

# 人工异源六倍体小麦中甲基化差异的 MSAP 分析

聂利红<sup>1</sup>, 王延召<sup>1</sup>, 孙其信<sup>2</sup>, 房卫平<sup>1</sup>, 谢德意<sup>1</sup>

(1. 河南省农业科学院经济作物研究所, 河南 郑州 450002; 2. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**利用 MSAP 方法分析了小麦从四倍体到六倍体进化过程中甲基化水平和甲基化遗传模式的变化。结果表明, 人工异源六倍体小麦 SCA/SQ (AABBDD) 及其四倍体母本 SCAUP (AABB)、二倍体父本粗山羊草 SQ523 (DD) 的总甲基化水平分别为 28.21%、27.53%、24.11%。37 对引物检测到 1 087 条差异的扩增片段, 对这些位点的甲基化遗传模式进行分析, 结果表明, 在人工异源六倍体中发生过甲基化的比例为 18.95%, 高于去甲基化的比例 (2.58%)。这些结果揭示了小麦从四倍体到六倍体的进化过程中, 通过对一些功能基因的甲基化来减轻异源多倍化造成的影响。

**关键词:**人工六倍体小麦; 异源多倍化; 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)02-0077-04

## MSAP Analysis of DNA Methylation Alteration in Synthetic Hexaploid Wheat

NIE Li-hong<sup>1</sup>, WANG Yan-zhao<sup>1</sup>, SUN Qi-xin<sup>2</sup>, FANG Wei-ping<sup>1</sup>, XIE De-yi<sup>1</sup>

(1. Economic Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** DNA methylation is known to play an important role in the regulation of gene expression in higher plants. In this study, we assessed the extent and patterns of cytosine methylation alterations in a stable synthetic hexaploid wheat and their progenitor parents using MSAP. Results showed that the levels of methylation in SCA/SQ (AABBDD) and the parents were 28.21%, 27.53%, 24.11%, respectively. A total of 1 087 fragments were differentially amplified from the two digests for at least one of the parental lines, about 21.53% of loci shown changes in methylation patterns in the allopolyploid. Among these loci, 18.95% were hypermethylated, 2.58% were demethylated. The increased methylation level in synthetic hexaploid wheat compared to its parents might mitigate the shocks from the hybridization and duplication.

**Key words:** Synthetic hexaploid wheat; Allopolyploidy; DNA methylation; MSAP

表观遗传学 (Epigenetics) 是指在基因的 DNA 序列没有发生改变的情况下, 基因功能发生可遗传的变化, 并最终导致表型的变化。DNA 甲基化作为表观遗传学研究的主要内容, 是目前表观遗传学研究的热点之一。异源多倍化可诱发基因组内转座子内外的编码及调控序列发生迅速的表观遗传修饰, 从而导致基因沉默、产生新性状以及转座子活性的抑制<sup>[1-4]</sup>。在生物进化历程中, 甲基化参与了越来越多的生物学过程, 包括基因的表达调控、胚胎发育、细胞分化、基因组印迹、X 染色体失活等<sup>[5]</sup>。DNA 甲基化的生物学作用主要体现在基因表达调

控和维持基因组的稳定性等方面<sup>[6]</sup>。植物在不同发育时期进行着不同的发育反应, 可通过 DNA 甲基化的改变 (增高和降低) 来控制基因的转录, 从而达到在不同时期关闭和开启基因表达的目的。

小麦是世界和我国重要的粮食作物, 又是研究植物多倍化的经典材料。普通小麦是典型异源六倍体 (AABBDD) 作物, 和其祖先亲本相比具有明显优势。尽管其基因组是最为复杂的植物基因组之一, 但是由于小麦在生产上的重要性以及其基因组的典型性, 长期以来, 育种家一直在利用多倍体对其进行改良。例如, 从远缘种属向普通小麦中转移抗病基

收稿日期: 2011-12-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30370878)

作者简介: 聂利红 (1979-), 女, 河南安阳人, 副研究员, 博士, 主要从事植物进化和遗传育种研究。

通讯作者: 孙其信 (1962-), 男, 甘肃景泰人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种研究。

因 利用多倍体培育麦类作物新类型: 如同源四倍体荞麦、同源四倍体黑麦、异源八倍体小黑麦等<sup>[7]</sup>。本研究以硬粒小麦 SCAUP( AABB)、粗山羊草 SQ523( DD) 为材料, 通过人工合成六倍体小麦, 模拟自然界普通小麦的形成过程。利用 MSAP 技术, 研究六倍体小麦在异源多倍化后全基因组甲基化模式的变化, 探索小麦多倍体在进化过程中基因表达变化的调控机制。

1 材料和方法

1.1 材料

用四倍体硬粒小麦 SCAUP( AABB) 作母本, 以粗山羊草 SQ523( DD) 作父本, 通过远缘杂交获得

F<sub>1</sub>, 然后利用秋水仙素进行加倍, 获得人工六倍体小麦 SCA/SQ( AABBDD)。经过自交多代, 获得稳定的人工六倍体小麦。亲本和人工六倍体小麦种子培养室, 三叶期取材。本试验材料来源于 CIMMYT。

1.2 MSAP DNA 甲基化分析

采用 CTAB 法提取 DNA。MSAP DNA 甲基化分析参照 Xiong 等<sup>[8]</sup>, 并作适当修改。用识别 4 碱基的 *Hpa* II 和 *Msp* I 同裂酶分别与识别 6 碱基核酸内切酶 *Eco*R I 组合对样本 DNA 进行双酶切, 在酶切片段的两端加上人工设计的与 *Eco*R I 和 *Hpa* II / *Msp* I 酶切位点互补的人工接头。选择扩增产物在 5% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 硝酸银染色。接头和引物序列见表 1。

表 1 接头和引物序列

Tab. 1 Sequence of adapters and primers

	<i>Eco</i> R I	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I
接头 Adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'	5'-GATCATGAGTCCTGCT 5'-CGAGCAGGACTCATGA
预扩引物 Pre Amp primer	GAC TGC GTA CCA ATT C	CAT GAG TCC TGC TCG GT
选扩引物 Selective primer	GAC TGC GTA CCA ATT CAC A GAC TGC GTA CCA ATT CAC C GAC TGC GTA CCA ATT CAG G GAC TGC GTA CCA ATT CAC G GAC TGC GTA CCA ATT CAG C GAC TGC GTA CCA ATT CAA T GAC TGC GTA CCA ATT CAG T GAC TGC GTA CCA ATT CCA A GAC TGC GTA CCA ATT CCA T	CAT GAG TCC TGC TCG GTC AC CAT GAG TCC TGC TCG GTC AG CAT GAG TCC TGC TCG GTC AT CAT GAG TCC TGC TCG GTC AA CAT GAG TCC TGC TCG GTC TA

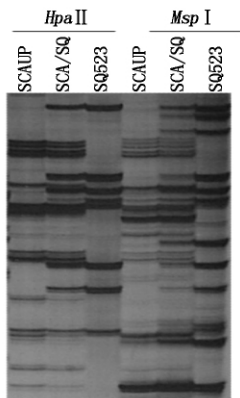


图 1 人工六倍体及其亲本的 MSAP 扩增结果

Fig. 1 MSAP fingerprints of the synthetic hexaploid wheat and parents

2 结果与分析

2.1 人工异源六倍体小麦及亲本的甲基化水平

来自 CIMMYT 的自交 9 代稳定人工合成六倍体小麦 SCAUP/SQ523( AABBDD) 及其亲本 SCAUP( AABB) 和 SQ523( DD) 为材料, 采用 MSAP 技术, 对供试材料叶片中的 5'-CCGG 的胞嘧啶甲基

化水平进行了分析( 图 1)。同一材料的 DNA 用同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 酶切后, 根据带型的有无可以分为 4 种类型: ( - , -) 型, 两种酶都不能识别切割, 表示该位点存在双链外甲基化; ( - , +) 型, 指 *Hpa* II 不能切割而 *Msp* I 可以识别并切割, 表示该位点为双链内甲基化, 即全甲基化; ( + , -) 型, 指 *Hpa* II 能识别切割而 *Msp* I 不能切割, 表示该位点为单链外甲基化, 即半甲基化; ( + , +) 型, 指两种酶都可以识别并切割, 表示该位点无甲基化。

选用的 37 对引物组合在供试的 3 个材料中共获得 2 517 条清晰的条带, 至少存在于 1 个亲本中的差异扩增片段有 1 087 条( *Hpa* II 和 *Msp* I 之间的差异扩增片段), 亲本 SCAUP( AABB)、SQ523( DD) 和 SCAUP/SQ523 中总甲基化( 包括全甲基化和只有 1 条链甲基化的半甲基化) 的带数分别为 693、607、710 条, 甲基化水平分别为 27.53%、24.11%、28.21%。

2.2 人工异源六倍体小麦及其亲本的甲基化遗传模式

通过对人工合成六倍体小麦及其亲本的甲基化

模式比较,1 087 条差异扩增片段分为两大类型:( I )为单态性位点,即在双亲和人工合成六倍体小麦中存在同样的甲基化模式,这种类型的片段共有 179 个( 占总差异片段的 16. 47% ),包括带型为 A1 ( - ,+ , - ,+ , - ,+ ) 的 142 个全甲基化位点和带型为 A2( + , - ,+ , - ,+ , - ) 的 37 个半甲基化位点。( II )多态性位点,亲本间或亲本与人工合成六倍体间存在甲基化差异,这种类型的片段共有 908 个。进一步研究,908 个多态性位点又可以分成 B 型、C 型和 D 型 3 类( 表 2 )。B 型为孟德尔遗传型,这一类型的共同特点是亲本中的条带在人工合成六倍体小麦中呈现简单的孟德尔遗传,即在亲本之一或者双亲中检测到的条带在人工合成六倍体小麦中

也能检测到,这一类型的片段共有 674 个( 62. 00% ); C 型为去甲基化型,即人工合成六倍体小麦比亲本的甲基化程度降低,即在形成人工合成六倍体小麦后,该位点去甲基化,这一类型的片段共有 28 个( 2. 58% ); D 型为甲基化或过甲基化型,人工合成六倍体小麦比亲本的甲基化程度增加,这一类型的片段共有 206 个( 18. 95% )。本试验中约有 21. 53% 的位点在人工合成六倍体小麦中发生了甲基化的改变,过甲基化基因的比例( 18. 95% )高于去甲基化的比例( 2. 58% ),这说明人工六倍体小麦可能通过对一些功能基因的甲基化来缓和杂交和基因组加倍造成的影响。

表 2 人工合成六倍体小麦及亲本甲基化模式

Tab. 2 The alteration of methylation patterns between the synthetic hexaploid wheat and parents								
甲基化模式 ( Methylation patterns)	SCAUP ( AABB)		SQ523 ( DD)		SCA/SQ ( AABBD)		位点数 Number of sites	位点数( 比例/%) Total
	H	M	H	M	H	M		
A	-	+	-	+	-	+	142	179 ( 16. 47)
	+	-	+	-	+	-	37	
B	-	-	-	+	-	+	71	674 ( 62. 00)
	-	-	+	-	+	-	39	
	-	+	-	-	-	+	230	
	-	+	+	-	+	+	9	
	-	+	+	+	+	+	46	
	+	-	-	-	+	-	137	
	+	-	-	+	+	+	4	
	+	+	-	+	+	+	111	
	+	+	+	-	+	+	27	
	+	-	+	+	+	+	9	
C	-	-	-	+	+	+	7	28 ( 2. 58)
	-	-	+	-	+	+	3	
	-	+	-	-	+	+	5	
	-	+	-	+	+	+	1	
	+	-	-	-	+	+	3	
	-	-	+	-	-	-	49	
	-	-	-	+	-	-	76	
D	-	+	-	-	-	-	10	206 ( 18. 95)
	-	+	-	+	-	-	1	
	-	+	+	-	-	-	2	
	+	-	-	-	-	-	12	
	+	-	+	+	-	-	1	
	-	+	+	+	-	-	1	
	-	+	+	-	-	+	5	
	-	+	+	-	+	-	1	
	-	+	+	+	-	+	15	
	+	-	-	+	-	+	1	
	+	-	-	+	+	-	10	
	+	-	+	+	+	-	11	
	+	+	-	+	-	+	9	
	+	+	+	-	-	+	1	
	+	+	+	-	+	-	1	
	+	+	+	+	-	+	1	
	+	+	+	-	+	-	1	

注: - . 表示在该位置上没有条带; + . 表示有带。  
Note: - . Band absent; + . Band present.

### 3 讨论

远缘杂交和多倍化过程是植物界物种形成和进化的重要途径<sup>[9-10]</sup>。异源多倍化后,新融合的基因组需要经历“二倍化”过程,进化成当代的二倍体物种。在进化过程中,为了适应杂交和多倍化对基因组的冲击,新形成的异源多倍体发生了快速的遗传<sup>[11]</sup>和表观遗传<sup>[4]</sup>的变化。Liu 等<sup>[12-13]</sup>发现小麦中异源多倍体物种形成可诱发稳定遗传的胞嘧啶甲基化变异,而且这种胞嘧啶甲基化变异是非随机发生的。对人工四倍体小麦及其亲本的研究发现,有大约 13% 的位点上在 F<sub>1</sub> 或合成种中发生了胞嘧啶甲基化的改变<sup>[14]</sup>。本研究约有 21.53% 的位点在人工合成六倍体小麦中发生了甲基化的改变,其中过甲基化基因的比例(18.95%)高于去甲基化的比例(2.58%),暗示着,可能通过对一些功能基因的甲基化来缓和杂交和基因组加倍对人工六倍体小麦造成的影响。

基因沉默在异源多倍化过程中普遍发生<sup>[15-17]</sup>,基因沉默与高水平的 DNA 甲基化和低水平的组蛋白乙酰化有关<sup>[18]</sup>,去甲基化可引起基因激活,过度的甲基化可引起基因沉默。Lee 和 Chen<sup>[2]</sup>研究人工四倍体拟南芥中一些呈沉默表达的基因,发现基因组中存在这些基因的完整 DNA 序列,使用 aza-dC 处理阻断基因组的胞嘧啶甲基化后,这些沉默基因又表现出了活性。越来越多的证据表明无论是转录失活还是转录后沉默都与 DNA 甲基化有关<sup>[19-20]</sup>,这意味着多倍体植物可能通过 DNA 甲基化对冗余的基因进行调控。

#### 参考文献:

- [1] Comai L, Tyagi A P, Winter K *et al.* Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids [J]. *Plant Cell* 2000, 12: 1551 - 1568.
- [2] Lee H S, Chen Z J. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 6753 - 6758.
- [3] Yaakov B, Kashkush K. Massive alterations of the methylation patterns around DNA transposons in the first four generations of a newly formed wheat allohexaploid [J]. *Genome* 2011, 54(1): 42 - 49.
- [4] Xu Y, Zhong L, Wu X *et al.* Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized *Brassica napus* allopolyploids [J]. *Planta* 2009, 229(3): 471 - 483.
- [5] Zilberman D. The evolving functions of DNA methylation [J]. *Curr Opin Plant Biol* 2008, 11: 554 - 559.
- [6] Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes [J]. *Curr Opin Genet Dev* 2000, 10: 217 - 223.
- [7] 沈显生. 浅析植物多倍体现象 [J]. *生物学杂志*, 1995, 5: 8 - 11.
- [8] Xiong L Z, Xu C G, Saghai Maroof M A, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J]. *Molecular and General Genetics* 1999, 261: 439 - 446.
- [9] Bennett M D, Leitch I J. Nuclear DNA amounts in angiosperms-583 new estimates [J]. *Ann Bot* 1997, 80: 169 - 196.
- [10] Gaeta R T, Pires J C, Iniguez-Luy F, *et al.* Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype [J]. *Plant Cell* 2007, 19: 3403 - 3417.
- [11] Leitch A R, Leitch I J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants [J]. *Science* 2008, 320: 481 - 483.
- [12] Liu B, Vega J M, Segal G *et al.* Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy non-coding DNA sequences [J]. *Genome* 1998, 41: 272 - 277.
- [13] Liu B, Vega J M, Feldman M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences [J]. *Genome* 1998, 41: 535 - 542.
- [14] 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 [J]. *Plant Cell* 2001, 13: 1749 - 1759.
- [15] Adams K L, Percifield R, Wendel J F. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid [J]. *Genetics* 2004, 168: 2217 - 2226.
- [16] Chaudhary B, Flagel L, Stupar R M, *et al.* Reciprocal silencing, transcriptional bias and functional divergence of homeologs in polyploid cotton (*Gossypium*) [J]. *Genetics* 2009, 182(2): 503 - 517.
- [17] Buggs R J, Elliott N M, Zhang L *et al.* Tissue-specific silencing of homoeologs in natural populations of the recent allopolyploid *Tragopogon mirus* [J]. *New Phytol* 2010, 186(1): 175 - 183.
- [18] Chen Z J, Pikaard C S. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 3442 - 3447.
- [19] Matzke M A, Matzke A J. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses [J]. *Cell Mol Life Sci* 1998, 54(1): 94 - 103.
- [20] Paun O, Bateman R M, Fay M F *et al.* Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid Orchids (*Dactylorhiza: Orchidaceae*) [J]. *Mol Biol Evol* 2010, 27(11): 2465 - 2473.