

外源种质导入引发小麦表观遗传变异的 MSAP 分析

张勇 刘朝辉 刘成 杨足君 邓科君 彭金华 周建平 李光蓉
唐宗祥 任正隆*

(电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054; 四川农业大学农学院植物遗传育种省级重点实验室, 雅安 625014.

*联系人, E-mail: renzl@uestc.edu.cn)

摘要 通过染色体工程将外源种质向小麦基因组转移的过程中, 可以诱发受体物种基因组结构及基因表达的广泛遗传变异. 本文以 3 个高代分离的小麦-黑麦姊妹易位系及其农艺亲本为材料, 应用 GISH 和 AFLP 技术分析其基因组结构与组成, 发现姊妹系材料基因组组成高度一致; 同其亲本相比较, 除 1RS/1BL 染色体易位外, 并没有表现出其他明显的基因组结构变异. 进一步的 MSAP 分析发现, 易位系材料发生全甲基化修饰的比例比小麦亲本(全甲基化, 16.37%; 半甲基化, 25.44%)明显上升(CN12, 20.15%; CN17, 20.91%; CN18, 22.42%), 而半甲基化比例则明显下降(CN12, 21.41%; CN17, 23.43%; CN18, 22.42%). 本研究共检测到 29 种不同类型的甲基化修饰模式, 其中 13 种类型(33.74%)的位点表现为超甲基化修饰, 9 种类型(22.76%)的位点表现为去甲基化修饰, 而余下 7 种类型(4.07%)的位点甲基化模式变异未能明确界定. 从中分离了多条存在甲基化位点变异的 DNA 序列, 鉴定了多种小麦转座子序列、亚端粒重复序列以及单拷贝蛋白质编码序列.

关键词 小麦 黑麦 易位系 表观遗传 DNA 甲基化 MSAP

表观遗传(epigenetic inheritance)是指在 DNA 序列没有发生变异的情况下基因表达的可遗传变异, 这种变异又可随细胞的有丝分裂和(或)减数分裂遗传下去的现象^[1,2]. 高等植物基因组中约有 20%~50% 左右的胞嘧啶残基发生甲基化, 其中约 90% 的甲基化位于“C_pG”二核苷酸或“C_pN_pG”三核苷酸中^[3-5]. 生命活动中 DNA 甲基化现象涉及生命科学的基础研究和应用领域, 与基因表达调控、胚胎发育、细胞分化、基因组印迹、性染色体失活及细胞记忆等诸多生物学过程密切相关^[1,4-6], 是当今生物科学研究领域的热点. 通过对拟南芥^[3]、棉花^[7]、大米草^[8]、水稻^[9,10]等物种间远缘杂交的研究表明, 外源物种 DNA 的导入可诱发受体物种基因组 DNA 甲基化程度及模式发生显著改变, 进而引起杂交后代转录组发生有别于亲本的广泛变异, 并且这种 DNA 甲基化与基因组转录模式的协同变异可以通过有性及无性方式在子代中进行传递, 从而表现不同的表型性状^[4,8,9,11].

在小麦遗传改良中, 通过诱导染色体易位的途径, 我们已将多种小麦近缘种属的优异种质导入小麦基因组中, 创制了一大批小麦新种质, 其中一些材

料表现了亲本并不具有的新性状^[12-14]. 进一步的研究表明, 仅用渗入到小麦基因组中的异源种质产生的遗传效应来解释这些材料优异性状的产生似乎是远远不够的^[12,13], 我们认为应用表观遗传学研究方法有可能为阐释这种新性状产生的遗传变异机制提供新的研究思路. 本文以一套高代分离的小麦-黑麦 1RS/1BL 姊妹易位系及其亲本材料为研究对象, 在分析小麦基因组背景中黑麦种质遗传稳定性的基础上, 应用“甲基化敏感的扩增多态性”(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术^[15], 对酶切位点的甲基化模式进行分析, 检测姊妹易位系及亲本材料间的甲基化多态性, 揭示外源物种染色体导入受体小麦基因组后引起 DNA 甲基化变异的分布规律及存在特性, 为进一步的基础研究和育种应用提供理论依据.

1 材料与方法

() 材料. 本研究所用小麦-黑麦易位系川农 12 (CN12, 2002 年四川省审定)、川农 17 (CN17, 国审麦 2003024)、川农 18 (CN18, 2004 年四川省审定)携

2007-06-17 收稿, 2007-11-22 接受

国家自然科学基金(批准号: 30671136, 30730065)、国家博士后科学基金(批准号: 20070411158)、教育部新世纪优秀人才支持计划(批准号: NCET-06-0810)及电子科技大学青年基金重点项目(批准号: L08010901JX0677)资助

带有1RS/1BL染色体, 小麦MY11 (*Triticum aestivum*)及黑麦自交系L155 (*Secale cereale*)是其农艺亲本^[12,16]. 所有材料保存于四川农业大学植物遗传育种省级重点实验室.

() DNA提取. 种子经70%乙醇浸种消毒, 置于垫有湿溶滤纸的培养皿中, 在(25 ± 0.5) 光照培养箱中培养, 10 d后取0.5 g幼叶用于DNA提取, 提取方法参考Murray和Thompson的方法^[17]. DNA纯度和浓度用0.8%琼脂糖凝胶和BioSpec-mini分光光度仪(Shimadzu, Japan)检测.

() 根尖细胞中期分裂相制片. 根尖细胞染色体制片参照Ren^[12]的方法, 并略有改动. 将种子置于发根板中, (22 ± 0.5) 培养至根长1.5~2 cm时, 切取根尖冰水处理24 h, 卡洛氏固定液固定30 min后, 0.2 mol/L盐酸解离并以醋酸压片, 液氮脱盖片, 自然干燥2~3 d后用于原位杂交.

() 黑麦种质GISH分析. 采用DIG-Nick Translation Mix试剂盒(Roche, Germany)标记黑麦基因组DNA为探针, 并以小麦基因组DNA为封阻(1:50), 在小麦-黑麦易位系根尖染色体中期分裂相制片上进行原位杂交. 杂交过程、信号检测及结果处理按Zhang等人^[18]的报道进行.

() 易位系及亲本材料携带1RS, 1BS染色体分子鉴定. 参照Froidmont^[19]及Chai等人^[20]的方法, 分

别以O11B3/O11B5 及ω-sec-P1/ω-sec-P2 引物组合扩增位于小麦1B染色体短臂的*Glu-B3*及黑麦1RS染色体短臂的ω-secalin位点, 进行1RS/1BL易位系分子鉴定.

() AFLP分析. AFLP分析按Vos等人^[21]的方法进行, 但稍作修改: 15 μL酶切体系加入5 U *EcoR*, 5 U *Mse* (Fermentas, Lithuanian), 500 ng基因组DNA, 37 酶切过夜; 20 μL连接体系加入5 U *T₄*-DNA连接酶(TaKaRa, Japan)、3 pmol/L *EcoR* 接头和30 pmol/L *Mse* 接头, 16 连接过夜; 20 μL选择性扩增体系加入0.5 U *Taq* DNA聚合酶(TaKaRa, Japan), *EcoR*, *Mse* 选扩引物各30 ng, 于Cycler (Bio-RAD, America)进行扩增(接头、引物序列见表1). 扩增产物于6%变性聚丙烯酰胺凝胶、80 W衡功率电泳分离, 按Bassam等人^[22]的方法银染显带.

() MSAP分析. MSAP分析流程基本参照本文中修改的AFLP方法^[21]进行, 其中分别用*EcoR* +*Hpa*, *EcoR* +*Msp* (Fermentas, Lithuanian)内切酶组合对基因组DNA进行酶切. *EcoR* 接头及引物序列以Vos等人^[18]的序列为参照, *Hpa* (*Msp*)接头及引物序列以Xiong等人^[23]的序列为参照, 详见表1. 所有接头及引物序列均由Invitrogen公司(America)合成.

() 差异片段的回收、克隆和测序. 针对不同

表1 AFLP和MSAP分析的接头和引物序列^{a)}

接头		
	<i>EcoR</i> I -adaptors-F	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	<i>EcoR</i> I -adaptors-R	5'-AATTGGTACGCACTC-3'
	<i>Mse</i> I -adaptors-F	5'-GACGATGAGTCTGAG-3'
	<i>Mse</i> I -adaptors-R	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -adaptors-F	5'-GATCATGAGTCTGCT-3'
	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -adaptors-R	5'-CGAGCAGGACTCATGA-3'
预扩引物		
	<i>EcoR</i> I -A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
	<i>Mse</i> I -C	5'-GACGATGAGTCTGAGTAAAC-3'
	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -T	5'-ATCATGAGTCTGCTCGGT-3'
AFLP 选扩引物组合		
	<i>EcoR</i> I -AAC+ <i>Mse</i> I -CAG	<i>EcoR</i> I -ACT+ <i>Mse</i> I -CTA
	<i>EcoR</i> I -AGG+ <i>Mse</i> I -CTT	<i>EcoR</i> I -AAC+ <i>Mse</i> I -CTA
	<i>EcoR</i> I -ACA+ <i>Mse</i> I -CTG	<i>EcoR</i> I -AAG+ <i>Mse</i> I -CTG
	<i>EcoR</i> I -ACG+ <i>Mse</i> I -CGT	<i>EcoR</i> I -ACG+ <i>Mse</i> I -CAA
MSAP 选扩引物组合		
	<i>EcoR</i> I -ACA+ <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -TCA	<i>EcoR</i> I -ACA+ <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -TTC
	<i>EcoR</i> I -ACC+ <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -TGC	<i>EcoR</i> I -ACC+ <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -TTC
	<i>EcoR</i> I -ACG+ <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -TCCA	<i>EcoR</i> I -AAG+ <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -TCGA
	<i>EcoR</i> I -ACA+ <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -TCGA	<i>EcoR</i> I -ACT+ <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -TCGA

a) 黑体表示不同的选择性碱基, 即不同的引物除此位置的碱基不同外, 其余的均相同

易位系材料中甲基化位点差异表现的 MSAP 位点, 用刀片将差异片段挖下, 加 100 μ L 灭菌双蒸水, 沸水浴 5 min, 然后冷却. 取 2 μ L 上清液为扩增模板, 以相应的选扩引物组合及扩增条件进行 PCR 扩增. PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上检测, 以 PCR 纯化试剂盒进行回收 (Sangon, China). 回收产物接入 pMD18-T 载体 (TaKaRa, Japan), 转化大肠杆菌感受态细胞, 挑选阳性单克隆. 序列测定委托上海生工公司进行 (Sangon, China), 序列信息登录 GenBank Database 注册.

2 结果与分析

2.1 黑麦种质在小麦遗传背景中的存在及影响

通过外源染色体的“单体附加-破碎-整合”过程, 我们创制了大量小麦新种质, 其中一些易位系材料表现了其小麦及外源物种亲本均不具有的新性状, 如大穗多粒、株型优异、花后持绿、抗病性强等(图 1(a)和(b)). 通过比较位于 1R 和 1B 染色体短臂上特异分子标记的 PCR 扩增结果, 可以明确得知 CN12, CN17 和 CN18 三个易位系材料携带 1RS 染色体(图 1(c)). 用黑麦基因组 DNA 作探针、小麦基因组 DNA 作封阻, 对 CN12, CN17 和 CN18 根尖细胞染色体中期分裂相制片进行原位杂交. 如图 1(d)所示, 分裂相中的两条带随体的染色体短臂出现明显的黄色杂交信号, 信号均匀分布, 未见背景干扰, 可以确定这两条染色体短臂为黑麦染色体 1R 的短臂(1RS). 综合分子生物学及细胞生物学的实验证据, 可知 CN12, CN17 和 CN18 为含 1RS/1BL 染色体的小麦-黑麦易位系材料.

2.2 小麦-黑麦易位系基因组结构分析

参考 Vos 等人 [21] 发表的引物组合, 从中随机选用 10 对 AFLP 引物组合, 对小麦-黑麦姊妹易位系材料及其亲本进行基因组扫描, 进行多态性验证. 8 对引物组合均产生了清晰可辨的 AFLP 指纹图谱(图 2), 共扩增得到 367 条带. 在这些扩增位点中, 除黑麦亲本(L155)出现大量特异扩增条带外, 携带 1RS/1BL 易位染色体的姊妹材料(CN12, CN17, CN18)间扩增条带一致, 并未检测出有别于亲本的扩增位点(图 2). 实验结果表明, 在所检测的小麦-黑麦易位系中, 外源种质的导入并没有引发小麦基因组 DNA 一级结构上的明显变异.

2.3 小麦-黑麦易位系基因组 DNA 甲基化水平分析

同裂酶 *Hpa* 和 *Msp* 的酶切位点均为“CCGG/GGCC”, 但二者对酶切位点 DNA 序列的甲基化敏感程度却有不同: *Hpa* 能识别并切割非甲基化和半甲基化位点(双链 DNA 中只有一条链的外侧胞嘧啶发生甲基化, 即^{5m}CCGG/GGCC), 而不能切割全甲基化位点(双链 DNA 中两条链的内侧胞嘧啶均发生甲基化, 即^{5m}CGG/GG^{5m}CC); *Msp* 能识别并切割非甲基化和全甲基化位点而不能切割半甲基化位点 [15]. 因而当以此同裂酶分别与 *EcoR* 组合进行 AFLP 反应时, 每一个扩增位点均代表一个 (CCGG/GGCC) 位点, 而对比 *Hpa* 与 *Msp* 不同的扩增模式就可反映出该位点的甲基化状态及程度(图 3), 细分为: A 型, 都有带 (*Hpa* +/*Msp* +), 代表非甲基化位点(或单链内甲基化); B 型, *Hpa* 无带、*Msp* 有带 (*Hpa* -/*Msp* +), 代表全甲基化位点; C 型, *Hpa* 有带、*Msp* 无带 (*Hpa* +/*Msp* -), 代表半甲基化位点.

图 1 小麦-黑麦易位系与亲本材料相比较表现的新性状及黑麦种质在小麦遗传背景中的存在形式
(a) 易位系材料表现花后持绿; (b) 易位系材料表现高抗条锈病; (c) 易位系及亲本材料携带 1RS 或 1BS 染色体分子鉴定结果;
(d)-(f) CN12, CN17, CN18 的 GISH 结果, 箭头所示为黑麦 1RS 易位染色体杂交信号

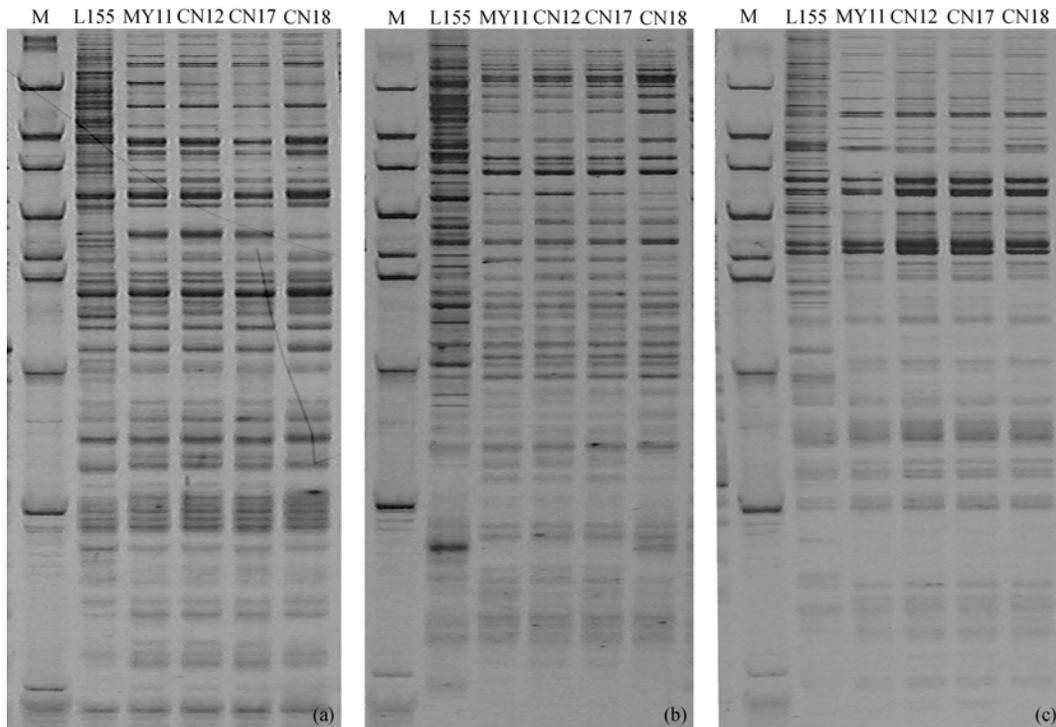


图2 小麦-黑麦易位系及亲本材料基因组 DNA 的 AFLP 选择性扩增结果
(a)~(c) 3 组不同的 AFLP 引物组合选扩结果

EcoR 选扩引物分别与 *Hpa* 及 *Msp* 选扩引物配对, 组成用于小麦 MSAP 分析的 8 对引物组合, 在小麦-黑麦易位系及其亲本材料中共扩增产生 397 条清晰可辨且可重复的 DNA 条带, 平均每对引物扩增获得 49.63 条带. 其中, 在黑麦亲本(L155)、小麦亲本(MY11)以及 3 个易位系材料(CN12, CN17, CN18) 中分别检测到 128, 166, 165, 176, 178 个甲基化位点, 甲基化比例依次为 32.25%, 41.81%, 41.56%, 44.33%, 44.83%(表 2). 由此可知, 黑麦与小麦亲本在基因组 DNA 甲基化水平上存在较大差异, 而相对于小麦亲本而言, 不同易位系材料间, 基因组 DNA 甲基化位点的绝对数量以及相对数量都有不同程度的改变. 进一步分析发现, 在 MY11, CN12, CN17, CN18 中检测到的全甲基化位点数分别为 65, 80, 83, 89, 全甲基化比例依次为 16.37%, 20.15%, 20.91%, 22.42%, 而半甲基化位点数分别为 101, 85, 93, 89, 半甲基化比例依次为 25.44%, 21.41%, 23.43%, 22.42%. 从中可见, 易位系材料基因组中全甲基化位点较其小麦亲本明显增加, 而半甲基化位点较其小麦亲本明显减少. 数据分析表明, 存在于小麦遗传背景中的外源种质引起了受体基因组中不同形式 DNA 甲基化水平的明显变化.

2.4 小麦-黑麦易位系基因组 DNA 甲基化模式变异分析

通过比较易位系与小麦亲本材料间不同的 MSAP 扩增指纹图谱, 我们将从二者基因组中检测到的 DNA 甲基化位点模式归结为两类: () 单态性甲基化位点, 即同一“CCGG/GGCC”位点的甲基化模式在小麦亲本及不同易位系材料间表现一致; () 多态性甲基化位点, 即同一“CCGG/GGCC”位点的甲基化模式在小麦亲本及不同易位系材料间表现相异(图 3). 经统计, 在小麦易位系材料中存在 96 个单态性甲基化位点, 占所检测甲基化位点数的 39.02%, 其中全甲基化位点 43 个(M1)、半甲基化位点 53 个(M2), 而其余的 150 个甲基化位点表现为多态性, 占所检测甲基化位点数的 60.98%(表 3).

依据“CCGG/GGCC”位点甲基化程度的变异程度, 可将表现多态性模式的甲基化位点进一步细分 3 类: () 超甲基化位点(PH), 即该位点胞嘧啶甲基化程度较小麦亲本加强; () 去甲基化位点(PD), 即该位点胞嘧啶甲基化程度较小麦亲本减弱; () 不确定位点(PU), 即该位点胞嘧啶甲基化程度较小麦亲本的变异情况不能进行准确定性. 其中, 检测到 PH, PD 以及 PU 位点数分别为 83, 56, 10, 占总体甲基化

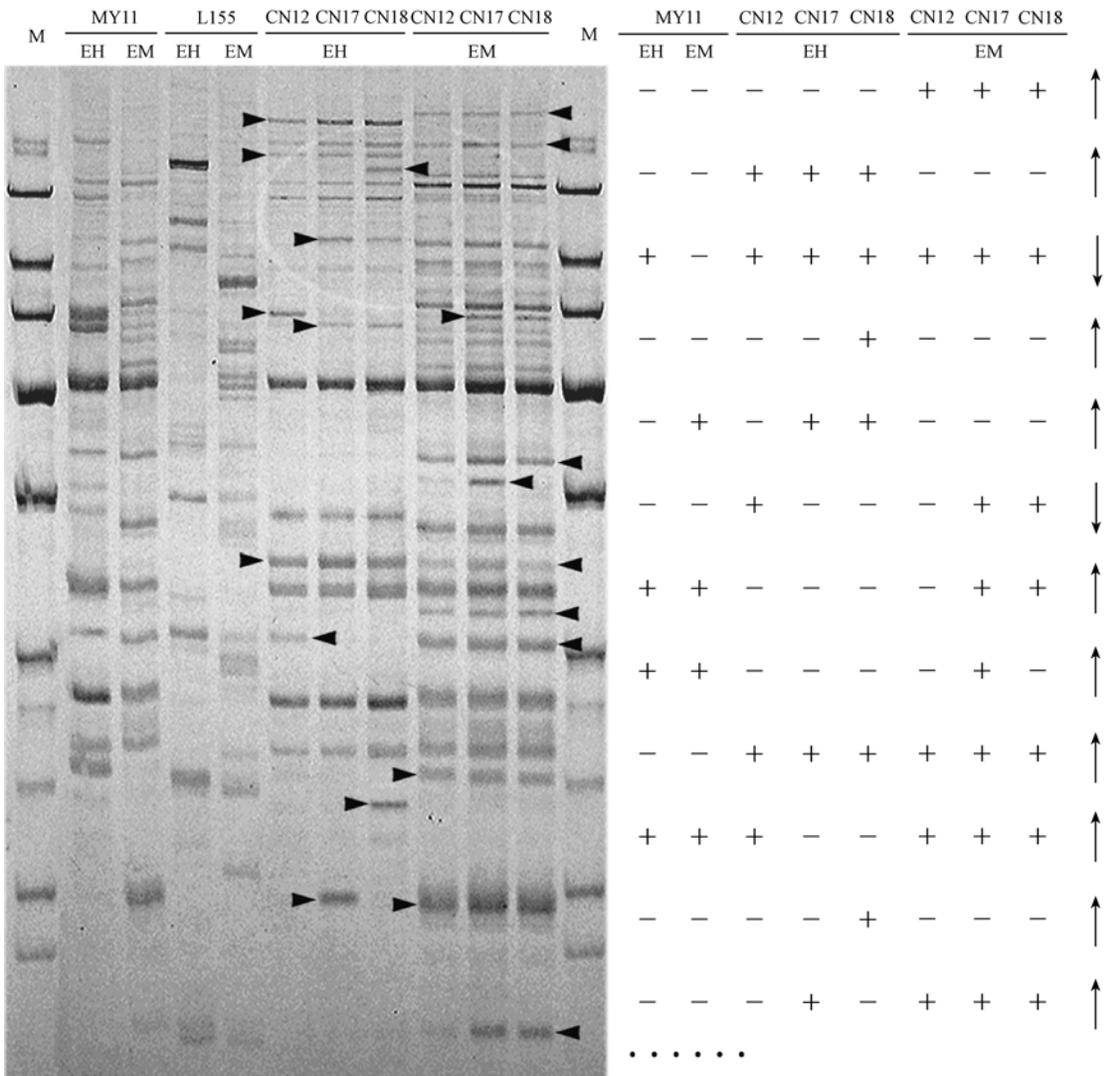


图 3 小麦-黑麦易位系及亲本材料基因组 DNA 的 MSAP 选择性扩增结果及甲基化位点变异模式图
EH, *EcoR* + *Hpa* II; EM, *EcoR* + *Msp*; -, 无带; +, 有带; ↑, 甲基化水平上升; ↓, 甲基化水平下降

表 2 8 对 MSAP 引物组合在小麦-黑麦易位系及亲本材料中的检测结果

引物组合	扩增位点	L155		MY11		CN12		CN17		CN18	
		甲基化位点		甲基化位点		甲基化位点		甲基化位点		甲基化位点	
		全	半	全	半	全	半	全	半	全	半
E-ACA+H/M-TCA	43	8	6	10	6	13	5	13	5	15	5
E-ACA+H/M-TTC	57	7	2	9	11	9	12	9	13	9	13
E-ACC+H/M-TGC	52	5	16	8	23	11	16	11	15	12	15
E-ACC+H/M-TTC	62	9	15	7	16	8	16	7	16	9	13
E-ACG+H/M-TCCA	38	5	10	6	8	9	6	9	6	9	6
E-AAG+H/M-TCGA	46	8	5	10	17	8	13	8	14	8	13
E-ACA+H/M-TCGA	39	11	2	5	10	5	10	6	16	8	15
E-ACC+H/M-TCGA	60	10	9	10	10	17	7	20	8	19	9
总计	397	128		166		165		176		178	
甲基化位点比例(%)		15.87	16.37	16.37	25.44	20.15	21.41	20.91	23.43	22.42	22.42
		32.25		41.81		41.56		44.33		44.83	

表3 小麦-黑麦易位系及亲本材料中DNA甲基化位点模式变异分析^{a)}

甲基化模式		MY11		CN12		CN17		CN18		位点数目	合计(%)
		EH	EM	EH	EM	EH	EM	EH	EM		
单态性位点	M1	-	+	-	+	-	+	-	+	43	96(39.02)
	M2	+	-	+	-	+	-	+	-	53	
超甲基化位点	PH1	+	+	-	+	-	+	-	+	18	83(33.74)
	PH2	+	+	+	-	+	-	+	-	5	
	PH3	+	+	+	+	+	+	+	-	1	
	PH4	+	+	+	+	-	+	-	+	1	
	PH5	+	+	+	+	+	-	+	-	1	
	PH6	-	-	-	+	-	+	-	+	21	
	PH7	-	-	+	-	+	-	+	-	20	
	PH8	-	-	-	-	+	-	+	-	8	
	PH9	-	-	+	-	+	-	+	+	3	
	PH10	-	-	-	-	-	-	-	+	2	
	PH11	-	-	-	+	-	+	+	+	1	
	PH12	-	-	-	-	+	-	-	-	1	
	PH13	-	-	+	-	-	-	-	-	1	
多态性位点	PD1	+	-	+	+	+	+	+	+	17	56(22.76)
	PD2	+	-	-	-	-	-	-	-	14	
	PD3	+	-	+	-	+	-	+	+	2	
	PD4	+	-	+	-	+	-	+	+	2	
	PD5	+	-	+	+	+	+	+	-	1	
	PD6	+	-	+	+	+	+	+	+	1	
	PD7	-	-	+	+	+	+	+	+	10	
	PD8	-	+	+	+	+	+	+	+	8	
	PD9	-	+	+	-	+	-	+	-	1	
不确定位点	PU1	+	-	-	-	-	-	-	-	2	10(4.07%)
	PU2	+	-	+	-	-	-	+	+	1	
	PU3	+	-	+	+	+	+	-	+	1	
	PU4	+	-	-	-	+	-	-	-	1	
	PU5	-	+	-	-	-	-	-	-	3	
	PU6	-	-	-	-	-	-	-	+	1	
	PU7	-	-	+	+	-	+	-	+	1	

a) EH, *EcoR* + *Hpa* ; EM, *EcoR* + *Msp* ; -, 无带; +, 有带; M, 单态位点(monomorphic sites); PH, 多态超甲基化位点(polymorphic hypermethylation sites); PD, 多态去甲基化位点(polymorphic demethylation sites); PU, 多态不确定位点(polymorphic uncertain sites)

位点的 33.74%, 22.76%, 4.07%。在超甲基化多态性位点中又存在 13 种不同类型(PH1~PH13), 其中包括 8 类在小麦亲本中检测不到的易位系特异甲基化位点变异模式(PH6~PH13)。同样, 去甲基化多态性位点中也存在 9 种不同的类型(PD1~PD9), 其中仅有 1 类易位系特异甲基化位点变异模式(PD7)。在确定的多态性甲基化位点中, 有 12 种类型(PH1, PH2, PH6, PH, PD1, PD2, PD6~PD9, PU1, PU5)、共 120 个甲基化位点模式在 CN12, CN17, CN18 间是相同的, 而与小麦亲本-MY11 相异, 占总体甲基化位点的 48.78%。其余 17 种甲基化多态性模式, 共 30 个位点在不同易位系材料间表现相异的甲基化模式, 约占总体甲基化位点的 12.20%。

2.5 小麦-黑麦易位系基因组 DNA 甲基化变异位点分析

对 20 个小麦-黑麦易位系材料多态性甲基化位点进行回收、克隆, 最终成功分离了 15 条存在甲基化位

点变异的 DNA 序列(EF453755~EF453757, EF469547~EF469553, EF486285~EF486305)。经测序分析, 15 条序列中一端具有“CCGG/GGCC”位点(*Hpa* , *Msp* 识别位点), 另一端为“GAATTC/CTTAAG”(EcoR 识别位点)。通过进一步的序列比对分析, 从中鉴定了小麦转座子重复序列(EF453755, EF453756, EF469547, EF469548, EF469553, EF486287- EF486291, EF486296, EF486298, EF486301, EF486302)、亚端粒重复序列(EF469549, EF486300)、高分子量谷蛋白亚基(EF-469550)、核糖体蛋白亚基(EF469552, EF486305)等同源序列。

3 讨论

3.1 小麦-黑麦易位系中外源种质对小麦基因组结构的影响

随着小麦远缘杂交研究的深入, 大量小麦族(Triticeae)种质资源中蕴藏的有益基因已成功导入小麦遗传背景中, 其中很大一部分是来自黑麦的。通过

诱导染色体易位的途径,我们将黑麦种质导入小麦基因组中,创制了大量小麦新种质^[12-14]。这种通过有性杂交的形式将外源种质引入小麦基因组中的过程,可以诱发受体物种基因组结构及基因表达的广泛遗传变异。Shaked等人^[24]在研究小麦族植物属间杂交现象时发现,在属间及种间杂交后代中都表现了异于亲本的新性状,同时在他们的基因组中检测到强度不等的相对于亲本的遗传位点缺失及增加。随后的研究在拟南芥属(*Arabidopsis*)^[3]及大米草属(*Spartina*)^[8]的种间杂交以及小麦(*T. aestivum*)与山羊草(*A. tauschii*)^[25]、黑麦(*S. cersale*)^[26]的属间杂交中都表明,杂交后代从表型性状到基因表达直至基因组结构都展现了异于亲本的遗传变异。在我们的研究中,同样发现一些小麦材料表现了亲本均不具有的新性状^[12-14],如大穗多粒、株型优异、花后持绿、抗病性强等(图 1(a)和(b))。细胞学研究表明,黑麦种质在小麦遗传背景中以易位染色体的形式存在(图 1(c)和(d)),并且能稳定遗传^[12-14,16]。应用 AFLP 技术对部分代表性研究材料的基因组结构与组成进行了分析,发现高代分离姊妹系(CN12, CN17, CN18)间的基因组组成高度一致(图 2)。同其亲本相较,除 1RS/1BL 染色体易位外,并没有表现出其他明显的基因组结构变异(图 2),说明在所检测的小麦-黑麦易位系中,外源种质的导入并没有引发小麦基因组 DNA 一级结构上的明显变异。

3.2 小麦-黑麦易位系及亲本间 DNA 甲基化水平及模式的遗传变异

最近的研究表明,物种间的远缘杂交伴随着相当的表现遗传变异现象发生,其中包括大量的 DNA 胞嘧啶甲基化变异,它关闭和启动某些基因的转录表达程序^[4,8,11]。通过对水稻^[9,10,23]、拟南芥^[3]、大米草^[8]以及玉米^[27]等植物的研究发现,杂交后代基因组中 DNA 甲基化比例相对于亲本发生了明显的变异,并且不同位点的甲基化模式表现丰富的多态性,杂交后代一些位点与亲本相比表现为去甲基化,而另一些位点表现为甲基化水平增加,还有一些位点表现为组织特异性。研究者认为,这种 DNA 甲基化水平及模式的变异是一种普遍现象,可能与杂交后代全新基因调控系统的形成密切相关,对于物种适应不同的生长环境更是必须的^[3,8-10,23]。本文以 MSAP 技术检测小麦易位系及其亲本基因组 DNA 甲基化程度的差异性,实验证明小麦基因组“CCGG/GGCC”位点甲

基化修饰比例(41.56%~44.83%)明显高于黑麦基因组中比例(32.25%)(表 2, 图 3),而且小麦-黑麦易位系中甲基化位点基本源自小麦遗传背景(图 3)。同时,不同的小麦-黑麦易位系材料相对于其小麦亲本而言,基因组 DNA 甲基化水平有一定变化: CN12 甲基化水平基本维持不变(41.56%),而 CN17(44.33%)、CN18(44.83)甲基化水平有一定幅度的上升(表 2)。但是通过细分不同类型的甲基化修饰比例,我们发现三个姊妹系易位材料在“CCGG/GGCC”位点发生全甲基化修饰的比例相比小麦亲本(全甲基化, 16.37%; 半甲基化, 25.44%)均明显上升(CN12, 20.15%; CN17, 20.91%; CN18, 22.42%),而半甲基化比例则明显下降(CN12, 21.41%; CN17, 23.43%; CN18, 22.42%)(表 2)。透过这些数据可以推论,小麦-黑麦易位系中外源种质的存在引起了小麦遗传背景中 DNA 甲基化程度及模式的变异,这与前人在拟南芥^[3]、大米草^[8]异源多倍体以及水稻杂交渐渗系^[9,10]中的研究结果相类似。

很多研究指出, DNA 甲基化模式可以随细胞的有丝分裂和(或)减数分裂传递给后代^[1,2],同时也有报道 DNA 甲基化的动态变化和模式重塑现象,这种现象在种间杂交以及异源多倍体化现象中尤其普遍^[3,8-10,23]。本文研究结果表明,小麦-黑麦易位系中 39.02%的“CCGG/GGCC”位点甲基化模式与小麦亲本一致,但由于黑麦种质的引入,更多的甲基化位点修饰模式发生了变异,同小麦亲本相比表现较高的多态性(60.98%)(表 3)。尽管如此,在不同的小麦易位系间却表现了较高的一致性(48.78%),多态性位点比例仅为 12.20%,这与小麦易位系间外源种质相同的存在形式以及高度一致的基因组一级结构组成是相符的(图 2)。本研究在不同的小麦易位系中共检测到 29 种不同类型的甲基化修饰模式,其中 13 种类型(33.74%)表现为超甲基化修饰,9 种类型(22.76%)表现为去甲基化修饰,而余下的 7 种类型(4.07%)甲基化模式变异未能明确界定(表 3),这些同一位点表现的甲基化修饰模式间的变异可能在一定程度上与基因组的转录活性密切相关,进而影响不同易位系间表型性状的变化^[3,8-10]。

3.3 小麦-黑麦易位系中甲基化位点变异的特异性

已有的研究表明,植物远缘杂交过程中,涉及各类重复序列、转座元件、启动子序列、蛋白编码区在内的多种 DNA 序列甲基化修饰模式会发生改变,其中转座元件和其他重复序列是甲基化变异的主要位

点, 这些序列DNA甲基化模式的改变可以影响植物花期、育性、形态等表型性状^[3,10,28]. Cheng等人^[28]深入研究了反转座子*Tos17*的甲基化模式与转座行为间的相互关系, 发现其转座活性与其DNA甲基化水平呈负相关, 并且*Tos17*甲基化模式的改变还能调控其相邻基因的表达活性, 他们将此调控机制称为转录干涉(transcriptional interference), 并认为这种DNA甲基化水平的基因表达调控机制对水稻组培过程中细胞分化、器官发生以及生殖发育等均具有重要意义^[28]. 在拟南芥异源多倍体以及水稻-菰渐渗系中, 研究者也证实了多种转座元件转录激活事件的存在, 同样与之相伴的是转座元件DNA序列去甲基化行为的表现^[3,9,10]. 本研究中, 我们从小麦-黑麦易位系中分离了多条存在甲基化位点变异的DNA序列, 从中鉴定了多种小麦转座子序列及亚端粒重复序列以及单拷贝蛋白质编码序列. 我们考虑, 这些重复序列以及功能基因的甲基化位点及模式的变异可能与易位系材料与亲本间以及不同易位系材料间的表型性状差异有着一定关系. 这其中我们在表现持绿特性的易位系CN17和CN18中分离到与叶绿体蛋白质合成相关的核糖体蛋白亚基编码序列(EF469552, EF486305), 发现其甲基化模式与亲本及其姊妹材料表现相异, 这表明这些序列的甲基化模式改变与易位系特殊的花后叶片抗衰老特性获得可能存在一定的相关性. 更值得引起注意的是, 在分离的转座子序列中, *Tri-MS-5* (EF469548)与最近刚从硬粒小麦中克隆的叶片衰老相关调控基因*NAC*^[29]位于同一基因座. 考虑到*Tri-MS-5*位于*NAC*的调控区附近, 其甲基化模式的变异与*NAC*表达活性变化间的相关关系有必要进行深入的研究分析.

3.4 外源种质导入引起小麦易位系表型性状变异的可能表观分子机制

一个功能正常的远缘杂交后代中, 来源于不同亲本的异源遗传物质必须在同一个细胞中稳定的相互作用. 通过表观遗传变异调节整个基因组的基因表达模式是达到这种稳定性的重要途径, 一般远缘杂交后代中的甲基化水平及模式不论在重复序列或单拷贝序列上都不同于其杂交亲本^[3,8-10,28]. 本研究所采用的是从高代分离的姊妹易位系材料, 实验材料的农艺性状稳定、遗传一致性强, 但是相对于亲本及其双二倍体, 不同的易位系材料却表现了许多全新的性状, 如大穗多粒、株型优异、花后持绿、抗病性强等(图1(a)和(b)), 显然仅仅用渗入到小麦基因组中的异源种质产生的遗传效应来解释似乎是不够的^[12,13]. 为了加深对这种现象的认识, 本研究首先以GISH技术分析了CN12, CN17, CN18三个姊妹易位系基因组间黑麦种质的存在形式, 从细胞水平证实了黑麦1RS染色体在小麦基因组背景中的稳定遗传(图1(c)和(d)); 进而以AFLP技术分析他们的基因组组成差异, 从分子水平证明1RS/1BL易位系材料间并没有表现明显的基因组结构变异(图2). 在此水平上, 我们应用MSAP技术进一步分析姊妹易位系材料间基因组表观遗传变异行为, 发现从DNA甲基化程度到甲基化修饰模式, 易位系及小麦亲本间均存在明显的变异, 特别是同一遗传位点的甲基化修饰模式更是表现了高水平的多态性(表2和3). 同时, 在这些甲基化模式变异位点中, 鉴定了多种转座子及亚端粒重复序列以及单拷贝蛋白质编码序列(表4). 针对不同位点的甲基化变异而言, 其对于不同性状

表4 DNA甲基化模式变异位点测序及比对结果

序列	长度/bp	同源序列	相邻基因位点	E值
EF453755	197	<i>T. turgidum</i> 反转录转座子 (AY494981)	高分子量谷蛋白亚基, 蛋白激酶	1×10 ⁻⁷⁴
EF453756	634	<i>T. monococcum</i> 反转录转座子 (AY146588)	高分子量谷蛋白亚基 GLU-A3-2	0.0
EF453757	200	<i>Aegilops tauschii</i> 转座子 (AY534123)	转座子	8×10 ⁻¹⁷
EF469548	326	<i>T. turgidum</i> 反转录转座子 (DQ871219)	<i>NAC</i> 转录因子, 鼠李糖半乳糖醛裂解酶	1×10 ⁻¹¹²
EF469549	234	<i>A. speltoides</i> 亚端粒重复 Spelt1 序列 (AY117402)	无	1×10 ⁻⁹²
EF469552	562	<i>T. aestivum</i> 核糖体蛋白 <i>S11</i> 及 <i>Rpl36</i> 基因 (EF486305)	无	0.0
EF469553	428	<i>T. monococcum</i> 反转录转座子 (AY485644)	<i>SNF2P</i> , 推测的转座酶	2×10 ⁻¹⁴⁸
EF486285	358	无	无	358
EF486287	594	<i>A. tauschii</i> 转座子 (AY534123)	转座子	0.0
EF486292	497	<i>T. monococcum</i> 反转录转座子 (AY485644)	功能未知的 <i>CDS</i> , <i>ZCCT2</i>	3×10 ⁻³⁰
EF486298	393	<i>T. aestivum</i> 反转录转座子 (CT009735)	球蛋白	9×10 ⁻¹⁴¹
EF486300	528	<i>T. aestivum</i> 改变的 pSc119.1-1 重复序列 (EF062311)	无	3×10 ⁻⁴¹
EF486301	528	<i>T. monococcum</i> 反转录转座子 (AF326781)	肌动蛋白、抗性蛋白及类根瘤蛋白类蛋白基因	0.0

的表现及影响是不同的,某些位点甲基化程度的降低对某些性状的表现是必须的,而另一些位点甲基化程度的增加同样可能与其他性状的表现息息相关,所以本研究在易位系中检测到高水平的甲基化位点模式变异是可以理解的。

在深入分析外源种质引发小麦表观遗传变异现象时,实验材料基因组一级结构的一致性是很重要的,本文虽然在细胞及分子水平已经证实高代分离的姊妹易位系材料间遗传组成相对一致,但由于检测技术分辨力有限,并不能完全排除基因组一级结构相异带来的影响。但是在扫描力度相同(或相近)的情况下,不同易位系材料表现的基因组甲基化位点模式多态性(60.98%)远远高于易位系材料间基因组一级结构组成的异质性(图 2 和 3),这至少可以从另一个角度说明小麦-黑麦易位系间不同性状的表现与基因组表观遗传变异有着更为密切的联系。考虑到目前在植物远缘杂交引起基因组 DNA 甲基化水平变异研究方面所取得的一系列进展,以及 DNA 甲基化水平与基因表达活性密切相关,我们有理由认为远缘杂种后代发生的表型变异不但与其基因组 DNA 序列的改变程度息息相关,而且更与基因组 DNA 甲基化程度及修饰模式的变异有着不可割裂的联系。

参 考 文 献

- 1 Saze H, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J. Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet*, 2003, 34(1): 65—69[doi]
- 2 Guimil S, Dunand C. Patterning of *Arabidopsis* epidermal cells: Epigenetic factors regulate the complex epidermal cell fate pathway. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(12): 601—609[doi]
- 3 Madlung A, Masuelli R W, Watson B, et al. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiol*, 2002, 129: 733—746[doi]
- 4 Chan S W L, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 351—360[doi]
- 5 Xiao W, Custard K D, Brown R C, et al. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 805—814[doi]
- 6 Jullien P E, Kinoshita T, Ohad N, et al. Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell*, 2006, 18(6): 1360—1372[doi]
- 7 Adams K L, Percifield R, Wendel J F. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*, 2004, 168: 2217—2226[doi]
- 8 Salmon A, Ainouche M L, Wendel J F. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Mol Ecol*, 2005, 14: 1163—1175[doi]
- 9 Liu Z, Wang Y, Shen Y, et al. Extensive alterations in DNA methylation and transcription in rice caused by introgression from *Zizania*

- 10 Dong Z Y, Wang Y M, Zhang Z J, et al. Extent and pattern of DNA methylation alteration in rice lines derived from introgressive hybridization of rice and *Zizania latifolia* Griseb. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 196—205[doi]
- 11 Schob H, Grossniklaus U. The first high-resolution DNA “methylome”. *Cell*, 2006, 126(6): 1025—1028[doi]
- 12 Ren Z L. Introduction of rye chromatin into wheat and its breeding behavior. *Scientia Agricultura Sinica*, 1991, 24(3): 18—25
- 13 Ren Z L. Effect of wheat genetic background on the expression of the rye gene *Lr26* for resistance to leaf rust in wheat. *Acta Genetica Sinica*, 1993, 20(4): 312—316
- 14 Ren Z L, Zhang H Q. Induction of small-segment-translocation between wheat and rye chromosomes. *Sci China Ser C-Life Sci*, 1997, 27(3): 258—263
- 15 Reyna-Lopez G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol Gen Genet*, 1997, 253: 703—710[doi]
- 16 Tang Z X, Ren Z L, Wu F, et al. The selection of transgenic recipients from new elite wheat cultivars and study on its plant regeneration system. *Agri Sci China*, 2006, 5(6): 417—427
- 17 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19): 4321—4325[doi]
- 18 Zhang Y, Zhang S G, Qi L W, et al. Chromosome microdissection, cloning and painting of the chromosome 1 in poplar (*Populus tremula*). *Silvae Genetica*, 2005, 54(4-5): 211—217
- 19 Froidmont D. A co-dominant marker for the 1BL/1RS wheat-rye translocation via multiplex PCR. *J Cereal Sci*, 1998, 27: 229—232[doi]
- 20 Chai J F, Zhou R H, Jia J Z, et al. Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL/1RS wheat-rye chromosome translocations. *Plant Breed*, 2006, 125: 302—304[doi]
- 21 Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407—4414[doi]
- 22 Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, 196: 80—83[doi]
- 23 Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A S, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Genet Genomics*, 1999, 26: 439—446
- 24 Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, et al. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell*, 2001, 13: 1749—1759[doi]
- 25 He P, Friebe B R, Gill B S, et al. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 401—414[doi]
- 26 Ma X F, Fang P, Gustafson J P. Polyploidization-induced genome variation in triticale. *Genome*, 2004, 47: 839—848[doi]
- 27 Zhao X X, Chai Y, Liu B. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Sci*, 2007, 172: 930—938[doi]
- 28 Cheng C, Daigen M, Hirochika H. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Mol Genet Genomics*, 2006, 276(4): 378—390[doi]
- 29 Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, et al. A *NAC* gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science*, 2006, 314: 1298—1301[doi]