非翻译区, 并含有一个1284bp的开放读码框, 编码一段428个氨基酸残基的多肽链。在217份中国冬麦材料和342份CIMMYT春麦材料中发现了Psy-A1的3个等位变异, Psy-A1a、Psy-A1b和Psy-A1c根据Psy-A1a和Psy-A1b以及Psy-A1a和Psy-A1c的序列差异分别开发了共显性标记YP7A和YP7A-2。YP7A在Psy-A1a类型材料中的194bp扩增片段与高黄色素含量相关, 而在Psy-A1b材料中扩增的231bp片段则与低黄色素含量相关。在RLL群体PH82-2/内乡188中, YP7A被定位于7AL染色体, 与SSR标记Xwmc809连锁, 遗传距离为5.8cM。将一个控制黄色素含量的主效QTL定位在这一区段上, 并与YP7A共分离, 在不同环境中可以解释20.0~28.0%的表型变异。

4. 参照Psy-A1的序列特征并结合电子克隆方法, 在217份中国冬麦材料和342份CIMMYT春麦材料中鉴定并克隆了7B染色体Psy-B1位点的5个等位变异, 即Psy-B1a、Psy-B1b、Psy-B1c、Psa-B1d和Psy-B1e。其中Psy-B1a、Psy-B1b和Psy-B1c在中国冬麦材料中的比例分别为39.6%、43.8%和15.7%; Psy-B1a、Psy-B1b和Psa-B1d在CIMMYT春麦材料中的比例分别为50.6%、29.2%和19.6%; 而Psy-B1d和Psy-B1e在中国冬麦材料和CIMMYT春麦材料中只分别检测到2例。根据Psy-B1a和Psy-B1b的序列多态性开发了共显性标记YP7B-1其在Psy-B1a材料中扩增的151bp片段与高黄色素含量相关, 而在Psy-B1b中扩增的156bp的片段则与低黄色素含量相关。根据Psy-B1c的特异序列开发了显性标记YP7B-2, 其428bp的扩增片段与高黄色素含量相关。根据Psy-B1d和Psy-B1e的序列分别设计了显性标记YP7B-3和YP7B-4, 可分别扩增出884bp和717bp的片段。用标记YP7A、YP7B-1和YP7B-2检测217份中国冬麦材料, 表明不同基因型的黄色素含量差异达到1%显著水平。在这个基础上, 再结合1B-1R易位系的检测, 则可在更大程度上提高基因型和表型的吻合程度。然而, 基于Psy-B1基因开发的分子标记在CIMMYT春麦材料中却没有表现出与表型性状的显著相关, 进一步分析显示这些材料的黄色素含量主要受Psy-A1和1B-1R两个位点的调控, 应用这两个位点的分子标记即可对黄色素含量做出比较准确的预测。

5. 在硬粒小麦7A染色体Psy-A1位点鉴定并克隆了Psy-A1d和Psy-A1e的全序列, 可以用标记YP7A或YP7A-2来区分; 在硬粒小麦7B染色体Psy-B1位点鉴定并克隆了Psy-B1e、Psy-B1f和Psy-B1g的全序列, 其中Psy-B1e为普通小麦和硬粒小麦共有, 其它两个为硬粒小麦特有。等位变异Psy-B1f和Psy-B1g可以用共显性标记YP7B-1区分, Psy-B1e可以用显性标记YP7B-4检测。通过对100份CIMMYT硬粒小麦材料的检测, 发现YP7B-1在Psy-B1f中扩增的151bp片段与高黄色素含量相关, 而在Psy-B1g材料中扩增的153bp片段与低黄色素含量相关。

6. 应用本文克隆到的PPO和PSY1基因的等位基因序列分别构建了两个系统发育树。根据系统发育树的拓扑结构, 并参考各个等位变异的序列特征, 分析了普通小麦及其近缘种Ppo-A1、Psy-A1和Psy-B1位点各等位变异的进化关系, 认为普通小麦有2个或2个以上四倍体祖先; 分析了ppD-D1位点等位变异, 认为普通小麦有2个粗山羊草供体。两个基因的结果互相支持和补充, 支持小麦起源的多次多倍体化理论, 即普通小麦是由不同的栽培二粒小麦和粗山羊草系经多次六倍体化形成的。

9. 学位论文 [王嘉瑞 普通小麦—中间偃麦草抗条锈病异代换系的选育与鉴定 2008](#)

我国是世界上最大的小麦条锈病(*Puccinia striiformis* Westend f. sp. *tritici*)流行区, 抗病品种选育与利用是控制该病害最经济、安全、有效的方法。小麦近缘种中间偃麦草是小麦遗传改良的重要基因源, 对条锈病菌有很好的抗病性。本研究采用常规杂交并辅抗鉴定等方法, 以中国春ph1b突变体为轮回亲本, 利用无芒中4, 转育中间偃麦草的抗条锈性, 并通过细胞学和DNA原位杂交检测, 鉴定和筛选普通小麦—中间偃麦草的抗条锈病异代换系或易位系。研究结果如下:

1. 在已有工作基础上, 在田间对86个普通小麦—中间偃麦草转育后代(BC2F7)各品系的株高、成熟期等农艺性状的综合表现进行系统观测与评价, 筛选出20个农艺性状综合表现相对较好的品系, 即P13、P30、P38、P54、P55、P58、P59、P64、P65、P66、P67、P68、P69、P71、P78、P88、P89、P90、P91、P92。

2. 用我国当前毒性频率较高的小麦条锈菌流行小种条中32号(CY32)和水源II致病类型14(Su-14), 对筛选的品系在苗期分小种抗条锈性鉴定, 筛选出对两菌系均抗病的P55、P58、P64、P67品系和只对Su-14抗病的P13、P54、P59、P66、P69品系, 表明中4带有抗条锈性的染色体(质)已转移到这些品系中, 且抗性表达有效; 导入到P55、P58、P64、P67中兼抗Su-14和CY32的抗条锈病基因与导入到P13、P54、P59、P66、P69中抗Su-14的基因不同。

3. 通过体细胞染色体镜检, 筛选出29个染色体数均为 $2n=42$ 的株系, 即单P13-1-1、单P13-1-2、单P30-1-2、单P30-1-3、单P38-1-1、单P38-2-1、单P58-1-1、单P58-2-2、单P69-2-1、单P69-2-2、P67-2-3、单P67-2-15和单P67-1-1~17, 并显示各品系体细胞染色体数均为偶数, 且每个品系所选株系的镜检单株染色体数均相同, 说明这些株系的核型已稳定遗传。

用地高辛标记中间偃麦草总DNA作为探针, 以中国春ph1b突变体DNA为封阻, 染色体原位杂交检测显示, 单P67-1-12-2-2、单P58-1-001和单P38-2-005株系染色体数为 $2n=42$, 且其各有2条染色体来自中间偃麦草, 为普通小麦—中间偃麦草的抗条锈病二体异代换系。

4. 采用AFLP技术, 分析异代换系单P67-1-12-2-2、单P67-1-12-2-3及其亲本中4和中国春ph1b突变体基因组DNA, 筛选出1对引物(P-ACA/M-CCA)能在异代换系基因组DNA上稳定扩增出特异DNA产物, 为进一步分子标记研究奠定了基础。

10. 期刊论文 [陈军营, 冯林剑, 舒文涛, 台国琴, CHEN Jun-ying, FENG Lin-jian, SHU Wen-tao, TAI Guo-qin 小麦及其近缘种间杂交的不亲和性及其F1籽粒性状研究 -河南农业科学2006, "" \(12\)](#)

采用人工去雄和授粉的方法研究了普通小麦、硬粒小麦、小黑麦、黑麦间不同杂交组合的结实率及其F1籽粒的形态差异。结果表明: 不同亲本间杂交的不亲和性表现在授粉、受精及合子或种子发育的不同阶段, 从而导致受精困难或杂种胚过早败育, 或形成正常的杂交种子, 但籽粒变小, 表现为远缘杂交结实率的高低及籽粒形态差别很大。并讨论了远缘杂交的重要性和复杂性, 提出了远缘杂交不亲和性分子机理的研究方法。

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_yc201006013.aspx

授权使用: 颜蕴(wfzgnyk11), 授权号: 5984fa7e-2497-4540-8f0c-9e3100baa13f

下载时间: 2010年11月17日