

# 小麦与叶锈菌互作前后基因组甲基化模式分析

付胜杰<sup>1</sup>, 王 晖<sup>2</sup>, 冯丽娜<sup>1</sup>, 李 星<sup>1</sup>, 王 琄<sup>1</sup>, 杨文香<sup>1</sup>, 刘大群<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学 植物保护学院植物病理系, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001; 2. 济宁医学院, 山东 济宁 272013)

**摘要:**首次使用甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术分析两种小麦材料近等基因系 TcLr19 及其感病亲本 Thatcher 的甲基化水平, 同时比较了苗期接种叶锈菌生理品种 THIT 前后基因组 DNA 胞嘧啶甲基化模式。60 对选扩引物对接种前后的小麦 DNA 进行全基因组筛选, 共得到 3 554 个片段。其中 998 个片段是两种甲基化模式中的一种, 小麦近等基因系 TcLr19 及其感病亲本 Thatcher 的甲基化水平约为 28.1%。在所有的引物中, 并没有直接分离得到接种前后的甲基化模式的差异。结果初步表明, 叶锈菌可能并没有诱导植物基因组 DNA 胞嘧啶位点的甲基化模式变化。

**关键词:** DNA 甲基化; 小麦叶锈菌; 甲基化敏感扩增多态性; 抗病性

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)04-0028-04

## Analysis of DNA Methylation Related on the Interaction between Wheat and Wheat Leaf Rust

FU Sheng-jie<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, FENG Li-na<sup>1</sup>, LI Xing<sup>1</sup>, WANG Shen<sup>1</sup>, YANG Wen-xiang<sup>1</sup>, LIU Da-qun<sup>1</sup>

(1. Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Jining Medical College, Jining 272013, China)

**Abstract:** DNA methylation is known to play an important role in the regulation of gene expression in eukaryotes. The wheat near-isogenic line TcLr19 and Thatcher is race-specific resistance and compatible in the interaction with *Puccinia triticina* respectively. Using methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) analysis, we compared the patterns of cytosine methylation in TcLr19 and Thatcher that had been inoculated with *Puccinia triticina*, subjected to left untreated. In all, 3 554 DNA fragments, each representing a recognition site cleaved by either or both of two isoschizomers, were amplified using 60 pairs of selective primers. A total of 998 sites were found to be one of the methylated. The results suggest that no differences in cytosine methylation exist between seedlings inoculated and those unchallenged.

**Key words:** DNA methylation; *Puccinia triticina*; MSAP; Resistance

DNA 甲基化与生物体内许多生物过程有关, 如基因组印记、基因转录调节、转座子调节、基因沉默等<sup>[1-5]</sup>。DNA 甲基化可以从转录水平 (Transcriptional gene silencing, TGS) 和转录后水平 (Post-transcriptional gene silencing, PTGS) 调节基因表达。通常情况下, 甲基化抑制转录<sup>[2]</sup>。TGS 是由于启动子区域高度甲基化而产生, 而 PTGS 则是因为已转录的转录体或编码序列的高度甲基化而导致转录 RNA 降解, 并不影响转录率<sup>[5]</sup>。

植物中最常见的甲基化通常发生在 CpG 和 CpNpG 序列, 这些甲基化的序列可以通过 DNA 的复制传递给子代, 起着调节基因表达的作用<sup>[6]</sup>。真核

生物中检测甲基化的方法有两种: 基于重硫酸盐的方法和基于同裂酶的方法。重硫酸盐可以将未甲基化的胞嘧啶 (C) 转换成胸腺嘧啶 (T), 通过测序即可检测到甲基化的胞嘧啶。同裂酶具有相同的酶切识别位点, 但对不同的甲基化位点敏感性不同, 故酶切后可产生甲基化 DNA 序列的多态性<sup>[7]</sup>。MSAP (Methylation-sensitive amplified polymorphism) 是一种基于同裂酶应用在 AFLP 基础上发展起来的检测基因组 DNA 甲基化的方法<sup>[8]</sup>。这种改进的 AFLP 技术中使用两种甲基化敏感的限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 替代 *Mse* I 作为高频内切酶。*Hpa* II 和 *Msp* I 可识别相同的四碱基序列 5'-CCGG-3', 但是它们对

收稿日期: 2008-02-25

基金项目: 国家“973”专项 (2005CCA01600); 国家“十一五”支撑计划 (2006BAD08A05)

作者简介: 付胜杰 (1978-), 男, 山东济宁人, 硕士, 主要从事小麦锈病研究。

通讯作者: 杨文香 (1966-), 女, 河北沧州人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事小麦锈病研究。

刘大群 (1958-), 男, 河北石家庄人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病害生物防治与分子植物病理学研究。

DNA 甲基化显示有不同的敏感性, 当 CCGG 中的一个或两个 C 处于全甲基化(两条链都甲基化)状态时, *Hpa* II 没有活性, 而当其处于半甲基化(双链 DNA 中的一条被甲基化)时 *Hpa* II 可以进行识别酶切, 但对半甲基化的 C<sup>5m</sup>CGG 的酶切频率较没有甲基化低。 *Msp* I 可对半甲基化或全甲基化的 C<sup>5m</sup>CGG 序列进行酶切, 但不能对 C<sup>5m</sup>CCGG 酶切。通过选择扩增酶切后的基因组 DNA, 可检测到不同甲基化模式<sup>[9]</sup>。目前这种方法在植物中已被用来研究水稻的杂种优势<sup>[10]</sup>、小麦和拟南芥异源多倍性<sup>[9, 11]</sup>、小麦春化作用<sup>[12]</sup>以及水稻抗百叶枯的成株抗性<sup>[13]</sup>等。

由小麦叶锈菌(*Puccinia tirticina*)引起的小麦锈病是影响世界小麦稳产高产的重要病害之一, 也是影响我国小麦生产的重要因素, 该病害在世界各产麦区均有发生<sup>[14, 15]</sup>, 严重时可能造成 5%~15% 甚至更大的产量损失<sup>[16]</sup>。前期研究表明, 小麦夏孢子在条件适宜时, 数小时内完成萌发, 8 h 后完成侵染<sup>[17]</sup>。小麦叶锈菌的侵入方式同其他锈菌一样, 是通过气孔侵入的<sup>[18, 19]</sup>。但对于病原菌侵入表皮后的互作过程, 只是从组织病理学<sup>[19]</sup>, 细胞生物学方面<sup>[18, 19]</sup>加以探讨, 但对于小麦和叶锈菌互作的分子生物学机制, 特别是甲基化与抗病的关系还知之甚少。因而, 进一步在分子水平研究抗锈机制, 对深入锈菌的致病机理和认识寄主的抗锈机制以及开拓新的抗病渠道无疑具有重要意义。

尽管诱导甲基化的机制还不是很清楚, 但有证据显示温度和重金属等逆境可以改变植物的甲基化模式。比如低温等, 能通过对基因组甲基化的影响来调节一些基因的表达, 这给我们一些启发。生物胁迫也是一种逆境, 那么这种生物胁迫逆境是否会改变甲基化的模式? 而抗病相关的一些基因的表达是否会受生物胁迫逆境诱导的甲基化模式改变的调节? 甲基化/去甲基化是否有可能参与病原与寄主互作中的抗病信号转导? 我们利用 MSAP 技术分析了小麦特异性的非亲和互作以及亲和互作中的小麦基因组在接菌前后的甲基化模式, 试图弄清 DNA 甲基化是否参与植物与病原微生物的互作, 以及在这种亲和和非亲和互作中所扮演的角色, 旨在为进一步了解病原菌与寄主互作的分子生物学基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

供试材料为小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr19 及感病亲本 Thatcher, 小麦叶锈菌生理小种 04-15-8-1 (THTT) 由河北农业大学锈病研究中心提供。

### 1.2 小麦叶锈菌小种 04-15-8-1 (THTT) 与 TcLr19 和 Thatcher 互作的表型鉴定

将已催芽的小麦抗叶锈近等基因系 TcLr19 及感病对照 Thatcher 种子各 5~10 粒分别种植于一直径 7 cm 小盘中, 待小麦苗长至第一叶完全展开时, 采用撒粉法将小麦叶锈菌小种 04-15-8-1 (THTT) 分别接种于 TcLr19 和 Thatcher 的叶片上, 黑暗保湿 16 h 后移至(20±5) °C 光照 16 h、黑暗 8 h 的培养箱中培养, 13 d 后进行表型鉴定。

### 1.3 小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr19 及感病对照 Thatcher 接菌及样品采集

将小麦近等基因系 TcLr19 和感病亲本 Thatcher 的种子催芽, 选取长势一致的种子播种于花盆中栽培, 分别培养至一叶期后, 用筛选得到的叶锈菌菌种 04-15-8-1 (THTT) 对 TcLr19 和 Thatcher 接种, 以不接菌为对照。接菌后 0, 12, 24, 48, 72 h 分别剪取接种叶片(去掉叶片尖部和近基部), 提取基因组 DNA。

### 1.4 小麦 DNA 的提取

参照本实验室改良的 CTAB 法提取小麦叶片基因组 DNA。去除 RNA 纯化后的 DNA 质量和浓度检测采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪进行, 于 4 °C 或 -20 °C 冰箱中保存备用。

### 1.5 MSAP 分析

引物采用 Sha 等<sup>[13]</sup>发表的引物及在此基础上通过改变引物 3 端 3 个选择性碱基随机组合共组成 60 对引物, 由上海生物工程技术服务公司合成。引物序列如表 1。使用 *Eco*R I/*Hpa* II 和 *Eco*R I/*Msp* I 两个限制性内切酶组合进行双酶切, 然后在酶切片段的两端, 分别加上与 *Eco*R I 和 *Hpa* II-*Msp* I 酶切位点互补的人工接头(表 1)。预扩选扩分别参照杨文香等<sup>[20]</sup>建立的小麦 AFLP 反应体系和程序进行。MSAP 的扩增产物通过 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 65 W 稳功率电泳 2.5 h, 硝酸银染色, 胶干后进行 H (*Eco*R I/*Hpa* II) 和 M (*Eco*R I/*Msp* I) 泳道条带数及带型统计分析。每一条带代表一个酶切识别位点, H1, H2, H3, H4, H5, H6 和 M1, M2, M3, M4, M5, M6 共 12 个泳道分别代表 TcLr19 未接菌的对照, 接菌后 0, 12, 24, 48, 72 h 的基因组材料在 *Eco*R I/*Hpa* II 和 *Eco*R I/*Msp* I 两个限制性内切酶组和进行双酶切的酶切图谱。共有 3 种带型: A 是指 12 条泳道内都有条带出现, 表示该位点没有甲基化 *Hpa* II 和 *Msp* I 都可以识别; B 是指 *Eco*R I/*Hpa* II 酶切时有条带出现, 而 *Eco*R I/*Msp* I 酶切时条带缺失, 这意味着该位点是半甲基化位点; C 是指 *Eco*R I/*Hpa* II 酶切时条带缺失, 而 *Eco*R I/*Msp* I 酶切时

条带出现,这意味着该位点是全甲基化位点(图2)。

表1 试验所用的引物

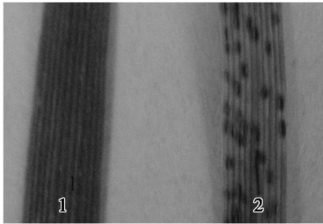
Tab.1 Primers used in the test

接头和引物 Adaptors and primers	接头和引物序列 The sequences of adaptors and primers
<i>Eco</i> R I adaptor(forward)	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>Eco</i> R I adaptor(reverse)	AATTGCTACGCAGTCTAC
<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I(forward)	GACGATGAGTCTAGAA
<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I(reverse)	CGTTCTAGACTCATC
<i>Eco</i> R I+A	GTAGACTGCGTACCAATTC
<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I+T	GATGAGTCTAGAACGGT
E+AAC	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+AAA	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+AAT	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+AAG	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+ACT	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+ACC	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+ACA	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+ACG	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+AGT	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+AGC	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+AGG	GTAGACTGCGTACCAATTC
E+AGA	GTAGACTGCGTACCAATTC
HM+TTC	GATGAGTCTAGAACGGT
HM+TAC	GATGAGTCTAGAACGGT
HM+TGC	GATGAGTCTAGAACGGT
HM+TAG	GATGAGTCTAGAACGGT
HM+TTG	GATGAGTCTAGAACGGT

2 结果与分析

2.1 TcLr19 和 Thatcher 与叶锈菌小种 04-15-8-1 互作的表型

一叶期接种 7, 13 d 后, 观测其表型。未接种和假接种的秧苗并没有观测到表型。而接菌的 TcLr19 和 Thatcher 的叶片的表型分别为 0 和 4(图1), 表明 TcLr19 对于叶锈菌小种 04-15-8-1 具有小种特异性的抗性。



1. TcLr19 2. Thatcher

图1 小麦抗叶锈近等基因系 TcLr19 及对照 Thatcher 对小麦叶锈菌 04-15-8-1 的侵染反应型

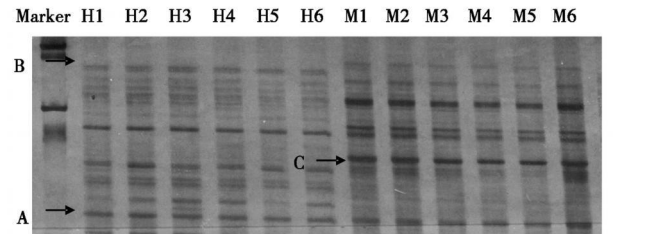
Fig.1 Infection types of 04-15-8-1 on TcLr19 and Thatcher

2.2 苗期小麦基因组在接菌前后甲基化的模式未见差异

因为 *Hpa* II 对酶切识别位点中的任一个 C 的全甲基化敏感, 而 *Msp* I 仅对第 1 个 C 的甲基化敏感, 第 2 个 C 上的甲基化不影响扩增产物的出现, 故

序列胶上 *Eco*R I-*Msp* I 酶切产物的选择扩增存在、而 *Eco*R I-*Hpa* II 酶切产物选择扩增缺失的条带统计为全甲基化位点, 反之, *Eco*R I-*Msp* I 酶切产物选择扩增缺失、而 *Eco*R I-*Hpa* II 酶切产物选择扩增存在的条带统计为半甲基化位点。

用 5 条 *Hpa* II-*Msp* I+TNN 引物与 12 条 *Eco*R II+ANN (N=A, T, G, C) 共交叉组成了 60 对引物组合, 对小麦近等基因系 Thatcher 和 TcLr19 的接菌后 0, 12, 24, 48, 72 h 材料的 DNA 及其未接菌对照的基因组 DNA 的 COGG 位点进行全基因组甲基化扫描检测, 每对引物扩增出约 50~80 条片段, 每一个片段代表了一个由两个同裂酶中的一个或两个识别的酶切位点, 共扫描了 3 554 个基因位点。至少存在 998 个两种甲基化情况中的一种, 在两种酶切条件下可扩增出不同的片段(图2)。其中检测到全甲基化位点 626 个, *Msp* I 剪切, 但是不允许 *Hpa* II 剪切, 占全部检测位点的 17.6%, 半甲基化位点 372 个, 这种情况允许 *Hpa* II 剪切, 却不允许 *Msp* I 剪切, 占全部检测位点的 10.5%。总体而言, 这两种小麦材料的甲基化率约为 28.1%。



A, B, C 分别表示位点未甲基化, 半甲基化和全甲基化。H1, H2, H3, H4, H5, H6 和 M1, M2, M3, M4, M5, M6 分别表示接菌前后各个时间点的小麦基因组 DNA 经 *Eco*R I-*Hpa* II 和 *Eco*R I-*Msp* I 酶切得到的片段。H1, H2, H3, H4, H5, H6 和 M1, M2, M3, M4, M5, M6 are amplification fragments after digestion with *Eco*R I-*Hpa* II and *Eco*R I-*Msp* I respectively.

图2 聚丙烯酰胺电泳图谱, 共有三种带型  
Fig.2 MSAP band of unmethylated(A), hemimethylated(B) and fully methylated(C) sites

无论在亲和互作还是在非亲和互作中都没有检测到明显的接菌前后的差异, 但我们得到了和接菌无关的 TcLr19 以及其感病亲本 Thatcher 之间的差异, 这种差异的存在可能是由于二者基因组 DNA 之间的序列差异, 而不是基因组 DNA 甲基化引起的。

3 讨论

DNA 甲基化在植物发育过程中起着重要的调节作用, 甲基化是调节植物特定器官发育和生育时期进程的重要组成部分<sup>[2]</sup>。春化作用是植物受低温诱导而开花的自然现象, 最近有研究表明, 春化作用也受到 DNA 甲基化的调节。有一种假说认为, 春化作用是由于控制开花时间转变的关键基因启动子区域的去甲基化而产生, 这种假说在烟草和拟南芥中已得到

证实<sup>[21, 22]</sup>。MSAP 已经在不同作物中用于基因组甲基化研究并且显示出其对于大规模胞嘧啶甲基化检测的高效性<sup>[9-12]</sup>。

既然基因组 DNA 甲基化是基因表达调节的一种主要方式, 而且受到低温和重金属离子等环境因素的影响。那么在病原菌与寄主互作的过程中有大量的基因被诱导表达, 是否其中的一部分也会受到甲基化的调节还不是很清楚。能否确定甲基化参与植物与病原菌的互作, 或者参与它们之间的信号转导就变得尤为重要。

本研究使用的栽培材料具有特殊的近等基因系背景, 对试验中使用的叶锈菌生理小种的侵染表型分别显示有感病、高抗。我们利用 MSAP 技术, 首次进行了小麦近等基因系 TcLr19 及其感病亲本 Thatcher 的基因组 DNA 在接菌前后 CCGG 位点上的甲基化模式分析。旨在证实甲基化在植物与真菌的亲亲和非亲和互作中所扮演的角色。

我们用 60 对引物分别筛选了接菌前后不同时间点的全基因组 DNA, 但并没有见到有明显区分的差异。在统计条带时, 由于测序 DNA 凝胶条带的上部和下部分不够清晰, 也就没有统计在内。虽然在筛选的过程中, 发现了不少的差异点, 但在随后的 3 次生物学重复工作中, 并没有得到很好的确认。比较有趣的是研究获得的差异, 除了接菌前后的差异之外还存在接菌 0 h 与未接菌之间的差异, 出现这种结果的可能原因之一是, 发育调节的甲基化和去甲基化位点的存在干扰了我们的工作。这可能意味着虽然在相同条件播种的麦苗有着近似的表型, 但基因组的甲基化形式仍然存在着千差万别。这也给我们的工作带来了一定的困难。

由于我们没有在试验中检测到稳定并清晰的接菌前后 DNA 甲基化位点的变化, 所以只能认为 TcLr19 及其感病亲本 Thatcher 的非亲和以及亲和互作并不影响小麦基因组甲基化的模式。但这些不能说明甲基化不参与植物和病原菌的互作, 这也可能和筛选的引物相对较少有关, 也可能在具有其他侵染型的锈菌的互作中或者其他病原菌的互作中扮演一定角色。我们接下来要做的工作是增加引物数量, 继续扩大基因组筛选范围, 同时扩大群体, 筛选各种互作类型(抗萌发、抗侵入、抗扩展、HR、慢锈性、温敏、成株抗性等)下的小麦基因组, 同时弄清楚小麦与叶锈菌互作对参与甲基化的酶表达谱的影响, 以明确植物甲基化位点是否受生物胁迫的影响。

#### 参考文献:

[1] Jost J P, Saluz H P. DNA methylation; molecular biology and

biological significance [M]. Cance Springer-Verlag, Basel, 1993.

- [2] 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.
- [3] Haz T A, Anjum M A, Grewal A G, *et al.* DNA methylation: an essential mechanism in plant molecular biology [J]. Acta physiol Plant, 2001, 23: 491—499.
- [4] Martienssen R A, Colot V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi [J]. Science, 2001, 293: 1070—1074.
- [5] Paszkowski J, Whitham S A. Gene silencing and DNA methylation processes [J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4: 123—129.
- [6] Wassenege M. RNA-directed DNA methylation [J]. Plant Mol Biol, 2000, 43: 203—220.
- [7] Xu M L, Li X Q, Korban S S. AFLP-based detection of DNA methylation [J]. Plant Mol Biol Rep, 2000, 18: 361—368.
- [8] 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 [J]. Mol Gen Genet, 1997, 253: 703—710.
- [9] Madlung A, Masuelli R W, Watson B, *et al.* Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic Arabidopsis allotetraploids [J]. Plant Physiol, 2002, 129: 733—746.
- [10] 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]. Mol Gen Genet, 1999, 261: 439—446.
- [11] 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.
- [12] Sherman J D, Talbert L E. Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat [J]. Genome, 2002, 45: 253—260.
- [13] Sha A H, Lin X H, Huang J B, *et al.* Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis [J]. Mol Gen Genomics, 2005, 273: 484—490.
- [14] 贾继增. 小麦的抗叶锈基因及抗原 [J]. 国外农学-麦类作物, 1990(2): 32—34.
- [15] Denissen C J M. Influence of race and post infection temperature on two components of partial resistance to wheat leaf in seedlings of wheat [J]. Euphytica, 1991, 58(1): 13—20.
- [16] Komer J A. Genetics of resistance to wheat leaf rust [J]. Annu Rev Phytopathol, 1996, 34: 435—455.
- [17] 白志英, 王冬梅, 侯春燕, 等. 小麦叶锈菌侵染过程的显微和超微结构 [J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(6): 393—397.
- [18] 黄国红, 康振生, 朱之育, 等. 小麦叶锈菌在感病寄主上发育的组织病理学和超微结构研究 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(1): 52—56.
- [19] 黄国红, 王 瑶, 康振生, 等. 小麦品种及单基因系与叶锈菌互作的组织学和超微结构研究 [J]. 西北农林科技大学学报. 自然科学版, 2003, 31(2): 45—49.
- [20] 杨文香. Lr37、Lr44 AFLP 分子标记及 124 个小麦品种(系)抗叶锈基因鉴定 [D]. 保定: 河北农业大学, 2003.
- [21] Bum J E, Smyth D R, Peacock W J, *et al.* Genes controlling late flowering in *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetics, 1993, 90: 147—155.
- [22] Finnegan E J, Genger R K, Kovac K, *et al.* DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization [J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 5824—5829.