

小麦果聚糖合成酶基因 *6-SFT-A* 单核苷酸多态性分析及其定位

岳爱琴^{1,2}, 李 昂², 毛新国², 吕小平², 李润植¹, 贾继增², 景蕊莲²

(¹ 山西农业大学农学院, 山西太谷 030801; ² 中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/农业部作物种质资源利用重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: 【目的】小麦果聚糖合成酶基因 *6-SFT* 是果聚糖合成过程中的关键酶基因, 研究 *6-SFT-A* 的多态性, 分析其与小麦苗期抗旱性的关系, 并进行遗传定位。【方法】以苗期抗旱性不同的 30 份六倍体小麦和 4 份小麦 A 基因组供体种乌拉尔图小麦为材料, 通过直接测序分析 *6-SFT-A* 的单核苷酸多态性 (SNP) 及其与抗旱性的关系; 开发基因分子标记, 利用 RIL 群体 (偃展 1 号×内乡 188) 对该基因进行遗传定位。【结果】在 30 份六倍体小麦材料中检测到 14 个核苷酸多态性位点, 包括 13 个 SNP 和 1 个 InDel, 平均 234 bp 检测到一个多态性位点, 仅在 1 727 和 1 781 bp 2 个位点检测到非同义突变; 在 4 份乌拉尔图小麦中检测到 28 个 SNP 和 4 个 InDel, 其频率明显高于普通小麦。该基因的内含子 1、2、3 和外显子 3 为变异富集区, 其它区域变异较小, 外显子 2 变异最小, π 值为 0。34 份材料分为 3 种单倍型, HapI I 主要包括中等抗旱材料和水敏感材料, HapI III 中主要包括强抗旱材料和中等抗旱材料。利用 RIL 群体将该基因定位于染色体 4A 的标记 *Xcwm-27* 与 *Xwpt688* 之间, 遗传距离分别为 5.3 和 7.9 cM。【结论】单倍型分析表明, 小麦果聚糖合成酶基因 *6-SFT-A* 单倍型与小麦苗期抗旱性有一定的相关性。

关键词: 小麦; *6-SFT-A*; 单核苷酸多态性; 抗旱性; 单倍型; 遗传作图

Single Nucleotide Polymorphism and Mapping of *6-SFT-A* Gene Responsible for Fructan Biosynthesis in Common Wheat

YUE Ai-qin^{1,2}, LI Ang², MAO Xin-guo², CHANG Xiao-ping², LI Run-zhi¹, JIA Ji-zeng², JING Rui-lian²

(¹ Agronomy College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Crop Germplasm and Utilization, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】 *6-SFT* is a key gene responsible for the fructan biosynthesis in plants. The objective of the present study was to detect single nucleotide polymorphism (SNP) of *6-SFT-A*, determine the relationship between SNP and drought resistance, and mapping it on chromosome of wheat (*Triticum aestivum* L.). 【Method】 Thirty hexaploid wheat accessions with different drought resistance at seedling stage and four *T. urartu*, the A genome donor species of hexaploid wheat, were selected to detect the nucleotide polymorphism in *6-SFT-A* gene by sequencing, and determine the relationship between SNP and drought resistance. Using the recombinant inbred lines (RIL) derived from a cross Yanzhan 1 × Neixiang 188 mapped *6-SFT-A* on chromosome. 【Result】 Among the 30 hexaploid accessions, 14 polymorphism sites in *6-SFT-A* nucleotide sequences were identified, including 13 SNP and one InDel (insertion and deletion) with the polymorphism frequency of 1/234 bp, only two nonsynonymous mutation identified in 1 727 bp and 1 781 bp sites. The introns 1, 2, 3 and exon 3 were detected as the rich nucleotide variation regions. Exon 2 showed the least variation. Compared to the common wheat, *T. urartu* species exhibited higher

收稿日期: 2011-01-07; 接受日期: 2011-03-18

基金项目: 国家“973”计划项目 (2010CB951501)、CGIAR 挑战计划项目 (GCP, G7010.02.01)

联系方式: 岳爱琴, E-mail: yueaiqinnd@126.com. 通信作者景蕊莲, Tel: 010-82105829; E-mail: jingrl@caas.net.cn

sequence variation. Totally, three haplotypes were identified for the plant materials. Haplotype I consists of wheat accessions with medium-drought resistance and drought sensitivity. Haplotype III includes the wheat accessions with high- and medium-drought resistance. Using a population of 190 recombinant inbred lines derived from a cross of Yanzhan 1 × Neixiang 188, *6-SFT-A* was mapped on chromosome 4A between SSR markers *Xcwm-27* and *Xwpt 688*, and the genetic distances were 5.3 cM and 7.9 cM from the flanking markers, respectively. **【Conclusion】** The present data indicated that SNP in *6-SFT-A* gene is associated with wheat seedling drought resistance to some extent.

Key words: wheat (*Triticum aestivum* L.); *6-SFT-A*; single nucleotide polymorphism (SNP); drought resistance; haplotype; genetic mapping

0 引言

【研究意义】植物体内的果聚糖分布在根、茎、叶、花和种子等部位。在高等植物中,果聚糖不仅是一种重要的储藏性可溶性碳水化合物,也是主要的渗透调节物质,果聚糖在植物体内的积累可提高植物的抗旱、耐寒能力^[1-4]。果聚糖一方面在作物受到旱胁迫、冷胁迫时为植物提供己糖供植物生长和进行渗透调节,另一方面果聚糖的多糖基可以插入到细胞膜磷脂双层分子中间保持膜稳定性^[5-6]。因此,研究小麦果聚糖合成酶基因对于提高小麦抗旱性具有重要意义。**【前人研究进展】**果聚糖是以果糖为基本单位聚合而成,有4种不同的果糖基转移酶参与了果聚糖的合成,即蔗糖:蔗糖 1-果糖基转移酶(sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase, 1-SST)、蔗糖:果聚糖 6-果糖基转移酶(sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, 6-SFT)、果聚糖:果聚糖 1-果糖基转移酶(fructan:fructan 1-fructosyltransferase, 1-FFT)以及果聚糖:果聚糖 6G-果糖基转移酶(fructan:fructan 6G-fructosyltransferase, 6G-FFT),其中,6-SFT是果聚糖合成过程中的关键酶之一。该酶以蔗糖为底物,催化蔗糖分子上的果糖基转移到另一个蔗糖分子果糖基的C6位上,合成6-蔗果三糖(6-kestose),同时还能以寡果聚糖为底物,生成分支型果聚糖。小麦 *6-SFT* 已被克隆,转基因黑麦草植株叶片中果聚糖含量增加,抗旱、耐寒性增强^[7-8]。Gao等^[9]研究了6个抗旱性不同的小麦品种苗期旱胁迫过程中 *6-SFT* 的表达,发现抗旱材料中该基因的表达量高,水敏感材料表达量较低。Goggin等^[10]研究表明,在旱胁迫条件下,旱地小麦品种茎秆中积累的果聚糖是水地品种的2.5倍。核苷酸是遗传物质的最小组成单位,单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是基因组DNA上某一特定核苷酸由于转换、颠换、插入、缺失等变化而造成的DNA序列多态性。SNP广泛而稳定地存在

于植物基因组中,基因的SNP可能影响基因的功能。小麦 *Ppd-D1*、玉米苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* (phenylalanine ammonia-lyase)、大豆异黄酮合成酶基因 *IFS* (soybean isoflavone synthase) 的SNP多态性影响这些基因的功能^[11-13]。SNP作为新一代高通量的遗传标记,在植物多样性、群体遗传、系统进化与功能基因组学等领域发挥了重要作用^[14]。因此,研究小麦果聚糖合成酶基因 *6-SFT* 的SNP多态性与抗旱性的关系及其染色体遗传定位,对于发掘利用该基因的优异等位基因资源,改良小麦抗旱性具有重要意义。**【本研究切入点】**迄今为止,关于小麦 *6-SFT-A* 的核苷酸多态性及其与小麦抗旱性的关系、遗传定位还未见报道。**【拟解决的关键问题】**本研究以抗旱性不同的30份六倍体小麦和4份小麦A基因组供体种乌拉尔图小麦为材料,通过直接测序研究小麦 *6-SFT-A* 的核苷酸多态性;开发基因分子标记,以重组自交系群体(RIL)偃展1号×内乡188为材料进行遗传定位;并探讨 *6-SFT-A* 的核苷酸多态性与小麦苗期抗旱性的关系,为挖掘利用优异抗旱基因资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料包括重组自交系群体(RIL)偃展1号×内乡188的190个F₈株系^[15]、30份六倍体普通小麦(AABBDD)及6份小麦二倍体野生近缘种,即4份乌拉尔图小麦(*Triticum urartu*, AA)、1份拟斯卑尔脱山羊草(*Aegilops speltoides*, SS, B基因组供体)和1份粗山羊草(*Aegilops tauschii*, DD),均由中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室提供,材料的基本情况见表1。本课题组(小麦基因资源)利用83对SSR标记对由154份小麦材料构成的自然群体进行群体结构分析,结果表明,该群体分为4个亚群,本研究所用的30份六倍体小麦材料是从各亚群中挑选的典

表 1 分析 6-SFT-A 多态性的植物材料

Table 1 Plant materials for detecting 6-SFT-A polymorphism

序号 No.	材料名称 Accession	抗旱性 Drought resistance	产地 Origin	序号 No.	材料名称 Accession	抗旱性 Drought resistance	产地 Origin
1	北京 8686 Beijing 8686	HR	北京 Beijing, China	19	春 22 9th-25 Chun 22 9th-25	MR	CIMMITY
2	丰抗 13 Fengkang 13	HR	北京 Beijing, China	20	冀麦 41 Jimai 41	MR	河北 Hebei, China
3	京核 8922 Jinghe 8922	HR	北京 Beijing, China	21	偃展 1 号 Yanzhan 1	MR	河南 Henan, China
4	沧州小麦 Cangzhouxiaomai	HR	河北 Hebei, China	22	紫秆白芒先 Ziganbaimangxian	MR	河南 Henan, China
5	冀麦 6 号 Jimai 6	HR	河北 Hebei, China	23	长 6878 Chang 6878	MR	山西 Shanxi, China
6	白齐麦 Baiqimai	HR	甘肃 Gansu, China	24	京品 10 号 Jingpin 10	S	北京 Beijing, China
7	昌乐 5 号 Changle 5	HR	山东 Shandong, China	25	春 04 9th-5-1 Chun 04 9th-5-1	S	CIMMITY
8	鲁麦 14 Lumai 14	HR	山东 Shandong, China	26	春 45 9th-50-1 Chun 45 9th-50-1	S	CIMMITY
9	长武 131 Changwu 131	HR	陕西 Shaanxi, China	27	大荔 1 号 Dali 1	S	陕西 Shaanxi, China
10	晋 2148-7 Jin 2148-7	HR	山西 Shanxi, China	28	临抗 5108 Linkang 5108	S	山西 Shanxi, China
11	早选 10 号 Hanxuan 10	HR	山西 Shanxi, China	29	中国春 Chinese Spring	S	四川 Sichuan, China
12	04-030	MR	北京 Beijing, China	30	PANDAS	S	意大利 Italy
13	04-044	MR	北京 Beijing, China	31	乌拉尔图小麦 203 <i>T. urartu</i> 203 (UR203)	未知 Unknown	叙利亚 Syria
14	安 85 中 124-1 An 85 zhong 124-1	MR	北京 Beijing, China	32	乌拉尔图小麦 204 <i>T. urartu</i> 204 (UR204)	未知 Unknown	叙利亚 Syria
15	北京 10 号 Beijing 10	MR	北京 Beijing, China	33	乌拉尔图小麦 207 <i>T. urartu</i> 207 (UR207)	未知 Unknown	叙利亚 Syria
16	北京 14 号 Beijing 14	MR	北京 Beijing, China	34	乌拉尔图小麦 209 <i>T. urartu</i> 209 (UR209)	未知 Unknown	叙利亚 Syria
17	京 411 Jing 411	MR	北京 Beijing, China	35	拟斯卑尔脱山羊草 <i>Ae. speltoides</i> (Y2041)	未知 Unknown	不详 Unknown
18	单 R8093 Shan R8903	MR	北京 Beijing, China	36	粗山羊草 <i>Ae. tauschii</i> (Y215)	未知 Unknown	墨西哥 Mexico

HR: 强抗旱 High resistance; MR: 中等抗旱 Medium resistance; S: 水敏感 Sensitivity

型材料。

1.2 小麦苗期抗旱性鉴定

在长 60 cm、宽 40 cm、高 15 cm 的塑料箱中装入 10 cm 厚的中等肥力耕层土，灌水至田间持水量的 85%±5%。每塑料箱分为 21 个小区（即 3 行 7 列），每个小区播种一份材料 45 粒，覆土 2 cm 后盖塑料膜，于露天条件下培养。出苗后，揭去塑料膜，选留长势良好的 30 株。待苗长至三叶一心时，进行水分处理，处理和对照各 3 次重复，对照（水）保持水分充足，干旱胁迫（旱）处理的土壤水分保持在田间持水量的 60%—70%，连续处理 20 d。挖苗后用剪刀去根，将地上部分 105℃杀青 20 min，80℃烘干至恒重。利用幼苗地上部生物量的旱/水比值作为抗旱性指标，旱/水比值≥0.90 为强抗旱（HR），0.89—0.80 为中等抗旱（MR），<0.80 为水敏感（S）。

1.3 特异引物设计及筛选

以 NCBI 网站中的 6-SFT 序列（FJ228688）为参照，利用 Primer Premier 5.0 软件，设计通用引物（F1: 5'-TACCAA ACTCTCTTAGAGTTCACGAGGG-3'，R1: 5'-CACGAGTCCACTCTCCCAAACAACAATA-3'）。首先在小麦二倍体材料中扩增目标基因，然后根据 A、B、D 基因组 3'UTR 区的序列设计 A 基因组特异引物，筛选出 1 对能够在六倍体小麦基因组 DNA 中特异扩增 A 基因组目标基因的特异引物（F2: 5'-TACCAA ACTCTCTTAGAGTTCACGAGGG-3'，R2: 5'-GCCCAACAAAGTAATATACTGTGA-3'）。

1.4 目标片段的获得和测序

以供试材料基因组 DNA 为模板，用北京全式金公司的高保真酶 TransStart™ Fast *Pfu* DNA Polymerase 进行扩增，PCR 体系总体积为 15 μL，其中，ddH₂O 8.0 μL、5×PCR buffer 3.0 μL、引物 F (5 μmol·L⁻¹) 0.6 μL、引物 R (5 μmol·L⁻¹) 0.6 μL、dNTP (2.5 μmol·L⁻¹) 0.4

μL 、transfastpfu酶(5 U)0.3 μL 和模板DNA(20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 2.1 μL 。PCR程序为 95°C 5 min; 95°C 1 min, 59°C 45 s, 72°C 3 min 30 s, 35 次循环; 72°C 10 min, 15°C 保存。在 1.2% 琼脂糖凝胶中检测PCR产物, 挖胶回收目标片段, 连接于pEASY-Blunt载体, 转化后挑取阳性克隆, 测序。利用通用引物M13F、M13R及DNASar Primer软件设计的 4 条叠套测序引物, 按BigDye Terminator Kit v3.1 操作规程做测序PCR, 用DNA Analyzer 3730XL测序, 每份材料至少检测 6 个克隆。

1.5 目标片段 DNA 序列单核苷酸多态性检测

用 DNASar SeqMan 软件对测序数据进行质量评价, 通过设定组装参数(最小匹配长度为 50 bp, 最小匹配率为 95%), 对来自同一材料不同克隆的测序结果进行组装, 得到一致序列。利用 DNASar Megalign 软件分别对来自不同材料的序列进行多序列联配, 用 DnaSP5.10 分析目标序列的单核苷酸多态性及单倍型, 并计算遗传多态性指数 π 值。

1.6 小麦 *6-SFT-A* 遗传定位

RIL群体(偃展 1 号 \times 内乡 188)的遗传图谱上共定位了 478 个标记, 其中, 4A染色体上有 27 个标记^[15]。以RIL群体的 190 个株系为材料, 用 *6-SFT*的A基因组特异引物进行扩增, PCR产物用 *Mlu* I 37°C 酶切 2 h, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 利用Map Manage

QTL b20 软件 (LOD为 3.0) 对目标基因进行连锁分析。

2 结果

2.1 *6-SFT-A* 的序列结构

根据六倍体小麦 3 个二倍体野生近缘种中 *6-SFT* 基因组序列 3'UTR 的差异, 设计反向引物 R2, 正向引物 F2 序列与通用引物 F1 序列相同(图 1)。

用 A 基因组特异引物克隆 4 份乌拉尔图小麦(AA)和 30 份六倍体小麦的 *6-SFT-A*, 测序结果表明, 目标片段长度为 3 269 bp, 包括 4 个外显子(exon)、3 个内含子(intron)及 5'和 3'端的非编码区(UTR)(图 2)。外显子区域依次为 12—303 bp、447—455 bp、1 101—1 959 bp 和 2 458—3 160 bp, 其中, 第二外显子只有 9 个核苷酸(ATCCCAACG), 是目前植物基因组中发现的最小外显子。1—11 bp 为 5'-UTR, 3 161—3 269 bp 为 3'-UTR, 3 个内含子分别位于 304—446 bp、456—1 100 bp、1 960—2 457 bp 区段。*6-SFT-A* 编码区总长度为 1 863 bp, 编码 620 个氨基酸。*6-SFT* 属于糖基水解酶第 32 家族, 该家族典型的特征是具有糖基水解酶催化位点 NDPNG, 最小的第二外显子编码其中的 DPN。

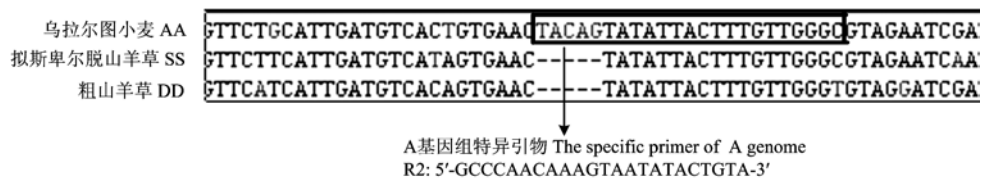


图 1 小麦 A 基因组 *6-SFT-A* 特异引物设计示意图

Fig. 1 Schematic for A genome specific primer design of *6-SFT-A*

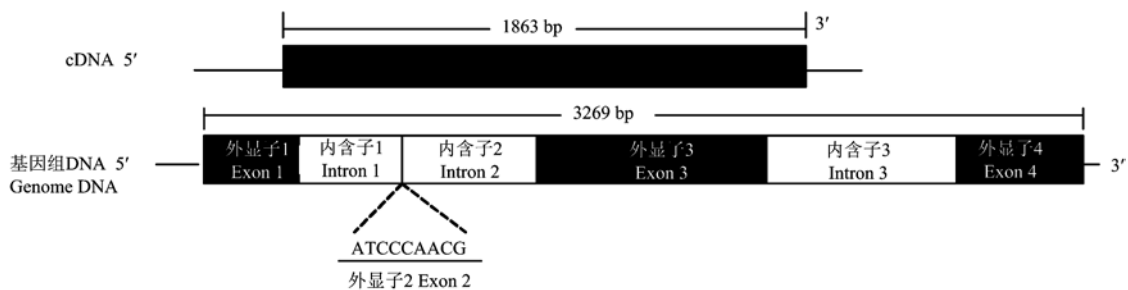


图 2 小麦 *6-SFT-A* 结构示意图

Fig. 2 Schematic representation of wheat *6-SFT-A* gene

2.2 6-SFT-A 序列多态性

在 4 份乌拉尔图小麦的 6-SFT-A 序列中共检测到 28 个 SNP 和 4 个 InDel, 其中, 10 个 SNP 位于编码区, 占总数的 36%, 18 个位于非编码区, 占总数的 64%, 4 个 InDel 全部位于非编码区, 平均 117 bp 有 1 个 SNP, 817 bp 有 1 个 InDel, 102 bp 有 1 个 SNP/InDel 位点(表 2)。在 30 份六倍体小麦的 6-SFT-A 序列中, 共检测到 14 个多态性位点, 包括 13 个 SNP 和 1 个 InDel, 其中, 6 个 SNP 发生在编码区, 占总数的 46%,

7 个发生在非编码区, 占总数的 54%, 平均 234 bp 检测到 1 个多态性位点, 每 251 bp 有 1 个 SNP 位点, 3 269 bp 只有 1 个 InDel。在六倍体小麦 6-SFT-A 的核苷酸变异中, 8 个 SNP 位点发生转换(A↔G、C↔T), 5 个 SNP 位点发生颠换(A↔C、A↔T、G↔C、G↔T), 转换与颠换的比率为 1.6 : 1, 转换是主要的碱基突变类型。该基因在二倍体种中的变异频率大于六倍体小麦, 这可能是六倍体小麦长期承受强大的人工选择压力造成的。

表 2 6-SFT-A 序列核苷酸变异

Table 2 Nucleotide acid variation in 6-SFT-A

供试材料 Accession	区域 Region	序列长度 DNA sequence (bp)	单核苷酸多态性 SNP		插入缺失 InDel	
			数量 Number	备注 Comment	数量 Number	备注 Comment
六倍体小麦 Hexaploid	非编码区 Non-coding region	1406	7	1 个 SNP/201 bp	1	1 个 InDel/1406 bp
	编码区 Coding region	1863	6	1 个 SNP/311 bp	0	0 个 InDel/1863 bp
	整个分析区 Complete region	3269	13	1 个 SNP/251 bp	1	1 个 InDel/3269 bp
二倍体小麦 Diploid	非编码区 Non-coding region	1406	18	1 个 SNP/78 bp	4	1 个 InDel/352 bp
	编码区 Coding region	1863	10	1 个 SNP/186 bp	0	0 个 InDel/1863 bp
	整个分析区 Complete region	3269	28	1 个 SNP/117 bp	4	1 个 InDel/817 bp

2.3 6-SFT-A 多态性位点分布

基因序列的核苷酸多样性研究通常以 π 值为指标, 衡量同一位点不同序列两两之间的差异。本研究 34 份材料 6-SFT-A 序列多样性在各区域中呈现不均匀分布(图 3), 基因全长的 π 值为 0.00273。内含子 1、2、3 和外显子 3 (共计 2 165 bp) 为变异富集区, π 值均超过 0.0035。这几个区段 π 值依次为 0.00465、0.00395、0.00376 和 0.00359。外显子 2 和 4 最保守,

π 值分别为 0 和 0.00036, 表明编码区的遗传变异程度小于非编码区。6-SFT-A 的多态性位点分布模式可能与各区段所承受的选择压力有关, 非编码区承受的选择压力相对较小, 因而变异频率较高, 而编码区编码有生物学功能的蛋白质, 承受的选择压力较大, 因此, 核苷酸的变异频率较低。

2.4 6-SFT-A 编码区多态性位点分析

对普通小麦 6-SFT-A 编码区 SNP 进行检测, 整个编码区有 6 个碱基位点发生了变化, 并且均表现为碱基转换, 没有 InDel 和碱基颠换。4 个 SNP 为 A↔G 转换, 2 个为 C↔T 转换。其中 4 个是同义突变, 2 个为非同义突变(表 3)。同义突变的 π 值为 0.00218, 非同义突变的 π 值为 0.00200, 同义突变的遗传变异程度略大于非同义突变。六倍体小麦 6-SFT-A 编码区的 SNP 发生在外显子 1 和 3, 在不同材料中均有碱基变化。分布在外显子 3 的多态性碱基位点最多, 共有 5 个, 而且 2 个非同义突变都发生在外显子 3, 碱基均由 A 变为 G, 但是 1 727 bp 位点变异是将酰胺类的天冬酰胺(Nasn)变为酸性氨基酸类的天冬氨酸(Dasp), 而 1 781 bp 位点导致羟基类的苏氨酸(Ythr)变为脂肪族类的丙氨酸(Aala)。这 2 个氨基酸变异位点均位于该酶的功能结构域, 可能会影响基因的功能。

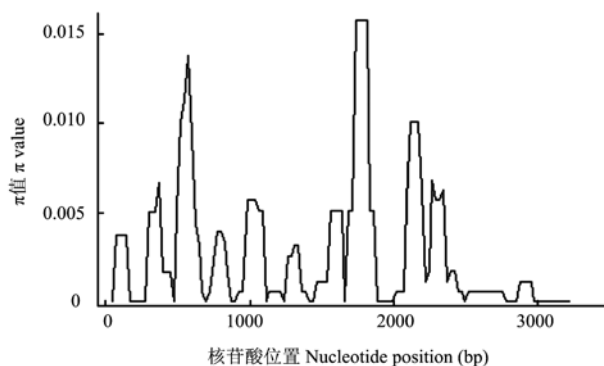


图 3 6-SFT-A 多态性位点分布的 Sliding-window 分析

Fig. 3 Sliding-window analysis of 6-SFT-A polymorphism sites

表 3 *6-SFT-A* 编码区核苷酸变异Table 3 Nucleotide mutation in coding region of *6-SFT-A*

序号 No.	位点 Site (bp)	区域 Region	类型 Type	单核苷酸变异 Single nucleotide mutation (x/y)	氨基酸变异 Amino acid change	变异类型 Mutation type
1	116	Exon1	SNP	C/T		S
2	1609	Exon3	SNP	A/G		S
3	1727	Exon3	SNP	A/G	Asn /Asp	N
4	1781	Exon3	SNP	A/G	Thr/Ala	N
5	1783	Exon3	SNP	A/G		S
6	1831	Exon3	SNP	T/C		S

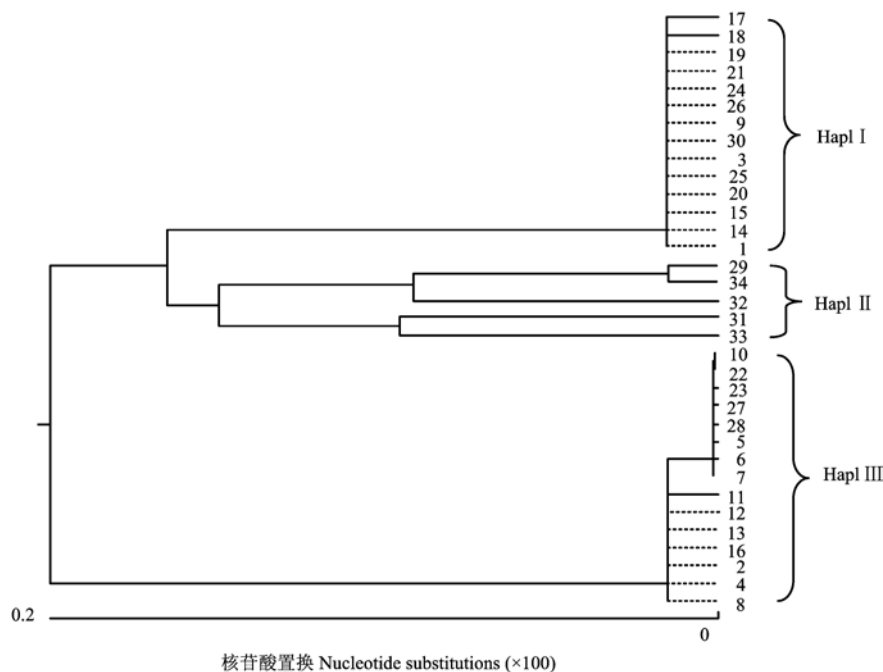
x/y 表示碱基由“x”突变为“y”，如“A/G”表示该位点由“A”突变为“G”；S表示同义突变；N表示非同义突变

x/y means that base x change to y, i.e. A/G means A changed to G; S indicates synonymous mutation; N indicates non-synonymous mutation

2.5 *6-SFT-A* 单倍型分析

对 34 份供试材料的 *6-SFT-A* 全长基因组序列进行聚类分析，得到 3 种单倍型 (haplotype) (图 4)。4 份二倍体材料 UR203、UR204、UR207、UR209 和地方品种中国春聚在 Hapl II，其中，中国春与 UR209 的相似性最高。Hapl II 与 Hapl I 的相似性较高，与 Hapl III 的相似性较低。Hapl I 共有 14 份材料，包括 3 份强抗旱材料、7 份中等抗旱材料和 4 份水敏感材料。Hapl III 包括 15 份材料，其中 8 份强抗旱材料，5 份中等抗旱材料和 2 份水敏感材料，强抗旱材料有白齐麦、

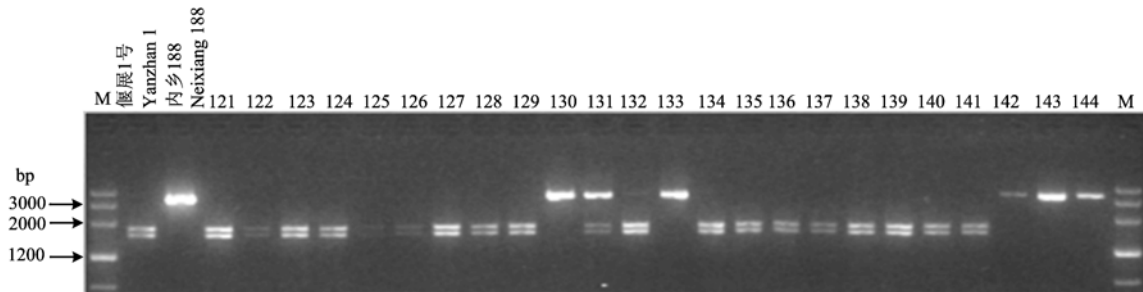
昌乐 5 号、冀麦 6 号、晋 2148-7、沧州小麦、丰抗 13、鲁麦 14 和早选 10 号。由聚类结果可以看出，Hapl III 主要为抗旱材料，占总数的 87%，其中，强抗旱材料占总数的 53%，而 Hapl I 中强抗旱材料仅占总数的 23%。相关分析表明，苗期生物量 (旱/水比值) 与 *6-SFT-A* 单倍型呈显著相关 ($P < 0.05$)，Hapl III 的平均苗期生物量 (旱/水比值=0.91) 显著高于 Hapl I (0.84)。结果表明，*6-SFT-A* 单倍型与小麦苗期抗旱性有一定的对应关系，不过 Hapl III 中也存在水敏感材料。

图 4 *6-SFT-A* 序列单倍型关系结构树Fig. 4 Phylogenetic tree for *6-SFT-A* haplotype relationship

2.6 6-SFT-A 遗传定位

用 6-SFT 的 A 基因组特异引物对 RIL 群体亲本偃展 1 号和内乡 188 进行扩增, 偃展 1 号属于 Hapl I, 内乡 188 属于 HaplIII, 2 个亲本在 1 781 位点的碱基分别为 G 和 A, 该位点使 2 个亲本具有 *Mlu* I 酶切位

点差异。偃展 1 号可以被酶切为 1 742 和 1 527 bp 两条片段, 而内乡 188 无此酶切位点 (图 5)。用此 PCR-RFLP 标记检测 RIL 群体的 190 个株系, 将该基因定位于染色体 4A 的 SSR 标记 *Xcwm-27* 与 *Xwpt688* 之间, 遗传距离分别为 5.3 和 7.9 cM (图 6)。



121—144: RIL 群体 (偃展 1 号×内乡 188) 的 24 个株系 24 lines of RILs (Yanzhan 1×Neixiang 188)

图 5 RIL 群体 (偃展 1 号×内乡 188) 中 6-SFT-A 的分离

Fig. 5 Separation of 6-SFT-A in RILs (Yanzhan 1×Neixiang 188)

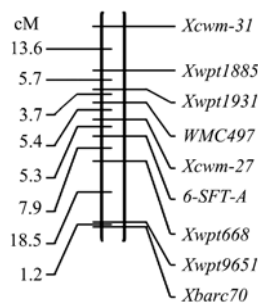


图 6 6-SFT-A 在小麦染色体 4A 上的遗传定位

Fig. 6 Linkage map of 6-SFT-A and its flanking markers on wheat chromosome 4A

3 讨论

迄今为止, 生物基因组序列的单核苷酸多态性是已发现的最丰富的遗传变异。在玉米基因组中每 57 bp 就有 1 个 SNP^[16], 大豆基因组中每 272 bp 有 1 个 SNP^[17], 而人类基因组中大约 1 000 bp 有 1 个 SNP。本研究在 30 份六倍体小麦 6-SFT-A 的 3 269 bp 序列中发现了 13 个 SNP 和 1 个 InDel, 单核苷酸多态性频率是 251 bp 有 1 个 SNP 和 3 269 bp 有 1 个 InDel。由此可见, 基因或基因组中 SNP/InDel 频率可能与生物种类、基因种类及功能等有关。

小麦 6-SFT-A 单核苷酸多态性类型中, 插入与缺

失较少, 30 份六倍体材料的基因全长序列 3 269 bp 中只有 1 个 InDel, 4 份乌拉尔图小麦 (AA) 中平均 817 bp 有 1 个 InDel, 分别占单核苷酸多态性总数的 7.1% 和 12.5%, 这与多数文献报道的结果类似^[18-19]。小麦 6-SFT-A 基因的转换与颠换比例是 1.6 : 1, 比老鼠^[20]、水稻^[21]、玉米^[16]及小麦 *TaDREBI*^[22] 中转换与颠换的比例低, 但是比大豆基因和小麦 *TaCRT-D* 中转换与颠换的比例高^[17,23], 因此推测单碱基的突变形式也因物种和基因的不同而异。

对 6-SFT-A 的 3 个内含子和 4 个外显子的研究发现, 内含子 1 的 π 值最大, 为 0.00465, 外显子 3 的 π 值较大, 为 0.00359。6-SFT-A 的 SNP 多态性分布类似于人类基因组基因 SNP 的分布, 主要在 5' 起始编码区和 3' 编码区附近^[24]。启动子区域和第一内含子区域对于在转录水平调控基因的表达非常重要, 为了适应不同的环境, 小麦在驯化和人工改良过程中保留了这些区域丰富的多态性^[11]。此外, 6-SFT-A 的第二外显子最小, 只有 9 bp, 但也最保守, 不仅在 6-SFT 序列 A 基因组不同材料中没有 SNP/InDel, 而且在同一材料的 A、B、D 3 个基因组之间、以及同一基因组不同材料之间均没有核苷酸多态性, 说明该区段的保守性和重要性。但是, Bournay 等^[25] 对糖基水解酶家族的研究表明, 当马铃薯受到低温胁迫时, 茎和叶中糖基水解酶 mRNA 前体在转录后的加工过程中会将这段最小外显子剪切掉。Simpson 等^[26] 进一步研究表明, 最小外显子被剪

切是由于第 1、3 内含子剪接位点序列发生突变造成的。小麦在受到早胁迫和冷胁迫时果聚糖合成酶是否也会在转录后加工的过程中剪切掉该外显子, 从而影响小麦的抗旱性有待研究。

Ponomarenko 等^[27] 研究指出, 植物中 SNP 的大量出现可能是自然选择的结果, 因为当基因中编码蛋白质的 SNP 随着自然选择 and 时间的推移而得以保留时, 这些 SNP 的变异就很有可能以某种方式帮助生物进化。在本研究中, 与 Hapl I 相比, Hapl III 在 *6-SFT-A* 编码区有 6 个碱基变异, 包括 4 个同义突变, 2 个非同义突变。其中, 外显子 3 的 1 727 和 1 781bp 位点碱基突变不仅直接导致其编码氨基酸发生变异, 而且突变氨基酸的生化性质如极性、酸碱性和芳香性等也发生变化。Hapl III 中的 2 个非同义突变可能与抗旱性有一定的关系, 不过, 究竟是由于外显子 3 的 2 个非同义突变导致蛋白功能变异, 还是其它同义突变影响表达水平从而导致小麦苗期抗旱性增强, 还有待进一步研究。

作物抗旱性是由多基因控制的复杂数量性状, 其中, 单个基因对抗旱性有一定的作用, 但这种作用是微效的, 也可能是单方面的。作为功能基因, *6-SFT-A* 的多态性能否引起植物生理性状的改变, 还有赖于其上游相关基因如 *PP2A* 的调控作用^[28]。虽然发现该基因的单核苷酸多态性与小麦抗旱性有一定的对应关系, 例如 Hapl III 中抗旱材料是主体, 但是也包括少数水分敏感的基因类型, 说明该基因与抗旱性之间的关系是复杂的。利用 *6-SFT-A* 外显子 3 的 2 个非同义突变 SNP 开发功能标记, 结合其上游基因的优异单倍型组合, 扩大小麦材料范围, 进行标记与抗旱性的关联分析, 将有助于揭示小麦 *6-SFT* 与抗旱性的关系。

根据 *6-SFT-A* 序列在 RIL 群体亲本偃展 1 号和内乡 188 之间的差异, 开发了基因分子标记, 将该基因定位于染色体 4A 的标记区间 *Xcwm-27—Xwpt688*。Yang 等^[29] 利用小麦 DH 遗传群体 (早选 10 号×鲁麦 14), 在此标记附近检测到影响籽粒灌浆速率的 QTL; Wu 等^[30] 利用同一 DH 群体在此标记附近检测到不同水分条件下作用于株高的 QTL。在 *6-SFT-A* 附近检测到的 QTL 为进一步研究该基因的功能提供了参考。

4 结论

分析了不同抗旱性小麦材料中 *6-SFT-A* 的多态性, 在 30 份六倍体小麦材料中检测到 14 个核苷酸多态性位点, 包括 13 个 SNP 和 1 个 InDel; 在 4 份乌拉尔图小麦中检测到 28 个 SNP 和 4 个 InDel, 其频率明

显高于普通小麦。34 份小麦材料分为 3 种单倍型, Hapl III 中主要包括强抗旱材料和中等抗旱材料。利用 RIL 群体将 *6-SFT-A* 定位于染色体 4A 的标记区间 *Xcwm-27—Xwpt688*, 与侧翼标记的遗传距离分别为 5.3 和 7.9 cM。

References

- [1] Wardlaw I F, Willenbrink J. Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytologist*, 2000, 148: 413-422.
- [2] Foulkes M J, Sylvester-Bradley R, Weightman R, Snape J W. Identifying physiological traits associated with improved drought resistance in winter wheat. *Field Crops Research*, 2007, 103: 11-24.
- [3] Volaire F, Lelièvre F. Production, persistence, and water soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought in the South of France. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1997, 48: 933-944.
- [4] Portes M T, Figueiredo-Ribeiro R C L, Carvalho M A M. Low temperature and defoliation affect fructan-metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165: 1572-1581.
- [5] Vereyken I J, Kuik J A, Evers T H, Rijken P J, Kruijff B. Structural requirements of the fructan-lipid interaction. *Biophysical Journal*, 2003, 84: 3147-3154.
- [6] Spollen W G, Nelson C J. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology*, 1994, 106: 329-336.
- [7] Kawakami A, Yoshida M. Molecular characterization of sucrose: Sucrose 1-Fructosyltransferase and sucrose:Fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in wheat during cold hardening. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2002, 66(11): 2297-2305.
- [8] Hisano H, Kanazawa A, Kawakami A, Yoshida M, Shimamoto Y, Yamada T. Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science*, 2004, 167: 861-868.
- [9] Gao X, She M Y, Yin G X, Qiao W H, Du L P, Ye X G. Cloning and characterization of genes coding for fructan biosynthesis enzymes (FBEs) in triticeae plants. *Agricultural Sciences in China*, 2010, 9(3): 313-324.
- [10] Goggin D E, Setter T L. Fructosyltransferase activity and fructan accumulation during development in wheat exposed to terminal drought. *Functional Plant Biology*, 2004, 31: 11-21.
- [11] Guo Z A, Song Y X, Zhou R H, Ren Z L, Jia J Z. Discovery,

- evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene. *New Phytologist*, 2009, 185: 841-851.
- [12] Andersen J R, Zein I, Wenzel G, Krützfeldt B, Eder J, Ouzunova M, Lübberstedt T. High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a *Phenylalanine Ammonia-Lyase* locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114: 307-319.
- [13] Cheng H, Yu O, Yu D Y. Polymorphisms of *IFS1* and *IFS2* gene are associated with isoflavone concentrations in soybean seeds. *Plant Science*, 2008, 175: 505-512.
- [14] Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5: 94-100.
- [15] 宋彦霞. 小麦抽穗期及其它农艺性状的 QTL 分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- Song Y X. QTL analysis of the wheat earing period and other agronomic characters[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [16] Guillet-Claude C, Birolleau-Touchard C, Manicacci D, Rogowsky P M, Rigau J, Murigneux A, Martinant J P, Barrière Y. Nucleotide diversity of the *ZmPox3* maize peroxidase gene: Relationships between a MITE insertion in exon 2 and variation in forage maize digestibility. *BMC Genetics*, 2004, 5(19): 1-11.
- [17] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, Van Tassell C P, Matukumalli L K, Grimm D R, Hyatt S M, Fickus E W, Young N D, Cregan P B. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*, 2003, 163: 1123-1134.
- [18] Stephens J C, Schneider J A, Tanguay D A, Choi J, Acharya T, Stanley S E, Jiang R H, Messer C J, Chew A, Han J H, Duan J C, Carr J L, Lee M S, Koshy B, Kumar A M, Zhang G, Newell W R, Windemuth A, Xu C B, Kalbfleisch T S, Shaner S L, Arnold K, Schulz V, Drysdale C M, Nandabalan K, Judson R S, Rúaño G, Vovis G F. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*, 2001, 293: 489-493.
- [19] Schmid K J, Sørensen T R, Stracke R, Törjék O, Altmann T, Mitchell-Olds T, Weisshaar B. Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 2003, 13: 1250-1257.
- [20] Lindblad-Toh K, Winchester E, Daly M J, Wang D G, Hirschhorn J N, Lavolette J P, Ardlie K, Reich D E, Robinson E, Sklar P, Shah N, Thomas D, Fan J B, Gingeras T, Warrington J, Patil N, Hudson T J, Lander E S. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nature Genetics*, 2000, 24: 381-386.
- [21] Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 1212-1220.
- [22] 陈吉宝, 景蕊莲, 员海燕, 卫波, 昌小平. 小麦 *TaDREB1* 基因的单核苷酸多态性分析. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2387-2394.
- Chen J B, Jing R L, Yuan H Y, Wei B, Chang X P. Single nucleotide polymorphism of *TaDREB1* gene in wheat germplasm. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(12): 2387-2394. (in Chinese)
- [23] 王计平, 毛新国, 景蕊莲, 李润植, 昌小平. 小麦抗旱相关基因 *TaCRT-D* 单核苷酸多态性分析. 中国农业科学, 2008, 41(12): 3983-3990.
- Wang J P, Mao X G, Jing R L, Li R Z, Chang X P. Single nucleotide polymorphism of *TaCRT-D* gene associated with drought resistance in wheat germplasm. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(12): 3983-3990. (in Chinese)
- [24] The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 2007, 449: 851-861.
- [25] Bournay A S, Hedley P E, Maddison A, Waugh R, Machray G C. Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(12): 2347-2351.
- [26] Simpson C G, Hedley P E, Watters J A, Clark G P, McQuade C, Machray G C, Brown J W S. Requirements for mini-exon inclusion in potato invertase mRNAs provides evidence for exon-scanning interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: 422-433.
- [27] Ponomarenko J V, Merkulova T I, Vasiliev G V, Levashova Z B, Orlova G V, Lavryushev S V, Fokin O N, Ponomarenko M P, Frolov A S, Sarai A. rSNP-Guild, a database system for analysis of transcription factor binding to target sequences: Application to SNPs and site-direction mutations. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(1): 312-316.
- [28] Martínez-Noël G, Tognetti J A, Salerno G L, Wiemken A, Pontis H G. Protein phosphatase activity and sucrose-mediated induction of fructan synthesis in wheat. *Planta*, 2009, 230: 1071-1079.
- [29] Yang D L, Jing R L, Chang X P, Li W. Identification of quantitative trait loci and environmental interactions for accumulation and remobilization of water-soluble carbohydrates in wheat (*Triticum aestivum* L.) stems. *Genetics*, 2007, 176: 571-584.
- [30] Wu X S, Wang Z H, Chang X P, Jing R L. Genetic dissection of the developmental behaviours of plant height in wheat under diverse water regimes. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(11): 2923-2937.