

小麦蛋白磷酸酶 2A 结构亚基基因 *TaPP2Aa* 的功能标记作图

王智兰^{1,2}, 毛新国², 李 昂², 昌小平², 刘惠民¹, 景蕊莲²

(¹山西大学生物工程学院, 太原 030006; 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】开发小麦抗旱相关蛋白磷酸酶结构亚基基因 *TaPP2Aa* 的功能标记并作图, 为分子标记辅助选择抗逆育种提供依据。【方法】测序得到普通小麦及其野生近缘种 *TaPP2Aa* 的基因序列, 分析其 SNP 位点差异, 设计 3 对基因组特异引物和 6 对基因组内等位基因特异引物, 利用中国春缺四体对 *TaPP2Aa* 进行染色体定位, 利用 RIL 群体 (Opata 85×W7984) 和 DH 群体 (旱选 10 号×鲁麦 14) 进行该基因的功能标记作图。【结果】*TaPP2Aa* 定位于小麦第 5 同源染色体群上; *TaPP2Aa-B* 位于 RIL 群体 5B 的标记区间 *Xwg909—Xgwm67*, 与 2 个标记的遗传距离分别为 4.0 cM 和 3.6 cM, 在 DH 群体 5B 染色体的标记区间 *Xgwm234—WMC363*, 与 *WMC363* 的遗传距离为 7.5 cM; 在 2 个遗传群体中与标记 *Xgwm67* 的距离分别为 3.6 cM 和 11.4 cM。 *TaPP2Aa-D* 位于 RIL 群体染色体 5D 的标记区间 *Xcmwg770—Xbarc205*, 遗传距离分别为 9.8 cM 和 10.0 cM。【结论】确定了 *TaPP2Aa* 所在的染色体位置, 通过与 DH 和 RIL 2 个遗传作图群体中已有的抗逆主效 QTL 进行对比分析, 明确了 *TaPP2Aa* 与小麦抗逆性状 QTL 具有遗传连锁关系, 开发的功能标记可用于小麦抗逆性状的分子标记辅助选择。

关键词: 普通小麦; *TaPP2Aa*; 功能标记; 遗传作图

Functional Marker Mapping of Protein Phosphatase 2A Structural Subunit Gene *TaPP2Aa* in Common Wheat

WANG Zhi-lan^{1,2}, MAO Xin-guo², LI Ang², CHANG Xiao-ping², LIU Hui-min¹, JING Rui-lian²

(¹ College of Bioengineering, Shanxi University, Taiyuan 030006; ² Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Crop Germplasm Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】 The purpose of the present research was to develop functional markers of protein phosphatase 2A structural subunit gene *PP2Aa* in common wheat (*Triticum aestivum* L.) for marker assisted selection in breeding of drought tolerance. 【Method】 Based on the single nucleotide polymorphism (SNP) in the sequences of *PP2Aa* gene in common wheat and its wild relative species, three genome-specific primer pairs and six allele-specific primer pairs were designed. The Chinese Spring nulli-tetrasomic lines, a recombinant inbred line (RIL) population (Opata 85 × W7984) and a doubled haploid (DH) population (Hanxuan 10 hao× Lumai 14) were used for genetic location and mapping of *TaPP2Aa*. 【Result】 The *TaPP2Aa* gene was located on chromosomes 5A, 5B and 5D. *TaPP2Aa-B* was mapped in the intervals between markers *Xwg909* and *Xgwm67* on chromosome 5B in RIL population, 4.0 cM and 3.6 cM from the flanking markers, and between markers *Xgwm234* and *WMC363* on chromosome 5B in DH population, 7.5 cM from *WMC363*, 3.6 cM and 11.4 cM from the common marker *Xgwm67* in two populations, respectively. *TaPP2Aa-D* was mapped in the interval between markers *Xcmwg770* and *Xbarc205* on chromosome 5D in RIL population, 9.8 cM and 10.0 cM from them. 【Conclusion】 The present study mapped the *TaPP2Aa* on the homoeologous chromosomes 5A, 5B and 5D.

收稿日期: 2010-12-29; 接受日期: 2011-02-17

基金项目: 国家“973”计划项目 (2010CB951501)、北京市优秀博士学位论文指导教师科技项目 (YB20088210101)、CGIAR 挑战计划项目 (GCP, G7010.02.01)

联系方式: 王智兰, E-mail: wangyan1111ai@163.com. 通信作者景蕊莲, Tel: 010-82105829; E-mail: jingrl@caas.net.cn

Through comparative analysis with main effect QTLs for stress resistance in DH and RIL genetic populations, the genetic linkage between *TaPP2Aa* and stress-resistant QTLs was identified. The functional markers developed for *TaPP2Aa-B* and *TaPP2Aa-D* can be used for marker assisted selection to enhance the efficiency of wheat stress-tolerant improvement.

Key words: common wheat; *TaPP2Aa*; functional marker; genetic mapping

0 引言

【研究意义】蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 通过调节大分子保护因子、渗透调节因子和转录因子等相应蛋白的可逆磷酸化来调控下游一系列逆境应答基因的表达, 在植物抵抗干旱、高盐和低温等逆境中发挥重要作用^[1-2]。对小麦蛋白磷酸酶 PP2A 基因进行遗传定位, 有助于了解该基因的遗传信息, 明确其与小麦抗逆性状的连锁关系, 为小麦分子育种提供依据。【前人研究进展】PP2A 全酶是由结构亚基 A、催化亚基 C 和调节亚基 B 组成的异源三聚体。早期对 PP2A 的研究主要集中在人类和小鼠等哺乳动物, 研究表明该基因参与基因表达、细胞的分裂、分化和代谢、信号转导、发育和形态建成等重要生命活动^[3-6]。在植物中, PP2A 主要调节细胞分裂并参与逆境信号传递^[7-8]。拟南芥 PP2A 结构亚基基因 *RCN1* 功能缺失突变体的根端分生组织细胞分裂发生异常, 对乙烯和渗透胁迫的敏感性增强, 在黑暗或低温条件下, PP2A 的活性增强^[9-11]。水稻蛋白磷酸酶基因 *OsPP2A-1* 和 *OsPP2A-3* 受发育和逆境胁迫的调控^[12]。在小麦抗逆反应中, PP2A 也起到一定的作用, 其结构亚基 *TaPP2Aa*、催化亚基 *TaPP2Ac-1* 和调节亚基 *TaBβ-1* 均参与对高渗、高盐、低温及 ABA 处理的应答反应, 过量表达这些基因的转基因拟南芥植株均表现对干旱的耐受性增强^[13-15]。利用分子标记选择目标性状将有效提高育种工作效率。功能标记 (functional marker, FM) 是根据基因序列设计的分子标记, 能够直接检测基因, 区分和预测等位基因及相对性状, 因此优于根据基因组 DNA 序列开发的 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 等传统标记^[16]。小麦种质资源中蕴藏着大量的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 等位变异, 广义 SNP 包括插入和缺失 (insert and delete, InDel), 利用这些 SNP 开发功能标记进行分子标记辅助选择将加速小麦分子育种进程^[17]。例如小麦光周期基因 *Ppd-D1* 的 6 类功能标记与小麦的抽穗期、株高和千粒重有关^[18], 基于小麦 *Dreb1* 的 SNP 开发的功能标记也为小麦标记辅助选择育种提供了依据^[19]。【本研究切入点】目前, 关于小麦蛋白磷酸酶

结构亚基基因 *TaPP2Aa* 功能标记的开发和遗传定位尚未见报道, *TaPP2Aa* 与小麦抗逆性状 QTL 的遗传连锁关系尚未明确。【拟解决的关键问题】本研究以中国春缺四体和 2 个遗传群体为材料, 分析小麦抗旱相关基因 *TaPP2Aa* 的序列多态性, 开发功能标记并进行遗传定位, 对比分析该基因与小麦抗逆性状 QTL 的遗传连锁关系, 为标记辅助选择育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于检测 *TaPP2Aa* DNA 序列多态性的材料包括 5 份六倍体普通小麦 (*T. aestivum* L., AABBDD, 2n=6x=42): 旱选 10 号、鲁麦 14、Opata 85、W7984 和中国春, 小麦的二倍体野生近缘种, 即小麦基因组的供体种乌拉尔图小麦 UR208 (*T. urartu*, AA, 2n=2x=14)、拟斯卑尔脱山羊草 Y2041 (*Ae. speltoides*, SS, 2n=2x=14) 和粗山羊草 Ae38 (*Ae. tauschii*, DD, 2n=2x=14) 以及四倍体小麦 PO9 (*T. polonicum*, AABB, 2n=4x=28)。

以中国春为背景的缺四体材料用于目标基因的染色体定位。进行目标基因标记的 2 个遗传作图群体为具有 149 个株系的加倍单倍体 (doubled haploid, DH) 群体 (旱选 10 号 × 鲁麦 14)^[20] 以及具有 111 个 F₉ 株系的重组近交系群体 (recombinant inbred lines, RIL), 该群体的母本是墨西哥栽培品种 Opata 85, 父本是人工合成的六倍体小麦 W7984。

以上材料的种子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利用重点实验室提供。所用材料的水培幼苗长至一心一叶时, 剪取叶片, -70℃ 保存备用。

1.2 DNA 提取

用酚-氯仿法提取叶片基因组 DNA^[21]。

1.3 引物设计和基因全长扩增

根据小麦基因资源课题组克隆的 *TaPP2Aa* 全长序列^[14] 设计能够在小麦基因组 DNA 中稳定特异扩增该基因的引物 Pa (PaF: 5'-TGATGGCTATGGTTCGA TGAG-3', PaR: 5'-TTAGCTAGACATCATGATCTG GTC-3')。PCR 体系总体积为 15 μL, 其中 3 μL 5 ×

PCR buffer, dNTP和引物的终浓度分别为 0.4 和 0.26 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, *TransStart Fast Pfu* DNA Polymerase 0.75 U, 模板DNA 50 ng。PCR反应条件为 95°C 3 min; 95°C 1 min, 58°C 45 s, 72°C 5.5 min, 35 个循环; 15°C 保存。PCR仪为Biometra T1 thermocycler。在 1.0%的琼脂糖凝胶中检测PCR产物, 按照Biomiga EZgene™ Gel Extraction Kit (拜尔迪, 北京) 操作说明回收目标片段。

1.4 DNA 测序

用 *pEASY-Blunt Simple Cloning Kit* (全式金, 北

京) 连接纯化 PCR 产物, 热击转化 *Trans1-T1 Phage Resistant E. coli* 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 利用质粒小提试剂盒 (天根, 北京) 提取并纯化含有目标片段的质粒。用通用引物 M13F、M13R 及 DNASTar 软件设计的 7 条基因序列叠套引物 (表 1) 进行双向测序, 每个基因型材料至少测通 12 个单克隆序列, 以保证测序结果的可靠性。使用 3730XI DNA Analyzer 测序仪, 测序反应体系按照 ABI 公司的 BigDye Terminator Kit v3.1 操作说明配制。测序 PCR 条件为 96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 3 min, 30 个循环, 4°C 保存。

表 1 *TaPP2Aa* 序列叠套测序引物

Table 1 Sequencing primers for *TaPP2Aa*

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	位置 Loci (bp)	引物 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	位置 Loci (bp)
A1	CTCGAGTATCATCTGTGGTC	761—781	A5	CAGACTTGATGAAGGGGATAGC	3482—3503
A2	GTCAGTGATTGTGCTTACTAGC	1185—1206	A6	CAATGTACTGCTATACGCTGG	4107—4627
A3	GTTTCATGTTACCCAGAAGCTG	1871—1891	A7	GTGCATGTTTAAAGTATGCCTAG	4640—4662
A4	TGTCTGGGGAAGGTGCGA	2493—2511			

1.5 单核苷酸多态性检测

利用 DNASTar 软件系统的 Editseq、Sequman 和 MegAlign 软件包进行 DNA 序列的拼接、整理与 SNP 分析。

1.6 基因组特异引物设计和基因组特异 PCR

通过对六倍体小麦与二倍体、四倍体材料目标基因序列的比对分析, 确定小麦 A、B 和 D 基因组的的目标基因序列。根据 3 个基因组序列差异设计 3 对引物 PaA、PaB 和 PaD (表 2), 其中, PaB 和 PaD 为基因组特异引物, PaA 扩增区段的 A 基因组序列中存在与 B、D 基因组序列的限制性内切酶 *Hap I* 位点差异, 其 PCR 产物 (1 277 bp) 被酶切为 1 013 bp 和 264 bp,

而 B (1 266 bp) 和 D (1 251 bp) 基因组的 PCR 产物保持全长。因此, 首先采用基因组通用引物 PaA 进行扩增, 然后利用 PCR-RFLP 方法区分不同基因组序列。利用中国春缺四体和不同倍性材料进行目标基因的染色体定位。

PCR 反应体系和条件同 1.3 (除 72°C 1.5 min 外), PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶中检测。

1.7 等位基因特异引物设计和等位基因特异 PCR

在检测的 5 份六倍体小麦 A、B 和 D 3 个基因组的 *TaPP2Aa* 序列中, 在材料之间未检测到 A 基因组的 SNP 位点, 但 B 和 D 基因组之间均存在 SNP 位点。根据 B 和 D 基因组内检测到的 *TaPP2Aa* 的 SNP 位点,

表 2 *TaPP2Aa* 基因组特异引物序列

Table 2 Genome-specific primers used for chromosome assignment of *TaPP2Aa*

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	染色体 Chromosome	PCR 产物长度 PCR product size (bp)	退火温度 T _m (°C)
PaAF	GATTGTGCTTACTAGCGTAGTCAG	5A 5B 5D	1277 1266 1251	58
PaAR	CGAACATGCTGAGACGAATC			
PaBF	GTTGCATGATATTCTACTGGC	5B	1180	56
PaBR	GCGTGTAATCAATGTCTCAAGTT			
PaDF	TTGTGAAGTGTGGCAAGTTG	5D	785	59
PaDR	GATTTGTAGCAACTAGCAATAGAAG			

按照Jeong等^[22]的方法设计等位基因特异PCR引物(表3)检测SNP。

利用特异引物进行等位基因特异PCR (allele-specific PCR, AS-PCR)。AS-PCR反应体系为 10 μ L,

其中 10 \times PCR buffer 1 μ L, MgCl₂、dNTP和引物的终浓度分别为 0.56、0.45 和 1 μ mol·L⁻¹, Fermentas *Taq* DNA Polymerase 0.75 U, 模板DNA 50 ng, PCR反应条件同上。在 1.5%琼脂糖凝胶中检测PCR产物。

表 3 *TaPP2Aa* 等位基因特异引物序列

Table 3 Allele-specific primers of *TaPP2Aa*

引物 Primer	引物序列 ¹⁾ Sequence (5'→3')	3'特异检测目标 3' specific detection			PCR 产物长度 Expected size (bp)	退火温度 Tm (°C)
		基因组 Genome	位置 Locus (bp)	碱基 Base		
P1F	CGTAGTCAGTGATTGTTACATGTATA	B	1230—1231	TA	1211	59
P1R	GAAATTGGCAAGAGTTAGTCTATT	B	2393	A		
P2F	GTAGTCAGTGATTGTTACATGTAGC	B	1230—1231	—	1207	57
P2R	AAATTGGCAAGAGTTAGTCTATG	B	2393	C		
P3F	TGCAATCATTGAGTACATCCCT	B	3685	T	1699	60
P3R	CTAGACATCATGATCTGGTCACAT	B	5339	A		
P4F	TGCAATCATTGAGTACATCCCG	B	3685	G	1698	60
P4R	CTAGACATCATGATCTGGTCACAC	B	5339	G		
P5F	GTATTCTGCTGCTGTTATTGTCC	B	2393	C	1335	60
P5R	CCTAACTGACTAGCCAGCAGC	B	3685	G		
P6F	GGTTAGGTTCTTGTTGATTTGTTAC	D	1430	G	949	60
P6R	TTCAGTAACTGCCCGGA	D	2369	T		
c4-1-f	GTTGTTTTTCAGTGCCAGATAC	*			298	60
c4-1-r	CTACAAACATCAACACATAAGCATT	*				

¹⁾ 表中粗斜体字母为 3'端特异碱基; *: 阳性对照引物, c4-1-f与c4-1-r为 1 对公用引物, 对所有材料均有扩增, 与P6 同时使用, 检测*TaPP2Aa-D*的 SNP; —: 缺失

¹⁾ The bold italic letters are 3' specific bases; * Primer c4-1-f and c4-1-r are a pair of positive control, amplify in all plant materials, used with P6 simultaneously to confirm SNPs in *TaPP2Aa-D*; —: Deletion

1.8 等位基因标记作图

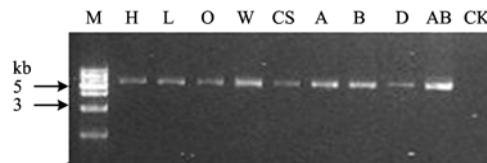
采用在遗传群体双亲之间表现多态性的等位基因特异引物,通过AS-PCR分别检测 2 个遗传群体的基因型, 根据DH群体^[23]和RIL群体 (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/linemaps/Wheat/SxO_5.html) 的分子标记遗传图谱, 利用MapMaker 3.0 遗传作图软件定位目标基因。

2 结果

2.1 *TaPP2Aa* 不同基因组序列 SNP 分析

利用 *TaPP2Aa* 全长引物 Pa 在 9 份不同倍性的材料中扩增到基因的全长 DNA 序列(图 1)。比对六倍体小麦、二倍体野生近缘种及四倍体小麦基因的测序结果(图 2), 在六倍体小麦中分离到 3 种序列分别与小麦 A、B、D 3 个基因组供体种的二倍体野生近缘

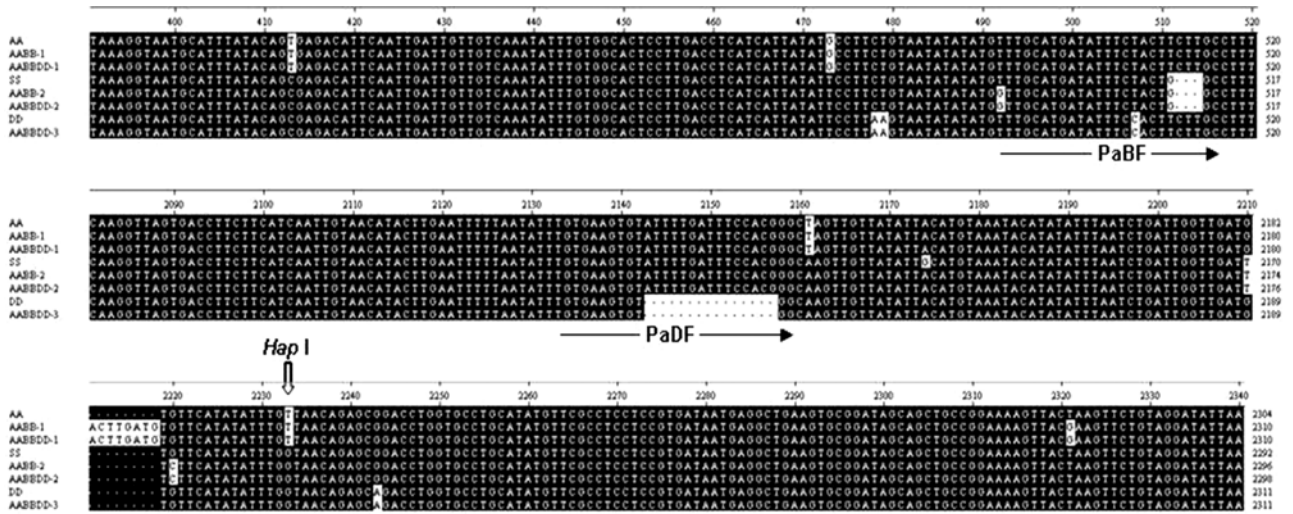
种序列匹配, 因此推测这 3 种序列分别来自于六倍体小麦的 A、B 和 D 基因组, 依次命名为 *TaPP2Aa-A*、*TaPP2Aa-B* 和 *TaPP2Aa-D*, 在 GenBank 中的序列号



M: 1 kb DNA marker; H: 旱选 10 号; L: 鲁麦 14; O: Opata 85; W: W7984; CS: 中国春; A: 乌拉尔图小麦 UR208; B: 拟斯卑尔脱山羊草 Y2041; D: 粗山羊草 Ae38; AB: 四倍体小麦 PO9; CK: 阴性对照。下同
M: 1 kb DNA marker; H: Hanxuan 10; L: Lumai 14; O: Opata 85; W: W7984; CS: Chinese Spring; A: *Triticum urartu* UR208; B: *Aegilops speltoides* Y2041; D: *Aegilops tauschii* Ae38; AB: *Triticum polonicum* PO9; CK: Negative control. The same as below

图 1 不同材料中扩增的 *TaPP2Aa* 产物

Fig. 1 PCR products of *TaPP2Aa* in different plant materials



AA、SS、DD 分别为二倍体野生近缘种 UR208、Y2041 和 Ae38 的 *PP2Aa* 序列；AABB-1 和 AABB-2 为四倍体小麦 PO9 的 2 种序列；AABBDD-1、AABBDD-2 和 AABBDD-3 分别为六倍体普通小麦的 3 种序列 *TaPP2Aa-A*、*TaPP2Aa-B* 和 *TaPP2Aa-D*。PaBF 和 PaDF 分别为 B 和 D 基因组特异引物的位点，*Hap I* 为 A 基因组区别于 B 和 D 的酶切位点。由于基因较长，图中仅给出带目标序列的片段
AA, SS and DD are the *PP2Aa* sequences from the diploid accessions: UR208, Y2041 and Ae38; AABB-1 and AABB-2 are two sequences from the tetraploid PO9; AABBDD-1, AABBDD-2 and AABBDD-3 are three sequences from common wheat, assigned as *TaPP2Aa-A*, *TaPP2Aa-B* and *TaPP2Aa-D*. PaBF and PaDF indicate the sequences for specific primers of B and D genomes. *Hap I* shows the specific loci for A genome. Sequence segments with target loci listed

图 2 不同倍性材料 *TaPP2Aa* 的序列比对

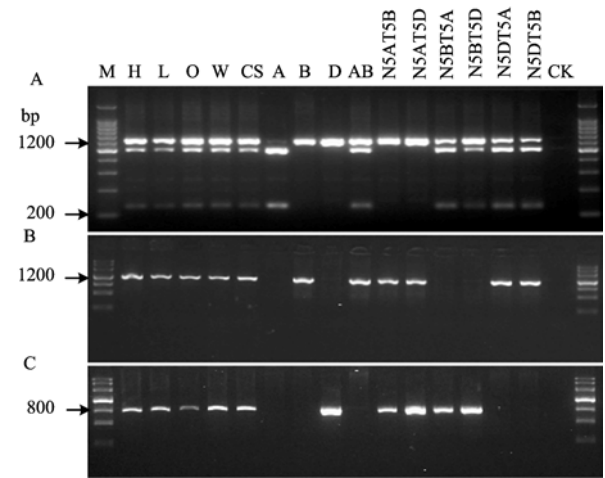
Fig. 2 Sequence alignment of *TaPP2Aa* in hexaploid wheat and its wild relative species

分别为 HQ897162、HQ897163 和 HQ897164。基因组序列之间的差异为设计基因组特异引物提供了依据。

六倍体小麦 *TaPP2Aa-A*、*TaPP2Aa-B* 和 *TaPP2Aa-D* 的序列全长分别为 5 846 bp、5 366 bp 和 5 563 bp。3 个基因组的基因序列结构相似，均包含 12 个外显子和 11 个内含子，其中第 6 和第 8 内含子序列差异较大。比对 5 份六倍体小麦 3 个基因组的基因序列，*TaPP2Aa-A* 序列完全相同；*TaPP2Aa-B* 序列中有 5 个 SNP 位点，其中 2 个位于外显子区，3 个位于内含子区，依次为 1 230—1 231 bp 的 TA/~（~表示缺失）（第 2 个内含子）、2 393 bp 的 A/C（第 5 个内含子）、3 685 bp 的 T/G（第 8 个外显子）、4 037—4 038 bp 的 TT/G~（第 8 个内含子）和 5 339 bp 的 A/G（第 12 个外显子）；*TaPP2Aa-D* 序列中有 2 个 SNP 位点，均位于内含子区，依次为 1 430 bp 的 T/G（第 2 个内含子）和 2 369 bp 的 G/T（第 5 个内含子）。

2.2 基因组特异引物开发与 *TaPP2Aa* 染色体定位

根据 *TaPP2Aa* 在不同基因组中序列差异设计的 B 和 D 基因组特异引物（表 2），对基因进行染色体定位（图 3）。其中，A 基因组序列中有限制性内切酶 *Hap I* 酶切位点，首先用基因组公用引物进行扩增，然后用 *Hap I* 对 PCR 产物进行酶切，将 *TaPP2Aa-A*



A: 用 PCR-RFLP 引物 PaA-*Hap I* 将 *TaPP2Aa-A* 定位在 5A 上；B: 用特异引物 PaB 将 *TaPP2Aa-B* 定位在 5B 上；C: 用特异引物 PaD 将 *TaPP2Aa-D* 定位在 5D 上。N5AT5B、N5AT5D、N5BT5A、N5BT5D、N5DT5A 和 N5DT5B 分别为相应的中国春缺四体系；CK: 阴性对照
A: *TaPP2Aa-A* located on chromosome 5A with PCR-RFLP primer PaA-*Hap I* ; B: *TaPP2Aa-B* located on 5B with PCR specific-primer PaB; C: *TaPP2Aa-D* located on 5D with PCR specific-primer PaD; N5AT5B, N5AT5D, N5BT5A, N5BT5D, N5DT5A and N5DT5B: Nulli-tetrasomic lines of Chinese Spring; CK: Negative control

图 3 *TaPP2Aa* 的染色体定位

Fig. 3 Chromosome locations of *TaPP2Aa*

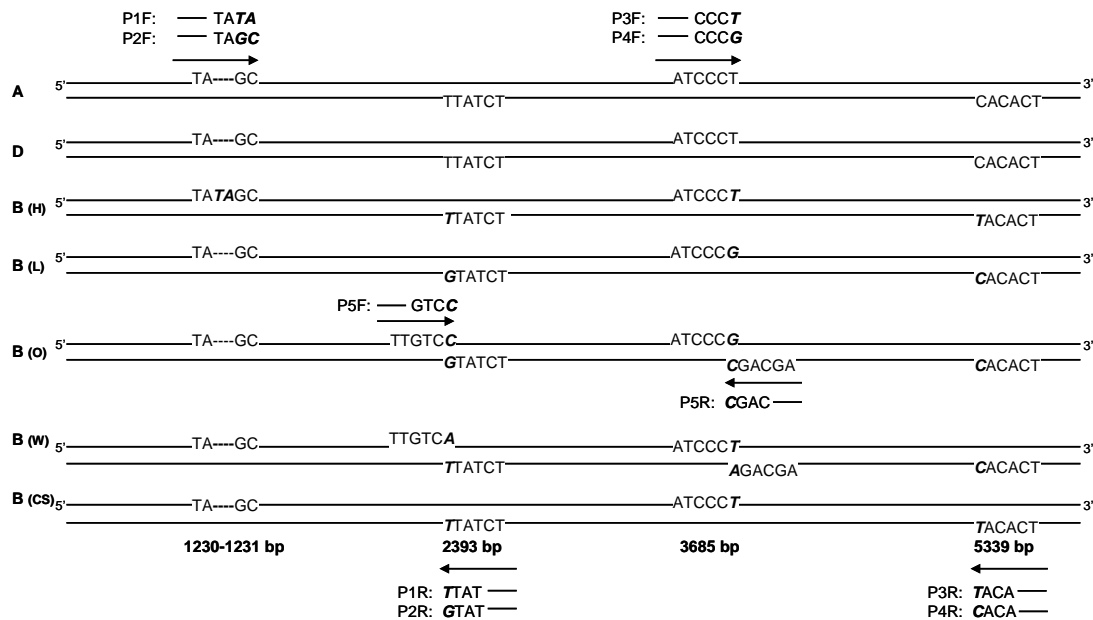
定位在 5A 染色体上; 利用 *TaPP2Aa-B* 和 *TaPP2Aa-D* 2 种序列的特异引物将其分别定位在 5B 和 5D 染色体上。

2.3 等位基因特异引物开发以及不同基因型材料的 AS-PCR 检测

在 5 份六倍体小麦中, *TaPP2Aa-A* 的序列分别完全相同; *TaPP2Aa-B* 在 DH 群体的双亲早选 10 号和鲁麦 14, 以及 RIL 群体的双亲 Opata 85 和 W7984 之间分别存在差异。以早选 10 号 *TaPP2Aa-B* 序列在 1 230—1 231 bp、2 393 bp、3 685 bp、5 339 bp 的碱基 (TAATA) 为对照, 鲁麦 14 的 SNP 位点为 (~CGG)、Opata 85 为 (~CGG)、W7984 (~ATG)、中国春为 (~ATA), 同时参考 *TaPP2Aa-A* (~ATG) 和 *TaPP2Aa-D* (~ATG) 在相应位点的碱基变化, 设计了 4 对能同时检测 DH 群体 *TaPP2Aa-B* 2 个相邻 SNP 的等位基因特异 PCR 引物 P1、P2、P3 和 P4 及 1 对能同时检测 RIL 群体 *TaPP2Aa-B* 2 个相邻 SNP 的等位基因特异 PCR 引物 P5 (图 4); *TaPP2Aa-D* 序列在

DH 群体双亲之间无差异, 而在 RIL 群体亲本之间存在差异。与 *TaPP2Aa-B* 等位基因特异引物设计相似, 根据 *TaPP2Aa-D* 序列 1 463 bp 和 2 369 bp 处 Opata 85 (CT) 和 W7984 (TG) 的碱基差异, 同时参考 *TaPP2Aa-A* (TG) 和 *TaPP2Aa-B* (TG) 在相应位点的碱基, 设计能同时检测 RIL 群体这 2 个 SNP 的等位基因特异 PCR 引物 P6, 并设计引物 c4-1 作为阳性对照。

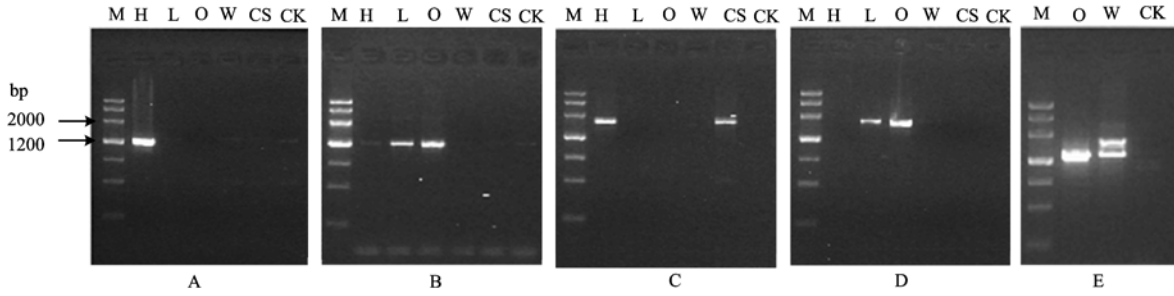
利用 AS-PCR 分别检测六倍体小麦 *TaPP2Aa-B* 和 *TaPP2Aa-D* 的基因型。用于检测 DH 群体 *TaPP2Aa-B* 基因型的引物 P1 和 P3 对亲本早选 10 号的 B 基因组特异扩增, 而引物 P2 和 P4 对鲁麦 14 的 B 基因组特异扩增 (图 5)。因此, 对于 DH 群体亲本早选 10 号和鲁麦 14, P1 和 P2、P3 和 P4 分别为互补的等位基因特异引物; 用于检测 RIL 群体 *TaPP2Aa-B* 基因型的引物 P5 在双亲之间的 PCR 产物存在差异, Opata 85 只有 1 335 bp 条带, 而 W7984 同时存在 1 335 bp 和 1 695 bp 2 个扩增条带 (图 5)。



B (H)、B (L)、B (O)、B (W) 和 B (CS) 分别列出了早选 10 号、鲁麦 14、Opata 85、W7984 和中国春在 1 230—1 231 bp、2 393 bp、3 685 bp 和 5 339 bp 处的 SNP 位点 (粗斜体字母); A 和 D 分别表示 *TaPP2Aa-A* 和 *TaPP2Aa-D* 在相应位点的序列。P1、P2、P3、P4 和 P5 表示根据这些位点设计的引物
B(H), B(L), B(O), B(W) and B(CS) list SNPs of Hanxuan 10, Lumai 14, Opata 85, W7984 and Chinese Spring at 1 230-1 231 bp, 2 393 bp, 3 685 bp and 5 339 bp (bold and italic letters). A and D list the sequences of *TaPP2Aa-A* and *TaPP2Aa-D* at these sites. P1, P2, P3, P4 and P5 are primers designed based on the SNPs

图 4 开发等位基因特异引物的策略

Fig. 4 Strategy for designing the allele-specific primers to genotype the SNPs



A、B、C、D、E 依此为引物 P1、P2、P3、P4 和 P5 的扩增产物 A、B、C、D 和 E are the PCR products of P1, P2, P3, P4 and P5 in order

图 5 不同基因型材料 *TaPP2Aa-B* 的 AS-PCR 检测

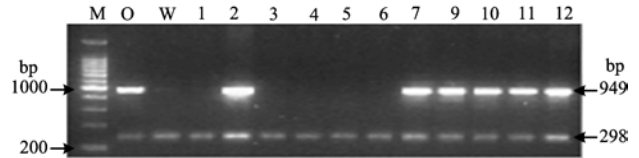
Fig. 5 Genotype detection of *TaPP2Aa-B* using AS-PCR

用于检测 RIL 群体 *TaPP2Aa-D* 基因型的引物 P6 仅对 Opatata 85 的 D 基因组特异扩增，对 W7984 无扩增，阳性对照 c4-1 在双亲中均有扩增，产物长度为 298 bp，故引物 P6 和 c4-1 同时使用能够一次性准确检测 Opatata 85 和 W7984 的基因型（图 6）。

2.4 利用 AS-PCR 对 *TaPP2Aa-B* 和 *TaPP2Aa-D* 进行遗传作图

利用 B 基因组等位基因特异引物 P5 检测 RIL 群体 111 个株系的基因型，58 个株系的基因型与 Opatata 85 相同，53 个株系的基因型与 W7984 相同。*TaPP2Aa-B* 最终被定位到小麦染色体 5B 的标记区间 *Xwg909*—*Xgwm67*，与 2 个侧翼标记的遗传距离分别为 4.0 cM

和 3.6 cM（图 7）。



M: 200 bp DNA marker; O: Opatata 85; W: W7984; 1—12: RIL 群体部分株系 Partial lines of RIL population

图 6 RIL 群体部分株系 *TaPP2Aa-D* 基因型的 AS-PCR 检测

Fig. 6 Genotypes of *TaPP2Aa-D* in partial lines of RIL population using AS-PCR

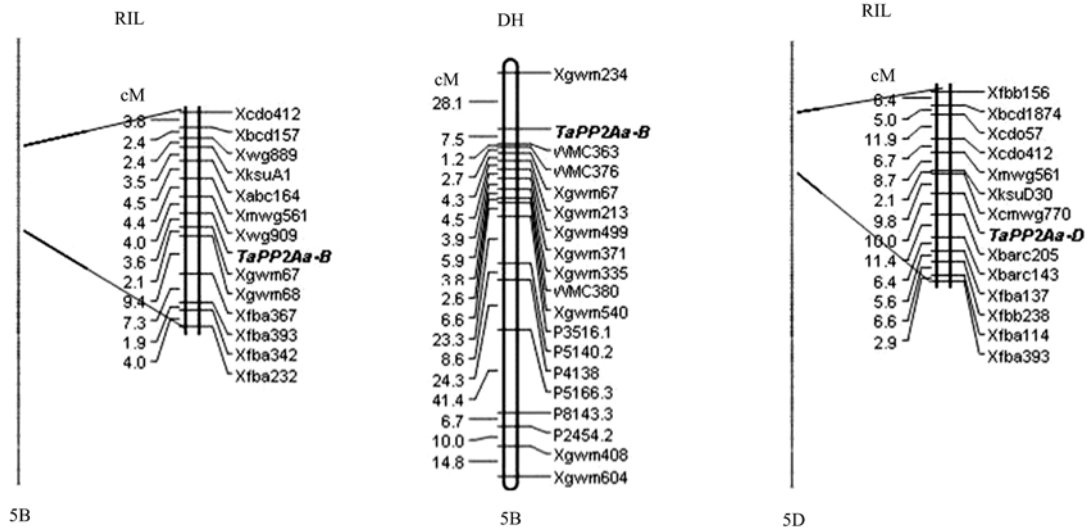


图 7 *TaPP2Aa* 在小麦第 5 同源染色体 5B 和 5D 上的位置

Fig. 7 Map of *TaPP2Aa* on chromosomes 5B and 5D

利用 B 基因组的互补等位基因特异引物对 P1 和 P2、P3 和 P4 分别检测 DH 群体 149 个株系的基因型, 2 对引物的检测结果一致。66 个株系的基因型与早选 10 号相同, 83 个株系的基因型与鲁麦 14 相同。*TaPP2Aa-B* 最终被定位到小麦染色体 5B 的标记区间 *Xgwm234—WMC363*, 与 2 个标记的遗传距离分别为 28.1 cM 和 7.5 cM (图 7)。与 RIL 群体中相同侧翼标记 *Xgwm67* 之间的遗传距离为 11.4 cM。

利用 D 基因组的等位基因特异引物 P6 和阳性对照 c4-1 同时检测 RIL 群体 111 个株系的基因型, 61 个株系的基因型与 *Oyata 85* 相同, 50 个株系的基因型与 *W7984* 相同。*TaPP2Aa-D* 最终被定位到染色体 5D 的标记区间 *Xcmwg770—Xbarc205*, 遗传距离分别为 9.8 cM 和 10.0 cM (图 7)。

3 讨论

3.1 小麦基因功能标记开发

小麦传统分子标记是基于随机 DNA 序列差异设计的, 因此, 它们绝大部分属于目标基因的侧翼标记而不是某个特定基因本身的标记。相比之下, 功能标记是根据基因的序列多态性开发的, 能将不同材料间基因本身的序列多态性与表型变异相结合^[17]。普通小麦为异源六倍体, 基因组庞大, 其 A、B、D 3 个基因组的等位基因可能具有不同的表达模式^[24]。因此, 分析小麦重要基因的序列组成, 并根据其多样性开发功能标记, 对于深入研究目标基因的功能具有重要作用。近年来, 小麦基因功能标记的开发受到人们的重视, 关于抗病性、春化习性、低分子量谷蛋白、株高、抗逆性、粒宽等重要性状基因 *Pm3b*^[25]、*VRN*^[26]、*Glu-B1*^[27]、*Rht*^[28]、*Drebl1*^[19]和*TaGW2*^[29]的功能标记被相继报道。人们努力开发在作物遗传中准确、便于检测的功能标记, Jeong 等^[22]在检测大豆抗病基因 *Rsv1* 和 *Rsv3* SNP 时, 首次证明可以利用 AS-PCR 在一个 PCR 反应中同时检测 2 个相邻的 SNP。He 等^[30]开发了小麦多酚氧化酶的功能标记, 利用 1 对互补引物 PPO16 和 PPO29 可以对不同小麦材料进行高 PPO 活性和低 PPO 活性分型。

本研究以 RIL 群体 (*Oyata 85* × *W7984*) 和 DH 群体 (早选 10 号 × 鲁麦 14) 为材料, 根据群体双亲之间 *TaPP2Aa-B* 和 *TaPP2Aa-D* 中的 SNP 位点, 设计了 6 对能同时检测 2 个相邻 SNP 的等位基因特异 PCR 引物, 其中 P1 和 P2、P3 和 P4 为 2 对功能互补的引物, P1 和 P3 对早选 10 号特异扩增而对鲁麦 14 无扩

增, 相反, P2 和 P4 对鲁麦 14 特异扩增而对早选 10 号无扩增, 利用 2 对引物同时检测基因的标记位点, 增加了标记的可靠性, 因此, 本试验选择互补引物 P1 和 P2、P3 和 P4 检测 DH 群体株系的基因型。引物 P5 在适当的 PCR 体系中能在 *Oyata 85* 和 *W7984* 中扩增出表现稳定的差异产物, 为一共显性标记, 因此选择 P5 检测 RIL 群体株系的基因型。引物 P6 仅对 RIL 群体亲本 *Oyata 85* 有扩增, 但在 PCR 过程中加入能够同时扩增 *Oyata 85* 和 *W7984* 目标序列的阳性对照 c4-1, 提高了对亲本 *W7984* 基因型株系的检测效率及准确性。开发的这些功能标记可用于今后育种材料和自然群体基因型的检测。

3.2 蛋白磷酸酶基因序列的多态性

蛋白磷酸酶的催化亚基在进化中相当保守, 是最保守的已知酶类之一^[3]。与其相比, 本试验所研究的结构亚基次之, 但在进化上也非常保守^[31]。虽然在六倍体小麦 A、B 和 D 基因组的 DNA 序列上检测到几处 SNP, 但其所编码的蛋白并无差异。其中, B 基因组 *TaPP2Aa-B* 的 5 个 SNP 位点中, 3 个变异位于内含子区域, 2 个位于编码区域, 也均为同义突变。D 基因组的 2 个 SNP 位点均位于内含子区域。生物体内起重要作用的蛋白及其基因在进化上是保守的, 这些基因内部的多态性可能影响其在不同材料中剪切、翻译以及信号传导的强弱, 从而影响表型, 使得不同材料之间表现出一定的差异。高等植物内含子序列和可变剪接在基因表达调控中也具有重要作用。大麦 *Cly1* 第 10 个外显子中 1 处单核苷酸变化 (A/G) 引起的同义突变导致剪切发生变化, 最终导致大麦闭花授粉特性发生改变^[32]。蛋白磷酸酶的调节亚基 B 与结构亚基 A 的 N 端重复序列结合, 催化亚基 C 与结构亚基 A 的 C 端重复序列结合, *TaPP2Aa-B* 在 5 339 bp 处的 A/G 导致的同义突变位于其编码蛋白质的 C 端, 可能影响结构亚基与催化亚基的结合, 进而影响与其相关的表型性状, 有待于进一步的研究证明。

3.3 *TaPP2Aa* 邻近区间的抗逆相关 QTL

利用 DH 群体和 RIL 群体将 *TaPP2Aa-B* 分别定位在染色体 5B 的标记区间 *Xgwm234—WMC363* 和 *Xwg909—Xgwm67*, 将 *TaPP2Aa-D* 定位在染色体 5D 的标记区间 *Xcmwg770—Xbarc205*。前人利用相同的遗传群体, 已经在这些标记区间及其邻近区间检测到一些抗逆性状的 QTL。本课题组利用 DH 群体, 在 5B 的标记区间 *Xgwm234—WMC363—WMC376* 检测到 2 个 QTL, 分别控制穗长和株高; 其邻近标记区间 *Xgwm499—*

Xgwm371 为株高、株高早胁迫系数和株高抗旱指数 3 个性状共享的 QTL 区间^[33]; *Xgwm371*—*Xgwm335* 区间控制茎秆可溶性碳水化合物积累效率^[23]; *Xgwm499*—*WMC380* 区间分布了控制叶绿素含量的 2 个主效 QTL^[34-35]。An 等^[36]和 Su 等^[37]利用该 DH 群体, 在 5B 的标记区间 *WMC363*—*WMC376* 检测到控制氮和磷营养高效吸收的 QTL。Landjeva 等^[38]检测到 RIL 群体染色体 5B 的标记 *Xwg889* 与 PEG 胁迫处理的小麦根长高度相关; Breseghello 等^[39]在 5B 上检测到与小麦粒长高度相关的位点。利用同一群体, 将 *TaPP2Aa-D* 定位在染色体 5D 的标记区间 *Xcmwg770*—*Xbarc205*, Yang 等^[34]在该区间附近检测到与叶绿素含量相关的 QTL 位点。

作物的抗逆性是由多基因控制的复杂数量性状, 发掘重要抗逆基因并开发功能标记, 是进行作物抗逆性状分子标记选择的有效途径。*TaPP2Aa* 作为调节基因, 在逆境信号传导的上游起作用, 该基因内部的多样性可能导致传导信号的强弱与种类的多样性, 进而影响下游逆境相关基因的表达, *TaPP2Aa* 的功能标记可用于小麦抗逆性状的分子标记辅助选择育种。

4 结论

小麦 *TaPP2Aa* 定位在第 5 同源群染色体 5A、5B 和 5D。在 RIL 群体连锁图中, *TaPP2Aa-B* 位于 5B 染色体标记区间 *Xwg909*—*Xgwm67*, 与 2 个标记的距离分别为 4.0 cM 和 3.6 cM; 在 DH 群体连锁图中, *TaPP2Aa-B* 位于 5B 染色体标记区间 *Xgwm234*—*WMC363*, 与 *WMC363* 的距离为 7.5 cM。*TaPP2Aa-B* 在 2 个群体中与同一标记 *Xgwm67* 的遗传距离分别为 3.6 cM 和 11.4 cM。*TaPP2Aa-D* 位于染色体 5D 标记区间 *Xcmwg770* 和 *Xbarc205*, 遗传距离分别为 9.8 cM 和 10.0 cM。

References

- [1] Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: A current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(4): 436-442.
- [2] País S M, Téllez-Inón M T, Capiati D A. Serine/threonine protein phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 2009, 4(11): 1013-1015.
- [3] Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal*, 2001, 353(3): 417-439.
- [4] Grinthal A, Adamovic I, Weiner B, Karplus M, Kleckner N. PR65, the HEAT-repeats scaffold of phosphatase PP2A, is an elastic connector that links force and catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(6): 2467-2472.
- [5] Turowski P, Favre B, Campbell K S, Lamb N J C, Hemmings B A. Modulation of the enzymatic properties of protein phosphatase 2A catalytic subunit by the recombinant 65 kDa regulatory subunit PR65 α . *European Journal of Biochemistry*, 1997, 248: 200-208.
- [6] Calin G A, Iasio M G, Caprini E, Vorechovsky I, Natali P G, Sozzi G, Croce C M, Barbanti-Brodano G, Russo G, Negrini M. Low frequency of alterations of the α (PPP2R1A) and β (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene*, 2000, 19: 1191-1195.
- [7] Smith R D, Walker J C. Plant protein phosphatases. *Annual Review of Plant Biology*, 1996, 47(1): 101-125.
- [8] Singh A, Giri J, Kapoor S, Tyagi A K, Pandey G K. Protein phosphatase complement in rice: Genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC Genomics*, 2010, 11(435): 1471-2164.
- [9] Blakeslee J J, Zhou H W, Heath J T, Skottke K R, Rodriguez-Barrios J A, Liu S Y, DeLong A. Specificity of RCN1-mediated protein phosphatase 2A regulation in meristem organization and stress response in roots. *Plant Physiology*, 2008, 46: 539-553.
- [10] Larsen P B, Cancel J D. Enhanced ethylene responsiveness in the *Arabidopsis eer1* mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A A regulatory subunit, RCN1. *The Plant Journal*, 2003, 34: 709-718.
- [11] Luo J H, Shen G X, Yan J Q, He C X, Zhang H. AtCHIP functions as an E3 ubiquitin ligase of protein phosphatase 2A subunits and alters plant response to abscisic acid treatment. *The Plant Journal*, 2006, 46: 649-657.
- [12] Yu R M, Zhou Y, Xu Z F, Chye M L, Kong R Y. Two genes encoding protein phosphatase 2A catalytic subunits are differentially expressed in rice. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(3): 295-311.
- [13] Xu C Y, Jing R L, Mao X G, Jia Y X, Chang X P. A wheat (*Triticum aestivum*) protein phosphatase 2A catalytic subunit gene provides enhanced drought tolerance in tobacco. *Annals of Botany*, 2007, 99(3): 439-450.
- [14] 徐重益. 小麦抗旱相关基因 *TaPP2Ac/a* 的分离、定位与功能验证 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- Xu C Y. Isolation, location and functional analysis of

- drought-response gene *TaPP2Ac/a* from wheat (*Triticum aestivum* L.)[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007. (in Chinese)
- [15] 刘诗航, 王彩香, 毛新国, 刘惠民, 李 昂, 景蕊莲. 小麦蛋白磷酸酶 2A 调节亚基因 *TaBβ-1* 的克隆及其在非生物胁迫下的表达特性. 中国农业科学, 2010, 43(11): 2197-2208.
- Liu S H, Wang C X, Mao X G, Liu H M, Li A, Jing R L. Cloning of protein phosphatase 2A regulatory subunit gene *TaBβ-1* and its expression patterns under abiotic stresses in wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(11): 2197-2208. (in Chinese)
- [16] Andersen J R, Lübberstedt T. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*, 2003, 8: 554-560.
- [17] Bagge M, Xia X, Lübberstedt T. Functional markers in wheat. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10: 211-216.
- [18] 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*, 2010, 185(3): 841-851.
- [19] Wei B, Jing R L, Wang C S, Chen J B, Mao X G, Chang X P, Jia J Z. *DreB1* genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): Development of functional markers and gene mapping based on SNPs. *Molecular Breeding*, 2009, 23: 13-22.
- [20] 景蕊莲, 昌小平, 贾继增, 胡荣海. 用花药培养创建小麦加倍单倍体作图群体. 生物技术, 1999, 9(3): 4-8.
- Jing R L, Chang X P, Jia J Z, Hu R H. Establishing wheat doubled haploid population for genetic mapping by anther culture. *Biotechnology*, 1999, 9(3): 4-8. (in Chinese)
- [21] Sharp P J, Chao S, Desai S, Gale M D. The isolation, characterization and application in the triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homoeologous chromosome arm. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 78: 342-348.
- [22] Jeong S C, Maroof M A. Detection and genotyping of SNPs tightly linked to two disease resistance loci, *Rsv1* and *Rsv3*, of soybean. *Plant Breeding*, 2004, 123: 305-310.
- [23] 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(1): 571-584.
- [24] Mochida K, Yamazaki Y, Ogihara Y. Discrimination of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Molecular Genetics and Genomics*, 2003, 270: 371-377.
- [25] Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *The Plant Journal*, 2004, 37(4): 528-538.
- [26] Fu D L, Szcs P, Yan L L, Helguera M, Skinner J S, Zitzewitz J V, Hayes P M, Dubcovsky J. Large deletions with in the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 2005, 273: 54-65.
- [27] Lei Z S, Gale K R, He Z H, Gianibelli C, Larroque O, Xia X C, Butow B J, Ma W. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the *Glu-B1* locus in hexaploid wheat. *Journal of Cereal Science*, 2006, 43(1): 94-101.
- [28] Zhang X K, Yang S J, Zhou Y, He Z H, Xia X C. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1b* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers. *Euphytica*, 2006, 152: 109-116.
- [29] Su Z Q, Hao C Y, Wang L F, Dong Y C, Zhang X Y. Identification and development of a functional marker of *TaGW2* associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122(1): 211-223.
- [30] He X Y, He Z H, Zhang L P, Sun D J, Morris C F, Fuerst E P, Xia X C. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115: 47-58.
- [31] Garbers C, DeLong A, Deruère J, Bernasconi P, Söll D. A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 1996, 15(9): 2115-2124.
- [32] Nair S K, Wang N, Turuspekov K, Pourkheirandish M, Sinsuwongwat S, Chen G, Sameri M, Tagiri A, Hondal I, Watanabe Y, Kanamori H, Wicker T, Stein N, Nagamura Y, Matsumoto T, Komatsuda T. Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided *HvAP2* mRNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(1): 490-495.
- [33] 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.
- [34] Yang D L, Jing R L, Chang X P, Li W. Quantitative trait loci mapping for chlorophyll fluorescence and associated traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(5): 646-654.
- [35] Li H W, Tong Y P, Li B, Jing R L, Lu C M, Li Z S. Genetic analysis

- of tolerance to photo-oxidative stress induced by high light in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37(6): 399-412.
- [36] An D G, Su J Y, Liu Q Y, Zhu Y G, Tong Y P, Li J M, Jing R L, Li B, Li Z S. Mapping QTLs for nitrogen uptake in relation to the early growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil*, 2006, 284(1): 73-84.
- [37] Su J Y, Zheng Q, Li H W, Li B, Tong Y P, Jing R L, Li Z S. Detection of QTLs for phosphorus use efficiency in relation to agronomic performance of wheat grown under phosphorus sufficient and limited conditions. *Plant Science*, 2009, 176: 824-836.
- [38] Landjeva S, Neumann K, Lohwasser U, Bürner A. Molecular mapping of genomic regions associated with wheat seedling growth under osmotic stress. *Biologia Plantarum*, 2008, 52(2): 259-266.
- [39] Breseghello F, Sorrells M E. QTL analysis of kernel size and shape in two hexaploid wheat mapping populations. *Field Crops Research*, 2007, 101(2): 172-179.

(责任编辑 李 莉)