

TaMyb2-II 基因在普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 及其近缘种中的单核苷酸多态性分析

王爱萍^{1,2} 毛新国² 景蕊莲^{2,*} 昌小平² 杨武德¹

(¹山西农业大学农学院,山西太谷 030801; ²中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室,北京 100081)

摘要:以 39 份抗旱性不同的普通小麦、5 份 A 基因组材料、4 份拟斯卑尔脱山羊草 (*Aegilops speltoides*)、6 份粗山羊草 (*A. tauschii*) 和 2 份四倍体小麦为材料,分析 *TaMyb2* 基因的核苷酸序列长度多态性和单核苷酸多态性,及其与抗旱性的关系。结果发现, *TaMyb2* 在 A 基因组材料中无目标片段扩增,在其他材料中共检测到 I、II、III 3 种类型序列。经详细分析, *TaMyb2-II* 序列长 1 606 bp,在供试材料 77 088 bp 的核苷酸序列中检测到 34 个单核苷酸变异,其中 26 个 SNP,8 个 InDel,二者出现的频率分别为 1/2 965 bp 和 1/9 636 bp,编码区 π 值 (0.000 55) 小于非编码区的 π 值 (0.001 85),说明编码区的遗传变异小于非编码区的遗传变异。从 SNP 水平上分析,发现普通小麦与其 D 基因组供体种粗山羊草及四倍体小麦的亲缘关系较近,与 B 基因组供体种拟斯卑尔脱山羊草的亲缘关系较远。48 份材料的 *TaMyb2-II* 序列共分为 18 个单倍型 (haplotype),其中 haplotype 2.3.5.6.8.9 均为旱地栽培的普通小麦品种,说明普通小麦 *TaMyb2-II* 的这几个 haplotype 结构可能与抗旱性有关。

关键词: *TaMyb2-II*; 单核苷酸多态性; 普通小麦; 近缘种; 抗旱性

中图分类号: S512

Single Nucleotide Polymorphism of *TaMyb2-II* Gene in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Its Relatives

WANG Ai-Ping^{1,2}, MAO Xin-Guo², JING Rui-Lian^{2,*}, CHANG Xiao-Ping² and YANG Wu-De¹

(¹Agronomy College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi; ²National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Drought is one of the major elements affecting the yield of wheat, one of the most important crops in arid and semi-arid areas. Mining pivotal drought-resistant genes and probing their polymorphisms is a feasible approach to decipher crops' drought resistance. The genes involved in drought resistance are classified into two classifications, functional genes and regulatory genes, based on their functions responding to water deficient. Much attention has been paid to regulatory genes because of their crucial roles in drought resistance. *AtMyb2* regulates the expression of dehydration-responsive genes *rd22* and *AtADH1* in plants. Recent studies indicate that *TaMyb2* is involved in response to water stress in common wheat, but whether its polymorphisms associated with drought resistance is still unclear. To probe the polymorphisms of *TaMyb2* gene and uncover their functions in drought resistance, a total of fifty-six accessions, including thirty-nine common wheat cultivars with different drought resistance, five species with A genome including three *T. urartu*, one *T. monococcum* and one *T. boeoticum*, four *A. speltoides*, six *Ae. tauschii* and two tetraploid wheat species, were selected to perform the research. The PCR amplification showed that *TaMyb2* was detectable in all accessions except A genome species. Based on the genomic sequences, *TaMyb2* was classified into 3 types named as *TaMyb2-I*, *TaMyb2-II* and *TaMyb2-III*, respectively.

·基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2004CB117202)。

作者简介: 王爱萍 (1973-), 女, 在读博士, 研究方向: 小麦抗旱相关基因的多态性。E-mail: dqwap110@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 景蕊莲, 研究员, 研究方向: 作物抗旱分子生物学。Tel: 010-62186706; E-mail: jingr1@caas.net.cn
Received (收稿日期): 2006-01-26; Accepted (接受日期): 2006-05-25.

The full-length sequence of *TaMyb2-11* genomic DNA was 1 606 bp. Twenty-six SNPs (single nucleotide polymorphism) and eight InDels (insertion-deletion) were identified in 77 088 bp nucleotide acid sequence of 48 accessions, and the frequencies of SNP and InDel were 1/2 965 bp and 1/9 636 bp, respectively. The frequency of SNP in coding region ($\pi = 0.000 55$) of *TaMyb2-11* was lower than that in noncoding region ($\pi = 0.001 85$), the ratio of Ka/Ks was 0.32 which seemed to suggest *TaMyb2-11* suffered artificial selection pressure and was very conservative. Phylogenetic analysis demonstrated that the relationship between *Ae. tauschii* and common wheat was much closer than that between *Ae. speltoides* and common wheat. Eighteen haplotypes were detected in 48 accessions, in which haplotype 2, 3, 5, 6, 8 and 9 were common wheat cultivars with drought resistance, which indicated that these haplotypes might relate to the drought resistance of common wheat.

Key words: *TaMyb2-11*; Single nucleotide polymorphism; Common wheat; Relative; Drought resistance

干旱、高盐、冷害等非生物胁迫是影响作物产量的主要逆境因子,其共同特征是导致植物体内水分亏缺。植物受到水分胁迫时会发生一系列生理生化反应来应答逆境,首先是对逆境信号的传导。水分胁迫应答基因的表达调节有4种信号途径,其中2种为ABA依赖型,2种为非ABA依赖型。许多转录因子基因,包括Myb转录因子在胁迫反应中参与ABA依赖型的信号传导。转录因子通过调节生长发育过程中外部形态和生理变化发挥重要作用^[1-3]。拟南芥中有1 500个转录基因^[4],Myb是转录因子中最大的家族。AtMyb2是拟南芥Myb家族中的一个重要成员,受干旱、高盐和ABA诱导,能与干旱反应元件结合调节干旱诱导基因*rd22*和低氧诱导的乙醇脱氢酶基因*AlADH1*的表达^[5-7]。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是指基因组中单个核苷酸的变异。插入-缺失(insertion-deletion, InDel)指单个核苷酸或DNA片段的插入或缺失。广义SNP包括InDel,是最丰富的遗传变异。基因编码区的SNP可能导致基因功能的改变。郝岗平等通过测定*CBF4*基因序列,对17个生态型拟南芥作了单核苷酸多态性与分子进化^[8]、抗旱表型^[9]的相关分析,发现拟南芥*CBF4*基因的SNP标记与抗旱性具有一定的相关性。Mauricio等研究发现,27个不同拟南芥生态型抗病基因*Rps2*序列变化引起它们抗病性的差异^[10]。Stranger等分析了编码黑芥子酶的*TGG1*基因核苷酸的变化,发现核苷酸变异与正向选择的模式一致^[11]。因此,比较分析目标基因DNA序列的多样性是揭示基因多样性的有效方法,将为基因的功能分析提供有用的信息。

本文通过直接测序研究基因*TaMyb2*的单核苷

酸多态性及其与抗旱性的关系,以期发掘利用小麦优异抗旱基因资源提供依据,为标记和克隆重要抗旱基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

39份普通小麦(*Triticum aestivum* L.) (AABBDD),包括国内不同时期、不同地区的栽培品种和农家品种;5份A基因组供体种(AA),包括3份乌拉尔图小麦(*T. urartu*)、1份栽培一粒小麦(*T. monococcum*)和1份野生一粒小麦(*T. boeoticum*);4份B基因组供体种拟斯卑尔脱山羊草(*Aegilops speltoides*)(SS),6份D基因组供体种粗山羊草(*Ae. tauschii*)(DD)和2份四倍体小麦(AABB),基本情况见表1。

1.2 方法

1.2.1 *TaMyb2*基因cDNA序列获得及引物设计

以GenBank中小麦全长*TaMyb2*基因cDNA (AY615199 GI: 47680446)序列为基础,用PrimerPremier 5.0软件设计引物,获得了1对在六倍体小麦基因组DNA中能特异扩增出目标产物的引物(forward primer: 5'-GCGAATTGGGAGGCAGAGG-3', reverse primer: 5'-CAGCAAGGTGGCCGGGT-3'),该引物对起始于第41位点,终止于第961位点(CDS区为68~901 bp)。

1.2.2 DNA测序 DNA测序按ABI公司的BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit的操作说明进行。测序PCR反应程序为:96℃ 1 min;96℃ 10 s,50℃ 5 s,60℃ 4 min,30个循环;4℃保存。每份材料至少测出8个单克隆的全长序列,以保证测序结果的可靠性。

表 1 供试植物材料
Table 1 Plant materials used in the study

序号 No.	材料 Accession	审定时间 Released date	种植环境/基因组 Planting condition/genome	产地 Origin
1	京 411 Jing 411	1991	水浇地 Irrigated land	北京 Beijing, China
2	京双 2 号 Jingshuang 2	不详 Unknown	水浇地 Irrigated land	北京 Beijing, China
3	北京 8686 Beijing 8686	1995	水浇地 Irrigated land	北京 Beijing, China
4	衡 7228 Heng 7228	2003	水浇地 Irrigated land	河北 Hebei, China
5	石家庄 8 号 Shijiazhuang 8	2001	水浇地 Irrigated land	河北 Hebei, China
6	衡 95 观 26 Heng 95 guan 26	2001	水浇地 Irrigated land	河北 Hebei, China
7	豫麦 13 Yumai 13	1989	水浇地 Irrigated land	河南 Henan, China
8	偃展 1 号 Yazhan 1	2000	水浇地 Irrigated land	河南 Henan, China
9	鲁麦 1 号 Lumai 1	1983	水浇地 Irrigated land	山东 Shandong, China
10	鲁麦 14 Lumai 14	1990	水浇地 Irrigated land	山东 Shandong, China
11	鲁麦 15 Lumai 15	1990	水浇地 Irrigated land	山东 Shandong, China
12	临丰 615 Linfeng 615	2002	水浇地 Irrigated land	山西 Shanxi, China
13	陕农 7859 Shaanong 7859	1986	水浇地 Irrigated land	陕西 Shaanxi, China
14	小偃 22 Xiaoyan 22	1998	水浇地 Irrigated land	陕西 Shaanxi, China
15	武农 148 Wunong 148	2000	水浇地 Irrigated land	陕西 Shaanxi, China
16	陕 253 Shaan 253	2001	水浇地 Irrigated land	陕西 Shaanxi, China
17	小偃 54 Xiaoyan 54	1998	旱地 Rain-fed land	北京 Beijing, China
18	京农 80 鉴 107 Jingnong 80 Jian 107	稳定品系 Stable line	抗旱 Drought resistance	北京 Beijing, China
19	04-2	DH 系 DH line	抗旱 Drought resistance	北京 Beijing, China
20	04-118	DH 系 DH line	抗旱 Drought resistance	北京 Beijing, China
21	西峰 20 Xifeng 20	1994	旱地 Rain-fed land	甘肃 Gansu, China
22	四棱红葫芦头 Silenghonghuloutou	农家种 Landrace	旱地 Rain-fed land	河北 Hebei, China
23	洛阳 8628 Luoyang 8628	1997	旱地 Rain-fed land	河南 Henan, China
24	洛麦 9505 Luomai 9505	2004	旱地 Rain-fed land	河南 Henan, China
25	新克早 9 号 Xinkehan 9	1987	旱地 Rain-fed land	黑龙江 Heilongjiang, China
26	早选 10 号 Hanxuan 10	1973	旱地 Rain-fed land	山西 Shanxi, China
27	晋麦 47 Jinmai 47	1995	旱地 Rain-fed land	山西 Shanxi, China
28	晋麦 50 Jinmai 50	1996	旱地 Rain-fed land	山西 Shanxi, China
29	晋麦 54 Jinmai 54	1997	旱地 Rain-fed land	山西 Shanxi, China
30	晋麦 57 Jinmai 57	1998	旱地 Rain-fed land	山西 Shanxi, China
31	长 6154 Chang 6154	2003	旱地 Rain-fed land	山西 Shanxi, China
32	蚂蚱麦 Mazhamai	农家种 Landrace	旱地 Rain-fed land	陕西 Shaanxi, China
33	陕合 6 号 Shaanhe 6	1971	旱地 Rain-fed land	陕西 Shaanxi, China
34	渭麦 4 号 Weimai 4	1979	旱地 Rain-fed land	陕西 Shaanxi, China
35	陕早 8675 Shaanhan 8675	1996	旱地 Rain-fed land	陕西 Shaanxi, China
36	西农 1043 Xinong 1043	1999	旱地 Rain-fed land	陕西 Shaanxi, China
37	西农 2911 Xinong 2911	稳定品系 Stable line	抗旱 Drought resistance	陕西 Shaanxi, China
38	小冰麦 143 Xiaobingmai 143	2004	旱地 Rain-fed land	陕西 Shaanxi, China
39	中国春 Chinese Spring	农家种 Landrace	旱地 Rain-fed land	四川 Sichuan, China
40	UR202	乌拉尔图小麦 <i>T. wurtu</i>	AA	叙利亚 Syria
41	UR203	乌拉尔图小麦 <i>T. wurtu</i>	AA	叙利亚 Syria
42	UR206	乌拉尔图小麦 <i>T. wurtu</i>	AA	伊朗 Iran
43	MO102	栽培一粒小麦 <i>T. monococcum</i>	AA	不详 Unknown
44	BO104	野生一粒小麦 <i>T. boeoticum</i>	AA	不详 Unknown
45	Y2003	拟斯卑尔脱山羊草 <i>Ae. speloides</i>	SS	叙利亚 Syria
46	Y2005	拟斯卑尔脱山羊草 <i>Ae. speloides</i>	SS	叙利亚 Syria
47	Y2009	拟斯卑尔脱山羊草 <i>Ae. speloides</i>	SS	叙利亚 Syria
48	Y2017	拟斯卑尔脱山羊草 <i>Ae. speloides</i>	SS	叙利亚 Syria
49	Y185	粗山羊草 <i>Ae. tauschii</i>	DD	荷兰 Netherlands
50	Y215	粗山羊草 <i>Ae. tauschii</i>	DD	墨西哥 Mexico
51	Y221	粗山羊草 <i>Ae. tauschii</i>	DD	伊朗 Iran
52	Y296	粗山羊草 <i>Ae. tauschii</i>	DD	前苏联 Former Soviet Union
53	Y2280	粗山羊草 <i>Ae. tauschii</i>	DD	美国 USA
54	Y2282	粗山羊草 <i>Ae. tauschii</i>	DD	美国 USA
55	PS5	波斯小麦 <i>T. carthlicum</i>	AABB	美国 USA
56	PO6	波兰小麦 <i>T. polanicum</i>	AABB	新疆 Xinjiang

注: * 供试材料的基本情况详见参考文献 [12-15]。Note: * The details of backgrounds were in references [12-15].

1.2.3 目标片段 DNA 序列多态性检测 用 DNASTar SeqMan 软件对测序数据进行质量评价, 设定组装参数(最小匹配长度为 40 bp, 最小匹配率为 80%), 对来自同一材料不同克隆的测序结果进行组装; 利用 DNASTar MegAlign 软件对不同基因型的序列进行多序列联配(multialignment), 比较分析不同基因型间 *TaMyb2* 核酸序列的单核苷酸多态性。

用 DnaSP 软件 (Version 4.0)^[16] 分析核苷酸多样性 π , 并作 Sliding-window 分析, 每个位点的同义突变数量用 K_s 表示, 非同义突变数量用 K_a 表示。

用 DNASTar MegAlign 软件对序列进行聚类分析 (phylogenetic tree), 用 TreeView 软件编辑进化树, 分析基因的单倍型。

2 结果与分析

2.1 *TaMyb2* 的基因组特异性

以 56 份供试材料的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。在普通小麦 (AABBDD)、拟斯卑尔脱山羊草 (SS) 和粗山羊草 (DD) 中均检测到目标扩增产物, 但在 5 份 A 基因组供体种材料中均未获得目标扩增产物, 说明本研究所用引物为基因组 B 与 D 的特异引物, 因此后续

分析不涉及 A 基因组材料。

2.2 *TaMyb2* 序列分类

对 51 份材料的测序结果表明, *TaMyb2* 的序列分为 *TaMyb2-I*、*TaMyb2-II*、*TaMyb2-III* 3 种类型。*TaMyb2-I* 序列长 1 600 bp, 包括粗山羊草材料、四倍体小麦和普通小麦, 不同材料间 *TaMyb2-I* 的序列差异较大; *TaMyb2-II* 序列长 1 606 bp, 包括 1 份拟斯卑尔脱山羊草 Y2005、粗山羊草材料、四倍体小麦和普通小麦, 共 48 份材料; *TaMyb2-III* 序列长度变化范围较大, 介于 1 597 ~ 1 615 bp 之间, 均来自拟斯卑尔脱山羊草。本文仅分析 *TaMyb2-II* 在不同材料间的单核苷酸多态性。

2.3 *TaMyb2-II* 序列的结构特点

结构分析表明, *TaMyb2-II* 序列包含 3 个外显子, 2 个内含子及 5' 和 3' 端的非翻译区 (UTR) (图 1)。其中第 28 ~ 160 bp、272 ~ 401 bp、951 ~ 1 526 bp 分别为外显子 1、2 和 3, 内含子 1 和 2 分别位于第 161 ~ 271 bp 和第 402 ~ 950 bp 区段。第 1 ~ 27 bp 为 5'-UTR, 第 1 528 ~ 1 606 bp 为 3'-UTR。其中, 第 34 ~ 190 bp、191 ~ 343 bp 分别为 *Myb* 基因家族的保守域 R2 和 R3, 第 663 ~ 820 bp 为该基因的酸性区域, 起转录激活作用。

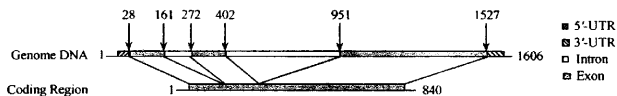


图 1 *TaMyb2-II* 结构示意图
Fig. 1 Structure of *TaMyb2-II*

2.4 *TaMyb2-II* 序列的多态性

比较分析 39 份普通小麦、2 份四倍体小麦、6 份粗山羊草和拟斯卑尔脱山羊草 Y2005 中 *TaMyb2-II* 序列在 SNP 水平上的遗传变异情况, 发现 26 个 SNP, 其中编码区 11 个 SNP, 频率为 1/3 665 bp, 非编码区 15 个 SNP, 频率为 1/2 451 bp, 非编码区 SNP 变异频率约为编码区的 1.5 倍; 仅在非编码区发现 8

个 InDel, 频率为 1/4 596 bp, 编码区没有发现 InDel。

核苷酸多样性 π 是指基因序列中的每个核苷酸在群体中被随机取代的可能性, 反映了 1 个基因的遗传变异程度。48 份材料 *TaMyb2-II* 的 π 值为 0.001 17, 编码区 π 值 (0.000 55) 小于非编码区的 π 值 (0.001 85), 说明编码区的遗传变异小于非编码区的遗传变异。

表 2 *TaMyb2-II* 序列核苷酸变异
Table 2 Nucleotide acid variation in *TaMyb2-II*

基因区域 Region	大小 Size(bp)	SNP	InDel	SNP 的频率 Frequency of SNP	InDel 的频率 Frequency of InDel	π ($\times 10^{-3}$)
整个分析区域 Complete region	77088	26	8	1/2965	1/9636	1.17
编码区 Coding region	40320	11	0	1/3665	0	0.55
非编码区 Non-coding region	36768	15	8	1/2451	1/4596	1.85

2.5 *TaMyb2-11* 序列多态性位点分布

不同材料中 *TaMyb2-11* 序列各区段核苷酸多态性位点分布情况的分析结果见图 2, 内含子 1 区段为变异富集区, 核苷酸多样性 (π 值) 超过 0.009, 其他区域的核苷酸多态性明显较低, 其中外显子 3 的核苷酸多样性最低。这种多态性分布模式可能与各区段承受的选择压力不同有关, 内含子区承受的选择压力较小, 因而变异频率相对较高, 而编码区承受的选择压力较大, 所以仅保留了很少的核苷酸变异。

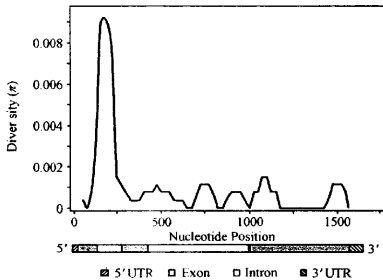


图 2 *TaMyb2-11* 基因多态位点分布的 Sliding-window 分析
Fig. 2 Sliding-window analysis of *TaMyb2-11* polymorphism sites

2.6 *TaMyb2-11* 编码区多态性分析

检测 *TaMyb2-11* 序列编码区在 48 份供试材料的单核苷酸多态性, 仅在 9 份材料中发现 11 个 SNP, 其中 2 个是同义突变, 9 个为非同义突变。不同材料编码区单核苷酸变异及其相应的氨基酸变异情况见表 3。在小麦 S 基因组供体种材料 Y2005 和 D 基因组供体种材料 Y185 中分别发现 2 个 SNP, 2 份材料各有 1 个同义突变位点。在保守域 R2 区段 (34 ~ 190 bp) 有 2 个非同义 SNP 突变, 即 103 位点, Y2005 的核苷酸由 a 突变为 g, 氨基酸由丝氨酸突变为甘氨酸; 在 151 位点, 晋麦 57 的核苷酸由 a 突变为 t, 编码的赖氨酸突变为蛋氨酸; 在保守域 R3 区段 (191 ~ 343 bp) 有 1 个非同义 SNP 突变, 即 247 位点 PSS 的核苷酸由 c 突变为 g, 谷氨酰胺突变为谷氨酸。该基因的酸性区域 (663 ~ 820 bp) 起转录激活作用, 797 位点 PO6 的核苷酸由 a 突变为 g, 天氨酸突变为甘氨酸。上述 *TaMyb2-11* 保守域和酸性区域, 以及其他编码区的非同义 SNP 突变可能会影响该基因的功能。在 *TaMyb2-11* 的 373 位点, 中国春的核苷酸 c 突变为 t, 由不带电荷的极性 R 基氨基酸谷氨酰胺变为带负电荷的 R 基氨基酸谷氨酸。晋

麦 57 和中国春均属于旱地栽培品种, 其 *TaMyb2-11* 的编码区均有 SNP 变化。

表 3 *TaMyb2-11* 编码区变异
Table 3 Mutation in coding region of *TaMyb2-11*

位点 Site	材料 Accession	单核苷酸变异 Mutation of SNP(x/y)	氨基酸变异 Amino acid mutation(X/Y)	突变类型 Mutation type
103	Y2005	A/g	S/G	N
123	Y2005	T/c	P/P	S
151	Jinmai 57	a/t	K/M	N
247	PS5	C/g	Q/E	N
366	shaanong 7859	G/c	E/D	N
373	Chinese Spring	C/g	Q/E	N
423	Heng 95 guan 26	G/c	E/D	N
433	Y2282	A/g	K/E	S
797	PO6	A/g	D/G	N
828	Y185	A/g	L/L	S
835	Y185	G/a	V/I	N

注: * x/y 表示碱基由 x 变异为 y, 如 a/g 表示该位点由 a 突变为 g; X/Y 表示氨基酸由 X 变异为 Y。

** N: 非同义突变; S: 同义突变。

Note: * x/y means that the base x changed into y. (e.g., a/g means a changed into g); X/Y means that the amino acid X changed into Y. ** N: nonsynonymous; S: synonymous.

TaMyb2-11 编码区同义突变与非同义突变核苷酸多样性见表 4。同义突变的 π 值为 0.00043, 非同义突变的 π 值为 0.00058, 同义突变的核苷酸多样性小于与非同义突变核苷酸多样性。

TaMyb2-11 编码区突变位点的非同义突变平均数 K_a 为 0.0017, 平均同义突变数 K_s 为 0.0053。 K_a/K_s 比值代表选择效应及选择方向, 当 K_a/K_s 值大于 1 时, 表示基因受正向选择影响, 属于快速进化基因; K_a/K_s 值等于 1, 说明同义突变和非同义突变频率相同, 群体没有受到选择的影响; K_a/K_s 值小于 1, 说明基因受负向选择影响, 属于相对保守基因^[17]。 *TaMyb2-11* 的 K_a/K_s 比值为 0.32, 说明该基因的核苷酸序列非常保守。

表 4 *TaMyb2-11* 编码区单核苷酸多样性

突变类型 Mutation type	π	K_s	K_a
同义突变 Synonymous mutation	0.00043	0.0053	—
非同义突变 Nonsynonymous mutation	0.00058	—	0.0017

2.7 *TaMyb2-11* 序列单倍型分析

根据 *TaMyb2-11* 全长序列对 48 份供试材料进行聚类分析和单倍型 (haplotype) 分析, 供试材料分为 18 个单倍型 (图 3)。haplotype 1 ~ haplotype 7 分别只有 1 份材料, 依次为 Y2005、04-2、04-118、衡 7228、

晋麦 47、陕合 6 号和 Y2280, 这 7 个单倍型与 haplotype 8 ~ haplotype 18 的亲缘关系较远, 而 haplotype 8 ~ haplotype 18 之间的亲缘关系相对较近。从 *TaMyb2-11* 序列来看, 6 份 D 基因组供体的粗山羊草 Y185、Y215、Y221、Y296、Y2280、Y2282 以及四倍体波斯小麦和波兰小麦分别与普通小麦聚为 1 个 haplotype, 表明粗山羊草和四倍体小麦与普通小麦的亲缘关系较近, 而唯一 1 份具有 *TaMyb2-11* 序列的拟斯卑尔脱山羊草 Y2005 (haplotype 1) 与另外 17 个单倍型的距离最远, 这也说明拟斯卑尔脱山羊草与普通小麦的亲缘关系较远。

分析发现, 18 个单倍型中有 2 个单倍型为小麦的近缘种, 6 个单倍型为旱地栽培小麦, 3 个单倍型为水地栽培小麦, 其余为水、旱地栽培品种混合类型。旱地栽培单倍型小麦包括 haplotype 2 的 04-2, haplotype 3 的 04-118, haplotype 5 的晋麦 47, haplotype 6 的陕合 6 号, haplotype 8 的小偃 54、中国春和洛麦

9505, haplotype 9 的四棱红葫芦头、晋麦 54 和西农 1043 等品种; 水地栽培单倍型小麦包括 haplotype 4 的衡 7228, haplotype 10 的豫麦 13、武农 148 和鲁麦 1 号, 以及 haplotype 15 的小偃 22、鲁麦 15、京 411 和北京 8686 等品种, 可能说明普通小麦 *TaMyb2-11* 的 haplotype 结构与小麦抗旱性之间有一定的关系。haplotype 11、haplotype 12、haplotype 13、haplotype 14、haplotype 16、haplotype 17、haplotype 18 所包含的品种既有旱地栽培品种也有水浇地品种, 说明单倍型的分类与抗旱性的表型不完全一致, 也揭示了抗旱性的复杂性。haplotype 结构与供试材料的产地没有关系, 例如, 山西的旱地品种早选 10 号、晋麦 47、晋麦 50、晋麦 54 和晋麦 57 分别属于 haplotype 13、haplotype 5、haplotype 16、haplotype 9 和 haplotype 14。*TaMyb2-11* 的 haplotype 结构与编码区结构变异没有对应关系 (表 3)。

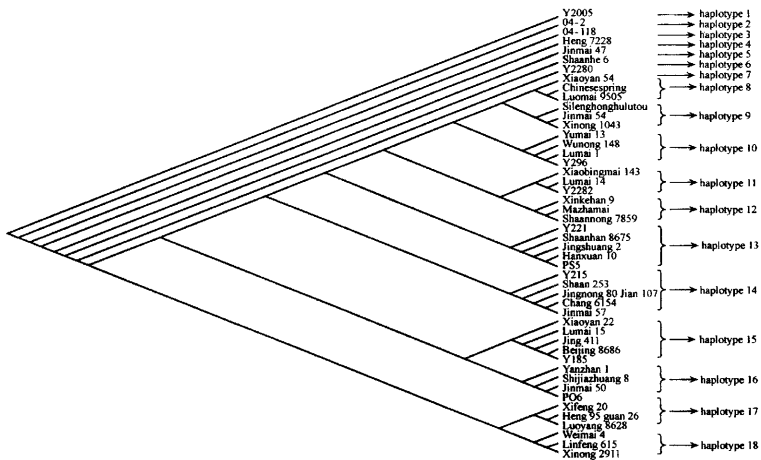


图 3 *TaMyb2-11* 序列单倍型关系结构树

Fig. 3 Slanted-cladogram trees representing *TaMyb2-11* haplotype relationship

3 讨论

3.1 *TaMyb2-11* 的单核苷酸多样性

本文在 SNP 水平上对 *TaMyb2-11* 序列在普通小麦及其近缘种中的单核苷酸多态性进行了研究, 发现 26 个 SNP 和 8 个 InDel, 其频率分别为 1/2 965 bp 和 1/9 636 bp, 与其他生物相比相差甚远, 例如拟南芥

中 *CBF4* 基因每 35.8 bp 中 1 个 SNP, 每 143 bp 中 1 个 InDel^[8-9], 尽管 *TaMyb2* 与 *CBF4* 均参与逆境胁迫条件下 ABA 依赖型的信号传导, 但是二者的 SNP 频率不同。玉米基因组平均每 57 bp 中 1 个 SNP^[18], 大豆基因组平均每 272 bp 中 1 个 SNP^[19], 其多态性频率均远远高于小麦及其近缘种 *TaMyb2-11* 基因的多态性频率, 因此, 基因或基因组中的 SNP 和 InDel 频

率可能与植物种类、基因种类及功能等有关。

R2 和 R3 是 *Myb* 基因家族的保守域。 *TaMyb2-II* 中, 在此区域内 B 基因组供体材料 Y2005 的 1 个不带电荷的 R 基丝氨酸突变为相同性质的甘氨酸; 普通小麦晋麦 57 的 1 个带正电荷的 R 基赖氨酸突变为非极性 R 基的蛋氨酸; 波斯小麦 PS5 的不带电荷的极性谷氨酰胺突变为带负电荷的 R 基谷氨酸。这 2 个保守域的碱基变化可能影响 *Myb2* 与目标基因结合位点的有效识别, 从而影响目标基因的转录。Urao 等报道, *AtMyb2* 的 C 末端酸性区域是有效的转录激活域, 此区域的缺失将降低基因的反式激活效率^[20]。 *TaMyb2-II* 序列的第 663 ~ 820 bp 为酸性区域, 为转录激活域, 在此区域内, 仅发现波兰小麦 PO6 中带负电荷的 R 基天氨酸突变为不带电荷的极性 R 基甘氨酸, 而其他供试材料中均未发现 SNP 变异。

3.2 普通小麦及其近缘种的进化关系

从 SNP 水平上分析 *TaMyb2-II* 基因组在不同材料中的差异, 可以分析普通小麦及其近缘种的进化关系。小麦 B 基因组供体材料拟斯卑尔脱山羊草 Y2003、Y2005、Y2009 和 Y2017 中扩增出的 *TaMyb2-III* 序列与 *TaMyb2-I*、*TaMyb2-II* 两种序列差异较大, 除 Y2005 扩增得到的 2 条序列中的 1 条为 *TaMyb2-II* 外, 其余的 7 条序列均属于 *TaMyb2-III* 类。在供试材料的 *TaMyb2-II* 序列中, Y2005 的 SNP 变异较多。根据 *TaMyb2-II* 序列的单核苷酸多态性分析普通小麦与其近缘种的亲缘关系, 发现与普通小麦亲缘关系由近到远的物种依次为四倍体小麦、粗山羊草、拟斯卑尔脱山羊草, 验证了前人的研究结果, 即粗山羊草是普通小麦 D 基因组的供体, 而拟斯卑尔脱山羊草的 S 基因组可能是 B 基因组的部分供体^[21]。在普通小麦的进化历程中, 二倍体小麦 (AA) 与 B 基因组供体结合形成四倍体小麦 (AABB), 再与 D 基因组供体粗山羊草杂交后形成普通小麦 (AABBDD), 四倍体小麦与普通小麦进化的时间较近, 亲缘关系也近。

3.3 *TaMyb2-II* 单倍型结构与抗旱性的关系

依据 *TaMyb2-II* 的全长序列分析供试材料的 haplotype, 基因序列包括外显子、内含子及 5' 和 3' 端的非翻译区。结果发现, 6 个单倍型为旱地栽培小麦, 3 个单倍型为水地栽培小麦, 其余为水、旱地栽培小麦品种混合类型。旱地栽培小麦的单倍型包括 haplotype 2、3、5、6、8 和 9, 可能说明普通小麦

TaMyb2-II 的 haplotype 结构与抗旱性之间有一定的关系, 还需要作进一步的研究。

Urao 等 1993 年首次报道从干旱胁迫的拟南芥莲座植物体的 cDNA 文库中筛选到了 *AtMyb2* 的 mRNA, 分析表明, *AtMyb2* 受干旱、盐和 ABA 诱导表达, 可以调节脱水诱导基因 *rd22* 的表达^[21]; 2003 年 Abe 报道 *AtMyb2* 在 ABA 信号传导中具有转录激活子的作用^[7]。本文研究的 *TaMyb2* 在小麦水分胁迫诱导表达的 cDNA 文库中已经检测到^[23], 因此推测该基因与小麦的抗旱性有关。但植物抗旱性为多基因控制的复杂性状, 且普通小麦为异源六倍体, 基因组庞大复杂, 加之 *TaMyb2* 为多基因家族, 单从某一家族成员单一拷贝的结构多样性还不能全面揭示 *TaMyb2* 与抗旱性的关系。如果能进一步分析 *TaMyb2* 基因家族中每个成员的结构多态性和不同拷贝序列之间的相互关系, 结合精准的抗旱性鉴定结果, 将有助于揭示 *TaMyb2* 与小麦抗旱性的直接关系, 这方面的研究正在进行中。

4 结论

(1) 利用小麦 B、D 基因组特异引物进行 PCR 扩增, 得到 3 种类型的 *TaMyb2* 序列, 分别命名为 *TaMyb2-I*、*TaMyb2-II*、*TaMyb2-III*。

(2) *TaMyb2-II* 序列长 1 606 bp, 在供试材料 77 088 bp 的基因组核苷酸序列中共检测到 34 个单核苷酸变异, 其中 26 个 SNP, 8 个 InDel, 二者出现的频率分别为 1/2 965 bp 和 1/9 636 bp; *TaMyb2-II* 编码区的变异小于非编码区; Ka/Ks 比值为 0.32, 表明该基因非常保守。

(3) 在 *TaMyb2-II* 的编码区共发现 11 个 SNP, 分别位于 9 份材料中, 其中 2 个是同义突变, 9 个为非同义突变。

(4) 根据 *TaMyb2-II* 序列的多态性, 将供试材料分为 18 个单倍型, 其中 6 个单倍型全部为旱地栽培小麦, 3 种单倍型全部为水地栽培小麦, 表明 *TaMyb2-II* 的单倍型结构可能与小麦的抗旱性相关。

(5) 进化分析表明, 普通小麦与其 D 基因组供体种粗山羊草及四倍体小麦的亲缘关系较近, 与 B 基因组供体种拟斯卑尔脱山羊草的亲缘关系较远。

References

- [1] Stern D L. A role of *ultrabithorax* in morphological differences between *Drosophila* species. *Nature*. 1998, 396: 463-466

- [2] Cubas P, Vincent C, Coen E. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*, 1999, 401: 157-161
- [3] Arthur W. The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology. *Nature*, 2002, 415: 757-764
- [4] Riechmann J L, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C Z, Keddle J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe O J, Samaha R R, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang J Z, Ghandehari D, Sherman B K, Yu G L. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 2000, 290: 2105-2110
- [5] Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 1997, 9(10): 1859-1868
- [6] Hoeren F U, Dolferus R, Wu Y W, Peacock W J, Dennis E S. Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*) by low oxygen. *Genetics*, 1998, 149: 479-490
- [7] Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2003, 15: 63-78
- [8] Hao G-P(郝岗平), Wu Z-Y(吴忠义), Cao M-Q(曹鸣庆), Pelletier G, Brunel D, Huang C-L(黄丛林), Yang Q(杨清). Nucleotide polymorphism in the drought induced transcription factor CBF4 region of *Arabidopsis thaliana* and its molecular evolution analyses. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2004, 31(12): 1415-1425 (in Chinese with English abstract)
- [9] Hao G-P(郝岗平), Wu Z-Y(吴忠义), Chen M-S(陈茂盛), Cao M-Q(曹鸣庆), Brunel D, Pelletier G, Huang C-L(黄丛林), Yang Q(杨清). Single nucleotide polymorphism of CBF4 locus region of *Arabidopsis thaliana* correspond to drought tolerance. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2004, 12(2): 122-131 (in Chinese with English abstract)
- [10] Mauricio R, Stahl E A, Korves T, Tian D, Kreitman M, Bergelson J. Natural selection for polymorphism in the disease resistance gene *Rpa2* of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2003, 163(2): 735-746
- [11] Stranger B E, Mitchell-Olds T. Nucleotide variation at the myrosinase-encoding locus, *TGG1*, and quantitative myrosinase enzyme activity variation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Ecol*, 2005, 14: 295-309
- [12] Zhuang Q-S(庄巧生). Chinese Wheat Improvement and Pedigree Analysis(中国小麦品种改良及系谱分析). Beijing: China Agriculture Press, 2000(in Chinese)
- [13] Jin S-B(金善宝). Chinese Wheat Varieties Record 1962-1982(中国小麦品种志 1962—1982). Beijing: Agriculture Press, 1986 (in Chinese)
- [14] Jin S-B(金善宝). Chinese Wheat Varieties Record 1983-1993(中国小麦品种志 1983—1993). Beijing: China Agriculture Press, 1997(in Chinese)
- [15] Jin S-B(金善宝). Chinese Wheat Varieties and Pedigree(中国小麦品种及系谱). Beijing: Agriculture Press, 1983(in Chinese)
- [16] Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular population analysis. *Bioinformatics*, 1999, 15(2): 174-175
- [17] Nielsen R. Molecular signatures of natural selection. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 197-218
- [18] Guillet-Claude C, Birolleau-Touchard C, Manicacci D, Rogowski P M, Rigau J, Murigneux A, Martinant J P, Barriere Y. Nucleotide diversity of the *ZmPox3* maize peroxidase gene: relationships between a MITE insertion in exon 2 and variation in forage maize digestibility. *BMC Genet*, 2004, 5: 19
- [19] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, Van Tassel C P, Matukumalli L K, Grimm D R, Hyatt S M, Fickus E W, Young N D, Cregan P B. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*, 2003, 163: 1123-1134
- [20] Urao T, Noji M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A transcriptional activation domain of AtMYB2, a drought-inducible *Arabidopsis* Myb-related protein. *Plant J*, 1996, 10(6): 1145-1147
- [21] Lupton F G. Research Group of Genetics and Breeding(北京农业大学遗传育种研究室) trans. Basic Theory of Wheat Breeding(小麦育种的理论基础). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1988(in Chinese)
- [22] Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 1993, 5: 1529-1539
- [23] Wang Z(王转), Zang Q-W(贛庆伟), Guo Z-A(郭志爱), Jing R-L(景蕊莲). A preliminary study on gene expression profile induced by water stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2004, 31(8): 842-849 (in Chinese with English abstract)