

人工异源六倍体小麦部分同源基因的表达变化

王延召¹, 聂利红¹, 孙其信^{2*}, 胡学安¹, 魏良明¹, 周 波¹

(1. 河南省农业科学院, 河南 郑州 450002; 2. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为了研究小麦从四倍体到六倍体进化过程中部分同源基因的表达变化, 以人工异源六倍体小麦 SCA/SQ 及其亲本 SCAUP 和 SQ523 为材料, 采用 cDNA-SSCP 方法分析了 208 个部分同源基因不同拷贝的表达情况。结果表明, 有 10 个来自父本的拷贝在人工异源六倍体小麦中沉默, 进一步分析了这些沉默表达的基因, 发现其中有 5 个是由于在 DNA 序列上丢失, 而另外 5 个可能是由于甲基化或者其他机制引起的。

关键词: 人工异源六倍体小麦; 多倍化; 基因表达变化

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)11-0019-03

Expression of Homoeologous Gene in Synthetic Hexaploid Wheat

WANG Yan-zhao¹, NIE Li-hong¹, SUN Qi-xin^{2*}, HU Xue-an¹, WEI Liang-ming¹, ZHOU Bo¹

(1. Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to understand the homoeologous gene changes during the evolution of hexaploid wheat from tetraploid one, the artificial synthesized heterogenous hexaploid wheat SCA/SQ and its parents SCAUP and SQ523 were taken as materials to study the homoeologous gene expression by means of cDNA-SSCP analysis. Results showed that 10 gene copies from male parent SQ523 were silenced in synthetic hexaploid wheat, among which 5 copies were caused by the loss of corresponding DNA sequences, and other 5 ones were due to methylation or other mechanisms according to the DNA-SSCP analysis.

Key words: synthetic hexaploid wheat; polyploidization; gene expression changes

杂交和多倍化是植物物种形成的一个重要途径。野生及栽培驯化的多倍体在农业生产中发挥了巨大的作用, 但新形成的异源多倍体不稳定, 发生了快速而广泛的基因组结构^[1-2]和基因表达水平^[3-4]的变化。普通小麦是通过 2 次天然杂交和加倍形成的异源六倍体, 是研究植物多倍化的经典材料。杂交将不同的基因组融合到一个细胞核, 多倍化导致基因组加倍^[5]。多倍化后重复基因在进化过程中的命运是近年来国际上遗传育种领域关注的热点, 尽管已取得一定的进展^[6-7], 但知之甚少。SSCP (single strand conformation polymorphism, 单链构象多态性) 是由 Nouri 等^[8]首次建立的, 经过不断的完善和发展, 已成为一种快速、灵敏筛查已知基因突变位点, 识别未知基因突变的新技术。Forsstrom 等^[9]研究表明, 利用 SS-

CP 方法可以分辨小麦基因组中部分同源基因的 DNA 序列。Bottley 等^[10]利用 SSCP 方法研究了来自 A、B、D 不同基因组上的部分同源基因在小麦中的表达情况, 结果表明, 部分同源基因的表达变化具有器官特异性。为了研究小麦从四倍体到六倍体进化过程中部分同源基因的表达变化, 本试验以一套来自 CIMMYT 的人工合成六倍体小麦及其四倍体和二倍体亲本为材料, 利用 SSCP 技术, 分析了人工异源六倍体小麦中部分同源基因不同拷贝的表达变化, 并对部分同源基因沉默的机制进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

用四倍体小麦 SCAUP (AABB) 作母本和粗山

收稿日期: 2012-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370878)

作者简介: 王延召 (1978-), 男, 河南禹州人, 副研究员, 博士, 主要从事植物遗传育种研究。E-mail: yz9839@126.com

* 通讯作者: 孙其信 (1962-), 男, 甘肃景泰人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: qxsun@cau.edu.cn

羊草 SQ523(DD)作父本,获得杂交 F_1 ,然后通过秋水仙素加倍,获得人工六倍体小麦 SCA/SQ(AABBDD),经过自交多代,获得稳定的人工六倍体小麦,该试验材料由国际玉米小麦改良中心(CIMMYT)提供。亲本和人工六倍体小麦种于河南省农业科学院培养室,三叶期取材。

1.2 DNA 提取

采用 CTAB 方法提取基因组 DNA。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

用 Trizol 试剂提取总 RNA,其中的痕量 DNA 用 DNA 酶 I 纯化,然后用 PolyATtract[®] mRNA Isolation System (Promega) 试剂盒分离 mRNA。反转录 (20 μ L 反应体系) 如下:向 DEPC 处理过的 0.5 mL 离心管中加入总 RNA 2 μ L (1 μ g/ μ L),锚定引物 2 μ L (100 ng/ μ L),DEPC 处理过的超纯水 7 μ L,混匀离心,65~70 $^{\circ}$ C 变性 15 min,缓慢冷却至室温 (约 15 min),加入 4 μ L dNTP (2.5 mmol/L),4 μ L 反转录 buffer (5 \times),1 μ L 反转录酶 M-MLV (400 U/ μ L),0.5 U RNase 抑制剂 (40 U/ μ L),混匀离心,37 $^{\circ}$ C 放置 1 h。取出,95 $^{\circ}$ C 放置 5 min,以灭活反转录酶的活性。取出,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 SSCP 分析

SSCP 分析参照 Bottley 等^[10]的方法。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,35 个循环。

取 2 μ L PCR 产物,加入 4 μ L 变性缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,取出,立刻放入冰浴中。在 12% 非变性 PAGE 凝胶上电泳分离 (缓冲液置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱预冷),200 W 电泳 2 min,8 W 下恒功率电泳 18 h,硝酸银染色,室温干燥后,统计结果。

2 结果与分析

随机选取了 Bottley 等^[10]开发的 208 对引物,以供试材料的 cDNA 为模板,分析了人工异源六倍体小麦部分同源基因 (AB、D 基因组) 不同拷贝的表达变化。经 SSCP 图谱分析发现,有 10 个来自父本 SQ523(DD) 的拷贝在人工异源六倍体小麦 SCA/SQ(AABBDD) 中未检测出相应的条带,而 208 对引物在母本四倍体小麦 SCAUP(AABB) 中扩增的条带在人工异源六倍体小麦中均能检测到。这说明 208 个部分同源基因来自母本的拷贝在人工异源六倍体小麦中都能表达,而有 10 个来自父本的拷贝在人工异源六倍体中表达模式发生了改变。

对 10 个不表达的基因进行了 DNA-SSCP 分析发现,在人工异源六倍体和父本中有 5 个基因 (表 1、图 1) 能扩增出相同的条带,而另外 5 个基因^[5] (BG313738、BF483382、BG274576、BF145580、BE489901) 在父本中出现的条带在人工异源六倍体中没有检测到 (图 2)。

表 1 人工合成六倍体小麦中父本沉默的基因

基因	定位	推测功能	E 值
BE445428	1A 1B 1D	未知蛋白	2.5
BMI36937	1AL 1BL 1DL	未知蛋白	4e-24
BE498761	3AL 3BL 3DL	P0415C01.15	4e-24
BE497590	2AS 2BS 2DS	真核生物翻译起始因子 (eIF-5A, eIF-4D)	2e-18
BE591218	未知	转录因子	0.19

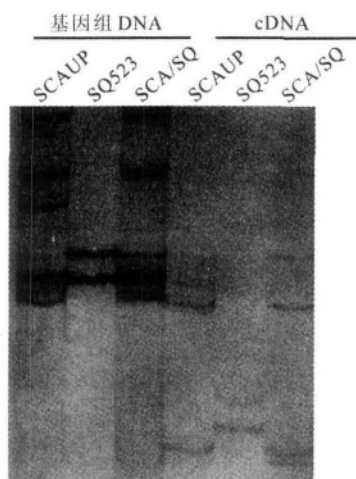


图 1 BE445428 在人工异源六倍体小麦及其亲本中的 SSCP 分析

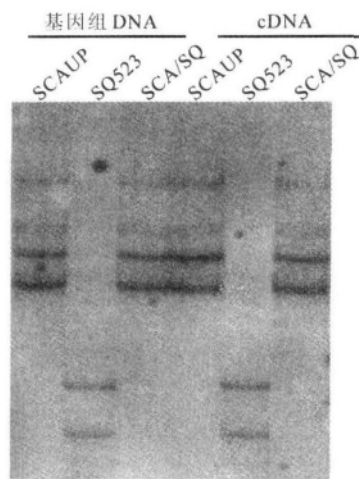


图 2 BG313738 在人工异源六倍体小麦及其亲本中的 SSCP 分析

3 讨论

普通小麦的基因型为 AABBDD, 是典型的异源六倍体。本研究采用 cDNA-SSCP 技术分析来源于四倍体母本和二倍体父本的部分同源基因在人工异源六倍体小麦中的表达变化, 结果表明, 208 对部分同源基因中有 10 个来自父本的拷贝发生了沉默, 而来自母本的拷贝没有发现沉默现象。因此, 推测小麦从四倍体向六倍体进化过程中, 部分同源基因的表达可能具有倾向性。其原因可能是倍性较低的亲本(DD)在多倍化过程中会发生更明显的变化, 也可能是因为本研究所用的人工异源六倍体小麦是以四倍体(AABB)为母本, 来自父本的基因为了适应新的细胞质环境, 在更大的范围上调整了基因的表达模式。

在 10 个不表达的基因中, *BE445428*、*BMI36937*、*BE498761* 等 5 个基因可能是由于 DNA 甲基化或其他某种调控机制而导致了基因沉默; 而 *BG313738*、*BF483382*、*BG274576* 等 5 个基因的不表达是因为序列丢失所致^[5]。这说明在小麦多倍化过程中, 除了表观遗传修饰以外, 基因 DNA 序列丢失和变异也是导致亲本基因在人工异源多倍体基因组中不能正常表达的主要原因之一。沉默的基因包括编码生长发育相关蛋白、转录因子以及真核生物翻译起始因子(eIF-5A、eIF-4D)的基因, 这表明多倍化过程中沉默的基因没有类型的倾向性。

参考文献:

- [1] Leitch A R, Leitch I J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants[J]. *Science*, 2008, 320: 481-483.
- [2] Gaeta R T, Chris P J. Homoeologous recombination in allopolyploids: The polyploidy ratchet[J]. *New Phytologist*, 2010, 186: 18-28.
- [3] He P, Friebe B R, Gill B S, *et al.* Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat[J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 401-414.
- [4] Chagué V, Just J, Mestiri I, *et al.* Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids[J]. *New Phytol*, 2010, 187(4): 1181-1194.
- [5] 聂利红, 韩宗福, 逯腊虎, 等. 人工合成六倍体小麦与亲本种之间基因组与基因区域的序列变异分析[J]. *自然科学进展*, 2008, 18(1): 45-50.
- [6] Pumphrey M, Bai J, Laudencia-Chingcuanco D, *et al.* Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat[J]. *Genetics*, 2009, 181(3): 1147-1157.
- [7] Hovav R, Udall J A, Chaudhary B, *et al.* Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(16): 6191-6195.
- [8] Noumi T, Mosher M E, Natori S, *et al.* A phenylalanine for serine substitution in the beta subunit of *Escherichia coli* F₁-ATPase affects dependence of its activity on divalent cations[J]. *J Biol Chem*, 1984, 259: 10071-10075.
- [9] Forsstrom P O, Koebner R, Merker A. The conversion of wheat RFLP probes into STS markers via the single-stranded conformation polymorphism technique[J]. *Genome*, 2003, 46(1): 19-27.
- [10] Bottley A, Xia G M, Koebner R M. Homoeologous gene silencing in hexaploid wheat[J]. *Plant J*, 2006, 47: 897-906.