

网络出版日期:2018-05-09
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180509.1603.016.html>

小麦 *TaCYP78A5* 基因的克隆及生物信息学分析

郑雅月¹, 杨璐¹, 张炳慧¹, 赵万春^{1,2}, 董剑^{1,2}, 高翔^{1,2}, 李晓燕^{1,2}

(1. 西北农林科技大学 农学院, 陕西杨凌 712100; 2. 陕西省小麦工程技术研究中心/
陕西省小麦新品种培育工程研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘要 细胞色素 P450(Cytochromes P450)蛋白家族含有硫羟基和血红素结构域,参与多种生物合成,CYP78A 家族成员对籽粒大小形成有重要的功能。利用同源克隆的方法,分别从小麦大粒品系‘P271’和小粒材料‘中国春’中扩增到位于 2AS、2BS、2DS 上的 *TaCYP78A5-2A*、*TaCYP78A5-2B* 和 *TaCYP78A5-2D* 基因,编码 534、544、549 个氨基酸。通过分析发现在‘P271’和‘中国春’克隆到的 *TaCYP78A5* 序列一致,说明 *TaCYP78A5* 基因在这 2 个粒型的小麦中是保守的。CYP78A 家族在水稻和拟南芥中具有非自主性细胞表达模式,结合对 CYP78A 家族的生物进化关系研究发现,CYP78A 家族的各个基因在单子叶植物中是保守的。‘P271’和‘中国春’籽粒大小的差异,可能是 *TaCYP78A5* 基因在‘P271’中的基因表达量高于‘中国春’,引起种子发育过程中内表皮细胞的增殖,从而促进种子表皮增大,使得‘P271’种子大小和质量增加。

关键词 小麦; *TaCYP78A5*; 克隆; 生物信息学分析

中图分类号 S512.1⁺1 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2018)05-0667-08

小麦产量由单位面积穗数、穗粒数和千粒质量 3 因素构成,其中千粒质量在产量构成因素中受遗传特性的影响最大,广义遗传力高达 59%~80%^[1]。小麦籽粒大小影响千粒质量的形成,属于受多基因控制的数量性状^[2]。在前人的研究中,利用不同的群体材料,小麦籽粒大小和产量相关的 QTL 被鉴定出来。例如,Kumar 等^[3]将控制粒质量的 QTL 定位在 1AS、2BS、7AS 上,这些 QTL 可解释 9.06%~19.85% 的表型变异;王瑞霞等^[4]在多个环境下将 21 个与千粒质量相关的 QTL 定位在小麦 1A、1B、2A、2D、3B、4A、4D、5A、6D 和 7D 染色体上。这些 QTL 的鉴定与定位,为小麦籽粒大小基因的精细定位与克隆奠定了很好的前期基础。

目前,对于小麦籽粒大小相关基因的克隆已经取得了一些进展。Song 等^[5]研究发现,水稻粒宽基因(*OsGW2*)的同源基因 *TaGW2* 通过控制种子发育影响千粒质量。常成等^[6]在小麦中克隆了水稻 *GS3* 的同源基因 *PEBP-like* 基因,发现 *PEBP-like* 基因的变异对籽粒的大小以及粒质量

产生影响。Wang 等^[7]克隆了水稻籽粒大小基因 *OsGS5* 的同源基因 *TaGS5*,*TaGS5-A1* 与粒宽、粒质量相关,*TaGS5-A1b* 等位基因在种子发育的各个时期其表达量均高于 *TaGS5-A1a*。在水稻中,许多与种子大小相关的基因已经被克隆和功能研究;但在小麦中种子大小相关基因的功能研究还未深入,小麦籽粒大小形成缺乏相应的分子证据。因此,对小麦籽粒大小相关基因进行克隆,并对这些基因如何调控小麦籽粒大小的形成进行解析,是阐释小麦籽粒大小形成的分子机制的重要前提。

细胞色素 P450(Cytochromes P450)是植物中最大的蛋白家族之一^[8]。对细胞色素 P450 的研究发现,CYP78A 家族成员具有控制籽粒大小的功能^[9-13]。拟南芥中 *CYP78A5/KLUH* 基因控制种子的大小,其作用独立于其他母系因素,通过促进种皮细胞增殖而决定种子大小^[9]。拟南芥中 *CYP78A9* 基因也是通过控制胚珠和种子发育阶段表皮细胞的增殖,进而控制种子表皮的大小,影响种子的大小^[13]。在水稻中 *CYP78A13* 通过

收稿日期:2017-11-29 修回日期:2017-12-15
基金项目:中国博士后科学基金(2017M613223);陕西省博士后科研項目(2016BSHYDZZ43);陕西省科技计划(2017NY-009)。
第一作者:郑雅月,女,硕士研究生,研究方向为小麦遗传育种。E-mail:2276574199@qq.com
通信作者:高翔,男,博士,教授,博士生导师,研究方向为小麦品质改良与育种。E-mail:gx@nwsuaf.edu.cn
李晓燕,女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为小麦遗传育种。E-mail:xiaoyanli@nwsuaf.edu.cn

调节胚与胚乳之间的大小平衡来调节种子的大小, *CYP78A13* 基因功能缺失突变体的种子胚增大但胚乳减小, 而过表达 *CYP78A13* 则会导致种子的胚减小和胚乳增大^[12,14]; 番茄中 *CYP78A5/ KLUH* 的同源基因 *SIKLUH* 也通过增加细胞数量调控果实大小^[15-17]。前人通过遗传和蛋白结构分析认为 *CYP78A* 家族成员之间具有相似功能, 然而, 小麦中关于 *CYP78A5* 的功能研究报道还比较少, *CYP78A5* 基因在小麦中对种子生长发育的调控机理还未被揭示。本研究通过克隆小麦不同籽粒大小材料中 *CYP78A5* 基因, 分析 *TaCYP78A5* 在大粒小麦‘P271’和小粒小麦‘中国春’ (‘CS’) 序列变异, 并进行生物信息学分析, 探究其在小麦种子大小形成中的作用, 为小麦中细胞色素 *P450* 基因调控种子大小提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

小麦大粒材料‘P271’和小粒材料‘中国春’ (‘CS’) 均由西北农林科技大学农学院小麦品质遗传育种实验室提供 (图 1)。将‘中国春’和‘P271’小麦种子用质量分数为 3% 的次氯酸钠消毒, 然后利用体积分数 1% 的 H_2O_2 溶液催芽处理后在培养箱中培养。2 周后, 取幼嫩的叶片提取 DNA。2016 年 10 月, ‘中国春’和‘P271’按常规方法种植在杨凌小麦综合试验站实验田, 进行常规播种与田间管理。

1.2 试验方法

1.2.1 籽粒表型测定 籽粒的粒长、粒宽、千粒质量均由万深 SC-A 型种子自动考种仪千粒质量仪测定, 表 1 所示的数据结果是 284 粒‘中国春’籽粒和 285 粒‘P271’籽粒经仪器测量和软件处理所得。

1.2.2 总 DNA 提取 采用 CTAB 法^[18] 提取小麦叶片基因组总 DNA。

1.2.3 引物设计和基因克隆 根据 NCBI 中已公布的基因序列号 KT266824.1, 采用 Primer premier 5.0 软件设计特异性引物 *TaCYP78A5-F* 和 *TaCYP78A5-R*, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以‘中国春’和‘P271’幼苗中提取的 DNA 为模板, 用引物进行 PCR 扩增, 按 $2 \times Es Taq$ MasterMix (CWBIO) 说明书配制反应体系 $25.0 \mu L$, 含 $2 \times Taq$ MasterMix $12.5 \mu L$, $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ 上下游引物各 $2.0 \mu L$, DNA $2.0 \mu L$,

ddH_2O $6.5 \mu L$ 。扩增程序为 $95^\circ C$ 5 min; $95^\circ C$ 50 s, $58^\circ C$ 50 s, $72^\circ C$ 2 min, 30 个循环, $72^\circ C$ 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收目标产物, 将目的片段与克隆载体 *PEASY-T1* (Trans-Gen Biotech) 连接并转化入感受态细胞 *Transl-T1* 中, 筛选阳性单克隆, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.4 *TaCYP78A5* 基因生物信息学分析 利用 NCBI 中 BLAST 在线软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRA>) 进行基因序列比对分析, 利用 NCBI 中 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测序列开放阅读框, 利用 DNAMAN 7.0 进行基因序列及蛋白质序列比对, 在 NCBI 中 CDD (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html) 在线预测氨基酸序列保守结构域, 利用 ProtParam 进行蛋白质一级序列分析 (<http://web.expasy.org/protparam/>), 利用 NPS@网站 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsaautomat.pl=NPSA/npsa_sopma.html) 预测蛋白质二级结构, 利用 SWISS-MODEL 软件 (<https://swissmodel.expasy.org/repository>) 预测蛋白质三级结构。利用 pfam 预测蛋白质的信号肽 (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1>), 利用 TMHMM 预测蛋白质的跨膜区 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)。利用 *CYP78A5* 基因全长及其推导的氨基酸序列, 在 GenBank 数据库查找其同源序列, 发现近缘物种中已克隆 *CYP78A* 家族的基因序列, 通过 MEGA 5.0 的最大似然法 (Maximum Likelihood method) 构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 籽粒表型变异

利用自动考种仪千粒质量仪测量‘中国春’和‘P271’种子。经过仪器自带的软件处理得出‘中国春’籽粒的平均宽度为 $2.59 mm$, 平均长度为 $5.32 mm$, 千粒质量为 $27.68 g$, 而‘P271’籽粒的平均宽度 $3.54 mm$, 平均长度为 $7.59 mm$, 千粒质量为 $57.48 g$, ‘P271’的籽粒长、宽、千粒质量都明显高于‘中国春’ (表 1)。因此, 本试验将‘中国春’作为小粒材料, ‘P271’作为大粒材料研究 *TaCYP78A5* 基因与小麦籽粒大小形成的关系。



图 1 小麦‘CS’和‘P271’的籽粒粒型
Fig. 1 The grain shape of ‘CS’ and ‘P271’

表 1 ‘CS’和‘P271’籽粒的表型数值($\bar{x} \pm s_x$)

材料名称 Name	籽粒均宽/mm Grain width	籽粒均长/mm Grain length	千粒质量/g Thousand grain mass
P271	3.54±0.23	7.59±0.48	57.48±0.83
中国春 CS	2.59±0.22	5.32±0.33	27.68±0.50

2.2 TaCYP78A5 基因克隆和序列分析

以特异性引物 TaCYP78A5-F: TCTTTC-CATGGTTACCGGCC 和 TaCYP78A5-R: CAG-CTCTCTCTGGCCCTAG 扩增得到‘中国春’和‘P271’的 *TaCYP78A5* 基因序列各 18 个,这 18 条序列聚集成 3 类,将 3 类序列提交到小麦资源库(<https://urgi.versailles.inra.fr/blast/blast.php>)进行 BLAST 比对,分别定位到小麦 2AS、2BS、2DS 染色体上,命名为 *TaCYP78A5-2A*、*TaCYP78A5-2B* 和 *TaCYP78A5-2D*。将 *TaCYP78A5* 基因的氨基酸序列在 NCBI 进行比对,结果显示 *TaCYP78A5* 属于细胞色素 P450 家族成员(图 2-A)。利用 NCBI 中 ORF Finder 预测序列开放阅读框,*TaCYP78A5* 与其他 CYP78A 家族成员一样均由 2 个外显子和 1 个内含子组成,不同染色体上的 *TaCYP78A5-2A*、*TaCYP78A5-2B* 和 *TaCYP78A5-2D* 序列之间显示出 98.17% 的高度相似性。*TaCYP78A5-2A*、*TaCYP78A5-2B* 和 *TaCYP78A5-2D* 的编码区长度分别为 1 608、1 638 和 1 650 bp,编码 534、544、549 个氨基酸(图 2-B)。

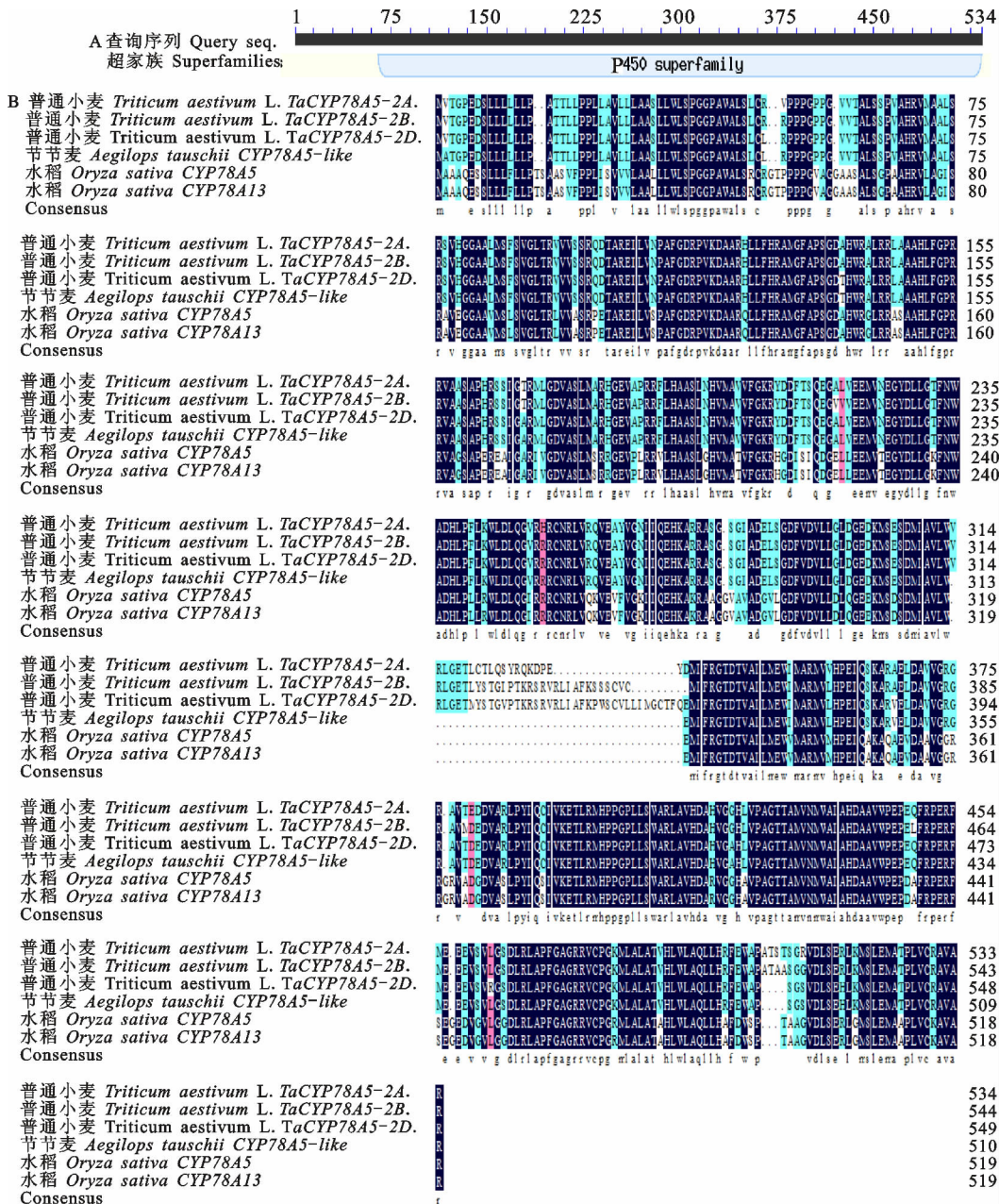
2.3 TaCYP78A5 的蛋白结构预测

利用 Protparam 网站进行 TaCYP78A5 蛋白

质 3 个染色体组上序列一级序列理化性质预测如表 2,结果显示蛋白不稳定系数大于 40,亲水性均为正值,说明 TaCYP78A5 蛋白可能是不稳定的脂溶性疏水蛋白,且 3 条染色体上的结果相一致。利用 NPS@ 的 SOPMA 网站预测 TaCYP78A5 蛋白序列的二级结构,以 TaCYP78A5-2A 为例,如图 3-A 中的预测结果表明,α-螺旋比例最高,达到 49.63%左右;29.96%左右为无规则卷曲;伸展链的比例在 12.55%,β-转角最少,约占 7.87%。二级结构预测,该蛋白主要以 α-螺旋和无规卷曲为主,含少量 β-转角。TaCYP78A5-2B 和 TaCYP78A5-2D 的二级结构组成与 TaCYP78A5-2A 相似度很高,TaCYP78A5-2B 蛋白的 α-螺旋、无规则卷曲、伸展链、β-转角分别各占 47.79%、28.86%、14.15%、9.19%。TaCYP78A5-2D 蛋白的 α-螺旋、无规则卷曲、伸展链、β-转角分别各占 45.36%、29.87%、16.76%、8.01%。在 SWISS-MODEL 网页提交 TaCYP78A5 基因的氨基酸序列,在蛋白结构库中搜索比对模板,得到 4i8v.1.A 序列与 TaCYP78A5 氨基酸序列的第 48~544 个残基的一致性达 28%,且 4i8v.1.A 序列编码蛋白也是 P450 家族蛋白,具备同源建模的条件。从而得到本研究中 TaCYP78A5-2A 基

因所编码蛋白的三维结构模型如图 3-B, TaCYP78A5-2B 和 TaCYP78A5-2D 蛋白的三级结构组成与 TaCYP78A5-2A 相似度很高,都是由 α -螺旋和两个反向平行的 β -折叠及一对 β -转角组成。将 TaCYP78A5 编码的蛋白氨基酸序列输入 TMHMM 网址进行蛋白跨膜区结构分析,跨膜区预测结果分析表明该蛋白是膜锚定蛋白,具有

跨膜结构域,第 1~8 个氨基酸为膜内区域,第 9~31 个氨基酸为跨膜区域,其余的均为膜外区域。Pfam 的预测结果(图 3-C)也表明第 1~44 个氨基酸为信号肽区域,其余的为与数据库比对的 P450 家族的序列区域,由此推测 TaCYP78A5 是一种分泌蛋白。



A. TaCYP78A5 基因蛋白家族预测 Proteins prediction of TaCYP78A5;B. 不同植物中 CYP78A5 氨基酸序列比对,深蓝色区域为保守结构域 Alignment of amino acid sequence of CYP78A5 in different plants,the dark blue regions are conserved domain

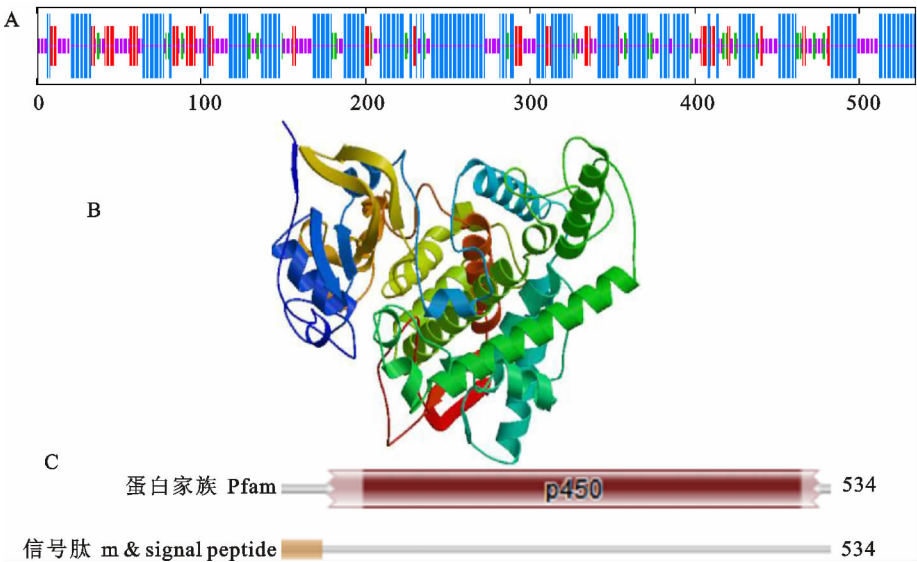
图 2 小麦 CYP78A5 蛋白家族预测及推测的氨基酸序列与其他植物的 CYP78A5 氨基酸序列比对

Fig. 2 Predicted of CYP78A5 protein,alignment of deduced amino acid sequences of CYP78A5 between wheat and other plants

表 2 *TaCYP78A5* 蛋白一级结构特点

Table 2 Primary structural features of *TaCYP78A5* protein

蛋白 Protein	氨基酸数量 Number of amino acids	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	亲水性 Hydropathicity
<i>TaCYP78A5</i> -2A	534	7.8	49.02	99.21	0.095
<i>TaCYP78A5</i> -2B	544	9.25	51.16	100.97	0.162
<i>TaCYP78A5</i> -2D	549	9.00	49.85	100.4	0.149



A. *TaCYP78A5*-2A 蛋白的二级结构,蓝色区域为 α -螺旋,紫色区域为无规卷曲,红色区域为伸展链,绿色区域为 β -转角 Secondary structure of *TaCYP78A5*-2A protein,blue area shows alpha helix,purple region as a random coil,the red area is extended strand,the green area is beta turn;B. *TaCYP78A5*-2A 蛋白的三级结构预测 Predicted tertiary structure of *TaCYP78A5* protein;C. *TaCYP78A5* 序列匹配和特征 *TaCYP78A5* sequence matches and features

图 3 *TaCYP78A5* 的蛋白结构预测

Fig. 3 Predicted structure of *TaCYP78A5* protein

2.4 *CYP78A* 基因进化分析

根据 *TaCYP78A5* 氨基酸序列与 NCBI 中的同源序列比对,发现 *TaCYP78A5* 序列与水稻及节节麦序列达到 85% 的一致性(图 2-B),其中 *TaCYP78A5*-2D 与节节麦的 *CYP78A5-like* (GenBank 登录号为 XM_020344923)蛋白有很高的一致性(93%),进一步构建 *TaCYP78A5* 和其他已知 *CYP78A* 家族成员的系统进化树(图 4),水稻 *CYP78A13* (GenBank 登录号为 AB780362.1)与水稻 *CYP78A5* (GenBank 登录号为 XM_015790749)基因聚于一个分支,显示出更高的一致性(100%)。且 *CYP78A* 家族的其他基因如 *CYP78A11* 在不同单子叶物种中的相似性都比较高,可以推测 *CYP78A* 家族在单子叶植物中的功能相对保守。而且 Xu 等^[14] 研究显示水稻 *CYP78A13* 基因能够在拟南芥中恢复 *cyp78a5* 的缺失表型,这表明 *CYP78A13* 和 *CYP78A5* 可能

是直系同源基因。因此,本研究克隆到的 *TaCYP78A5* 基因编码一个小麦细胞色素 P450 蛋白,并且可能是拟南芥 *CYP78A5* 的直系同源基因。

3 讨论

在 *CYP450* 家族中,*CYP78A* 与其他成员不同,它参与植物种子发育等植物特异反应^[9,12]。通过对一个新的 *CYP78A5* 基因突变体的表型观察,证明了 *CYP78A5* 基因参与多个生长发育调控途径,包括可能调控植物体的细胞增殖以及发育时期的转换等,而这些调控途径又通过 *CYP78A5* 这样的基因形成复杂的调控网络,从而保证植物的正常生长^[19]。*CYP78A5* 基因间接调控赤霉素合成代谢相关基因^[20],且不直接调控植物激素如生长素、细胞分裂素以及油菜素内酯等的代谢^[19]。

在模式植物拟南芥和水稻中的研究已经证明

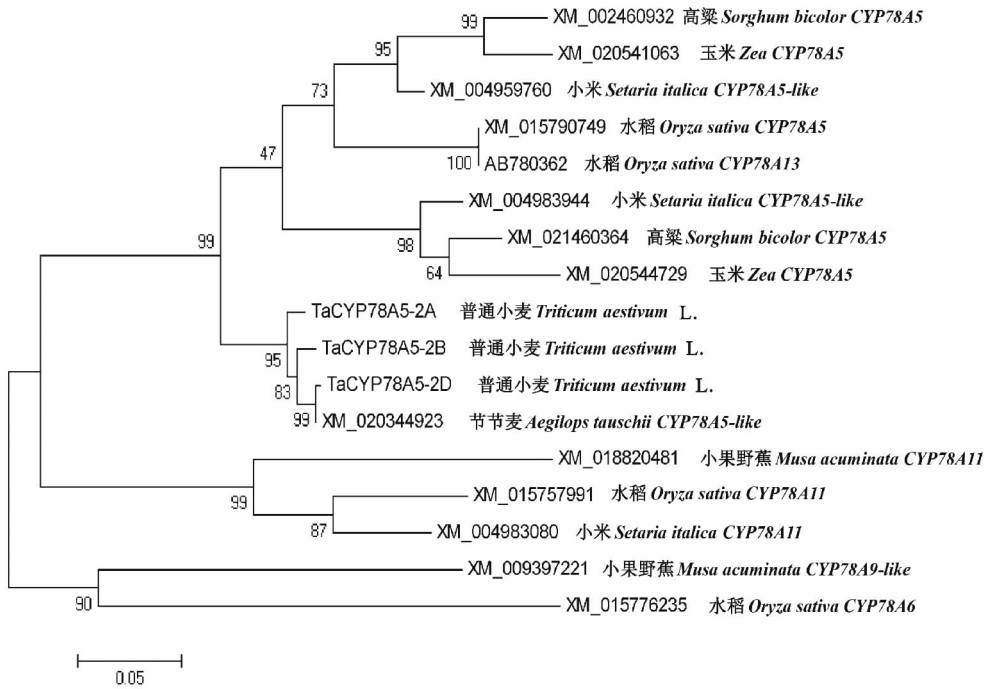


图 4 CYP78A 家族进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of CYP78A family

CYP78A 基因家族多个成员如 CYP78A5, CYP78A9 和 CYP78A13 等均具有控制种子大小的功能^[9,13-14]。在拟南芥中, Adamski 等^[9]发现了调控籽粒大小的 *KLUH/CYP78A5*, 籽粒中过表达 *KLU* 基因, 种子的体积和质量都会显著增加; 而当该基因功能缺失时, 种子的体积和质量又会显著降低; *KLU* 基因在花后的胚珠内表皮中表达, 通过促进内表皮细胞的增殖, 增大表皮细胞的数目, 从而达到增大种子表皮的效果, 进而增加种子的大小和质量。在水稻中, CYP78A9 和同源基因 CYP78A6、CYP78A8, 通过促进细胞增殖来调控花器官的生长及种子发育^[13,17]。编码 CYP78A13 的 *GE* 基因在平衡胚和胚乳大小方面有重要的影响, *GE* 基因功能缺失后, 胚变大而胚乳变小; 相反地, CYP78A13 蛋白过表达后, 胚变小而胚乳变大, 从而导致水稻种子增大^[12,14]。而水稻的 CYP78A13 基因能够在拟南芥中恢复 *cyp78a5* 的缺失表型, 这表明 CYP78A13 和 CYP78A5 可能是直系同源基因^[14]。

Miyoshi 等^[21]发现水稻 *PLA1/CYP78A11* 基因通过影响顶端分生组织的细胞增殖来调控生殖器官的发育, 但在顶端分生组织未检测到 CYP78A11 基因的表达, CYP78A11 基因可能通过非细胞自制模式控制生殖器官发育。Anastasiou 等^[22]仅在拟南芥叶、花器官基部检测到

CYP78A5 基因的表达, 其促生作用却贯穿整个植株; 并提出 CYP78A5 基因可能依赖于一个可以在细胞间移动的信号, 通过非细胞自制模式促进器官生长。相似的, Adamski 等^[9]发现, PINO: CYP78A5 转基因拟南芥植株中仅在胚珠中过表达 CYP78A5 基因, 却导致拟南芥花器官的增大、花序的伸长, 这一现象也支持 CYP78A5 基因非细胞自制的作用模式。

本研究克隆的 TaCYP78A5 与其他 CYP78A 家族成员一样均由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 并与水稻中 CYP78A5 具有很高的相似性。因此, 我们可以推测 CYP78A5 的同源基因 TaCYP78A5 在小麦中也可能具有在水稻、拟南芥中类似的功能, 通过促进胚珠和种子发育阶段表皮细胞增殖来影响种子大小。本研究通过对核酸序列和编码的氨基酸序列比对分析发现‘P271’和‘中国春’克隆到的 TaCYP78A5 基因序列一致, 说明 TaCYP78A5 基因在这 2 个粒型的小麦中相对保守。推测 TaCYP78A5 基因对这 2 种粒型的小麦的作用可能是通过在小麦‘P271’的根、茎、叶各组织或籽粒发育过程中基因表达量较高引起的, 也可能是 TaCYP78A5 基因的启动子在 2 个材料中的差异所引起。关于 TaCYP78A5 基因在小麦中的具体的分子作用机制还需进一步证明。

参考文献 Reference:

- [1] 庄巧生. 中国小麦品种改良及系谱分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 497-518.
ZHUANG Q SH. Analysis of Chinese Wheat Improvement and Pedigree [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 497-518.
- [2] CAMPBELL K G, BERGMAN C J, GUALBERTO D G, *et al.* Quantitative trait loci associated with kernel traits in a soft× hard wheat cross[J]. *Crop Science*, 1999, 39(4): 1275-1285.
- [3] KUMAR N, KULWAL P L, GAUR A, *et al.* QTL analysis for grain mass in common wheat [J]. *Euphytica*, 2006, 151(2): 135-144.
- [4] 王瑞霞, 张秀英, 伍玲, 等. 不同生态环境下冬小麦籽粒大小相关性状的 QTL 分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 398-407.
WANG R X, ZHANG X Y, WU L, *et al.* QTL Analysis of grain size and related traits in winter wheat under different ecological environments [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(2): 398-407.
- [5] SONG X J, HUANG W, SHI M, *et al.* A QTL for rice grain width and mass encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(5): 623-630.
- [6] 常成, 张海萍, 张秀英, 等. 小麦 *PEBP-like* 基因等位变异与籽粒大小, 粒重关系研究[J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 23-27.
CHANG CH, ZHANG H P, ZHANG X Y, *et al.* Study on relationship between allelic variation in *PEBP-like* gene and grain size and mass in common wheat [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(1): 23-27.
- [7] WANG S, ZHANG X, CHEN F, *et al.* A single-nucleotide polymorphism of *TaGS5* gene revealed its association with kernel mass in Chinese bread wheat [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6(1166): 1166.
- [8] NELSON D R, SCHULER M A, PAQUETTE S M, *et al.* Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudo genes from a monocot and a dicot [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 756-772.
- [9] ADAMSKI N M, LENHARD M, ERIKSSON S, *et al.* Local maternal control of seed size by *KLUH/CYP78A5*-dependent growth signaling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(47): 20115-20120.
- [10] ITO T, MEYEROWITZ E M. Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, *CYP78A9*, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1541-1550.
- [11] WANG J W, SCHWAB R, CZECH B, *et al.* Dual effects of miR156-targeted SPL genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(5): 1231-1243.
- [12] NAGASAWA N, HIBARA K I, HEPPARD E P, *et al.* GIANT EMBRYO encodes *CYP78A13*, required for proper size balance between embryo and endosperm in rice [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2013, 75(4): 592-605.
- [13] SOTELO-SILVEIRA M, CUCINOTTA M, CHAUVIN A L, *et al.* Cytochrome P450 *CYP78A9* is involved in *Arabidopsis* reproductive development [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 779-799.
- [14] XU F, FANG J, OU S, *et al.* Variations in *CYP78A13* coding region influence grain size and yield in rice [J]. *Plant Cell & Environment*, 2015, 38(4): 800-811.
- [15] MONFORTE A J, DIAZ A, CANO-DELGADO A, *et al.* The genetic basis of fruit morphology in horticultural crops: lessons from tomato and melon [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(16): 4625-4637.
- [16] VAN D K E, CHAKRABARTI M, CHU Y H, *et al.* What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit mass and shape [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5(5): 227.
- [17] FANG W J, WANG Z B, CUI R F, *et al.* Maternal control of seed size by *EOD3/CYP78A6* in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2012, 70(6): 929-939.
- [18] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular mass plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [19] 柴燕群, 罗达, 杨军. 细胞色素 P450 基因 *CYP78A5/KLUH* 控制拟南芥叶发育的时期转换[J]. 植物生理学报, 2012, 48(6): 605-610.
CHAI Y Q, LUO D, YANG J. Cytochrome P450 *CYP78A5/KLUH* participates in regulating phase transition of leaf development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(6): 605-610.
- [20] NEMHAUSER J L, HONG F, CHORY J. Different plant hormones regulate similar processes through largely non-overlapping transcriptional responses [J]. *Cell*, 2006, 126(3): 467-475.
- [21] MIYOSHI K, AHN B O, KAWAKATSU T, *et al.* PLASTOCHRON1, A timekeeper of leaf initiation in rice, encodes cytochrome P450 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(3): 875-880.
- [22] ANASTASIOU E, LENHARD M. Growing up to one's standard [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(1): 63-69.

Cloning and Bioinformatics Analysis of *TaCYP78A5* Gene in Wheat

ZHENG Yayue¹, YANG Lu¹, ZHANG Binghui¹, ZHAO Wanchun^{1,2},
DONG Jian^{1,2}, GAO Xiang^{1,2} and LI Xiaoyan^{1,2}

(1. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Wheat Engineering Research Center of Shaanxi Province/New Varieties Cultivation of
Wheat Engineering Research Centre of Shaanxi Province, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Cytochrome P450 (Cytochromes P450) family contains sulfhydryl group, and heme structure domains have been proved to participate in a variety of biosynthesis. CYP78A family members were found to play an important role in controlling grain size. In this study, *TaCYP78A5-2A*, *TaCYP78A5-2B* and *TaCYP78A5-2D* genes which had encoding 534, 544, 549 amino acids respectively, were cloned from wheat of large grain line ‘P271’ and small grain material ‘Chinese Spring’ and located on 2AS, 2BS and 2DS. There was no variation of *TaCYP78A5* genes between ‘P271’ and ‘Chinese Spring’, so this indicated that *TaCYP78A5* gene was conserved in the two different grain sizes of wheat varieties. CYP78A family was found as non-cell autonomous manner in rice and *Arabidopsis thaliana* seed development. Combined with the biological evolution of the CYP78A family, we found that the CYP78A families of genes were conserved among monocotyledons. The difference of grain size between ‘P271’ and ‘Chinese Spring’ wheat is higher than that in ‘Chinese Spring’ due to the gene expression level of *TaCYP78A5* in ‘P271’, and it caused the proliferation of inner epidermal cells during seed development, thereby the increasing seed epidermis could increase the size and mass of the ‘P271’ seeds.

Key words Wheat; *TaCYP78A5*; Clone; Bioinformatics analysis

Received 2017-11-29

Returned 2017-12-15

Foundation item China Postdoctoral Science Foundation(No. 2017M613223); Shaanxi Province Postdoctoral Science Foundation(No. 2016BSHYDZZ43); Project of Shaanxi Province Science and Technology(No. 2017NY-009).

First author ZHENG Yayue, female, master student. Research area: genetics and breeding in wheat. E-mail: 2276574199@qq.com

Corresponding author GAO Xiang, male, Ph. D, professor, doctoral supervisor. Research area: wheat quality improvement and breeding. E-mail: gx@nwsuaf.edu.cn

LI Xiaoyan, female, Ph. D, associate professor, master supervisor. Research area: wheat genetics and breeding. E-mail: xiaoyanli@nwsuaf.edu.cn

(责任编辑: 成 敏 Responsible editor: CHENG Min)