

doi:10.7668/hbxb.2014.06.006

小麦三雌蕊突变体 *TaAPI-3* 基因的克隆及表达分析

王育伟,彭正松,杨在君,魏淑红,廖明莉,赵欢,杨会,杨宇凤,王清海

(西华师范大学,西南野生动植物资源保护省部共建教育部重点实验室,四川南充 637009)

摘要:为探讨 *TaAPI-3* 基因在小麦三雌蕊性状形成中的作用,从小麦三雌蕊近等基因系 CM28 和 CM28TP 中克隆得到 3 个同源基因 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c*。通过碱基序列、氨基酸序列、聚类及实时荧光定量分析表明,*TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 基因 cDNA 序列分别为 1 210,1 208,1 199 bp,ORF 分别为 825,816,855 bp,分别编码 274,271,284 个氨基酸残基。*TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 与中国春 *TaAPI-3* 的核苷酸序列相似度分别为 96.02%,93.1%,93.56%,氨基酸序列相似性高达 99%,95%,97%,并且与 A 类基因 *TaAGL29*、*OsMADS15*、*ZAPI*、*BM8*、*EnWM8*、*TaAPI-3* 聚集到 API/SUQA 亚家族 FUL2 类群中。实时荧光定量分析表明,*TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 在 CM28 和 CM28TP 的 3 个发育时期的小穗中均有表达,但各个时期的表达量有明显差异。CM28 中主要在二棱期-小花分化期表达,CM28TP 中主要在雌雄蕊原基分化期表达。试验分析显示,*TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 可能具有上述 A 类基因相似的功能,其表达模式可能与小麦三粒/一粒性状形成相关。试验结果为进一步探讨该基因在小麦三雌蕊性状形成过程中的作用奠定了基础。

关键词:小麦;花器官发育;*TaAPI-3*;MADS-box 基因;基因表达

中图分类号:S512.1.1;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)06-0028-08

Cloning and Expression Analysis of *TaAPI-3* Genes of Three Pistils Mutation in Wheat

WANG Yu-wei, PENG Zheng-song, YANG Zai-jun, WEI Shu-hong, LIAO Ming-li,
ZHAO Huan, YANG Hui, YANG Yu-feng, WANG Qing-hai(Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education),
China West Normal University, Nanchong 637009, China)

Abstract: To investigate the role of *TaAPI-3* in the formation of wheat three pistils trait. Three homologous genes *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b* and *TaAPI-3c* were cloned from wheat three pistils near-isogenic lines CM28 and CM28TP in this study. By nucleotide sequence, amino acid sequence, quantification and clustering analysis showed that the cloned cDNA of *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b* and *TaAPI-3c* were 1 210, 1 208, 1 199 bp in length, respectively. *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b* and *TaAPI-3c* genes respectively contained an 825, 816, 855 bp ORF which encode 274, 271, 284 amino acids. The cDNA sequence of *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b* and *TaAPI-3c* with *TaAPI-3* were respectively 96.02%, 93.1% and 93.56% similarity. And the identities to *TaAPI-3* in amino acids sequences were 99%, 95%, 97% respectively. Cluster analysis showed that *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b* and *TaAPI-3c* were clustered into FUL2 clade, and showed greater similarity to A class function genes, such as, *TaAGL29*, *OsMADS15*, *ZAPI*, *BM8*, *EnWM8E* and *TaAPI-3* genes. Real-time analysis showed the expression level of *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b* and *TaAPI-3c* in CM28 and CM28TP were significantly different. For CM28, high expression level was shared in two ridge until floret differentiation (spikelet length 2-5 mm). However, the expression level was higher in the pistil and stamen primordium (spikelets length 5-7mm) of CM28TP. Experimental analysis indicated that the genes of *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b*, *TaAPI-3c* may have similar function with A class function genes of above-mentioned, and the difference of expression pattern in CM28 and CM28TP may be bound up with three-pistil traits. The results make the founda-

收稿日期:2014-09-06

基金项目:国家自然科学基金项目(31301319);教育部重点项目(211164)

作者简介:王育伟(1986-),男,河南开封人,在读硕士,主要从事小麦遗传育种研究。

通讯作者:彭正松(1964-),男,四川安岳人,教授,博士,主要从事小麦遗传育种研究。

tion to further explore their roles in forming three-pistil traits in wheat.

Key words: Wheat; Floral organ development; *TaAPI-3*; MADS-box gene; Gene expression

开花是植物由营养生长向生殖生长转变的一个重要生理过程,受内外源信号和环境因子的严格调控。前人通过对模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、金鱼草(*Antirrhinum majas*)等花器官发育的研究提出了著名的花器官发育“ABC 模型”^[1-2],该模型指出从花分生组织到花器官的形成主要由 A、B、C 三类功能基因控制,每一类基因均在相邻的两轮花器官中起作用。随后在矮牵牛和酵母双杂交试验中发现了 D、E 功能的基因^[3]，“ABC 模型”进一步发展为“ABCDE 模型”^[4-6]。“ABCDE 模型”中的基因大多数属于 MADS-box 基因,该类基因编码的转录因子在真核生物的发育控制和信号转导中起到关键作用^[7]。高等植物中 MADS-box 基因大多为 Type II 型^[8],该类型基因具有高度保守的 M 区结构域和半保守的 K 区及高度不保守的 C 端区域^[9]。

目前,小麦(*Triticum aestivum*)中有 45 个 MIKC 型 MADS-box 基因的 cDNA 全长被报道,并被归入 13 个 MIKC 型中的 11 子类中,其中 *TaAPI-1*、*TaAPI-2*、*TaAPI-3* 属于 A 类基因 API/SQUA 基因家族成员。在普通小麦中国春中,*TaAPI-3* 的表达模式与其同源基因水稻 *OsMADS15* 和玉米 *ZAPI* 相似,推断其功能与拟南芥的 *API* (A 类基因)基因相似^[10]。

一朵小花结实三粒种子的突变体最初由陈济世等^[11]发现,并命名为“三粒小麦”,其亲本不能确定。Peng 等^[12-13]对“三粒小麦”进行了多年改良并培育出“小麦三雌蕊突变品系 TP”。TP 的三雌蕊性状受一对显性核基因控制,与细胞质遗传无关,这与 Murai 等^[14]发现的雄蕊雌蕊化品系不同。TP 具有 3 个正常的雄蕊和 3 个可育的雌蕊,由于 TP 品系中一朵小花能结三粒种子,显著地增加穗粒数,因而具有较高的育种学价值。

本研究从小麦三雌蕊近等基因系 CM28TP 及其轮回亲本川麦 28 (CM28)的幼穗中分别克隆得到了 *TaAPI-3* 基因的 cDNA 序列,并进行了序列分析。通过 Real-time PCR 技术检测了 *TaAPI-3* 基因在幼穗不同发育阶段的表达水平,研究结果为进一步探讨该基因在小麦三雌蕊性状形成过程中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验选用小麦三雌蕊近等基因系 CM28TP^[15]

及其轮回亲本川麦 28 (CM28)为试验材料。所有材料种植于西华师范大学生命科学学院实验田中。当小麦进入孕穗期后,选取长度为 2~5 mm (二棱期-小花分化期)、5~7 mm (雌雄蕊原基分化期)、7~10 mm (药隔期)^[16] 3 个时期的小穗浸入 RNA 保存液中,液氮速冻后,储存于 -70 °C 冰箱中备用。

1.2 总 RNA 的提取

总 RNA 的提取按照 EZgene™ Plant Easy Spin RNA Miniprep Kit (R6611)试剂盒说明书进行,将所得 RNA 溶解在 DEPC-treated ddH₂O 中。然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NANODROP 2000c 紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, -70 °C 保存备用。

1.3 cDNA 链的合成

以总 RNA 为模板,按反转录试剂盒 PrimeScript Perfect Real-time RT Reagent Kit (TaKaRa, 中国)反转录步骤反转录出 cDNA 链。反应体系为 80 μL, 5 × Primescript Buffer 16 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix 4 μL, Oligo dT Primert 4 μL, Random 6 mers 4 μL, 模板 RNA 根据浓度计算,剩余用水补足 80 μL。反应程序:37 °C 15 min, 85 °C 5 s, -20 °C 备用。

1.4 *TaAPI-3* 的克隆

基于 NCBI 中登录号为 AM502871 的序列,通过引物设计软件 Primer 5.0 设计引物 *TaAPI-3* (表 1)。分别选取 CM28 和 CM28TP 中 7~10 mm 的小穗 cDNA 分别为模板进行 PCR 扩增,反应体系 20 μL: 2 × PCR mix 10 μL, 上下游引物各 1 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。反应程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将目的片段切胶回收,连接至 pMD19-T 载体,重组质粒导入 DH5α 感受态细胞,涂布于含有 100 μg/mL Amp⁺ 的固体培养基上,37 °C 培养,筛选阳性克隆单菌落测序。

1.5 *TaAPI-3* 基因序列分析及系统进化树的构建

对获得的基因 (*TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、*TaAPI-3c*) cDNA 序列运用 NCBI 中的 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blast 程序进行序列同源性分析,验证克隆片段是否正确。利用在线工具 ORF Find 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析基因的开放阅读框 (ORF)。利用 DNAMAN 5.0 进行基因序列同源性比较。使用 ClustalX 1.83 软件对得到氨基酸序列进行多重序列比对,再使用

MEGA 5.0 软件中的邻近相连法进行建树,并进行 Bootstrap 检测。

1.6 实时荧光定量分析

以 CM28TP 和川麦 28(CM28)二棱期-小花分化期、雌雄蕊原基分化期、药隔期的小穗为试验材料,分别提取总 RNA(方法同 1.2),并反转录 cDNA(方法同 1.3)。应用 Primer Express 2.0 软件设计定量引物 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、*TaAPI-3c* 和 *TaAPI-3a*

探针、*TaAPI-3b* 探针、*TaAPI-3c* 探针(表 1)。

选用 BIORAD CFX96 Real-time PCR 仪进行实时定量分析,具体操作按照 SsoFast™ EvaGreen Supermix (BIO-RAD, 中国)试剂盒操作说明进行。以 *Actin* (AB181991) 和 *Ubiq* (DQ086482) 为内参基因^[17-18],利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 在供试材料小穗不同发育阶段的相对表达量。

表 1 *TaAPI-3* 克隆及荧光定量 PCR 引物序列

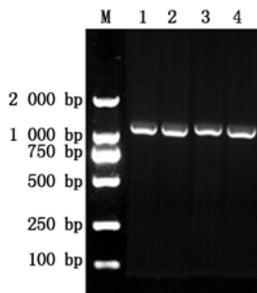
Tab.1 Sequences of primers for *TaAPI-3* cloning and Real-time PCR

用途 Application	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature
cDNA 扩增 cDNA amplification	<i>TaAPI-3F</i>	CACAACCTAGCTTTCATAA	52
	<i>TaAPI-3R</i>	CCATCTCCCCTCACCG	
荧光定量 Real-time PCR	<i>TaAPI-3aF</i>	CAGCAACAACAACAAATG	51
	<i>TaAPI-3aR</i>	TGAAACTGGAAGATGATGA	
	<i>TaAPI-3bF</i>	GCAACAACAACAACAGAT	50
	<i>TaAPI-3bR</i>	TGAAACTGGAGGATGATG	
	<i>TaAPI-3cF</i>	CAGCAACAACAACAAATG	50
	<i>TaAPI-3cR</i>	TGAAACTGGAAGATGATGA	
探针 Probe	<i>TaAPI-3a</i> 探针	CAGCAACAACAACAAATG	51
	<i>TaAPI-3b</i> 探针	GCAACAACAACAACAGAT	50
	<i>TaAPI-3c</i> 探针	CAGCAACAACAACAAATG	50
内参 Internal reference	<i>Actin-F</i>	CTATCCTTCGTTTGGACCTTGC	55
	<i>Actin-R</i>	AGCGAGCTTCTCCTTTATGTCTC	
	<i>Ubiq-F</i>	AAGGCGAAGATCCAGGACAAG	55
	<i>Ubiq-R</i>	TGGATGTTGTAGTCCGCCAAG	

2 结果与分析

2.1 *TaAPI-3* 基因 cDNA 序列分析

利用表 1 所示引物对 CM28 和 CM28TP 中 *TaAPI-3* 基因的 cDNA 全长进行了扩增,获得与预期大小(1 210 bp)相符的条带(图 1)。为避免操作误差,PCR 扩增重复 2 次。



M. Marker 2000; 1, 2. CM28; 3, 4. CM28TP。

图 1 *TaAPI-3* 基因扩增结果

Fig. 1 Amplification of the putative fragment of *TaAPI-3* genes

每个克隆挑取 15 个单菌落进行测序,测序结果表明该基因在 CM28 和 CM28TP 中各有 3 个同源序列,序列比对发现 CM28 和 CM28TP 中的 3 个同源序列高度一致,因此,在 CM28 和 CM28TP 中共分析了 3 条同源序列,并命名为 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、

TaAPI-3c。大小分别为 1 210, 1 208, 1 199 bp;开放阅读框 ORF 分别为 825, 816, 855 bp;分别编码 274, 271, 284 个氨基酸残基。在 NCBI 数据库中利用 Blast 程序进行基因同源性检索发现,*TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、*TaAPI-3c* 序列与中国春 *TaAPI-3* 的序列相似度分别为 96.02%, 93.1% 和 93.56%。用 DNAMAN 进行碱基序列比对显示,3 条同源序列均具有高保守的 M 区结构域以及半保守的 K 区,说明 3 条克隆序列为典型的 MADS-box 基因。

对获得的 3 条同源序列 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、*TaAPI-3c* 与中国春 *TaAPI-3* (登录号:Am502871) 的编码区序列进行了比对分析(图 2)。在编码区共 21 个位点检测到 SNP 突变,5 个位置检测到的插入/缺失突变,全部位于 C 区。

2.2 *TaAPI-3* 氨基酸序列分析

将 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 的氨基酸序列与小麦 *TaAPI-3*、拟南芥 AP1、水稻 OsMADS15、玉米 ZAP1 氨基酸序列进行了比对分析。如图 3 所示,*TaAPI-3a* 与 AP1、OsMADS15、ZAP1 的相似度分别为 50.54%, 84.48%, 82.46%;*TaAPI-3b* 分别为 51.65%, 85.35%, 84.70%;*TaAPI-3c* 分别为 48.59%, 66.90%, 68.66%。*TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、*TaAPI-3c* 与 *TaAPI-3* 的相似性高达 99%, 95%, 97%, 共 59

处检测到氨基酸残基改变,其中,M区有3处,K区 1处,其余位于C区。

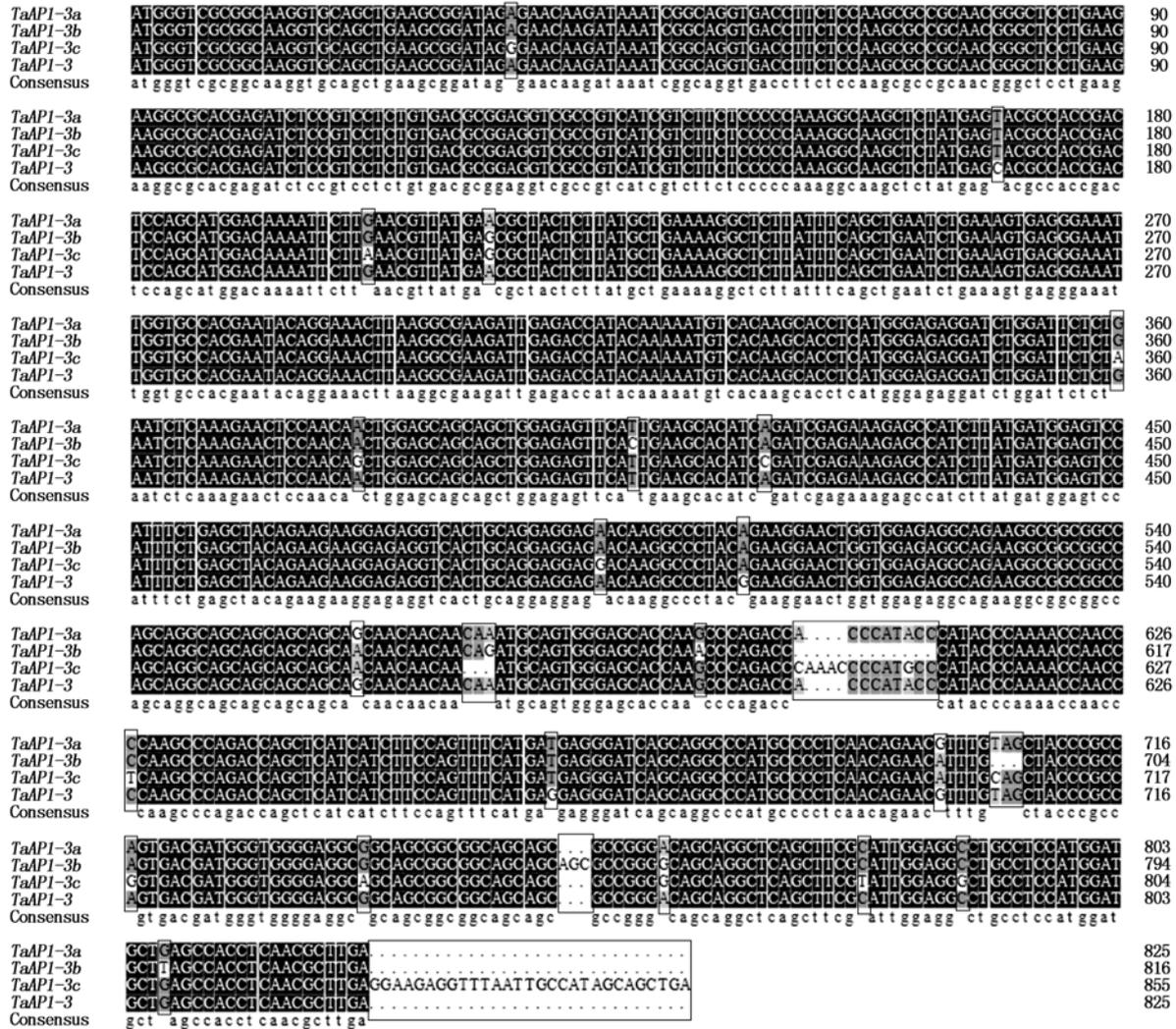


图2 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、*TaAPI-3c* 与中国春 *TaAPI-3* 序列比对结果

Fig.2 Sequence alignment of *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b*, *TaAPI-3c* with *TaAPI-3* from Chinese Spring

TaAPI-3a、TaAPI-3b 和 TaAPI-3、OsMADS15、ZAPI 的 C 端都含有一个 FUL 蛋白保守结构域 LPPWML,而 TaAPI-3c 既不具有结构域 LPPWML,也不具有 API 蛋白结构域 CFAA。

2.3 TaAPI-3 氨基酸序列聚类分析

为进一步了解 TaAPI-3a、TaAPI-3b 和 TaAPI-3c 与其他 API/SQUA 亚家族 A 类基因的亲缘关系,我们利用推导氨基酸序列构建系统发育树(图 4)。发育树显示,API/SQUA 亚家族基因被分为双子叶和单子叶两大谱系。双子叶植物谱系包含 API 和 FUL 类蛋白基因,单子叶谱系包括只编码 FUL 类蛋白的基因,已经进化出 FUL1、FUL2 和 FUL3 这 3 个分支。本试验得到的 3 个序列(TaAPI-3a、TaAPI-3b 和 TaAPI-3c)都包含在 FUL2 类基因中。

2.4 TaAPI-3 基因表达模式的实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 分析

为进一步探讨分离得到的 3 个同源基因在

CM28 和 CM28TP 中的表达是否有差异,通过 Real-time PCR 研究了 3 个同源基因在小穗各发育时期的表达模式。由图 5 可以看出, *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 在 2 种材料的 3 个时期均有表达,但各个时期的表达量有明显差异。在 CM28 幼穗中, *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 的表达量均是二棱期至小花分化期(2 ~ 5 mm)最高,而雌雄蕊原基分化期和药隔期的表达量比较接近。在 CM28TP 幼穗中, *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 的表达量均是在雌雄蕊原基分化期(穗长 5 ~ 7 mm)最高,且显著高于二棱期至小花分化期和药隔期的表达量。此外,在药隔期,3 个同源基因在 CM28TP 的表达水平均很低,明显低于在 CM28 中表达量。这表明, *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 在 CM28 和 CM28TP 幼穗中的表达模式存在明显差异,CM28 中主要在二棱期 - 小花分化期(穗长 2 ~ 5 mm)表达,CM28TP 中主要在雌雄蕊原基分化期(穗长 5 ~ 7

mm) 表达。

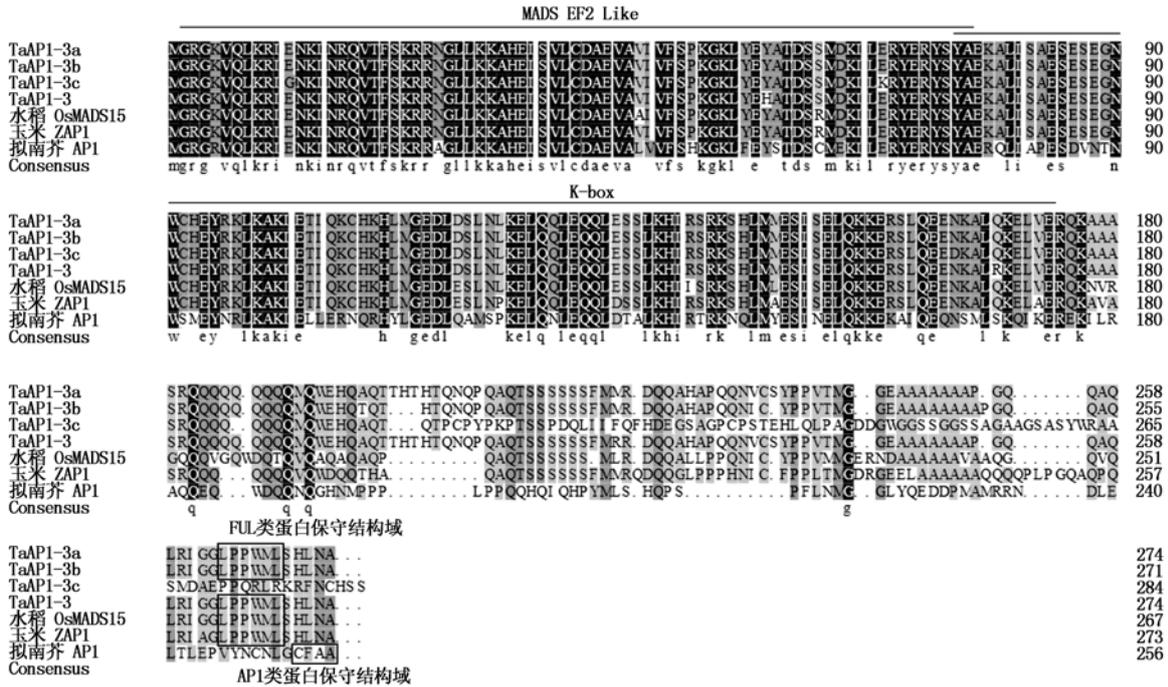


图3 TaAPI-3a、TaAPI-3b、TaAPI-3c 与拟南芥 AP1、水稻 OsMADS15、玉米 ZAP1 及中国春 TaAPI-3 的氨基酸序列比对结果

Fig.3 The amino acid sequences alignment of TaAPI-3a, TaAPI-3b, TaAPI-3c with AP1 (A. thaliana), OsMADS15 (O. sativa), ZAP1 (Z. mays) and TaAPI-3 (T. aestivum)

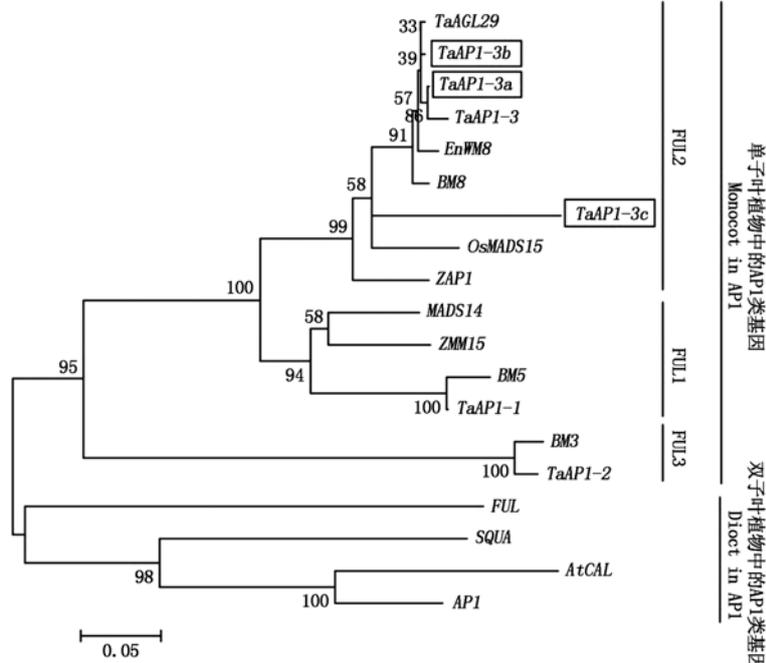
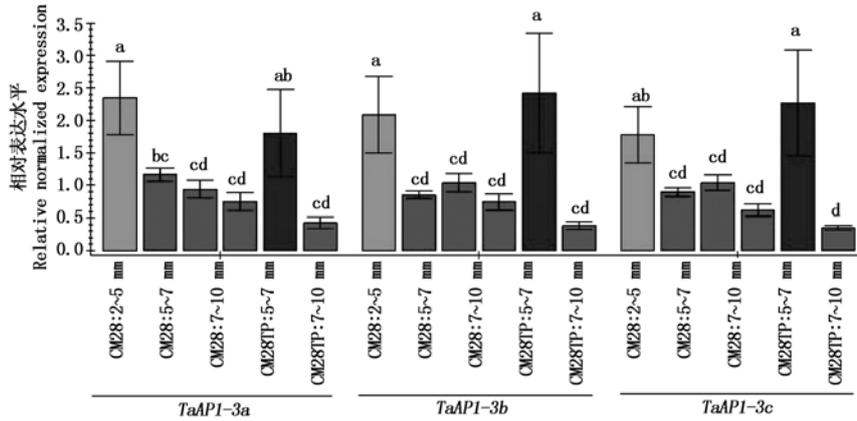


图4 TaAPI-3 氨基酸序列聚类分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of TaAPI-3 amino acid sequence

各节点处数值表示 Bootstrap 值(重复 1 000 次);系统进化树分析涉及的基因序列如下:垂穗披碱草. *wm8* (AE013431.1);水稻. *MADS14* (AAF19047.1), *OsMADS15* (AAF19048.1);大麦. *BM8* (CAB97354.1), *BM3* (CAB97351.1), *BM5* (CAB97352.1);小麦. *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b*, *TaAPI-3c*, *TaAGL29* (ABF57930.1), *TaAPI-1* (CAM59047.1), *TaAPI-2* (CAM59048.1), *TaAPI-3* (CAM59049.1);玉米. *ZAP1* (NP001105333.1), *ZMM15* (ACG35179.1);拟南芥. *FUL* (AAA97403.1), *AtCAL* (NP_564243.1), *API* (NP_177074.1);金鱼草. *SQUA* (CAA45228.1). The numbers next to the nodes give bootstrap values of 1 000 replicates; The A group MADS-box genes listed in the tree are as follows: *Elymus nutans*. *wm8* (AE013431.1), *Oryza sativa*. *MADS14* (AAF19047.1), *OsMADS15* (AAF19048.1). *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*. *BM8* (CAB97354.1), *BM3* (CAB97351.1), *BM5* (CAB97352.1); *Triticum aestivum*. *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b*, *TaAPI-3c*, *TaAGL29* (ABF57930.1), *TaAPI-1* (CAM59047.1), *TaAPI-2* (CAM59048.1), *TaAPI-3* (CAM59049.1); *Zea mays*. *ZAP1* (NP001105333.1), *ZMM15* (ACG35179.1); *Arabidopsis thaliana*. *AtCAL* (NP_564243.1), *FUL* (AAA97403.1), *API* (NP_177074.1); *Antirrhinum majus*. *SQUA* (CAA45228.1).



柱状图上的不同字母表示差异达到0.05显著水平。

Different letters on each column are significantly different at 0.05 level.

图5 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 基因在 CM28 和 CM28TP 3 个时期的表达量分析

Fig. 5 Relative expression levels of *TaAPI-3a*, *TaAPI-3b* and *TaAPI-3c* genes

3 讨论

生殖过程是高等植物生活史中最重要的阶段,与植物生殖密切相关的花器官的发育一直是植物学家的研究重点之一。人们对植物花发育的研究主要集中在拟南芥和金鱼草两类模式植物,近年来单子叶植物如水稻、玉米、大麦的花发育研究也逐渐增多。然而,同属单子叶作物的小麦的研究比较薄弱。本试验依据 NCBI 上公布的 *TaAPI-3* (*T. aestivum*) 序列设计引物,从 CM28TP 和 CM28 幼穗中扩增 *TaAPI-3* 基因。核苷酸和氨基酸序列比对发现从 CM28TP 和 CM28 中均得到 3 个同源基因序列,且 3 个同源序列在 2 个材料间高度一致。这表明三雌蕊性状与 3 个同源基因序列本身没有直接关系。此外,小麦是异源六倍体物种,有 A、B、D 这 3 个基因组,分别来自 3 个二倍体祖先种。本试验得到的 3 个同源基因是否正好是分别位于 A、B、D 基因组的 3 个等位基因,有待进一步研究。

氨基酸序列比对显示, *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c*、*OsMADS15* (*O. sativa*) 和 *ZAPI* (*Z. mays*) 的 C 端都含有 1 个 LPPWML 保守结构域,这个结构域也同样存在于拟南芥 FUL 类蛋白中,而 API 类蛋白中没有。API 蛋白的 C 端有 1 个保守的 CFAA 结构域^[19],是其行使功能的 1 个必要修饰,FUL 类蛋白不存在这个结构域。这说明 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 是拟南芥 FUL 基因的直系同源基因,而非拟南芥 API 的直系同源基因,*TaAPI-3c* 的 C 端既不具有 LPPWML 结构域,也不具有 CFAA 结构域,但进化树显示, *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、*TaAPI-3c* 全部聚集在 FUL2 类基因中,推测 LPPWML 结构域可能不是 FUL 类蛋白所必需的。

在系统发育树上位置接近的基因其功能具有一

定的相关性,但由于其表达模式的不同,它们又具有各自所特异的一些功能^[20]。进化树显示,3 个同源基因与 *OsMADS15* (*O. sativa*)、*ZAPI* (*Z. mays*)、*BM8*、*TaAGL29*、*EnWM8* (*E. nutans*)、*TaAPI-3* 聚在 FUL2 类基因分支。FUL2 类基因在叶片和小穗中都有表达,但在叶片和小穗中的表达量一般都低于 FUL1 类基因。FUL2 类基因可能部分发生了亚功能化而在小穗发育的特定阶段中起作用^[21]。由此推测,本研究得到的 3 个同源基因也具有 FUL2 类基因的功能,但又具有功能上的分化。从进化树可以看出, *TaAPI-3a* 和 *TaAPI-3b* 与 *TaAGL29* (*T. aestivum*) 关系最近,与大麦 *BM8* 的进化关系也较近。*TaAGL29* 的表达几乎遍于各种组织,如根、叶和花序,不仅在非生殖部位(外稃,内稃和颖片),而且在雄蕊和雌蕊中高水平表达^[22]。*BM8* 的表达仅限于生殖器官,不在营养器官表达^[23],在大麦小花外稃、内稃、花药、子房以及维管系统器官原基和整个花序发育阶段小花的维管组织中充分表达。根据进化树我们推测, *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 与 *TaAGL29* 和 *BM8* 有相似的表达和功能,具体的功能尚需进一步试验验证。此外, *TaAPI-3a* 和 *TaAPI-3b* 在 1 个分支,而 *TaAPI-3c* 单独在 1 个分支,而且距离 *TaAPI-3a* 和 *TaAPI-3b* 较远,暗示 *TaAPI-3c* 在序列进化上与 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 有一定差异,这与氨基酸序列比对结果一致,在功能上与 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 可能也有一定分化。

已知 ABC 模型认为,A 类基因在花的第 1,2 轮发育中表达,C 类基因在第 3,4 轮花器官中表达。A 与 C 相互拮抗。与大多数开花植物相似,拟南芥的花由四轮基本的花器官组成:从外向里分别为花萼、花瓣、雄蕊及雌蕊,而小麦花序分生组织的单位是小穗,小穗由小花和 2 个颖片组成,小花从外到内依次

是外稃、内稃、浆片、雄蕊和雌蕊^[24]。Ambrose 等^[25]提出禾谷类作物的内/外稃相当于萼片,浆片等同于花瓣,因而认为 ABC 模型同样适用于禾谷类作物花器官的形态建成。Paolacci 等^[10]研究认为,中国春 *TaAPI-3* 在整个发育阶段的小穗中均有表达, *TaAPI-3* 与 *OsMADS15*^[26]、*ZAPI*^[27] 有类似的表达模式。*OsMADS15* 基因主要在水稻植株的节、节间、成熟叶片、内稃和外稃、浆片中表达,而在雄蕊、心皮中表达量低或没有,过量表达 *OsMADS15* 基因后,可引起水稻矮化、早花,并且对水稻穗的发育有重要影响^[28]。本研究我们通过定量 PCR,分析了 3 个同源基因在不同发育阶段小穗的表达情况。结果显示,3 个同源基因在普通小麦 CM28 和三雌蕊突变体 CM28TP 的 3 个时期(二棱期-小花分化期、雌雄蕊原基分化期、药隔时期)的小穗中均有表达,这与 Paolacci 等^[10]的试验结果一致。本研究中所用材料 CM28 和 CM28TP 是 1 对近等基因系,CM28 表现为一粒,而 CM28TP 表现为 3 粒,其他性状表现高度一致^[15]。定量结果显示,3 个同源基因在 CM28 和三雌蕊突变体 CM28TP 小穗中的表达模式不同。在普通小麦 CM28 中,3 个同源基因在二棱期-小花分化期(2~5 mm)表达量最高,在雌雄蕊原基分化期表达量较低,而 3 粒小麦 CM28TP 中,在二棱期-小花分化期表达量较低,在雌雄蕊原基分化期(穗长 5~7 mm)高水平表达。雌雄蕊原基分化期是形成雄蕊和雌蕊的关键时期,该时期应该是决定内外稃、浆片特征的 A 类基因低水平表达,决定雄蕊和雌蕊特征的 B、C 类基因高水平表达,然而 CM28TP 中,A 类基因 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b*、*TaAPI-3c* 在雌雄蕊原基分化期高水平或过量表达,这种表达模式的改变可能与相关 C 类功能基因失活或功能改变有关,进而使雌蕊的分化异常,导致三雌蕊的出现。生物性状的改变,不是由某一个或者某一类基因表达异常造成的,而是由多个基因相互作用实现的。根据本研究结果,我们只能推测 3 个 A 类同源基因 *TaAPI-3a*、*TaAPI-3b* 和 *TaAPI-3c* 参与了三粒/一粒性状,而不能说它导致了这一性状,三雌蕊形成的分子机制还有待于进一步探究。

参考文献:

- [1] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls; genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature*, 1991, 353: 31-37.
- [2] Meyerowitz E M, Bowman J L, Brockman L L, et al. A genetic and molecular model for flower development on *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 1991, 112 (Suppl): 157-167.
- [3] Angenent G C, Franken J, Busscher M, et al. A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(10): 1569-1582.
- [4] Honma T, Goto K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs [J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 525-529.
- [5] Theissen G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4: 75-85.
- [6] Zahn L M, Kong H, Leebens-Mack J H, et al. The evolution of the SEPALLATA subfamily of MADS-box genes: a preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history [J]. *Genetics*, 2005, 169(4): 2209-2223.
- [7] Messenguy F, Dubois E. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development [J]. *Gene*, 2003, 316: 1-21.
- [8] Munster T, pahnke J, Di Rosa A, et al. Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes Preexisting in the common ancestor of ferns and seed Plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2415-2420.
- [9] Kaufmann K, Melzer R, Theissen G. MIKC-type MADS domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants [J]. *Gene*, 2005, 347: 183-198.
- [10] Paolacci A R, Tanzarella O A, Porceddu E A, et al. Molecular and phylogenetic analysis of MADS-box genes of MIKC type and chromosome location of SEP-like genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2007, 278(6): 689-708.
- [11] 陈济世, 张岭华, 吴秉礼. “三粒小麦”的发现及选育初报 [J]. *作物学报*, 1983, 9(1): 69-71.
- [12] Peng Z S. A new mutation in wheat producing three pistils in a floret [J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2003, 189: 270-272.
- [13] Peng Z S, Yang J, Wei S H, et al. Characterization of the common wheat (*Triticum aestivum* L.) mutation line producing three pistils in a floret [J]. *Hereditas*, 2004, 141(1): 15-18.
- [14] Murai K, Takumi S, Koga H, et al. Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat [J]. *The Plant Journal*, 2002, 29: 169-182.
- [15] 杨在君, 彭正松, 周永红, 等. 利用 SRAP 分子标记评价小麦三雌蕊近等基因系的遗传背景 [J]. *核农学报*, 2012, 26(1): 22-27.
- [16] 谷祝平. 生物显微技术 [M]. 石家庄: 河北教育出版社, 1993.

- [17] Yamada K, Saraike T, Shitsukawa N A, *et al.* Class D and B-sister MADS-box genes are associated with ectopic ovule formation in the pistil-like stamens of alloplasmic wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71(1/2): 1–14.
- [18] 杨在君. 小麦三雌蕊突变体幼穗中基因的差异表达分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011: 39–40.
- [19] Yalovsky S, Rodríguez-Concepción M, Bracha K, *et al.* Prenylation of the floral transcription factor APETALA1 modulates its function [J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(8): 1257–1266.
- [20] Ciaffi M, Paolacci A R, Tanzarella O A, Porceddu E. Molecular aspects of flower development in grasses [J]. *Sex plant reproduction*, 2011, 24: 247–282.
- [21] Preston J C, Kellogg E A. Reconstructing the evolutionary history of paralogous APETALA1/FRUITFULL-like genes in grasses (Poaceae) [J]. *Genetics*, 2006, 174(1): 421–437.
- [22] Zhao T, Ni Z F, Dai Y, *et al.* Characterization and expression of 42 MADS-box genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, 276(4): 334–350.
- [23] Schmitz J, Franzen R, Ngyuen T H, *et al.* Cloning, mapping and expression analysis of barley MADS-box genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42(6): 899–913.
- [24] 王力先, 王永飞. 被子植物花发育的 ABC 模型研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2007, 13(8): 49–51.
- [25] Ambrose B A, Lerner D R, Ciceri P, *et al.* Molecular and genetic analyses of the *silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots [J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(3): 569–579.
- [26] Kyoizuka J, Kobayashi T, Morita M, *et al.* Spatially and temporally regulated expression of rice MADS box genes with similarity to Arabidopsis class A, B and C genes [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2000, 41(6): 710–718.
- [27] Mena M, Mandel M A, Lerner D R, *et al.* A characterization of the MADS-box gene family in maize [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 1995, 8(6): 845–854.
- [28] 陆孙杰. 水稻 *OsMADS15* 基因功能研究及用酵母双杂筛选互作蛋白[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 7–46.

欢迎订阅 2015 年《河南农业科学》

《河南农业科学》是河南省农业科学院主办的综合性农业科技期刊。多年来,深受省内外农业科技人员、农业院校师生等涉农读者的喜爱。本刊连续被评为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊、RCCSE 中国核心学术期刊(A-)和中国农业核心期刊。曾多次获得有关部门的奖励,被评为“全国优秀农业期刊”;连续荣获“河南省优秀科技期刊一等奖”、“河南省自然科学期刊综合质量检测一级期刊”,“河南省第一、二届自然科学二十佳期刊”。

栏目设置有:综述、作物栽培·遗传育种、农业资源与环境、植物保护、园艺·林学、畜牧·兽医、农产品加工·农业工程·农业信息技术。

本刊为月刊,国际标准 16 开本,160 页,彩色封面,每期定价 18.00 元,全年 216 元。各地邮局均可订阅,邮发代号:36–32。如错过订期,可直接与本刊编辑部联系订阅。

网址: <http://www.hnnykx.org.cn>

地址:郑州市花园路 116 号

E-mail: hnnykx@163.com

邮编:450002

电话:0371–65739041

传真:0371–65712747