

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00297

## 叶锈菌胁迫下的小麦基因组 MSAP 分析

付胜杰<sup>1,3</sup>, 王晖<sup>2</sup>, 冯丽娜<sup>1</sup>, 孙一<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, 保定 071001;
2. 济宁医学院, 济宁 272013;
3. 山东省济宁市梁山县农业办公室, 梁山 272600

**摘要:** 内源 DNA 甲基化是真核生物表观遗传调控的重要组成部分, 在真核生物的基因表达调控中具有重要的作用。生物胁迫为植物提供一种内在的表观遗传进化动力。研究生物胁迫下 DNA 甲基化的变异模式, 有助于全面理解 DNA 甲基化的表观调控生物学功能。小麦近等基因系 TcLr19、TcLr41 及其感病亲本 Thatcher 在苗期对叶锈菌生理小种 THTT、TKTJ 分别表现为小种特异性抗病反应和感病反应。文章利用甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)技术分析了小麦的甲基化水平, 同时比较了苗期在生物胁迫前后基因组 DNA 胞嘧啶甲基化模式。用 60 对 MSAP 引物对接种前后的小麦 DNA 进行全基因组筛选, 没有直接分离得到接菌前后的甲基化模式的差异, 结果初步表明, 叶锈菌并没有诱导稳定且特异的植物基因组 DNA 胞嘧啶位点的甲基化模式变化, 但发现 TcLr41 及其感病亲本 Thatcher 之间存在表观遗传学差异。

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

## Analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism in wheat genome under the wheat leaf rust stress

FU Sheng-Jie<sup>1,3</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, FENG Li-Na<sup>1</sup>, SUN Yi, 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, Biological Control Center for Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China;
2. Jining Medical College, Jining 272013, China;
3. Liangshan Agricultural Office of Shandong Province, Liangshan 272600, China

**Abstract:** Intrinsic DNA methylation pattern is an integral component of the epigenetic network in many eukaryotes. DNA methylation plays an important role in regulating gene expression in eukaryotes. Biological stress in plant provides an inherent epigenetic driving force of evolution. Study of DNA methylation patterns arising from biological stress will help us fully understand the epigenetic regulation of gene expression and DNA methylation of biological functions. The wheat near-isogenic lines TcLr19 and TcLr41 were resistant to races THTT and TKTJ, respectively, and Thatcher is compatible in the interaction with *Puccinia triticina* THTT and TKTJ, respectively. By means of methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) analysis, the patterns of cytosine methylation in TcLr19, TcLr41, and Thatcher inoculated with *P. triticina* THTT and TKTJ were compared with those of the untreated samples. All the DNA fragments, each representing a recognition site cleaved by each or both of isoschizomers, were amplified using 60 pairs of selective primers. The results indicated that there was no significant difference between the challenged and

收稿日期: 2008-05-30; 修回日期: 2008-07-29

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项(编号: 2005CCA01600), 国家“十一五”支撑计划项目(编号: 2006BAD08A05)资助

作者简介: 付胜杰(1978-), 男, 硕士, 专业方向: 小麦锈病研究。现在山东省梁山县农业办公室工作。E-mail: shengjiefu@126.com

通讯作者: 杨文香(1966-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子植物病理学。E-mail: wenxiangyang2003@163.com

刘大群(1958-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物病害生物防治与分子植物病理学。E-mail: ldq@hebau.edu.cn

unchallenged plants at DNA methylation level. However, epigenetic difference between the near-isogenic line for wheat leaf rust resistance gene *Lr41* and Thatcher was present.

**Keywords:** DNA methylation; *Puccinia triticina*; Methylation-Sensitive amplified polymorphism (MSAP); resistance

DNA甲基化与生物体内许多生物过程有关,表现在基因组印记、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<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>。甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)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* 和*Msp* 替代*Mse* 作为高频内切酶。*Hpa* 和*Msp* 可识别相同的四碱基序列 5'-CGG-3',但是它们对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* 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* 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<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>以及水稻抗白叶枯的成株抗性<sup>[13]</sup>等,并显示出检测大规模甲基化的高效性。

由小麦叶锈菌 (*Puccinia triticina* Eriks.) 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,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>,严重时可造成 5%~40%甚至更大的产量损失<sup>[14]</sup>。至今,关于叶锈菌与小麦互作的机理以及病原菌侵入表皮后的互作过程,只是从组织病理学<sup>[16]</sup>、细胞生物学方面<sup>[16,17]</sup>、抗逆生理学<sup>[18]</sup>加以探讨,对于小麦和叶锈菌互作的分子生物学机制只有关于*Lr1*<sup>[19]</sup>和*Lr34*<sup>[20]</sup>的诱导表达的相关报导,特别是甲基化与抗病的关系对病理学界来说也仅是一个概念。

生物和非生物胁迫对所有有机体都可能形成巨大的进化动力,这些进化动力可以导致遗传学突变,也可能产生表观遗传学突变。尽管作为表观遗传学最重要的方式——甲基化的机制还不是很清楚,但染色质结构、基因表达调控和DNA甲基化是密切联系并相互影响的<sup>[21,22]</sup>。有证据显示温度、重金属离子和高压等非生物胁迫可以改变植物的甲基化模式<sup>[23-25]</sup>,并且能通过对基因组甲基化的影响来调节一些相关的基因表达。Wei等<sup>[26]</sup>发现*Mla*基因位点的内部相关抗白粉基因之间存在甲基化差异,虽然相关基因的表达和甲基化状态并不具有正相关性,但仍然给我们指出了方向。特别是2005年Sha等<sup>[13]</sup>发现水稻白叶枯病原菌诱导的DNA去甲基化现象的存在,无疑为生物胁迫和甲基化之间存在关系提供了最直接的证据。叶锈菌侵染也是生物胁迫的一种,那么这种生物胁迫是否会改变植物基因组DNA的甲基化模式,而与抗病相关的一些基因的表达是否会受生物胁迫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,就显得非常意义。

文章利用 MSAP 技术分析了小种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,试图明确 DNA 甲基化是否参与植物与病原微生物的互作,以及在这种亲和与非亲和互作中所扮演的角色,对深入了解锈菌的致病机理、认识寄主的抗锈机制、充分调节植物的抗病水平以及开拓新的抗病渠道资源无疑具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr19、TcLr41 及感病亲本 Thatcher, 美国明尼苏达大学禾谷锈病研究中心馈赠, 河北农业大学锈病研究中心繁育保存; 小麦叶锈菌生理小种 THTT、TKTJ 由河北农业大学锈病研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 小麦叶锈菌小种 THTT、TKTJ 与 TcLr19、TcLr41 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、TcLr41 及感病对照 Thatcher 种子各 5~10 粒分别种植于一直径 7 cm 盆中, 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 THTT、TKTJ 分别接种于 TcLr19、TcLr41 和 Thatcher 的叶片上, 黑暗保湿 16 h 后移至 20±5℃, 光照 16 h、黑暗 8 h 的培养项中培养, 13 d 后进行表型鉴定。表型划分为 0、1、2、3、4 六个等级, 其中, “0”为免疫, “1”为高抗, “2”为中抗, “3”、“4”为感病。

1.2.2 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、TcLr41 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 THTT、TKTJ 对 TcLr19、TcLr41 和 Thatcher 接种, 以不接菌为对照, 接菌后 0 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 分别剪取接种叶片, 提取基因组 DNA。

1.2.3 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℃或-20℃冰箱中保存备用。

1.2.4 MSAP 分析

引物采用 Sha 等 [13] 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, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。使用 *EcoR* /*Hpa* 和 *EcoR* /*Msp* 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 *EcoR* 和 *Hpa* -*Msp* 酶切位点互补的人工接头(表 1)。预扩选扩分别参照采用杨文香等 [27] 建立的小麦 AFLP 反应体系和程序进行优化。MSAP 的扩增产物在 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 (*EcoR* /*Hpa*) 和 M (*EcoR* /*Msp*) 泳道条带数及带型统计分析。

表 1 实验所用引物

接头和引物	接头和引物序列(5'→3')
<i>EcoR</i> adaptor	F: CTCGTAGACTGCGTACC R: AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>Hpa</i> - <i>Msp</i> adaptor	F: GACGATGAGTCTAGAA R: CGTTCTAGACTCATC
<i>EcoR</i> +A	GTAGACTGCGTACCAATTCA
<i>Hpa</i> - <i>Msp</i> +T	GATGAGTCTAGAACGGT
E + AAC	GTAGACTGCGTACCAATTCAAC
E + AAA	GTAGACTGCGTACCAATTCAAA
E + AAT	GTAGACTGCGTACCAATTCAAT
E + AAG	GTAGACTGCGTACCAATTCAAG
E + ACT	GTAGACTGCGTACCAATTCAC
E + ACC	GTAGACTGCGTACCAATTCACC
E + ACA	GTAGACTGCGTACCAATTCACA
E + ACG	GTAGACTGCGTACCAATTCACG
E + AGT	GTAGACTGCGTACCAATTCAGT
E + AGC	GTAGACTGCGTACCAATTCAGC
E + AGG	GTAGACTGCGTACCAATTCAGG
E + AGA	GTAGACTGCGTACCAATTCAGA
HM + TTC	GATGAGTCTAGAACGGTTC
HM + TAC	GATGAGTCTAGAACGGTAC
HM + TGC	GATGAGTCTAGAACGGTGC
HM + TAG	GATGAGTCTAGAACGGTAG
HM + TTG	GATGAGTCTAGAACGGTTG

2 结果与分析

2.1 TcLr19、TcLr41 和 Thatcher 与叶锈菌小种 THTT、TKTJ 互作的表型

一叶期接种 7 d 和 13 d 后, 观测其表型。接菌 THTT 的 TcLr19 的表型为 “0; ” (图 1), 接菌 TKTJ 的 TcLr41 的表型为 “; 1” (图 2), 接菌叶锈菌小种 THTT、TKTJ 的 Thatcher 的叶片的表型都是 4 (图 1, 图 2), 表明 TcLr19 对于叶锈菌小种 THTT 具有小种特异抗性, TcLr41 对于叶锈菌生理小种 TKTJ 为小种特异抗性, 而 Thatcher 对叶锈菌小种 THTT、TKTJ 都变现为高度感病。

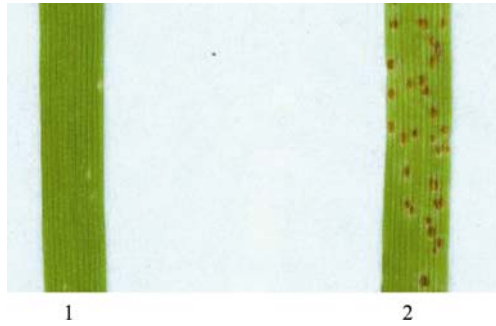


图 1 小麦抗叶锈近等基因系 **TcLr19** 及对照 **Thatcher** 对小麦叶锈菌生理小种 THTT 的侵染反应型 1: **TcLr19**; 2: **Thatcher**

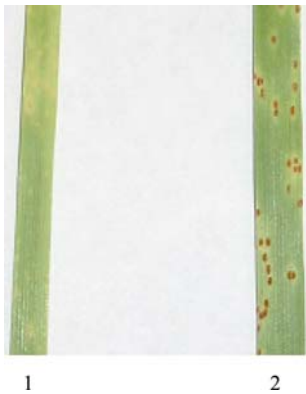


图 2 小麦抗叶锈近等基因系 **TcLr41** 及对照 **Thatcher** 对小麦叶锈菌 **TKTJ** 的侵染反应型 1: **TcLr41**; 2: **Thatcher**。

## 2.2 小麦基因组 DNA 的 MSAP 体系的优化

### 2.2.1 基因组 DNA 的酶切与连接

MSAP-PCR 是基于双酶切的 PCR 反应, 模板 DNA 的质量至关重要。粗提 DNA 需经 RNase 消化去除 RNA 后, 再进行限制性酶切消化。实验证明在 40  $\mu\text{L}$  *Hpa* 和 *EcoR* 双酶切体系中 300~800 ng 基因组 DNA 对实验结果无明显影响(图 3), 为了操作方便, 选用 DNAr 的量为 500 ng。

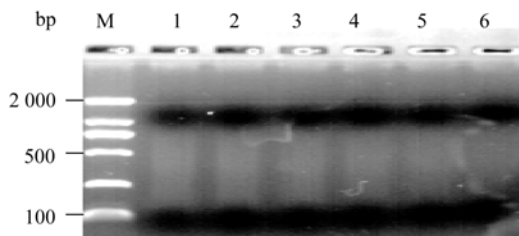


图 3 小麦基因组 DNA 被 *Hpa* II 和 *EcoR* I 双酶切 3.5 h 图谱 M: DL2000 Marker; 1~6: 小麦基因组 DNA 的浓度分别为 800、700、500、300、200 和 100 ng。

### 2.2.2 MSAP 预扩体系的建立

总体系设定为 40  $\mu\text{L}$ , 使用酶切连接产物用呈分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0  $\mu\text{L}$ , 扩增结果在琼脂糖电泳显示(图 4), 从 2.0  $\mu\text{L}$  开始出现明显的扩增条带, 加 4  $\mu\text{L}$  时, 产物浓度适中, 为了操作方便, 选用酶切连接产物 4  $\mu\text{L}$ 。分别设定加入 5 U/ $\mu\text{L}$  的 *Taq* 酶 0.10、0.30、0.50  $\mu\text{L}$ , 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳上显示(图 5), *Taq* 酶为 0.10  $\mu\text{L}$  时, 扩增条带清楚, 但浓度稍低, *Taq* 酶为大于 0.30  $\mu\text{L}$  时扩增出现拖尾现象。所以选取 5 U/ $\mu\text{L}$  的 *Taq* DNA 聚合酶 0.10  $\mu\text{L}$ 。

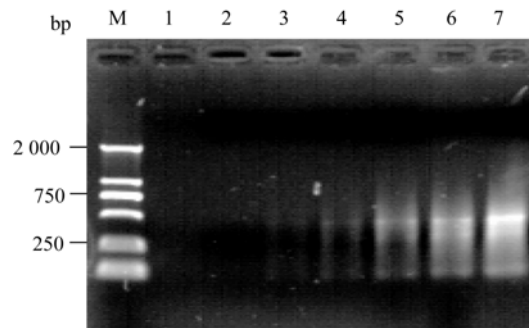


图 4 不同浓度的酶切连接产物的 MSAP 预扩增结果 M: DL2000 Marker; 1~7: 分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 和 6.0  $\mu\text{L}$  酶切连接产物。

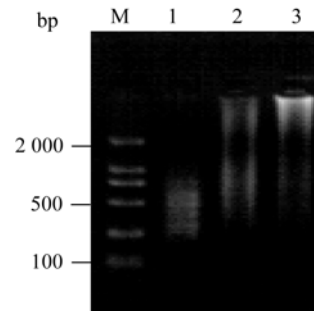


图 5 不同浓度的 *Taq* 酶预扩增结果 M: DL2000 Marker; 1: 0.5 U; 2: 1.5 U; 3: 2.5 U。

### 2.2.3 MSAP 选扩体系的建立

总体积设定为 20  $\mu\text{L}$ , 预扩产物稀释 20 倍后, 分别取 6.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.2  $\mu\text{L}$  6 个浓度梯度。扩增结果在琼脂糖电泳显示(图 6), 从 2.0  $\mu\text{L}$  开始出现清晰明亮的扩增条带, 产物浓度适中, 为了操作方便, 选用预扩稀释产物 2  $\mu\text{L}$ 。其他条件不变的情况下, 分别设定加入 5 U/ $\mu\text{L}$  的 *Taq* 酶 0.5 U, 1.5 U, 2.5 U, 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳上显示(图 7), *Taq* 酶为 0.10  $\mu\text{L}$  时, 扩增产物条带很弱, 0.30  $\mu\text{L}$  时,

扩增条带亮度适中, 但是 0.50  $\mu\text{L}$  时, 扩增的条带出现拖尾现象。所以选取 5 U/ $\mu\text{L}$  的 *Taq* DNA 聚合酶 0.3  $\mu\text{L}$ 。

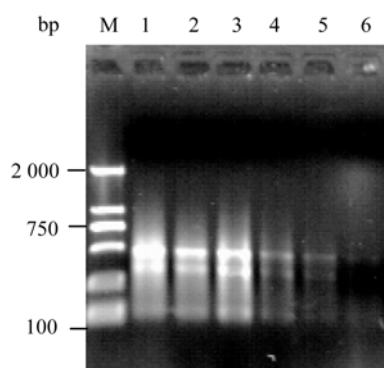


图6 不同浓度预扩产物的 MSAP 选扩增结果

M: DL2000 Marker; 1~6: 分别为预扩产物 6.0、4.0、2.0、1.0、0.5 和 0.2  $\mu\text{L}$ 。

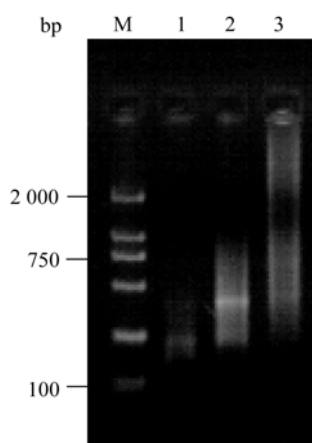


图7 不同浓度 *Taq* 酶的 MSAP 选扩增结果

M: DL2000 Marker; 1~3: 为 *Taq* DNA 聚合酶用量, 分别为 0.5 U、1.5 U、2.5 U。

## 2.3 接菌前后小麦基因组 DNA 的 MSAP 分析

### 2.3.1 TcLr19、TcLr41 及其感病亲本 Thatcher 的甲基化水平

因为 *Hpa* 对酶切识别位点中的任一个 C 的全甲基化敏感, 而 *Msp* 仅对第一个 C 的甲基化敏感, 第二个 C 上的甲基化不影响扩增产物的出现, 故在聚丙烯酰胺电泳图谱上, 每一条带代表一个酶切识别位点, 当 H 泳道(由 *EcoR* -*Hpa* 酶切产物选择扩增, 简称 H 泳道或图谱)内有条带存在, 而 M 泳道内(由 *EcoR* -*Msp* 酶切产物选择扩增, 简称 M 泳道或图谱)条带缺失时, 该位点统计为半甲基化位点。反之, 当 M 泳道内有条带存在、而 H 泳道内条带缺失, 该位点统计为全甲基化位点。但是, 当 H

和 M 泳道内都有条带存在时, 该位点统计为未甲基化位点。H1、H2、H3、H4、H5、H6 六条泳道分别代表 TcLr19 或者 TcLr41 未接菌的对照, 接菌后 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的 6 个时间点获得的基因组材料的 H 电泳图谱。M1、M2、M3、M4、M5、M6 六条泳道分别代表 TcLr19 或者 TcLr41 未接菌的对照, 接菌后 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的 6 个时间点获得的基因组材料的 M 电泳图谱。共有 3 种类型: A 表示该位点没有甲基化, B 表示该位点是半甲基化位点, C 表示该位点是全甲基化位点(图 8)。

用 5 条 *Hpa* -*Msp* +TNN 引物与 12 条 *EcoR* + ANN(N= A, T, G, C)共交叉组成了 60 对, 对小麦近等基因系 Thatcher 和 TcLr19 的接菌后 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的材料 DNA 及其未接菌对照的基因组 DNA 的 CCGG 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 8)。其中检测到全甲基化位点 626 个, 占全部检测位点的 17.6%。半甲基化位点 372 个, 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%。

为了验证上面的结果, 从 60 对 MSAP 引物中选择了效果较好的 12 对引物再次对小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和感病对照 Thatcher 接菌前后的基因组 DNA 进行验证分析, 共扫描了 934 个基因位点。至少存在 239 个两种甲基化情况中的一种, 在两种酶切条件下可扩增不同的片段。其中检测到全甲基化位点 148 个, 占全部检测位点的 15.8%。半甲基化位点 91, 占全部检测位点的 9.7%, 总甲基化率约为 25.5%。

### 2.3.2 苗期小麦基因组在接菌前后的甲基化的模式未见差异

使用 60 对引物对小麦近等基因系 Thatcher 和 TcLr19 的未接菌对照以及接菌后 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的材料基因组 DNA 的 CCGG 位点进行全基因组甲基化扫描检测, 重复 3 次并没有发现接菌导致的大规模的稳定的或者特异位点的甲基化变化。为了证实这一结果, 我们再次使用了 12 对引物对小麦近等基因系 Thatcher 和 TcLr41 的未接菌对照以及接菌后 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的材料



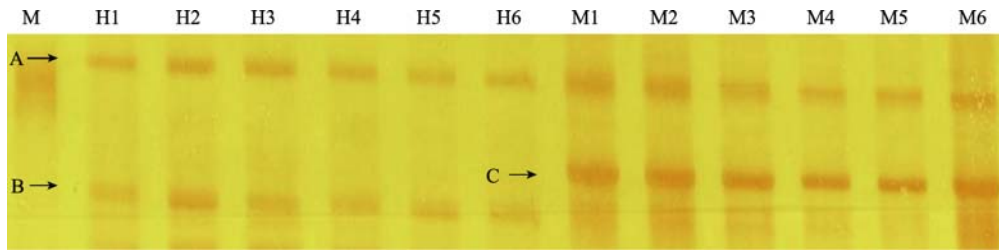


图 8 接菌前后小麦基因组的 MSAP 聚丙烯酰胺电泳图谱(共有 3 种类型, 分别为 A、B、C)

A、B 和 C 分别表示位点未甲基化, 半甲基化和全甲基化。M: pBR322 Marker; H1~H6 和 M1~M6 分别表示接菌前后各个时间点的小麦基因组 DNA 经 *EcoR* -*Hpa* 和 *EcoR* -*Msp* 酶切得到的片段。

基因组 DNA 的 CCGG 位点进行全基因组甲基化扫描检测, 结果同样显示叶锈菌并没有诱导稳定而特异的甲基化位点变化

### 2.3.3 接菌前后随机的差异

我们在接菌前后相同遗传背景材料中获得了多个甲基化位点的差异(图 9), 但是这种甲基化差异在随后的 3 次生物学重复中, 并不能被很好的重复, 那么我们不能把这种差异认为是一种可靠的受接菌诱导的结果。但这种差异的引物检出率高达 35%, 在众多的其他植物的 MSAP 分析中并没有被提及到。

### 2.3.4 与接菌无关的近等基因系之间的表观遗传差异

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, 但是我们获得了与接菌无关的 TcLr41 与其感病亲本 Thatcher 之间的表观遗传学差异, 即 Thatcher 中这一位点 H 和 M 泳道内都有条带存在, 而在 TcLr41 中 H 泳道内有带存在而 M 泳道内条带缺失, 表明这一位点(箭头所指处)在 Thatcher 中为未甲基化位点, 在 TcLr41 中为半甲基化位点(图 10)。

## 3 讨论

### 3.1 甲基化与胁迫

生物和非生物胁迫对所有有机体都可能形成巨

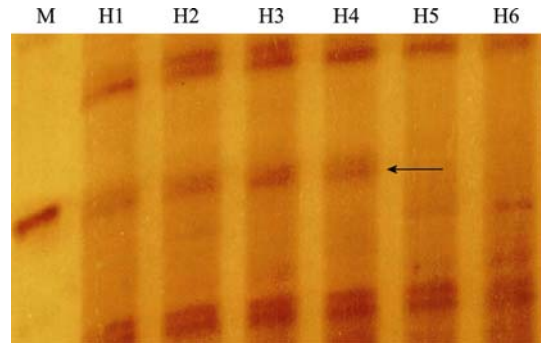


图 9 相同遗传背景材料之间的甲基化差异

M: pBR322 Marker; H1、H2、H3、H4、H5 和 H6 分别代表接菌前后的各个不同时间点获得的 Thatcher DNA 经 *EcoR* -*Hpa* 酶切的结果。H5 和 H6 在该位点缺失。箭头指示检测到的接菌前后甲基化程度发生变化的位点。

大的进化动力。为了生存, 生物体必须发展自身的耐受、抗性和逃避的机能。植物体形成了复杂的代谢反应来应对和存活。胁迫可以定义为对个体生长和发育不利的影响, 可分为内在和外部的。内在的胁迫, 比如远缘杂交、自发的基因突变、异常的细胞分裂, 可能导致生理代谢或遗传调控的负面影响。植物的外部胁迫分为生物的和非生物的两类, 生物的胁迫包括了病原菌的侵染和竞争; 非生物胁迫有各种不利的环境条件, 如不适的温度、压力、辐射、水和营养供给或光照条件。非生物的胁迫不仅可以导致程序化的生理上的胁迫反应, 还可导致基因组范围的变异。胁迫诱导



图 10 近等基因系之间的甲基化差异

*EcoR* -*Hpa* 酶切均有条带出现, *EcoR* -*Msp* 酶切 Thatcher 均有条带出现(H7-H12), 但是 TcLr41 均没有条带出现(M7-M12)。M: PBR322 Marker, H1~H6 和 M1~M6 分别表示接菌前后各个时间点的 Thatcher 小麦基因组 DNA 经 *EcoR* -*Hpa* 酶切的结果, 而 H7~H12 和 M7~M12 分别代表接菌前后各个时间点 TcLr41 基因组经 *EcoR* -*Msp* 的酶切结果。箭头指示检测到的小麦近等基因系之间甲基化程度不同的位点。

的基因组的反应之一就是基因组结构变异。与其他的胁迫一样, 甲基化介导的基因转录活性的改变也会致使植物体逃避或忍受逆境。与其他的胁迫反应不同, 甲基化引起的反应可能不会直接限定一个进化了的发展的生理途径, 而是寻找一个合适的途径来处理和解决非同寻常的压力挑战。

DNA 甲基化是一种生物体普遍的应对各种基因组冲击的表观遗传反应。特殊的环境条件刺激能引起植物的可遗传的甲基化变异。DNA 甲基化作为植物体潜在的基本的基因组防御体系, 它通过随环境刺激和基因组改变而调整其生理机制, 对外界刺激做以应答。因为在染色质结构、基因表达调控和 DNA 甲基化是密切联系并相互影响的, 而且温度、压力、重金属离子等非生物胁迫都能影响植物的甲基化程度, 因而可能会引起染色质结构的改变。既然基因组 DNA 甲基化是基因表达调节的一种主要方式, 而且受到温度等胁迫因素的调节。生物胁迫能诱导植物体内大量的基因表达或者关闭, 这些基因表达的变化受调控的方式之一就是基因组甲基化。

### 3.2 甲基化与小麦叶锈菌的胁迫

本研究使用的栽培材料具有特殊的近等基因系背景, 对实验中使用的叶锈菌生理小种的侵染表型分别显示有抗病、高抗。我们利用 MSAP 技术, 首次进行了小麦近等基因系 TcLr19、TcLr41 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, 观察到不少可明显区分的差异。但在随后的 3 次生物学重复上发现这些差异都不具有稳定性, 我们只能认为病原菌并没有诱导大规模的或者位点特异性的甲基化变异。在统计条带时, 由于测序 DNA 凝胶上条带的上部 and 下部不够清晰, 也就没有统计在内。有研究提出植物的 DNA 甲基化的可遗传特征可能对植物的基因组进化有重要的作用。它可以迅速产生应对变化的环境条件的有针对性的或随机的表观等位基因, 有利于适应性强的表型筛选。这些都说明了了解不同作物的甲基化水平也非常重要。我们的工作也得到了这方面的结果。两次实验结果非常近似, 获得的小麦的甲基化水平分别为 28.1% 和 25.5%, 差别不大, 这也和使用的引物不尽

相同有关, 小麦基因组的甲基化水平为我们进一步了解植物的遗传资源提供了可参考的数据。

有趣的是, 实验获得了与接菌无关的 TcLr41 其感病亲本 Thatcher 之间的表观遗传学差异位点, 这一位点在 Thatcher 中为未甲基化位点, 在 TcLr19 中为半甲基化位点。但是该位点的甲基化程度不受病原菌侵染的影响, 但是否与抗病和感病有关还有待于进一步证实, 进一步的工作需要分析该位点的序列特征以及表达, 若具有基因功能和表达差异, 则通过沉默该基因验证其功能是否和表观遗传相关。在植物体中, 很多过程都受到表观遗传的调控, 其中一种是属于表观遗传学范畴的等位突变。这一和病原菌无关的甲基化位点差异是否直接导致了基因表达的改变并通过这种改变决定或者影响小麦的抗病表型, 甚至某些抗病基因功能的丧失, 除了因为新的生理毒性小种出现之外, 自身 R 基因的调控区因为甲基化的存在而失活的可能性也是存在的。这种现象是由发育状态或者染色体结构的影响导致的, 还是有其他未知的因素存在, 目前还没有清楚的认识, 在抗病等位基因中是否也存在表观等位基因非常值得探讨。

同时在接菌前后相同遗传背景材料中获得了多个甲基化位点的差异, 多达 21 条引物能检出这种多态性差异, 而且在单一的扩增重复中稳定性非常好, 这就排除了人为的扩增原因对结果的影响, 这种差异的检出率高达为 35%, 但是这种甲基化差异在随后的三次生物学重复中, 并不能被很好的重复。影响基因组甲基化的一个主要原因是发育状态, 但是即使相同条件下的种植的同遗传背景的材料, 其发育状态也可能由于各种非可控条件受到影响, 这种影响可能体现为小麦基因组的甲基化模式的不一致性; 另一个原因可能是我们所拥有的小麦近等基因系这种材料的特殊背景, 虽然实验所用的材料是回交六代的近等基因系, 但除抗病目的基因之外还可能存在其他的遗传差异, 这些因素也可能造成基因组的甲基化模式出现与抗病表型无关的差异。实验中没有检测到稳定而且清晰的接菌前后的 DNA 甲基化特异位点的变化, 所以初步认为 TcLr19、TcLr41 及其感病亲本 Thatcher 与叶锈菌的非亲和以及亲和互作并没有影响小麦基因组甲基化的模式。下一步将增加引物数量, 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 etc)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的表达谱的影响,以明确植物甲基化位点是否受生物胁迫的影响。更重要的工作是对近等基因系之间的表观遗传学差异位点进行克隆测序以及功能分析,以试图证实抗病是否受表观遗传的影响。

## 参考文献(References):

- [1] Jost JP, Saluz HP. DNA methylation: molecular biology and biological significance. Springer-Verlag, Basel, 1993.
- [2] Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(2): 217–223. [\[DOI\]](#)
- [3] Haz IA, Anjum MA, Grewal AG, Chaudhary GA. DNA methylation: an essential mechanism in plant molecular biology. *Acta Physiol Plant*, 2001, 23(4): 491–499. [\[DOI\]](#)
- [4] Martienssen RA, Colot V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, 2001, 293(5532): 1070–1074. [\[DOI\]](#)
- [5] Paszkowski J, Whitham SA. Gene silencing and DNA methylation processes. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(2): 123–129. [\[DOI\]](#)
- [6] Wassenegger M. RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(2–3): 203–220. [\[DOI\]](#)
- [7] Xu ML, Li XQ, Korban SS. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, 18(4): 361–368. [\[DOI\]](#)
- [8] Reyna-Lopez GE, 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(6): 703–710. [\[DOI\]](#)
- [9] Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic Arabidopsis allotetraploids. *Plant Physiol*, 2002, 129(2): 733–746. [\[DOI\]](#)
- [10] Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, Zhang QF. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 439–446. [\[DOI\]](#)
- [11] Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA. 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. [\[DOI\]](#)
- [12] Sherman JD, Talbert LE. Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat. *Genome*, 2002, 45(2): 253–260. [\[DOI\]](#)
- [13] Sha AH, Lin XH, Huang JB, Zhang DP. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. *Mol Gen Genomics*, 2005, 273(6): 484–490. [\[DOI\]](#)
- [14] Kolmer JA. Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu Rev Phytopathol*, 1996, 34: 435–455. [\[DOI\]](#)
- [15] Denissen CJM. Influence of race and post infection temperature on two components of partial resistance to wheat leaf in seedlings of wheat. *Euphytica*, 1991, 58(1): 13–20. [\[DOI\]](#)
- [16] 黄国红, 王瑶, 康振生, 魏国荣, 朱之增, 李振岐. 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. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(2): 45–49.
- [17] 黄国红, 康振生, 朱之增, 李振岐. 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. 植物病理学报, 2003, 33(1): 52–56.
- [18] Anguelova-Merhar VS, van der Westhuizen AJ, Pretorius ZA. Intercellular chitinase and peroxidase activities associated with resistance conferred by gene *Lr35* to leaf rust of wheat. *Plant Physiol*, 2002, 159(11): 1259–1261. [\[DOI\]](#)
- [19] Hulbert SH, Bai J, Fellers JP, Pacheco MG, Bowden RL. Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance gene *Lr34/Yr18*. *Phytopathology*, 2007, 97(9): 1083–1093. [\[DOI\]](#)
- [20] Fofana B, Travis W, Strelkov SE, Cloutier S. Temporal gene expression profiling of the wheat leaf rust pathosystem using cDNA microarray reveals differences in compatible and incompatible defense pathways. *Int J Plant Genomics*, 2007, 2007: 1–13. <http://www.hindawi.com/getarticle.aspx?doi=10.1155/2007/17542>.
- [21] Geiman TM, Robertson KD. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together. *J Cell Biochem*, 2002, 87(2): 117–125. [\[DOI\]](#)
- [22] Okamoto H, Hirochika H. Silencing of transposable elements in plants. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(11): 527–534. [\[DOI\]](#)
- [23] 华扬, 陈学峰, 熊建华, 张义平, 朱英国. 水稻冷胁迫诱导的甲基化差异片段 CIDM7 的分离和分析. 遗传, 2005, 27(4): 595–600.
- [24] 杨金兰, 柳李旺, 龚义勤, 黄丹琼, 王峰, 何玲莉. 镉胁迫下萝卜基因组甲基化敏感扩增多态性分析. 植物生理与分子生物学学报, 2007, 33(3): 219–226.
- [25] 申斯乐, 王振伟, 单晓辉, 王华, 李玲, 林秀云, 龙丽坤, 翁克难, 刘宝, 邹广田. 高压导致水稻变异品系发生 DNA 甲基化模式及基因组结构的改变. 中国科学(C 辑生命科学), 2005, 35(6): 490–496.
- [26] Wei FS, Wing RA, Wise RP. Genome dynamics and evolution of the *Mla* (powdery mildew) resistance locus in barley. *Plant Cell*, 2002, 14: 1903–1917. [\[DOI\]](#)
- [27] 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[学位论文]. 河北农业大学, 2003.