

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.01953

小麦 *TaFT* 基因编码区序列多态性及其与开花期的关系

孙道杰 冯毅 王辉* 闵东红 李学军

(西北农林科技大学农学院 / 国家小麦改良中心, 陕西杨凌 712100)

摘要: 春化基因 *VRN-B3* 是小麦开花素基因 *TaFT*, 为探索该基因在品种间的保守性及其与小麦开花早晚的关系, 根据 *TaFT* 基因序列(GenBank accession No.: DQ890162)设计特异 PCR 引物, 扩增了 13 个品种中该基因的编码区。通过测序和序列比对, 发现不同品种间该基因编码区的 DNA 序列存在多态性, 序列翻译发现 5 个品种的表达产物 FT 蛋白发生变异。利用中国春的非整倍体材料将 *TaFT* 基因定位在 7BS 染色体上。参考品种的冬春性及开花时间, 推测冬性品种正常的 FT 蛋白(同 DQ890162 翻译的氨基酸序列一致)可加速开花, FT 蛋白变异则延迟开花; 春性品种的 FT 蛋白变异与否对开花期影响不大, 推测 *TaFT* 基因的效应可能被春性品种的显性春化基因所掩盖。

关键词: 小麦; *TaFT* 基因; 序列多态性; 开花调控; 春化基因

Polymorphism of Wheat *TaFT* Gene Expressional Sequence and the Impact to Flowering Dates

SUN Dao-Jie, FENG Yi, WANG Hui*, MIN Dong-Hong, and LI Xue-Jun

(College of Agronomy, Northwest A&F University / National Wheat Improvement Center, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: It has been confirmed that the wheat vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. In this study, special PCR primers were designed using the software 'DNAMAN' based on the sequences of *TaFT* (GenBank No. DQ890162). The PCR products amplified from 13 cultivars with different flowering dates were sequenced from two directions. Sequence alignment was conducted using the software BioEdit. The results of DNA sequence polymorphism showed that the translational FT protein from five cultivars had mutations. The *TaFT* gene was mapped to chromosome 7BS using a set of nulli-tetrasomic lines and ditelosomic line 7BL of Chinese Spring. According to the vernalization characteristics and the flowering time we deduced that for the winter cultivars, the normal FT protein may accelerate flowering, the FT protein mutation will delay flowering; for the spring cultivars, the dominant vernalization allele genes may substitute the *TaFT* gene's function, and FT protein variation will not obviously influence flowering dates.

Keywords: *Triticum aestivum* L.; *TaFT*; Sequence polymorphism; Genetic control of flowering dates; Vernalization gene

植物的开花控制机制是生物学家研究的热点领域之一。通过对模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的深入研究, 基本上阐明了拟南芥开花控制的光周期途径是叶片中的光受体(光敏色素)感受光信号, 产生昼夜节律, 适当的昼夜节律将开启或影响昼夜节律基因(*CCA1*、*LHY*、*ELF3*、*TOC1*、*FKF1*、*ZTL*、*LUX*、*LOV*、*LKP2* 等)的表达^[1-3], *CDF1* 和 *GI* 感受昼夜节律基因的变化, 最终在叶中激活

*CONSTANS(CO)*的表达。当 *CO* 表达量超过特定临界值时就可以激活 *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) 的表达, 启动开花过程^[4-7]。早在 20 世纪 30 年代, Chailakhyan 根据嫁接实验提出开花素概念, 认为对光周期有不同反应的植物之间可能有相同的源自叶子的信号物质来促进开花, 因而植物开花时间受该信号物质控制, 但这种信号究竟是什么, 长期以来一直是一个有待研究的问题^[7-8]。Huang 等^[9]研究表明, *FT*

基金项目: 引进国际先进农业科学技术计划(948 计划)项目(2006-G2B)和国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A02)

作者简介: 孙道杰(1970–), 男, 河南焦作人, 博士, 研究方向: 小麦遗传育种。E-mail: chinawheat@163.com

*通讯作者(Corresponding author): 王辉(1943–), 男, 博士生导师, 从事小麦遗传育种研究。

Received(收稿日期): 2008-01-07; Accepted(接受日期): 2008-05-14.

mRNA(*FLOWERING LOCUS T* mRNA)可能是科学家寻找多年的开花素,这无疑是一项令人振奋的发现。但是 Corbesier 等^[10]研究表明,开花素是 FT 蛋白而并非 FT mRNA。FT 蛋白由叶片中的 FT 基因表达产生,经由植物脉管系统到达茎尖组织,激活其他基因并引起植物开花的全过程。Yan 等^[11]证实小麦(*Triticum aestivum* L.)的 *VRN-B3* 基因(即以前的 *VRN-B4*^[11])等同于拟南芥的 FT 基因,与春化作用互作并影响小麦的开花时间,可以称之为小麦的 FT 基因(*TaFT*),该基因有 3 个外显子和 2 个内含子,编码由 177 氨基酸组成的蛋白。

近些年,气候变化日趋明显,暖冬、倒春寒、干热风等灾害性天气出现的频率逐渐增加,威胁着小麦生产的安全性。为了稳定小麦生产,必须根据新的气候趋势,通过遗传改良来调整营养生长与生殖生长的转换点,调整各发育阶段的相对长度,使其与光周期等环境变化密切协调,从而使小麦适应新的气候条件,提高稳产性。为此,需要深入研究和发掘与开花控制密切相关的春化基因(*Vrn*)、光周期基因(*Ppd*)及固有的早熟性基因(*Eps*)^[12]。本研究尝试探索 *TaFT* 基因(*VRN-B3*)编码区 DNA 序列的多态性及其与开花期的关系,为小麦的生态育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及取样

选用具有类型和地域代表性的小麦材料 13 份,分别是 Holland-1(荷兰)、皖 38、西农 889、小偃 81、周麦 18、济麦 22、西农 979、豫麦 18、西农 1376、郑麦 9023、宁春 4 号、扬麦 5 号和 NF-134(加拿大),均由国家小麦改良中心杨凌分中心提供。以中国春缺四体及双端体材料(中国农业科学院作物科学研究所/国家小麦改良中心提供)对 *TaFT* 基因进行染色体定位。

2006 年 10 月 8 日于西北农林科技大学国家小麦改良中心杨凌分中心试验地播种,随机区组设计,每小区 3 行(行长 2 m,行距 25 cm),2 次重复,采用常规农作管理,陕西杨凌的气候条件可以保证所有材料都能正常春化并抽穗开花。准确记录各材料的抽穗期和开花期并判断其冬春性。小区有 50%以上顶部小穗露出剑叶,或棍棒型在叶鞘中上部裂开见小穗即为抽穗期;小区有 50%以上的穗中部小穗开始开花即为开花期;主要依据冬季苗相、发育情况、春化基因的分子标记鉴定结果^[13]及其在实际生产中

的表现综合判断冬春性。

1.2 基因组 DNA 提取

采用 SDS 法^[14],每基因型取 3 粒种子分别提取 DNA,经 0.8%琼脂糖凝胶电泳和 DV6600 紫外分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间,说明 DNA 基本无降解,适合于 PCR 扩增。用于 *TaFT* 基因的表达编码区多态性检测和染色体定位。

1.3 引物设计、*TaFT* 基因的编码区序列 PCR 扩增及 DNA 序列测定

使用 DNAMAN 软件,基于中国春的 *TaFT* 基因序列(GenBank No.: DQ890162)^[11]设计特异 PCR 引物。上下游引物对序列分别为 F: 5'-AAGGAAGGGC TAATGGCCG-3'; R: 5'-GGCCGTGGGTAGATCAAT TGT-3'(由上海生工生物工程技术有限公司合成)。PCR 体系为 20 μ L,含 10 \times buffer 2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U,4 种 dNTP 各 150 μ mol L⁻¹,每条引物 0.5 μ mol L⁻¹,模板 DNA 40~60 ng。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。预期扩增片段长度近 1 300 bp,使用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。由英骏生物技术有限公司进行扩增产物 DNA 测序。分别用 BioEdit 和 DNAMAN 软件进行 DNA 序列比较以及推测表达蛋白序列。

1.4 *TaFT* 基因的染色体定位

以中国春缺四体和双端体基因组 DNA 为模板,用 *TaFT* 基因特异引物进行 PCR 扩增,电泳检测、定位该基因。

2 结果与分析

2.1 小麦 *TaFT* 基因编码区 DNA 序列及预测蛋白氨基酸序列多态性分析

序列比对发现,内含子 I (627 bp)的序列在 13 份材料间完全一致, DNA 序列同源性为 100%; 与中国春 *TaFT* 基因内含子 II (97 bp)DNA 序列(GenBank No. DQ890162)相比,西农 1376 有 2 个 SNP 和 1 个碱基插入,扬麦 5 号有 1 个 SNP,豫麦 18 有 1 个碱基插入,其他材料 *TaFT* 基因内含子 II 与中国春的完全一致。与中国春 *TaFT* 基因外显子序列相比, Holland-1 在外显子 I 的第 40 碱基缺失,导致蛋白翻译时产生移码突变并过早出现终止密码子,产生无义突变(图 1); 皖 38 和西农 889 外显子 III 的第 222 碱基由“T”突变为“C”,致使密码子“TTC”变为“CTC”,相应的氨基酸也由苯丙氨酸(Phe)变为亮氨酸(Leu),这

2 种氨基酸都具有疏水 R 基(图 1); 郑麦 9023 外显子 III 的第 180 碱基处插入 1 个碱基“C”而第 219 碱基处缺失 1 个碱基“T”, 导致预测表达 FT 蛋白靠近 C 端的 15 个氨基酸发生移码突变(translational frameshifting), 但表达蛋白的总氨基酸数目未变(图 1); 扬麦 5 号外显子 III 的第 223 碱基“T”缺失, 导致预测表达 FT 蛋白 C 端的 16 个氨基酸发生移码突

变并继续延长(原终止密码子因移码突变而改变)(图 1)。小偃 81、周麦 18、济麦 22、西农 979、豫麦 18、西农 1376、宁春 4 号和 NF-134 等 8 个材料的相应 DNA 序列未发现多态性, 预测表达的 FT 蛋白完全一致。郑麦 9023、扬麦 5 号和皖 38 的等位变异序列已提交 GenBank(Accession No.: EU368120、EU368121 和 EU368122)。

H	MAGRDRDPLVVGR	LWGTCWTPSSGPPTSG*	-----
Y5	MAGRDRDPLVVGRVVG	VDLDPFVVRTTNLRVT	FGNRTVSNCELKPSMVAQQPRVEVGGNE
Z9023	MAGRDRDPLVVGRVVG	VDLDPFVVRTTNLRVT	FGNRTVSNCELKPSMVAQQPRVEVGGNE
W&X	MAGRDRDPLVVGRVVG	VDLDPFVVRTTNLRVT	FGNRTVSNCELKPSMVAQQPRVEVGGNE
CS	MAGRDRDPLVVGRVVG	VDLDPFVVRTTNLRVT	FGNRTVSNCELKPSMVAQQPRVEVGGNE
H	-----	-----	-----
Y5	MRTFYTLVMVDPDAPSP	SDPNLREYHLHWLVT	DIPGTTGASFGQEVMCYESPRPTMGIHRF
Z9023	MRTFYTLVMVDPDAPSP	SDPNLREYHLHWLVT	DIPGTTGASFGQEVMCYESPRPTMGIHRF
W&X	MRTFYTLVMVDPDAPSP	SDPNLREYHLHWLVT	DIPGTTGASFGQEVMCYESPRPTMGIHRF
CS	MRTFYTLVMVDPDAPSP	SDPNLREYHLHWLVT	DIPGTTGASFGQEVMCYESPRPTMGIHRF
H	-----	-----	-----
Y5	VLVLFQQQLGRQTVYAP	GWRQNFNTRDFAELYNL	GPPVAAVYSTASVRPAPAAGGCTI.....
Z9023	VLVLFQQQLGRQTVYAP	GWRQNFNTRDFAELALQ	PRPACRRRHILNCQREAGSGGRRMYN*
W&X	VLVLFQQQLGRQTVYAP	GWRQNFNTRDFAELYNL	GPPVAAVYTLNCQREAGSGGRRMYN*
CS	VLVLFQQQLGRQTVYAP	GWRQNFNTRDFAELYNL	GPPVAAVYFNCQREAGSGGRRMYN*

图 1 小麦 *TaFT* 基因预测表达的 FT 蛋白

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of wheat FT protein

H: Holland-1; Y5: Yangmai 5; Z9023: Zhengmai 9023; W&X: Wan 38 and Xinong 889; CS: Chinese Spring (DQ890162); “*”: stop codon; “...”: ellipsis amino acid; “-”: null. The amino acid variations are indicated with black background.

2.2 小麦 *TaFT* 基因的染色体定位

以缺四体和双端体基因组为模板, 用所设计 *TaFT* 基因特异引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测发现, 缺四体“N7B-D7D”(图 2 中 02 泳道)和双端体 7BL(图 2 中 21 泳道)均无扩增产物, 其他缺四体材料均扩增出预期片段。因而可以基本确定小麦的 *TaFT* 基因位于 7B 染色体的短臂上。与前人对春化基

因 *VRN-B3* (即以前的 *VRN-B4*^[11])的定位一致^[15]。

2.3 小麦 *TaFT* 基因产物 FT 蛋白多态性与开花期的关系

13 份小麦材料在陕西关中正常播种的抽穗开花期见表 1。Holland-1 的 *TaFT* 基因由于靠近氨基末端(amino terminus)发生移码突变并提前终止, 只能表达很短的多肽链, 不可能具备 FT 蛋白的生物学功

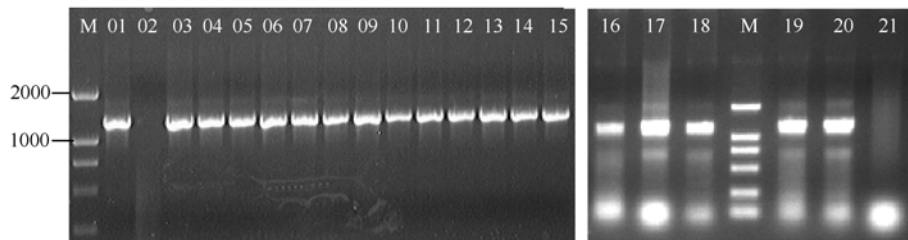


图 2 *TaFT* 基因特异引物的小麦非整倍体 PCR 电泳图谱

Fig. 2 PCR amplification of CS nulli-tetrasomic lines and ditelosomic line 7BL using the special primer for *TaFT* gene

由于材料较多, 分两次完成电泳检测(左右图)。M: DNA ladder DL2000; lane 02: Chinese Spring nullisomic 7B-tetrasomic 7D; lane 21: ditelosomic line 7BL.

表 1 13 份小麦材料的抽穗开花期及其 FT 蛋白
Table 1 Heading and flowering dates and FT protein of 13 wheat cultivars

品种 Cultivar	冬春性 Winter or spring habit	抽穗期 Heading date (month/day)	开花期 Flowering date (month/day)	FT 蛋白 FT protein
Holland-1	Winter	5/06	5/13	no FT protein
Wan 38	Winter	4/26	5/04	1 amino acid substitute
Xinong 889	Winter	4/25	5/03	1 amino acid substitute
Xiaoyan 81	Winter	4/20	4/29	normal
Zhoumai 18	Winter	4/19	4/28	normal
Jimai 22	Winter	4/20	4/30	normal
Xinong 979	Winter	4/14	4/23	normal
Yumai 18	Semi-winter	4/13	4/22	normal
Xinong 1376	Spring	4/10	4/20	normal
Zhengmai 9023	Spring	4/11	4/20	15 amino acid substitute
Ningchun 4	Spring	4/10	4/20	normal
Yangmai 5	Spring	4/12	4/21	carboxyl terminus translational frameshifting
NF-134	Spring	4/12	4/22	normal

每个材料的抽穗和开花期在 2 个重复之间均无差异。
The heading and anthesis dates are not different between 2 replicates.

能,因而在该材料中 *TaFT* 应为假基因(pseudogene),抽穗和开花很晚;皖 38 和西农 889 的 *TaFT* 基因序列产生相同的单核苷酸多态性(SNP)导致 FT 蛋白中一个氨基酸替换,对 FT 蛋白的功能可能产生些许影响,这两个品种抽穗和开花较晚;郑麦 9023 的 FT 蛋白在靠近 C 端处产生了包含 15 个氨基酸的移码突变,可能部分改变 FT 蛋白的功能,该品种抽穗和开花都较早;扬麦 5 号的 FT 蛋白发生了与郑麦 9023 类似的突变,只是位置处于 C 末端,并且原终止密码子因移码而改变,可能翻译出更长一些的多肽链;其他 8 份材料 *TaFT* 基因外显子序列未产生多态性,FT 蛋白正常。

3 讨论

小麦何时由营养生长转入生殖生长,受到春化基因、光周期基因、固有早熟基因(earliness *per se* genes)以及 *TaFT* 等开花相关基因的协同控制。春化基因和光周期基因对小麦发育的影响研究的比较深入^[12,15-17],固有早熟基因对发育影响也已阐明^[18-19]。证实 FT 蛋白就是科学家寻找多年的植物开花素是一项最新研究成果^[10],但 FT 蛋白是否只是其他发育相关基因用于控制开花的信号分子而其基因本身不具备直接环境应答并调控发育的功能,目前还难以定论。本研究展示了小麦 *TaFT* 基因编码区序列及表达产物 FT 蛋白的品种间多态性,该基因在品种间

的序列保守性(sequence conservation)并不高,表明其重要性不是很高。从所选用的 13 份材料来看,对于冬性品种,FT 蛋白难以表达的材料 Holland-1 开花很晚,FT 蛋白发生了单个氨基酸替换(功能可能有所改变)的皖 38 和西农 889(春化基因型均为 *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-D1*^[13])都表现较晚开花,而 FT 蛋白正常的西农 979、济麦 22、小偃 81 和周麦 18 表现较早开花,可见 FT 蛋白有利于提早冬性品种的开花期;然而对于春性品种,FT 蛋白局部氨基酸发生移码突变的郑麦 9023(*vrn-A1*, *Vrn-B1*, *vrn-D1*)和扬麦 5 号(*vrn-A1*, *vrn-B1*, *Vrn-D1*)^[13]却没有表现出晚花现象,FT 蛋白正常的宁春 4 号(*Vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-D1*)、豫麦 18(*vrn-A1*, *vrn-B1*, *Vrn-D1*)、西农 1376(*vrn-A1*, *vrn-B1*, *Vrn-D1*)和 NF-134(*Vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-D1*)的开花并不比郑麦 9023 和扬麦 5 号早,推测在春性品种中,FT 蛋白的促花作用可能被显性春化基因的功能所遮盖。

对拟南芥的研究表明,植物开花控制有光周期途径、春化途径、固有早熟性(自主途径)和 GA 途径 4 种,一个途径受阻将影响开花时间但不会完全阻止发育转换^[20-21]。郑麦 9023 和扬麦 5 号尽管 FT 蛋白发生变异(其功能是否改变尚不清楚),但其他途径如春化也会加速开花。FT 蛋白发生变异的冬性品种表现晚花现象,合理的解释应是正常的 FT 蛋白能够加速冬性品种的发育,使开花提早。

4 结论

小麦 *TaFT* 基因编码区序列在不同品种间存在较高的多态性; 根据编码区 DNA 序列推测的表达产物 FT 蛋白在品种间也存在氨基酸序列的多态性, 可能导致该蛋白功能的丧失或改变。对于冬性品种, 正常的 FT 蛋白可加速开花, FT 蛋白变异则延迟开花; 对于春性品种, 显性的春化基因可替代 *TaFT* 基因的功能, 因而 FT 蛋白是否正常对开花期影响不大。

References

- [1] Takano M, Inagaki N, Xie X, Yuzurihara N, Hihara F, Ishizuka T, Yano M, Nishimura M, Miyao A, Hirochika H. 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
- [2] Doyle M R, Davis S J, Bastow R M, McWatters H G, Kozma-Bognar L, Nagy F, Millar A J, Amasino R M. The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2002, 419: 74–77
- [3] Hazen S P, Schultz T F, Pruneda-Paz J L, Borevitz J O, Ecker J R, Kay S A. *LUX ARRHYTHMO* encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 10387–10392
- [4] Imaizumi T, Tran H G, Swartz T E, Briggs W R. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 2003, 426: 302–306
- [5] Ayre B G, Turgeon R. Graft transmission of a floral stimulant derived from *CONSTANS1*. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2271–2278
- [6] Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. *Science*, 2004, 303: 1003–1006
- [7] Sun C-H(孙昌辉), Deng X-J(邓晓建), Fang J(方军), Chu C-C(储成才). An overview of flowering transition in higher plants. *Hereditas (遗传)*, 2007, 29(10): 1182–1190 (in Chinese with English abstract)
- [8] Périlleux C, Bernier G. The control of flowering: Do genetical and physiological approaches converge. *Annu Plant Rev*, 2002, 6: 1–32
- [9] Huang T, Bohlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O. The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science*, 2005, 309: 1694–1696
- [10] Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 2007, 316: 1030–1033
- [11] Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Plant Biol*, 2006, 103: 19581–19586
- [12] Stelmakh A F. Genetics systems regulating flowering response in wheat. *Euphytica*, 1998, 100: 359–369
- [13] Zhang X K, Xiao Y G, Zhang Y, Xia X C, Dubcovsky J, He Z H. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. *Crop Sci*, 2008, 48: 458–470
- [14] Zhao S-H(赵姝华), Wang F-D(王富德), Zhang S-P(张世华), Lin F(林凤). The comparisons among the methods of extracting and purifying plant DNA. *Rain Fed Crops (杂粮作物)*, 1998, 18(2): 35–38(in Chinese)
- [15] Iwaki K, Haruna S, Niwa T, Kato K. Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and the *Vrn* genotype. *Plant Breed*, 2001, 120: 107–114
- [16] Worland A J, Börner A, Korzun V, Li W M, Petrovic S, Sayers E J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. *Euphytica*, 1998, 100: 385–394
- [17] Worland A J. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. *Euphytica*, 1996, 89: 49–57
- [18] Martinic J Z. Life cycle of common wheat varieties in natural environments as related to their response to shortened photoperiod. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 1975, 75: 237–251
- [19] Hoogendoorn J. The basis of variation in date of ear emergence under field conditioning amongst the progeny of a cross between two winter wheat varieties. *J Agric Sci*, 1984, 104: 493–500
- [20] Komeda Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 521–535
- [21] Mouradov A, Cremer F, Coupland G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 2002, 14(suppl): S111–S130