DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.01354

小麦 *TaPHYA* 基因亚家族的克隆及表达分析

王霞^{1,2,**} 马燕斌^{2,3,4,**} 宋梅芳² 孟凡华² 李秀全² 杨丽²
吴霞⁴ 杨克诚^{3,*} 杨建平^{2,*}

¹运城学院生命科学系, 山西运城 044000; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³四川农业大学玉米研究所, 四川雅安 625014; ⁴山西省农业科学院棉花研究所, 山西运城 044000

摘要: 光敏色素是一类与作物农艺性状密切相关的基因家族。本研究克隆了中国春小麦光敏色素 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 基因完整的编码序列, 并对它们进行了生物信息学以及转录分析。在 NCBI 数据库中对其推测的氨基酸序列进行 BLAST 分析, 发现 *TaPHYA1* 和 *TaPHYA3* 氨基酸序列中包含光敏色素基因完整的功能结构域。系统进化树分析表明, 小麦 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 之间进化关系相近, 且与单子叶植物玉米、水稻的 *PHYA* 聚为一个亚类。另外, *TaPHYA* 的表达丰度具有组织特异性, 在茎、叶、穗中表达量分别是根中的 1.35、0.34 和 0.87 倍; 而在同光质条件下, 其表达丰度也具有光质特异性, *TaPHYA* 的总表达量在黑暗和远红光条件下最高, 在蓝光条件下次之, 而红光和白光条件下最低。该结果为深入研究小麦光敏色素 A 基因亚家族的功能奠定了基础。

关键词: 小麦; 光敏色素 A; 组织特异性; 表达分析

Isolation and Expression Patterns of *TaPHYA* Gene Subfamily in Common Wheat

WANG Xia^{1,2,**}, MA Yan-Bin^{2,3,4,**}, SONG Mei-Fang², MENG Fan-Hua², LI Xiu-Quan², YANG Li², WU-Xia⁴, YANG Ke-Cheng^{3,*}, and YANG Jian-Ping^{2,*}

¹ Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ³ Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an 450002, China; ⁴ Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China

Abstract: *Phytochromes (PHYs)* are important genes related to crop agronomic traits. In this paper, *TaPHYA1*, *TaPHYA2*, and *TaPHYA3* were cloned from cv. Chinese Spring (*Triticum aestivum* L.). The putative domains of *TaPHYA1*, *TaPHYA2*, and *TaPHYA3* proteins were predicted via the NCBI Protein BLAST. Either *TaPHYA1* or *TaPHYA3* is composed of a GAF domain, a PHYtochrome domain, two PAS domains, a His Kinase A domain, and a Histidine kinase-like ATPase domain. Phylogenetic tree analysis indicated that *TaPHYA1*, *TaPHYA2*, and *TaPHYA3* are more close to *PHYA* members of monocot plants (*ZmPHYA*, *SbPHYA*, and *OsPHYA*) rather than to those of dicot plants (*AtPHYA* and *GmPHYA*). Expression profile of *TaPHYAs* were analyzed using semi quantitative RT-PCR and real time PCR assays. We found that the expression levels of *TaPHYAs* in stem, leaf and spike were 1.35, 0.34, and 0.87 times of that in root, respectively. Additionally, *TaPHYA* showed high expression level in darkness, far-red, and blue light, but low expression level in red and white light conditions. The transcription of *TaPHYA* in the seedlings grown in the dark or far-red light was four or three times of that in seedlings grown in red light, respectively.

Keywords: *Triticum aestivum*; Phytochrome A; Tissue-specific expression; Transcription expression analysis

光敏色素是植物中一类重要的功能调控蛋白。研究发
发现, 拟南芥光敏色素有 5 个成员, 分别为 *PHYA*、*PHYB*、*PHYC*、*PHYD* 和 *PHYE*, 控制种子萌发、幼苗去黄化、叶片开张、茎伸长、开花以及避荫性

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08010-002), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB118300)和国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2008AA10Z121)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 杨建平, E-mail: yangjianping@caas.net.cn, Tel: 010-82105859; 杨克诚, Tel: 0835-2882465

第一作者联系方式: E-mail: wx_myb@163.com (王霞), 15235665598@163.com (马燕斌) ** 同等贡献(Contributed equally to this work)

Received(收稿日期): 2012-03-08; Accepted(接受日期): 2012-04-20; Published online(网络出版日期): 2012-06-05.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120605.0956.002.html>

等发育过程^[1-2]。利用光敏色素基因进行作物改良发现, 转拟南芥 *PHYA* 或 *PHYB* 到水稻或马铃薯中可以分别促进水稻籽粒或马铃薯产量增加^[3-4]。因此, 研究作物光敏色素基因的功能对作物改良具有重要意义。

目前已克隆了多种作物光敏色素家族基因, 其功能也得到初步研究。水稻中含有 *PHYA*、*PHYB* 和 *PHYC* 3 个单拷贝基因^[5-6], 利用 *PHY* 这 3 个基因的单缺失突变体和双缺失突变体, 发现水稻光敏色素调节胚芽鞘伸长、根的向地性反应、幼苗去黄化以及开花时间^[7-8]; 在玉米中, 由于进化前期经历了从四倍体化又回到二倍体的复杂过程, 其光敏色素基因分别保留了 2 个拷贝, 即 *ZmPHYA1*、*ZmPHYA2*、*ZmPHYB1*、*ZmPHYB2*、*ZmPHYC1* 和 *ZmPHYC2*^[9-10], 已报道了 *ZmPHYA1* 和 *ZmPHYA2* 受光调控的 RNA 表达模式及其蛋白功能^[11]。最近, Wu 等^[12]发现大豆 *GmPHYB1* 基因在拟南芥中异源表达可以改变植株形态结构以及开花期。

Southern blot 杂交实验证明, 在异源六倍体小麦中, 小麦光敏色素基因家族中也仅存在 *PHYA*、*PHYB* 和 *PHYC*^[13-15], 并且已克隆了小麦光敏色素基因 *PHYB* 家族中的 1 个基因和 *PHYC* 家族中的全部 3 个基因^[14-16]。小麦光敏色素 A 家族基因中虽然存在 3 个拷贝^[13], 但是仅 *TaPHYA1* 序列被 NCBI 完整公布 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ313099>), 其他序列未见报道。本研究中克隆了中国春小麦 *TaPHYA* 的家族基因的 3 个成员, 并初步分析 *TaPHYA* 蛋白结构域、组织特异性及光调控下转录表达模式, 为深入研究小麦光敏色素 A 基因家族的功能以及利用该基因进行小麦作物的改良提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

异源六倍体(AABBDD)小麦中国春和京 411 由本实验室保存, 中国春缺体-四体材料 N4A-T4D 由美国堪萨斯州立大学小麦遗传与基因资源中心提供。

将各材料种子放入装有灭菌水的培养皿中过夜萌芽, 挑选发芽一致的种子移入蛭石中, 于 22℃ 培养箱中以持续黑暗、持续远红光(波长 739 nm, 光强 0.5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$)、持续红光(波长 669 nm, 光强 30 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$)、持续蓝光(波长 470 nm, 光强 5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$)和持续白光(日光灯, 光强 12.5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$)处理 7 d, 取样后用液氮迅速冷冻, -80℃ 保存备用。

各光处理材料幼苗在室温条件下生长至第 90 天, 再于暗条件下处理 24 h 后分别取根、茎、叶和穗, 迅速装入离心管, 液氮速冻后-80℃ 保存, 用于组织特异性表达检测。

1.2 RNA 提取及其 cDNA 合成

分别取约 0.1 g 不同光处理的小麦样品, 利用 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)提取总 RNA, 经 DNase I 处理去除 DNA 污染、电泳检测质量及分光光度计测定 RNA 浓度后, 取等量总 RNA 进行反转录, 合成 cDNA 第一链, -20℃ 保存备用。

1.3 *TaPHYA* 基因家族的克隆

提取暗条件生长 7 d 的中国春和中国春 N4A-T4D 材料总 RNA, 反转录得到 cDNA。以中国春 cDNA 为模板, 根据面包小麦的 *TaPHYA1* (AJ313099) 序列设计引物(表 1)克隆 *TaPHYA1*。以中国春 N4A-T4D 的反转录 cDNA 为模板, 根据 *TaPHYA2* (AJ313100) EST 序列, 设计 2 对特异扩增引物(表 1), 拼接获得 *TaPHY2* 序列全长。*TaPHYA3* 为中国春小麦 4D 染色体 BAC 克隆基因后推定的 mRNA 对应的 cDNA 序列(表 1)。

表 1 小麦 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 基因的 PCR 扩增引物

Table 1 Primer sequences of *TaPHYA1*, *TaPHYA2*, and *TaPHYA3* for gene cloning

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
TaPHYA1-F	ATGTCTTCTCAAGGGCTGCTTC
TaPHYA1-R	TCAGTGCTCCATGGCCGTTGGAG
TaPHYA2-1F	ATGTCTTCTCAAGGGCTGCTTC
TaPHYA2-1392R	GTATCTGAGACTCGGTTGGG
TaPHYA2-528F	GTTACCGAGCAACCGGC
TaPHYA2-3393R	CAGTGCTCC ATGGCCGTTGGAG
TaPHYA3-F	ATGTCTTCTCAAGGGCTGCTTC
TaPHYA3-R	TCAGTGCTCCATGGCCGTTGGAG

1.4 *PHY* 半定量与实时定量 PCR 分析

在比较小麦近缘种间以及单子叶物种光敏色素基因序列基础上, 对 *TaPHYA* 基因序列保守区设计半定量和定量 PCR 引物, 内参为小麦 *TaActin* (AF326781) (表 2)。实时定量 PCR 体系共 25 μL , 按试剂盒(Bio-Rad iQ SYBR Green Supermixture, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)说明书进行扩增, 反应程序为 95℃ 预变性 5 s; 95℃ 变性 5 s, 55℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 10 s, 80℃ 2 s, 40 个循环。反应在 MJ Research PTC-200 荧光定量 PCR 仪上进行, 3 次重复采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行定量分析。

表 2 半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 分析用引物
Table 2 Primers for semiquantitative RT-PCR and real-time PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	片段长度 Expected size (bp)	用途 Purpose
TaActin-F (AF326781)	GGTGATGAGGCGCAGTCCAAG	386	Internal reference gene
TaActin-R (AF326781)	CGACCAGCGAGATCCAAACGA		
TaPHYs-F1	CGCAGATGTTTGAGGAGGACG	151	Real-time PCR
TaPHYs-R1	ACAAGCAAGTTCGGCGGTGAG		
TaPHYs-F2	GCTTGGATTGGAGATGGCTG	506	Semiquantitative RT-PCR
TaPHYs-R2	TCAGTGCTCCATGGCCGTTGGAG		

2 结果与分析

2.1 中国春小麦 *TaPHYA* 基因家族的克隆与蛋白结构域分析

克隆获得的中国春小麦 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 基因, 其完整的编码序列均为 3 393 个核苷酸, 两两之间的核苷酸相似性高达 97%。利用 DNAMAN 推测其 PHY 编码氨基酸序列, 发现 *TaPHYA1* 和 *TaPHYA3* 编码 1 131 个氨基酸, 而 *TaPHYA2* 仅编码 889 个氨基酸, 它在第 2 669 碱基处出现终止密码子突变。在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/index.shtml>)对其蛋白结构域预测分析发现, *TaPHYA1* 和 *TaPHYA3* 包含 1 个 GAF 结构域、1 个 Phytochrome 结构域、2 个 PAS 结构域、1 个组氨酸激酶 A 结构域(His Kinase A domain) 和一个类似组氨酸激酶的 ATP 激酶结构, 而 *TaPHYA2* 仅包含 1 个 GAF 结构域、1 个 Phytochrome 结构域和 2 个 PAS 结构域(图 1)。

2.2 小麦 *TaPHYA* 系统进化树分析

将中国春 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 推测的氨基酸序列与水稻、玉米、大豆、拟南芥 PHYA 推测的氨基酸序列进行系统进化树分析, 结果单子叶植物与双子叶植物的光敏色素 A 明显区分(图 2)。小麦 PHYA 与同为禾本科作物的水稻(94%)、玉米 PHYA (92%)具有高度相似性, 而与拟南芥和大豆 PHYA 的相似度分别为 89%和 PHY80%。

2.3 *TaPHYA* 组织表达特异性

PHY 定量 PCR 结果表明, *TaPHYA* 在不同组织中表达量不同, 由多到少依次为茎、根、穗和叶, PHY 在茎、叶、穗中的表达量分别相当于在根中的 1.35、0.34 和 0.87 倍(图 3), 说明 *TaPHYA* 在小麦中的表达具有组织特异性。

2.4 *TaPHYA* 光质表达特异性分析

以中国春和京 411 为材料, 利用 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 基因的共同引物作为定量分析

引物, 在不同光条件下对 3 个 *TaPHYA* 基因的表达量进行检测。与黑暗中的表达量相比, 中国春 *TaPHYA* 基因远红光和蓝光条件下的相对表达量依次为 0.92 和 0.76, 而在红光和白光条件下的相对表达量为 0.31 和 0.10, 表明 PHYA 在黑暗、远红光以及蓝光中高表达, 在红光和白光中表达量低; 京 411 的 PHYA 基因的表达模式与中国春的 PHYA 一致, PHYA 在持续黑暗、远红光、红光、蓝光和白光条件下的相对表达量依次为 1.00、0.73、0.26、0.45 和 0.24 (图 2)。因此, *TaPHYA* 的表达受光调控, 且在持续黑暗、持续远红光以及持续蓝光条件下, *TaPHYA* 相对表达量较多; 而在持续红光条件或持续白光条件下, *TaPHYA* 积累明显减少, 具有明显的光质特异性。

3 讨论

普通小麦遗传进化关系复杂, 形态学、细胞学等证据资料表明其不同染色体组可能来源于不同的小麦近源材料^[17-18], 因此, *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 的 mRNA 序列以及氨基酸序列具有高度相似性可能与其进化来源的亲缘性有关。

从已经发表的对光敏色素蛋白不同结构域功能研究可知, PHYA 等光敏色素的 N 末端具有感应特定光的特性, C 末端对信号输出和交换具有必需的作用^[19-20]。从 cDNA 推测的氨基酸序列可知, *TaPHYA1* 和 *TaPHYA3* 具有完整的氨基酸序列结构域, 这些不同的结构域与拟南芥和水稻光敏色素 A 的结构域组成相同, 表明其功能类似, 但中国春的 *TaPHYA1* 和 *TaPHYA3* 氨基酸序列与它们氨基酸序列仍然存在差异, 因此其功能是否完全相同还需要进一步验证。以往研究表明, 拟南芥中 HKRD 结构域缺失影响 PHYA 的光敏感性以及亚细胞定位^[21]。*TaPHYA2* 编码区由于提前终止突变, 导致 *TaPHYA2* 的 HKRD 结构域缺失, 暗示 *TaPHYA2* 的光敏感性和亚细胞定位功能可能丧失, 但其功能是否丧失还需要进一步的实验证明。

TaPHYA1	MSSSRAA...SSSSRRRROSTQERVL AQT TDD ARLNACFEBSDFDYSKLWEAQRDTPTVLOEGRSEKVI A. YLQHIQRGKHQSFCCLL	87
TaPHYA2	MSSSRAA...SSSSRRRROSTQERVL AQT TDD ARLNACFEBSDFDYSKLWEAQRDTPTVLOEGRSEKVI A. YLQHIQRGKHQSFCCLL	87
TaPHYA3	MSSSRAA...SSSSRRRROSTQERVL AQT TDD ARLNACFEBSDFDYSKLWEAQRDTPTVLOEGRSEKVI A. YLQHIQRGKHQSFCCLL	87
OsPHYA	MSSSRPTQSSSSRRRROSTQERVL AQT TDD ARLNACFEBSDFDYSKLWEAQRDTPTVLOEGRSEKVI A. YLQHIQRGKHQSFCCLL	88
AtPHYA	MSSSRPTQSSSSRRRROSTQERVL AQT TDD ARLNACFEBSDFDYSKLWEAQRDTPTVLOEGRSEKVI A. YLQHIQRGKHQSFCCLL	87
TaPHYA1	ALDEKSFNVIAFSENAP EMLTTVSHAVPSVDDPPRLDICTNVPSLFTDQCATALRKALGFADVSLNLPILVOCRTSCKPFFYAIHVRATCC	177
TaPHYA2	ALDEKSFNVIAFSENAP EMLTTVSHAVPSVDDPPRLDICTNVPSLFTDQCATALRKALGFADVSLNLPILVOCRTSCKPFFYAIHVRATCC	177
TaPHYA3	ALDEKSFNVIAFSENAP EMLTTVSHAVPSVDDPPRLDICTNVPSLFTDQCATALRKALGFADVSLNLPILVOCRTSCKPFFYAIHVRATCC	177
OsPHYA	ALDEKSFNVIAFSENAP EMLTTVSHAVPSVDDPPRLDICTNVPSLFTDQCATALRKALGFADVSLNLPILVOCRTSCKPFFYAIHVRATCC	178
AtPHYA	ALDEKSFNVIAFSENAP EMLTTVSHAVPSVDDPPRLDICTNVPSLFTDQCATALRKALGFADVSLNLPILVOCRTSCKPFFYAIHVRATCC	177
TaPHYA1	LVVDFEPVNPTEFPATAACALQSYKLAAKAISKIQALPGCSHELLCNTVVRKVEFELTCYDRVMAYKFHEDNHCVEFAEHTKPGLEPYLGL	267
TaPHYA2	LVVDFEPVNPTEFPATAACALQSYKLAAKAISKIQALPGCSHELLCNTVVRKVEFELTCYDRVMAYKFHEDNHCVEFAEHTKPGLEPYLGL	267
TaPHYA3	LVVDFEPVNPTEFPATAACALQSYKLAAKAISKIQALPGCSHELLCNTVVRKVEFELTCYDRVMAYKFHEDNHCVEFAEHTKPGLEPYLGL	267
OsPHYA	LVVDFEPVNPTEFPATAACALQSYKLAAKAISKIQALPGCSHELLCNTVVRKVEFELTCYDRVMAYKFHEDNHCVEFAEHTKPGLEPYLGL	268
AtPHYA	LVVDFEPVNPTEFPATAACALQSYKLAAKAISKIQALPGCSHELLCNTVVRKVEFELTCYDRVMAYKFHEDNHCVEFAEHTKPGLEPYLGL	267
TaPHYA1	HYPATDIPQAAARFLFKNKVRRLCDVRARSIKUIEDRALPFDISLCCSALRAAHSCHLOYENNNIASLVHAAVVVNNEEDDEVGSEQP	357
TaPHYA2	HYPATDIPQAAARFLFKNKVRRLCDVRARSIKUIEDRALPFDISLCCSALRAAHSCHLOYENNNIASLVHAAVVVNNEEDDEVGSEQP	357
TaPHYA3	HYPATDIPQAAARFLFKNKVRRLCDVRARSIKUIEDRALPFDISLCCSALRAAHSCHLOYENNNIASLVHAAVVVNNEEDDEVGSEQP	357
OsPHYA	HYPATDIPQAAARFLFKNKVRRLCDVRARSIKUIEDRALPFDISLCCSALRAAHSCHLOYENNNIASLVHAAVVVNNEEDDEVGSEQP	358
AtPHYA	HYPATDIPQAAARFLFKNKVRRLCDVRARSIKUIEDRALPFDISLCCSALRAAHSCHLOYENNNIASLVHAAVVVNNEEDDEVGSEQP	356
GAF domain		
TaPHYA1	AQQQRRKILWCLVUCHESSPYVPPFLRYACEFLAQVFAHVNKEFELVQRLREKSLIRMTITLSDHLPKKEASPLTIIVSGAPNIMDLKRC	447
TaPHYA2	AQQQRRKILWCLVUCHESSPYVPPFLRYACEFLAQVFAHVNKEFELVQRLREKSLIRMTITLSDHLPKKEASPLTIIVSGAPNIMDLKRC	447
TaPHYA3	AQQQRRKILWCLVUCHESSPYVPPFLRYACEFLAQVFAHVNKEFELVQRLREKSLIRMTITLSDHLPKKEASPLTIIVSGAPNIMDLKRC	447
OsPHYA	AQQQRRKILWCLVUCHESSPYVPPFLRYACEFLAQVFAHVNKEFELVQRLREKSLIRMTITLSDHLPKKEASPLTIIVSGAPNIMDLKRC	448
AtPHYA	AQQQRRKILWCLVUCHESSPYVPPFLRYACEFLAQVFAHVNKEFELVQRLREKSLIRMTITLSDHLPKKEASPLTIIVSGAPNIMDLKRC	445
TaPHYA1	DCAALLYGGRVWRLGNAPTESQIRDLALWLSVHSDSTGLSTESLHDACYPGASALCDTVCGHAAVAKINSDDILFWFRSPTAREHWRGCA	537
TaPHYA2	DCAALLYGGRVWRLGNAPTESQIRDLALWLSVHSDSTGLSTESLHDACYPGASALCDTVCGHAAVAKINSDDILFWFRSPTAREHWRGCA	537
TaPHYA3	DCAALLYGGRVWRLGNAPTESQIRDLALWLSVHSDSTGLSTESLHDACYPGASALCDTVCGHAAVAKINSDDILFWFRSPTAREHWRGCA	537
OsPHYA	DCAALLYGGRVWRLGNAPTESQIRDLALWLSVHSDSTGLSTESLHDACYPGASALCDTVCGHAAVAKINSDDILFWFRSPTAREHWRGCA	538
AtPHYA	DCAALLYGGRVWRLGNAPTESQIRDLALWLSVHSDSTGLSTESLHDACYPGASALCDTVCGHAAVAKINSDDILFWFRSPTAREHWRGCA	535
Phytochrome region		
TaPHYA1	RMDPSDDMDRRHHPRLSPKAFLEVVVHKLSDADSEMDAHSLOLILRGTVG...VVKPTCKASLDEQICDLKLDGLAELQAVTSEM	623
TaPHYA2	RMDPSDDMDRRHHPRLSPKAFLEVVVHKLSDADSEMDAHSLOLILRGTVG...VVKPTCKASLDEQICDLKLDGLAELQAVTSEM	623
TaPHYA3	RMDPSDDMDRRHHPRLSPKAFLEVVVHKLSDADSEMDAHSLOLILRGTVG...VVKPTCKASLDEQICDLKLDGLAELQAVTSEM	623
OsPHYA	RMDPSDDMDRRHHPRLSPKAFLEVVVHKLSDADSEMDAHSLOLILRGTVG...DIPKTRAAALDNQVQDLKLDGLAELQAVTSEM	624
AtPHYA	RMDPSDDMDRRHHPRLSPKAFLEVVVHKLSDADSEMDAHSLOLILRGTVG...DIPKTRAAALDNQVQDLKLDGLAELQAVTSEM	622
TaPHYA1	VRLMETATVPILAVIDGCLVNCUNQKAAELTCLRVDDAI CHHLLTLEBESSVSVVQRHLYALQGREKREVF EFKTHGPKRDDCPVILV	713
TaPHYA2	VRLMETATVPILAVIDGCLVNCUNQKAAELTCLRVDDAI CHHLLTLEBESSVSVVQRHLYALQGREKREVF EFKTHGPKRDDCPVILV	713
TaPHYA3	VRLMETATVPILAVIDGCLVNCUNQKAAELTCLRVDDAI CHHLLTLEBESSVSVVQRHLYALQGREKREVF EFKTHGPKRDDCPVILV	713
OsPHYA	VRLMETATVPILAVIDGCLVNCUNQKAAELTCLRVDDAI CHHLLTLEBESSVSVVQRHLYALQGREKREVF EFKTHGPKRDDCPVILV	714
AtPHYA	VRLMETATVPILAVIDGCLVNCUNQKAAELTCLRVDDAI CHHLLTLEBESSVSVVQRHLYALQGREKREVF EFKTHGPKRDDCPVILV	712
PAS domain I		
TaPHYA1	VNACASRDLDHDDVVGVCFAQDHTVHKLVDKFTFVEGDYAIHNNPPLPPIFGADSEFGWCSEUNAAHKLTCWHREVLDRKHLCEV	803
TaPHYA2	VNACASRDLDHDDVVGVCFAQDHTVHKLVDKFTFVEGDYAIHNNPPLPPIFGADSEFGWCSEUNAAHKLTCWHREVLDRKHLCEV	803
TaPHYA3	VNACASRDLDHDDVVGVCFAQDHTVHKLVDKFTFVEGDYAIHNNPPLPPIFGADSEFGWCSEUNAAHKLTCWHREVLDRKHLCEV	803
OsPHYA	VNACASRDLDHDDVVGVCFAQDHTVHKLVDKFTFVEGDYAIHNNPPLPPIFGADSEFGWCSEUNAAHKLTCWHREVLDRKHLCEV	804
AtPHYA	VNACASRDLDHDDVVGVCFAQDHTVHKLVDKFTFVEGDYAIHNNPPLPPIFGADSEFGWCSEUNAAHKLTCWHREVLDRKHLCEV	802
TaPHYA1	FDSRNASCLLKNKDAFVSLGVVINSALAGEETEKAPFCFFDRSKYTECLLSVNRNRQNECCLITGVVCFIHIPSHLQALQVQASQEQ	893
TaPHYA2	FDSRNASCLLKNKDAFVSLGVVINSALAGEETEKAPFCFFDRSKYTECLLSVNRNRQNECCLITGVVCFIHIPSHLQALQVQASQEQ	889
TaPHYA3	FDSRNASCLLKNKDAFVSLGVVINSALAGEETEKAPFCFFDRSKYTECLLSVNRNRQNECCLITGVVCFIHIPSHLQALQVQASQEQ	893
OsPHYA	FDSRNASCLLKNKDAFVSLGVVINSALAGEETEKAPFCFFDRSKYTECLLSVNRNRQNECCLITGVVCFIHIPSHLQALQVQASQEQ	894
AtPHYA	FDSRNASCLLKNKDAFVSLGVVINSALAGEETEKAPFCFFDRSKYTECLLSVNRNRQNECCLITGVVCFIHIPSHLQALQVQASQEQ	892
PAS domain II		
TaPHYA1	SLKRLKAFSYMRAHINNPLSGHLYSKALKNLTDLNERQMRQIHVADNCHHQ LNKILADLDQHNIMEKSSCLDL EHA EFVLQDVVAAVVSQ	983
TaPHYA2	SLKRLKAFSYMRAHINNPLSGHLYSKALKNLTDLNERQMRQIHVADNCHHQ LNKILADLDQHNIMEKSSCLDL EHA EFVLQDVVAAVVSQ	889
TaPHYA3	SLKRLKAFSYMRAHINNPLSGHLYSKALKNLTDLNERQMRQIHVADNCHHQ LNKILADLDQHNIMEKSSCLDL EHA EFVLQDVVAAVVSQ	983
OsPHYA	SLKRLKAFSYMRAHINNPLSGHLYSKALKNLTDLNERQMRQIHVADNCHHQ LNKILADLDQHNIMEKSSCLDL EHA EFVLQDVVAAVVSQ	984
AtPHYA	SLKRLKAFSYMRAHINNPLSGHLYSKALKNLTDLNERQMRQIHVADNCHHQ LNKILADLDQHNIMEKSSCLDL EHA EFVLQDVVAAVVSQ	980
His kinase A domain		
TaPHYA1	VLIACGCKGIRVSCNLPERFMRQTVYGDGVRLQQLISDFLSISVKFSPVGCSSVEISAKATKNSIGENLHLIDLELRIRKHQGLGVPAELMA	1073
TaPHYA2	VLIACGCKGIRVSCNLPERFMRQTVYGDGVRLQQLISDFLSISVKFSPVGCSSVEISAKATKNSIGENLHLIDLELRIRKHQGLGVPAELMA	889
TaPHYA3	VLIACGCKGIRVSCNLPERFMRQTVYGDGVRLQQLISDFLSISVKFSPVGCSSVEISAKATKNSIGENLHLIDLELRIRKHQGLGVPAELMA	1073
OsPHYA	VLIACGCKGIRVSCNLPERFMRQTVYGDGVRLQQLISDFLSISVKFSPVGCSSVEISAKATKNSIGENLHLIDLELRIRKHQGLGVPAELMA	1074
AtPHYA	VLIACGCKGIRVSCNLPERFMRQTVYGDGVRLQQLISDFLSISVKFSPVGCSSVEISAKATKNSIGENLHLIDLELRIRKHQGLGVPAELMA	1070
Histidine kinase-like ATPases		
TaPHYA1	QMFEEDEPQSSREGLCLVSRNLLRLMNGDVRLHREAGVSIFILTAEALACPTAMEH	1130
TaPHYA2	QMFEEDEPQSSREGLCLVSRNLLRLMNGDVRLHREAGVSIFILTAEALACPTAMEH	889
TaPHYA3	QMFEEDEPQSSREGLCLVSRNLLRLMNGDVRLHREAGVSIFILTAEALACPTAMEH	1130
OsPHYA	QMFEEDEPQSSREGLCLVSRNLLRLMNGDVRLHREAGVSIFILTAEALACPTAMEH	1128
AtPHYA	QMFEEDEPQSSREGLCLVSRNLLRLMNGDVRLHREAGVSIFILTAEALACPTAMEH	1122

图 1 普通小麦 TaPHYA1、TaPHYA2 和 TaPHYA3 推定氨基酸序列比对及功能域分析

Fig. 1 Multiple alignment and functional domain analysis of deduced amino acid sequences of TaPHYA1, TaPHYA2, and TaPHYA3 in common wheat

星号(*)示 TaPHYA2 提前终止的氨基酸位置。NCBI 中登录编码为 AJ313099 (TaPHYA1, 小麦)、GU994117PHY (TaPHYA2, 小麦); GU994129 (TaPHYA3, 小麦)、AB109891 (OsPHYA, 水稻)和 NP_172428 (AtPHYA, 拟南芥)。

Asterisk (*) shows the position of terminal code in TaPHYA2. NCBI accession numbers are AJ313099 (TaPHYA1, *Triticum aestivum*), GU994117 (TaPHYA2, *Triticum aestivum*), GU994129 (TaPHYA3, *Triticum aestivum*), AB109891 (OsPHYA, *Oryza sativa*), and NP_172428 (AtPHYA, *Arabidopsis thaliana*).

图 2 小麦 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 与其他植物光敏色素 A 的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of predicted amino acid sequences from wheat *TaPHYAs* and other plant *PHYAs*

不同组织中 *TaPHYA* 的表达存在明显差异, 表达量最高的为茎, 而最低的为叶, 说明 *TaPHYA* 的表达积累量具有组织特异性。这一结果可能是由于 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 基因的其中之一在一些组织中表达量较高, 而在其他组织中表达较低造成, 表明这 3 个基因的表达调控机制可能存在差异, 但也不排除是由这 3 个基因整体表达水平一致升高或一致降低的可能性。因此, 有必要寻找每个基因的特异性引物对单个基因的转录分别分析, 以确定其组织表达特异性。

图 3 *TaPHYA* 的组织特异性表达的实时定量 PCR 分析
Fig. 3 Tissue-specific expression of *TaPHYAs* through real-time PCR

TaPHYA mRNA 提取自生长 90 d 的中国春, 取样前进行 24 h 黑暗处理。内参为 *TaActin*。

mRNA of *TaPHYA* was extracted from 90-day old seedlings of Chinese Spring, which were treated with darkness for 24 h before sampling. *TaActin* was used as the internal control.

在暗条件、远红光条件以及蓝光条件下, *TaPHYA* 转录表达水平明显高于在红光条件和白光条件下, 也说明 *PHYA* 基因的转录表达与光线调控相关^[22-24], 可以受不同光调控而表现不同模式^[25-26]。Hennig 和 Buche^[22]研究表明, 黑暗中 *PHYA* 通过转录和转录后水平的共同调节, 表达水平能够达到光条件下积累水平的 100 倍以上。本研究获得了与此趋势一致的结果。在本研究结果基础上进一步利用基因特异性引物研究每个基因的光质特异性, 将为研究小麦 *PHYA* 基因亚家族各个成员的功能提供更详细的证据。

图 4 不同光照条件下小麦 *TaPHYA* 的总转录水平

Fig. 4 Transcription levels of *TaPHYAs* in response to different light conditions

A 和 C: *PHY* 半定量 RT-PCR 结果; B 和 D: 定量 RT-PCR 结果。内参对照为 *TaActin*。Dk: 黑暗; FR: 远红光; R: 红光; B: 蓝光; WL: 白光。

A and C: semiquantitative RT-PCR result; B and D: real-time PCR result. *TaActin* was used as the internal control. Dk: darkness; FR: far-red light; R: red light; B: blue light; WL: white light.

4 结论

从小麦中分别克隆到 *TaPHYA1*、*TaPHYA2* 和 *TaPHYA3* 基因的完整表达序列。其中, *TaPHYA1* 和 *TaPHYA3* 基因开放阅读框包括 3 393 个核苷酸, 编码具有 1 130 个氨基酸残基的蛋白, 且具有完整的光敏色素基因功能结构域, 而 *TaPHYA2* 基因提前发生终止突变。小麦 *TaPHYA* 与禾本科作物水稻、玉米、高粱的 *PHYA* 的氨基酸序列相似性高, 而与双子叶植物中的 *PHYA* 相似性较低。小麦中 *TaPHYA* 的转录具有组织特异性, 并且在不同光质下转录不同, 其表达具有光质特异性。

致谢: 感谢美国堪萨斯州立大学小麦遗传与基因资源中心提供中国春缺体-四体材料 N4A-T4D 的种子。

References

- [1] Wang H, Deng X W. Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 172–178
- [2] Schepens I, Duek P, Fankhauser C. Phytochrome-mediated light signalling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 564–569
- [3] Garg A K, Sawers R J H, Wang H, Kim J K, Walker J M, Brutnell T P, Parthasarathy M V, Vierstra R D, Wu R J. Light-regulated overexpression of an *Arabidopsis* phytochrome A gene in rice alters plant architecture and increases grain yield. *Planta*, 2006, 223: 627–636
- [4] Thiele A, Herold M, Lenk I, Quail P H, Gatz C. Heterologous expression of *Arabidopsis* phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiol*, 1999, 120: 73–81
- [5] Dehesh K, Tepperman J, Christensen A H, Quail P H. *phyB* is evolutionarily conserved and constitutively expressed in rice seedling shoots. *Mol Gen Genet*, 1991, 225: 305–313
- [6] Basu D, Dehesh K, Schneider-Poetsch H J, Harrington S E, McCouch S R, Quail P H. Rice *PhyC* gene: structure, expression, map position and evolution. *Plant Mol Biol*, 2000, 44: 27–42
- [7] Takano M, Kanegae H, Shinomura T, Miyao A, Hirochika H, Furuya M. Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants. *Plant Cell*, 2001, 13: 521–534
- [8] Takano M, Inagaki N, Xie X, Yuzurihara N, Hihara F, Ishizuka T, Yano M, Nishimura M, Miyao A, Hirochika H, Shinomura T. Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell*, 2005, 17: 3311–3325
- [9] Sheehan M J, Farmer P R, Brutnell T P. Structure and expression of maize phytochrome family homeologs. *Genetics*, 2004, 167: 1395–1405
- [10] Gaut B S, Doebley J F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6809–6814
- [11] Ma Y-B(马燕斌), Li Z(李壮), Cai Y-F(蔡应繁), Zhou P(周朋), Xiao Y(肖阳), Huang Y-B(黄玉碧), Fu F-L(付凤玲), Pan G-T(潘光堂), Yang K-C(杨克诚), Yang J-P(杨建平). Isolation, protein structures and expression patterns responding to different light treatments of two phytochrome A genes in maize (*Zea mays* L.). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2010, 43(10): 1985–1993 (in Chinese with English abstract)
- [12] Wu F Q, Zhang X M, Li D M, Fu Y F. Ectopic expression reveals a conserved *PHYB* homolog in soybean. *PLoS One*, 2011, 6: e27737. DOI: 10.1371/journal.pone.0027737
- [13] Ogihara Y, Shimizu H, Hasegawa K, Tsujimoto H, Sasakuma T. Chromosome assignment of four photosynthesis-related genes and their variability in wheat species. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 383–394
- [14] Kulshreshtha R, Kumar N, Balyan H S, Gupta P K, Khurana P, Tyagi A K, Khurana J P. Structural characterization, expression analysis and evolution of the red/far-red sensing photoreceptor gene, phytochrome C (*PHYC*), localized on the 'B' genome of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta*, 2005, 221: 675–689
- [15] Li Z(李壮), Ma Y-B(马燕斌), Cai Y-F(蔡应繁), Wu S-W(吴锁伟), Xiao Y(肖阳), Meng F-H(孟凡华), Fu F-L(付凤玲), Huang Y-B(黄玉碧), Yang J-P(杨建平). Cloning and expression analysis of *TaPhyB3* in *Triticum aestivum*. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(5): 779–787 (in Chinese with English abstract)
- [16] Devos K M, Beales J, Ogihara Y, Doust A N. Comparative sequence analysis of the *Phytochrome C* gene and its upstream region in allohexaploid wheat reveals new data on the evolution of its three constituent genomes. *Plant Mol Biol*, 2005, 58: 625–641
- [17] Yu B-L(余波澜), Huang C-F(黄朝峰), Zhou W-J(周文娟), Zhang W-J(张文俊). Evolution study of wheat (*Triticum aestivum* L.) A, B and D genome based on DNA sequence similarity. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2001, 28(7): 635–639 (in Chinese with English abstract)
- [18] Yu H-X(于海霞), Tian J-C(田纪春). Review of genome B in *T. aestivum* L. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2008, 6(4): 724–732 (in Chinese with English abstract)
- [19] Clough R C, Jordan-Beebe E T. Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for PFR ubiquitination and degradation. *Plant J*, 1999, 17: 155–167
- [20] Weller J L, Batge S L, Smith J J, Kerckhoffs L H, Sineshchekov V A, Murfet I C, Reid J B. A dominant mutation in the pea *PHYA* gene confers enhanced responses to light and impairs the light-dependent degradation of phytochrome A. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2186–2195
- [21] Müller R, Fernández A P, Hiltbrunner A, Schäfer E, Kretsch T. The histidine kinase-related domain of *Arabidopsis* phytochrome

- A controls the spectral sensitivity and the subcellular distribution of the photoreceptor. *Plant Physiol*, 2009, 150: 1297–1309
- [22] Hennig L, Buche C. Dynamic properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, 1999, 121: 571–577
- [23] Quail P H. Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annu Rev Genet*, 1991, 25: 389–409
- [24] Wang H, Ma L, Habashi J, Li J, Zhao H, Deng X W. Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 32: 723–733
- [25] Canton F R, Quail P H. Both *phyA* and *phyB* mediate light-imposed repression of *PhyA* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1999, 121: 1207–1215
- [26] Somers D E, Quail P H. Temporal and spatial expression patterns of *PhyA* and *PhyB* genes in *Arabidopsis*. *Plant J*, 1995, 7: 413–427

信息索引

- 1386 欢迎订阅 2013 年《作物杂志》
- 1396 欢迎订阅 2013 年《农业科技通讯》
- 1424 欢迎订阅 2013 年《中国农业科学》中、英文版
- 1459 欢迎订阅 2013 年《中国农业科技导报》
- 1470 新书推介——《植物生物学》
- 1521 欢迎订阅 2013 年《中国生态农业学报》
- 1528 欢迎订阅 2013 年《作物学报》
- 1537 新书推介——《DNA 和蛋白质序列数据分析工具》
- 1550 欢迎订阅 2013 年《特产研究》
- 1552 关于召开“中国作物学会 2012 年学术年会”的通知