

小麦分蘖角度 *TaTAC1* 基因同源克隆及表达分析

曹鑫, 邓梅, 张正丽, 刘宇娇, 杨希兰, 周红, 刘亚西

(四川农业大学小麦研究所分子生物学实验室, 成都 611130)

摘要:分蘖角度影响植物群体结构、光合效率以及植株的形态建成, 最终影响其产量及品质。小麦中关于分蘖角度的研究鲜有报道。前人研究显示, 水稻 *OsTAC1* 正向调控分蘖角度的大小, 玉米 *ZmTAC1* 与叶片角度呈正相关。本研究的目的是解析 *TaTAC1* 的表达模式并初步了解该基因的分子遗传机制及其与分蘖角度的遗传关系。本研究以 CN16、SM969、Lan2399、SHW-1 为材料, 利用同源克隆分离获得 *TaTAC1*, 利用生物信息学软件对 *TaTAC1* 进行序列特征分析, 应用实时荧光定量 PCR 对其表达模式进行分析, 并进行 *TaTAC1* 蛋白的亚细胞定位分析。结果显示, *TaTAC1* 长度约 1.1~1.2 kb, 包括 780 bp 的完整开放阅读框和 320~370 bp 的 3'-UTR。 *TaTAC1* 的 cDNA 序列分为 2 类, 其中 CN16-2、SM969-2 的第 10 号碱基发生突变, 引起终止子提前, 导致 *TaTAC1* 表达受阻; Lan2399-2 和 SHW-1-2 在 109~115 碱基位置有“CGCGCG”片段插入, 导致蛋白质 β -折叠片减少。表达分析表明, *TaTAC1* 在分蘖期的叶鞘、茎高效表达, 分蘖节其次, 叶与根表达量最低。相关分析表明该基因在分蘖节各时期表达量与分蘖角度呈显著正相关, Pearson 相关系数为 0.677, 其他组织表达量与分蘖角度无显著相关性。亚细胞定位分析显示 *TaTAC1* 定位于细胞膜。从上述结果可以推测 *TaTAC1* 在 mRNA 水平上正向调控分蘖角度, 且可能参与生长素极性运输过程从而改变分蘖角度大小。

关键词:小麦 (*Triticum aestivum* L.); 分蘖角度; *TaTAC1*; 同源克隆; 表达分析

Molecular Characterization and Expression Analysis of *TaTAC1* gene in *Triticum aestivum* L.

CAO Xin, DENG Mei, ZHANG Zheng-li, LIU Yu-jiao, YANG Xi-lan, ZHOU Hong, LIU Ya-xi

(Laboratory of Molecular Biology, Wheat Research Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130)

Abstract: Tillering angle affects plant population structure, photosynthetic efficiency and morphogenesis. It thus could ultimately affect the yield and quality for a given plant. To our knowledge, the studies on tillering angle in wheat are limited. It was reported that *OsTAC1* in rice positively controlled tillering angle and *ZmTAC1* in maize was positively correlated with blade angle. Here, we are aiming at analyzing expression pattern of *TaTAC1* and revealing the molecular genetic mechanisms of this gene and its genetic relationship with the tillering angle. To this end, we used four genotypes of common wheat, CN16, SM969, Lan2399 and SHW-1 for isolating *TaTAC1* based on homology cloning, characterized its sequence, analyzed its expression pattern using real-time fluorescent quantitative PCR, and performed the subcellular localization of this gene. Our results showed that *TaTAC1* was about 1.1-1.2 kb in length including 780 bp of a complete opening reading frame (ORF) and 320-370 bp of 3'-UTR. Two types of cDNA sequences for *TaTAC1* were identified. The sequences of CN16-2 and SM969-2 were grouped in Type I. The 10th base for these sequences was mutated, leading to the presence of a terminator. Expression of these genes was thus not detected. The sequences of Lan2399-2 and SHW-1-2 were grouped in Type II. A fragment of “CGCGCG” was inserted between 109th and 115th of these sequences, leading to the reduction of beta-pleated sheets. Expression profiling indicated that *TaTAC1* was mostly expressed in leaf sheath and stem at tillering stage followed by tillering

收稿日期: 2016-02-13 修回日期: 2016-05-06 网络出版日期: 2016-12-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161214.1435.026.html>

基金项目: 四川省科技支撑计划(2016NZ0057); 国家自然科学基金(31301317)

第一作者研究方向为麦类分子遗传育种。E-mail: 750383605@qq.com

通信作者: 刘亚西, 研究方向为小麦品质及抗逆分子遗传育种。E-mail: yaxi.liu@hotmail.com

node and least in leaf and root. Correlation analysis showed that the expression abundance of *TaTAC1* in tillering node throughout the investigated stages was significantly positively correlated with the angles of tillering ($R = 0.677$). No significant correlation was detected between expression of *TaTAC1* in other tissues and tillering angle. *TaTAC1* was located in cell membrane. Taken together, we suggested that *TaTAC1* positively regulated tillering angle at mRNA level, and it may be involved in auxin polar transport process to change the size of tillering angle.

Key words: wheat (*Triticum aestivum* L.); tillering angle; *TaTAC1*; homology-based cloning; expression analysis

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是世界一半以上人口的主要粮食, 其种植面积、总产量以及总贸易额均居各类作物之首。合理的小麦株型可较大幅度提高产量, 而分蘖角度是决定株型的主要因素之一, 研究与之相关的基因, 对于小麦理想株型的构建以及提高小麦产量具有重要的理论和实践意义。对禾本科植物而言, 主茎与分蘖的夹角即为分蘖角度。P. Li 等^[1]利用稻 (*Oryza sativa* L.) 大分蘖突变体克隆获得散生基因 *LAZY1*, 通过调节生长素的极性运输来调控水稻地上部分的向重力性, 从而影响分蘖角度的大小。X. Wu 等^[2]克隆得到通过影响水稻向重力性反应来调控分蘖角度的基因 *LPA1*。L. Tan 等^[3]和 J. Jin 等^[4]利用野生稻分离得到控制分蘖角度和分蘖数基因 *PROG1*, 该基因由一个碱基的突变引起氨基酸代换, 导致水稻由匍匐生长向直立生长转变。然而, 前人研究的 *TAC1* 基因与分蘖角度有着更为紧密的联系。B. Yu 等^[5]分离了控制分蘖角度的主效 QTL, 命名为 *Os-TAC1* (Tiller angle controlling 1)。分蘖角度较小的材料中, *tacl* 3'-UTR 内含子 3' 拼接点处的碱基由 "AGGA" 突变为 "GGGA" 导致 *tacl* 表达量下降, 分蘖角度几乎变为 0°。该基因主要在叶鞘、茎以及分蘖基部不伸长节等部位表达, 认为 *TAC1* 可能属于禾本科植物所特有的控制分蘖角度的新小基因家族。在玉米 (*Zea mays* L.) 中, L. Ku 等^[6]同源克隆得到 *ZmTAC1*, 由于当代栽培玉米基本是独秆, 不发生分蘖, 因此该基因不再控制玉米分蘖角度转而对叶片角度发挥调解作用。对 *ZmTAC1* 的 mRNA 水平表达分析, 其主要在叶鞘和叶枕部位表达。*ZmTAC1* 由于 5'-UTR 的碱基 "CTCC" 突变为 "CCCC" 后而发生变异, 导致玉米叶片与主茎的夹角发生改变, 且基因表达量达到最大值时, 叶角也达到最大, 这表明 *ZmTAC1* 正向调控玉米叶角大小。中国芒、高粱中也有 *TAC1* 相关研究^[7-8]。综上所述, 虽然分蘖角度在禾本科植物中已被大量研究, 但小麦中关于该性状的研究还未见报道。本研究将从小麦中同源克隆分蘖角度基因 *TaTAC1*, 拟通过序

列分析以及实时荧光定量 PCR, 初步解析该基因的分子遗传机制及生物学表达模式, 为小麦分蘖角度研究领域提供理论指导, 进而为小麦理想株型的选育奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

普通小麦 (*Triticum aestivum* L., AABBDD) 川农 16 (CN16)、蜀麦 969 (SM969)、人工合成六倍体小麦 Lan2399、SHW-1 均由四川农业大学小麦研究所提供。所有材料分别于 2013 年 10 月、2014 年 10 月种植于四川省成都市温江区惠和村小麦试验田 (30°42'46.40"N, 103°51'55.28"E), 行距 30 cm, 株距 50 cm, 每行 3 粒种子, 每个材料 10 行。生育期间正常施肥、浇水。生长 15 d 后, 每隔 5 d 取其叶、叶鞘、茎、分蘖节以及根 5 个组织, 每个组织取 2 个重复, 共取 7 个采样时间点。所有材料保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。小麦成熟期时, 对其分蘖角度进行测量并采集照片。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 按照成都百菲特科技有限公司的植物 RNA 提取试剂盒 (RN1103) 的方法提取 RNA, 并用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量^[9]。

1.2.2 cDNA 第 1 链的合成 利用 TaKaRa 宝生物公司的反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser-Perfect Real Time) 合成 cDNA 的第 1 链。

1.2.3 小麦 *TAC1* 基因 cDNA 序列的克隆 根据 *OsTAC1* (Os09g0529300)、*ZmTAC1* (LOC100277053) 和 *SbTAC1* (Sb02g030610) 基因 cDNA 中保守核苷酸序列设计一对特异性引物: Ta-F: ATGGCCCTANAG GTGTTCAAT; Ta-R: GGATAAAGCGGAGNGTTTANTG, 以所有材料的 cDNA 为模板扩增小麦 *TAC1* 基因 cDNA 序列。PCR 反应体系如下: 4 μL cDNA 模板、5 μL 10 × Ex Taq Buffer、4 μL MgCl₂、6 μL dNTP、0.5 μL TaKaRa Ex Taq、1 μL Primer Ta-F、1 μL Primer Ta-R、28.5 μL ddH₂O, 反应体系总体积为 50 μL。

PCR 反应程序为:① 94 °C 5 min;② 94 °C 30 s;③ 50 ~ 58 °C 30 s;④ 72 °C 1 min;⑤ 72 °C 7 min;⑥ 12 °C forever,其中②③④ 反应 35 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后利用天根生化科技有限公司(TIANGEN)普通琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化,然后与 TA 克隆载体 pMD19-T 连接,阳性单克隆检测送于生物公司测序后(TsingKe, Chengdu, China),利用 DNAMAN、CLC Genomics Workbench 8.0.2、MEGA 6.0 以及 NCBI 在线 BLAST 工具对基因序列进行比对分析,利用在线数据库 SWISS-MODEL 对 *TaTAC1* 蛋白进行三维结构预测。

1.2.4 荧光定量 RT-qPCR 为确保荧光定量实验数据的准确性,本研究利用前人^[10]已筛选出的在小麦中能稳定表达的内参基因,即 *Ta. 14126. 1*、*Ta. 7894. 3. A1_at* 和 *Actin*,其相对表达量的几何平均数将作为均一化标准。由于 PCR 扩增得到的小麦 *TAC1* 基因 ORF 序列高度保守,但个别碱基存在差异,为保证引物特异且扩增效率适宜,本研究利用 Primer 5.0 以及 DNAMAN 在扩增得到的基因序列的保守区域内设计荧光定量引物 D-F: CACCATTGATGATAATAAGGC; D-R: TTGGTCCACCTTTTCTTCAT。该引物通过溶解曲线及荧光定量 PCR 产物测序检测。cDNA 溶液经质粒提取后作为标准曲线的模板,将其以 10 的倍数梯度稀释,共稀释 7 个浓度梯度,用作标准曲线的制作和扩增效率的计算。荧光定量反应体系体积为 20 μ L,包括:2 μ L cDNA、9 μ L SYBR-GREEN I(TakaRa 公司)、0.5 μ L Primer D ~ F、0.5 μ L Primer D ~ R、8 μ L Dnase/Rnase-Free Water;PCR 反应程序:① 95 °C 2 min;② 95 °C 10 s;③ 56 °C 30 s;④ 72 °C 30 s;⑤ 79 ~ 80 °C 10 s;⑥ 65 ~ 95 °C 10 s;⑦ 25 °C 2 min。其中②③④⑤反应 41 个循环,⑥反应 61 个循环。所有样品生物重复 2 次,PCR 反应重复 3 次,每次 PCR 反应添加 2 个空白对照。小麦分蘖时期不同时段的基因相对转录水平根据 M. W. Pfaffl^[11]的方法计算,最后利用 Microsoft Excel 2010 统计数据。

1.2.5 亚细胞定位 按照南京诺唯赞生物科技有限公司(Vazyme)的一步克隆法将目的基因与真核载体连接形成重组载体,一步克隆所用的引物为:YXB-F: ACTCTTGACCATGGTAGATCTATGGCCCTAAAGGTGT TCAATTG; YXB-R: AAGTTCCTTCTCCTTTACTAGTG-GCACCAAGCAGAGGAGGTT;选择的酶切位点为 *Bgl* II 和 *Spe* I (Thermo 公司),然后将重组载体利用基因枪导入洋葱表皮细胞中 25 °C 暗箱培养 24 h 后,在荧光显微镜(OLYMPUS)下观察细胞中

的绿色荧光。

2 结果与分析

2.1 不同小麦品种分蘖角度差异

利用 Digi Angle 电子量角器测量成熟期小麦主茎与一级分蘖的夹角,每个材料测量 10 株,取平均值。在测量过程中收集小麦分蘖节部位的照片(图 1)。测量并计算后得到小麦分蘖角度分别为 CN16: 24°; SM969: 20°; Lan2399: 70°; SHW-1: 72°。Lan2399、SHW-1 的分蘖角度大小约是 CN16、SM969 的 3.5 倍。因此 Lan2399 和 SHW-1 相对于 CN16 和 SM969 为分蘖角度大的小麦。

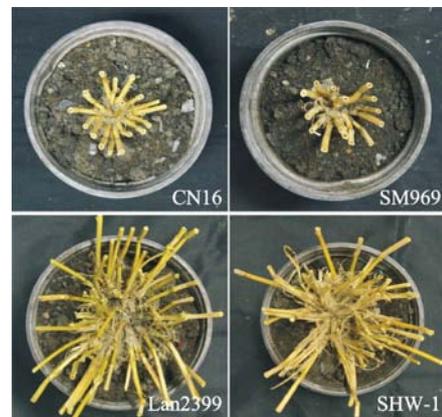
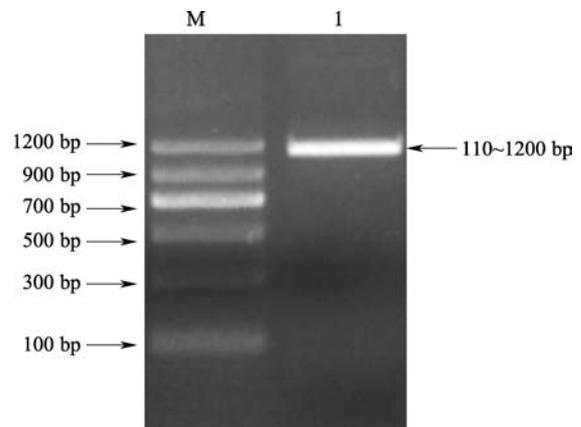


图 1 小麦成熟期分蘖节

Fig. 1 Tiller node of wheat at maturation stage

2.2 *TaTAC1* 基因 cDNA 序列特征分析

以 4 个材料生长 30 d 时 cDNA 作为模板,利用特异性引物扩增得到 1.1 ~ 1.2 kb *TaTAC1* 的 cDNA 序列(图 2),包括 780 bp 完整的 ORF 及 320 ~



M: TIANGEN MD100 Marker II; 1: 以 cDNA 为模板的扩增产物

M: TIANGEN MD100 Marker II, 1:

Amplification product with cDNA as template

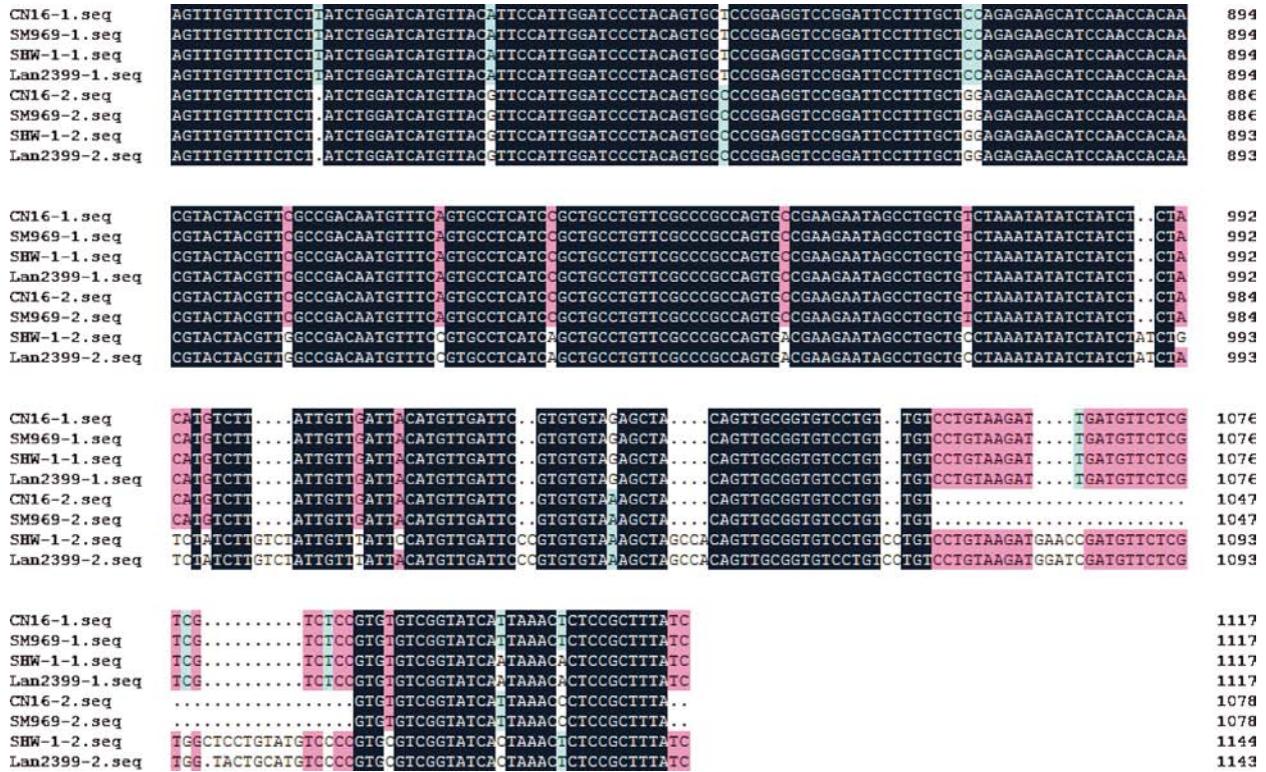
图 2 *TaTAC1* cDNA 扩增产物

Fig. 2 Amplification product of *TaTAC1* cDNA

370 bp 的 3'-UTR, 预测分子量约为 29022, 等电点约为 5.42。该基因编码 260 个氨基酸。进一步对 *TaTAC1* 进行分析, *TaTAC1* 的 cDNA 序列分为 2 类, 第一类序列命名为 CN16-1、SM969-1、Lan2399-1、SHW-1-1, 第二类序列则为 CN16-2、SM969-2、Lan2399-2、SHW-1-2 (图 3); CN16-1、SM969-1、Lan2399-1、SHW-1-1

的 cDNA 序列完全一致, CN16-2、SM969-2 的第 10 位碱基发生变异 (C-T), 导致终止子提前形成, 从而使 *TaTAC1* 表达受阻; Lan2399-2、SHW-1-2 的 109 ~ 115 位有 6 个碱基 (CGCGCG) 的插入, 导致精氨酸 (R) 和丙氨酸 (A) 的插入, 使得该蛋白的三维结构中减少一个 β -折叠片 (图 4)。

CN16-1.seq	ATGSCCCTAAGGTGTTCAATTGGCTGAATCGGAAGATGCATTCCAATGCGGAGTCTGCACCATTGATGATAAATAGGCCATGGAGAAGGAAGACTCTG	10C
SM969-1.seq	ATGSCCCTAAGGTGTTCAATTGGCTGAATCGGAAGATGCATTCCAATGCGGAGTCTGCACCATTGATGATAAATAGGCCATGGAGAAGGAAGACTCTG	10C
SHW-1-1.seq	ATGSCCCTAAGGTGTTCAATTGGCTGAATCGGAAGATGCATTCCAATGCGGAGTCTGCACCATTGATGATAAATAGGCCATGGAGAAGGAAGACTCTG	10C
Lan2399-1.seq	ATGSCCCTAAGGTGTTCAATTGGCTGAATCGGAAGATGCATTCCAATGCGGAGTCTGCACCATTGATGATAAATAGGCCATGGAGAAGGAAGACTCTG	10C
CN16-2.seq	ATGSCCCTAAGGTGTTCAATTGGCTGAATCGGAAGATGCATTCCAATGCGGAGTCTGCACCATTGATGATAAATAGGCCATGGAGAAGGAAGACTCTG	10C
SM969-2.seq	ATGSCCCTAAGGTGTTCAATTGGCTGAATCGGAAGATGCATTCCAATGCGGAGTCTGCACCATTGATGATAAATAGGCCATGGAGAAGGAAGACTCTG	10C
SHW-1-2.seq	ATGSCCCTAAGGTGTTCAATTGGCTGAATCGGAAGATGCATTCCAATGCGGAGTCTGCACCATTGATGATAAATAGGCCATGGAGAAGGAAGACTCTG	10C
Lan2399-2.seq	ATGSCCCTAAGGTGTTCAATTGGCTGAATCGGAAGATGCATTCCAATGCGGAGTCTGCACCATTGATGATAAATAGGCCATGGAGAAGGAAGACTCTG	10C
CN16-1.seq	TGCGCGGG.....AGTGTGGCTGAGCAAGACACTGAAGCCCTGCTGTCGGTGATGTGCTTCTTAATGGCATTCTTGGCATTGGCAGCTTGGCCACAA	194
SM969-1.seq	TGCGCGGG.....AGTGTGGCTGAGCAAGACACTGAAGCCCTGCTGTCGGTGATGTGCTTCTTAATGGCATTCTTGGCATTGGCAGCTTGGCCACAA	194
SHW-1-1.seq	TGCGCGGG.....AGTGTGGCTGAGCAAGACACTGAAGCCCTGCTGTCGGTGATGTGCTTCTTAATGGCATTCTTGGCATTGGCAGCTTGGCCACAA	194
Lan2399-1.seq	TGCGCGGG.....AGTGTGGCTGAGCAAGACACTGAAGCCCTGCTGTCGGTGATGTGCTTCTTAATGGCATTCTTGGCATTGGCAGCTTGGCCACAA	194
CN16-2.seq	TGCGCGGG.....AGTGTGGCTGAGCAAGACACTGAAGCCCTGCTGTCGGTGATGTGCTTCTTAATGGCATTCTTGGCATTGGCAGCTTGGCCACAA	193
SM969-2.seq	TGCGCGGG.....AGTGTGGCTGAGCAAGACACTGAAGCCCTGCTGTCGGTGATGTGCTTCTTAATGGCATTCTTGGCATTGGCAGCTTGGCCACAA	193
SHW-1-2.seq	TGCGCGGG.....AGTGTGGCTGAGCAAGACACTGAAGCCCTGCTGTCGGTGATGTGCTTCTTAATGGCATTCTTGGCATTGGCAGCTTGGCCACAA	20C
Lan2399-2.seq	TGCGCGGG.....AGTGTGGCTGAGCAAGACACTGAAGCCCTGCTGTCGGTGATGTGCTTCTTAATGGCATTCTTGGCATTGGCAGCTTGGCCACAA	20C
CN16-1.seq	CTTGAACCTCCTTTCCCTGAGGCCGCCATGAACAAGATGAGTTCATCGTCATGGATGAAGAAAAGGTGGACCAAGAAAGTTCGAAGAGGAAAAGTGT	294
SM969-1.seq	CTTGAACCTCCTTTCCCTGAGGCCGCCATGAACAAGATGAGTTCATCGTCATGGATGAAGAAAAGGTGGACCAAGAAAGTTCGAAGAGGAAAAGTGT	294
SHW-1-1.seq	CTTGAACCTCCTTTCCCTGAGGCCGCCATGAACAAGATGAGTTCATCGTCATGGATGAAGAAAAGGTGGACCAAGAAAGTTCGAAGAGGAAAAGTGT	294
Lan2399-1.seq	CTTGAACCTCCTTTCCCTGAGGCCGCCATGAACAAGATGAGTTCATCGTCATGGATGAAGAAAAGGTGGACCAAGAAAGTTCGAAGAGGAAAAGTGT	294
CN16-2.seq	CTTGAACCTCCTTTCCCTGAGGCCGCCATGAACAAGATGAGTTCATCGTCATGGATGAAGAAAAGGTGGACCAAGAAAGTTCGAAGAGGAAAAGTGT	287
SM969-2.seq	CTTGAACCTCCTTTCCCTGAGGCCGCCATGAACAAGATGAGTTCATCGTCATGGATGAAGAAAAGGTGGACCAAGAAAGTTCGAAGAGGAAAAGTGT	287
SHW-1-2.seq	CTTGAACCTCCTTTCCCTGAGGCCGCCATGAACAAGATGAGTTCATCGTCATGGATGAAGAAAAGGTGGACCAAGAAAGTTCGAAGAGGAAAAGTGT	294
Lan2399-2.seq	CTTGAACCTCCTTTCCCTGAGGCCGCCATGAACAAGATGAGTTCATCGTCATGGATGAAGAAAAGGTGGACCAAGAAAGTTCGAAGAGGAAAAGTGT	294
CN16-1.seq	GAGGACAAAGAAGAGGCATTGCTACAGCACCAGTGCACCAGAACCTGCTATTGAACCTGCCAGATGCATTATCGTCGATGAAGAATACAACCTTCA	394
SM969-1.seq	GAGGACAAAGAAGAGGCATTGCTACAGCACCAGTGCACCAGAACCTGCTATTGAACCTGCCAGATGCATTATCGTCGATGAAGAATACAACCTTCA	394
SHW-1-1.seq	GAGGACAAAGAAGAGGCATTGCTACAGCACCAGTGCACCAGAACCTGCTATTGAACCTGCCAGATGCATTATCGTCGATGAAGAATACAACCTTCA	394
Lan2399-1.seq	GAGGACAAAGAAGAGGCATTGCTACAGCACCAGTGCACCAGAACCTGCTATTGAACCTGCCAGATGCATTATCGTCGATGAAGAATACAACCTTCA	394
CN16-2.seq	GAGGACAAAGAAGAGGCATTGCTACAGCACCAGTGCACCAGAACCTGCTATTGAACCTGCCAGATGCATTATCGTCGATGAAGAATACAACCTTCA	387
SM969-2.seq	GAGGACAAAGAAGAGGCATTGCTACAGCACCAGTGCACCAGAACCTGCTATTGAACCTGCCAGATGCATTATCGTCGATGAAGAATACAACCTTCA	387
SHW-1-2.seq	GAGGACAAAGAAGAGGCATTGCTACAGCACCAGTGCACCAGAACCTGCTATTGAACCTGCCAGATGCATTATCGTCGATGAAGAATACAACCTTCA	394
Lan2399-2.seq	GAGGACAAAGAAGAGGCATTGCTACAGCACCAGTGCACCAGAACCTGCTATTGAACCTGCCAGATGCATTATCGTCGATGAAGAATACAACCTTCA	394
CN16-1.seq	CGTGTTCTGTAAGAAGAAATCCTGATGTGTGAAGTTGAAGTGGAGGATTTCTTAAGTCCAGGAACAACCACTTCTGATGGAGAGAAGGTGGAA	494
SM969-1.seq	CGTGTTCTGTAAGAAGAAATCCTGATGTGTGAAGTTGAAGTGGAGGATTTCTTAAGTCCAGGAACAACCACTTCTGATGGAGAGAAGGTGGAA	494
SHW-1-1.seq	CGTGTTCTGTAAGAAGAAATCCTGATGTGTGAAGTTGAAGTGGAGGATTTCTTAAGTCCAGGAACAACCACTTCTGATGGAGAGAAGGTGGAA	494
Lan2399-1.seq	CGTGTTCTGTAAGAAGAAATCCTGATGTGTGAAGTTGAAGTGGAGGATTTCTTAAGTCCAGGAACAACCACTTCTGATGGAGAGAAGGTGGAA	494
CN16-2.seq	CGTGTTCTGTAAGAAGAAATCCTGATGTGTGAAGTTGAAGTGGAGGATTTCTTAAGTCCAGGAACAACCACTTCTGATGGAGAGAAGGTGGAA	487
SM969-2.seq	CGTGTTCTGTAAGAAGAAATCCTGATGTGTGAAGTTGAAGTGGAGGATTTCTTAAGTCCAGGAACAACCACTTCTGATGGAGAGAAGGTGGAA	487
SHW-1-2.seq	CGTGTTCTGTAAGAAGAAATCCTGATGTGTGAAGTTGAAGTGGAGGATTTCTTAAGTCCAGGAACAACCACTTCTGATGGAGAGAAGGTGGAA	494
Lan2399-2.seq	CGTGTTCTGTAAGAAGAAATCCTGATGTGTGAAGTTGAAGTGGAGGATTTCTTAAGTCCAGGAACAACCACTTCTGATGGAGAGAAGGTGGAA	494
CN16-1.seq	AGTGAGAACTACACTTGTGATCTATTTCAGCCGAAACATTCTACCAAGTGATACAGGGGAGAAGAGTACCAGAAGACTGTATTATTGCTGGGGCA	594
SM969-1.seq	AGTGAGAACTACACTTGTGATCTATTTCAGCCGAAACATTCTACCAAGTGATACAGGGGAGAAGAGTACCAGAAGACTGTATTATTGCTGGGGCA	594
SHW-1-1.seq	AGTGAGAACTACACTTGTGATCTATTTCAGCCGAAACATTCTACCAAGTGATACAGGGGAGAAGAGTACCAGAAGACTGTATTATTGCTGGGGCA	594
Lan2399-1.seq	AGTGAGAACTACACTTGTGATCTATTTCAGCCGAAACATTCTACCAAGTGATACAGGGGAGAAGAGTACCAGAAGACTGTATTATTGCTGGGGCA	594
CN16-2.seq	AGTGAGAACTACACTTGTGATCTATTTCAGCCGAAACATTCTACCAAGTGATACAGGGGAGAAGAGTACCAGAAGACTGTATTATTGCTGGGGCA	587
SM969-2.seq	AGTGAGAACTACACTTGTGATCTATTTCAGCCGAAACATTCTACCAAGTGATACAGGGGAGAAGAGTACCAGAAGACTGTATTATTGCTGGGGCA	587
SHW-1-2.seq	AGTGAGAACTACACTTGTGATCTATTTCAGCCGAAACATTCTACCAAGTGATACAGGGGAGAAGAGTACCAGAAGACTGTATTATTGCTGGGGCA	594
Lan2399-2.seq	AGTGAGAACTACACTTGTGATCTATTTCAGCCGAAACATTCTACCAAGTGATACAGGGGAGAAGAGTACCAGAAGACTGTATTATTGCTGGGGCA	594
CN16-1.seq	TCCACTTCAAACCTACATTGTGCATGAAAAGACACATAAAAAGAAGCCAAATAAGCCAAATGCCAGATCCCTGGAAGGCTACGAGAAAATTAAGTCGAG	694
SM969-1.seq	TCCACTTCAAACCTACATTGTGCATGAAAAGACACATAAAAAGAAGCCAAATAAGCCAAATGCCAGATCCCTGGAAGGCTACGAGAAAATTAAGTCGAG	694
SHW-1-1.seq	TCCACTTCAAACCTACATTGTGCATGAAAAGACACATAAAAAGAAGCCAAATAAGCCAAATGCCAGATCCCTGGAAGGCTACGAGAAAATTAAGTCGAG	694
Lan2399-1.seq	TCCACTTCAAACCTACATTGTGCATGAAAAGACACATAAAAAGAAGCCAAATAAGCCAAATGCCAGATCCCTGGAAGGCTACGAGAAAATTAAGTCGAG	694
CN16-2.seq	TCCACTTCAAACCTACATTGTGCATGAAAAGACACATAAAAAGAAGCCAAATAAGCCAAATGCCAGATCCCTGGAAGGCTACGAGAAAATTAAGTCGAG	687
SM969-2.seq	TCCACTTCAAACCTACATTGTGCATGAAAAGACACATAAAAAGAAGCCAAATAAGCCAAATGCCAGATCCCTGGAAGGCTACGAGAAAATTAAGTCGAG	687
SHW-1-2.seq	TCCACTTCAAACCTACATTGTGCATGAAAAGACACATAAAAAGAAGCCAAATAAGCCAAATGCCAGATCCCTGGAAGGCTACGAGAAAATTAAGTCGAG	694
Lan2399-2.seq	TCCACTTCAAACCTACATTGTGCATGAAAAGACACATAAAAAGAAGCCAAATAAGCCAAATGCCAGATCCCTGGAAGGCTACGAGAAAATTAAGTCGAG	694
CN16-1.seq	TCGTGAAGAAGATGCTGGGGAAGAAGATCCACCCAGAGCAGCTCAATGGACGTAGTAAATGCAGAGGAACCTCCCTGCTTGGTGCCTAGSCTCGCGGACA	794
SM969-1.seq	TCGTGAAGAAGATGCTGGGGAAGAAGATCCACCCAGAGCAGCTCAATGGACGTAGTAAATGCAGAGGAACCTCCCTGCTTGGTGCCTAGSCTCGCGGACA	794
SHW-1-1.seq	TCGTGAAGAAGATGCTGGGGAAGAAGATCCACCCAGAGCAGCTCAATGGACGTAGTAAATGCAGAGGAACCTCCCTGCTTGGTGCCTAGSCTCGCGGACA	794
Lan2399-1.seq	TCGTGAAGAAGATGCTGGGGAAGAAGATCCACCCAGAGCAGCTCAATGGACGTAGTAAATGCAGAGGAACCTCCCTGCTTGGTGCCTAGSCTCGCGGACA	794
CN16-2.seq	TCGTGAAGAAGATGCTGGGGAAGAAGATCCACCCAGAGCAGCTCAATGGACGTAGTAAATGCAGAGGAACCTCCCTGCTTGGTGCCTAGSCTCGCGGACA	787
SM969-2.seq	TCGTGAAGAAGATGCTGGGGAAGAAGATCCACCCAGAGCAGCTCAATGGACGTAGTAAATGCAGAGGAACCTCCCTGCTTGGTGCCTAGSCTCGCGGACA	787
SHW-1-2.seq	TCGTGAAGAAGATGCTGGGGAAGAAGATCCACCCAGAGCAGCTCAATGGACGTAGTAAATGCAGAGGAACCTCCCTGCTTGGTGCCTAGSCTCGCGGACA	794
Lan2399-2.seq	TCGTGAAGAAGATGCTGGGGAAGAAGATCCACCCAGAGCAGCTCAATGGACGTAGTAAATGCAGAGGAACCTCCCTGCTTGGTGCCTAGSCTCGCGGACA	794



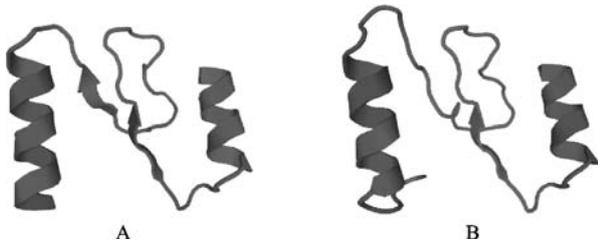
黄色方框区域表示起始子和终止子的位置;红色区域表示终止子提前出现和6个碱基插入的位置

The yellow box;The ATG codon and the original position of the terminator occurrence,

The red box;The location of the termination forming in advance and the insertion of the base

图3 4个材料的 *TaTAC1* 基因 cDNA 全长序列比对

Fig.3 Full sequence alignment of *TaTAC1* cDNA in four materials



A: 预测的正常 cDNA 序列编码蛋白质三级结构;

B: 预测的6个碱基插入后的 cDNA 序列编码蛋白质三级结构

A: Predicted tertiary structure of proteins with normal cDNA sequences, B: Predicted tertiary structure of proteins of cDNA sequences with six bases insert

图4 预测 *TaTAC1* 编码的部分蛋白质三级结构

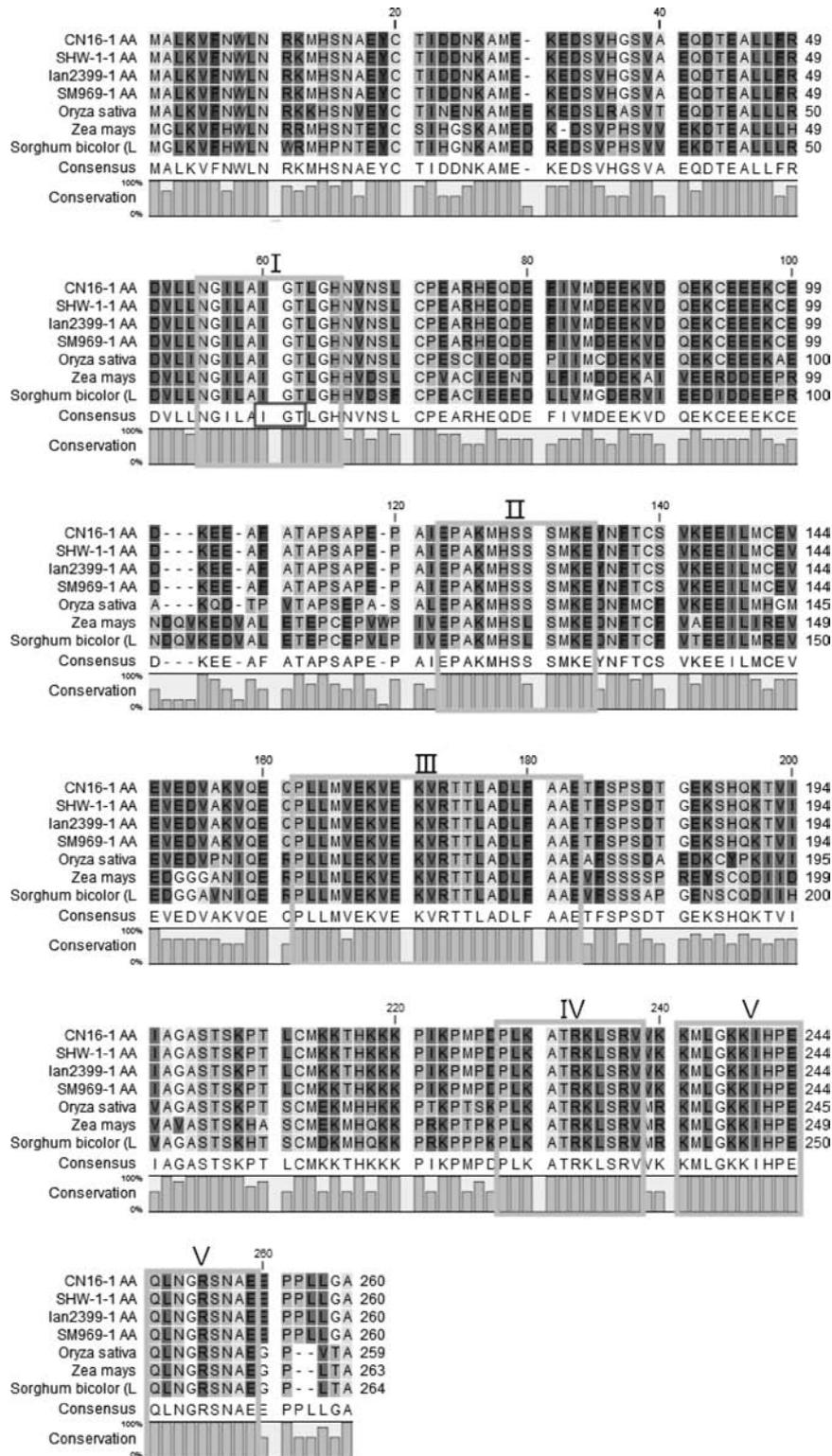
Fig.4 Predicted tertiary structure of some proteins encoded by *TaTAC1*

同源性分析显示, *TaTAC1* 第一类基因序列的氨基酸序列与 *OsTAC1*、*ZmTAC1*、*SbTAC1* 的同源性分别约为 76%、62%、65%, 序列中存在 5 个区域高度保守, 区域 I 内均含有 IGT 基因家族^[12] 典型的氨基酸结构“IGT”(图 5), 因此推测 *TaTAC1* 是这 3 个基因在小麦上的同源基因, 且具有相似的功能。

2.3 *TaTAC1* 基因的表达模式分析

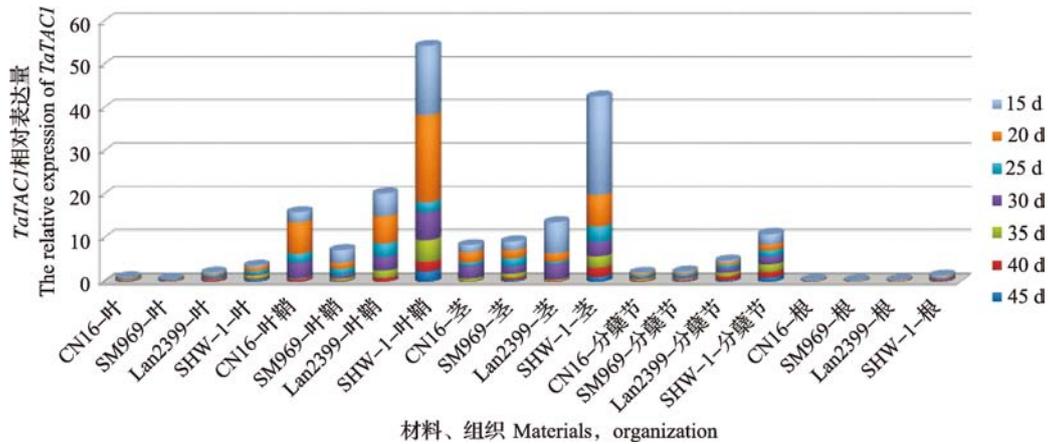
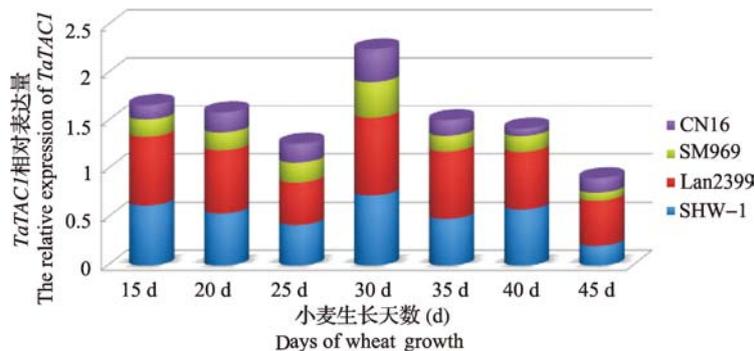
实时荧光定量 PCR 结果(图 6)表明, 在 4 个材料的不同发育阶段(不同分蘖时期), *TaTAC1* 在各组织均有表达, 但表达趋势和程度上存在异同。从表达组织上看, 4 个材料的 *TaTAC1* 均在叶鞘、茎的相对表达量最高, 其次是分蘖节, 叶和根最低。从表达时空上看, 叶和根的表达量没有随小麦生长发育呈现出一定规律; 茎、叶鞘在 15~20 d 时表达量最高, 25 d 时, CN16、SHW-1 中有下降现象, 30 d 时再次升高, 然后逐渐降低; 30 d 时, SM969 与 Lan2399 则一直逐渐降低。CN16、SM969、Lan2399 的分蘖节在 15~25 d 时表达量逐渐升高, 30 d 时达最大值, 随后 4 个材料均有不同程度地降低, 而 SHW-1 分蘖节的表达量则为 15 d 时为最大值, 20~25 d 有轻微下降, 30 d 时再次升高, 随后逐渐降低。

利用 SPSS 20.0 软件将小麦不同时期下各组织的相对表达量与分蘖角度进行相关性分析, 发现 *TaTAC1* 在分蘖节的表达量与分蘖角度呈显著相关, Pearson 相关性系数为 0.677, 其他组织与分蘖角度无显著相关性, 由此将分蘖节不同时期下

图5 不同物种的 *TAC1* 基因氨基酸序列多重比对图Fig. 5 Multiple sequence alignment of the amino acid sequence of *TAC1* from different species

该基因的相对表达量单独绘制成图,结果显示, CN16、SM969 中 *TaTAC1* 的相对表达量比 Lan2399、SHW-1 都要低(图 7); Lan2399、SHW-1 中 *TaTAC1* 在分蘖节的表达量最高时约为 CN16、SM969 的 17~20

倍,最低时约为 1~3 倍。结合 4 个材料分蘖角度的大小,可以说明在小麦生长发育过程中, *TaTAC1* 可能与调控分蘖角度有关,且正向调控分蘖角度的大小。

图 6 *TaTAC1* 基因在不同材料的不同组织时期下的相对表达量Fig. 6 Relative expression of *TaTAC1* gene in different tissues and stages of different materials图 7 分蘖节处 *TaTAC1* 的相对表达量Fig. 7 Relative expression of *TaTAC1* gene in tiller node

2.4 *TaTAC1* 蛋白的亚细胞定位

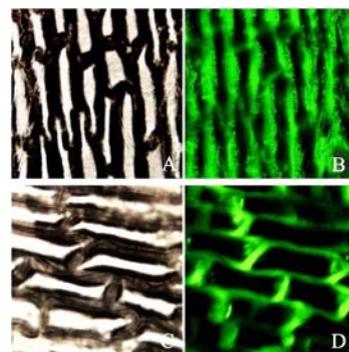
利用基因枪将重组的真核表达载体 35S:TaTAC1-GFP 以及原始空载体 pCAMBIA-1302 导入洋葱表皮细胞中,利用荧光显微镜观察,在绿色荧光下,导入空载体的洋葱表皮细胞获得瞬时高表达,整个细胞都显绿色(图 8-A、图 8-B),而 *TaTAC1* 融合蛋白只有细胞膜显示绿色(图 8-C、图 8-D),说明 *TaTAC1* 蛋白亚细胞定位于细胞膜。

3 讨论

合理的小麦株型结构不仅可以增加播种密度,而且可提高群体的光合效率及植株的抗性,最终影响产量及品质^[13-15]。小麦分蘖角度是株型的重要决定因素之一^[16-17]。研究分蘖角度的分子遗传机制,不仅对解析其生物学功能具有重要的理论指导,而且对高产优质小麦新品种的选育也有重要的实践意义^[18-20]。

本研究利用同源克隆从小麦中成功克隆与 *OsTAC1*、*ZmTAC1* 同源的 *TaTAC1*。CN16-2、SM969-2 与 Lan2399-2、SHW-1-2 中单个碱基的突变可能引起 *TaTAC1* 在 mRNA 表达水平的差异,从而导致分

蘖角度的差异,目前已有类似碱基突变的基因报道,如 *OsTAC1*^[5]、*ZmTAC1*^[6]、*OsHd6*^[21]、*PROG1*^[3-4]。



A: 对照组原始载体 pCAMBIA-1302 在自然光下拍摄的图片;
B: 对照组原始载体 pCAMBIA-1302 在激发光下拍摄的图片;
C: 实验组重组载体 pCAMBIA-1302-TaTAC1 在自然光下拍摄的图片;
D: 实验组重组载体 pCAMBIA-1302-TaTAC1 在激发光下拍摄的图片

A: Photographing of pCAMBIA-1302 under the nature light,
B: Photographing of pCAMBIA-1302 under the exciting light,
C: Photographing of pCAMBIA-1302-TaTAC1 under the nature light,
D: Photographing of pCAMBIA-1302-TaTAC1 under the exciting light

图 8 *TaTAC1* 蛋白在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位
Fig. 8 Subcellular localization of *TaTAC1* in epidermal cells

另外 Lan2399-2、SHW-1-2 中碱基的插入引起蛋白三维结构中一个 β 折叠片消失,导致蛋白质稳定性和特异性降低,从而可能引起该蛋白不能特异的与原来的 RNA 分子结合。G. Ulf-Peter 等^[22]等开发了检测蛋白质与不同 RNA 分子结合的方法,研究表明非特异性蛋白可通过特殊途径发挥其特异性。因此发生特异性改变的 TaTAC1 蛋白可能会通过与原先不同的表达方式如改变蛋白质结合方式来调控小麦性状。小麦基因组较为复杂,这些结论还有待于进一步深入研究。

TaTAC1 表达分析结果显示,TaTAC1 在 4 个材料的不同时期和不同组织均有表达,TaTAC1 在叶鞘、茎高效表达,分蘖节次之,叶与根最低,说明该基因具有组织时空表达的特异性。调控分蘖角度的基因 OsTAC1^[5]、PROGI^[3-4]、LAZY1^[1] 等也在叶鞘枕、分蘖节以及茎的节部等组织高效表达,这些组织部位可能直接影响植株结构的形成及维持。OsTAC1 在紧凑型水稻中表达水平显著低于松散型水稻,其上调表达导致分蘖角度增大,下调表达导致分蘖角度减小,表明 OsTAC1 决定着分蘖角度的大小^[5];松散型玉米中 ZmTAC1 的表达量普遍高于紧凑型玉米,通过自交序列比较及染色体定位也印证了 ZmTAC1 正向调控叶角大小的结论^[6]。本研究中,结合材料之间的表达差异与分蘖角度大小分析表明,紧凑型小麦 CN16、SM969 的 TaTAC1 表达量低,松散型小麦 Lan2399、SHW-1 的 TaTAC1 表达量高,且相关性分析表明分蘖角度与定量结果呈显著正相关性。这一结果与水稻、玉米上类似研究结果基本吻合,因此推测 TaTAC1 可能正向调控分蘖角度的大小。有研究报道,TAC1 与 LAZY1 的基因序列相似,属于同一个基因家族,且 TAC1 由 LAZY1 进化而来^[12,23-24]。李经勇等^[25]研究表明在植物的叶鞘、茎秆以及再生芽中 IAA 含量较高,有利于再生芽的萌发。本研究中定量表达结果显示 TaTAC1 在叶鞘、茎高效表达,分蘖节也有表达,另外该蛋白亚细胞定位于细胞膜。因此结合前人研究结果可以推测,TaTAC1 可能也参与生长素极性运输过程,进而影响植株的形态建成。而关于 TaTAC1 是否是通过碱基突变、插入抑或是通过改变生长素极性运输来调控分蘖角度大小等还需要进一步的实验验证。这些问题的解决或许将有助于揭示小麦分蘖发生分子遗传机制,也将为小麦株型育种奠定基础。

致谢:感谢四川省科技支撑计划(2016NZ0057)、国家自然科学基金(31301317)的资助。感谢四川农业大学小麦研究所江千涛研究员对亚细胞定位技术的帮助和建议。

参考文献

[1] Li P, Wang Y, Qian Q, et al. LAZY1 controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport[J]. Cell Res, 2007, 17(5):402-410

- [2] Wu X, Tang D, Li M, et al. Loose plant architecture1, an INDETERMINATE DOMAIN protein involved in shoot gravitropism, regulates plant architecture in rice[J]. Plant Physiol, 2013, 161(1):317-329
- [3] Tan L, Li X, Liu F, et al. Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication[J]. Nat Genet, 2008, 40(11):1360-1364
- [4] Jin J, Huang W J, Yang J, et al. Genetic control of rice plant architecture under domestication[J]. Nat Genet, 2008, 40(11):1365-1369
- [5] Yu B, Lin Z, Li H, et al. TAC1, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice[J]. Plant J, 2007, 52(5):891-898
- [6] Ku L, Wei X, Zhang S, et al. Cloning and characterization of a putative TAC1 ortholog associated with leaf angle in maize (*Zea mays* L.) [J]. PLoS One, 2011, 6(6):e20621
- [7] Zhao H, Huai Z, Xiao Y, et al. Natural variation and genetic analysis of the tiller angle gene *MsTAC1* in *Miscanthus sinensis* [J]. Planta, 2014, 240(1):161-175
- [8] Paterson A H, Bowers J E, Rémy B, et al. The sorghum bicolor genome and the diversification of grasses [J]. Nature, 2009, 457(7229):551-556
- [9] Fleige S, Pfaffl M W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance[J]. Mol Aspects Med, 2006, 27(S2-3):126-139
- [10] 龙翔宇. 利用基因芯片技术发掘小麦内参基因及抗赤霉病相关基因[D]. 成都:四川农业大学, 2011
- [11] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. [J]. Nucl Acids Res, 2001, 29(9):e45
- [12] Chris D, Ann C, Renate H, et al. PpeTAC1 promotes the horizontal growth of branches in peach trees and is a member of a functionally conserved gene family found in diverse plants species [J]. Plant J, 2013, 75(4):618-630
- [13] Li P, Cheng Z, Zhao H, et al. The research progress of dryland wheat ideal plant type[J]. Acta Genet Sin, 2011, 31(9):2631-2640
- [14] 刘兆晔, 于经川, 姜鸿明, 等. 小麦理想株型的探讨[J]. 中国农学通报, 2010, 26(8):137-141
- [15] Mcsteen P, Leyser O. Shoot branching[J]. Annu Rev Plant Biol, 2005, 56(56):353-374
- [16] Zefu L, Hong Y, Guosheng X, et al. Genome-wide binding analysis of the transcription activator IDEAL PLANT ARCHITECTURE1 reveals a complex network regulating rice plant architecture. [J]. Plant Cell, 2013, 25(10):3743-3759
- [17] 张其鲁, 陈香芝, 张立全, 等. 小麦株型分类探讨[J]. 山东农业科学, 2006(1):17-19
- [18] 韦沙, 武晶, 张双喜, 等. 作物株型相关基因研究进展[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(4):4-7
- [19] 库丽霞, 张君, 张伟强, 等. 作物株型相关性分子机理的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(5):20-25
- [20] Peng J R, Richards D E, Hartley N M, et al. 'Green Revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. [J]. Nature, 1999, 400:256-261
- [21] Takahashi Y, Shomura A, Sasaki T, et al. Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(14):7922-7927
- [22] Ulf-Peter G, Yandek L E, Niland C N, et al. Hidden specificity in an apparently nonspecific RNA-binding protein. [J]. Nature, 2013, 502(7471):385-388
- [23] Yoshihara T, Spalding E P, Iino M. AtLAZY1 is a signaling component required for gravitropism of the *Arabidopsis thaliana* inflorescence[J]. Plant J, 2013, 74:267-279
- [24] Teichmann T, Muhr M. Shaping plant architecture. [J]. Front Plant Sci, 2015, 6(233):233
- [25] 李经勇, 唐永群, 吴毓. 稻株内源 IAA 含量变化与再生芽萌发生长的关系[J]. 西南农业学报, 2003(2):114-116