西北农业学报 2010,19(6):55-59
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

普通小麦及其近缘种 *NCED* 基因的克隆及表达分析*

李 康[1],聂小军[1],方桂英[1],王 乐[1],岳 华[1],佘奎军[1],宋卫宁[1,2]
(1.西北农林科技大学 农学院,陕西杨凌 712100;2.陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西杨凌 712100)

摘 要:利用已知的大麦 *NCED* 基因(dbj|BAF02837.1)保守区域设计引物,在野生一粒小麦、硬粒小麦、野生二粒小麦、普通小麦和粗山羊草中分别扩增出长度为 782、782、782、783、783 bp 的目的片断,生物信息学分析结果表明,均含有一个开放阅读框,编码 242 个氨基酸残基组成的蛋白,具有典型的 9-顺式-新黄素加双氧酶蛋白的结构域。同源性比对结果表明,普通小麦与大麦的 *NCED* 序列具有高度同源性(97%);普通小麦及其近缘种在该区内 *NCED* 基因片段的同源性在 95%以上。半定量 RT-PCR 表达分析表明,*NCED* 基因参与了普通小麦及其近缘种对非生物胁迫高渗、高盐的应答反应,但在不同物种或胁迫处理下的表达模式不同,其中粗山羊草和普通小麦在高渗和高盐胁迫下分别表现出了较快的应答反应。

关键词:普通小麦;9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧合酶;基因克隆;序列比较;表达分析
中图分类号:S512.1+1 **文献标识码**:A **文章编号**:1004-1389(2010)06-0055-05

Cloning and Expression of a *NCED* Gene in Wheat and Its Relative Species

LI Kang[1], NIE Xiaojun[1], FANG Guiying[1], WANG Le[1], YUE Hua[1], SHE Kuijun[1] and SONG Weining[1,2]
(1. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Key Laboratory of Agriculture Molecular Biology of Shaanxi Province, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: A pair of specific degenerate primers was designed from the conservative domain of *NCED* in *Hordeum-vulgare*, *Oryza sativa*, and *Zea mays* to amplify the *NCED* gene. 782, 782, 782, 783, and 783 bp fragments were amplified from *Triticum boeoticum*, *Triticum dicoccoides*, *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, and *Aegilops tauschii*, respectively. The isolated fragments were cloned and seque*NCED*, and 242 amino acid residues encoded by the longest open reading frame (OFR) in all were highly homological with the conserved domain of 9-cis-epoxycarotenoiddioxygenase (*NCED*), which confirmed that the isolated fragment was the product of *NCED* gene. Compared nucleotide sequence between these five materials, the result showed that the similarities of each sequence higher than 95%. Real time quantitative PCR was performed to reveal that *NCED* was up regulated in abiotic stress (dehydration treatment and NaCl treatment). *Aegilops tauschii* and *Triticum aestivum* L. demonstrated faster response reaction under hyper-osmotic and high-salt stress respectively.

Key words: Wheat; 9-cis-epoxycarotenoiddioxygenase (*NCED*); Gene cloning; Sequence alignment; Expression analysis

脱落酸(abscisic acid,ABA)是一种非常重要的植物激素,它在植物的生长发育、气孔调节和对外界恶劣环境的反应中都起着极其重要的作用[1-2]。植物对干旱、寒冷和盐碱的适应是通过一系列由依赖 ABA 和非依赖 ABA 的信号调节系统而达到的。所以研究 ABA 的生物合成和信号

* **收稿日期**:2010-02-25 **修回日期**:2010-03-14
基金项目:教育部高等学校科技创新工程重大项目培育基金项目(707054)。
第一作者:李康,男,硕士研究生,专业方向为分子生物学。E-mail:likang19850126193@163.com
通讯作者:宋卫宁,教授,博士生导师,主要从事基因组学与分子育种研究。E-mail:sweining2002@yahoo.com

调节是从分子生物学水平上了解植物抗旱、抗寒和抗盐碱遗传机制的重要途径[3-5]。9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase,NCED)催化的氧化裂解反应是ABA生物合成途径中的关键步骤[6-7]。第一个*NCED*基因首先从玉米(*Zea mays*)中被克隆出来[6,8],随后在其他植物中也克隆到了*NCED*基因,例如番茄[9]、菜豆[7]、豇豆[10]等。近年来,在其他植物如玉米、大豆和拟南芥等中,*NCED*被证实是干旱胁迫诱导的,而将*NCED*基因转化拟南芥和烟草后,提高了转基因植株内源ABA含量和耐旱性[11-12]。上述结果综合表明,*NCED*基因在提高植物抗逆性方面具有良好的应用前景。

野生一粒小麦、硬粒小麦、野生二粒小麦和粗山羊草作为小麦的近缘物种,是普通小麦遗传改良的重要基因资源,但是目前,在小麦及其近缘种基因组中,所有ABA生物合成体系各种酶的基因都还没有被克隆,因而弄清*NCED*基因在普通小麦及其近缘种中的分布情况及表达模式对普通小麦的抗逆性改良有着十分重要的作用。本研究以普通小麦及其近缘种为材料对ABA合成过程中的重要基因*NCED*基因进行克隆及序列分析,并对其进行半定量RT-PCR表达研究,旨在为ABA合成的分子机制研究和麦类作物抗逆的分子机理的揭示奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及DNA提取

野生一粒小麦(*Triticum boeoticum Boiss*)L_2-5、粗山羊草(*Aegilops tauschii*)由西北农林科技大学农学院标本区提供。硬粒小麦(*Triticum durum*)Joppa、野生二粒小麦(*Triticum dicoccoides*)Mt Hemon、普通小麦(*Triticum aestivum* L)品种中国春均由陕西省农业分子生物学重点实验室保存。

取1~2周龄的硬粒小麦、野生一粒小麦、普通小麦品种中国春、野生二粒小麦、粗山羊草幼叶,用CTAB提取法提取基因组DNA。

1.2 目的基因的克隆

根据大麦(U95953.1)、水稻(AP008218.1)、玉米(U95953.1)*NCED*基因的保守区序列,用Primer Premier 5.0软件设计引物:*NCED* Primer1:5′- gcatcccgcccttcatcaac-3′;*NCED* Primer2:5′- cgtccacccacatcatctcc-3′。

内参基因18S的引物序列:18SF:5′-gagtatggtcgcaaggctgaaa-3′;18SR:5′-cagacaaat cgctccaccaac-3′。

PCR反应体系:10×PCR buffer 2.0 μL,2.5 mmol/L dNTP 1.6 μL,25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL,10 μmol/L引物各0.5 μL,5 U/μL *Taq*聚合酶0.2 μL,100 ng/μL DNA模板0.5 μL,加ddH_2O至20 μL。扩增程序为:94℃预变性3 min,然后以94℃变性40 s,60℃复性40 s,72℃延伸90 s进行35个循环,最后于72℃延伸10 min。

琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的片段条带并克隆至pMD-18载体(TAKARA,Japan),挑取阳性克隆提取质粒,送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.3 序列的生物信息学分析

将所得的普通小麦及其近缘种的序列在Genebank中进行同源性搜索,利用InterProScan在线分析软件预测所获序列的结构域(http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/index.html)。采用MEGA4.0软件对普通小麦及其近缘种的*NCED*基因序列和其他植物的*NCED*基因进行多序列比对并通过Neighbor-joining方法构建系统进化树。

1.4 *NCED*基因半定量RT-PCR表达分析

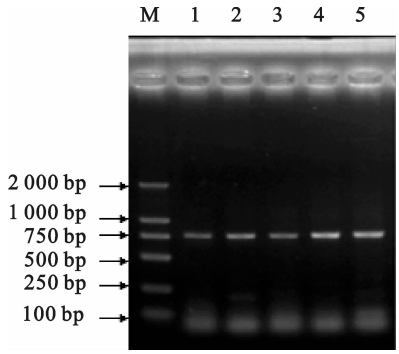
将中国春和其他材料的种子置于垫有湿润滤纸的培养皿中,4℃条件下萌发,待种子发芽后再移栽到盛有基质的营养钵中。待幼苗长至2周龄时进行胁迫处理,处理方式包括对幼苗进行自然脱水处理和用200 mmol/L的NaCl溶液对幼苗进行渗透胁迫,在处理后0,1,3,6,12 h分别取样,参照Bizol试剂盒说明书(Invitrogen,USA)提取总RNA。

在各处理总RNA浓度相对一致的条件下,通过预试验确定PCR扩增反应的循环数。以各处理及对照在各时间点的幼苗叶片总RNA为模板,用M-AMV反转录酶合成cDNA第一链,再以cDNA为模板,并以18S rRNA作为内参基因,用*NCED* Primer1、*NCED* Primer2和内参基因引物进行RT-PCR扩增,扩增程序为94℃预变性3 min,然后以94℃变性40 s,60℃复性40 s,72℃延伸90 s进行35个循环,最后于72℃延伸10 min。取适量的扩增产物于0.01 g/mL琼脂糖凝胶电泳上检测扩增结果。

2　结果与分析

2.1　小麦及其近缘种 *NCED* 基因克隆及序列分析

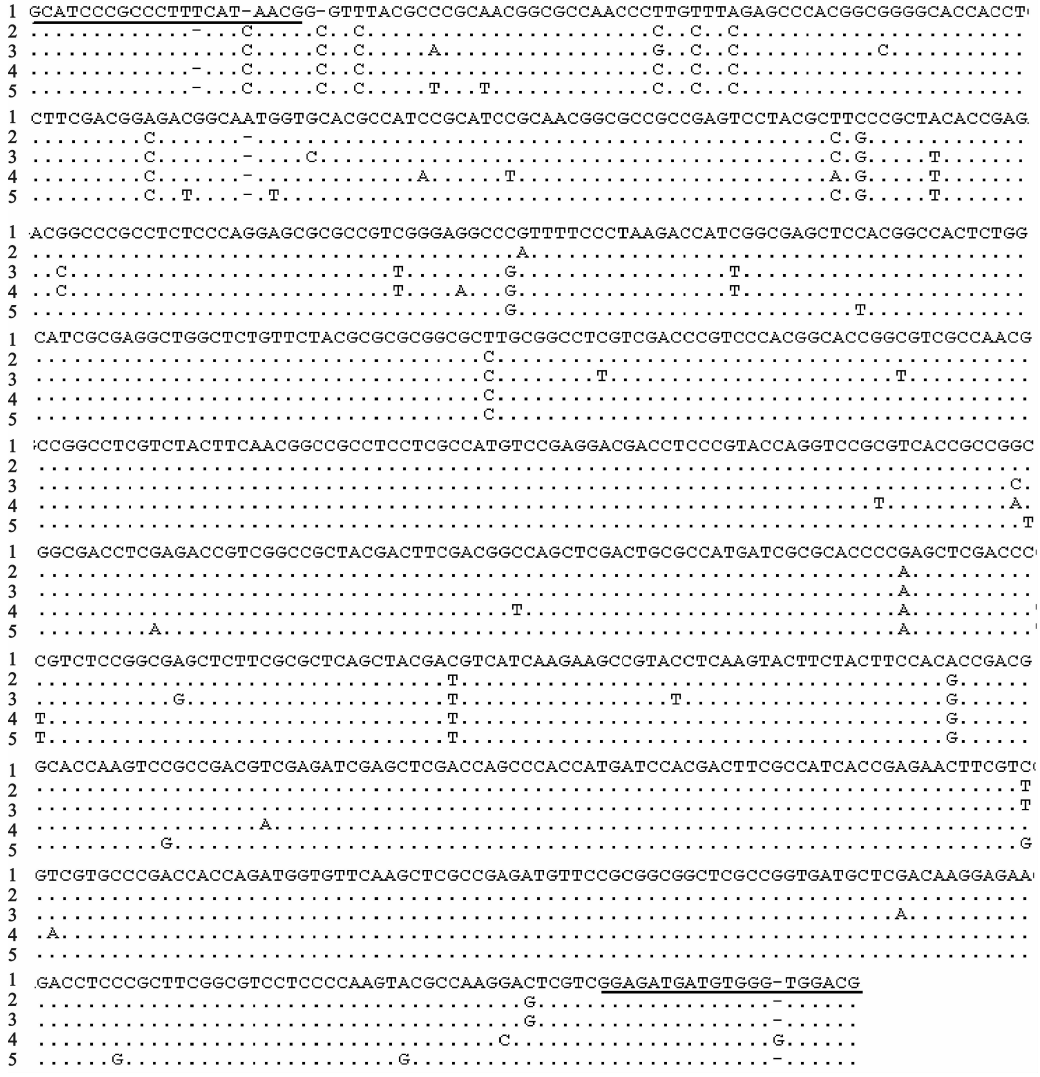
利用 *NCED* Primer1 和 *NCED* Primer2 对野生一粒小麦、硬粒小麦、野生二粒小麦、粗山羊草和普通小麦品种中国春的基因组 DNA 进行 PCR 扩增得到了一条 800 bp 左右的目的片段(图 1),与预期结果一致。克隆阳性片段并送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序,分别得到了 782、782、782、783、783 bp 的 DNA 序列片段。将测序得到的 5 个核酸序列运用 MEGA4.0 软件进行序列比对(图 2)。结果表明,普通小麦、野生一粒小麦、硬粒小麦、野生二粒小麦、粗山羊草在



M. DL2000 1. 野生一粒小麦 *Triticum boeoticum* 2. 硬粒小麦 *Triticum durum* 3. 野生二粒小麦 *Triticum dicoccoides* 4. 粗山羊草 *Aegilops tauschi* 5. 普通小麦 *Triticum aestivum* L.

图 1　*NCED* 基因的 DNA 扩增结果

Fig. 1　Gene amplification results of *NCED*



1. 硬粒小麦 *Triticum durum*;2. 野生一粒小麦 *Triticum boeoticum*;3. 野生二粒小麦 *Triticum dicoccoides*;4. 粗山羊草 *Aegilops tauschi*;5. 普通小麦 *Triticum aestivum* L.

图 2　普通小麦及其近缘种 *NCED* 基因的核苷酸序列比较(划线部分为引物序列)

Fig. 2　Comparison on the nucleotide sequences of *NCED* genes between common wheat and its relative species(the underlined is primer sequence)

该基因片段的同源性均在 95%以上，只有个别碱基的差异，说明在麦类作物中该基因片段具有高度保守性。

将所克隆到的普通小麦品种中国春核酸序列信息输入到 GenBank 中进行 TBLASTN 同源核酸序列搜索，共检索到 93 条同源序列，其中与大麦 *NCED* 核酸序列同源性最高，达到了 97%（表 1），与水稻的同源性达到了 90%；同时，应用 NCBI 的 BLAST 在线分析工具和 InterProScan 对五个基因片段的结构域预测，结果表明，该片段编码的 242 个氨基酸序列具有典型的 9-顺式-新黄素加双氧酶蛋白的结构[14]。由上可以证实所获得的五个 DNA 序列分别是硬粒小麦、野生一粒小麦、普通小麦、野生二粒小麦、粗山羊草的 9-顺式-新黄素加双氧酶基因的部分序列。

表 1 普通小麦品种中国春 *NCED* 基因核甘酸序列与部分其他植物 *NCED* 基因的同源性比较

Table 1 Homology of *NCED* nucleotide sequence of common wheat cultivar China Spring with other plants

基因登录号 Accession	物种 Species	碱基同源性/% The rate of identitiesIdentities	同源碱基数 Identical base pairsIdentities	期望值 E-value
AB239297.1	大麦 *Hordeum vulgare*	97	782	0
AY838901.1	水稻 *Oryza sativa*	90	778	0
U95953.1	玉米 *Zea mays*	87	695	0
AY838900.1	南西文心兰 *Oncidium* Gower Ramsey	77	553	4e-105
DQ062150.3	柱花草 *Stylosanthes guianensis*	75	513	1e-74
DQ173535.1	风花茶 *Rumex palustris*	78	340	1e-70
AY974808.1	短柱头菟丝子 *Cuscuta reflexa*	74	580	7e-68
AY974806.1	菜豆 *Phaseolus vulgaris*	73	568	4e-86

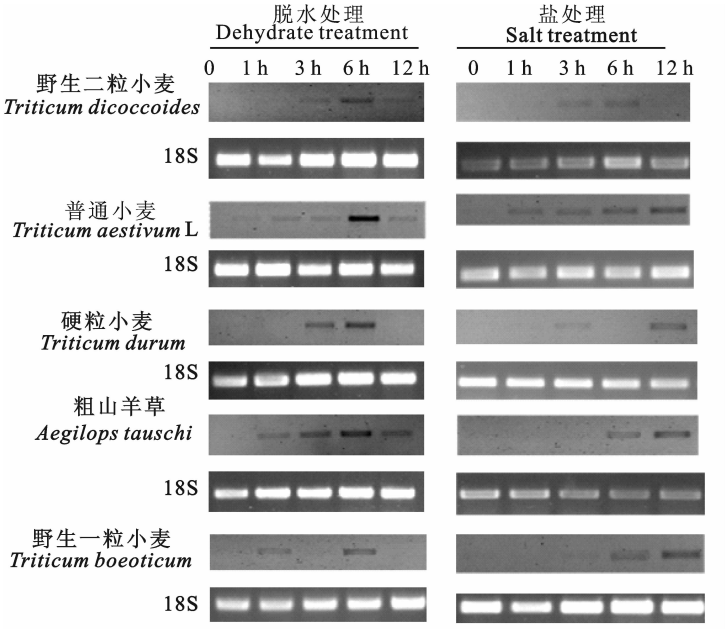


图 3 普通小麦及其近缘种在不同胁迫下叶片中 *NCED* 基因表达的 RT-PCR 分析

Fig. 3 *NCED* transcript in the leafs of five species under dehydrate and salt stress treatments

2.2 非生物胁迫条件下 *NCED* 基因的半定量 RT-PCR

为了验证本研究克隆的 *NCED* 基因在非生物胁迫下，不同物种间的表达差异，将普通小麦及其近缘种进行脱水和盐胁迫处理，测定基因的相对表达量。试验结果初步表明，幼苗期普通小麦及其近缘种在没有受非生物胁迫的条件下 *NCED* 基因只有少量或者几乎不表达，但是随着逆境处理时间的增加其表达量明显增加（图 3），但不同物种或胁迫处理下的表达模式不同。在脱水处理条件下，随着时间的延长 *NCED* 表达量明显上升，在处理后的 6 h 几个物种 *NCED* 基因的表达量都达到了最高，在处理后的 12 h，几个物种的表达量都有下降的趋势，但是相比之下，粗山羊草在处理后 1 h*NCED* 基因表达量就明显上升。而在 NaCl 盐胁迫下，除野生二粒小麦外该基因的表达量均在 12 h 处达到最高，其中普通小麦品种中国春在处理后的 1 h*NCED* 就出现了较

高的表达量。这说明在不同处理的胁迫下,小麦及其近缘种的表达模式是不同的,其中粗山羊草在应对脱水胁迫时能够快速反应,而在盐胁迫时普通小麦则表现出了强烈的响应能力。

3　讨 论

本试验首次从野生一粒小麦、硬粒小麦、野生二粒小麦、普通小麦和粗山羊草中克隆到了 *NCED* 基因的片断,包含一个开放阅读框,编码由 242 个氨基酸残基组成的蛋白,具有典型的 9-顺式-新黄素加双氧酶蛋白的结构域。

NCED 基因在拟南芥中为一个多基因家族,其中 *AtNCED*3 受干旱胁迫的诱导,对干旱胁迫下 ABA 的合成起关键作用。融合蛋白的酶活性测定表明 *AtNCED*3 编码的是有活性的 NCED 蛋白[13]。根据 NCBI 上的同源检索结果,AtNCED3 蛋白与其余 3 个具有 NCED 酶活性的 AtNCED2、AtNCED6 和 AtNCED9 的氨基酸同源性分别为 68%,58%和 71%。本研究克隆到的普通小麦及其近缘种 *NCED* 基因片段之间的同源性都在 95%以上,这说明在普通小麦中的 *NCED* 基因可能以单基因形式存在,并且其在普通小麦及其近缘种中具有高度的保守性。

前人研究结果表明,*NCED* 基因在非生物胁迫下大量表达,并调控内源 ABA 的合成[13-14],但是其在不同胁迫或不同物种间的表达模式是不相同的[11,16]。本研究结果表明,普通小麦及其近缘种 *NCED* 基因在正常条件下表达量很低或几乎不表达,但在逆境条件下的表达量明显增强,脱水胁迫和盐胁迫都能够强烈诱导该基因的表达,说明了 *NCED* 基因参与了麦类作物的非生物胁迫应答反应,这与前人的研究结果是一致的。同时,在非生物胁迫条件下普通小麦及其近缘种之间 *NCED* 基因的表达量具有明显差异,说明不同麦类材料对逆境的响应能力是不同的,小麦及其近缘种间 *NCED* 基因的诱导表达和调控还是存在一定差异,这就为普通小麦的抗逆性育种提供了一定的理论依据。

抗逆基因分离及其在品种改良上的应用是小麦抗逆育种的研究热点,本研究克隆并分析了普通小麦及其近缘种 *NCED* 基因的片段,并证实了 *NCED* 基因参与了普通小麦及其近缘种的非生物胁迫应答反应,为进一步研究 *NCED* 基因的表达调控、麦类作物的 ABA 生物合成代谢途径及其抗逆分子机理奠定了基础。

参考文献:

[1] Davies W J, Zhang J . Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil [J]. Annu Rev Plant Mol Biol, 1991, 42: 55-76.

[2] Chandler P M, Robertson M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1994, 45: 113-141.

[3] Finkelstein R R, Gampala S S L, Rock C D. Abscisic acid signaling in seeds and seedling [J]. Plant Cell, 2002, 14: 15-45.

[4] Zhu J K. Salt and drought stree signal transduction in plant [J]. Annu Rev Plant Biol, 2002, 56: 165-185.

[5] 吴耀荣,谢　旗. ABA 与植物胁迫抗性[J]. 植物学通报, 2006, 23: 511-518.

[6] Tan B C, Schwartz S H, Zeevaart J A D, *et al*. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94: 12235-12240.

[7] Qin X, Zeevaart J A D. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water stressed bean [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96: 15354-15361.

[8] Schwartz S H, Tan B C, Gage D A, *et al*. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize [J]. Science, 1997, 276: 1872-1874.

[9] Burbidge A, Grieve T M, Jackson A, *et al*. Characterization of the ABA deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize VP14 [J]. The Plant Journal, 1999, 17: 427-431.

[10] Luchi S, Kobayashi M, Yamaguchi, Shinozaki K, *et al*. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase is involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea [J]. Plant Physiology, 2000, 23: 553-562.

[11] Luchi S, Kobayashi M, Taji T, *et al*. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epox -ycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis [J]. Plant J, 2001, 27: 325-333.

[12] Qin X, Zeevaart J A D. Over expression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in Nicotiana plumbaginifolia increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance [J]. Plan Physiology, 2002, 12(8): 544-551.

[13] Bao-Cai Tan, Leina M. Joseph, *et al*. Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid -dioxy genase gene family[J]. The Plant Journal, 2003, 7: 44-56.

[14] Rodrigo M J , Alquezar B, Zacaras L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrussinensis* L. *Osbeck*) [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(3): 633-643.

[15] Jinfen Yang, Zhenfei Guo. Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (*SgNCED*1) from Stylosanthes guianensis and its expression in response to abiotic stresses [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26: 1383-1390.