



植物组织培养诱导的DNA甲基化的研究进展

郭春东^{1,2}, 孙善文^{1,3}, 解莉楠^{1,2,*}

¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

²东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨150040

³林木遗传育种国家重点实验室(东北林业大学), 哈尔滨150040

*通信作者(linanxie@nefu.edu.cn)

摘要: 植物组织培养是农作物改良、育种和繁殖的重要手段之一。基于细胞全能性, 利用组织、器官或细胞等材料可获得基因型和表型相同的再生植株。植物组织培养过程给予了植物特定的环境压力, 组织培养产生的再生植株也会出现一些表型的变异, 进一步研究发现这些表型的变异与表观遗传修饰变化密切相关。其中, DNA甲基化导致体细胞无性系变异的研究最为广泛。本文主要综述了不同发生途径的植物组织培养中DNA甲基化变化的最新研究进展, 重点关注在基因组水平上与体细胞无性系变异相关的DNA甲基化模式的变化情况, 这些研究结果有助于利用表观遗传育种, 创制优良种质, 推动作物育种与改良。

关键词: 作物育种; 植物组织培养; DNA甲基化; 体细胞无性系变异

Research progress on DNA methylation induced by plant tissue culture

GUO Chundong^{1,2}, SUN Shanwen^{1,3}, XIE Linan^{1,2,*}

¹College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

²Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education, Harbin 150040, China

³State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

*Corresponding author (linanxie@nefu.edu.cn)

Abstract: Plant tissue culture is one of the important methods of crop improvement, breeding and reproduction. Based on totipotency, tissue culture regenerants from tissues, organs or cells always look similar genotypically and phenotypically. Specific microenvironmental stress imposed to explants could result in some phenotypic variation. Further studies found that these phenotypic variations are closely related to epigenetic modification changes. The research of DNA methylation leading to somatic clonal variation is the most extensive research. This paper mainly reviewed the latest research of DNA methylation changes in plant tissue culture with different approaches focusing on changes of DNA methylation patterns associated with somatic clonal variation at the genomic level. These findings will contribute to promote crop improvement and produce excellent germplasm with epigenetic breeding strategy.

Key words: crop breeding; plant tissue culture; DNA methylation; somatic clonal variation

植物组织培养技术是将植物的细胞、组织等部分在体外进行培养, 由此获得再生植株的重要技术, 是农作物改良、育种和快速繁殖的重要手段之一。由于植物细胞具有全能性, 利用组织、器官

收稿 2022-11-15 修定 2023-02-04
资助 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2021C005)、国家自然科学基金(62001088)、中央高校项目(2572022BD04)和“十四五”国家重点研发计划(2021YFD2200103)。

或细胞等材料再生出植株,并通过良种繁育得到大量基因型和表型相同的个体。但是研究中发现,组织培养产生的再生植株也会出现一些表型的变异,进一步研究发现植物组织培养过程给予植物特定的环境压力,会导致植株DNA甲基化模式发生改变,同时会诱导植株在组织培养的过程中发生转座子(transposable elements, TEs)的跳跃或染色体结构的改变等,最终导致植株产生表观遗传变异,并且可以遗传给下一代。

当植物经过组织培养的过程后,再生细胞可能会发生遗传或表观遗传方面的变异,这些变异被称为体细胞无性系变异。目前发现,在植物组织培养的过程中,DNA甲基化的变化较为常见。DNA甲基化在植物基因表达和发育调控中都发挥着重要的作用。本文综述了在基因组水平上与性状变异相关的DNA甲基化模式的变化以及引起体细胞无性系变异中DNA甲基化模式改变的发生机制,通过这些研究发现DNA甲基化能够推动重要农艺性状的改良。

1 植物组织培养与体细胞无性系变异

1.1 植物组织培养

在选育良种的过程中,传统育种采用有性生殖的方式,设计杂交组合,然后通过筛选优良的性状来获得优良的基因型组合,最终获得优良的纯种个体以及杂种个体。但是这些优良杂种个体的后代会因为基因分离、自由组合等原因而不再具有亲本的优良性状,那么获得相同性状的品系则需要重新进行杂交筛选,耗费时间、金钱和人力。相比之下,无性繁殖理论上可以完全保留杂种的性状,在保持植物优良性状的能力上更加突出。

随着科学技术的飞速发展,人们需要一种更为完善的植物无性繁殖的技术来进行科学的研究,组织培养技术应运而生。植物组织培养是指分离出植物的一部分(细胞、组织、器官或者整个植株),将其在人工控制的培养基中进行无菌培养(Garcia-Gonzales等2010)。据其培养的组织部分可以将其分为三种类型,分别是细胞培养(包括细胞悬液、配子细胞和原生质体培养)、器官培养(所有器官,例如根、芽、合子胚等)和组织培养(愈伤组

织和分化组织)(Loyola-Vargas等2018)。在组织培养过程中,外植体经历器官发生过程或体细胞胚胎发生过程。该技术应用于各种重要经济植物的无性繁殖,包括兰花(*Cymbidium* ssp.)、葡萄(*Vitis vinifera*)、草莓(*Fragaria×ananassa*)、西伯利亚人参[*Eleutherococcus senticosus*]、菠萝[*Ananas comosus*]、辣椒(*Capsicum annuum*)等。植物组织培养技术弥补了传统繁殖方法的局限性,在当代生物技术中占据十分重要的位置,在植物发育过程、微繁殖、基因功能和转基因植物中都有广泛的应用。

1.2 体细胞无性系变异

虽然,植物组织培养得到的再生植株在理论上与亲本的基因型和表型应该完全一致。但是,诸多研究显示,植物经过组织培养后,出现了与供体植株不一致的变异的再生植株,称为体细胞无性系变异,这给无性繁殖系统带来了很大的问题(Bairu等2011)。在细胞和分子水平上,体细胞无性系变异包括序列变异、细胞变异和表观遗传变异。在育种工作中,这种变异是难以控制的,这可能会干扰作物原有的优良性状,造成育种结果的不稳定,并且有可能会造成经济上的损失。植物组织培养包括脱分化和再分化两个进程,其中脱分化涉及染色质水平上的重编程,诱导植物形成愈伤组织,再分化使得愈伤组织分化出各种组织器官,最后形成完整植株。Stroud等(2013)利用一系列未转入外源基因的水稻品系再生植株和野生型植株等来研究组织培养对于甲基化的影响,发现与非再生植株相比,所有的再生植株均具有显著的甲基化水平降低的现象,并且基因组中的某些位点特别容易发生甲基化的丢失。

2 组织培养与DNA甲基化

2.1 DNA甲基化

体细胞无性系变异的最主要的原因之一是表观基因组的变化。表观遗传调控包含DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA等调控方式,其中DNA甲基化是目前研究最为透彻的表观遗传修饰。植物中的DNA甲基化主要发生在TE和其他重复的DNA元件上(Law和Jacobsen 2010)。DNA甲基化在哺乳动物和植物中都很保守,基因组DNA甲基

化的变化对于基因调控和生物发育有重要的意义。植物中存在三种序列背景的甲基化, 其中CG序列发生甲基化的频率最高, 其次是CHG和CHH (H=A、T或C)。DNA甲基化通过从头甲基化、甲基化维持和主动去甲基化这三个过程来进行动态调控。这三种不同序列背景的DNA甲基化都是由RNA介导的DNA甲基化途径(RNA-directed DNA methylation, RdDM)进行从头合成, 但是甲基化维持过程所需的酶和途径不同。

在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)非经典RdDM途径中, 由RNA依赖的RNA聚合酶6 (RNA-dependent RNA polymerase 6, RDR6)和DCL4介导产生21/22-nt siRNAs, 最终会建立非CG甲基化的甲基化途径, 有利于重新激活转座子从头甲基化(Bond和Baulcombe 2015)。但RDR6如何特异性识别转座子RNA和siRNAs的选择性加工尚未可知。

在拟南芥经典RdDM途径中, 与RNA聚合酶2 (RNA polymerase II, Pol II)同源的RNA聚合酶4 (RNA polymerase IV, Pol IV)在植物特定的区域内产生转录本, RNA依赖的RNA聚合酶2 (RNA-dependent RNA polymerase 2, RDR2)与这些转录本结合并且依据碱基互补配对原则将其转化为双链RNA, 并被DCL3 (dicer-like protein 3)切割为小干扰RNA (small interfering RNAs, siRNAs), 再被双链RNA结合相关蛋白在两端突出的核苷酸上加上甲基, 从细胞核进入细胞质, 与AGO4 (argonaute 4)和热激蛋白90结合, RNA双链打开形成单链, 之后热激蛋白90脱离, AGO4与单链RNA进入细胞核, 与RNA聚合酶5 (RNA polymerase V, Pol V)转录得到的RNA进行特异性识别, 同时招募DRD1与RDM1等蛋白形成蛋白复合体, 招募结构域重排甲基转移酶2 (domains rearranged methyltransferase 2, DRM2)进行DNA甲基化。

在拟南芥中, CG和CHG分别由DNA甲基转移酶1 (DNA methyltransferase 1, MET1)和染色质甲基化酶3 (chromomethylase 3, CMT3)维持, CHH是由染色质甲基化酶2 (chromomethylase 2, CMT2)和RdDM途径中的DRM2分别在不同的位置来进行维持。CMT2和CMT3通过识别组蛋白H3上第9位赖氨酸的甲基化来进行靶序列的识别。CMT2途

径介导在中心体区域序列的长TEs的CHH甲基化, 并优先选择拟南芥的CAA/CTA序列(Law和Jacobsen 2010)。关于DNA甲基化建立和维持的分子机制研究加深了我们对DNA甲基化调控的认知, DNA甲基化对于作物育种和改良也具有十分重要的作用。

2.2 DNA甲基化和基因表达

有研究表明, DNA甲基化影响了基因的转录水平, 从而影响了基因的表达及一些细胞过程, 但是转录背后的调控机制却尚不明确(Law和Jacobsen 2010)。研究发现, 在凹唇姜[*Boesenbergia rotunda*]胚胎性愈伤组织中, CG和CHG环境下的DNA甲基化水平与*SERK*、*LEC2*和*WUS*的表达水平呈负相关, DNA甲基化水平的降低导致了*SERK*、*BBM*、*LEC2*和*WUS*的表达水平升高, 而在非胚胎性愈伤组织中表达则较低, 因此DNA甲基化水平的降低可能促进凹唇姜在组织培养过程中的胚性能力(Karim等2018)。尽管一部分表观遗传变异不能遗传给后代, 但是有一些由于DNA甲基化而被沉默的基因可以将姐妹染色单体上的等位基因也进行DNA甲基化, 这个过程被称为副突变(Miguel和Marum 2011)。在玉米中, *b1*、*r1*、*p11*和*p1*等4个基因的变异验证了这个说法, 由于*B1*位点甲基化, 所以使得与*B1*互补基因上的未甲基化的等位基因也发生了甲基化, 导致了*B1*基因的表达被抑制, 产生副突变(paramutation) (Sidorenko等2001)。由此可见, 表观等位基因为在不改变基因序列的前提下改变表型的作物育种提供了一个新的思路。

2.3 组织培养诱导转座子甲基化水平变化

转座子是一类能够在不同基因座上跳跃的DNA序列(Feschotte等2002)。转座子的生理活动受到表观遗传控制, 所以表观遗传对于基因正常发挥功能是至关重要的。在真核生物中, 通过改变TEs的甲基化水平导致基因沉默或激活来发挥作用, 包括RdDM途径与RNA干扰(RNA interference, RNAi) (Law和Jacobsen 2010)。TEs的重新激活与DNA低甲基化有关系。随着对转座子研究的深入, 发现表观遗传控制着转座子的跳跃和表达, 对于基因组正常表达至关重要。Adam等(2007)在研究中发现, 油棕(*Elaeis guineensis*)经过连续的组织培

养,再生植株果实发育异常,雌花的雄蕊和雄花的雄蕊发育为假果皮,并且常导致不育的单性结实,但是果实里却没有种子,且产油量极低,研究者把这种异常表型称之为mantling。经过一系列的分析发现这种异常的表型与B类MADS box转录因子的甲基化水平变化有关。正常样本和mantled油棕样本中,MANTLED基因座上的CG甲基化无变化,CHG甲基化显著降低,CHH甲基化降低幅度较小。MANTLED基因座中的*Karma*转座子在正常植株中高甲基化,在异常表型的植株中低甲基化水平。进一步分析发现细胞中的24nt-siRNAs会随着组培时间的增加而减少,这可能是*Karma*转座子甲基化水平降低的原因(Ong-Abdullah等2015)。Tanurdzic等(2008)研究了在细胞悬浮液中培养的拟南芥的DNA修饰的情况,发现常染色质甲基化水平升高,异染色质DNA甲基化水平降低并且伴随着特定转座子的转录激活,且激活的转座子使得21-nt和22-nt的含量增加,24-nt的含量降低。有研究表明,经过体外组织培养的大麦植株中的再生植株和子代植株的全基因组水平的DNA甲基化水平都升高了,两者DNA甲基化水平几乎相同,但是子代植株中的转座子活性降低。因此,TEs的变化可能与DNA甲基化水平的变化不一致,但是具体的机制尚不清楚。

转座子序列的低甲基化会导致特定位点产生表观等位基因,这些表观等位基因会将甲基化状态遗传给后代。Tanurdzic等(2008)发现由于在细胞悬浮液中进行培养,*AG*、*FWA*和其他转座子的表观遗传状态发生了变化,DNA甲基化水平降低,同时*FWA*被激活,转录水平增加,相比于对照组增加了25倍。

3 DNA甲基化与体细胞无性系变异

目前,很多研究侧重于检测经组织培养后植株的表观遗传变异的频率,以此来评估利用组织培养技术进行作物育种的稳定性(Miguel和Marum 2011)。

有研究已经报道了在植物中由于DNA甲基化变化而导致的无性系变异的现象(Saze 2008)。有研究发现经过组织培养后的玉米(*Zea mays*)植株,

其胚乳中的*z1B4*基因和*z1B6*基因的启动子DNA甲基化水平上升,相应的基因表达量下降,*z1B1*基因的DNA甲基化水平下降,其基因表达量上升(Xu等2016)。拟南芥根表皮细胞特化系统能够用于研究其发育过程中的表观遗传调控机制,利用这个系统,Costa等(2017)发现在发育过程中,每个细胞周期中的染色质状态都可以被重置和重构(Miguel和Marum 2011)。在组织培养的过程中,DNA甲基化模式是动态的且受到一定的控制。例如,两种玉米近交系A188胚胎培养的21个后代中发现去甲基化发生的频率很高,在玉米的愈伤组织和体外再生植株中发现许多区域的DNA甲基化水平都有一定的改变(Stelpflug等2014)。经过组织培养后的水稻(*Oryza sativa*)的后代存在高频DNA甲基化的现象。在蓝莓(*Vaccinium spp.*)的愈伤组织中,存在相对高水平的甲基化CCGG位点,相反在叶片中,这样的位点相对较少(Ghosh等2017)。

Ji等(2019)利用了10个处于不同发展阶段的大豆[*Glycine max*]样品,对其连续的组织培养样品的DNA甲基化水平的改变进行了分析,结果显示连续的组织培养会引起全基因组DNA甲基化水平的增加,尤其是CHH背景下的DNA甲基化。通过进一步对于小RNA组和CMT3密码子偏好性分析,发现主要原因是由于RdDM途径影响了CHH背景的甲基化,CMT2也起到一定作用。大豆未成熟的子叶必须经过生长素的诱导才可以形成胚性愈伤组织。经过暴露在生长素24 h的环境中后,RdDM途径中的很多酶的表达量都降低了,但是基因组甲基化水平却升高了,这种现象表明生长素对于DNA甲基化水平的变化也有影响,但其中的作用机制仍不清楚。体胚发生模拟了合子胚的发育过程,尽管连续的组织培养只会让细胞发育到球形胚,但是仍具有胚的特征,一定程度上符合有性生殖会对基因组甲基化进行加固的假说。

连续组织培养中发生的DNA甲基化模式的变化可以分为三个来源,第一是由于组织培养前后处于不同状态细胞所固有的甲基化差异,如大豆未成熟的子叶与球形胚以及球形胚上分化来的细胞之间是存在甲基化差异的(Ji等2019)。第二是组织培养过程中所造成的DNA甲基化的变化,例如

经过组织培养后再生的水稻植株的甲基化水平低于野生型,这可能也与细胞的脱分化、再分化和激素的影响有关(Wang等2013)。第三是连续的组织培养导致复制非偶联的DNA甲基化维持能力的下降,导致每一次复制后,DNA甲基化水平都会下降,慢慢造成甲基化的丢失(Ming等2021)。尽管大量的文章对于组织培养后的DNA甲基化的变化进行了分析,但是没有对甲基化变化进行上述的三种来源的分类,而且对于甲基化维持的变化的机制研究,需要从细胞水平上进行研究,这都是现今研究所欠缺的。

3.1 DNA甲基化和器官发生

DNA甲基化影响了基因的表达调控机制,进而影响了器官发生。Maury (2012)利用甜菜(*Beta vulgaris*)研究了茎和根再生过程中DNA甲基化水平的变化。其中UBI6在茎的再生过程中DNA甲基化水平和基因表达水平都发生了变化。研究发现DNA甲基化在器官发生的过程中发挥作用。随着环境的变化,DNA甲基化也受到了影响。在苹果(*Malus pumila*)的芽再生过程中,如果将植株长时间暴露在低温环境下,DNA序列没有发生变化,但是甲基化水平升高(Hao等2003)。

3.2 DNA甲基化和体细胞胚胎发生

体细胞胚胎发生是体外植物再生的一种重要而高效的途径。很多研究都认为DNA甲基化是影响体细胞胚胎发生过程的一个极为重要的因素。在植物体细胞胚胎发生的过程中存在着频繁的DNA去甲基化和重新甲基化的过程。Li等(2019)通过体细胞胚胎发生途径培养了一批再生棉花(*Gossypium* spp.)植株,这批植株CHH甲基化水平降低,激活了相关基因的转录与表达,与RdDM通路以及H3K9me2依赖的途径有关,并且低甲基化可以增加胚胎的数量且有利于提高植株的再生能力。

在体细胞胚胎发生过程中,环境胁迫使得DNA甲基化水平发生变化。甲基化水平的降低有利于体细胞胚胎发生,并且可以恢复一部分植株的体细胞胚胎发生能力。对脐橙(*Citrus sinensis* var. *brasiliensis*)愈伤组织甲基化模式的变化情况进行分析发现,具有体细胞胚胎发生能力的脐橙相较于失去体细胞胚胎发生能力的脐橙DNA甲基化水

平降低(Hao等2002)。在不同的胁迫条件下,DNA甲基化模式的变化与基因的表达有关。然而向胡萝卜(*Daucus carota* var. *sativa*)细胞悬浮培养基中施加外源生长素后,发现DNA甲基化水平变化显著,加入甲基化抑制剂5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-Aza)后,会立刻阻断体细胞胚胎发生(Loschiavo等1989)。在苜蓿(*Medicago*)中也发现了类似的现象,5-Aza诱导DNA低甲基化,阻断了体细胞胚胎的发生,导致植株丧失再生能力(Santos等2002)。压力胁迫会引起DNA甲基化水平发生不同程度的改变,但是其中一部分低甲基化有利于体细胞胚胎的发生,另一部分会直接阻断体细胞胚胎的发生,所以我们猜测体细胞胚胎的发生与否与不同的胁迫有关,也取决于DNA甲基化的程度。

4 与体细胞无性系变异相关的DNA甲基化机制

在细胞分裂的过程中,即使植物没有受到影响,表观遗传机制也会产生表观遗传记忆来存储周围环境中发生的变化。在组织培养的过程中,对植物细胞施加特定的环境压力,植株会发生遗传和表观遗传变异。这些特定的环境压力影响了细胞器的正常功能,质膜和细胞壁最先感应压力,并且产生活性氧(reactive oxygen species, ROS) (Das和Roychoudhury 2014)。在低温和重金属等环境压力下,细胞的自动调节能力是不稳定的,ROS的过量产生会导致DNA、蛋白质、脂质和色素的变异,影响了细胞的功能,进而导致体细胞无性系变异(Bednarek和Orłowska 2020)。Curry (2001)推测,在植物组织培养系统中,外植体的生理条件等因素也影响了遗传和表观遗传变异,其中氧化应激损伤起主要的作用。表观遗传调控也可以影响体细胞无性系变异的发生,它可能会导致DNA甲基化水平的永久改变(Bednarek和Orłowska 2020)。

4.1 外植体类型与体细胞无性系变异

外植体的类型和年龄会影响体细胞无性系变异发生的概率和性质。将分化程度较高的组织例如茎尖和腋芽用作外植体进行培养、直接从叶片、叶柄、茎节间、根段、花药等部位生出不定芽或者从外植体中形成愈伤组织,外植体中嵌合组织

的存在都会影响再生植株发生体细胞无性系变异的概率(Pijut等2012)。而外植体的年龄影响DNA甲基化水平从而影响体细胞无性系变异发生的概率不是完全一致的。从新西兰辐射松(*Pinus radiata*)幼苗植株中获得外植体时,植株的DNA甲基化水平较低(Fraga等2002)。而从芒果(*Mangifera indica*)幼苗组织中获得外植体时,DNA甲基化水平较高(Baurens等2004)。

4.2 愈伤组织与体细胞无性系变异

在组织培养的过程中,愈伤组织的产生也可能是导致体细胞无性系变异的原因之一。后续的培养使外植体容易受到氧化应激的影响,可能会导致变异。在不同水平的组织培养过程中,例如原生质体培养,从高度分化的分生组织到分化程度较低的愈伤组织,这个过程会导致体细胞无性系变异的发生。有研究发现在茄子(*Solanum melongena*)中,通过愈伤组织产生的再生植株的变异率高于通过腋枝产生的植株(Zayova等2010)。DNA甲基化的水平取决于细胞分化的水平。愈伤组织经历脱分化和再分化过程后,DNA甲基化水平发生了变化。

4.3 传代培养周期与体细胞无性系变异

在组织培养的过程中,诱导植物发生体细胞无性系变异会受到传代培养周期的数量和持续时间的影响。在细胞悬浮液和愈伤组织培养中,体细胞无性系变异的概率随着体外培养的传代次数和持续时间的增加而增加(Bairu等2006)。随着传代培养周期数的增加,在组织培养相对较短的时间内获得较高的增殖率。香蕉(*Musa nana*)在组织培养系统中,开始传代时体细胞无性系变异概率为1.3%,第11次传代培养后增加到3.8% (Rodrigues等1997)。

除了传代培养周期的数量外,培养的持续时间也影响了体细胞无性系变异的发生率,尤其是愈伤组织培养和细胞悬浮培养。随着愈伤组织培养时间的增加,变异核型逐渐增加,因此在连续的传代培养的过程中产生的变异植株也随之增加(Zayova等2010)。经过长期培养再生的植株更加容易发生体细胞无性系变异。Rival等(2013)发现体外增殖的培养方式会随着时间的增加而诱导植

株甲基化水平显著升高,并且DNA甲基化水平的升高在组织培养油棕榈胚性能力的表达调节方面发挥了作用。

4.4 植物生长调节剂与体细胞无性系变异

在体外培养的过程中,细胞周期的改变会导致植物体细胞无性系变异的发生,而植物生长调节剂、温度、渗透压等因素会影响植物体内的细胞周期(Nwauzoma和Jaja 2013)。正常的细胞周期会在DNA复制完成前停止细胞分裂,而组织培养扰乱了正常的细胞周期,使得染色体断裂,染色体断裂后会引引起体外培养植株一系列的变化。

植物生长调节剂增加了细胞增殖速率且可以诱导不定芽的生长,诱导细胞周期紊乱,影响体细胞无性系的变异速率,导致植物形态发生变化,再生植株发生变异。例如2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)和1-萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA)等生长调节剂会引起体细胞无性系变异的发生(Sales和Butardo 2014)。Morao等(2016)研究了不同细胞类型的DNA甲基化水平的变化,发现根尖分裂活性高的小柱细胞DNA甲基化水平最高,特别是在转座子序列的CHH位点。Sales和Butardo (2014)发现在培养基中添加2,4-D会导致香蕉植株甲基化水平升高,尤其是胞嘧啶甲基化水平发生了显著的变化,这也导致了植株发生形态上的变化。在胡萝卜胚胎培养的过程中,发现了生长调节剂的类型和浓度会对全基因组甲基化水平造成影响,改变基因组的甲基化模式,尤其是2,4-D浓度的增加会导致胞嘧啶甲基化水平升高(LoSchiavo等1989)。在南瓜(*Cucurbita moschata*)的胚胎培养中也有类似的现象,但是并不是生长素起了唯一的作用,培养基中的氮源等成分也会影响植物的甲基化水平(Leljak-Levanic等2004)。同时还有一些抗生素,比如卡那霉素、潮霉素等,有利于增强重复序列的不可逆甲基化,而其中CpG位点优先被甲基化。Arnhold-Schmitt (1993)发现培养基中的吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)和纤维醇成分导致了胡萝卜愈伤组织的DNA甲基化水平发生变化。Matsuda等(2014)发现,在培养基中加入PGRs后,非洲紫罗兰属植物叶片的外植体发生体细胞无性系变异的百分比会显著增加。在持续

时间为2周的胡萝卜根外植体的增殖培养的过程中, Arnhold-Schmitt (1993)发现6-糖基氨基嘌呤这种细胞分裂素可以导致植株全基因甲基化水平降低, 而生长素可以引起全基因甲基化水平整体上升(LoSchiavo等1989)。有研究表明, 染色质重塑基因和组蛋白甲基化基因的差异表达会引起甲基化途径的破坏, 从而导致全基因组甲基化水平的变化, 并且改变的甲基化状态可以稳定遗传到再生植株中(Shearman等2013)。

除了生长调节剂的浓度, 不同生长调节剂的比例也会影响体外培养植株发生变化。Eeuwens (2002)发现较高的生长素与细胞分裂素的比率会导致油棕榈变异率较低, 而较低的比率导致变异率升高。

5 体细胞无性系变异在作物改良中的意义

在组织培养产生的体细胞无性系变异中, 有一些变异是有益的。Thieme等(2017)发现在拟南芥和水稻中, 抑制RNA polymerase II的活性可以使得植株在重复序列上的DNA甲基化水平降低, 产生了更多的染色体外DNA, 经过处理的植株后代中有多达75个热响应*ONSEN*逆转录转座子的插入, 这些后代表现出环境依赖的表型多样性。然而, 有一些变异是有害的, 例如由于*Karma*逆转录转座子的DNA甲基化水平降低, 导致棕榈油产量下降(Ong-Abdullah等2015)。体细胞无性系变异已经成功运用于许多遗传基础狭窄和遗传变异有限的作物物种, 例如无融合生殖和无性繁殖。在组织培养的过程中, 直接发生体细胞胚胎过程是不形成愈伤组织的, 胚胎是由单个体细胞形成的。由于愈伤组织的形成会使体细胞无性系变异发生的概率增加, 所以可以利用体细胞胚胎发生过程来进行植物的组织培养。例如, 在香蕉的无性繁殖过程中, 可以直接利用体细胞胚胎发生过程来降低体细胞无性系变异发生的几率(Shchukin等1996)。

植物产生的体细胞无性系变异是随机且不可预测的, 因此, 体细胞无性系变异的重点是让其具有可重复性, 而不是总让其朝着有利于作物育种的方向进行。有很多因素影响植物的体细胞无性系变异, 当出现有害的变异时, 可以通过缩短组织

培养的时间和减少传代培养的周期来控制。在苹果的组织培养过程中, 发现再生植株的果皮条纹发生了变化, 是由于参与花青素产生的*MYB10*转录因子启动子区域的DNA发生甲基化(Telias等2011)。对表观等位基因的全面了解有利于排除有害的等位基因, 可以通过利用表观遗传学技术创造有益的表观等位基因。

无论哪些作物的育种和改良计划, 首要因素都是遗传变异, 在遗传变异无法实现育种目标时, 表观遗传变异的力量就显现出来, 表观遗传育种为作物改良提供了全新的思路和途径。在组织培养过程中诱导的变异可以帮助选择具有理想农艺性状的植物。虽然有很多关于DNA甲基化与体细胞无性系变异的研究, 但是其机制却尚未被完全了解。因此, 深入解析体细胞无性系变异中的DNA甲基化机制有利于在组织培养过程中识别植物基因组中的高变区, 从而可以有效地控制体细胞无性系变异, 并且可以运用于作物育种与改良。

参考文献(References)

- Adam H, Jouannic S, Orieux Y, et al (2007). Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. *J Exp Bot*, 58 (6): 1245–1259
- Arnhold-Schmitt B (1993). Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.). *Theor Appl Genet*, 85: 793–800
- Bairu MW, Fennell CW, van Staden J (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Z elig'). *Sci Hortic*, 108 (4): 347–351
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul*, 63 (2): 147–173
- Baurens FC, Nicolleau J, Legavre T, et al (2004). Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiol*, 24: 401–407
- Bednarek PT, Orłowska R (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi) genetic changes. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 140: 245–257
- Bond DM, Baulcombe DC (2015). Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112 (3):

- 917–922
- Cassells A, Curry R (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 64: 145–157
- Das K, Roychoudhury A (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci*, 2: 53
- Euwens CJ, Lord S, Donough CR, et al (2002). Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 70 (3): 311–323
- Feschotte C, Zhang X, Wessler SR, et al (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet*, 3 (5): 329–341
- Fraga MF, Cañal M, Rodríguez R (2002). Phase-change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta*, 215: 672–678
- Garcia-Gonzales R, Quiroz K, Carrasco B, et al (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia E Investigacion Agraria*, 37 (3): 5–30
- Ghosh A, Igamberdiev AU, Debnath SC (2017). Detection of DNA methylation pattern in thidiazuron-induced blueberry callus using methylation-sensitive amplification polymorphism. *Biol Plant*, 61 (3): 511–519
- Hao YJ, Deng XX (2002). Stress treatments and DNA methylation affected the somatic embryogenesis of citrus callus. *Acta Bot Brasilica*, 44 (6): 673–677
- Hao YJ, Deng XX (2003). Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 72 (3): 253–260
- Ji L, Mathioni SM, Johnson S, et al (2019). Genome-Wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. *Plant Cell*, 31 (10): 2315–2331
- Karim R, Tan YS, Singh P, et al (2018). Expression and DNA methylation of *SERK*, *BBM*, *LEC2* and *WUS* genes in in vitro cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Physiol Mol Biol Plant*, 24 (5): 741–751
- Law JA, Jacobsen SE (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 11 (3): 204–220
- Leljak-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, et al (2004). Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep*, 23: 120–127
- Li JY, Wang MJ, Li YJ, et al (2019). Multi-omics analyses reveal epigenomics basis for cotton somatic embryogenesis through successive regeneration acclimation process. *Plant Biotechnol J*, 17 (2): 435–450
- Loschiavo F, Pitto L, Giuliano G, et al (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet*, 77 (3): 325–331
- Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. *Methods Mol Biol*, 1815: 3–13
- Matsuda S, Sato M, Ohno S (2014). Cutting leaves and plant growth regulator application enhance somaclonal variation induced by transposition of *VGs1* of *Saintpaulia*. *J Jpn Soc Hortic Sci*, 83 (4): 308–316
- Maury S, Trap-Gentil MV, Hebrard C, et al (2012). Genic DNA methylation changes during in vitro organogenesis: organ specificity and conservation between parental lines of epialleles. *Physiol Plant*, 146 (3): 321–335
- Miguel C, Marum L (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot*, 62 (11): 3713–3725
- Ming X, Zhang ZQ, Zou ZN, et al (2021). Kinetics and mechanisms of mitotic inheritance of DNA methylation and their roles in aging-associated methylome deterioration. *Cell Res*, 31 (3): 373–373
- Morao AK, Bouyer D, Roudier F (2016). Emerging concepts in chromatin-level regulation of plant cell differentiation: timing, counting, sensing and maintaining. *Curr Opin Plant Biol*, 34: 27–34
- Nwauzoma AB, Jaja ET (2013). A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp): mechanisms and applications. *J Appl Biosci*, 67: 5252–5260
- Ong-Abdullah M, Ordway JM, Jiang N, et al (2015). Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. *Nature*, 525: 533–537
- Pijut PM, Beasley RR, Lawson SS, et al (2012). *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species—A review (2001–2011). *Propag Ornamental Plants*, 12: 25–51
- Rival A, Ilbert P, Labeyrie A, et al (2013). Variations in genomic DNA methylation during the longterm in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep*, 32: 359–368
- Rodrigues P, Tulmann Neto A, Cassieri Neto P, et al (1997). Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated nanicao (*Musa* spp., AAA Group). *Acta Hort*, 490 (490): 469–474
- Sales EK, Butardo NG (2014). Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers. *Int J Biol Vet Agric Food Eng*, 8: 603–610
- Santos D, Fevereiro PJPC, Tissue, Culture O (2002). Loss of

- DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 70 (2): 155–161
- Saze H (2008). Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants. *Semin Cell Dev Biol*, 19 (6): 527–536
- Shchukin A, Ben-Bassat D, Israeli Y (1996). Plant regeneration via somatic embryogenesis in Grand Nain banana and its effect on somaclonal variation. In: III International Symposium on In vitro and Horticultural Breeding, pp: 317–318
- Shearman JR, Jantasuriyarat C, Sangsrakru D, et al (2013). Transcriptome analysis of normal and mantled developing oil palm flower and fruit. *Genomics*, 101 (5): 306–312
- Sidorenko LV, Peterson T (2001). Transgene-induced silencing identifies sequences involved in the establishment of paramutation of the maize *pl* gene. *Plant Cell*, 13: 319–335
- Stelpflug SC, Eichten SR, Hermanson PJ, et al (2014). Consistent and heritable alterations of DNA methylation are induced by tissue culture in maize. *Genetics*, 198 (1): 209–218
- Stroud H, Ding B, Simon SA, et al (2013). Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. *Elife*, 2: e00354
- Tanurdzic M, Vaughn MW, Jiang H, et al (2008). Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biol*, 6 (12): 2880–2895
- Telias A, Lin-Wang K, Stevenson DE, et al (2011). Apple skin patterning is associated with differential expression of *MYB10*. *BMC Plant Biol*, 11: 93
- Thieme M, Lanciano S, Balzergue S, et al (2017). Inhibition of RNA polymerase II allows controlled mobilisation of retrotransposons for plant breeding. *Genome Biol*, 18 (1): 134
- Wang XR, Wu R, Lin XY, et al (2013). Tissue culture-induced genetic and epigenetic alterations in rice pure-lines, F1 hybrids and polyploids. *BMC Plant Biol*, 13: 77
- Xu JH, Wang RX, Li XX, et al (2016). Locus- and site-specific DNA methylation of 19 kDa zein genes in maize. *PLoS One*, 11 (1): e0146416
- Zayova E, Vassilevska-Ivanova R, Kraptchev B, et al (2010). Somaclonal variations through indirect organogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biodivers. Conserv*, 3: 1–5