

多倍体小麦物种形成可诱发稳定遗传的胞嘧啶甲基化变异*

刘宝胡波 董玉柱 刘振兰 何孟元

(东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024)

摘要 多倍体小麦及其二倍体祖先物种的基因组 DNA 经一对同位酶 (*Hpa* II / *Msp* I) 消化后, 与 21 个不同类型的低拷贝 DNA 序列进行 Southern 杂交. 结果发现, 多倍体小麦实现物种形成后产生了广泛的胞嘧啶甲基化变异. 用同样的 21 种 DNA 序列为探针与 1 个人工合成的六倍体小麦及其亲本的 Southern 杂交结果表明, 甲基化变异已存在于该人工小麦的较早期自交世代 (S_5 , S_6 和 S_7). 而且, 在 3 个自交世代每代随机选取的 3 个单株之间的限制性酶切片段长度多态 (RFLP) 谱带均表现为高度一致; 这暗示甲基化变异可能发生得更早, 或者, 甲基化变异具有非随机性. 变化后的 RFLP 谱带在 3 个自交世代间表现为稳定遗传. 甲基化变异虽在整个基因组范围内发生, 但可能具有序列特异性. 对这种迅速发生的甲基化变异与异源多倍体基因组进化的两个重要属性即遗传二倍化和基因分化之间的可能关系进行了讨论.

关键词 小麦 异源多倍体物种形成 基因组进化 后生遗传变异 胞嘧啶甲基化

DNA 甲基化特别是胞嘧啶甲基化在真核生物基因组中十分普遍. 虽然其确切功能尚不十分清楚, 最新的观点认为胞嘧啶甲基化至少在调控基因表达和基因组防御两个方面具有重要作用^[1,2]. 目前已知许多因素可诱发胞嘧啶甲基化的变异, 如转基因可导致其本身及其宿主中同源序列的甲基化而发生基因沉默^[3]. 植物离体培养也能够诱发甲基化变异, 后者成为产生体细胞克隆变异的主要原因之一^[4]. 最近研究还发现, 哺乳动物的种间杂交和常规的水稻品系间杂交均产生了大量的胞嘧啶甲基化变异^[5,6].

虽然异源多倍体是许多高等植物包括多种重要作物的物种形成方式, 但人们对伴随异源多倍体形成过程中基因组变异的性质和作用知之甚少. 近年来在油菜、小麦和棉花等作物上的研究发现, 在异源多倍体形成的早期世代即发生了大量的 DNA 水平上的变异^[7~11]. 这些变异常被认为是核苷酸序列上的改变, 亦即属于基本上不可逆的遗传变异. 为研究异源多倍体物种形成是否也可诱发另外一种变异即后生遗传变异 (epigenetic changes), 我们以普通小麦为材料进行了本文的研究工作. 结果表明, 异源多倍体物种形成也诱发了后生遗传变异, 即可稳定遗传的胞嘧啶甲基化变异.

1999-10-24 收稿, 1999-12-10 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 39870425)

1 材料和方法

1.1 植物材料

具有代表性的多倍体小麦:普通小麦中国春(*T. aestivum* L. em Thell, var. *aestivum*, CS), 四倍体栽培小麦(*T. turgidum* L. var. *durum*, Inba, TTR04), 四倍体野生小麦(*T. turgidum* L. var. *dicoccoides*, TTD09)和四倍体提莫非维小麦(*T. timopheevii* L. var. *araticum*, TIA01). 二倍体祖先种:*T. urartu* Tumaniam ex Gandilyam var. *albonigrum* (TMU36, TMU41), *Aegilops speltoides* Tausch var. *typica* (TS01, TS19)和 *Aegilops tauschii* Coss var. *typica* (TQ01, TQ08 和 TQ20); 它们分别为多倍体小麦 A, B 和 D 基因组的供体^[12]. 1 个人工合成的六倍体小麦 *T. aestivum* var. *aestivum*(基因组 AABBDD, XX340)及其亲本 *T. turgidum* var. *dicoccoides*(基因组 AABB, TTD09)和 *Ae. tauschii* var. *typica*(基因组 DD, TQ01). 所有植物材料均取自以色列 Weizmann Institute of Science 的种质库.

1.2 DNA 序列

共选用了 21 个低拷贝 DNA 序列,包括 13 个部分同源群专化 cDNA 序列(分别源自大麦、燕麦或小麦的 cDNA 文库);4 个部分同源群专化的基因组 DNA 序列(源自一个小麦基因组 DNA 文库)和 4 个普通小麦 B-基因组染色体专化 DNA 序列(源自一个小麦基因组 DNA 文库或源自一个显微切割的染色体臂(5BL)亚基因组文库). 部分同源群专化序列代表普通小麦 A, B 和 D 基因组中 14 个部分同源染色体臂群中的 10 个;4 个 B-基因组染色体专化序列则分别定位于 B-基因组 7 条染色体的 5 条上. 以上 DNA 序列分别来自 Johnne Innes Center 的 M. D. Gale 实验室、Cornell University 的 M. Sorrells 实验室和 Weizmann Institute of Science 的 M. Feldman 实验室.

1.3 限制性酶切片段长度多态性(RFLP)分析和数据分析

选择生育期一致的单株叶片按 CTAB 法提取基因组 DNA^[13],并用 1 对同位酶即 *Hpa* II 或 *Msp* I 消化. 为保证酶切完全,酶量增至常量的 3 倍,且进行两次连续酶切:即第一次酶切后,用乙醇沉淀 DNA,经酚/氯仿抽提后溶解于无菌水中,然后加入新酶液进行二轮酶切. Southern 印迹,探针标记、分子杂交、杂交后洗脱及放射自显影均同前述^[13]. 数据分析根据 Nei 和 Li 提出的模型^[14],计算出所有成对组合的相似性数值,并由此计算出遗传距离.

2 结果

2.1 天然多倍体小麦中富含胞嘧啶甲基化变异

Hpa II 和 *Msp* I 识别相同的酶切位点 CCGG(真核生物中主要的甲基化位点),但对甲基化敏感程度不同. *Hpa* II 对内、外侧胞嘧啶甲基化均敏感,即不能消化含^mCCGG, C^mCGG 或^mC^mCGG 的位点;而 *Msp* I 只对外侧胞嘧啶甲基化敏感,即仅不能消化含^mCCGG 或^mC^mCGG 的位点^[15]. 此外,由于绝大多数甲基化发生在内侧胞嘧啶,因此, *Hpa* II 比 *Msp* I 对甲基化敏感. 对于一个特定的物种/序列组合, RFLP 谱带在两种酶切之间的差异即由特定位置胞嘧啶甲基化变异所致. 利用上述 21 个 DNA 序列为探针,对经 *Hpa* II/*Msp* I 消化的各种天然多倍体小麦及其二倍体祖先物种 DNA 的 Southern 杂交结果表明,对于多数所研究的序列,某一多倍体小麦与其任何一个二倍体祖先物种之间 *Hpa* II 酶切比 *Msp* I 酶切都具有明显高的多态性(如

图 1 所示)。这说明,多倍体小麦形成后产生了大量的胞嘧啶甲基化变异。

我们计算了各种多倍体小麦与其每种可能的二倍体祖先之间的遗传距离并列于表 1 中。不难看出,在任何一个多倍体/二倍体组合中, *Hpa* II 酶切所产生的遗传距离总是高于相应的 *Msp* I 酶切,进一步证实天然多倍体小麦富含胞嘧啶甲基化变异。

表 1 基于 1 对同位酶 (*Hpa* II / *Msp* I) 酶切和 21 个 DNA 序列所计算的每种多倍体小麦与其每个可能的二倍体祖先的遗传距离^{a)}

	<i>T. urartu</i> var. <i>albonigrum</i>		<i>Ae. speltoides</i> var. <i>typica</i>		<i>Ae. tauchii</i> var. <i>typica</i>	
	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I
<i>T. aestivum</i> var. <i>aestivum</i>	0.621 9	0.338 7	0.743 6	0.460 7	0.668 6	0.451 9
<i>T. turgidum</i> var. <i>durum</i>	0.636 1	0.310 3	0.760 7	0.441 7	0.708 7	0.456 8
<i>T. turgidum</i> var. <i>dicoccoides</i>	0.495 8	0.311 9	0.681 0	0.460 5	0.668 6	0.475 0
<i>T. timopheevii</i> var. <i>araraticum</i>	0.575 2	0.316 3	0.608 0	0.417 0	0.721 1	0.441 7

a) 数据为每个二倍体物种 2 或 3 个种群所计算的平均值

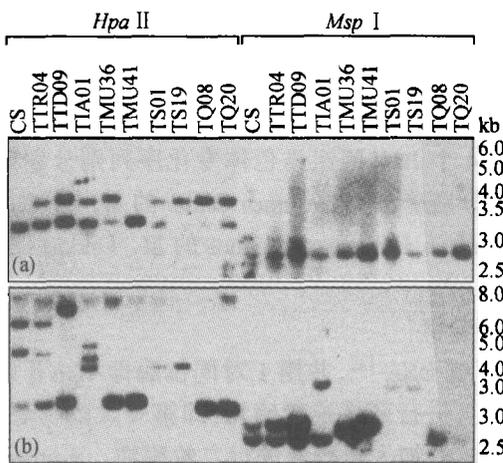


图 1 天然多倍体小麦的胞嘧啶甲基化变异
任何一个多倍体小麦与其任何一个可能的二倍体祖先物种之间的 *Hpa* II 酶切上表现出的 RFLP 多态性都高于相应的 *Msp* I 酶切,说明 CCGG 位点中内侧胞嘧啶甲基化变异。(a)和(b)分别为以序列 BCD442 和 CDO447 为针对同一张膜的杂交结果

2.2 胞嘧啶甲基化变异随异源多倍体形成而迅速产生并在自交世代中稳定遗传

上述结果表明,天然多倍体小麦中富含胞嘧啶甲基化变异。然而,由于这些天然物种已具有数千至数万年历史,因而难以区分异源多倍体形成后所产生的后生遗传变异和二倍体祖先物种中包括后生遗传变异的基因组分化,也不能确定多倍体基因组中这些变异产生的速率。人工多倍体为这些问题的研究提供了一个理想的实验体系。利用这 21 个 DNA 序列对 1 个人工六倍体小麦的 S_5 , S_6 和 S_7 3 个连续自交世代的分析表明,广泛的胞嘧啶甲基化变异已存于这个 5~7 代的人工小麦中,说明甲基化变异是一个迅速发生的过程。在所分析的 21 个序列中,除 1 个序列(CDO426,图 2(b))外,其它的 20 个序列在 3 个自交世代每代所随机选取的 3 个单株间,在变化的 RFLP 谱带上未检测到差异。这种早期自交世代的随机选取的单株间,在变化后的 RFLP 谱带上的高度一致性暗示甲基化变异可能发

生得更早,或者,甲基化变异具有非随机性。与其亲本比较,人工六倍体小麦在所分析的 17 个部分同源群专化序列(包括 cDNA 和基因组 DNA)中,8 个序列表现出胞嘧啶甲基化变异。其中,5 个序列表现为甲基化增加(hypermethylation),3 个序列表现为甲基化减少(hypomethylation)如图 2(a)。在这变异的 8 个序列中,7 个只表现在 *Hpa* II 酶切中,说明甲基化变异只发生在这 7 个序列之中或其紧密相连的两翼序列的内侧胞嘧啶上。只有 1 个序列(CDO426)在 *Hpa* II 和 *Msp* I 2 种酶切中发生了非同步变异(non-concordant variation),说明该序列中或其两翼相邻

序列不同 CCGG 位点的内、外侧胞嘧啶均发生了甲基化变化(图 2(b)). 在这 17 个序列中未发现不同类型序列(cDNA 或基因组 DNA)之间或定位于染色体上不同位置的序列之间在检测甲基化变异频率上的差异, 表明甲基化变异可能是一个发生在整个基因组范围的普遍现象. 然而, 所分析的 4 个 B-基因组低拷贝染色体专化序列的行为却不同, 这 4 个序列无一在双二倍体中检测到甲基化变异. 这说明虽然由异源多倍体化诱发的甲基化变异可能是在整个基因组范围发生的普遍现象, 却可能具有序列特异性. 所观察到的另一个值得注意的结果是, 用这 21 个 DNA 序列为探针, 在 3 个连续自交世代(S_5 , S_6 和 S_7)之间的 RFLP 谱带上只有一个序列(CDO426)检测到了差异, 这说明胞嘧啶甲基化变异可以在自交世代之间稳定遗传. 3 个世代的人工小麦分别与 2 个亲本之间在 2 种酶切上的遗传距离如表 2 所示. 明显可见, 由 *Hpa* II 酶切计算的遗传距离总是高于相应的 *Msp* I 酶切.

表 2 基于 1 对同位酶 *Hpa* II/*Msp* I 酶切和 21 个 DNA 序列所计算的人工六倍体小麦(分别在 S_5 , S_6 和 S_7 自交世代)与其亲本之间的遗传距离

	<i>T. turgidum</i> var. <i>dicoccoides</i>		<i>Ae. tauschii</i> var. <i>typica</i>	
	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I
XX340(S_5)	0.514 5	0.372 1	0.696 3	0.395 3
XX340(S_6)	0.514 5	0.372 1	0.696 3	0.395 3
XX340(S_7)	0.514 5	0.372 1	0.696 3	0.395 3

3 讨论

异源多倍体小麦对复杂多样的环境条件常表现出更广泛的适应性和其它有利的农艺性状^[12]. 显然, 这些特性在很大程度上可归因于其多个基因组的和谐共存和功能上的有序. 然而, 在同一细胞核中基因组的重复会打破二倍体祖先物种在自然选择中长期进化达到的协调. 因此, 在异源多倍体物种形成的早期, 整个基因组范围内在分子水平上的重新调整可能是物种成功形成所必需的. 我们在小麦上的研究发现, 这种调整反映在多种类型且迅速发生的基因组变异上^[8~10]. 最近以普通小麦-天兰冰草部分双二倍体为材料也观察到了类似的基因组变化^[16], 进一步说明这种现象可能具有普遍性. 所有这些基因组变异均被认为是遗传上的变异, 即核苷酸序列一级结构上的改变. 本文研究结果首次表明, 小麦异源多倍体形成时所发生的在分子水平上的基因组重新调整还包括可稳定遗传且非随机发生的

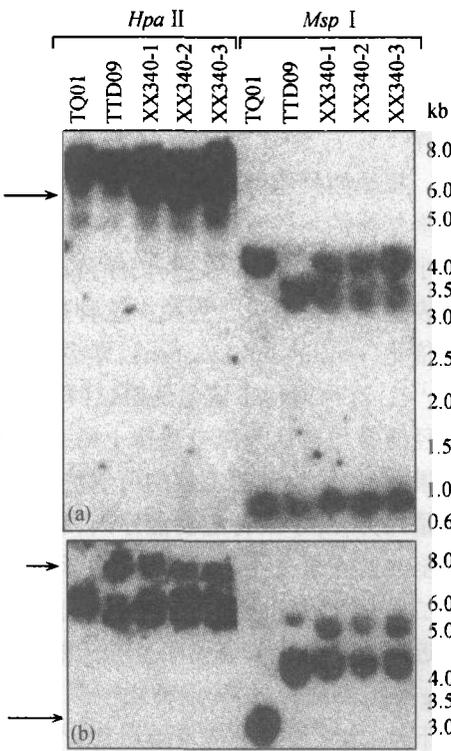


图 2 人工六倍体小麦的胞嘧啶甲基化变异 (a)与亲本比较, 在人工六倍体小麦自交 5 代(S_5)随机选取的 3 个单株的 *Hpa* II 酶切中均含有 1 条新的杂交片段(箭头所示), 而相应的 *Msp* I 酶切中不含有此片段(序列为 Omet-2); (b)TTD09 亲本 1 个杂交片段(短箭头所示)在人工六倍体小麦自交 5 代(S_5)随机选取的 3 个单株之一(XX340-1) *Hpa* II 酶切中拷贝数明显减少, 但在其相应的 *Msp* I 酶切中无此变化. 此外, 在所有 3 个植株的 *Msp* I 酶切中, TQ01 亲本杂交片段(长箭头所示)消失, 但在相应的 *Hpa* II 酶切中无此变化(序列为 CDO426). 以上结果在两次独立的实验中完全一致

后生遗传变异,即胞嘧啶甲基化变异. 变异的 DNA 序列包括定位于不同的部分同源群的不同类型序列(即 cDNA 和基因组 DNA),说明甲基化变异可能会影响到许多编码区和调节区. 然而,有些基因组区域如主要载有低拷贝、非编码的染色体专化序列的区域可能没有发生甲基化变异.

根据两种胞嘧啶甲基化变异即增加和减少均被观察到的结果,我们推测甲基化变异可能与多倍体的一些重要属性有关. 长期的细胞遗传学和近年来的分子遗传学研究结果表明多倍体小麦的构成基因组之间仍保持高度同源性. 因此,当几个基因组综合到一个核中,会发生超量表达的浪费现象. 为减少这种过量的基因表达,多倍体小麦中许多结构基因都发生了遗传二倍化(genetic diploidization),即多倍体中基因的表达水平被减少到与其二倍体祖先相近或相同^[17]. 这种遗传二倍化是通过两种途径之一来实现的,即基因沉默或基因剂量补偿. 这两种途径通常均被认为源自遗传上的变异,而且是在长期进化过程中完成的^[17]. 根据本文的研究结果,我们认为迅速发生的可遗传胞嘧啶甲基化增加变异可能是遗传二倍化的一种有效途径. 这是因为,对于某特定功能序列,编码区或调节区甲基化程度的提高会降低该基因的表达水平甚至使其完全失活. 而且,这种影响可能还会扩及其相邻基因^[18]. 因此,至少部分基因的遗传二倍化有可能是一个基于后生遗传变异实现的迅速过程. 支持这种推测的一个间接证据是新近形成的人工多倍体小麦与天然多倍体小麦之间在甲基化变异上具有一致性. 最近, Rieseberg 等人发现,二倍体杂种物种形成时相伴产生的基因组变异在物种形成的早期世代即被固定下来,之后稳定地遗传给后代^[19,20]. 本文所发现的在小麦异源多倍体形成早期世代所产生的后生遗传变异,也可能因其具有适应价值而在进化过程中通过自然选择被保持下来.

异源多倍体物种另外一个重要的特性是基因分化(gene diversification),即基因在剂量上的重复使得部分复等位基因可以分化成具有不同功能的新基因^[12]. 多倍体的这一属性也通常被认为是在漫长的进化过程中实现的. 本文所研究的胞嘧啶甲基化变异可能促进这一过程的实现. 如甲基化减少变异有可能使正常情况下由于启动子区甲基化而保持沉默的转座子(反转座子)激活,进而可诱发新的遗传变异^[18]. 而甲基化增加变异则可能诱发点突变,即由于甲基化的胞嘧啶易于通过脱氨基化在错配修饰后产生 C→T 或 G→A 的碱基转换. 显然,开始时产生的可逆的甲基化变异可导致不可逆的遗传变异. 这些伴随异源多倍体物种形成所迅速产生的遗传和后生遗传变异无疑可作为自然选择及适应性进化的原材料,进而有助于异源多倍体物种在进化上的成功.

致谢 感谢 Feldman 教授对本工作的指导和提供有关实验材料. 本文初稿承蒙郝水院士和 E. Millet 博士审阅并提出修改意见,谨致谢意.

参 考 文 献

- 1 Richards E J. DNA methylation and plant development. *Trend Genet*, 1997, 13: 319
- 2 Yoder J A, Walsh C P, Bestor T H. Cytosine methylation and ecology of intragenomic parasites. *Trend Genet*, 1997, 13: 335
- 3 Matzke A A, Matzke A J M, Eggleston W B. Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? *Trend Plant Sci*, 1996, 11: 382
- 4 Phillips R L, Kaeppler S M, Olhoft P. Genetic instability of plant tissue culture: breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci*

- USA, 1994, 91: 5 222
- 5 O'Neill R J W, O'Neill M J O, Granes J A M. Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodeling in an interspecies mammalia hybrid. *Nature*, 1998, 393: 68
 - 6 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 technique. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 439
 - 7 Song K M, Lu P, Tang K, et al. Rapid genome changes in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7 719
 - 8 Feldman M, Liu B, Segal G, et al. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, 1997, 147: 1 381
 - 9 Liu B, Vega J M, Abbo S, et al. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy non-coding DNA sequences. *Genome*, 1998, 41: 272
 - 10 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. *Genome*, 1998, 41: 535
 - 11 Wendel J F, Schnabel A, Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 280
 - 12 Feldman M, Lupton F G, Miller T E. Wheats. In: Smartt J, Simmonds N W, eds. *Evolution of Crop Plants*. London: Longman Group, 1995, 184
 - 13 Liu B, Segal G, Vega J M, et al. Isolation and characterization of chromosome-specific DNA sequences from a chromosome arm genomic library of common wheat. *Plant J*, 1997, 11: 959
 - 14 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 5 269
 - 15 Nelson M, McClelland M. Site-specific methylation effect on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res (Suppl)*, 1991, 19: 2 045
 - 16 Liu B, He M Y, Hao S. Study on genomic changes in partial amphiploids of common wheat-wheatgrass. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41: 591
 - 17 Soltis D E, Soltis P M. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Crit Rev Plant Sci*, 1993, 12: 243
 - 18 Henikoff S, Matzke M A. Exploring and explaining epigenetic effects. *Trend Genet*, 1997, 13: 293
 - 19 Rieseberg L H, Van Fossen C, Desrochers A M. Hybrids speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers. *Nature*, 1995, 375: 313
 - 20 Rieseberg L H, Sinervo B, Linder C R, et al. Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids. *Science*, 1996, 272: 741