

小麦及其近缘种 WFL 基因的克隆及序列分析

杨建涛 指导教师: 宋卫宁

摘要 以小麦及其近缘种为材料, 对 WFL 基因进行了克隆和多序列比对, 构建了系统进化树。结果表明所得的几个序列与 GeneBank 中已知序列的同源性至少在 95%以上, 多序列比对结果显示克隆得到的序列之间的相似性很高, WFL 基因的突变符合中性突变, 在小麦及其近缘种之间 LFY/FLO 同源基因的保守性很高, 根据已知序列构建的系统进化树与我们目前所认知的小麦亲缘关系一致。

关键词 小麦及其近缘种; WFL 基因; 克隆; 序列分析

LFY 基因在植物成花过程中有着十分重要的作用。首先, 它能协同其他成花相关基因抑制分生组织的营养性发育。LFY 基因更关键的作用是参与花分生组织形成, 正常功能的保持到防止花分生组织逆转的整个过程。它参与促进花分生组织的形成和花分生组织属性的控制, 维持花分生组织的正常功能、花启动、防止花分生组织的逆转等。除此之外, LFY 基因还参与活化花器官属性基因, 以及花分生组织属性的决定, 花分生组织的进一步发育等方面。LFY 基因在成花中的作用并不局限于调控开花时间和花转变, 而是在花序和花发育的各个阶段中都起着作用。LFY 基因与数十种的开花时间调控相关基因间存在相互作用, 构成了一个基因调控网络。而 LFY 在小麦中的同源基因 WFL 与小麦小穗发育有关, 进一步的研究表明 WFL 基因在内稃的发育过程中起着重要作用^[1]。植物中 LFY 同源基因的研究在分子进化领域具有重要意义。进行 WFL 基因的研究有利于弄清小麦成穗甚至种子形成的分子机理, 以及为小麦起源及驯化过程提供更多的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1) 普通小麦材料: Chinese Spring 晋麦 47 野生二粒小麦材料: Mt Hemon96
硬粒小麦材料: Coerulescens AC03 粗山羊草材料: 2-4
- 2) 转化受体菌株为 DH5 α , 克隆载体为 pMD18-T Simple Vector(TaKaRa 公司)。
- 3) 试剂 CTAB 提取液, TaKaRa TaqTM 酶, TAE 电泳缓冲液, 琼脂糖(Gene Tech 公司), 6 \times Loading Buffer, DL2000 DNA Marker,DMSO(二甲亚砜), 安徽优品生物工程有限公司 H.Q.&Q.凝胶回收试剂盒 II, 安徽优品生物工程有限公司质粒小量提取试剂盒, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 小麦及其近缘种总 DNA 的提取 2007 年 3 月 10 日在农学院标本区利用冰盒速冻取样, 液氮破碎研磨, 使用改良 CTAB 法提取供试材料总 DNA 并借助 0.8%琼脂糖凝胶电泳和 ND-1000 核酸蛋白检测仪对总 DNA 进行检测。

1.2.2 引物设计及 PCR 扩增 以 Genebank 中已知 WFLb cDNA 序列(登陆号: AB231889)设计 PCR 特异引物 P1: 5' CGTCTCGTGTCTCGTGCATGGAT 3' P2: 5' ACTGCACCTGGAGCAGGAAGA 3'。以普通小麦材料 Chinese Spring、晋麦 47, 野生二粒小麦材料 Mt Hemon96, 硬粒小麦材料: Coerulescens AC03 和粗山羊草材料 2-4 的总 DNA 为模板, 以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增, 反应体系为 20 μ l, 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 45s、64 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 90s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C forever。

1.2.3 PCR 产物的回收、连接及转化 目的基因 DNA 片段从琼脂糖凝胶上的回收使用安徽优品生物工程有限公司 H.Q.&Q.凝胶回收试剂盒 II 回收, 操作按照试剂盒说明书进行。采用 TaKaRa 公司的 pMD18-T Simple Vector 与目的片段进行连接, DH5 α 菌株为受体细胞进行转化。

1.2.4 重组质粒的筛选和鉴定 用 M13 引物对提取的重组质粒 DNA 进行 PCR 扩增鉴定。

1.2.5 序列的测定 重组质粒经纯化后, 由陕西省农业分子生物学重点实验室生物技术中心进行测序。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

以普通小麦材料 Chinese Spring、晋麦 47，野生二粒小麦材料 Mt Hemon96，硬粒小麦材料：Coerulescens AC03 和粗山羊草材料 2-4 的总 DNA 为模板，以 P1、P2 为引物进行扩增，所有模板的扩增产物大约为 850bp，比预期片段 100bp 左右。Genebank 中的 WFLb 序列为 cDNA 序列，而本次扩增的模板为基因组 DNA，所以所扩增出的序列中大约含有 100bp 的内含子序列。

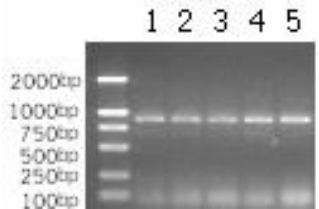


图 1 目的条带特异性扩增凝胶电泳检测结果，Marker 为 DL2000。 1-5 分别为中国春、晋麦 47、Mt Hemon96、Coerulescens AC03 和粗山羊草

2.2 小麦及其近缘种间 WFL 基因序列的同源性比较

将得到的 5 个基因片段的序列经校正后分别提交美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中的 Nr(核酸数据库 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)做 BLAST 同源性搜索，结果见表 1。

所测定的普通小麦、野生小麦、硬粒小麦和粗山羊草的 WFL 序列与 GeneBank 中已报道的中国春 A、B、D 染色体组上的 WFL 序列登陆号分别为 AB231888、AB231889、AB231890 同源性均在 95% 以上。其中从晋麦 47、Mt Hemon96 和 Coerulescens AC03 三个材料中克隆到的序列与中国春 B 染色体组上的 WFL 基因的同源性较高，而从粗山羊草中克隆到的序列与中国春 D 染色体的 WFL 基因的同源性较高，此结果恰好符合普通小麦中 D 染色体的进化来源。

表 1 小麦及其近缘种间的 WFL 序列的同源性比较

	AB231888	AB231889	AB231890
晋麦 47	96%	100%	96%
Mt Hemon96	95%	99%	95%
Coerulescens AC03	95%	100%	95%
粗山羊草	97%	95%	99%

2.3 小麦 WFL 基因序列的碱基组成

在所得到的 5 条 WFL 基因序列中 T、C、A、G 四种碱基组成的平均含量见表 3-2。

其中 C 碱基最高 (35.4%)，G 次之 (29.2%)，T 居第三位 (17.7%)，A 最低，仅为 16.4%。除粗山羊草与其他材料差异较大外，其他各种类型间只有略微的差异。G+C 的平均含量为 65.9，A+T 含量为 34.1。说明在各种麦类中 WFL 基因富含 G+C,表现出碱基的偏倚性。

表 2 小麦及其近缘种 WFL 序列的碱基组成

	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)
中国春	17.6	36.4	16.4	29.6	34.0	66.0
晋麦 47	17.2	36.0	17.0	29.8	34.2	65.8
Mt Hemon96	17.0	36.0	17.1	29.9	34.1	65.9
Coerulescens AC03	17.7	37.2	16.1	29.0	33.8	66.2
粗山羊草	19.5	37.6	15.2	27.7	34.7	65.3
Avg.	17.7	36.7	16.4	29.2	34.1	65.9

2.4 不同材料间的遗传距离

取各种材料的一致序列，用双参数模型计算各材料间的遗传距离，并估计其标准差，得到的各材料间的遗传距离见表 3，粗山羊草与其它小麦间的遗传距离最大 (0.077-0.085)，其次是野生小麦 Mt Hemon96 (0.011-0.085)，两个普通小麦材料中国春与晋麦 47 间的遗传距离最短。此处遗传距离

的计算主要反映不同材料间碱基差异的多少，计算过程中未考虑插入与缺失。此次研究的 5 个材料间的平均遗传距离为 0.037。

表 3 小麦及其近缘种间的遗传距离

	中国春	晋麦 47	Mt Hemon96	CoerulescensAC03	粗山羊草
中国春		0.003	0.005	0.004	0.013
晋麦 47	0.004		0.005	0.003	0.012
Mt Hemon96	0.015	0.011		0.005	0.011
Coerulescens AC03	0.007	0.008	0.011		0.012
粗山羊草	0.081	0.077	0.085	0.077	

上三角为标准误，下三角为 Kimura 2-Parameter 距离

2.5 WFL 基因序列中性检验

对分析的各材料中的序列用 Tajima’s D 值进行中性检验，同时将 5 个材料每三个作一次 Tajima's Test，其 P 值均大于 0.1，符合中性突变。

表 4 小麦及其近缘种 WFL 序列的 Tajima’s D 值中性检验

No. of Sequences	S	pS	pi	a1	a2	Theta	Diff	s. e.
D								
5	48	0.088	0.0355	2.083	1.423	0.042	-3.640	
3.05493	- 1.19152							

2.6 多序列比对

由供试的 5 个材料的 WFL 序列与 Genebank 中的中国春 B 染色体组上的 WFL 序列相比较可得到 WFL 基因的一段长度为 93bp 的内含子序列，所得到的内含子符合 GT---AG 规律，各材料的内含子长度相等。可以看出小麦及其近缘种 WFL 基因序列的差异很小。与 Genebank 中 WFL 基因编码的蛋白质序列比较分析可知 WFL 基因从第 16 个碱基开始编码氨基酸序列。（多序列比对图略）

2.7 系统进化树的构建

取小麦及其近缘种及同科水稻、兰科植物的一致序列，用 MEGA3.0 软件中的 NJ 法构建系统进化树如图 1，使用 bootstrap 法对进化树进行评估。

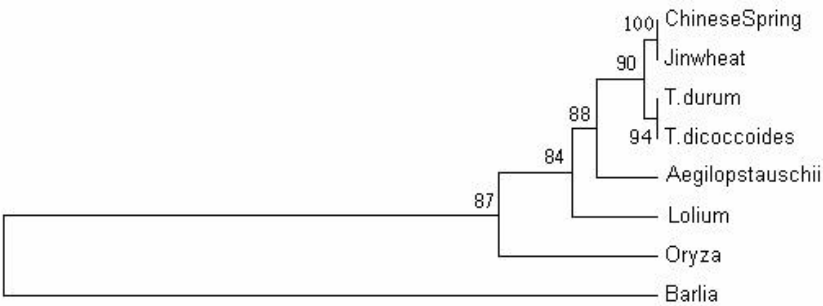


图 2 小麦及其近缘种及同科植物水稻、兰科植物一致序列构建的系统进化树
系统树分支处的数值代表系统进化树的稳定程度

3 讨论

首先笔者 PCR 扩增产物片段的大小分析及多序列比对结果发现普通小麦、野生二粒小麦、硬粒小麦及粗山羊草 WFL 基因上均含有一段长度为 93bp 的内含子序列，且符合 GT---AG 规律。其次中性检验表明小麦及其近缘中间 WFL 基因上的突变为中性突变，其中存在单核苷酸多态性位点。序列分析比表明 WFL 基因序列碱基组成表现出明显的 GC 偏倚性。遗传距离计算结果显示粗山羊草的 WFL 基因与普通小麦、野生二粒小麦和硬粒小麦的序列差异较大。最后利用系统进化树体现了小麦及其近缘种及同科水稻、兰科植物 LFY 同源基因进化距离。为小麦成穗分子机理的研究及利用基因工程手段进行花期调控打下了一定的理论基础。

参考文献（略）