

BSP 技术在萝卜-芥蓝异源四倍体及其亲本 *BZIP17* 同源基因甲基化检测中的应用

黄笑君, 吕昱树, 王建波*

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要: 为探讨异源多倍体基因组中直系同源基因的表达调控机制, 对重亚硫酸盐测序 PCR (BSP) 技术进行了改进优化。结果表明, 改进的 BSP 技术检测到萝卜-芥蓝四倍体及其亲本 *BZIP17* 同源基因启动子的甲基化水平为 3.8%~18.8%, 采用实时荧光定量 PCR 检测 *BZIP17* 基因的相对表达量, 且 *BZIP17* 同源基因的表达调控与启动子甲基化等作用相关。因此, 改进的 BSP 技术可应用到更多同源基因的甲基化检测中, 以分析异源多倍体中同源基因分子进化方式。

关键词: 植物异源多倍体; DNA 甲基化; 同源基因; 甲基化检测技术; 基因表达

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.02.001

Application of BSP Method to the Methylation Detection of *BZIP17* Homologous Genes in Allotetraploid *Raphanobrassica* and Its Parents

HUANG Xiao-jun, LÜ Yu-shu, WANG Jian-bo*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: In order to understand the expression regulation mechanism of parent origin orthologous genes in the allopolyploid genome, the bisulfite sequencing PCR (BSP) method was optimized. The results showed that the methylation rate of *BZIP17* homologous gene promoters in allotetraploid *Raphanobrassica* and its parents was ranged from 3.8% to 18.8%. Moreover, the expression level of *BZIP17* genes in the allotetraploid and its parents were detected using quantitative real-time PCR, which summarized that the expression regulation of *BZIP17* homologous genes is correlated with promoter methylation and other mechanisms. So, it was suggested that the BSP method could be applied to the methylation detection of more homologous genes, for the researches of molecular evolution patterns of allopolyploid homologous genes.

Key words: Allopolyploid plant; DNA methylation; Homologous genes; Methylation detection methods; Gene expression

多倍化是植物进化与物种形成的一种重要方式, 70% 以上的被子植物在进化过程中都发生过至少 1 次的多倍化^[1]。多倍体形成和进化过程中面临巨大的选择压力, 一方面要平衡亚基因组间基因的相对表达水平以维持细胞的正常代谢, 另一方面须确

保减数分裂时同源染色体的配对不受具有相似配对能力的非同源染色体的干扰^[2]。同时, 稳定遗传的多倍体植物通常表现出某些优于双亲的性状, 例如较大的器官和更高的抗旱、抗病能力, 这些表型变异可能提高多倍体植物的适应性, 也为农业生

收稿日期: 2015-06-29 接受日期: 2015-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370258, 31070204)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31370258, 31070204).

作者简介: 黄笑君(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物细胞及分子生物学研究。E-mail: 13571897191@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: jbwang@whu.edu.cn

产带来了可利用的资源^[3]。研究表明,多倍体植物中存在广泛的基因组冲击现象,表现为迅速且大量的染色体结构重排、序列的扩增与消除、表观重塑和基因转录水平变化等^[4-9],这为多倍体植物的形成、进化及适应性表现提供了分子基础和变异来源^[10-12]。人工合成的多倍体子代中有1%~5%的基因表现出相对其亲本的转录水平差异,差异表达的基因参与代谢、能量、细胞防御、信号、衰老、植物激素调节等过程^[5-6]。然而,多倍体中基因发生差异表达的机制尚不清楚,尤其是两个亚基因组间直系同源基因的表达调控方式,需要通过分别考察异源多倍体中不同亲本来源的直系同源基因来解答。

越来越多的证据显示出表观遗传修饰对多倍体基因表达变异的影响,其中转座元件和基因启动子上的DNA甲基化修饰被认为与多倍体基因表达变异密切相关^[13-14]。DNA甲基化是指在甲基转移酶作用下将甲基转移到特定碱基上的过程,主要发生于CpG序列(5'-CG-3')中的胞嘧啶位点上,在高等植物基因组非CpG序列(CHG及CHH, H=A或T或C)的胞嘧啶位点上也检测到一定水平的甲基化修饰^[15]。基因启动子区域CpG序列富集的CpG岛(CpG Island, CGI)的甲基化能够引起染色质结构及DNA与蛋白质互作形式的改变,从而引起基因的转录沉默,调控基因的表达^[16]。对拟南芥异源多倍体(*Arabidopsis suecica*)去甲基化前后的同源基因表达量进行检测,结果几乎所有的被测基因都发生了表达变化,且甲基化变化对不同亲本来源的同源基因的影响可能有所不同^[17]。因此,我们拟对异源多倍体基因组中不同亲本来源的直系同源基因分别研究,以探讨杂交后基因表达差异的分子机制,尤其是甲基化修饰在不同亚基因组同源基因上的作用形式。

重亚硫酸盐测序PCR (Bisulfite sequencing PCR, BSP)技术是一种高精度的甲基化检测技术,其原理是经重亚硫酸盐处理将DNA序列中未甲基化的C碱基脱氨基转化成U碱基,在第一轮PCR扩增中与A碱基配对,则在后续扩增及测序时该位点被检测为T碱基,而甲基化的C碱基则不发生转化,使得该位点的测序结果与模板一致。通过与未经重亚硫酸盐处理的DNA序列进行比对,即可知特定位点上的甲基化情况,由此可以测算某一目的基因启动子序列的甲基化水平。然而该技术应用于多倍体同源基因启动子甲基化检测时还存在以下问题,一是要保证同源基因引物仅扩增多倍体上对应物种的基因,二

是要处理设计引物时因不能有效避开CpG岛上富集的C位点而造成的对某种修饰情况序列的偏向性扩增,三是要统一在不同转化效率影响下序列甲基化水平比较分析时的标准。本研究中,我们选用人工合成的萝卜-芥蓝异源四倍体(*Raphanobrassica*, $2n=36$, RRCC)及其亲本萝卜(*Raphanus sativus*, $2n=18$, RR)、白花芥蓝(*Brassica oleracea* var. *alboglabra*, $2n=18$, CC, 甘蓝变种)^[18],对抗逆相关的同源基因*BZIP17*启动子进行BSP甲基化检测,在解决上述问题的基础上提供了详细的设计方案,这将有助于BSP技术在多倍体分子进化机制研究中的应用。同时,结合实时荧光定量PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)数据,分析*BZIP17*同源基因在不同物种和组织中的差异表达现象,揭示启动子甲基化修饰对多倍体同源基因的一种调控模式,为更多异源多倍体同源基因表达调控研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人工合成的萝卜-芥蓝四倍体(*Raphanobrassica*)及其亲本萝卜(*Raphanus sativus*)、白花芥蓝(*Brassica oleracea* var. *alboglabra*)材料由华中农业大学提供。对3物种营养期的幼嫩叶片和授粉后2周的角度果分别取样,每种材料从3个单株混合取样,提取全基因组DNA和总RNA。

1.2 DNA、cDNA 模板的制备

采用CTAB法提取全基因组DNA,使用Trizol法从组织中提取总RNA。以DL2000 DNA Maker为参照,使用1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA和RNA的完整性,用Eppendorf BioPhotometer plus紫外分光光度计测定波长260 nm及280 nm下的光吸收值(分别为 A_{260} 及 A_{280}),计算基因组DNA和RNA的纯度和浓度。使用M-MLV RT反转录体系(Promega)将RNA溶液中的mRNA反转录合成cDNA第一链,以*Actin2/7*为内参基因,合格的cDNA模板将作为后续基因表达定量检测的模板。

1.3 启动子的克隆及 BSP 甲基化检测

基因序列的获取 根据拟南芥*BZIP17*基因序列的ID分别在甘蓝(<http://brassicadb.org/brad/index.php>)^[19]和萝卜(<http://radish.kazusa.or.jp/>)^[20]基因组数

数据库中查找对应的基因ID和基因编码区、上游启动子和编码序列(Coding sequence, CDS)的序列信息。使用SoftBerry植物启动子预测软件(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>)和SoftBerry植物保守调控元件查找软件(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=scanwmp&group=programs&subgroup=promoter>)确定萝卜和甘蓝*BZIP17*基因转录起始位点5'端上游的启动子区域,并在甲基化引物设计软件Methyl Primer Express V1.0中考察区域中存在的CpG岛,分别将这两段含CpG岛的启动子序列用于萝卜和芥蓝BSP引物设计。

基因启动子的克隆测序 使用Primer Premier 5.0软件分别对含上述两段启动子的序列设计引物,两对引物所在的模板链序列均要在萝卜和甘蓝两个基因组中进行比对,得到唯一的、在对应基因组中的比对结果,此时引物将在四倍体基因组中特异扩增对应亲本来源的同源基因。使用上述引物和2×*Taq* PCR Master Mix (TIANGEN)体系对四倍体中两个目标序列和萝卜、芥蓝目标序列进行扩增,经2%琼脂糖凝胶电泳检测后,在紫外灯下切取4个目的片段,并用DNA凝胶回收试剂盒(AxyPrep)回收,最后溶解于7.8 μL Eluent中。分子克隆使用Dual Promoter TA Cloning[®] Kit pCR[®] II vector试剂盒(Invitrogen)将回收的PCR产物连接于T载体上,转化到DH5α感受态细胞,在涂有X-gal和IPTG的含0.1%氨苄青霉素的LB培养基上,将转化后的细胞均匀涂布,37℃培养16 h后挑取蓝斑附近的白斑扩大培养,使用M13引物进行菌液PCR检测,将含有插入片段载体的单克隆菌液送样测序。测序结果与参考基因组比对,得到萝卜*BZIP17*启动子、芥蓝*BZIP17*启动子及四倍体中分别与萝卜和芥蓝同源的*BZIP17*基因启动子的序列信息。

基因启动子的BSP甲基化检测 用甲基化引物设计软件Methyl Primer Express V 1.0根据DNA上非CpG序列通常不发生甲基化的特点,考虑到重亚硫酸盐处理导致的该序列中C向U(T)的转化,首先将输入序列转换为处理后的序列,再避开CpG位点设计引物,通过PCR和克隆测序过程,即可以对目标序列中的CpG位点进行甲基化评价。然而,植物基因组中存在的一定数量的CHG及CHH甲基化位点经重亚硫酸盐处理后并不发生序列变化,使用该软件设计的引物可能并不能与模板有效结合,造成

低效的PCR扩增。因此,我们遵照如上原理,仅将待测启动子CHHH序列中的C手动转换为T,然后将转换后的序列输入到Primer Premier 5.0软件中,避开CpG、CHG及CHH位点设计引物,考察启动子中不同序列类型上的甲基化情况。除了遵循引物设计的一般原则,同时还考虑了如下规则:(1)引物长度为25~30 bp,产物长度为100~300 bp;(2)引物结合部分的转换序列上尽量不要有C和转换后的C位点,如果不能避开,则设计简并引物,使其能够结合于样品中可能存在的不同甲基化修饰的启动子上,尽量提高甲基化检测的敏感性和准确性;(3)同样为了保证同源基因的特异扩增,BSP引物结合位点下的原始模板序列需分别在两个基因组中比对,得到唯一的、在对应基因组中的比对结果。使用EZ DNA Methylation-Gold[™] Kit (ZYMO RESEARCH)试剂盒对四倍体及亲本全基因组DNA进行重亚硫酸盐处理和回收,每物种两次技术重复,得到的产物作为PCR模板,使用上述引物和2×HotStart *Taq* PCR Master Mix (TIANGEN)体系扩增四倍体中的两个目标序列和萝卜、芥蓝中的目标序列。经回收和分子克隆,每个目的片段送10~20个含插入片段载体的单克隆菌液测序,得到重亚硫酸盐处理后的启动子的序列信息,使用DNAMAN 5.22软件进行多序列比对,以分析序列的甲基化情况。

1.4 基因表达的 qRT-PCR 相对定量检测

选取萝卜和甘蓝参考基因组中*BZIP17*基因的一段同源的CDS编码序列分别设计引物,使其在四倍体及萝卜、芥蓝基因组中特异扩增对应亲本来源的同源基因。使用上述引物及荧光定量反应体系SYBR[®] qPCR Mix (TOYOBO)在Applied Biosystems StepOne[™] Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)荧光定量仪上检测萝卜和芥蓝同源基因分别在萝卜、芥蓝和四倍体中相对于内参基因*Actin2/7*的转录水平^[21]。以cDNA为模板,每个基因设3个生物学重复和2个技术重复,两步法反应,以标准曲线法处理数据,基因相对表达量用平均值±标准差($\bar{X} \pm S$)表示^[22]。

2 结果和分析

2.1 *BZIP17*启动子在萝卜-芥蓝四倍体及亲本间的序列差异

*BZIP17*是一种跨内质网膜的转录因子,在盐胁迫

迫发生时被诱导表达的S1P蛋白酶切割,使得位于膜外侧的N末端释放并转移至细胞核,激活ATHB-7和RD20等盐胁迫相关基因的转录,启动植株的刺激响应过程^[23]。我们于萝卜测序及注释结果中得到BZIP17基因的参考序列Rsa1.0_11912.1.g55788.t1,在缺乏芥蓝基因组信息的情况下以其原种甘蓝基因组为参考,得到甘蓝BZIP17基因的参考序列Bo1005139。通过进一步查询数据库可知BZIP17基因有两段CDS序列,可作为后续基因表达定量检测的目标序列。

为得到BZIP17基因真实的启动子序列并作为BSP检测甲基化的对照,我们查找到萝卜和甘蓝同源基因5'上游编码链序列,经启动子预测、保守调控元件预测和CGI标注,分别选定转录起始位点上游-262~-8 bp和-1266~-1001 bp处为萝卜和甘蓝启动子的参考序列。使用根据上述序列设计的引物对萝卜、芥蓝和四倍体中BZIP17同源基因启动子分别扩增,克隆测序后与参考基因组进行比对,得到唯一比对的结果和较高的序列一致性(表1),将测得序列分别作为萝卜、芥蓝和四倍体萝卜同源、芥蓝同源的BZIP17启动子原始序列。

对所得结果进一步分析表明,萝卜BZIP17启动子与萝卜参考序列的一致性为100%,同时芥蓝BZIP17启动子与甘蓝参考序列的一致性高达99.62%,说明该基因的转录调控序列在物种内保守。四倍体与萝卜亲本相比,萝卜同源基因启动子在-213 bp处发生了一段12 bp的短序列插入,说明该基因的启动子伴随着四倍体的形成和稳定迅速

地产生了变异。类似的情况也发生在芥蓝同源BZIP17基因启动子上,值得注意的是,我们仅在四倍体叶片中发现-1227~-1186 bp的一段42 bp序列的缺失,而四倍体角果中却没有(图1)。反复比对后排除芥蓝同源基因引物对萝卜亚基因组同源基因的非特异扩增情况,确认了四倍体芥蓝同源BZIP17启动子序列的组织特异性。这种遗传镶嵌现象可能由发育过程中部分细胞的短序列消除所引起,并可能通过影响启动子上转录起始复合体的形成而导致四倍体不同组织中BZIP17芥蓝同源基因的差异表达。

2.2 萝卜-芥蓝四倍体及亲本中BZIP17同源基因启动子的甲基化模式

为完成萝卜-芥蓝四倍体及亲本中BZIP17同源基因启动子的BSP测序,根据重亚硫酸盐测序原理将启动子原始序列中CHHH的C转换为T,使用以转换序列为模板设计的BSP引物对重亚硫酸盐处理后的基因组DNA进行PCR扩增,将PCR产物克隆测序得到的序列与转换的启动子序列比对,判断甲基化位点并计算启动子甲基化水平。出于对技术重复性考察的目的,我们观察了不同物种和组织中各同源基因启动子的甲基化情况,发现重亚硫酸盐平行处理的两组技术重复试验得到的克隆测序结果基本一致,表明BSP技术用于多倍体同源基因检测时可以得到可靠的甲基化信息。

图2为萝卜-芥蓝四倍体及亲本的叶片和角果组织中BZIP17同源基因启动子序列上的甲基化情况,其中标记为C的位点是有可能发生甲基化的胞嘧啶位点,这些标记位点实际测得的甲基化数与所有克隆条带中这些标记位点数的比值记为该序列的甲基化水平。由于重亚硫酸盐处理未甲基化胞嘧啶的过程存在一定的转化效率,在一些理论上不发生甲基化的胞嘧啶位点(标记为T)上也检测到几个假阳性的甲基化结果,因此我们将标记为T的位点上实际测得的非甲基化位点数占理论值的比例作为甲基化检测的阳性率,用以校正序列的甲基化水平。最终得到的四倍体及亲本两种组织中BZIP17同源基因启动子的甲基化水平为3.8%~18.8% (表2),根据拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组的总体甲基化水平判断^[24],我们认为这是一组合理的测定值。

可见,叶片和角果中BZIP17同源基因启动子的甲基化水平在种间的变化趋势相似,且不存在显著的组织差异(a/e、b/f、c/g和h/d均小于1.6),无论四倍体还是亲本的芥蓝同源基因甲基化总是显著高

表1 BZIP17启动子克隆序列与RR、CC启动子序列的一致性

Table 1 Similarity of promoter sequences in BZIP17 with RR and CC

启动子 Promoter	RR	CC
RR_Ref.	100	-
CC_Ref.	-	99.62
-RR	95.67	-
-CC_Leaf	-	74.44
-CC_Silique	-	99.62

RR_Ref., CC_Ref.: 参考序列; RR, CC: 亲本中的同源序列; -RR: 四倍体中的萝卜同源序列; -CC_Leaf及-CC_Silique: 四倍体叶片和角果中芥蓝同源序列; -: 无意义的比较项。下同。

RR_Ref., CC_Ref.: Reference sequences; RR, CC: Homologous sequences in parents; -RR: RR homologous sequences in *Raphanobrassica*; -CC_Leaf and -CC_Silique: CC homologous sequences in leaves and siliques of *Raphanobrassica*; -: Comparisons without meaning. The same is following Tables and Figures.

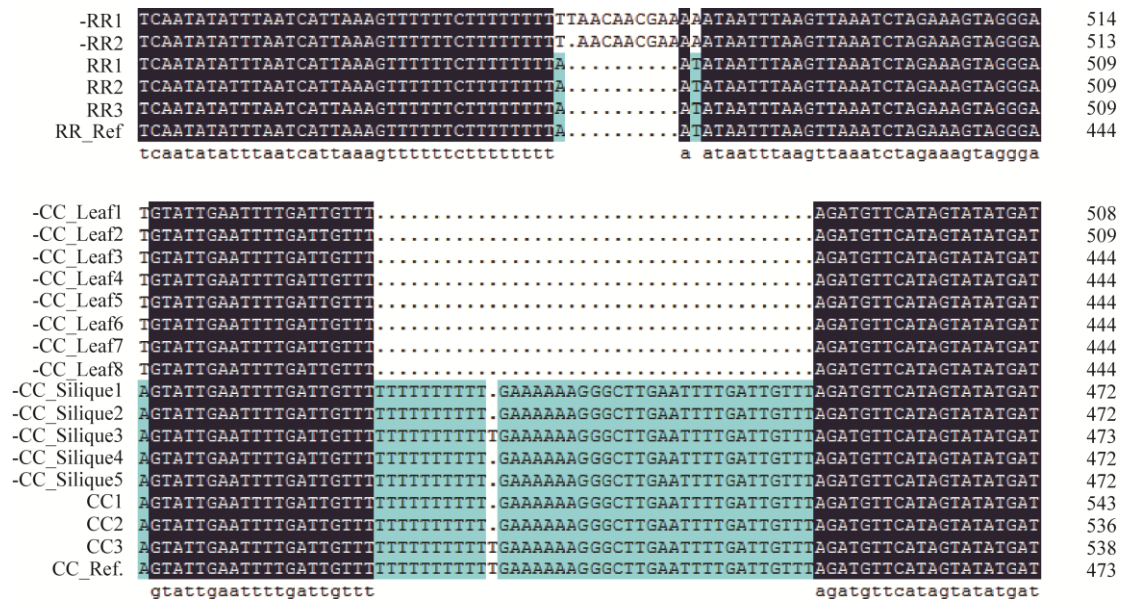


图1 *BZIP17*启动子的部分序列差异

Fig. 1 Differences in part of sequence among *BZIP17* promoters

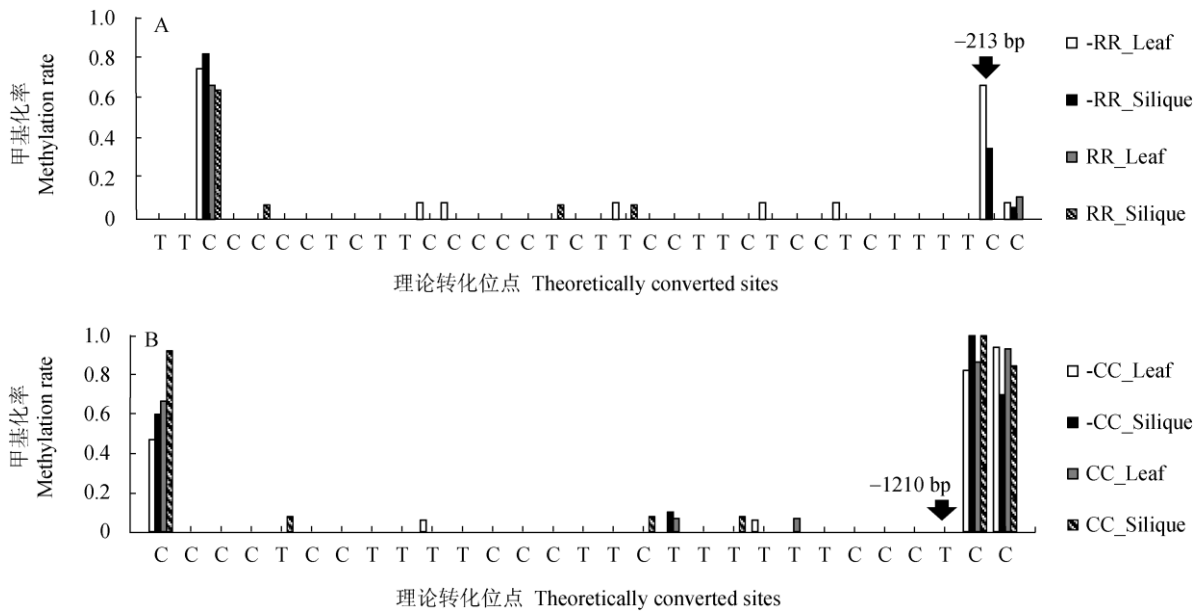


图2 *BZIP17*萝卜同源基因启动子(A)和芥蓝同源基因(B)启动子上胞嘧啶位点的甲基化分析。RR_Leaf, CC_Leaf: 亲本叶片中的同源基因启动子; RR_Silique, CC_Silique: 亲本果角中的同源基因启动子; -RR_Leaf, -CC_Leaf: 四倍体叶片中的同源基因启动子; -RR_Silique, -CC_Silique: 四倍体果角中的同源基因启动子; C: 理论上可能发生甲基化的胞嘧啶; T: 理论上不发生甲基化的胞嘧啶; ↓: 插入或缺失位点到转录起始位点的距离。下同。

Fig. 2 Methylation analysis of all the cytosine sites on *BZIP17* gene promoters. RR_Leaf, CC_Leaf: Homologous gene promoters in parent leaves; RR_Silique, CC_Silique: Homologous gene promoters in parent siliques; -RR_Leaf, -CC_Leaf: Homologous gene promoters in *Raphanobrassica* leaves; -RR_Silique, -CC_Silique: Homologous gene promoters in *Raphanobrassica* siliques; C: Theoretical probable methylated cytosines; T: Theoretical unmethylated cytosines; ↓: Point the distance of the insertion-deletion site from the transcriptional start site. The same is following Tables and Figures.

于萝卜同源基因甲基化(d/c、h/g、b/a和f/e均大于1.6), 这说明四倍体同源基因甲基化基本维持了其

在各自亲本中的相对水平。具体来讲, 芥蓝同源基因的甲基化水平在四倍体与亲本间差异不大(b/d<

1.1, $h/f < 1.6$), 萝卜同源基因的甲基化水平在四倍体比亲本有明显提高(a/c 、 e/g 均大于1.6), 但仍低于芥蓝同源基因的甲基化水平。对单个位点在不同物种和组织中的甲基化修饰情况进行分析, 表明同序列下的位点各自维持其保守的甲基化修饰水平, 但插入或缺失序列上的甲基化情况则有所不同。一个高甲基化位点存在于四倍体萝卜同源基因启动子的插入序列中, 导致该启动子甲基化水平相对亲本的提高(图2: A)。然而, 四倍体叶片中芥蓝同源基因启动子的一段42 bp的缺失序列由于仅含有1个保守的非甲基化修饰胞嘧啶而表现出同亲本相似的启动子甲基化水平(图2: B), 同时也说明这样的序列缺失可能通过影响除甲基化修饰之外的其他过程来调控四倍体叶片中芥蓝同源*BZIP17*基因的转录起

表2 *BZIP17* 启动子的甲基化水平

Table 2 Methylation levels of *BZIP17* promoters

启动子 Promoter	甲基化率 (%) Methylation rate	启动子 Promoter	甲基化率 (%) Methylation rate
-RR_Leaf ^a	8.1	-RR_Silique ^e	6.2
-CC_Leaf ^b	16.5	-CC_Silique ^f	15.2
RR_Leaf ^c	4.1	RR_Silique ^g	3.8
CC_Leaf ^d	16.3	CC_Silique ^h	18.8

a~h: 缩写, 被引用在正文中。

a-h: Abbreviations cited in the text.

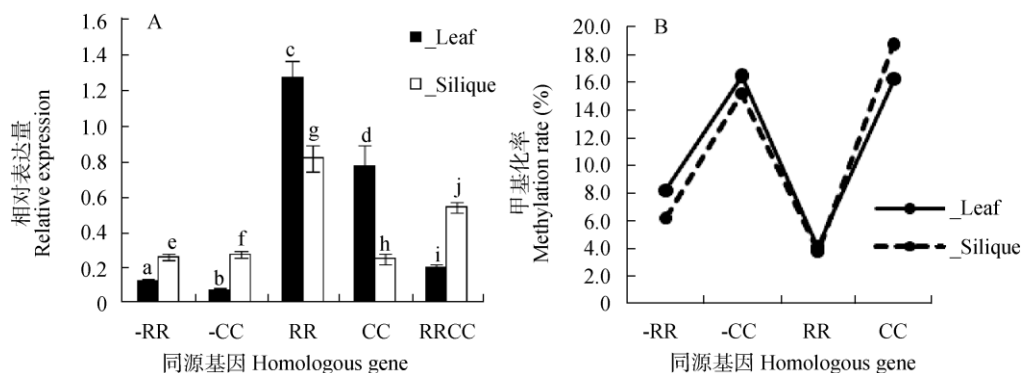


图3 *BZIP17* 基因相对表达量(A)与启动子甲基化水平(B)的比较。RRCC: 四倍体; a-j 同表2。

Fig. 3 Relative expressions and methylation rate of *BZIP17*. RRCC: *Raphanobrassica*; a-j see Table 2.

总体上看, 四倍体和亲本的两组织种中*BZIP17*同源基因的表达量与其启动子甲基化基本呈现出负相关的变化趋势, 体现了启动子甲基化对基因表达的抑制作用。同源基因在同物种不同组织内的表达量与甲基化存在一定的负相关关系(_Leaf与_Silique), 但表达量的组织差异显然比甲基化的组织差异明显, 且甲基化的组织差异对表达量的影响

始。综上所述, 四倍体中萝卜与芥蓝同源基因启动子大致维持了其在各自亲本中的甲基化模式, 萝卜同源基因在四倍体与亲本间的甲基化水平差异主要由序列变化引起。

2.3 *BZIP17*同源基因的差异表达与启动子甲基化的相关性

采用qRT-PCR技术测定萝卜和芥蓝*BZIP17*同源基因分别在四倍体和两亲本中相对*Actin2/7*基因的转录水平(图3), 结果表明不同物种中同源基因的表达存在较为普遍的组织差异(e/a 、 f/b 、 c/g 、 d/h 均大于1.1), 两亲本的*BZIP17*基因的表达量均呈现出叶片比角果更高的情况, 但四倍体的同源基因表达量却共同表现为叶片比角果更低。与亲本相比, 四倍体中的两个同源基因的表达受到了不同程度的抑制(c/a 、 g/e 、 d/b 均大于1.6, $f/h < 1.1$), 最终的结果是两个在亲本中表达量差异显著的同源基因在四倍体中表现为相似的表达水平, 尤其在角果中同源基因间没有明显的表达优势(c/d 、 g/h 、 a/b 大于1.6, $f/e < 1.1$)。四倍体叶片的*BZIP17*总表达量(i)明显偏离亲本叶片的表达量(>1.6), 表现为非加性表达, 而四倍体角果的*BZIP17*总表达量(j)与亲本角果的表达量相似(<1.1), 为加性表达。

效果在物种间也有所不同, 因此除甲基化外还可能存在其他的作用机制来影响该基因在组织中的差异表达。四倍体与亲本的同源基因相比较(-RR与RR, -CC与CC), 甲基化的变化并不能很好地反映基因表达差异的程度。此外, 四倍体和亲本中同源基因之间的甲基化差异都很显著(-RR与-CC, RR与CC), 亲本同源基因表达量差异基本体现了差异甲

甲基化调控的结果,但四倍体同源基因间的表达量变化却与甲基化水平没有明显的相关性,尤其对于四倍体萝卜同源基因来说,其他的调控机制可能是其表达抑制的主要因素。

通过对 *BZIP17* 同源基因在萝卜-芥蓝四倍体及其亲本不同组织中启动子甲基化水平和基因表达量的检测,发现四倍体两个同源基因的表达均受到不同程度的抑制而最终达到相似的水平,在总体上表现为该基因在四倍体叶片中的非加性表达和在四倍体角果中的加性表达。基因表达量在一定程度上受甲基化调控,但表达量的组织差异和四倍体萝卜同源基因的表达抑制可能还与其他调控作用相关。

3 讨论

3.1 BSP技术在植物异源多倍体同源基因甲基化检测中的应用

本研究旨在实施一种可行的方法对异源多倍体中来自不同亲本的同源基因启动子进行甲基化检测。我们基于高精度度和高准确性的BSP技术,以同源基因特异性检测为需要,考虑到植物基因组非CpG序列的甲基化特征,并针对差异甲基化分析的目的,在实验设计和数据处理上提出了实施要求。首先,同源基因的PCR引物必须对其特异扩增,引物设计须在不同序列的模板上进行,且所有引物须经过两次特异性检测,使其与同源的基因组有唯一比对序列、与非同源的基因组没有匹配序列,这保证了异源多倍体同源基因检测结果的可信度。其次,植物基因组非CpG序列甲基化的存在使模板上具有更高密度的可能发生甲基化的位点,这使得完全避开模板上的甲基化胞嘧啶而设计引物变得更加困难。我们建议利用简并引物对其结合序列上两种甲基化修饰情况的位点进行覆盖,让所有不同修饰情况下的同源基因序列均有同等的机会扩增,这保证了该技术检测甲基化位点的敏感性。最后,以测算得到的非甲基化位点的转化效率作为每组同源基因BSP检测的阳性率,将其与初步计算得到的序列甲基化水平的乘积作为最终矫正的结果,使不同组的甲基化水平在统一标准下得到比较,这保证了差异甲基化分析的准确性。在此要求下的BSP技术适用于同源基因的甲基化检测,为植物异源多倍体同源基因表达调控机制研究提供了技术支持,成为多倍体分子进化研究的新思路。另外,BSP同源

基因甲基化检测方案也可应用于印记现象^[25]和动物异源多倍体研究^[26]中。

3.2 异源多倍体同源基因表达量受启动子甲基化等作用的调控

萝卜-芥蓝四倍体被认为是具有油料、饲料作物潜力和杂交育种桥梁作用的人工合成异源多倍体,因具有确定的亲本而成为多倍体进化研究的一种材料。本研究在萝卜-芥蓝四倍体及其亲本中实现了BSP和qRT-PCR技术在同源基因差异检测中的应用,并揭示四倍体进化中抗逆相关基因*BZIP17*的表达调控规律。从表达结果来看,四倍体中基因剂量的累积并没有导致总体表达量比亲本的提高,却在叶片中反映出多倍体植物普遍存在的基因非加性表达的特征^[27],四倍体角果中的基因为加性表达,而无论在哪一种基因表达变化模式中,四倍体的同源基因的表达均比亲本低,这种现象意味着基因将受到更小的选择压力,其可能在基因序列和蛋白结构水平得到更快的进化,基因发生亚功能化或新功能化的可能性增加^[28-29]。鉴于*BZIP17*基因在抗盐胁迫中的重要作用,我们推测四倍体在高盐胁迫响应上具有更大的变异潜能,四倍体不同于亲本叶片的表达量低于角果表达量的现象也许可以从这方面得到解释。

*BZIP17*同源基因的表达在四倍体中受到不同程度的抑制,最终呈现相似的表达量,其与启动子甲基化水平存在一定程度的负相关关系,但关联性在不同物种和组织间有所差异,这意味着该基因的表达可能不只受到启动子甲基化的影响,尤其在四倍体萝卜同源基因的表达抑制过程中,除甲基化之外的其他调控机制可能发挥了更大的作用,这些调控可能涉及启动子序列变异和染色质重塑等^[30]。萝卜和芥蓝同源的*BZIP17*基因启动子在四倍体与亲本间都发生了序列变异,其中萝卜同源基因启动子在四倍体中有一段12 bp含高甲基化胞嘧啶位点的序列插入,而芥蓝同源基因启动子仅在四倍体叶片中存在42 bp的序列缺失,四倍体角果中的芥蓝同源基因启动子序列相对亲本则无明显变异。重亚硫酸盐处理前后的测序结果都显示了芥蓝同源基因启动子在四倍体组织间的序列差异,这种由一个受精卵发育而来的个体上存在不同基因型的细胞群的现象被称为遗传镶嵌。我们发现该缺失序列上不存在甲基化位点,推测这种序列变异可能通过其他方

式影响芥蓝同源基因在四倍体叶片中的转录。因此, 异源多倍体植物遗传镶嵌的发生频率、机制和意义还有待进一步研究。

多倍体植物通过大量的基因消除、表达沉默和染色体结构重排使其具有与二倍体亲本相似的遗传特性, 在这一过程中, 基因的表达可能受到剂量效应、序列变异、表观修饰等顺式或反式作用的影响^[31]。本研究分析了萝卜-芥蓝四倍体同源基因的一种表达调控模式, 得到了启动子甲基化等作用对 *BZIP17* 同源基因表达抑制的结果, 这使得四倍体中冗余的同源基因在低选择压力下具有更多亚功能化或新功能化的变异机会, 同时使基因在四倍体中的总表达量保持了相对稳定的变化趋势, 这些工作有助于进一步了解多倍体分子和表型的进化方式。我们认为, 可以利用 BSP 技术对异源多倍体中更多不同表达变异类型的基因进行甲基化检测, 以探讨这种重要的表观修饰对多倍体同源基因表达的调控作用。

参考文献

- [1] WOOD T E, TAKEBAYASHI N, BARKER M S, et al. The frequency of polyploid speciation in vascular plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(33): 13875–13879. doi: 10.1073/pnas.0811575106.
- [2] OSWALD B P, NUISMER S L. Neopolyploidy and diversification in *Heuchera grossulariifolia* [J]. Evolution, 2011, 65(6): 1667–1679. doi: 10.1111/j.1558-5646.2010.01208.x.
- [3] RIESEBERG L H, RAYMOND O, ROSENTHAL D M, et al. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization [J]. Science, 2003, 301(5637): 1211–1216. doi: 10.1126/science.1086949.
- [4] LIU B, WENDEL J F. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution [J]. Curr Genom, 2002, 3(6): 489–505. doi: 10.2174/1389202023350255.
- [5] LIU B, WENDEL J F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids [J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 29(3): 365–379. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00213-6.
- [6] CHEN Z J, NI Z F. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids [J]. BioEssays, 2006, 28(3): 240–252. doi: 10.1002/bies.20374.
- [7] McCLINTOCK B. The significance of responses of the genome to challenge [J]. Science, 1984, 226(4676): 792–801. doi: 10.1126/science.15739260.
- [8] HA M, LU J, TIAN L, et al. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(42): 17835–17840. doi: 10.1073/pnas.0907003106.
- [9] GROSZMANN M, GREAVES I K, ALBERTYN Z I, et al. Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(6): 2617–2622. doi: 10.1073/pnas.1019217108.
- [10] LEITCH A R, LEITCH I J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants [J]. Science, 2008, 320(5875): 481–483. doi: 10.1126/science.1153585.
- [11] RIDDLE N C, JIANG H M, AN L L, et al. Gene expression analysis at the intersection of ploidy and hybridity in maize [J]. Theor Appl Genet, 2010, 120(2): 341–353. doi: 10.1007/s00122-009-1113-3.
- [12] BIRCHLER J A, RIDDLE N C, AUGER D L, et al. Dosage balance in gene regulation: Biological implications [J]. Trends Genet, 2005, 21(4): 219–226. doi: 10.1016/j.tig.2005.02.010.
- [13] DIEZ C M, ROESSLER K, GAUT B S. Epigenetics and plant genome evolution [J]. Curr Opin Plant Biol, 2014, 18: 1–8. doi: 10.1016/j.pbi.2013.11.017.
- [14] KASHKUSH K, FELDMAN M, LEVY A A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat [J]. Nat Genet, 2003, 33(1): 102–106. doi: 10.1038/ng1063.
- [15] LISTER R, O'MALLEY R C, TONTI-FILIPPINI J, et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2008, 133(3): 523–536. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.029.
- [16] Feng S H, Cokus S J, Zhang X Y, et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(19): 8689–8694. doi: 10.1073/pnas.1002720107.
- [17] CHEN M, HA M, LACKEY E, et al. RNAi of *met1* reduces DNA methylation and induces genome-specific changes in gene expression and centromeric small RNA accumulation in *Arabidopsis* allopolyploids [J]. Genetics, 2008, 178(4): 1845–1858. doi: 10.1534/genetics.107.86272.
- [18] CHEN H G, WU J S, CHENG Y G, et al. Development and GISH analysis of amphidiploid *Raphanobrassica* between *Raphanus sativus* and *Brassica alboglabra* [J]. Acta Agron Sin, 2006, 32(8): 1117–1120. doi: 10.3321/j.issn:0496-3490.2006.08.003.
陈洪高, 吴江生, 程雨贵, 等. 萝卜-芥蓝异源四倍体的合成及GISH分析 [J]. 作物学报, 2006, 32(8): 1117–1120. doi: 10.3321/j.issn:0496-3490.2006.08.003.
- [19] LIU S Y, LIU Y M, YANG X H, et al. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes [J]. Nat Commun, 2014, 5: 3930. doi: 10.1038/ncomms4930.
- [20] KITASHIBA H, LI F, HIRAKAWA H, et al. Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome [J]. DNA Res, 2014, 21(5): 481–490. doi: 10.1093/dnares/dsu014.
- [21] GIRIN T, STEPHENSON P, GOLDSACK C M P, et al. Brassicaceae

- INDEHISCENT* genes specify valve margin cell fate and repress replum formation [J]. *Plant J*, 2010, 63(2): 329–338. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04244.x.
- [22] SHEN Y Y, ZHANG Y, ZOU J, et al. Comparative proteomic study on *Brassica* hexaploid and its parents provides new insights into the effects of polyploidization [J]. *J Proteom*, 2015, 112: 274–284. doi: 10.1016/j.jprot.2014.10.006.
- [23] LIU J X, SRIVASTAVA R, CHE P, et al. Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling [J]. *Plant J*, 2007, 51(5): 897–909. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03195.x.
- [24] COKUS S J, FENG S H, ZHANG X Y, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning [J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 215–219. doi: 10.1038/nature06745.
- [25] OHNISHI T, SEKINE D, KINOSHITA T. Genomic imprinting in plants: What makes the functions of paternal and maternal genes different in endosperm formation? [J]. *Adv Genet*, 2014, 86: 1–25. doi: 10.1016/B978-0-12-800222-3.00001-2.
- [26] BECAK M L. Polyploidy and epigenetic events in the evolution of *Anura* [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 5995–6014. doi: 10.4238/2014.August.7.15.
- [27] HEGARTY M, COATE J, SHERMAN-BROYLES S, et al. Lessons from natural and artificial polyploids in higher plants [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2013, 140(2/3/4): 204–225. doi: 10.1159/000353361.
- [28] SCHNABLE J C, SPRINGER N M, FREELING M. Differentiation of the maize subgenomes by genome dominance and both ancient and ongoing gene loss [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(10): 4069–4074. doi: 10.1073/pnas.1101368108.
- [29] TAKUNO S, GAUT B S. Body-methylated genes in *Arabidopsis thaliana* are functionally important and evolve slowly [J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29(1): 219–227. doi: 10.1093/molbev/msr188.
- [30] GAUR U, LI K, MEI S Q, et al. Research progress in allele-specific expression and its regulatory mechanisms [J]. *J Appl Genet*, 2013, 54(3): 271–283. doi: 10.1007/s13353-013-0148-y.
- [31] CHEN Z J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 377–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103835.