

网络出版时间:2026-06-15

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.s.20260615.1423.002

小麦红色胚芽鞘调控基因的鉴定及 CAPS 标记开发

蒋文慧^{1,2}, 强琴琴^{2,3}, 刘百龙¹, 王威豪¹, 王中华²

(1. 广西壮族自治区农业科学院/广西水稻遗传育种重点实验室, 广西南宁 530000; 2. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100;

3. 榆林大学, 陕西榆林 719000)

摘要:小麦红色胚芽鞘具有抗氧化、光保护和增强苗期抗逆性的生理功能。为解析小麦红色胚芽鞘的分子调控机制、完善形态标记辅助育种理论与技术,本研究以普通小麦宁 7840(白色胚芽鞘,母本)与 Clark(红色胚芽鞘,父本)杂交构建的 127 个 F_{12} 代重组自交系(RIL)群体为材料,通过完备复合区间作图法(ICIM-ADD)结合高密度遗传图谱(含 593 个 SNP 和 402 个 SSR 标记)定位红色胚芽鞘调控 QTL;利用比较基因组学比对小麦与二穗短柄草、高粱、水稻的染色体共线性区域,筛选花青素调控相关候选基因;克隆候选基因并分析红色与白色胚芽鞘株系的序列差异,开发 CAPS 标记并验证基因—表型关联性;通过亚细胞定位和小麦愈伤组织瞬时表达检验基因特性及功能。结果表明,127 个 RIL 群体中红色与白色胚芽鞘株系的比例为 1:1;在 7A 染色体上检测到 1 个红色胚芽鞘主效 QTL($qRc-7A$),其位于 *Xsnp7205* 与 *Xsnp5258* 标记间(1.69 cM),解释 66.4%表型变异。该定位区间与二穗短柄草 1 号染色体、高粱 10 号染色体及水稻 6 号染色体对应区段存在共线性关系。在高粱和水稻的共线性区域中,存在 2 个花青素调控相关的 R2R3-MYB 转录因子编码基因,二者与小麦 7A 染色体上的 TraesCS7A02G165700 基因序列高度相似,推测其为调控小麦红色胚芽鞘花青素合成的关键候选基因,将该基因命名为 *TaCl1*。红色胚芽鞘株系中,*TaCl1a* 的 cDNA 长度为 774 bp,编码 258 个氨基酸,其蛋白含完整 R2R3 结构域及 motif 5 结构域;白色胚芽鞘株系中,*TaCl1b* 因 714 bp 碱基缺失发生移码突变,缺失 motif 5。*TaCl1a* 定位于细胞核,在小麦愈伤组织瞬时表达中能诱导积累花青素,而 *TaCl1b* 则无此功能。CAPS 标记检测显示,*TaCl1a* 与红色胚芽鞘性状显著关联,但 4 份红色胚芽鞘材料(如黑小麦 76)携带 *TaCl1b*。综上所述,*TaCl1* 是调控小麦红色胚芽鞘花青素合成的核心基因,*TaCl1b* 因碱基缺失丧失功能;基于该变异的 CAPS 标记可用于分子鉴定,但部分材料红色性状依赖其他基因调控,需进一步解析多基因互作机制。

关键词:小麦;红色胚芽鞘;花青素;QTL 定位;瞬时表达

中图分类号:S512.1;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2026)07-0851-11

Identification of Regulatory Gene Controlling Red Coleoptile in Wheat, and Development of Its CAPS Marker

JIANG Wenhui^{1,2}, JIANG Qinqin^{2,3}, LIU Bailong¹, WANG Weihao¹, WANG Zhonghua²

(1. Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Guangxi Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding, Nanning, Guangxi 530000,

China; 2. Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3. Yulin University, Yulin, Shaanxi 719000, China)

Abstract: The red coleoptile in wheat confers antioxidant, photoprotective, and seedling stress-tolerance enhancing physiological functions. To provide key support for clarifying the molecular regulatory mechanism of the red coleoptile in wheat and improving the theory and technical system of morphological marker-assisted breeding, this study used a population of 127 F_{12} recombinant inbred lines (RILs) derived from the cross between a common wheat Ning 7840(white coleoptile, female parent)

收稿日期:2025-11-30 修回日期:2026-02-03

基金项目:广西自然科学基金项目(2025GXNSFBA069446);国家自然科学基金项目(32560088);广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科 2025YP006;2026YP109);广西青年科技人才工程资助项目(GXYESS2025198);榆林大学博士科研启动基金项目(2024GK21)

第一作者 E-mail:jiangwenhui323@163.com(蒋文慧); 826672589@qq.com(强琴琴)

通讯作者 E-mail:zhonghuawang@nwafu.edu.cn(王中华)

and Clark(red coleoptile, male parent) as materials. Quantitative trait loci(QTLs) controlling the red coleoptile were mapped using the inclusive composite interval mapping-additive effect(ICIM-ADD) method combined with a high-density genetic map containing 593 SNP and 402 SSR markers. Comparative genomics was used to align the collinear chromosomal regions between wheat and *Brachypodium distachyon*, sorghum, and rice to screen candidate genes related to anthocyanin regulation. Candidate genes were cloned, and sequence differences between red and white coleoptile lines were analyzed. CAPS markers were developed to verify gene-phenotype associations. The gene characteristics and functions were examined through subcellular localization and transient expression in wheat calli. The results showed that the ratio of red to white coleoptile lines in the RIL population conformed to 1:1. A major QTL(*qRc-7A*) was detected on chromosome 7A, located between markers *Xsnp7205* and *Xsnp5258* (1.69 cM), explaining 66.4% of the phenotypic variation. Collinearity analysis revealed a collinear relationship between this mapped interval and the corresponding regions on chromosome 1 of *Brachypodium distachyon*, chromosome 10 of *Sorghum bicolor*, and chromosome 6 of *Oryza sativa*. Within the collinear regions of *Sorghum bicolor* and *Oryza sativa*, anthocyanin regulatory R2R3-MYB transcription factor-encoding genes, namely Sb10g06800 and Os06g10350(*OsCl*), were identified, which shared high sequence similarity with the TraesCS7A02G165700 gene on wheat chromosome 7A. It was thus preliminarily inferred that TraesCS7A02G165700 is a key candidate gene regulating anthocyanin biosynthesis in the red coleoptile of wheat, and this gene was designated as *TaCl*. *TaCl*a in red coleoptile lines(cDNA length 774 bp, encoding 258 amino acids) contains a complete R2R3 domain and motif 5 domain, while *TaCl*b in white coleoptile lines has a frameshift mutation due to a 714 bp deletion, resulting in the loss of motif 5. *TaCl*a is localized in the nucleus and can induce anthocyanin accumulation in transient expression experiments in wheat calli, whereas *TaCl*b lacks this function. CAPS marker detection showed that *TaCl*a was significantly associated with the red trait, but 4 red coleoptile materials carried *TaCl*b. In conclusion, *TaCl* is the core gene regulating anthocyanin synthesis in wheat red coleoptiles, and *TaCl*b loses its function due to base deletion. The CAPS marker based on this variation can be used for molecular identification of red coleoptile, but other regulatory genes may be involved in some red materials, requiring further analysis of multi-gene interaction mechanisms.

Keywords: Wheat; Red coleoptile; Anthocyanin; QTL mapping; Transient expression

花青素是一类广泛存在于植物花、果实、茎、叶等组织中的水溶性黄酮类色素。在小麦胚芽鞘、茎、叶、叶耳、颖壳、花药及果皮等多个器官中均可检测到花青素^[1-6]。花青素的调控区域常与小麦品质、抗病性等重要农艺性状存在遗传连锁关系^[7-9]。因此,解析其分子调控机制对推动小麦分子育种研究具有重要意义。

小麦红色胚芽鞘的形成源于其自身富含花青素,该性状在小麦苗期即可呈现,且被广泛应用于杂交小麦种子纯度鉴定与品种资源分类研究^[10-13]。目前,有关小麦红色胚芽鞘调控基因的研究大多集中于基因定位与初步功能探索阶段。Röder等^[14]和 Khlestkina等^[15]通过经典遗传定位,将小麦红色胚芽鞘调控基因定位于7号染色体同源群短臂(7A、7B、7D),分别命名为*Rc-A1*、

*Rc-B1*和*Rc-D1*。Khlestkina等^[16]将*Rc-D1*定位于7D染色体*Xgwm44*与*Xgwm111*标记之间,距离*Xgwm44*约0.8 cM。Wang等^[17]从具有红色胚芽鞘的普通小麦品种Gy115中克隆到一个MYB家族基因*TaMYB-D1*,该基因被确定为*Rc-D1*遗传位点的候选基因。Ye等^[18]从8个普通小麦品种和34个乌拉尔图小麦品种中克隆到位于7A染色体上的*TaMYB-A1*基因。Shin等^[19]在小麦4号染色体上克隆到转录因子R2R3-MYB的编码基因*TaPL1*,并证实其可调控胚芽鞘花青素合成。综上,小麦胚芽鞘颜色受多基因协同影响。小麦胚芽鞘颜色还受环境和发育阶段的影响,如弱光条件下颜色变淡或呈白色,易导致颜色统计的误判,因此开发其连锁分子标记具有重要价值。目前,针对小麦胚芽鞘花青素合成相关基因分子标记的

研究较少,对其挖掘与验证亟待深入开展。

鉴于此,本研究以普通小麦宁 7840(白色胚芽鞘,母本)与 Clark(红色胚芽鞘,父本)杂交构建的 127 个 F_{12} 代重组自交系(RIL)群体为材料,通过完备复合区间作图法(ICIM-ADD)结合高密度遗传图谱精细定位红色胚芽鞘调控 QTL;利用比较基因组学筛选调控胚芽鞘花青素合成相关候选基因,从红、白胚芽鞘株系中分别克隆候选基因并分析其序列差异,进而开发功能特异性分子标记;通过亚细胞定位和小麦愈伤组织瞬时表达检验基因特性及功能,旨在明确小麦红色胚芽鞘的分子调控机制,为小麦形态标记在育种中的应用提供理论依据与技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为普通小麦(*Triticum aestivum* L.)品种宁 7840(母本,白色胚芽鞘)与 Clark(父本,红色胚芽鞘)的杂交 F_2 代经单粒传代至 F_{12} 代获得的 127 个重组自交系(RIL)群体。宁 7840、Clark 和 RIL 群体均来自西北农林科技大学农学院。

1.2 表型调查

选取饱满且健康的 RIL 群体种子各 20 粒,经 3%次氯酸消毒处理 20 min 并用无菌水冲洗 3 次后,放于铺有浸湿滤纸的培养皿中,置于光照培养箱培养,温度为 25 °C,16 h 光照/8 h 黑暗。出芽后第 4 天,观察并统计每个 RIL 株系的胚芽鞘颜色(红色/白色)。

1.3 基因组 DNA 提取与遗传图谱构建

取每个 RIL 株系幼苗叶片 50 mg,经液氮冷冻、研磨后,采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[20]。利用小麦 9K Infinium™ iSelect SNP 芯片(Illumina)对 RIL 群体进行基因分型,结合 402 个 SSR 标记,使用 QTL IciMapping 4.0 的 MAP 模块构建遗传连锁图谱,设置 LOD=5.5 分群,nnTwoOpt 算法排序,SARF 标准整理,Kosambi 函数将重组率转换为遗传距离(cM)。

1.4 QTL 定位

采用 QTL IciMapping 4.0 的 BIP 模块,选择 ICIM-ADD 方法(步长为 1 cM, $P=0.05$),通过 1 000 次排列检验确定 LOD 临界值,检测调控胚芽鞘颜色的 QTL 位点,利用 MapDraw 软件绘制 QTL 定位图谱。

1.5 候选基因筛选

根据 IWGSC 提供的“Wheat Genome Zipper”数据库^[21],使用 QTL IciMapping 4.0 软件的 MAP 模块绘制图谱,构建小麦 7A 染色体 QTL 定位区间与二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)1 号染色体、高粱(*Sorghum bicolor*)10 号染色体、水稻(*Oryza sativa*)6 号染色体的共线性图谱。参考二穗短柄草、高粱、水稻的基因注释信息,筛选花青素调控相关基因。将筛选到的调控花青素合成相关基因序列作为检索序列,在 Ensembl Plants 数据库中通过 BLAST 在线工具比对,挖掘位于 7A 染色体且与检索序列相似度高的基因,初步确定为调控红色胚芽鞘花青素合成的候选基因。

1.6 基因克隆

在 RIL 群体中随机选两株红色胚芽鞘株系(NC1 和 NC2)和白色胚芽鞘株系(NC3 和 NC4),用 Omega R6827-01 试剂盒提取胚芽鞘 RNA,经 DNase I(Takara D2215)去除基因组 DNA 后,用 StarScript II 反转录试剂盒(GeneStar A214-02)合成 cDNA。根据候选基因(ID 为 TraesCS7A02G165700,将其命名为 *TaCl1*)序列设计引物 7A-F(5'-GTGGCCGTGGATTGCCT-TAA-3')和 7A-R(5'-AACATGTGACTGAACTG-AGCCGGAT-3')。以 NC1、NC2、NC3 和 NC4 的 cDNA 为模板,利用引物 7A-F/7A-R 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系:1 μ L 模板(20~200 ng $\cdot$ μ L⁻¹),10 μ L 2 $\times$ KOD buffer,4 μ L 2 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs,0.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 引物各 0.5 μ L,0.4 μ L KOD 酶(TOYOBIO,日本),加入 ddH₂O 至 20 μ L。反应程序:94 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 20 s,58 °C 退火 20 s,68 °C 延伸 1 min,35 个循环;68 °C 延伸 5 min。

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶、回收目的片段,并与克隆载体 pMD18-T Vector(Takara,6011)在 25 °C 条件下连接 30 min。连接体系:pMD18-T Vector 0.5 μ L,纯化的目的片段 4.0 μ L,Solution I 5.0 μ L,ddH₂O 0.5 μ L。将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,用含有 Amp 的 LB 固体培养基筛选,并利用载体通用引物 M13F/M13R 进行菌落 PCR 鉴定,扩增体系及程序与上述扩增目的片段相同。随机挑选 3 个阳性菌株进行测序。

1.7 序列比对及进化树构建

利用 DNAMAN 软件对测序获得的核酸序

列及其推导的氨基酸序列进行比对分析。利用 MEGA 6 软件构建系统进化树,采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 估算分支距离,模型选择 *p*-distance,校验参数 bootstrap 设定为 1 000,其他参数使用软件默认值。

1.8 CAPS 标记开发与基因型检测

根据测序得到的不同胚芽鞘颜色株系中 *TaCl1* 基因的序列差异 (714 bp 处碱基缺失),设计 CAPS 标记引物 CAPS-F (5'-GGCCGAGC-CGTGCTCGTC-3') 和 CAPS-R (5'-AACATGT-GACTGAACTGAGCCGGAT-3')。以群体中不同胚芽鞘颜色株系的 DNA 为模板,使用 TaKaRa *Taq* 酶进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系:10 × PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol · L⁻¹ each) 0.8 μ L, 上下游引物 (10 μ mol · L⁻¹) 各 0.4 μ L, 模板 DNA (50~100 ng · μ L⁻¹) 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U · μ L⁻¹) 0.1 μ L, ddH₂O 补足至 10 μ L。PCR 扩增程序:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 5 min。

PCR 扩增产物用 *Ban* II (NEB, R0119VVIAL) 酶切:取 6 μ L PCR 扩增产物,加入 0.3 μ L *Ban* II 限制性内切酶、1 μ L 10 × 酶切缓冲液,用无菌去离子水补足至 10 μ L,37 °C 水浴酶切 4 h。用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显色^[22],分析不同小麦品种中 *TaCl1* 的基因型。

1.9 亚细胞定位

利用天根(北京)无缝克隆引物设计工具(<https://yw.tiangen.com/>)设计可扩增 *TaCl1* 基因 CDS 序列的同源重组引物 TaC1-F/TaC1-R (TaC1-F:5'-CGCCATGGTCGACGTACTAGT-GATGGGGAGGAGGGCGT-3', TaC1-R:5'-CCCTTGCTCACCATCCTAGTACACCGGCCATGTGCAGG-3', 下划线部分为 *Spe*I 酶切位点)。以 1.6 部分中扩增于红色胚芽鞘株系且经测序鉴定为阳性的单克隆菌株为模板,利用引物 TaC1-F/TaC1-R 扩增 *TaCl1* 基因 CDS 序列 (不含终止密码子)。PCR 扩增所用酶及体系同 1.6;扩增程序中,除退火温度为 60 °C 外,其余同 1.6 部分。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,纯化回收目的片段。利用同源重组酶 (NovoRec, Novoprotein Scientific Inc.) 将其连接到 pA7-GFP 载体上的 *Spe*I 酶切位点,与 GFP 融合表达。将构建的重组载体 *TaCl1::GFP* 转化至大肠

杆菌 DH5 α 感受态,用含有 Amp 的 LB 固体培养基进行筛选,并利用引物 TaC1-F/TaC1-R 对阳性菌落进行 PCR 验证。PCR 扩增所用酶、体系及程序同上述 *TaCl1* 基因 CDS 序列的扩增。对 PCR 阳性单克隆进行测序。对测序验证为阳性的菌株进行扩繁,使用无内毒素质粒试剂盒 (DP117, 天根) 进行质粒的提取。取部分提取质粒置于 1.5 mL 离心管中,在 37 °C 的金属浴上浓缩至浓度约为 1 000 ng · μ L⁻¹。利用载有金粉和 1 000 ng · μ L⁻¹ 质粒的基因枪 (PDS-1000/He) 轰击洋葱表皮细胞^[23],22 °C 暗培养 24~36 h 后,采用激光共聚焦显微镜 (Olympus IX83-FV1200) 观察 GFP 荧光信号。

1.10 基因枪介导目标基因的瞬时表达

利用 DNAMAN 软件设计可扩增 *TaCl1* 基因 CDS 序列的引物 TaC1-PCX-F/TaC1a-PCX-R 和 TaC1-PCX-F/TaC1b-PCX-R (TaC1-PCX-F: 5'-ATGGGGAGGAGGGCGTGCT-3', TaC1a-PCX-R:5'-TTAACCGCCATGTGCAGG-3', TaC1b-PCX-R: 5'-TCACGTGTGAGAGGTTTAAACCGG-3')。以 1.6 部分中扩增于红色胚芽鞘株系且经测序验证为阳性的单克隆菌株 DNA 为模板,利用引物 TaC1-PCX-F/TaC1a-PCX-R 扩增其 *TaCl1* 基因的 CDS 序列。以 1.6 部分中扩增于白色胚芽鞘株系且经测序鉴定为阳性的单克隆菌株 DNA 为模板,利用引物 TaC1-PCX-F/TaC1b-PCX-R 扩增其 *TaCl1* 基因的 CDS 序列。PCR 扩增体系及程序同 1.9 部分。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,回收、纯化目的片段。通过 T-A 克隆技术,将目的片段连接到 *Xcm*I 酶切后的植物表达载体 pCX-SN (CaMV35S 启动子) 上。表达载体转化大肠杆菌、筛选阳性菌株、测序验证、大量提取质粒及浓缩质粒等步骤均与 1.9 部分中相同。将小麦品种中国春成熟胚诱导的愈伤组织^[24]经高渗培养基 (MS+0.4 mol · L⁻¹ 甘露醇) 预处理 4 h 后,利用载有金粉和 1 000 ng · μ L⁻¹ 质粒的基因枪轰击,25 °C 暗培养 10 h 后转移至普通 MS 愈伤培养基,光照培养 2 d 后,用体视显微镜 (Nikon SMZ1500) 观察花青素积累情况。

2 结果与分析

2.1 红色胚芽鞘 QTL 的精细定位

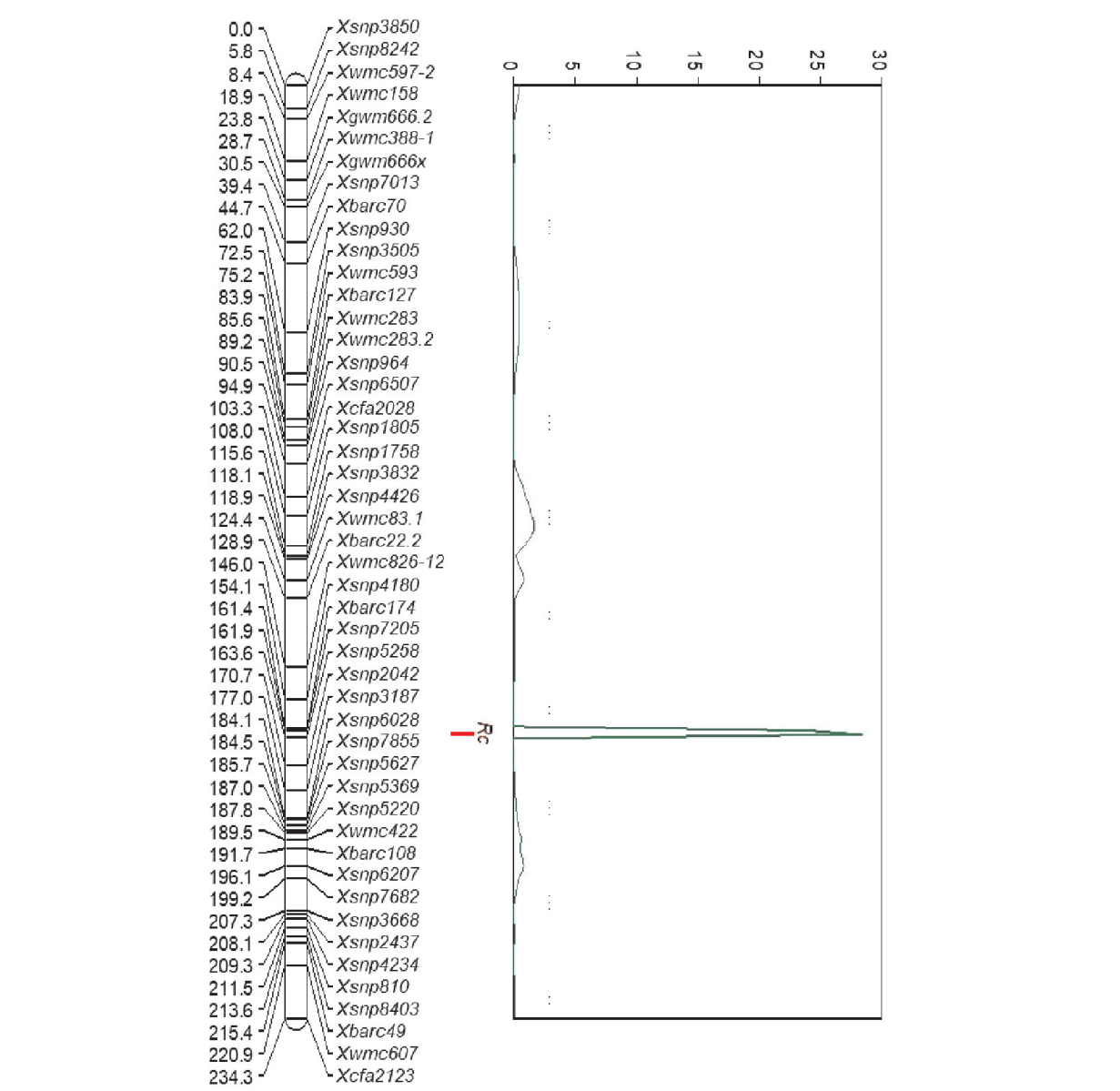
表型调查结果发现,127 个 RIL 株系中,59

个株系为红色胚芽鞘,67 个为白色胚芽鞘,表型分离符合 1:1($\chi^2=0.51$),这表明红色胚芽鞘性状受单基因控制。构建的遗传连锁图谱包含 995 个标记(593 个 SNP 标记和 402 个 SSR 标记),覆盖 46 个连锁群,总遗传距离 4 183.2 cM,标记间平均距离 4.2 cM,满足 QTL 定位需求。

QTL 检测结果显示,仅在 7A 染色体上检测到 1 个调控胚芽鞘颜色的主效 QTL,其位于标记 *Xsnp7205*(161.93 cM)与*Xsnp5258*(163.62 cM)之间,遗传距离 1.69 cM,LOD 值 28.41,解释 66.41% 的表型变异,将其命名为*qRc-7A*(图 1)。

2.2 候选基因的筛选与克隆

经共线性分析,小麦 7A 染色体分子标记*Xsnp7205*~*Xsnp5258* 区间与二穗短柄草 1 号染色体(Brad1lg46220~Brad1lg46740)、高粱 10 号染色体(Sb10g006210~Sb10g006850)、水稻 6 号染色体(Os06g09320~Os06g10650)存在共线性关系(图 2)。在高粱和水稻共线性区域中,鉴定到 2 个花青素调控相关转录因子 R2R3-MYB 的编码基因—Sb10g06800 和 Os06g10350(*OsCI* 基因)。在 Ensembl Plants 数据库中,通过 BLAST 在线工具比对发现,位于小麦 7A 染色体上的 TraesCS7A02G165700



Rc 代表*qRc-7A*。Rc represents *qRc-7A*。

图 1 RIL 群体红色胚芽鞘性状 QTL 定位遗传连锁图谱

Fig.1 Genetic linkage map of QTL mapping for red coleoptile trait in RIL population

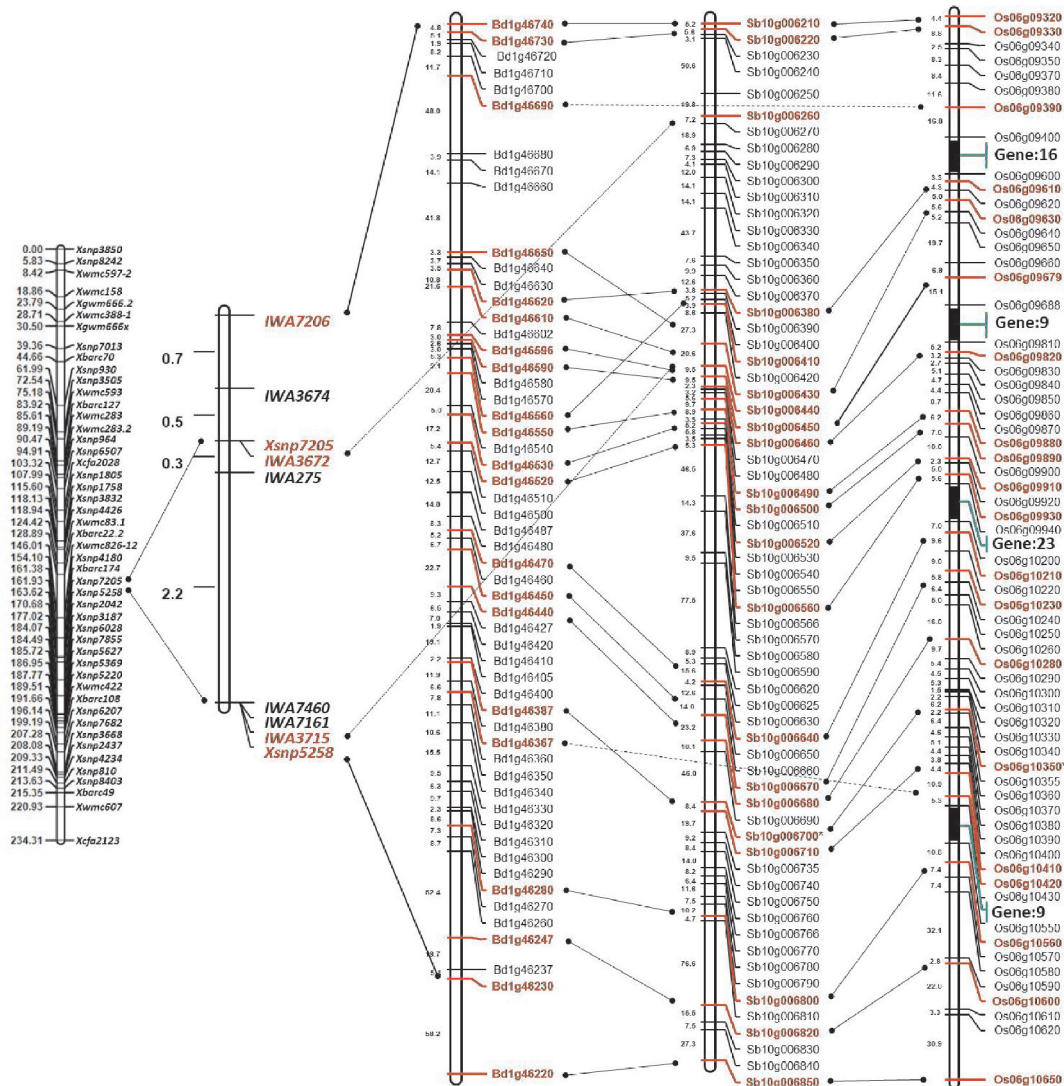
基因与 Sb10g06800 和 Os06g10350 基因高度相似,推测该基因为调控红色胚芽鞘花青素合成的关键基因,命名为*TaCl1*。

测序结果表明,红色胚芽鞘株系中*TaCl1* 基因全长为 867 bp,含 93 bp 内含子,CDS 全长为 774 bp,编码 257 个氨基酸;白色胚芽鞘株系中*TaCl1* 基因与红色株系相比存在两处差异:一是 483 bp 处 G 突变为 A,该突变未改变编码氨基酸;二是 714 bp 处存在 C 碱基缺失,这一缺失导致移码突变,最终使该基因编码 262 个氨基酸(图 3)。基于上述序列差异,将红色胚芽鞘株系和白色

胚芽鞘株系中*TaCl1* 基因分别命名为*TaCl1a* 和*TaCl1b*。

2.3 TaCl1 蛋白序列特征与进化分析

经蛋白序列比对,*TaCl1a* 包含完整的 R2、R3 结构域(R2R3-MYB 转录因子典型特征),且 C 端存在保守的 motif 5 结构域(DEXWLKxxH);而 *TaCl1b* 因移码突变,缺失 motif 5 结构域(图 4A)。为明确小麦*TaCl1* 基因的种内同源关系,及该基因与其他物种同源基因的亲缘演化关系,本研究从 NCBI 及 Ensembl Plants 数据库中获取小麦、小麦近缘物种及不同科属植物的 27 条 *TaCl1* 同源蛋白序

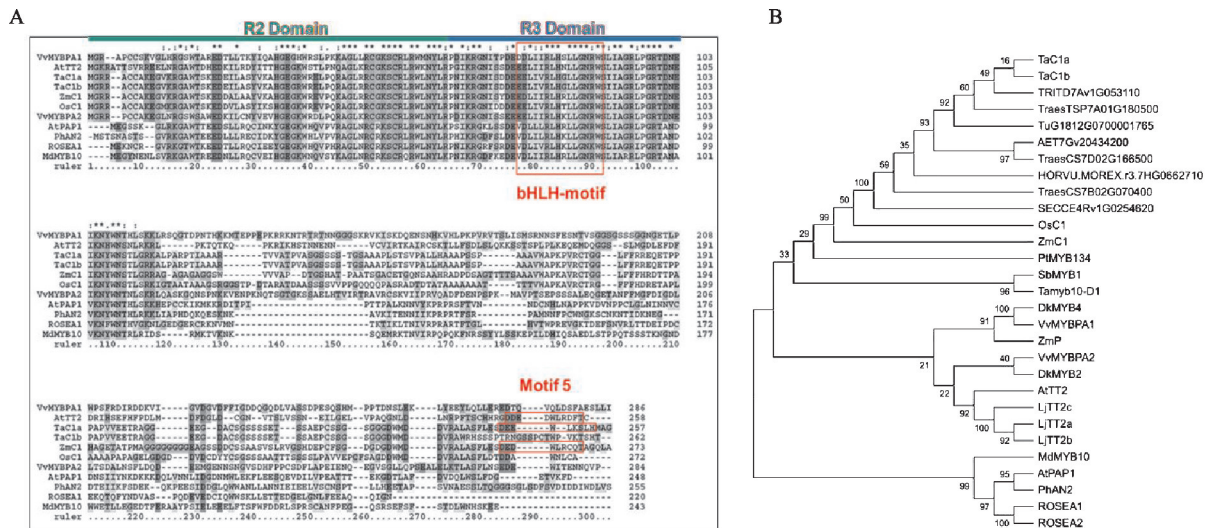


图中从左到右依次为本研究得到的遗传图谱、小麦 7AS 染色体遗传图谱及二穗短柄草 1 号染色体、高粱 10 号染色体、水稻 6 号染色体物理图谱。

From left to right in the figure are the genetic map generated in this study, the genetic map of wheat chromosome 7AS, and the physical maps of *Brachypodium distachyon* chromosome 1, sorghum chromosome 10, and rice chromosome 6.

图 2 本研究得到的遗传图谱与小麦 7AS 染色体遗传图谱及二穗短柄草、高粱和水稻物理图谱的共线性分析

Fig. 2 Synteny analysis of the genetic map generated in this study, the genetic map of wheat chromosome 7AS, and the physical maps of *Brachypodium distachyon*, sorghum, and rice



TRITD7Av1G053110 来源于硬粒小麦; TraesTSP7A01G180500 来源于斯卑尔脱小麦; TuG1812G0700001765 来源于乌拉尔图小麦; AET7Gv20434200 来源于粗山羊草; TraesCS7B02G166400、TraesCS7D02G166500 和 Tamyb10-D1 来源于普通小麦; HORVU.MOREX.r3.7HG0662710 来源于大麦; SECCE4Rv1G0254620 来源于黑麦; OsC1 来源于水稻; ZmP 和 ZmC1 来源于玉米; PtMYB134 来源于毛果杨; SbMYB1 来源于高粱; DkMYB2 和 DkMYB4 来源于柿树; VvMYBPA1 和 VvMYBPA2 来源于葡萄; AtPAP1 和 AtTT2 来源于拟南芥; LjTT2a、LjTT2b 和 LjTT2c 来源于百脉根; MdMYB10 来源于苹果; PhAN2 来源于矮牵牛; ROSEA1 和 ROSEA2 来源于金鱼草。

TRITD7Av1G053110 is from *Triticum turgidum*; TraesTSP7A01G180500 is from *Triticum spelta*; TuG1812G0700001765 is from *Triticum urartu*; AET7Gv20434200 is from *Aegilops tauschii*; TraesCS7B02G166400, TraesCS7D02G166500 and Tamyb10-D1 are from *Triticum aestivum*; HORVU.MOREX.r3.7HG0662710 is from *Hordeum vulgare*; SECCE4Rv1G0254620 is from *Secale cereale*; OsC1 is from *Oryza sativa*; ZmP and ZmC1 are from *Zea mays*; PtMYB134 is from *Populus trichocarpa*; SbMYB1 is from *Sorghum bicolor*; DkMYB2 and DkMYB4 are from *Diospyros kaki*; VvMYBPA1 and VvMYBPA2 are from *Vitis vinifera*; AtPAP1 and AtTT2 are from *Arabidopsis thaliana*; LjTT2a, LjTT2b and LjTT2c is from *Lotus japonicus*; MdMYB10 is from *Malus domestica*; PhAN2 is from *Petunia hybrida*; ROSEA1 and ROSEA2 are from *Antirrhinum majus*.

图 4 TaC1 的系统进化分析及其与同源蛋白的序列比对

Fig. 4 Phylogenetic analysis of TaC1 and protein sequence alignment with its homologous

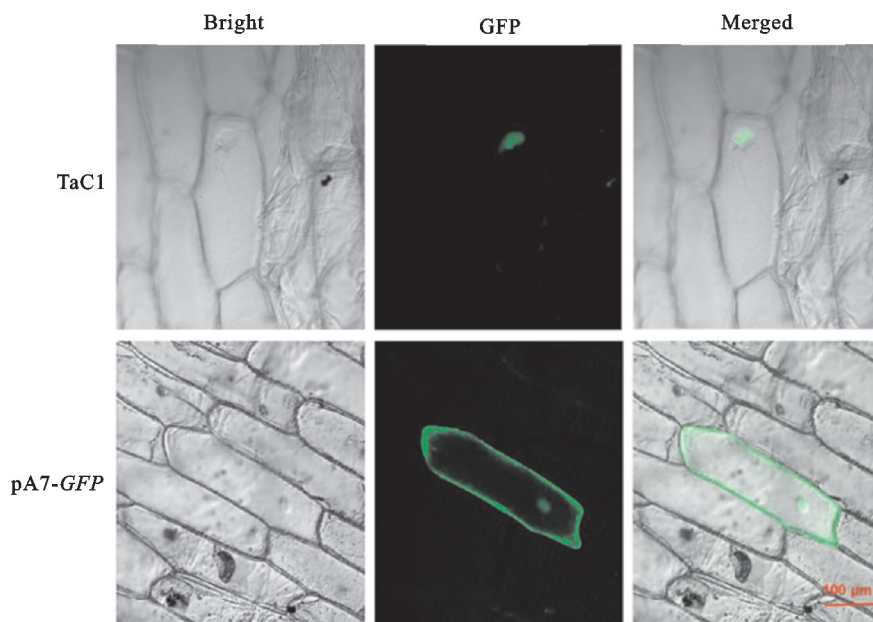


图 5 TaC1 在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular location of TaC1 in onion epidermal cell

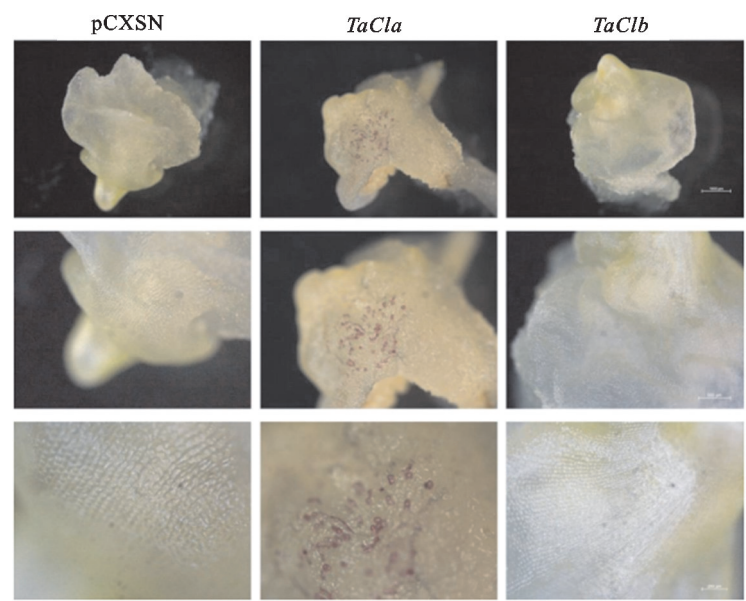
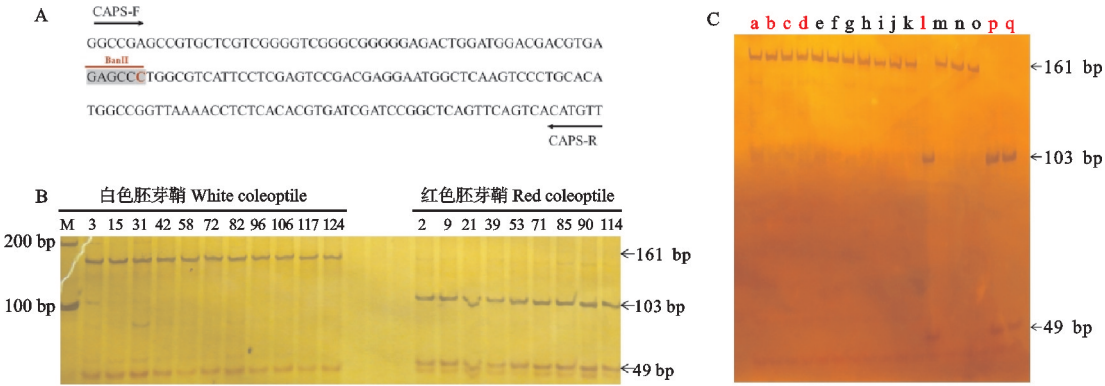


图 6 基因枪介导的*TaCl* 基因在小麦愈伤组织中的瞬时表达
Fig. 6 Particle bombardment-mediated transient expression of the *TaCl* gene in wheat calli

2.6 CAPS 标记的开发及其在*TaCl* 基因型分析中的应用

基于*TaClβ* 基因在 714 bp 处的碱基缺失位点,本研究开发了 CAPS 标记 CAPS-F/CAPS-R(图 7A),该标记扩增产物通过 *Ban*II 酶切可区分*TaClα* 与*TaClβ* 基因型。*TaClα* 基因的扩增产物为 162 bp,经酶切后产生 103 bp+49 bp 片段;*TaClβ* 基因的扩增产物为 161 bp,无法被酶切(图 7B)。

进一步利用开发的 CAPS 标记对 17 份不同胚芽鞘颜色的小麦材料进行扩增及酶切鉴定,结果(图 7C)显示,10 份白色胚芽鞘材料(如中国春、扬麦 158)均为*TaClβ* 基因型;但 7 份红色胚芽鞘材料中,仅有 3 份材料(如小偃 22、野生一粒麦)为*TaClα* 基因型,另外 4 份材料(如黑小麦 76、秦黑一号)为*TaClβ* 基因型,暗示存在其他调控红色胚芽鞘的基因。



A: 本研究中开发的 CAPS 标记 CAPS-F/CAPS-R; B: CAPS 标记在 RIL 群体中的扩增及酶切结果,其中数字 2~124 为材料编号; C: CAPS 标记在 17 份小麦材料(a: 黑小麦 76; b: 秦黑一号; c: 漯珍一号; d: AY30-1; e: 植洛乌麦; f: 河东乌麦; g: 西农 1376; h: AY18; i: Bobwhite; j: 杨麦 158; k: 中国春; l: 小偃 22; m: 明 988; n: A14; o: 硬粒小麦; p: Icaro; q: 野生一粒小麦)中的应用,红色字母标注的材料具有红色胚芽鞘,黑色字母标注的材料具有白色胚芽鞘。
A: The CAPS marker CAPS-F/CAPS-R developed in this study; B: Amplification and restriction enzyme digestion results of the CAPS marker in the RIL population, the numbers 2 to 124 represent the material codes; C: Amplification and restriction enzyme digestion results of the CAPS marker in different wheat materials(a: Heixiaomai 76; b: Qinhei 1; c: Luozhen 1; d: AY30-1; e: Zhiluowumai; f: Hedongwumai; g: Xinong 1376; h: AY18; i: Bobwhite; j: Yangmai 158; k: Chinese Spring; l: Xiaoyan 22; m: Ming 988; n: A14; o: Durum wheat; p: Icaro; q: *Triticum monococcum*), materials marked with red letters have red coleoptiles, while those marked with black letters have white coleoptiles.

图 7 CAPS 标记在不同小麦材料中的扩增及酶切结果
Fig. 7 Amplification and restriction enzyme digestion results of the CAPS marker in different wheat materials

3 讨论

3.1 *TaCl1* 是调控小麦红色胚芽鞘的关键基因

此前研究将小麦红色胚芽鞘调控基因定位于7号染色体同源群,但定位区间较宽(如*Rc-A1*定位于*Xgwm913*与*Xgwm60*之间,距离11.9 cM)^[15]。本研究通过9K SNP芯片结合SSR标记,将调控位点精细定位到7A染色体1.69 cM区间,显著提高了定位精度。此外,本研究借助比较基因组学,在共线性区域筛选到MYB转录因子基因*TaCl1*,其蛋白质序列特征(R2R3结构域、motif 5)与玉米*ZmCl1*、水稻*OsCl1*高度保守,且瞬时表达试验证实*TaCl1a*可诱导花青素合成,表明*TaCl1*是*Rc-A1*位点的候选基因。

*TaCl1b*处的714 bp碱基缺失引起移码突变,导致蛋白结构中缺失motif 5结构域^[25],这可能是*TaCl1b*基因丧失功能的核心原因。与之类似地,在水稻绿色叶鞘品种C418中,*OsCl1*基因因存在34 bp的片段缺失,造成其C端的[DE] Lx2 [RK] x3Lx6Lx3R保守基序缺失,进而导致其与bHLH蛋白的互作能力受损,最终使*OsCl1*基因丧失功能^[26]。这一结果表明,MYB转录因子的氨基酸序列完整性是其行使正常生物学功能的关键前提。此外,在野生稻及栽培稻叶鞘颜色的最新研究中发现,*OsCl1*存在25个序列变异,可形成16个功能单倍型(关联紫色叶鞘)和9个非功能单倍型(关联绿色叶鞘);其核心变异为编码区881~890 nt的10 bp缺失,同时还鉴定到3个新变异(T→A突变、T插入、T→C突变),这些变异均会导致*OsCl1*基因功能丧失^[27]。由此可见,*TaCl1*基因在不同小麦品种中是否存在更丰富的单倍型类型,仍有待开展深入研究。

3.2 小麦红色胚芽鞘调控的复杂性

CAPS标记检测结果表明,4份红色胚芽鞘材料(黑小麦76等)携带*TaCl1b*基因,暗示存在其他调控基因。Shin等^[19]在小麦4号染色体上克隆到R2R3-MYB基因*TaPL1*,其过表达可提高拟南芥花青素含量,且在红色胚芽鞘中高表达。此外,小麦7B、7D染色体上的*Rc-B1*、*Rc-D1*位点也可能参与调控^[15]。推测小麦红色胚芽鞘性状受多基因调控,不同品种中起主导作用的基因可能存在差异,需进一步克隆其他调控基因并解析其互作网络。

4 结论

小麦7A染色体红色胚芽鞘调控基因位于*Xsnp7205*与*Xsnp5258*标记之间,遗传距离为1.69 cM,并确定MYB转录因子基因*TaCl1*为调控该性状的候选基因;该基因存在*TaCl1a*和*TaCl1b*两种等位变异,其中*TaCl1a*调控红色胚芽鞘表型,*TaCl1b*调控白色胚芽鞘表型,二者功能差异的原因是*TaCl1b*的714 bp处发生碱基缺失,导致编码蛋白发生移码,使motif 5结构域缺失;本研究开发了可用于红色胚芽鞘分子鉴定的CAPS标记,但检测发现部分红色胚芽鞘材料虽携带*TaCl1b*基因仍表现为红色胚芽鞘,暗示该性状还依赖其他调控基因,后续需进一步解析小麦红色胚芽鞘调控的多基因互作机制。

参考文献:

- [1] GALE M D, FLAVELL R B. The genetic control of anthocyanin biosynthesis by homoeologous chromosomes in wheat [J]. *Genetical Research*, 1971, 18(2): 237.
- [2] ZEVEN A C. The colour of the coleoptile of wheat. 2. A review and geographical distribution of the purple coleoptile of *Triticum aestivum* [J]. *Euphytica*, 1973, 22(3): 471.
- [3] 王贵, 李宏伟, 林凡云, 等. 强光诱导小麦叶片花青素积累的研究 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(4): 754.
WANG G, LI H W, LIN F Y, et al. High light induced anthocyanin accumulation in wheat seedlings [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(4): 754.
- [4] JIANG W H, LIU T X, NAN W Z, et al. Two transcription factors TaPpm1 and TaPpb1 co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(10): 2555.
- [5] JIANG Q Q, JIANG W H, HU N, et al. Light-induced Ta-HY5-7A and TaBBX-3B physically interact to promote PURPLE PERICARP-MYB 1 expression in purple-grained wheat [J]. *Plants*, 2023, 12(16): 2996.
- [6] 耿小红, 武艳芍, 余马. 人工合成六倍体小麦 SHW-L1 紫色花药的遗传定位研究 [J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(22): 5748.
GENG X H, WU Y S, YU M. Genetic mapping of purple anthers in synthetic hexaploid wheat of SHW-L1 [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(22): 5748.
- [7] LI J L, ZHANG C Z, XU X R, et al. A MYB family transcription factor TdRCA1 from wild emmer wheat regulates anthocyanin biosynthesis in coleoptile [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2024, 137(9): 208.
- [8] ZHU Y W, LIN Y R, FAN Y J, et al. CRISPR/Cas9-mediated restoration of *Tamyb10* to create pre-harvest sprouting-resistant red wheat [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(4): 665.

- [9] MAO W W, WANG X B, CHEN Y M, *et al.* Map-based cloning and characterization reveal that an R2R3 MYB gene confers red glume in wheat [J]. *The Crop Journal*, 2025, 13(3): 887.
- [10] 沈又佳, 陆作楣. 种子纯度鉴定方法的研究 ——“赣化二号”杂交水稻种子纯度的芽鞘色鉴定法 [J]. 种子, 1985, 4(3): 17.
- SHEN Y J, LU Z M. A study on seed purity identification method; Coleoptile color identification for seed purity of hybrid rice ‘Gan Hua No. 2’ [J]. *Seed*, 1985, 4(3): 17.
- [11] EIKO H, SHIN T. Isolation of candidate genes for the barley *Ant1* and wheat *Rc* genes controlling anthocyanin pigmentation in different vegetative tissues [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(4): 1287.
- [12] QI X L, GUO S W, ZHONG Y, *et al.* Establishment of an efficient haploid identification system by engineering anthocyanin accumulation in the wheat embryo [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(3): 100568.
- [13] WANG L Y, ZHENG Y S, DUAN L L, *et al.* Artificial selection trend of wheat varieties released in Huang-Huai-Hai region in China evaluated using DUS testing characteristics [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 898102.
- [14] RÖDER M S, KORZUN V, WENDEHAKE K, *et al.* A microsatellite map of wheat [J]. *Genetics*, 1998, 149(4): 2007.
- [15] KHLESTKINA E K, PESTSOVA E G, RÖDER M S, *et al.* Molecular mapping, phenotypic expression and geographical distribution of genes determining anthocyanin pigmentation of coleoptiles in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104(4): 632.
- [16] KHLESTKINA E, PSHECHNIKOVA T, RÖDER M, *et al.* Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes [J]. *Cereal Research Communications*, 2009, 37(3): 391.
- [17] WANG Y Q, HOU X J, ZHANG B, *et al.* Identification of a candidate gene for *Rc-D1*, a locus controlling red coleoptile colour in wheat [J]. *Cereal Research Communications*, 2016, 44(1): 35.
- [18] YE G J, WEI L, CHEN W J, *et al.* Frame-shift mutation causes the function loss of *TaMYB-A1* regulating anthocyanin biosynthesis in *Triticum aestivum* [J]. *Cereal Research Communications*, 2017, 45(1): 35.
- [19] SHIN D H, CHOI M G, KANG C S, *et al.* A wheat R2R3-MYB protein PURPLE PLANT1 (TaPL1) functions as a positive regulator of anthocyanin biosynthesis [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 469(3): 686.
- [20] ROGERS S O, BENDICH A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Molecular Biology*, 1985, 5(2): 69.
- [21] International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWG-SC). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1251788.
- [22] 赵朋. 春小麦碳同位素分辨率和旗叶性状 QTL 分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- ZHAO P. Quantitative trait loci analysis of carbon isotope discrimination and flag leaf traits in spring wheat [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015.
- [23] 蒋文慧. 小麦中调控胚芽鞘与籽粒花青素合成相关基因的筛选及其功能研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- JIANG W H. Isolation and functional characterization of genes regulating anthocyanin biosynthesis in the coleoptile and grain of wheat [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2018.
- [24] 徐风, 李春莲, 李扬, 等. 节节麦幼胚再生体系的建立 [J]. 麦类作物学报, 2016, 36(2): 150.
- XU F, LI C L, LI Y, *et al.* Establishment of regeneration system for immature embryo of *Aegilops tauschii* [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2016, 36(2): 150.
- [25] STRACKE R, WERBER M, WEISSHAAR B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(5): 447.
- [26] GAO D Y, HE B, ZHOU Y H, *et al.* Genetic and molecular analysis of a purple sheath somaclonal mutant in Japonica rice [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(5): 901.
- [27] JIANG L, LYU S, YU H, *et al.* Transcription factor encoding gene *OsCl* regulates leaf sheath color through anthocyanin metabolism in *Oryza rufipogon* and *Oryza sativa* [J]. *BMC Plant Biology*, 2024, 24: 147.