

利用大麦寡核苷酸芯片分析小麦种间杂交种与亲本之间根系基因表达谱*

张银红** 倪中福** 姚颖垠 赵军 孙其信***

中国农业大学植物遗传育种系, 农业生物技术国家重点实验室, 北京市作物遗传改良重点实验室,
农业部作物基因组与遗传改良重点实验室, 北京 100094

摘要 大量报道表明, 杂种优势的形成与杂种一代中亲本基因的表达方式改变有关. 为了深入研究小麦杂种优势形成机理, 分析了小麦种间杂交种 3338/2463 在分蘖盛期地上部以及 9 个根系性状的杂种优势. 结果表明总根长、根表面积、根体积、根干重和叶干重等 5 个性状表现明显的杂种优势. 在测定小麦种间杂交种 3338/2463 根系性状杂种优势基础上, 利用大麦寡核苷酸芯片, 研究了上述杂交种与其亲本之间根系基因差异表达. 结果发现, 有 1187 个基因在杂种与亲本之间存在表达差异. 差异表达模式可以分为 8 种类型, 即杂种特异型、杂种沉默型、亲本特异型、亲本沉默型、杂种上调型、杂种下调型、杂种偏高亲和杂种偏低亲. 利用半定量 RT-PCR 技术对 14 个差异表达基因的表达模式进行验证, 发现 9(64.29%) 个基因与芯片的表达类型完全一致. 利用 GeneOntology 分析对差异表达的基因进行分类, 表明差异表达基因涉及植物生长代谢的各个过程. 将差异表达基因进行电子定位分析, 发现差异表达基因散布在小麦的各条染色体的 Bin 上, 分布在第一到第七部分同源群上的差异表达 ESTs 分别为 158, 148, 121, 140, 132, 94, 127 个.

关键词 小麦 杂种优势 大麦芯片 基因差异表达

利用杂种优势是提高小麦产量的一条有效途径, 但对杂种优势的形成机理, 特别是分子机理的认识却十分有限^[1]. 最近的研究表明, 杂种优势的形成可能与亲本基因在杂种一代中的表达方式改变有关^[2]. 以水稻、小麦和玉米为材料研究发现, 杂交种与亲本之间的基因差异表达模式与杂种优势存在显著的相关关系^[3-6]. 我们曾研究发现小麦杂交种和亲本间基因表达上发生了明显的改变, 存在杂种特异表达、亲本基因在杂种一代沉默等多种差异表达模式^[1,6-8]. 因此, 系统分析杂种一代表达改变的基因类别及其功能对揭示杂种优势机理有重要意义. 但是, 目前从水稻、玉米、小麦中分离克隆的杂种与亲本差异表达基因

片段数目很少, 因此有必要大量分离克隆杂交种与亲本差异表达基因, 以期从全基因组水平上研究差异表达基因及其表达模式.

基因芯片技术是一种研究基因差异表达的高通量技术, 能够比较全面地揭示不同样本之间的基因差异表达情况, 可同时对数以千计的基因进行研究, 不仅效率高、而且得到的结果可比性也强. Affymetrix 公司设计的寡核苷酸芯片具有重复性好, 且具有杂交特异的优点, 已经获得了广泛应用. 利用 Affymetrix 的大麦寡核苷酸芯片, 可以在全基因组水平上了解杂交种与亲本基因差异表达的模式、数目以及这些差异表达基因如何参与生理

2005-07-22 收稿, 2005-10-14 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划(2001CB1088)、国家杰出青年科学基金(批准号: 39925026)和国家自然科学基金(批准号: 30270824)资助项目

** 同等贡献作者

*** 通讯作者, E-mail: qxsun62@public.bta.net.cn

代谢途径。

过去几十年中,人们对杂种优势机理的研究主要围绕着产量等对人们“有利”的性状,而这些性状遗传发育过程相当复杂,在一定程度限制了对杂种优势机理的认识。根系是植物从环境中吸收水分和养分的重要器官,李晋生等的研究发现,和普通小麦相比,杂交小麦不同发育时期的根系垂直分布具有以下两个特点:相同层次中杂交小麦的根系生物量高,表现为杂种优势;深层根的比例增加,这可能与杂种小麦具有较强的抗逆能力相关^[9],但是对根系杂种优势分子水平的研究仍很有限。王章奎利用 DDRT-PCR 的方法研究小麦 4×5 双列杂交组合根系基因差异表达,发现平均有 27.54% 的片段表达量存在差异¹⁾。根系所有组织和细胞类型都是从一个顶端分生组织来的,因此在结构上是相对简单的,特别适合进行发育机理的研究。据此,我们提出以“遗传发育相对简单的根系”作为模式性状开展研究,将有助于加深对小麦杂种优势分子机理的认识。

本研究利用 Affymetrix 公司研制的大麦芯片,以杂交种 3338/2463 及其亲本为材料,对杂交种与亲本根系中的基因差异表达进行系统分析,并利用生物信息学方法对差异表达基因进行了电子定位。

1 材料和方法

1.1 实验材料和培养条件

以普通小麦 (*Triticum aestivum* L. $2n=6x=42$, AABBDD) 品系 3338 和斯卑尔脱小麦 (*Triticum spelta* L. $2n=6x=42$, AABBDD) 品系 2463 及其种间杂交种 3338/2463 为实验材料。每份材料的种子在 4℃ 低温处理 3 d, 然后种在蛭石中, 放入温室 (日温 20℃, 夜温 18℃; 光照: 16 h/d) 培养, 每周浇一次营养液^[10]。种植 45 d 后对处于分蘖盛期的根系进行性状测定, 取同一时期的根系用于 RNA 的提取。

1.2 根系杂种优势性状的测定

将分蘖盛期的根系用水清洗, 把每条根放入装有双蒸水的有机玻璃盘 (30 cm×20 cm) 中, 分开侧根, 防止重叠, 然后进行扫描。利用 Yabba^[11] 和 Frahm

等^[12]改良的方法和 WinRHIZOTM (WinRHIZO, Regents Instruments Inc., 2001, Quebec, Canada) 软件分析根系的物理特性, 包括总根数、总根长、根表面积、根直径、根体积, 每个材料 3 个重复。另外, 最长根长、主根数采用手工测定, 每个材料 6 个重复。将地上部和根系在 120℃ 下杀青 30 min, 然后在 80℃ 放置 24 h 烘干测定干重, 并计算根冠比。各性状的中亲优势和超亲优势用下面的公式计算: 中亲优势 (MPH)% = (F1-双亲平均)/双亲平均; 超亲优势 (BPH)% = (F1-最好的亲本)/最好的亲本。

1.3 大麦芯片杂交

(1) 大麦寡核苷酸芯片: 在设计上 Affymetrix 的芯片采用 25 bp 寡核苷酸探针, 保证最高特异性, 减少二级结构及其对杂交结果的影响并且杂交温度均一, 提高杂交效率。并且独创的 11 对 PM-MM (PM, 即 Perfect Match 代表完全匹配探针, MM, 即 Mismatch 代表中心一个碱基改变后不完全匹配探针) 探针设计有效地扣除了芯片上面的背景。大麦的基因组序列不完全, 所以大麦芯片上的 21439 个基因来源于已公开的 84 个 cDNA 文库中 350000 条高质量的 ESTs 以及国家生物信息中心 (the National Center for Biotechnology Information) 非冗余数据库中的 1145 个大麦基因序列。

(2) RNA 的提取和表达探针制备: RNA 提取采用 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), 反转录按照 SuperScript II 试剂盒 (Invitrogen) 说明书进行, 体外转录按照 RNA Transcript Labeling Kit (Affymetrix) 说明书进行, 同时进行生物素标记合成 cRNA 探针。

(3) 芯片杂交、洗脱、染色及检测: 合成的 cRNA 探针经片段化处理后用于与基因芯片 (Affymetrix 公司, 22K Barley1 GeneChip) 杂交。利用 Affymetrix 公司生产的专用设备“基因芯片检测工作站” (work station) 进行芯片的杂交、洗脱、染色及检测^[13-15]。

(4) 基因芯片检测数据的处理: 利用 Microarray Suite Version 5.0 等软件对芯片扫描所得数据进行计算和处理。其过程是: 先对每张芯片的数据进行标准化, 然后分别对杂种 3338/2463 与 3338, 2463 与

1) 王章奎. 普通小麦杂交种与亲本间根系基因表达差异与杂种优势分子机理. 中国农业大学博士学位论文, 北京, 2004

3338 以及杂种 3338/2463 与 2463 进行比较分析, 最后综合 3 组数据, 找出在 3 个材料中至少有一个材料表达且任意两者之间存在差异的表达基因。

1.4 cDNA 合成

cDNA 合成反应总体系为 20 μ L, 反应条件为: 总 RNA 2 μ g, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 50 μ mol/L dNTPs, 锚定引物 50 pmol, Rnase 抑制剂 20 U, MMLV 反转录酶 200 U, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h. 同时各取 2 μ L 反应产物用于两次显示 PCR 扩增, 以降低 PCR 过程中的假阳性干扰。

1.5 半定量 RT-PCR

针对 14 个大麦芯片上的 EST 片段, 利用 BLASTN 对 dbEST 进行同源性搜索, 选取与其核苷酸相似性最高的小麦 EST, 根据其序列利用 DNAMAN 设计特异引物, 进行 PCR 扩增. RT-PCR 反应总体积为 20 μ L, 包括反转录产物 2 μ L, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 0.001% gelatin, 200 mmol/L dNTPs, 基因特异引物 10 pmol, Taq DNA 聚合酶 1 U. PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 38 个循环的程序为 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 退火温度(根据引物的 T_m 值而定) 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 最

后 72 $^{\circ}$ C 10 min. 为防止 PCR 扩增到达平台期, 分别检测 25, 28, 30 个循环时基因的表达情况. 每个样品重复 3 次. 对照选用小麦 β -Actin 基因, 引物序列为:

Actin-L: 5'-CAGCAACTGGGATGATATGG-3';
Actin-R: 5'-ATTTTCGCTTTCAGCAGTGGT-3'.

2 结果

2.1 小麦根系性状杂种优势分析

将杂交种 3338/2463 与亲本自交系 3338 和 2463 在温室中蛭石培养, 45 d 后测定了地上部干重、根系的 8 个性状(总根长、根表面积、根直径、根体积、总根数、根干重、最长根长、主根数)以及根冠比, 计算各性状的中亲优势与超亲优势并进行 T 检验分析. 结果表明, 两个根系性状(根表面积, 根干重)的中亲优势分别为 96.64% 和 75.30%, 达到极显著水平 ($P < 0.01$), 超亲优势分别为 66.21% 和 53.97%, 达到显著水平 ($P < 0.05$), 总根长和根体积的中亲优势达到显著水平 ($P < 0.05$). 另外, 地下部和地上部生物量的中亲优势分别为 75.30% 和 39.94%, 可见根系性状的杂种优势比地上部叶片干重更为明显(表 1).

表 1 小麦 3338/2463 组合分蘖盛期根系性状杂种优势分析

杂种优势/%	性状									
	总根长 /cm	根表面积 /cm ²	根直径 /cm	根体积 /cm ³	总根数	根干重 /g	叶干重 /g	最长根长 /cm	主根数	根冠比
中亲优势	104.08*	96.64**	-8.11	80.72*	101.48	75.30**	39.94**	6.71	25.71	22.16
超亲优势	70.89	66.21*	-15.00	60.24	74.59	53.97*	16.24*	11.32	22.22	15.43

** 显著性差异水平为 $P < 0.01$; * 显著性差异水平为 $P < 0.05$

2.2 大麦芯片检测的质量判断

以杂种和亲本根系为实验材料, 与大麦芯片进行杂交, 图 1 是 3338 的 cRNA 与大麦芯片杂交后部分扫描图. 从图中可以看出, 芯片中间的“十”字(图 1(a))、四角的点以及“Barley1”字样(图 1(b))清晰可见, 四周的点线分布均匀. 进一步分析了 3 张芯片与质量控制有关的数据, 包括背景值、噪音值, 发现两者的变异幅度很小(表 2), 另外, 外加的阳性对照 BIOC, BIOB, BIOD 也都能检测到(表 2). 以上这些情况说明, 基因芯片的质量、样品 RNA 的质量以及杂交、检测体系均良好, 芯

片检测的结果是可靠的.

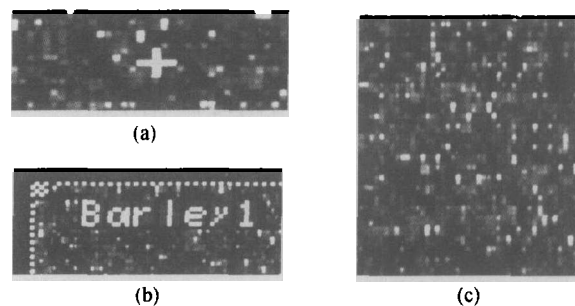


图 1 3338 的 cRNA 与大麦芯片杂交后扫描图

(a) 芯片质控的中心“十”字; (b) 芯片一角及“Barley1”字样; (c) 芯片部分扫描图片

表2 3338 与 大麦芯片杂交的质量检测^{a)}

背景值	平均值: 55.25		标准差: 1.20		最小值: 52.10		最大值: 57.60	
噪音值	平均值: 2.12		标准差: 0.13		最小值: 1.70		最大值: 2.40	
外标:								
探针	信号值 (5')	表达检 测(5')	信号值 (中)	表达检 测(中)	信号值 (3')	表达检 测(3')	信号值 (全长)	信号值 (3'/5')
AFFX-BIOB	72.5	表达	45.6	表达	38.2	表达	52.08	0.53
AFFX-BIOC	129.1	表达			100.5	表达	114.79	0.78
AFFX-BIOD	118.1	表达			652.5	表达	385.29	5.53
AFFX-CRE	1380.5	表达			2651.1	表达	2015.83	1.92

a) BIOB, BIOC 和 BIOD 是体外转录途径中参与生物素合成的外标基因, CRE 是来源于 P1 抗生素的重组基因, 用于芯片杂交中评估样品的杂交效率

2.3 大麦芯片的检测结果

利用 Data Mining Tool (Affymetrix, Version 2.0) 对亲本 3338, 2463 和杂交种 3338/2463 根系与 大麦芯片杂交检测结果进行分析, 结果显示, 在 22840 个探针中, 7074 个在 3338 中检测到信号, 占总数的 31%; 在杂交种 3338/2463 中检测到 6625 个, 占总数的 29%; 在 2463 中检测到 6695 个, 占总数的 29.3%, 有 8808 个基因至少在一个材料中有杂交信号(表 3)。

表3 小麦 3338/2463 组合杂交种和亲本 与 大麦芯片杂交结果

	3338		F1		2463	
	数目	%	数目	%	数目	%
有杂交信号的探针	7074	31.00	6625	29.00	6695	29.30
无杂交信号的探针	15222	66.60	15732	68.90	15637	68.50
杂交信号不确定的探针	544	2.40	483	2.10	508	2.20
总计	22840	100	22840	100	22840	100

分析 8808 个基因在杂种与亲本间差异表达情况, 发现有 1187(13.48%) 个基因在杂种与亲本之间存在表达差异, 其中信号值差异大于两倍的有 259(2.94%) 个。杂种与亲本之间的差异表达模式可以分为 8 种类型: (1) 杂种特异型, 即只在杂交种表达, 两个亲本均不表达; (2) 杂种沉默型, 即在两个亲本中表达, 杂交种不表达; (3) 单亲特异型, 即只在一个亲本表达, 另一个亲本和杂交种不表达; (4) 单亲沉默型, 即只在一个亲本和杂交种表达, 另一个亲本不表达; (5) 杂种上调型, 即在杂交种和亲本都表达, 但杂交种的表达量高于亲本; (6) 杂种下调型, 即在杂交种和亲本都表达, 但杂交种的表达量低于亲本; (7) 杂种偏高亲, 即在杂交种和亲本都表达, 但杂交种的表达量接近于高

表达量的亲本; (8) 杂种偏低亲, 即在杂交种和亲本都表达, 但杂交种的表达量接近于低表达量的亲本。在 1187 个表达差异基因中, 属于上述各表达模式的基因数目分别为 42(3.54%), 70(5.90%), 144(12.13%), 126(10.61%), 221(18.62%), 234(19.71%), 161(13.56%), 189(15.92%)。

2.4 表达差异基因的功能分类

将 1187 个表达差异的基因片段进行 BLASTX 搜索, 结果表明 975 (82.14%) 个基因与已知功能的基因具有较高的氨基酸相似性 ($E \text{ Value} < e^{-10}$), 另外 212(17.86%) 个基因在 GenBank 中搜索不到同源基因(截止到 2004 年 6 月), 因此认为他们可能代表着新的基因, 可能位于基因的 3' 可变区或者片段太短无法找到任何与之同源的基因。

按照 Gene Ontology (GO) 分类法则 (Gene Ontology Consortium, <http://www.geneontology.org>) 对 349 个基因进行功能分类。结果发现, 这些差异表达基因涉及植物生长发育的各个过程, 包括新陈代谢、细胞生长与维持、转录调控、抗逆性等等。其中 147(42.12%) 个主要参与细胞过程, 256(73.35%) 个参与到生理代谢途径, 42(12.03%) 个参与发育进程。进一步分类显示 126 个(36.10%) 基因参与了细胞过程中的细胞生长与维持, 其中 54 个(15.47%) 基因推测为不同类型的转运子, 例如: 胞内转运子、蛋白质转运子、小泡中介转运子等。另外, 227 (65.04%) 个的基因参与新陈代谢, 包括氨基酸及衍生物代谢、生物合成、糖类代谢、异化作用、辅酶代谢、电子转运、脂类代谢、核苷及核酸代谢、蛋白质代谢等, 其中的蛋白质代谢所占比例最高, 达到 33.81%(表 4)。

表4 小麦杂交种与亲本根系差异表达基因的功能分类

种类与亚种类	数目	比例%
1 细胞过程	147	42.12
1.1 细胞交流	33	9.46
1.1.1 细胞粘连	3	0.86
1.1.2 胞间信号传导	4	1.15
1.1.3 信号转导	30	8.60
1.1.4 细胞外刺激响应	1	0.29
1.2 细胞生长与维持	126	36.10
1.2.1 发芽	4	1.15
1.2.2 细胞周期	20	5.73
1.2.3 细胞生长	3	0.86
1.2.4 细胞自我平衡	4	1.15
1.2.5 细胞结构与起源	70	20.06
1.2.6 细胞增殖	13	3.72
1.2.7 转运子	54	15.47
1.3 细胞死亡	7	2.01
2 生理代谢途径	256	73.35
2.1 外界刺激响应	43	12.32
2.1.1 感应外界刺激	3	0.86
2.1.2 非生物刺激响应	27	7.74
2.1.3 生物刺激响应	12	3.44
2.1.4 机械刺激响应	1	0.29
2.1.5 损伤响应	4	1.15
2.2 新陈代谢	227	65.04
2.2.1 氨基酸及衍生物新陈代谢	23	6.59
2.2.2 生物合成	33	9.46
2.2.3 碳水化合物代谢	11	3.15
2.2.4 异化作用	8	2.29
2.2.5 辅酶代谢	1	0.29
2.2.6 电子传递	13	3.72
2.2.7 能量途径	2	0.57
2.2.8 类脂化合物代谢	4	1.15
2.2.9 大分子代谢	2	0.57
2.2.10 新陈代谢复合体营救	2	0.57
2.2.11 其他新陈代谢	6	1.72
2.2.12 氮素代谢	2	0.57
2.2.13 核苷及核苷酸代谢	51	14.61
2.2.14 一碳复合物代谢	2	0.57
2.2.15 氧及抗氧化代谢	1	0.29
2.2.16 磷代谢	1	0.29
2.2.17 蛋白质代谢	118	33.81
2.3 细胞活动力	5	1.43
2.4 细胞增殖	8	2.29
2.5 死亡	2	0.57
2.6 自我平衡	1	0.29
2.7 有机物生理代谢	3	0.86
2.8 内源刺激响应	13	3.72
2.9 刺激响应	1	0.29
2.10 胁迫响应	8	2.29
2.11 分泌过程	5	1.43
2.12 其他生理代谢途径	1	0.29
3 发育	40	11.46
3.1 其他发育过程	8	2.29
3.2 细胞分化	8	2.29
3.3 胚胎发育	18	5.16

续表

种类与亚种类	数目	比例%
3.4 生长	4	1.15
3.5 形态建成	11	3.15
3.6 形态特化	1	0.29
3.7 色素形成	1	0.29
3.8 胚胎后发育	2	0.57
3.9 繁殖	19	5.44
3.10 性别决定	1	0.29
4 其他	82	23.49

2.5 差异表达基因的染色体定位分析

美国小麦功能基因组已经利用中国春缺体四体系、双端体系以及一系列染色体物理缺失系将大约7000个小麦 EST 定位在中国春小麦的染色体上。本研究将差异表达基因序列与这些已经定位的小麦 EST 进行 BLASTN 比对,发现一共有 380 个 EST 与已经定位的 EST 具有较高的核苷酸相似性(90%, E 值 $< e^{-30}$),并且定位到 920 个位点。根据这些已经定位的 EST 在染色体上的位置,发现差异表达基因散布在小麦的各条染色体的 Bin 上。在第一到第七部分同源群的位点数分别达到 158, 148, 121, 140, 132, 94, 127。

2.6 差异表达基因的半定量 RT-PCR 分析

为了验证不同物种间采用芯片进行基因差异表达分析的可行性,利用 BLASTN 对 14 个差异表达基因进行同源性搜索,选取与其同源性最高的小麦 EST,通过半定量 RT-PCR 方法进一步分析了在小麦杂种与亲本的差异表达。将上述片段利用 BLASTX 进行同源性比较(图 2、表 5),从功能推测结果来看,这些基因参与了植物生长发育的多个代谢途径。如表 5 所示,其中 7 个基因(Contig1791_x_at, Contig2461_at, Contig1664_at, Contig10209_at, Contig3914_s_at, Contig1962_at, Contig1471_at)属于杂种上调型,Contig13968_at 为杂种下调型,3 个(Contig12564_at, Contig3163_at, Contig2967_at)属于杂种偏高亲,2 个(Contig2878_at, Contig41_at)属于杂种偏低亲,Contig3463_s_at 为单亲沉默型。另外杂种特异型、杂种沉默型和单亲特异型在 RT-PCR 中未检测到。将 RT-PCR 与芯片的结果进行比较,发现 9 个基因 RT-PCR 与芯片的表达类型完全一致,占 64.29%。

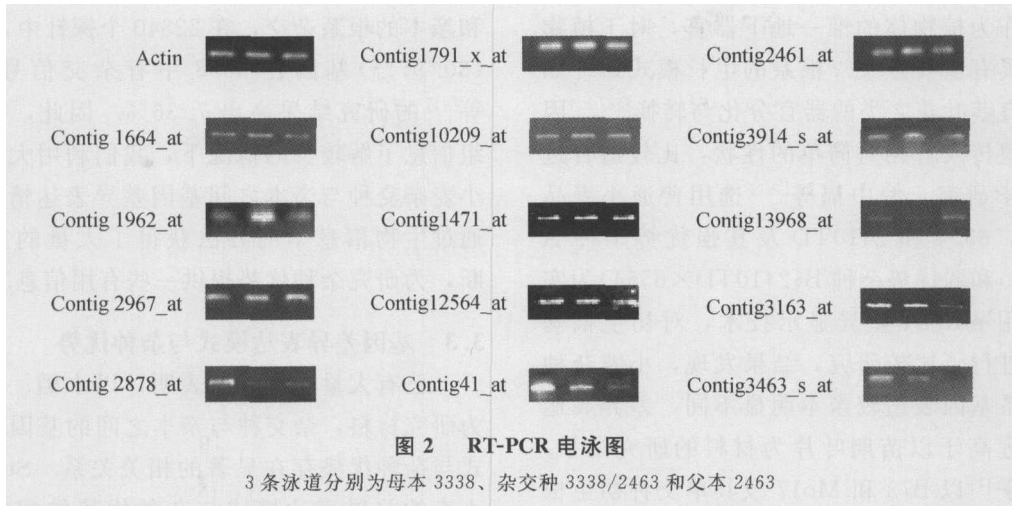


表 5 差异表达基因的半定量 RT-PCR 分析

探针编号	RT-PCR 表达模式	大麦芯片 表达模式	注释
Contig1791_x_at	杂种上调型	杂种上调型	腺苷高半胱氨酸水解酶
Contig2461_at	杂种上调型	杂种上调型	玉米 40S 核糖体蛋白 S13
Contig1664_at	杂种上调型	杂种上调型	水稻 生长素反应因子 2
Contig10209_at	杂种上调型	杂种上调型	生长素调节蛋白
Contig3914_s_at	杂种上调型	杂种上调型	小麦 乙烯反应因子结合蛋白
Contig1962_at	杂种上调型	杂种上调型	水稻 推测 40S 核糖体蛋白 S26
Contig1471_at	杂种上调型	杂种偏低亲	拟南芥 信号接收因子类似蛋白
Contig13968_at	杂种下调型	杂种下调型	水稻 推测第七跨膜蛋白
Contig2967_at	杂种偏高亲	杂种特异型	玉米 β 膨胀素 4
Contig12564_at	杂种偏高亲	单亲特异型	水稻 根中特异蛋白 RCc3
Contig3163_at	杂种偏高亲	杂种沉默型	F-box 蛋白家族
Contig2878_at	杂种偏低亲	单亲沉默型	水稻 β 膨胀素 2
Contig41_at	杂种偏低亲	杂种偏低亲	拟南芥 组蛋白 H3.3
Contig3463_s_at	单亲沉默型	单亲沉默型	水稻 果糖-6-磷酸盐-2-激酶

3 讨论

3.1 小麦根系表现明显的杂种优势

已有许多研究报道表明,小麦杂交一代较亲本具有根量大、根系分布深、发根高峰期长及后期新生根量多的特点,因而增强了杂种的抗逆性,使杂交小麦表现较好的稳产性和较高的产量。但是针对根系性状的杂种优势测定研究较少。本研究利用蛭石培养 45 d 的根系为材料,考察亲本 3338, 2463 和其杂种总根长、根干重等性状并进行杂种优势分析,发现根系比地上部具有更强的杂种优势。其中,根干重的优势表

现出极显著的差异,超亲优势达到 53.97%,根系的主根长和主根数目并没有显著差异,所以杂种根系性状的杂种优势主要体现在侧根数目增加、侧根长度增加。另外,本实验室利用营养液培养 3338/2463 杂交组合,得到了类似的结果,总根长和根干重在中亲优势上表现出极显著差异(未发表结果)。王章奎采用温室营养液培养方法,系统测定了小麦 4×5 双列杂交组合的杂交种与亲本 8 个根系性状的表现,发现根表面积、根平均直径的中亲优势非常明显超过 50%¹⁾。综合上述分析,小麦杂交种在根系性状上表现明显的杂种优势。

1) 见第 301 页脚注 1)

根组织作为植物的惟一地下器官,对于植物的生长发育具有重要意义。根系的生长模式始终如一,并且没有茎叶花之类的器官分化与转换^[16]。因此根系作为遗传发育相对简单的性状,比较适合进行分子生物学研究。倪中福等^[6,7]选用普通小麦品种(系)3338, 6554和2410TD及其强优势杂种A(3338×6654)和弱优势杂种B(2410TD×6554)为实验材料,采用mRNA差异显示技术,对初生根基因表达差异进行了比较研究,结果发现,小麦杂种一代苗期根系基因表达较亲本明显不同,差异表达基因的数目远高于以苗期叶片为材料的研究结果。Romagnoli等^[17]以B73和Mo17及其单交种初生根根尖为材料,从杂交种cDNA文库中筛选到3个在杂交种与亲本间差异表达的克隆。他们还对杂交种和亲本的poly(A)RNA分别进行了离体翻译,结果发现有33%的差异表达产物在杂交种中更丰富或特异表达。因此差异表达基因的功能分析为阐明基因差异表达与杂种优势形成提供了十分重要的证据。

3.2 利用大麦芯片研究小麦基因表达的可行性

近年来,分离差异表达基因的技术不断发展与完善,出现了mRNA差异显示技术(DDRT-PCR)、cDNA扩增片段长度多态性技术(cDNA-AFLP)、抑制性消减杂交(SSH)等,并且这些方法已得到广泛应用,成功分离了许多差异表达的基因。但是,上述实验方法存在假阳性较高,重复性较差,敏感度低的缺点。目前,Affymetrix公司生产的寡聚核苷酸芯片具有可重复,灵敏度高以及准确性好的特点,开始用于基因表达的研究^[18-20]。寡聚核苷酸芯片针对每个基因设计11对探针,每对探针分别由PM(完全配对的探针)和MM(中间一个碱基突变的探针)组成,每个探针长度为25bp。这种设计可以消除错配的假阳性,并且探针的大小一致,可有效控制杂交的温度和洗脱时间,增加灵敏度和可重复性。

Close等利用大麦芯片(22K, Barley1),分别与同一时期、同一生长条件的大麦、小麦、燕麦、水稻、高粱和玉米共6种禾本科作物杂交^[21]。结果表明,9972个基因在大麦中检测到信号,而在其他5种作物中分别检测到5392(23.61%),2645(11.58%),1911(8.37%),1709(7.48%),1281(5.61%)个信号。本研究利用大麦芯片与小麦杂种

和亲本的根系杂交,在22840个探针中,有7074个(30.97%)基因在3338中有杂交信号,比Close等^[21]的研究结果高出7.36%。因此,在小麦基因组信息了解较少的情况下,我们利用大麦芯片分析小麦杂交种与亲本之间基因差异表达情况,并可以通过生物信息学的方法获得了大量的差异表达片断,为研究杂种优势提供一些有用信息。

3.3 基因差异表达模式与杂种优势

已有大量研究报道表明,以水稻、小麦和玉米为研究材料,杂交种与亲本之间的基因差异表达模式与杂种优势存在显著的相关关系。Sun等在研究小麦的差异表达模式与杂种优势的相关关系时发现,UPnF1(与本研究中的单亲表达模式一致)与千粒重等3个农艺性状显著负相关;F1nBP(与本研究中的杂种特异表达模式一致)与每穗小穗数等5个农艺性状显著正相关;UPF1(与本研究中的单亲沉默模式一致)与株高等3个农艺性状显著正相关^[2]。本研究小麦杂交种和亲本根系与大麦芯片的杂交结果显示,1187个差异表达基因中,分别有221(18.62%),234(19.71%),161(13.56%),189(15.92%),126(10.61%)和144(12.13%)个属于杂种上调型、杂种下调型、杂种偏高亲、杂种偏低亲、单亲沉默和单亲特异等6种不同的表达模式。从遗传学角度分析,杂种上调型和杂种下调型可以解释为超显性效应和负显性效应、杂种偏高亲和单亲沉默型可以解释为显性效应,而杂种偏低亲和单亲特异型可以解释为隐性效应。其中显性效应占24.17%,而超显性效应占38.33%,参与超显性和显性表达模式的基因占62.50%。Yao等最近采用SSH方法对上述杂交组合差异表达基因进行了分离和鉴定,并利用反向Northern的方法进行验证,结果发现在根系中差异表达的443个基因中,杂种上调型和杂种偏高亲的表达模式占15.80%和17.83%;杂种下调型和杂种偏低亲分别为18.51%、16.02%,参与超显性和显性表达模式的基因占52.14%^[22]。根据这些结果,我们认为杂种优势的产生可能是显性效应和超显性效应共同作用的结果。

随着QTL定位工作的深入进行,已经报道了3种QTL互作方式与杂种优势的关系,包括在玉米

中发现超显性^[23]是杂种优势的遗传基础,水稻中的显性^[24]和上位性^[25]对水稻杂种优势形成起重要作用.最近,Hua等采用永久F2群体检测了杂种优势形成的超显性、显性以及上位性效应^[26].如果根据我们实验室以前的实验结果,至少3种差异表达模式与农艺性状杂种优势之间存在相关性,本文的结果支持了Hua等的观点,即超显性、显性对杂种优势的形成起重要作用.但是目前我们仍然无法确定究竟哪些在杂种与亲本之间差异表达的基因真正对杂种优势的形成起重要作用,或许这种差异表达仅仅是杂交产生的结果.因此我们需要获得差异表达基因的全长cDNA序列,或者至少是完整开放阅读框,这样可以深入了解差异表达基因的生物学功能,并为解释小麦杂交种与亲本之间基因差异表达与性状杂种优势表现的关系提供理论依据.

3.4 差异表达基因参与植物的多种代谢过程

小麦杂交种在生长势、抗逆性与产量性状等方面表现明显的杂种优势.生理生化分析表明,小麦杂种一代与亲本在酶的组成、光合作用、呼吸强度、同化产物的运转与积累等特性上与亲本显著不同^[17,27].最近研究显示,小麦杂种一代与亲本之间发生了明显的基因表达改变,这些差异表达模式与农艺性状杂种优势之间具有显著相关性.本文通过芯片杂交检测到1187个差异表达基因,其功能参与到生理代谢的各个途径,包括新陈代谢、物质转运、信号转导等等,进一步明确了有哪些基因发生了差异表达,这为杂种优势的产生提供了一些转录水平的依据.

本研究中,功能分类结果显示有37.12%的基因片段参与植物新陈代谢,有26.54%的片段参与细胞的生长与维持.尤其是42个杂交种特异表达的基因,有9个(21.43%)均参与植物的新陈代谢和细胞的生长与维持.另外本实验室通过抑制差减杂交(SSH)方法,以3338/2463组合为材料,分离克隆差异表达基因,功能分类显示相似的结果,参与植物新陈代谢和细胞生长与维持的差异表达基因所占比例较高,分别为41.4%和18.2%.杂种优势在营养生长阶段外在表型特征为杂种较亲本生长旺盛,生长速度快,分蘖能力强,这与新陈代谢、细胞的生长、维持以及物质的生物合成密切相关.因

此这些基因的差异表达可能对杂种优势的形成有重要贡献.虽然我们并不能证明这些基因的差异表达会直接产生杂种优势,但进一步深入分析这些基因的功能将会更有助于理解杂种优势形成地分子机理.

生长素是一类重要的植物激素,在植物的生长调节中起重要作用,在根系生长过程中参与侧根发生,而生长素反应因子(ARF)是一类重要的转录调节因子,通过与生长素调节基因的生长素反应元件(AREs)结合来影响生长素调节基因的表达^[28-30],并最终调控生长素响应的相关基因的表达.本研究结果显示:生长素反应因子(Contig1664_at)和生长素调节蛋白基因(Contig10209_at)的表达模式均属于杂种上调型,我们推测由于这两个基因在杂交种中的表达量增加,有可能促进杂种根系的发育.由于生长素在不定根的分化(发端)和发育中起着中心作用,所以进一步选取部分差异表达的生长素及其相关结合蛋白或者运输蛋白基因进行深入的功能分析,可能为进一步解释杂交种根系优势形成提供更多依据.

根系生长的根本是细胞的生长,而植物细胞的伸长受制于细胞壁,因此细胞壁的膨胀是细胞生长的前提.McQueen-Mason在1992年的实验中发现了膨胀素(expansin),以后的研究发现膨胀素是一种诱导细胞壁在酸性环境条件下发生松弛和不可逆伸展的细胞壁蛋白,在细胞壁的膨胀过程中起重要作用^[31]. β 膨胀素基因(Contig2967_at)的半定量RT-PCR的结果属于杂种偏高亲,而大麦芯片的结果为杂种特异型,虽然表达模式不同,但均检测到杂交种中表达量的增加.Lee等在大豆中发现了一个在根中特异表达的膨胀素基因,验证了该基因在大豆根的发育过程中对初生根和侧生根的分化以及伸长起重要作用^[32].根据本研究结果,我们推测 β 膨胀素基因在杂种中的增强表达可能促进了杂交种中根系细胞的生长,导致总根长和根干重的增加.

致谢 感谢中国农业大学苏震教授,徐文英女士在生物信息分析方面提供的帮助.

参 考 文 献

- 1 Sun Q X, Ni Z F, Liu Z Y. Differential gene expression between

- wheat hybrids and their parental inbreds in seedling leaves. *Euphytica*, 1999, 106 (2): 117—123
- 2 Sun Q X, Wu L M, Ni Z F, et al. Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross. *Plant Science*, 2004, 166(3): 651—657
 - 3 程宁辉, 杨金水, 高艳萍, 等. 玉米杂种一代与亲本基因差异的初步研究. *科学通报*, 1996, 41: 451—454
 - 4 程宁辉, 高艳萍, 杨金水, 等. 水稻杂种一代与亲本幼苗基因表达差异的分析. *植物学报*, 1997, 39: 379—382
 - 5 Xiong L Z, Yang G P, Xu C G, et al. Relationships of differential gene expression in leaves with heterosis and heterozygosity in a rice diallel cross. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 129—136
 - 6 倪中福, 孙其信, 吴利民. 普通小麦不同优势杂交种及其亲本之间基因表达差异比较研究. *中国农业大学学报*, 2000, 5(1): 1—8
 - 7 倪中福, 孙其信, 刘志勇. 普通小麦不同产量优势杂种与亲本苗期叶片基因表达差异研究. *农业生物技术学报*, 1999, 7(1): 95—101
 - 8 Ni Z F, Sun Q X, Wu L M. Differential gene expression between wheat hybrids and their parental inbreds in seedling leaves of early and vigorous tillering stages. *J China Agric Univ*, 2000, 5(1): 1—8
 - 9 李晋生, 王勤. 杂种小麦与高产栽培新途径试析. 杂种小麦研究进展(黄铁城等主编). 北京: 农业出版社, 1993, 224—226
 - 10 Broughton W, Dilworth M. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J*, 1971, 125: 1075—1080
 - 11 Yabba M, Foster E. Common bean root response to abscisic acid treatment. *Annu Rep Bean Improv Coop*, 2003, 46: 85—86
 - 12 Frahm M, Foster E, Kelly J. Indirect screening techniques for drought resistance in dry bean. *Annu Rep Bean Improv Coop*, 2003, 46: 87—88
 - 13 Wurmbach E, Yuen T, Ebersole B J, et al. Gonadotropin-releasing hormonereceptor-coupled gene network organization. *J Biological Chemistry*, 2001, 276: 47195—47201
 - 14 Tanaka T S, Jaradat S A, Lim M K, et al. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 9127—9132
 - 15 Cho R J, Racine F M, Wodicka L, et al. Parallel analysis of genetic selections using whole genome oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3752—3757
 - 16 丁月云, 马诚. 根组织特异表达基因研究进展. *生物工程进展*, 1994, 14(3): 20—23
 - 17 Romagnoli S, Maddaloni M, Livini C, et al. Relationship between gene expression and hybrid vigor in primary root tips of young maize (*Zea mays* L.) plantlets. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 767—775
 - 18 Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(13): 1675—1680
 - 19 Cohen B A, Mitra R D, Hughes, et al. A computational analysis of whole genome expression data reveals chromosomal domains of gene expression. *Nature Genetics*, 2000, 26(2): 183—186
 - 20 Takayuki T, Yasutaka N, Masami Y H, et al. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal*, 2005, 42: 218—235
 - 21 Close T J, Wanamaker S I, Caldo R A, et al. A new resource for cereal genomics: 22K barley genechip comes of age. *Plant Physiol*, 2004, 134: 960—968
 - 22 Yao Y Y, Ni Z F, Zhang Y H, et al. Identification of differentially expressed genes in leaf and root between wheat hybrid and its parental inbreds using PCR-based cDNA subtraction. *Plant Molecular Biology*, 2005, 58(3): 367—384
 - 23 Stuber C W, Lincoln S E, Wolff D W, et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*, 1992, 132: 823—839
 - 24 Xiao J H, Li J M, Yuan L P, et al. Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers. *Genetics*, 1995, 140: 745—754
 - 25 Yu S, Li J X, Xu C G, et al. Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9226—9231
 - 26 Hua J P, Xing Y Z, Wu W R, et al. Single-locus heterotic effects and dominance by dominance interactions can adequately explain the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2574—2579
 - 27 McDaniel R G. Biochemical and physiological basis of heterosis. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, 1985, 4: 227—246
 - 28 Ulmasov T, Hagen G, Guifoyle T J. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 1997, 276: 1865—1868
 - 29 Ulmasov T, Hagen G, Guifoyle T J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999a, 96: 5844—5849
 - 30 Ulmasov T, Hagen G, Guifoyle T J. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant Journal*, 1999b, 19: 309—319
 - 31 McQueen-Mason S J, Durachko D M, Cosgrove D J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 1992, 4: 1425—1433
 - 32 Lee D K, Ahn J H, Song S K, et al. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiology*, 2003, 131: 985—997