

研究报告 Original Papers

水稻中的“依鬼”: 不同表观遗传状态的同一转基因之间的相互作用

殷雨萌¹, 曾龙军², 王莉莉¹, 郑克志¹, 徐大超¹, 杨东雷^{1,*}¹南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京210095²南京农业大学作物表型组学交叉研究中心, 南京210095

摘要: 位于同源染色体的一对等位基因通过减数分裂与受精独立地遗传给子代, 在F₁及随后的世代中等位基因独立地表达, 这一过程中DNA序列是其表达调控与功能的决定因素。但是基因组印记、X染色体失活、副突变等生命现象并不符合孟德尔遗传定律。在本研究中, 利用强启动子35S驱动赤霉素代谢酶编码基因*OsGA2ox1*, 并遗传转化水稻, 获得的*OsGA2ox1* ectopic expression (GAE)转基因水稻表现出植株矮化、叶色深绿、开花延迟等赤霉素严重缺失的典型表型。在转基因植株的后代中出现了表型恢复、与野生型相同的植株。基因型鉴定发现它们含有35S::*OsGA2ox1*, 但是*OsGA2ox1*的转录降低到与野生型相当的水平, 因此将其命名为*OsGA2ox1* silencing (GAS)。进一步研究发现, 与矮化的GAE植株相比, GAS的35S启动子上DNA甲基化水平明显升高, 表明基因沉默很可能发生在转录水平上。利用这些转基因沉默的GAS与*OsGA2ox1*超表达的GAE水稻进行正反杂交, 所得到的F₁代植株都未呈现出赤霉素缺失表型, 并且它们35S启动子上的DNA甲基化水平与GAS一样高。在随后的F₂、F₃代群体中也未出现过矮化的植株。这表明在F₁代植株中, GAS沉默的35S::*OsGA2ox1*与GAE超表达的35S::*OsGA2ox1*之间发生了相互作用, 改变了超表达的35S::*OsGA2ox1*表观遗传学状态, 而且改变后的35S::*OsGA2ox1*的表观遗传学状态可以稳定地遗传给后代。本研究的发现将为转基因聚合育种提供重要的理论指导。

关键词: 水稻; 副突变; *OsGA2ox1*; 赤霉素; 基因沉默

孟德尔发现了分离定律和自由组合定律, 从此创立了遗传学。分离定律指在生物体中位于1对同源染色体上的等位基因具有独立性, 当生殖细胞减数分裂时, 等位基因随着同源染色体的分离而分开, 独立地随配子遗传给后代。该规律揭示出1个基因座上等位基因的遗传规律, 具有广泛的适用范围, 也具有一定的局限性, 例如在对动植物研究过程中发现的基因组印记、X染色体失活和副突变等表观遗传学现象, 都是经典孟德尔遗传无法解释的现象。

在哺乳动物中, X、Y染色体起源于一对同源的常染色体, 自然选择产生决定性别的基因, 进而发生性别分化(Graves 2006)。在分化后, X染色体形态大且基因丰富, 而Y染色体形态小且为异染色质状态(Graves 2006)。1949年Barr观察到雌猫(*Felis catus*)神经元细胞核中的“核仁卫星”, 并推测它可能来源于性染色体的异染色质, 首次发现哺乳动物X染色体失活(X-chromosome inactivation)的证据(Barr和Bertram 1949)。在雌性哺乳动物体

细胞的细胞核中, 只有1条正常染色的X染色体, 另外1条X染色体浓缩成染色较深的异染色质即巴氏小体, 目的是使雄性(XY)和雌性(XX)之间的X染色体连锁基因表达平衡(Wutz等2002; Avner和Heard 2001; Russell 1961; Lyon 1961)。1984年McGrath和Solter发现哺乳动物胚胎基因组中母本和父本的贡献是不相等的(McGrath和Solter 1984)。基因组印记(genomic imprinting), 指在生物的某些组织和细胞中1对等位基因由于亲本来源不同而只表达来自1个亲本的等位基因, 其中父(母)本等位基因不表达者, 称之为父(母)本印记, 不遵循孟德尔遗传规律(Davies等2005)。目前, 已在小鼠(*Mus musculus*)中发现149个印记基因, 在人类(*Homo sapiens*)中有

收稿 2020-06-11 修定 2020-07-18

资助 国家自然科学基金(31671340)、国家重点研发计划(2016YFD0100603-9)、江苏省自然科学基金(BK20170027)和转基因专项(2016ZX08001002)。

* 通讯作者(dlyang@njau.edu.cn)。

256个印记基因(Tsamban等2020)。同时,对基因组印记的分子机制也有了进一步研究:DNA甲基化、非编码RNA、微印记结构域及逆转座子、组蛋白修饰和染色质结构都是建立和维持基因组印记的重要因子(Tsamban等2020; Munshi和Duvvuri 2007)。

此外,副突变也不符合孟德尔遗传规律。1956年Brink在研究玉米(*Zea mays*)内源的*red1* (*r1*)基因时首次报道了副突变:*r1*编码1种调节花青素合成的转录因子并在强表达时使玉米粒呈现红(紫)色,*R-r* (*R-red*)纯合子控制籽粒呈紫色,*r-r*纯合子控制籽粒呈白色,*R-st* (*R-stippled*)纯合子使籽粒呈斑点紫色;当*R-r/R-r*与*r-r/r-r*杂交, F_1 代(*R-r/r-r*)籽粒为紫色,然而当*R-r/R-r*与*R-st/R-st*杂交后, F_1 代(*R-st/R-r*)籽粒全部为紫色,而 F_1 代(*R-st/R-r*)与*r-r/r-r*杂交的后代则有两种籽粒颜色,分别为斑点紫色(*R-st/r-r*)和白色(*R-r'/r-r*),即*R-r*等位基因在*R-st*作用下其表达发生了可遗传的变化而导致籽粒颜色变浅,将变化后的*R-r*命名为*R-r'* (Chandler等2000; Brink 1958, 1956); *R-r'*不仅可以在子代中遗传,并且可以继续沉默其他的*R-r* (程杉等2016)。这说明基因的表观遗传状态不仅能够稳定遗传,而且能够改变其等位基因的表观遗传状态。1968年,Brink、Coe及Hagemann等在东京遗传学大会上正式提出了“副突变(paramutation)”这一生物学术语(程杉等2016)。副突变被定义为两个同源等位基因之一的副诱变等位基因(paramutagenic allele)能够将另一个副易变等位基因(paramutable allele)变为1个新的副诱变等位基因(Zheng等2015)。随后的研究发现副突变不仅限于内源基因,对外源基因也有转化作用(程杉等2016)。故副突变的定义可被表述为同源序列之间的反式相互作用(trans-interaction)所产生的独特的遗传模式(Giacopelli和Hollick 2015)。它不仅在玉米(Sidorenko和Chandler 2008)、番茄(*Lycopersicon esculentum*) (Hagemann和Berg 1978)、金鱼草(*Antirrhinum majus*) (Krebbes等1987)等植物中广泛存在,在哺乳动物小鼠(Rassoulzadegan等2006)和人类(Rassoulzadegan和Cuzin 2015; Bennett等1997)中也得到证实。

基因聚合育种是改善作物性状的有效方法。它主要包括传统聚合育种、分子标记辅助选择聚合育种以及遗传转化聚合育种这3种方法。传统聚合育种法需要多次杂交与回交,因此选育品种耗时长、成本高(Yi等2013);分子标记辅助选择聚合育种能够对基因型直接选择,具有快速准确、不受环境影响等优点,有效缩短了育种年限(邓其明等2005);遗传转化聚合育种通过遗传转化的方法,可以更快地将几个目标基因聚合到一起,而且在水稻(*Oryza sativa*) (李进斌等2007)、烟草(*Nicotiana tabacum*) (苏宁等2002)和印度芥菜(*Brassica juncea*) (Cao等2008)等作物中已被成功应用(鲁秀梅等2017)。

在转基因聚合的过程中经常存在基因沉默现象,因此基因沉默机制的研究对转基因聚合育种具有重要的指导意义。在本研究中我们创制了1个35S::*OsGA2ox1*转基因水稻,*OsGA2ox1*超表达后呈现赤霉素缺失的表型。而在转基因后代中出现*OsGA2ox1*转录水平恢复到野生型水平,表型恢复到与野生型一样的沉默植株,其35S启动子上的DNA甲基化水平比超表达植株明显提高,表明其发生了转录水平的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)。将沉默的植株与超表达植株进行正反交, F_1 代与后代植株均呈现与野生型相同的正常形态,这表明沉默的*OsGA2ox1*可以充当副诱变等位基因,将超表达的*OsGA2ox1*转化为沉默的*OsGA2ox1*。本研究报道的转基因副突变为转基因聚合育种提供了重要的理论指导。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生型与转基因受体材料均为‘Taipei309’(TP309)。水稻(*Oryza sativa* L.)材料夏季种植于南京农业大学江浦试验基地与白马园区,冬季种植于海南省陵水县。

1.2 35S::*OsGA2ox1*超表达载体的构建及水稻遗传转化

利用限制性内切酶*Xba*I (货号R0145S, NEB)酶切细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC) OsJNBa0017J22获得长为8 515个碱基

对(base pair, bp)的*OsGA2ox1* (LOC_Os05g06670) 基因片段, 该片段包括转录起始位点前840 bp至转录终止位点后1 299 bp的区域。利用T₄ DNA连接酶(货号2011A, TaKaRa)将该基因片段连入*Xba*I酶切后回收的pCambia1301-35SN载体中, 将连接产物转入大肠杆菌DH5 α 感受态(C502, Vazyme)中。单克隆鉴定的引物分别为设计在*OsGA2ox1*的基因组DNA (genomic DNA, gDNA)片段(*OsGA2ox1* gDNA-F, 表1)与载体的NOS终止子上(NOS-R, 表1), 扩增片段长度为1 223 bp。挑取单克隆进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 筛选出以正确方式连入的重组质粒。利用2 $\times$ Taq Master Mix (Dye Plus) (货号P112-03, Vazyme)作为缓冲液进行PCR扩增, 配制方法见说明书。PCR程序设置为: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 重复35个循环; 72 $^{\circ}$ C最终延伸5 min。以质量分数为1%的琼脂糖凝胶于1 $\times$ TAE缓冲液中进行电泳并成像。提取质粒进行*Xba*I酶切验证, 以确定连入的片段大小正确。对候选单克隆进行测序验证, 最终获得35S::*OsGA2ox1*超表达载体。

将测序正确的超表达载体转入农杆菌感受态EHA105中, 通过农杆菌侵染法将35S::*OsGA2ox1*超表达载体转入到诱导脱分化的愈伤组织中, 经潮霉素筛选、分化培养和生根培养获得GAE转基因材料(Chan等1993)。

1.3 植物材料的杂交及自交

随着GAE的继代种植, 在后代中有赤霉素缺失的表型恢复的单株出现, 其后代植株在株高、叶色等方面全部表现为正常, 命名为GAS。分别以GAS和GAE为母本进行杂交, 以GAS为母本的杂交F₁代命名为GAS/GAE, 以GAE为母本的杂交F₁代命名为GAE/GAS。杂交的F₁代进行自交获得F₂代, F₂代自交获得F₃代, GAS/GAE自交的后代为F₂'、F₃'。

1.4 株高测量及统计

用卷尺量取植株在成熟期(播种后140 d)地上部的高度, 底部取地表根部位置, 顶部取植株主穗的穗子直立时的穗顶位置。利用双尾*t*检验对数据进行统计分析。

1.5 CTAB法提取DNA及转基因鉴定

在水稻苗期(播种后40 d)取单株的幼嫩叶片, 利用CTAB法[75 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl (pH=8.0), 15 mmol $\cdot$ L⁻¹ EDTA (pH=8.0), 1.05 mol $\cdot$ L⁻¹ NaCl, 质量分数为1.5%的CTAB]提取水稻DNA (宋敏等2001)。

利用设计在*OsGA2ox1* gDNA序列上的上游引物*OsGA2ox1* gDNA-F (表1)和植物表达载体pCambia1301-35SN的NOS终止子上的下游引物NOS-R (表1)进行转基因鉴定, 以内参基因*OsActin1* (LOC_Os03g50885)作为对照(*OsActin1*-F, *OsActin1*-R, 表1)。利用2 $\times$ Taq Master Mix (Dye Plus) (货号P112-03, Vazyme)进行PCR扩增。PCR程序设置在方法1.2基础上将循环数缩减为33个。以质量分数为1%的琼脂糖凝胶于1 $\times$ TAE缓冲液中进行电泳并成像。若以待检测植株的gDNA为模板能够扩增出目的片段条带, 即证明植株中含有35S::*OsGA2ox1*转基因载体(图1-B)。

1.6 RNA提取及反转录

利用TRIzolTM Reagent试剂盒(货号15596018, Invitrogen)提取水稻苗期(播种后40 d)幼嫩叶片的总RNA。取幼苗时期新鲜叶片于液氮中充分研磨成粉末, 向100 mg左右的样品粉末中加入1 mL TRIzol提取液并充分混匀, 于室温反应5 min; 加入200 μ L氯仿抽提后置于4 $^{\circ}$ C离心; 吸取一定量上清液后加入等体积异丙醇混匀, 室温静置10 min后置于4 $^{\circ}$ C离心, 离心后弃上清; 加入1 mL体积分数为75%的乙醇进行清洗, 再置于4 $^{\circ}$ C离心, 弃去上清液; 将上清液适当吹干, 加入50 μ L焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理过的水(简称DEPC水)充分溶解RNA, 置于-80 $^{\circ}$ C冻存。提取RNA过程中使用的试剂均保证无RNA酶污染。

利用反转录试剂盒HiScriptII QRT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (货号R223-01, Vazyme)的方法, 将提取的新鲜的总RNA反转录为互补DNA (complementary DNA, cDNA)备用。配制8 μ L体系(4 $\times$ gDNA wiper mix 2 μ L, 模板RNA 500 ng, RNA-free ddH₂O 补足)于42 $^{\circ}$ C反应2 min, 以去除RNA样品中的DNA污染; 向产物中加入2 μ L 5 $\times$ qRT SuperMix II并混匀进行反转录, 程序设置为: 50 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。将cDNA置于-20 $^{\circ}$ C冻存。

1.7 半定量RT-PCR

在*OsGA2ox1*的cDNA序列上设计上游引物(*OsGA2ox1* cDNA-F, 表1)和下游引物(*OsGA2ox1* cDNA-R, 表1), 以内参基因*OsActin1*作为对照(*OsActin1*-F, *OsActin1*-R, 表1)。将500 ng RNA反转录获得的cDNA稀释20倍, 以稀释后的cDNA为模板, 通过PCR对*OsActin1*序列进行扩增, 设置循环数及cDNA模板量使各个样品的内参基因目的片段扩增产物含量基本一致, 再以相同的条件扩增*OsGA2ox1*, 通过观察条带的成像亮度, 来判断该基因在各个样品中的表达水平。利用2×Taq Master Mix (Dye Plus) (货号P112-03, Vazyme)进行PCR扩增, 取4 μL稀释后cDNA为模板。PCR程序设置为: 95°C预变性3 min, 95°C变性30 s, 56°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 重复28个循环; 72°C最终延伸5 min。以质量分数为1%的琼脂糖凝胶于1×TAE缓冲液中进行电泳并成像。

1.8 蛋白免疫印迹实验

将适量水稻叶片置于液氮中冷冻研磨成粉末, 取200 mg粉末样品置于2.0 mL微量离心管, 加入200 μL蛋白提取液[50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH=7.5), 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 体积分数为1%的Triton X-100, 质量分数为0.1%的SDS, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 1 mmol·L⁻¹ dithiothreitol]和质量分数为1%的蛋白酶抑制剂(货号04693116001, Roche)混合物涡旋混匀, 置于冰上反应30 min; 将离心机预冷至4°C, 10 000×g的速度离心10 min; 吸取适量上清液加入等量的上样缓冲液[0.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH=6.8), 质量分数为20%的SDS, 体积分数为5%的β-巯基乙醇, 体积分数为10%的甘油, 0.2 g·L⁻¹溴酚蓝]后, 置于95°C变性5 min, 即完成对总蛋白的提取。之后将蛋白质样品在10% SDS-PAGE凝胶中以100 V电压垂直电泳100 min进行分离, 并利用湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene difluoride, PVDF)膜(货号66543, Pall Gelman Laboratory)上; 使用SLR1一抗(1:2 500) (Liu等2019)进行免疫反应, 将抗体按比例稀释到溶解于1×TBST的质量分数为5%的脱脂牛奶中, 将转印有总蛋白的PVDF膜置于其中进行孵育, 而后利用1×TBST清洗3次, 每次10 min; 再利用羊抗兔的二抗(1:5 000) (货号

CW0156, CWbio)进行免疫反应, 方法同一抗孵育; 最后使用eECL Western Blot Kit (货号CW0049, CWbio)进行显色, 利用化学发光凝胶成像系统(型号Chemi DOC XRS+, BIO-RAD)进行成像。

1.9 试剂盒提取DNA及35S启动子的重亚硫酸盐测序

利用DNeasy Plant Mini Kit (50) (货号69104, QIAGEN)试剂盒对材料的gDNA进行提取。将水稻叶片置于液氮中研磨成粉末, 向100 mg样品粉末中加入400 μL AP1和4 μL RNase A, 于65°C孵育10 min; 向裂解液中加入130 μL P3混匀后于冰上孵育5 min, 而后全速离心5 min; 将上清液转移至QIAshredder离心柱全速离心2 min后将澄清的裂解液转移至新的离心管; 向裂解液中加入1.5倍体积的AW1后混匀, 将DNeasy Mini离心柱置于2 mL离心管中并将混合物加入其中, 6 000×g离心1 min; 将离心柱置于新的2 mL离心管中, 加入500 μL AW2, 以6 000×g离心进行清洗并干燥; 将离心柱转移至新的1.5 mL离心管, 加入100 μL于65°C预热的AE缓冲液, 室温静置后离心洗脱DNA样品。

按照Bisulflash DNA Modification Kit (货号P-1026-050, EpiGentek)说明书进行重亚硫酸盐处理, 将未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基变为尿嘧啶。利用重亚硫酸盐处理200 ng DNA: 向一管BF5中加入1 mL BF1混匀, 再加入80 μL BF6并混匀; 向0.2 mL离心管中加入1~5 μL DNA (50~200 ng)后, 加入110 μL混合的BF1/BF5/BF6; 将运行程序设置为95°C 4 min, 65°C 30 min, 95°C 4 min, 65°C 30 min, 95°C 4 min, 65°C 60 min, 18°C 6 h。之后将处理后的DNA纯化: 向离心管中加入250 μL BF2后混匀, 将混合物转移至吸附柱中, 13 523×g离心30 s, 弃收集管中液体; 再向吸附柱中加入200 μL体积分数为90%的乙醇, 13 523×g离心20 s; 准备脱磺化缓冲液(每1 mL体积分数为90%的乙醇中加入12 μL BF3, 混匀), 向吸附柱中加入60 μL该缓冲液, 室温放置8 min, 13 523×g离心20 s后弃收集管中液体; 向吸附柱中加入200 μL体积分数为90%的乙醇, 13 523×g离心清洗, 重复1次; 将吸附柱放入新的1.5 mL离心管, 向滤膜加入10~20 μL BF4, 13 523×g离心30 s, 收集处理好的DNA。

表1 引物序列
Table 1 Oligos used in this study

引物名称	引物序列	扩增产物长度/bp
<i>OsGA2ox1</i> gDNA-F	5'-GATGCACCTCTACCTCCCAA-3'	1 223
NOS-R	5'-GTATAATTGCGGGACTCTAATC-3'	
<i>OsGA2ox1</i> cDNA-F	5'-TCCGAGCAAACGATGTGGAAGG-3'	392
<i>OsGA2ox1</i> cDNA-R	5'-GCTTTTCCCTCACTGGCATT-3'	
<i>OsActin1</i> -F	5'-TGGACAGGTTATCACCATTGGT-3'	86
<i>OsActin1</i> -R	5'-CCGCAGCTTCCATTCTATG-3'	
35S-5'-BisF1	5'-AtAAAtAAGGtAAGTAATAGAGATTGGAG-3'	391
35S-5'-BisR1	5'-TCAACaATaaCCTTTCTTTATCaCAATaATaaC-3'	
35S-5'-BisF2	5'-GTAATAGAGATTGGAGTtTtTAAAAAGGTAGT-3'	365
35S-5'-BisR2	5'-CTTTATCaCAATaATaaCATTTaTaaAaCCAC-3'	
35S-3'-BisF1	5'-AGtTATtTGTtAtTTTATTGTGAAGATAGT-3'	438
35S-3'-BisR1	5'-AaAaAaAaaAaaAATTATAAaTCATTTC-3'	
35S-3'-BisF2	5'-TGTtAtTTTATTGTGAAGATAGTGGAaaa-3'	413
35S-3'-BisR2	5'-AaaTCATTTCTATAAAATATATACTA-3'	
<i>Bca</i> BEST Sequencing Primer M13-47	5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'	569
<i>Bca</i> BEST Sequencing Primer RV-M	5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3'	

重亚硫酸盐处理后未甲基化的C变为T, 所以将扩增引物中F引物由原参考序列中C设计变为t, R引物将G变为a。

将超表达载体35S启动子分为5'端及3'端, 分别长310和370 bp。以重亚硫酸盐处理过的水稻gDNA为模板, 对启动子5'端和3'端分别进行巢式PCR。5'端扩增引物为35S-5'-BisF1/R1 (第1轮PCR引物)和35S-5'-BisF2/R2 (第2轮PCR引物) (表1), 3'端扩增引物为35S-3'-BisF1/R1 (第1轮PCR引物)和35S-3'-BisF2/R2 (第2轮PCR引物) (表1)。利用2×Taq Master Mix (Dye Plus) (货号P112-03, Vazyme)进行PCR扩增。第1轮PCR体系总体积设置为10 μL, 模板量为200 ng, 程序设置为: 95°C预变性3 min, 95°C变性30 s, 50°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 重复33个循环; 72°C最终延伸5 min。第2轮PCR以3 μL第1轮PCR产物为模板, PCR体系为50 μL, 程序将循环数提高到35, 其余条件与第1轮相同。将第2轮PCR扩增的产物纯化后连入pMD19-T中, 构建载体过程参照pMD™19-T Vector Cloning Kit (货号6013, Takara)说明书进行。将连接产物转化入大肠杆菌DH5α感受态细胞(C502, Vazyme)中, 挑取单克隆进行PCR验证。PCR引物为pMD™19-T Vector Cloning Kit提供的鉴定引物*Bca*BEST Sequencing Primers (表1), PCR体系仍按照2×Taq Master Mix (Dye Plus) (货号P112-03, Vazyme)说明书进行配

制。PCR程序设置为: 95°C预变性3 min, 95°C变性30 s, 55°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 重复35个循环; 72°C彻底延伸5 min。对候选单克隆进行测序, 将参考序列文件及测序结果文件内序列编辑成fasta格式上传到甲基化分析网站<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>进行甲基化水平的分析。

2 实验结果

2.1 35S::*OsGA2ox1*转基因发生基因沉默

水稻的*OsGA2ox1*是编码赤霉素失活酶的基因(Sakamoto等2001)。在本研究中将*OsGA2ox1*的gDNA片段克隆到超表达载体pCAMBIA1301-35SN中。将35S::*OsGA2ox1*的重组载体转入到水稻野生型(wild type, WT)品种TP309中, 获得GAE的转基因水稻(图1-A)。半定量RT-PCR检测发现, 在GAE中*OsGA2ox1*的转录水平大幅上升(图1-C), 同时表现出株高变矮、叶色深绿等赤霉素缺失的典型表型(图1-A)。赤霉素信号抑制蛋白SLR1是水稻中唯一的DELLA蛋白, 当赤霉素含量降低时SLR1会有所积累(Ikeda等2001; Ogawa等2000), 与赤霉素缺失表型相符的是SLR1的蛋白水平在GAE中大量累积(图1-D)。在GAE后代中出现表型恢复的植株

(图1-A), 通过基因型鉴定发现这些植株中含有35S::*OsGA2ox1* (图1-B), 但是*OsGA2ox1*的转录水平已经大幅度降低(图1-C), 同时SLR1蛋白的累积也下降到野生型水平(图1-D)。因此, 将这种转基因沉默株系命名为GAS。

2.2 GAS中的35S::*OsGA2ox1*沉默了GAE中的35S::*OsGA2ox1*

以GAS为母本、GAE为父本杂交获得的36株F₁代植株(GAS/GAE), 全部与GAS的表型一致(图2-A)。GAS/GAE的株高与WT和GAS相比没有显著差异, 但是与GAE相比有显著差异(图2-B)。利用半定量RT-PCR在WT、GAE、GAS和GAS/GAE中检测*OsGA2ox1*的转录水平, 发现GAS/GAE的转录水平与GAS相当, 但比GAE的显著下降(图2-C)。同样, GAS/GAE中的SLR1蛋白水平与WT和GAS的相当, 而与GAE相比也大幅降低(图2-D)。为了确定GAS沉默GAE中的*OsGA2ox1*是否由母本效应造成, 我们以GAE为母本与GAS进行杂交获得29株F₁代(GAE/GAS)。GAE/GAS的株高与WT和GAS相比没有显著差异(图2-A和B)。此外, 与GAS/GAE相同, GAE/GAS中的*OsGA2ox1*转录水平及SLR1蛋白表达量也降低到与GAS相当的水平(图2-C和D)。综上所述, 不管GAS作为母本还是父本, 均能使GAE来源的35S::*OsGA2ox1*发生基因沉默。

2.3 GAS的35S启动子DNA甲基化水平升高可能造成基因沉默

DNA甲基化是造成转录水平基因沉默最常见的表观遗传标记, 它是在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的作用下, 将S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine)的甲基转移到DNA的胞嘧啶(cytosine, C)的第5位碳原子上, 形成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m⁵C), 根据胞嘧啶甲基化发生的序列, 将其划分为CG、CHG和CHH三种类型, 其中H代表A、T和C (Matzke和Mosher 2014)。为研究35S::*OsGA2ox1*转基因沉默发生的原因, 我们对GAE与GAS转基因植株中35S启动子5'端和3'端两个区域的甲基化水平进行了检测。在35S启动子5'端区域, GAE的CG、CHG类型甲基化水平较低(CG, 12.50%; CHG, 23.14%), 而在GAS中这两种类型的甲基化水平大幅上升(CG, 98.43%; CHG, 72.72%); 但CHH类型甲基化在GAE中较高(35.39%)而在GAS中却下降了(23.67%) (图3-A)。总之, 随着GAE变为GAS, 35S启动子5'端区域的CHH高甲基化转变为CG、CHG高甲基化。

而在35S启动子3'端区域, GAE的三种类型的甲基化水平都较低(CG, 3.24%; CHG, 1.78%; CHH, 9.76%), 而在GAS中三种类型的甲基化水平都大幅提高(CG, 94.54%; CHG, 67.50%; CHH, 32.88%)

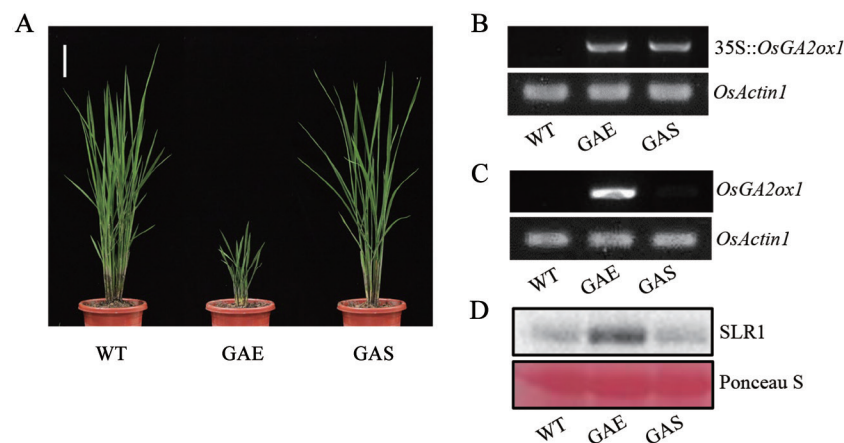


图1 水稻中35S::*OsGA2ox1*转基因发生沉默

Fig.1 The transgenic silencing of 35S::*OsGA2ox1* in rice

A: WT (TP309)、GAE和GAS (70 d苗)表型, Bar (白色标记)=10 cm; B: WT (TP309)、GAE和GAS的35S::*OsGA2ox1*转基因鉴定; C: 在WT (TP309)、GAE和GAS (40 d苗)中半定量RT-PCR检测的*OsGA2ox1*的转录水平; D: 在WT (TP309)、GAE和GAS (40 d苗)中的SLR1蛋白水平, Ponceau S为丽春红染色处理, Rubisco条带作为蛋白上样量对照。

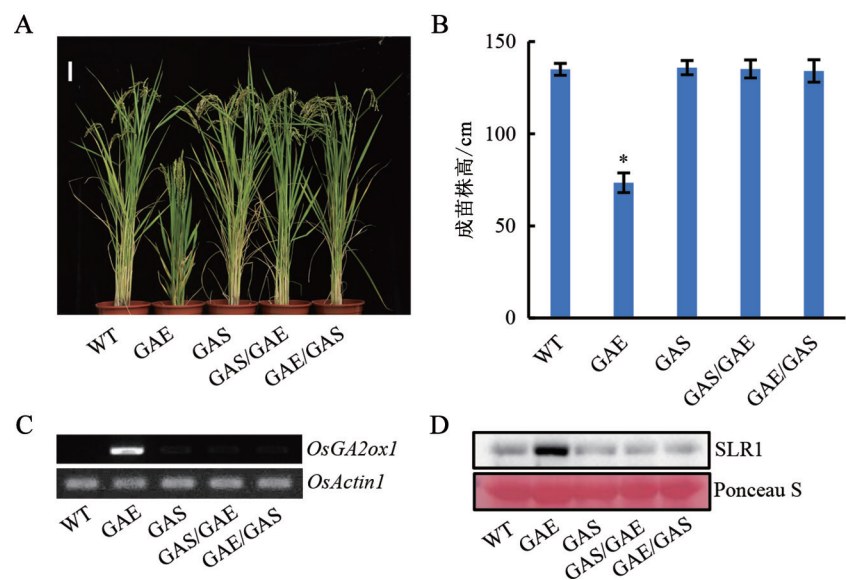


图2 在F₁代植株中GAS沉默了GAE
Fig.2 GAS silenced GAE in F₁ rice plants

A: WT (TP309)、GAE、GAS、GAS/GAE、GAE/GAS (140 d苗)表型, Bar (白色标记)=10 cm; B: 各基因型水稻(140 d苗)株高的平均值, $n=18$, *代表水稻株高统计学显著差异($P<0.05$, 双尾 t 检验); C: 在各基因型水稻(40 d苗)中半定量RT-PCR检测的*OsGA2ox1*的转录水平; D: 在各基因型水稻(40 d苗)中的SLR1蛋白水平, Ponceau S为丽春红染色处理, Rubisco条带作为上样量对照。

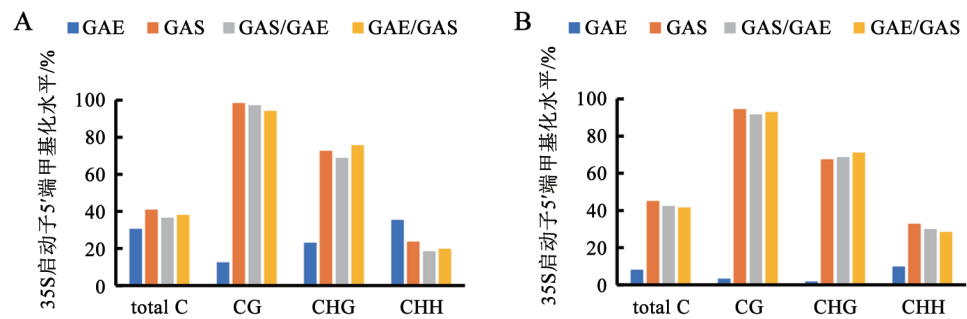


图3 GAS的35S启动子DNA甲基化升高可能造成转基因沉默

Fig.3 Increased DNA methylation of 35S promoter in GAS may cause transgene silencing

A: GAE、GAS、GAS/GAE、GAE/GAS的35S启动子5'端总体(total C)、CG、CHG、CHH甲基化水平, $n=12$; B: GAE、GAS、GAS/GAE、GAE/GAS的35S启动子3'端总体(total C)、CG、CHG、CHH甲基化水平, $n=12$ 。

(图3-B), 这种变化模式与5'端区域的变化模式有明显的区别。总之, 不管在35S启动子的5'端区域还是3'端区域, GAS的总体甲基化水平与GAE相比均大幅升高(图3-A和B), 表明在GAS中*OsGA2ox1*转基因沉默很可能由35S启动子DNA甲基化的升高造成的。

我们同样也对GAS与GAE正反交F₁代的35S启动子DNA甲基化水平进行检测, 结果表明GAS/

GAE与GAE/GAS中DNA甲基化水平与GAS的相当(图3-A和B), 说明35S启动子甲基化水平的上升是造成F₁代植株的*OsGA2ox1*转基因沉默的原因。

2.4 GAS与GAE正反交后代的转基因沉默稳定遗传

GAS中*OsGA2ox1*转基因发生沉默, 在GAS与GAE杂交F₁代中, GAS中沉默的35S::*OsGA2ox1*将GAE中超表达的35S::*OsGA2ox1*转变为沉默状态。为了研究GAE来源的35S::*OsGA2ox1*的表现遗传

学状态在脱离GAS来源的35S::*OsGA2ox1*的影响后是否又恢复为超表达, 我们分析了F₂代群体植株(GAS/GAE的后代命名为F₂, GAE/GAS的后代命名为F₂'). 我们对F₂及F₂'各4个株系, 每个株系24个单株的株高表型进行观察, 并对其株高进行统计分析, 结果发现F₂与WT及GAS相比没有显著差异, 但比GAE明显增高, 而反交得到的F₂'同样与WT及GAS相比株高没有明显差异(图4-A和B)。半定量RT-PCR检测发现, *OsGA2ox1*的转录水平在F₂、F₂'植株中与GAE相比明显降低, 而与WT和GAS没有明显差异(图4-C)。与GAE相比, F₂、F₂'植株中SLR1蛋白水平明显下降, 而与WT和GAS中的水平相当(图4-D)。以上结果表明, F₂及F₂'中GAE来源的35S::*OsGA2ox1*的表观遗传学状态在脱离GAS来源的35S::*OsGA2ox1*的影响后, 依然保持在沉默的表观遗传状态。

为了进一步确定遗传的稳定性, 我们分析了F₂的后代F₃及F₂'的后代F₃'. 我们对F₃与F₃'各20个株系, 每个株系24个单株的表型进行了观测, 未发现赤霉素缺失的水稻植株。对其株高测量, 发现F₃及F₃'植株的株高与WT及GAS的也没有显著差异, 而比GAE株高明显增加(图4-A和B)。半定量RT-PCR发现F₃及F₃'植株的*OsGA2ox1*的转录水平比GAE的

明显下降, 而与WT及GAS的相当(图4-C); Western Blot检测的结果表明SLR1蛋白的累积在F₃、F₃'植株中也没有恢复(图4-D)。综上所述, GAS可以将GAE中的*OsGA2ox1*超表达状态转化成沉默状态, 一旦变为沉默状态后, 可以在后代中稳定地遗传。

3 讨论

我们利用水稻野生型品种TP309为背景材料, 利用农杆菌侵染法转入35S::*OsGA2ox1*超表达载体, 获得转基因材料GAE。当转基因超表达后, 植株呈现出株高变矮、叶色深绿等赤霉素缺失的表型。在继代过程中, 转基因植株后代出现含有35S::*OsGA2ox1*转基因但表型恢复为正常株高的植株, 实验证明这些植株表型恢复到野生型状态是35S::*OsGA2ox1*转基因发生沉默的结果。

将GAE和GAS进行正反杂交, F₁代的植株全部与野生型的株高相同; *OsGA2ox1*的转录水平和赤霉素信号抑制因子SLR1的蛋白积累量在F₁植株中也与野生型相同, 表明GAS中沉默的35S::*OsGA2ox1*将GAE中超表达的35S::*OsGA2ox1*沉默, 这种沉默的表观遗传状态可以在后代中作为独立的遗传因子稳定地遗传。GAS中沉默的35S::*OsGA2ox1*恰似“侏鬼”, 它由之前的超表达变为了沉默

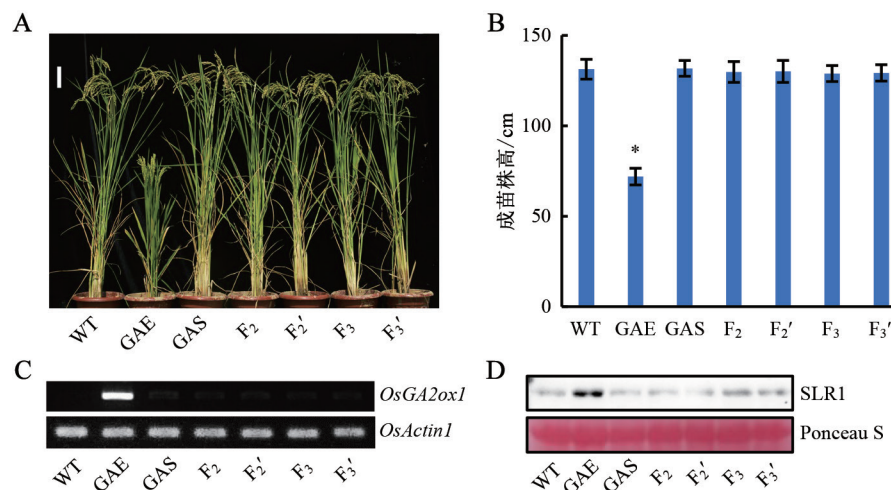


图4 35S::*OsGA2ox1*在F₂代、F₃代植株的转基因沉默稳定遗传

Fig.4 Transgenic silencing of 35S::*OsGA2ox1* inherit stably in F₂ and F₃ plants

A: WT (TP309)、GAE、GAS、F₂、F₂'、F₃、F₃' (140 d苗)表型, Bar (白色标记)=10 cm; B: 各基因型水稻苗期(140 d苗)株高的平均值, $n=18$, *代表水稻株高统计学显著差异($P<0.05$, 双尾 t 检验); C: 在各基因型水稻(40 d苗)中半定量RT-PCR检测的*OsGA2ox1*的转录水平; D: 在各基因型水稻(40 d苗)中的SLR1蛋白水平, Ponceau S为丽春红染色处理, Rubisco条带作为上样量对照。

状态, 并且具备了将GAE中超表达35S::OsGA2ox1变为沉默状态的能力, 自己本来是受害者, 但受害之后又“为虎作伥”去危害其他同类。

除了本文提到的外源基因之间的互作, 内源基因之间的互作已经有报告。例如Greaves等人此前发现, 将2个表观基因组有差异的拟南芥生态型杂交, 其F₁代胞嘧啶甲基化(³⁵C)水平发生变化, 这种变化是由反式染色体甲基化(trans-chromosomal methylation, TCM)和反式染色体去甲基化(trans-chromosomal demethylation, TCdM)引起的(Greaves等2014)。Greaves等人将拟南芥C24与Landsberg *erecta* (Ler)进行杂交, 在F₁代杂种中发现上千个TCM/TCdM位点(Greaves等2012), 主要研究了At1g64790以及At3g43340/50这两个位点, 结果发现在这两个位点上F₁代由TCM和TCdM引起的甲基化改变遗传给F₂代, 这与玉米中报道的副突变一致(Greaves等2014)。后来朱健康实验室将不同生态型来源的基因组之间由TCM和TCdM引起的甲基化非加性变化定义为甲基化互作(methylation interaction), 并发现RdDM途径是杂种中甲基化互作的分子机制(Zhang等2016)。在作物杂交过程中, 也很可能存在等位基因之间的TCM和TCdM, 这些互作增加了遗传的多态性, 对于创制品种多样的作物新品种有着重要的贡献。

参考文献(References)

- Avner P, Heard E (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, 2 (1): 59–67
- Barr ML, Bertram EG (1949). A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 163 (4148): 676–677
- Bennett ST, Wilson AJ, Esposito L, et al (1997). Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele. *Nat Genet*, 17 (3): 350–352
- Brink RA (1956). A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics*, 41 (6): 872–889
- Brink RA (1958). Paramutation at the R Locus in maize. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 23: 379–391
- Cao J, Shelton AM, Earle ED (2008). Sequential transformation to pyramid two Bt genes in vegetable Indian mustard (*Brassica juncea* L.) and its potential for control of diamondback moth larvae. *Plant Cell Rep*, 27 (3): 479–487
- Chan MT, Chang HH, Ho SL, et al (1993). *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Mol Biol*, 22 (3): 491–506
- Chandler VL, Eggleston WB, Dorweiler JE (2000). Paramutation in maize. *Plant Mol Biol*, 43 (2–3): 121–145
- Cheng S, Wang XR, Ding W (2016). Advances of epigenetic studies on mechanisms of paramutation. *Prog Physiol Sci*, 47 (1): 7–13 (in Chinese with English abstract) [程杉, 王晓荣, 丁卫(2016). 副突变及其表观遗传机制的研究进展. *生理科学进展*, 47 (1): 7–13]
- Davies W, Isles AR, Wilkinson LS (2005). Imprinted gene expression in the brain. *Neurosci Biobehav Rev*, 29 (3): 421–430
- Deng QM, Zhou YJ, Jiang ZX, et al (2005). Pyramiding bacterial blight (BB) resistance genes (*Xa21*, *Xa4* and *Xa23*) into rice and its effects analysis. *Acta Agron Sinica*, 31 (9): 1241–1246 (in Chinese) [邓其明, 周宇燭, 蒋昭雪等 (2005). 白叶枯病抗性基因*Xa21*、*Xa4*和*Xa23*的聚合及其效应分析. *作物学报*, 31 (9): 1241–1246]
- Giacopelli BJ, Hollick JB (2015). Trans-homolog interactions facilitating paramutation in maize. *Plant Physiol*, 168 (4): 1226–1236
- Graves JAM (2006). Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell*, 124 (5): 901–914
- Greaves IK, Groszmann M, Ying H, et al (2012). Trans chromosomal methylation in *Arabidopsis* hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (9): 3570–3575
- Greaves IK, Groszmann M, Wang A, et al (2014). Inheritance of trans chromosomal methylation patterns from *Arabidopsis* F₁ hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (5): 2017–2022
- Hagemann R, Berg W (1978). Paramutation at the *sulfurea* locus of *Lycopersicon esculentum* Mill. VII. Determination of the time of occurrence of paramutation by the quantitative evaluation of the variegation. *Theor Appl Genet*, 53 (3): 113–123
- Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, et al (2001). *slender rice*, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell*, 13 (5): 999–1010
- Krebbers E, Hehl R, Piotrowiak R, et al (1987). Molecular analysis of paramutant plants of *Antirrhinum majus* and the involvement of transposable elements. *Mol Gen Genet*, 209 (3): 499–507
- Li JB, Yao CX, Xu MH, et al (2007). Pyramiding lines of three foreign genes confer resistance to rice blast. *Southwest Chin J Agr Sci*, 20 (1): 49–52 (in Chinese with English

- abstract) [李进斌, 姚春馨, 许明辉等(2007). 三个外源抗稻瘟病基因聚合与抗性研究. 西南农业学报, 20 (1): 49–52]
- Liu M, Shi Z, Zhang X, et al (2019). Inducible overexpression of *Ideal Plant Architecture1* improves both yield and disease resistance in rice. *Nat Plants*, 5 (4): 389–400
- Lu XM, Zhang N, Chen JF, et al (2017). The research progress in crops pyramiding breeding. *Mol Plant Breed*, 15 (4): 1445–1454 (in Chinese with English abstract) [鲁秀梅, 张宁, 陈劲枫等(2017). 作物基因聚合育种的研究进展. 分子植物育种, 15 (4): 1445–1454]
- Lyon MF (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190 (4773): 372–373
- Matzke MA, Mosher RA (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet*, 15 (8): 394–408
- McGrath J, Solter D (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37 (1): 179–183
- Munshi A, Duvvuri S (2007). Genomic imprinting—The story of the other half and the conflicts of silencing. *J Genet Genomics*, 34 (2): 93–103
- Ogawa M, Kusano T, Katsumi M, et al (2000). Rice gibberellin-insensitive gene homolog, *OsGAI*, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene*, 245 (1): 21–29
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, et al (2006). RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 441 (7092): 469–474
- Rassoulzadegan M, Cuzin F (2015). From paramutation to human disease: RNA-mediated heredity. *Semin Cell Dev Biol*, 44: 47–50
- Russell LB (1961). Genetics of mammalian sex chromosomes. *Science*, 133 (3467): 1795–1803
- Sakamoto T, Kobayashi M, Itoh H, et al (2001). Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. *Plant Physiol*, 125 (3): 1508–1516
- Sidorenko L, Chandler V (2008). RNA-dependent RNA polymerase is required for enhancer-mediated transcriptional silencing associated with paramutation at the maize *pl* gene. *Genetics*, 180 (4): 1983–1993
- Song M, Zhang YS, Hu WH (2001). Comparison of four methods of DNA extraction from rice. *J Yunnan Univ (Nat Sci Ed)*, 23 (1): 74–76 (in Chinese with English abstract) [宋敏, 张云孙, 胡卫红(2001). 4种提取水稻基因组DNA方法的比较. 云南大学学报(自然科学版), 23 (1): 74–76]
- Su N, Sun M, Yang B, et al (2002). The insect resistance of OC and Bt transplastomic plant and the phenotype of their progenies. *Hereditas*, 24 (3): 288–292 (in Chinese with English abstract) [苏宁, 孙萌, 杨波等(2002). 双价抗虫基因叶绿体共转化植株抗虫性及其后代代表型分析. 遗传, 24 (3): 288–292]
- Tsamban T, Agarwal V, Khosla S (2020). Role of genomic imprinting in mammalian development. *J Biosci*, 45 (20): 1–21
- Wutz A, Rasmussen TP, Jaenisch R (2002). Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of *Xist* RNA. *Nat Genet*, 30 (2): 167–174
- Yi D, Cui L, Wang L, et al (2013). Pyramiding of *Bt cryIIa8* and *cryIBa3* genes into cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) confers effective control against diamond-back moth. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 115 (3): 419–428
- Zhang Q, Wang D, Lang Z, et al (2016). Methylation interactions in *Arabidopsis* hybrids require RNA-directed DNA methylation and are influenced by genetic variation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (29): E4248–E4256
- Zheng Z, Yu H, Miki D, et al (2015). Involvement of multiple gene-silencing pathways in a paramutation-like phenomenon in *Arabidopsis*. *Cell Rep*, 11 (8): 1160–1167

“Chang Ghost” in rice: the interactions between same transgenes with different epigenetic states

YIN Yumeng¹, ZENG Longjun², WANG Lili¹, ZHENG Kezhi¹, XU Dachao¹, YANG Donglei^{1,*}

¹State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

²Plant Phenomics Research Center, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: A pair of alleles on the homologous chromosome independently passes on in offspring through meiosis and fertilization. In F_1 and subsequent generations, the alleles are independently expressed. The DNA sequence of gene determines its function and expression pattern. However, in the biological processes such as genomic imprinting, X-chromosome inactivation and paramutation, alleles do not comply the genetic laws. In this study, the constitutive promoter, 35S was used to drive the gibberellin metabolism gene, *OsGA2ox1*. *OsGA2ox1* ectopic expression (GAE) transgenic rice exhibited a series of gibberellin deficient phenotypes such as plant dwarfism, dark green leaves, and delayed flowering. In the progeny of the GAE, a rice plant restored the development defects of GA deficiency. Genotyping confirmed the existence of 35S::*OsGA2ox1*, however, the transcriptional level of *OsGA2ox1* was reduced to a level comparable to that of the WT. We therefor named it as *OsGA2ox1* silencing (GAS). Bisulfite sequencing demonstrated that DNA methylation level on the 35S promoter in GAS was increased than that in GAE, suggesting that gene silencing likely occur at the transcription level. The F_1 plants from crossing GAS with GAE did not exhibit gibberellin-deficient phenotype, suggesting that overexpressed 35S::*OsGA2ox1* from GAE was silenced. Furthermore, the DNA methylation was increased on 35S promoter in F_1 plants, suggesting that silenced 35S::*OsGA2ox1* of GAS inactivated overexpressed 35S::*OsGA2ox1* of GAE through DNA methylation. In subsequent generations (F_2 and F_3), the GA-deficient plant did not segregate out, suggesting that inactivated overexpressed 35S::*OsGA2ox1* of GAE could be inherited. This study provides new insights in the behaviors of transgenes.

Key words: rice; paramutation; *OsGA2ox1*; gibberellin; gene silencing

Received 2020-06-11 Accepted 2020-07-18

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31671340), the National Key Research and Development Project (2016YFD0100603-9), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20170027) and Key Transformation Project (2016ZX08001002).

*Corresponding author (dlyang@njau.edu.cn).