

山核桃甲基化敏感扩增多态体系的建立与甲基化初步分析

陈文充, 贾 宁, 董 昂, 闫道良, 曾燕如

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 山核桃 *Carya cathayensis* 为浙江省重要的经济树种。近年来细胞生物学及分子标记的研究发现, 山核桃中存在无融合生殖, 天然群体的多态性不佳, 存在印迹数量性状位点(iQTLs)。iQTLs 与 DNA 甲基化有关, 而 DNA 甲基化对生物表观遗传调控起着重要的作用, 是可遗传的生物现象。甲基化敏感扩增多态(MSAP)是基于 PCR 扩增多态性的 DNA 甲基化检测方法。在建立山核桃 MSAP 标记体系的基础上对来自 3 个天然居群的山核桃单株样品进行了分析。结果表明: 山核桃存在甲基化, 非甲基化相对水平大于总甲基化相对水平, 且两者间差异极显著(Wilcoxon Rank Sum 检验 $P < 0.001$), 内侧胞嘧啶甲基化相对水平远大于半甲基化相对水平, 且两者间差异极显著(分子方差分析及邓肯多重比较, $P < 0.001$); 天然居群山核桃内侧胞嘧啶甲基化相对水平高, 则半甲基化相对水平和非甲基化相对水平则相对较低, 反之亦然; 居群间存在明显的表观遗传分化, 主要变异存在于居群内。此外, 山核桃的 MSAP 体系可用于薄壳山核桃 *Carya illinoensis*, 2 个物种在位点及位点数上存在差异。图 4 表 5 参 53

关键词: 林木育种学; 山核桃; 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性; 表观遗传

中图分类号: S722.8

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2019)03-0468-11

A protocol for methylation-sensitive amplified polymorphism markers and its application to a methylation analysis in *Carya cathayensis*

CHEN Wenchong, JIA Ning, DONG Ang, YAN Daoliang, ZENG Yanru

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In hickory (*Carya cathayensis*), an important non-timber species in Zhejiang Province, the existence of apomixis, of imprinted quantitative trait loci (iQTLs), and of low DNA polymorphism in terms of cytobiology and molecular markers, has recently been found. Since iQTLs (related to DNA methylation, an inheritable biological phenomenon) played a vital role in epigenetic regulation, methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP), a Polymerase Chain Reaction (PCR)-based method of detecting DNA methylation, was used to establish a protocol in hickory. Then samples from three natural hickory populations were analyzed. Results showed that methylation was prevalent in hickory with the non-methylation level significantly higher (Wilcoxon signed-rank test, $P < 0.001$) than the total methylation level. Internal cytosine methylation had a relatively higher level than semi-methylation, both of which were also significantly different from each other (Analysis of molecular variance (AMOVA) followed by Duncan's multiple comparison, $P < 0.001$). If hickory populations had a high level of internal cytosine methylation, then levels of semi-methylation and non-methylation of these populations were relatively low, and vice versa. Also, there was epigenetic differentiation among hickory populations, and the main differentiation existed within a population. In conclusion, this work has laid a foundation for further study of methylation in hickory; in fact, the MSAP protocol established in hickory could be used for pecan, even though the loci and the number of loci for pecan were different from those of hickory. [Ch, 4 fig. 5 tab. 53 ref.]

收稿日期: 2018-05-11; 修回日期: 2018-08-08

基金项目: 浙江省自然科学基金重点资助项目(LZ13C160002); 国家自然科学基金面上资助项目(31370678)

作者简介: 陈文充, 从事林木重要经济性状的遗传规律与种质创新研究。E-mail: 506396307@qq.com。通信作者: 曾燕如, 教授, 博士, 从事经济林培育与利用研究。E-mail: yrzeng@zafu.edu.cn

Key words: forest tree breeding; *Carya cathayensis*; methylation; methylation-sensitive amplification polymorphism; epigenetic

山核桃 *Carya cathayensis* 属胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya* 乔木树种, 是浙江区域优势明显的特色经济干果, 其坚果种仁具有较高的营养价值和经济效益^[1]。近年来向贵州石漠化地区推广山核桃种植, 生长良好, 并已陆续挂果^[2]。尽管生产上已解决了无性嫁接繁殖的问题^[3], 但山核桃长期处于野生、半野生状态^[4], 种下无品种, 以实生繁殖。与山核桃同属的薄壳山核桃 *Carya illinoensis* 则品种极其繁多, 2 个物种均含油率高, 且具互补的优势。如山核桃种子小, 壳硬, 风味独特, 而薄壳山核桃则种子大, 壳薄, 也有其独特的风味。因此, 自 20 世纪 60 年代开始, 2 个物种的杂交试验发现: 山核桃与薄壳山核桃正反交均可育, 杂种后代在生长性状上具有杂种优势, 但不管正交还是反交, 其子代在表型上均与母本相似^[5-6]。尽管山核桃为二倍体物种^[7-8], 但近年的研究发现: 山核桃存在起源于珠心细胞且属于不定胚生殖范畴的无融合生殖现象及假配合现象^[9]。随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNAs, RAPD), 扩增片段长度多态 (amplified fragment length polymorphism, AFLP), 简单序列重复间隔区 (inter-simple sequence repeat, ISSR), 序列相关扩增多态 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP), 简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 等分子标记的分析发现: 山核桃多态性不佳, 尽管存在一些多态的位点, 但比例较低^[10-12], 且利用有限的标记在山核桃中发现存在印迹数量性状位点 (imprinted quantitative trait loci, iQTLs)^[13]。基因组印迹与 DNA 甲基化有关^[14], 而 DNA 甲基化与染色质结构修饰、小分子 RNA 调控及核小体重塑^[15]、组蛋白共价修饰、基因沉默和 RNA 编辑等一起在生物体内进行表观遗传调控基因的表达, 其中 DNA 甲基化是研究最为透彻的表观遗传现象之一^[16]。甲基化敏感扩增多态 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 标记是在 AFLP 技术基础上衍生的基于 PCR 扩增的 DNA 甲基化检测方法, 它将 AFLP 中 *Mse* I 替换成 2 个对甲基化位点敏感程度存在差异的同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I, 可检测全基因组范围内 CCGG 位点的甲基化状况, 同时不仅可以获得非甲基化的遗传位点 (1, 1), 还可以获得包括半甲基化位点 (1, 0), 内部甲基化位点 (0, 1), 超甲基化或突变位点 (0, 0) 在内的共 4 类标记位点。MSAP 在不同生物中具有通用性, 被广泛应用于动植物资源鉴定、生物发育调控研究、杂种优势分子机理研究^[17]等, 并已应用于巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis*^[18], 杉木 *Cunninghamia lanceolata*^[19], 叶籽银杏 *Ginkgo biloba* var. *epiphylla*^[20], 地中海柏木 *Cupressus sempervirens*^[21], 落叶松 *Larix*^[22] 和毛白杨 *Populus tomentosa*^[23] 等林木的研究中。为了从标记方面对山核桃开展深入研究, 本研究借鉴其他物种的 MSAP 体系, 建立适用于山核桃的 MSAP 析体系, 并将其应用于天然群体的山核桃, 旨在为山核桃的遗传学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

从浙江省杭州市临安区太湖源镇指南村 (7 株, 30°21'N, 119°34'E), 临安区清凉锋镇林竹村 (17 株, 30°06'N, 118°58'E), 安徽省宁国市仙霞镇潘张村 (6 株, 30°24'N, 119°17'E) 3 个山核桃天然居群中分别采集盛果期成年单株的叶片, 用于 DNA 的提取。采样单株彼此间相距至少 50 m。

薄壳山核桃叶片样品采自浙江省杭州市余杭区长乐林场中国林业科学研究院亚热带林业研究所种质资源收集圃盛果期成年单株的叶片 (4 株, 30°18'N, 119°51'E)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用郭金剑^[24]改良的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取山核桃和薄壳山核桃基因组 DNA, 用核酸蛋白质分析仪 (ND-1000, NanoDrop, 美国) 测定波长 260 和 280 nm 时的光密度值 [$D(260)$, $D(280)$] 及反映基因组 DNA 质量的 $D(260)/D(280)$ 与 DNA 浓度; 用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的优劣。

1.2.2 山核桃 MSAP 体系的建立 基于洪舟等^[19]用于杉木的 MSAP 分析体系, 在山核桃中就酶切连接时间、预扩增产物稀释倍数、选择性扩增的模板 DNA 用量及 PCR 退火温度 (第 1 轮) 与扩增循环数 (第 2 轮) 进行优化, 建立适用于山核桃 MSAP 分析体系。DNA 限制性酶切与接头连接采用 1 步法。在此基础

上对酶切连接时间(4, 6 和 8 h)进行实验。因为预扩增与选择性扩增的目的与程序有差异, 所以有必要就具体的物种或研究对象, 对实验进行一定的优化^[25]。在预扩增阶段, 参考已有的杉木 MSAP 分子标记体系^[19]以及苹果 *Malus pumila*^[26], 脐橙 *Citrus sinensis*^[27]等其他经济物种的 MSAP 反应体系, 测试 3 种不同的预扩增产物稀释倍数(10, 20 和 40 倍), 同时试验选择性扩增的模板 DNA 用量(2 和 4 μ L)。借鉴三叶木通 *Akebia trifoliata* 的 MSAP 反应体系^[28], 对选择性扩增程序(94 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 第 1 轮 PCR 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 每个循环递减 0.7 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 13 个循环; 第 2 轮 PCR 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min)中第 2 轮 PCR 的循环数 (20, 25 和 30 次)及第 1 轮 PCR 中退火温度的递减幅度(每循环分别降低 0.7, 1.0 和 1.3 $^{\circ}$ C)进行优化。以上试验内容按序进行, 待前 1 个参数优化后便固定下来进行后 1 个参数的优化。选扩产物用质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。选扩产物电泳检测有扩增产物, 且条带清晰, 则进行 96 对引物组合(表 1)的筛选, 用体积分数为 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并对胶进行常规银染。

表 1 MSAP 分析选择性扩增引物序列

Table 1 Sequences of primers for selective amplification in MSAP

<i>EcoR</i> I (E)引物	序列(5'→3')	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (HM)引物	序列(5'→3')
E1	GACTGCGTACCAATTCGGT	HM-1	GATGAGTCTAGAACGGTAG
E2	GACTGCGTACCAATTCAC	HM-2	GATGAGTCTAGAACGGTAC
E3	GACTGCGTACCAATTC AAC	HM-3	GATGAGTCTAGAACGGTTG
E4	GACTGCGTACCAATTCAGA	HM-4	GATGAGTCTAGAACGGTTC
E5	GACTGCGTACCAATTC AAA	HM-5	GATGAGTCTAGAACGGTGT
E6	GACTGCGTACCAATTC AAT	HM-6	GATGAGTCTAGAACGGTGC
E7	GACTGCGTACCAATTC AGC	HM-7	GATGAGTCTAGAACGGTCT
E8	GACTGCGTACCAATTC CTG	HM-8	GATGAGTCTAGAACGGTCG
E9	GACTGCGTACCAATTC CAC		
E10	GACTGCGTACCAATTC CTG		
E11	GACTGCGTACCAATTC CAT		
E12	GACTGCGTACCAATTC ACG		

1.2.3 天然居群山核桃的分析 用建立的适用于山核桃的 MSAP 分析体系对天然居群山核桃样品进行分析时, *Hpa* II/*Msp* I 选择性扩增引物在序列末端加荧光 5'-FAM(羟基荧光素)标记(北京睿博兴科生物科技有限公司)。选择性扩增产物送北京睿博兴科生物科技有限公司进行毛细管电泳检测(ABI 3730XL)。

1.2.4 山核桃 MSAP 分析体系对薄壳山核桃的适用性 建立山核桃 MSAP 分析体系对薄壳山核桃 DNA 进行分析, 了解山核桃的 MSAP 分析体系是否适用于薄壳山核桃。

1.2.5 山核桃 MSAP 标记与其他分子标记的比较 在山核桃 MSAP 分析结果中提取非甲基化遗传位点信息, 并将其与 RAPD, AFLP, ISSR, SRAP, SSR 分子标记的结果进行比较。

1.2.6 数据处理 毛细管电泳检测选扩产物后, 甲基化与非甲基化位点由 GeneMarker V2.0.0 软件产生。软件默认去除小于 70 bp 的位点, 各位点上有扩增产物时记为“1”, 无扩增产物时记为“0”。使用 Excel, 将 MSAP 分析 2 组酶 *EcoR* I/*Hpa* II 和 *EcoR* I/*Msp* I 酶切产物的 PCR 0 或 1 的结果转换成 MSAP 分析结果(0, 0), (1, 0), (0, 1)和(1, 1)4 种位点数据, 用基于 R 语言的 msap 软件^[30]分析数据, 包括甲基化敏感位点(methylation sensitive locus, MSL)与非甲基化敏感位点(non-methylation locus, NML), 即遗传位点的判断, 并分析总位点数、MSL 数、NML 数、多态的 MSL 数及其比例, 多态的 NML 数及其比例, MSL 及 NML 各自的香农信息指数(Shannon diversity index, *I*)。基于 Wilcoxon Rank Sum 检验的遗传多样性与表观遗传多样性的差异显著性, 获得各居群(0, 0), (1, 0), (0, 1)和(1, 1)4 种位点各自的比例, 并分别对 MSL 和 NML 进行分子方差分析(AMOVA), 最后基于主坐标分析(Principal coordinates analysis, PCoA)来评估 MSL 和 NML 的分化。

2 结果与分析

2.1 山核桃 MSAP 分析体系的建立

提取的基因组 DNA 经琼脂糖电泳检测，结果条带明亮、清晰，质量较好。核酸蛋白质分析仪测定结果表明：基因组 DNA $D(260)/D(280)$ 为 1.80~2.10，纯度较高，可用于后续的 MSAP 标记分析。

实验发现：500 ng 基因组 DNA 在 37 ℃ 的水浴锅中双酶切-连接反应 4, 6 和 8 h，其中，6 h 效果最佳，没有大分子 DNA(图 1A)。将酶切完全且带接头的 DNA 产物进行预扩，琼脂糖电泳检测预扩产物在 100~1 000 bp 呈弥散状(图 1B)，说明效果较好，可用作下一步选择性扩增的模板。

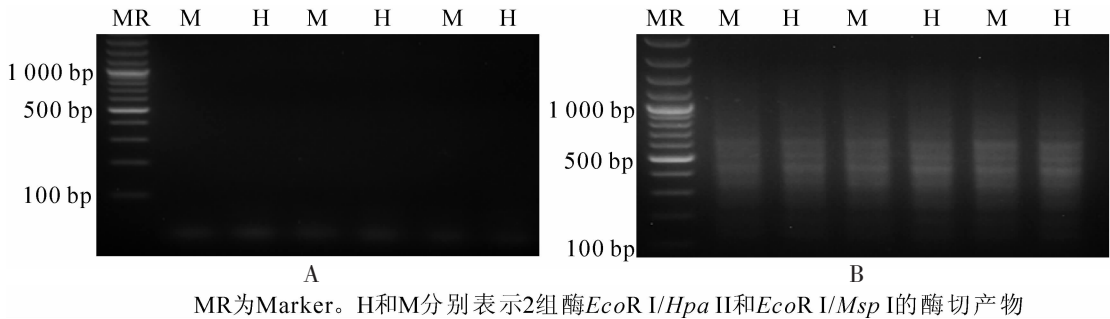
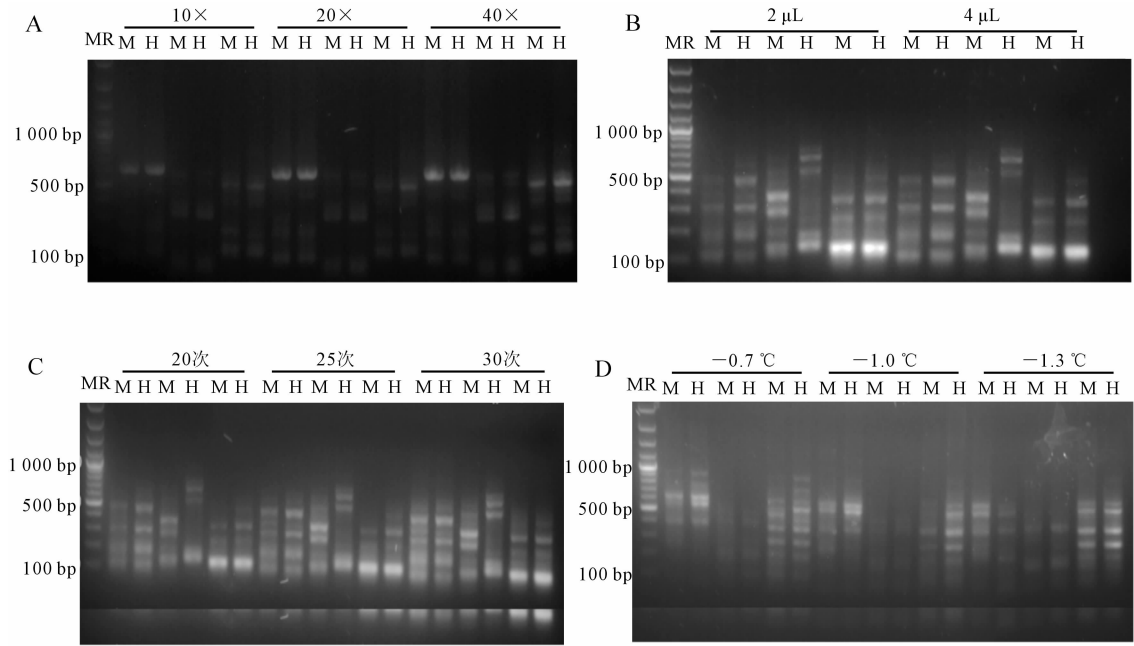


图 1 山核桃 DNA 双酶切-连接结果(A)和山核桃不同样品预扩增 DNA 检测(B)

Figure 1 Results of double enzyme digested DNAs in hickory (A) and different pre-amplified DNA samples(B)

在预扩增基础上，预扩产物模板 3 种不同稀释倍数的试验发现，预扩产物稀释 40 倍时，选择性扩增结果最佳(图 2A)。此外，发现预扩增产物用量为 2 μ L 时，选择性扩增结果最佳(图 2B)。而选择性扩增第 2 个 PCR 循环数为 25 时选扩反应效果最佳(图 2C)。当第 2 个 PCR 循环递减温度为-0.7 ℃时，选择性扩增条带数较少；当温度变化梯度为-1.0 ℃时，清晰条带数量偏少；而每循环降低 1.3 ℃为最佳温度变化梯度(图 2D)。

实验结果最佳的山核桃 MSAP 分析体系如下：500 ng DNA 在 37 ℃水浴锅中酶切连接 6 h；酶切连



MR为Marker。H和M分别表示2组酶*EcoR* I/*Hpa* II和*EcoR* I/*Msp* I的酶切产物。A. 不同稀释倍数预扩增DNA的选择性扩增反应效果；B. 2种不同预扩产物用量(2和4 μ L)的选择性扩增反应效果；C. 不同循环数的选择性扩增反应效果；D. 3种递减温度梯度的扩增效果

图 2 不同条件下 DNA 的选择性扩增反应效果

Figure 2 Result of selective amplification under different conditions

接反应产物稀释 10 倍进行预扩增。选择性扩增反应体系为 10×PCR 缓冲液 2.0 μL, dNTPs(10 mmol·L⁻¹, 生工生物工程(上海)股份有限公司)0.5 μL, 25 mmol·L⁻¹ 氯化镁 1.5 μL, 稀释 40 倍的预扩增产物 2.0 μL, 选择性扩增引物各 1.5 μL, *Taq* 酶(5×16.67 mkat·L⁻¹, 上海申能博彩生物科技有限公司)0.5 μL, 补水至 20.0 μL。选择性扩增的 PCR 程序为 94 ℃预变性 2 min; 94 ℃变性 30 s, 65 ℃退火复性 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 共 13 个循环, 每个循环退火温度递减 1.3 ℃; 94 ℃变性 30 s, 56 ℃退火复性 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 共 25 次循环; 72 ℃延伸 10 min, 4 ℃保持。从 96 对选择性扩增引物组合中筛选出了能扩增清晰条带, 重复性好, 且适用于山核桃 MSAP 分析的引物 5 对, 分别为 HM-2/E4, HM-3/E2, HM-3/E11, HM-5/E8, HM-8/E8。

2.2 天然居群山核桃的分析

2.2.1 山核桃 MSAP 分析 利用 *EcoR* I/*Hpa* II 和 *EcoR* I/*Msp* I 不同的酶切位点, MSAP 分析得到 4 种 5'-CCGG 位点信息。非甲基化遗传位点(1, 1)*Hpa* II 和 *Msp* I 2 种酶均能进行酶切, 毛细管电泳时出现 H(*EcoR* I/*Hpa* II 酶切产生)与 M(*EcoR* I/*Msp* I 酶切产生)双峰; 半甲基化位点(1, 0)仅 *Hpa* II 能进行酶切; 内部胞嘧啶甲基化位点(0, 1)则相反, 仅 *Msp* I 能进行酶切; 而超甲基化位点(0, 0)2 种酶均不能酶切, 电泳图上没有峰, 只能通过样品间的对比来推断 30 个山核桃样品 5 对选择性扩增引物共产生 389 个位点, 且 387 个位点为多态位点, 多态性水平为 99.48%, 其中引物组合 HM-3/E2 扩增的位点数(191)最多, 引物组合 HM-3/E11 扩增的多态性位点(18)最少; MSL 140 个, 多态位点 65 个, 甲基化敏感多态位点比例为 46.42%; NML 249 个, 多态位点 233 个, 非甲基化遗传多态位点比例为 93.57%。MSL 和 NML 的香农信息指数(*I*)平均分别为 0.554 和 0.173。

2.2.2 山核桃 MSAP 标记与其他标记分析结果的比较 由于 NML 是遗传位点^[29], 在与山核桃其他分子标记(RAPD, ISSR, SRAP, AFLP, SSR)分析结果相比较时, 采用 NML 的数据。结果表明: MSAP 分子标记的多态性水平(93.57%)最高, 其他每对引物的扩增位点数、多态引物比例、多态位点比例、每对引物扩增得到的多态位点数等各项指标也高于其他分子标记(表 2)。

表 2 山核桃各种分子标记扩增结果的比较

Table 2 A comparison among the amplification results of various molecular markers in hickory

标记名称	使用引物/对 (个)	获得多态的 引物/对(个)	扩增总位 点数/个	每对(个)引物 扩增位点数	扩增多态性 位点总数/个	多态引物比 例/%	多态位点 比例/%	每对(个)引物扩 增多态位点数
MSAP	5	5	249	49.80	233	100.00	93.57	46.60
RAPD	16	12	121	7.56	25	75.00	20.66	1.56
ISSR	17	9	143	8.41	20	52.94	13.99	1.18
SRAP	15	9	173	11.53	27	60.00	15.61	1.80
AFLP	11	8			32	72.72		2.91
SSR	30	0	30	1.00	0	0.00	0	0

2.2.3 甲基化/非甲基化相对水平分析 由于 MSAP 技术中所用的 2 种同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 均不能有效地识别非 5'-CCGG 位点的胞嘧啶甲基化和内外侧胞嘧啶都甲基化的 5'-CCGG 位点^[19], 且(0, 0)位点在实验上是没有扩增产物的位点, 也不排除位点缺失所致^[29], 因此 MSAP 检测到的甲基化位点数比实际的偏低。定义半甲基化类型与内侧胞嘧啶甲基化类型位点数之和为总甲基化位点数, 并将一个村的样品视作来自一个居群。基于 MSAP 分析结果可以看出: 山核桃甲基化相对水平变异系数在 20%左右, 总甲基化相对水平和非甲基化相对水平分别为 25.99%±2.42%和 33.38%±3.66%, 非甲基化相对水平大于总甲基化相对水平, 且两者间差异极显著($P<0.001$); 总甲基化中半甲基化相对水平和内侧胞嘧啶甲基化相对水平分别为 7.89%±1.53%和 18.10%±3.94%, 内侧胞嘧啶甲基化相对水平远大于半甲基化相对水平, 且两者间差异极显著($P<0.001$)(表 3)。对 3 个居群山核桃之间的甲基化状态进行比较, 其中林竹村总甲基化相对水平(28.00%)和内部胞嘧啶甲基化相对水平(21.33%)最高, 而其半甲基化相对水平(6.66%)和非甲基化相对水平(29.16%)最低; 潘张村的半甲基化相对水平(9.60%)和非甲基化水平(35.61%)最高, 其总甲基化相对水平(23.31%)和内侧胞嘧啶甲基化相对水平(13.71%)最低; 指南村各项相对水平居中。此研究中山核桃总甲基化相对水平和内侧胞嘧啶甲基化相对水平高, 则半甲基化相对水平和非甲基化

表 3 天然群体山核桃基因组 DNA 甲基化相对水平

Table 3 Relative methylation levels in hickory				
甲基化类型	均值±标准差/%	变异系数/%	最大值/%	最小值/%
非甲基化(1,1)	33.38 ± 3.66	10.96	35.61	29.16
半甲基化(1,0)	7.89 ± 1.53	19.32	9.60	6.66
内侧胞嘧啶甲基化(0,1)	18.10 ± 3.94	21.76	21.33	13.71
总甲基化(1,0)(0,1)	25.99 ± 2.42	9.29	28.00	23.31
全甲基化或位点缺失(0,0)	40.96 ± 2.95	7.19	43.84	37.96

相对水平则相对较低，反之亦然(表3)。

2.2.4 山核桃遗传和表观遗传多样性分析 由表 4 可见：指南村山核桃遗传多样性(0.176±0.053)和表观遗传多样性(0.591±0.099)都最丰富，其次为潘张村的山核桃(0.163±0.070 和 0.588±0.089)，林竹村山核桃遗传多样性(0.145±0.035)和表观遗传多样性(0.541±0.130)最低。变异系数遗传多样性在 24.16%~42.81%，表观遗传多样性为 15.12%~24.07%，表明遗传多样性高的居群，表观遗传多样性也相对较高，说明表观变异与遗传变异可能存在一定的关联，但又不完全依赖于经典遗传。3 个居群的整体表观遗传多样性(0.574±0.011)远大于整体的遗传多样性(0.162±0.052)，经 Wilcoxon 秩和检验分析($W=16\ 656.5$, $P<0.000\ 1$)表明，两者具有极显著差异。

表 4 山核桃天然群体表观遗传及遗传多样性

Table 4 Genetic (NML) and epigenetic (MSL) diversities assessed by Shannon diversity index in three natural populations				
居群	甲基化位点		非甲基化位点	
	香农信息指数	变异系数/%	香农信息指数	变异系数/%
潘张村	0.588 ± 0.089	15.12	0.163 ± 0.070	42.81
指南村	0.591 ± 0.099	16.78	0.176 ± 0.053	30.15
林竹村	0.541 ± 0.130	24.07	0.145 ± 0.035	24.16
均值	0.574 ± 0.011	18.73	0.162 ± 0.052	32.39

2.2.5 山核桃遗传与表观遗传分化及结构分析 非甲基化位点(NML)的 AMOVA 分析表明：山核桃天然居群几乎所有的遗传变异存在于居群内(98.76%)，只 1.24%存在于居群间，居群间分化不显著(分化系数 $\Phi_{st}=0.012$, $P=0.235$, $P>0.05$, 表 5)。甲基化敏感位点(MSL)的 AMOVA 分析表明：山核桃天然居群 76.70%的表观遗传变异存在于居群内，而 23.30%表观遗传变异存在于居群间，且居群间分化差异极显著($\Phi_{st}=0.233$, $P<0.000\ 1$, 表 5)。通过主坐标分析：各居群间的个体可以大致汇聚在一起，说明居群间存在明显的表观遗传分化，其中林竹村居群分别与指南村居群和潘张村居群之间存在少部分交集，而指南村居群与潘张村居群间相互独立(图 3)。居群间的表观遗传分化系数(0.233)远大于居群间的遗传分化系数(0.012)，这说明山核桃天然居群间表观遗传分化程度要高于遗传分化程度。Mantel 检验(相关系数 $r=0.125$, $P>0.05$)发现，遗传背景对表观遗传变异的影响不显著。

2.3 山核桃 MSAP 分析体系在薄壳山核桃上的应用

从山核桃中筛选的引物组合(HM-3/E2, HM-3/E11, HM-5/E8, HM-8/E8)对 4 个薄壳山核桃个体进行 MSAP 分析发现：只有 1 对引物组合 HM-5/E8 有扩增产物，且其位点及位点数量与山核桃存在差异

表 5 山核桃天然群体非甲基化位点(NML)与甲基化位点(MSL)的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) for both non-methylated (NML) and methylated loci (MSL) in three natural populations						
位点	变异来源	自由度	平方和	均方	方差	方差分量百分率/%
非甲基化遗传位点	居群间	2	22.94	11.47	0.129 4	1.24
	居群内	27	279.00	10.33	10.330 0	98.76
	总计	29	302.00	10.41		
甲基化位点	居群间	2	78.93	39.47	3.273 0	23.30
	居群内	27	290.80	10.77	10.770 0	76.70
	总计	29	369.80	12.75		

(图4), 其他3对引物均没有扩增产物, 说明山核桃 MSAP 体系也适用于薄壳山核桃, 但由于不同物种之间的差异性, 薄壳山核桃适用的 MSAP 引物还需进一步筛选。

3 讨论

本研究的 MSAP 分析表明: 山核桃中确实存在甲基化, 且与山核桃中其他的分子标记比较发现, MSAP 分析每对引物获取的遗传位点数、每对引物扩增的多态位点数、多态引物的比例、多态位点的比例都最高; 如果不用 MSAP 分析, 则不可能获得这些遗传位点的信息, 说明甲基化对山核桃遗传位点的发现与获取有影响。常规分子标记在山核桃中多态性不佳, 影响了山核桃的遗传分析。位点甲基化后使得染色质变得异常紧凑^[30], 且影响 DNA 的正常酶切, 因而使通常可获得较多多态标记的 AFLP 分析在山核桃中的适用性也不佳。内部胞嘧啶甲基化相对水平远大于半甲基化相对水平, 说明山核桃以内部胞嘧啶甲基化为主, 尽管山核桃中超甲基化或突变位点的比例不低。对于超甲基化或突变位点, 不同的人有不同的看法, 有些研究人员将其看作是超甲基化位点^[31-32]。如地中海柏木 *Cupressus sempervirens*^[21], 有些研究人员将其视为无信息位点^[33]。与其他遗传标记相比, 这些超甲基化或突变位点在实验上是无扩增产物的位点, 排除在扩增位点之外。这些位点至少不可能都是超甲基化或突变位点, 有待于进一步研究。山核桃整体及各居群内的表观遗传多样性均大于遗传多样性, 与很多其他植物种群的表现遗传研究结果一致, 如 *Viola cazorlensis*^[34], 日本的一种入侵植物^[35]等。类似的研究结果同样出现在一些动物种群的表现变异研究中^[36]。

3个居群非甲基化相对水平排序与遗传多相性排序间无对应关系, 但遗传多样性高的居群, 表观遗

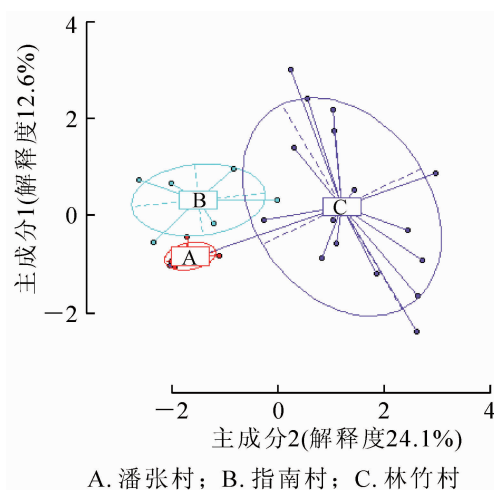


图3 3个山核桃天然居群表观遗传 (MSL) 结构主坐标 (PCoA) 分析
Figure 3 Principal coordinate analysis (PCoA) for epigenetic (MSL) differentiation among three natural populations

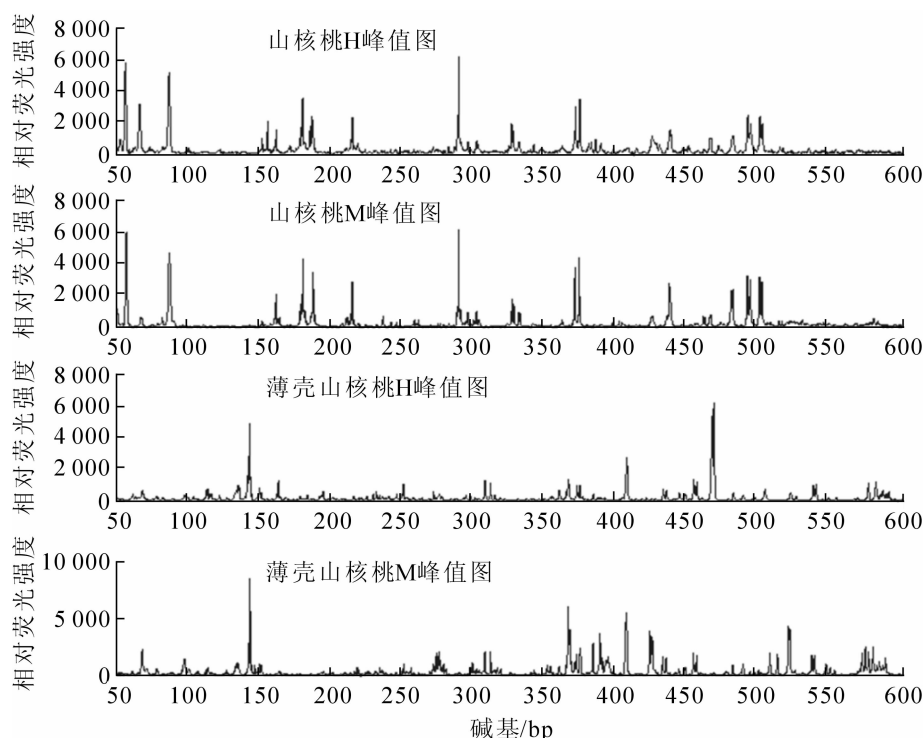


图4 山核桃与薄壳山核桃 MSAP 分析产物的荧光毛细管电泳图

Figure 4 Fluorescence capillary electrophoresis of PCR products from MSAP analysis in both hickory and pecan

传多样性也相对较高,说明表观变异与遗传变异可能存在一定的关联,须进一步进行研究。此外,甲基化变异主要存在于居群内,且居群间差异显著,说明山核桃甲基化变异具有居群特异性。研究表明:甲基化在植物对环境的刺激反应中发挥着作用^[37],也即环境变化会影响 DNA 甲基化,但 DNA 甲基化又在基因组印迹、发育基因调节及基因表达水平的自然变异中发挥作用^[38]。山核桃幼胚甲基化比例就随着幼胚的发育逐渐升高,且不同发育时期在基因组 DNA 甲基化水平上存在较大差异^[39]。但越来越多的证据表明:不改变 DNA 序列的表观遗传信息可以在世代间遗传^[40]。从受精卵到成熟的生物体,DNA 甲基化模式通过连续的细胞分裂将这些信息传递给子细胞,维持细胞特有的功能^[41],而生物选择许多表观遗传过程是为了确保发育过程的保真度^[42]。盐胁迫处理 2 个基因型水稻 *Oryza sativa* 的研究发现:有一定比例的 DNA 甲基化位点是基因型特有的,与其类似的遗传背景相一致;并在耐盐及盐敏感基因型中发现了几个具有稳定甲基化变化的位点,可作为基因型特有的表观遗传标记^[43]。在大花蕙兰 *Cymbidium hybridum*^[44]和水稻^[45]中发现了 2 类甲基化位点,其中一类甲基化状态保持不变,而另一类为不同发育阶段或品种间有变化的甲基化位点。也就是说,一定比例的甲基化位点是可遗传的。因此,从 MSAP 标记中获取的遗传位点信息,不仅可用于山核桃遗传分析,也可和遗传位点信息一起用于遗传图谱的构建^[46],对解析 QTL 基因对表型的作用具有一定的意义。DNA 甲基化使物种的遗传研究趋于复杂化,增加了研究的难度。

有性植物研究中越来越多支撑材料表明:无整合生殖是有性生殖的脱分化^[47],是可逆地叠加在有性途径上的一种生殖方式^[48]。表观遗传调控无融合生殖是一个很吸引人的假设,将是继续研究天然无融合生殖的关键焦点^[48],表观遗传机制是区分有性与无融合生殖控制事件的关键^[49-50],表观途径的突变导致无融合生殖样的表型^[48]。无融合生殖遗传上常出现大规模的分离畸变^[51],山柳菊属 *Hieracium* 物种连锁图谱有无标记或“连锁的”大片段^[52],而许多无融合生殖位点交换受到抑制^[48],且转录保守等位基因与无融合种子形成之间有很强关联^[53]。甲基化使得 DNA 结构上更加紧凑^[30],难以酶切产生交换。同时杉木中树高、胸径和材积性状的杂种优势^[19]及地中海柏木全同胞子代高和直径生长^[21]均与甲基化有关。甲基化既与无融合生殖有关,又与杂种优势有关。因此,山核桃甲基化的初步分析为该物种的后续深入研究打下了基础。

4 参考文献

- [1] 李新委,谢世友,马燕. 山核桃营养价值与种植经济效益分析[J]. 农学学报, 2015, 5(2): 51 - 56.
LI Xinwei, XIE Shiyu, MA Yan. Analysis of pecan nutritional value and planting economic benefit [J]. *J Agric*, 2015, 5(2): 51 - 56.
- [2] 李新委,谢世友. 石漠化地区种植山核桃经济效益分析[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(13): 57 - 60.
LI Xinwei, XIE Shiyu. Analysis on the economic benefit of walnut plant in rocky desertification area [J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2014, 20(13): 57 - 60.
- [3] 黄坚钦,章滨森,陆建伟,等. 山核桃嫁接愈合过程的解剖学观察[J]. 浙江林学院学报, 2001, 18(2): 111 - 114.
HUANG Jianqin, ZHANG Binsen, LU Jianwei, et al. Anatomical observation in graft union of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2001, 18(2): 111 - 114.
- [4] 王白坡,程晓建,喻卫武. 山核桃嫁接育苗成活率探讨[J]. 浙江林学院学报, 2002, 19(3): 231 - 234.
WANG Baipo, CHENG Xiaojian, YU Weiwu. Inquiry into survival rate of *Carya cathayensis* seedlings in grafting [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2002, 19(3): 231 - 234.
- [5] 叶茂富,吴厚钧. 山核桃与薄壳山核桃杂交的研究[J]. 林业科学, 1965, 10(1): 50 - 56.
YE Maofu, WU Houjun. Hybridization in hickory (*C. cathayensis*) and pecan (*C. illinoensis*) [J]. *Sci Silv Sin*, 1965, 10(1): 50 - 56.
- [6] 沈林,张慧,曾燕如,等. 山核桃与美国山核桃正反交种实及苗期性状的分析[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(5): 885 - 891.
SHEN Lin, ZHANG Hui, ZENG Yanru, et al. Analysis of fruit, seed and juvenile traits resulting from reciprocal crosses between *C. cathayensis* and *C. illinoensis* [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2009, 31(5): 885 - 891.

- [7] 王静, 吕芳德. 我国山核桃属植物研究进展[J]. 经济林研究, 2012, **30**(1): 138 – 142.
WANG Jing, LÜ Fangde. Advances in research on *Carya* Nutt. in China [J]. *Nonwood For Res*, 2012, **30**(1): 138 – 142.
- [8] 吕芳德, 杨帆, 张日清. 山核桃属部分种的核型分析[J]. 中南林学院学报, 2002, **22**(1): 47 – 49.
LÜ Fangde, YANG Fan, ZHANG Riqing. Karyotypes of three *Carya* Nutt. species [J]. *J Central South For Univ*, 2002, **22**(1): 47 – 49.
- [9] ZHANG Bin, WANG Zhengjia, JIN Songheng, *et al.* A pattern of unique embryogenesis occurring via apomixis in hickory (*Carya cathayensis*) [J]. *Biol Plant*, 2012, **56**(4): 620 – 627.
- [10] 沈林, 郭金剑, 李阳, 等. 基于 AFLP 分析的山核桃群体结构及遗传多样性[J]. 福建林业科技, 2009, **36**(4): 84 – 86.
SHEN Lin, GUO Jinjian, LI Yang, *et al.* Population structure and genetic diversity of *Carya cathayensis* revealed by AFLP analysis [J]. *J Fujian For Sci Technol*, 2009, **36**(4): 84 – 86.
- [11] 李元春, 沈林, 曾燕如. 山核桃 SRAP 体系的建立及与 RAPD 和 ISSR 标记的比较[J]. 浙江农林大学学报, 2011, **28**(3): 505 – 511.
LI Yuanchun, SHEN Lin, ZENG Yanru. Establishment of a SRAP analysis protocol in *Carya cathayensis* and a comparison among SRAP, RAPD, ISSR analysis protocols [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2011, **28**(3): 505 – 511.
- [12] LI Juan, ZENG Yanru, SHEN Dengfeng, *et al.* Development of SSR markers in hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) and their transferability to other species of *Carya* [J]. *Curr Genomics*, 2014, **15**(5): 357 – 379.
- [13] YIN Danni, ZHU Xuli, JIANG Libo, *et al.* A reciprocal cross design to map the genetic architecture of complex traits in apomictic plants [J]. *New Phytol*, 2015, **205**(3): 1360 – 1367.
- [14] AUSIN I, FENG S H, YU C W, *et al.* DNA methylome of the 20-gigabase Norway spruce genome [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2016, **113**(50): 1 – 8.
- [15] BAROUX C, RAISSIG M T, GROSSNIKLAUS U. Epigenetic regulation and reprogramming during gamete formation in plants [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2011, **21**: 124 – 133.
- [16] WANG Wensheng, HUANG Fei, QIN Qiao, *et al.* Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **465**(4): 790 – 796.
- [17] 王忠华, 王迪. DNA 甲基化分析技术在动植物遗传育种中的应用[J]. 生命科学, 2013, **25**(4): 435 – 441.
WANG Zhonghua, WANG Di. Application of DNA methylation analysis in genetics and breeding of plants and animals [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2013, **25**(4): 435 – 441.
- [18] 李海林, 吴春太, 李维国. 巴西橡胶树 DNA 甲基化的 MSAP 分析[J]. 分子植物育种, 2011, **9**(1): 69 – 73.
LI Hailin, WU Chuntai, LI Weiguo. Analysis on DNA methylation of rubber by methylation sensitive amplification polymorphism [J]. *Mol Plant Breed*, 2011, **9**(1): 69 – 73.
- [19] 洪舟, 施季森, 郑仁华, 等. 杉木亲本自交系及其杂交种 DNA 甲基化和表观遗传变异[J]. 分子植物育种, 2009, **7**(3): 591 – 598.
HONG Zhou, SHI Jisen, ZHENG Renhua, *et al.* Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation in Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*) intraspecific hybrids [J]. *Mol Plant Breed*, 2009, **7**(3): 591 – 598.
- [20] 王聪聪, 李际红, 邢世岩, 等. 不同单株叶籽银杏 DNA 甲基化 MSAP 分析[J]. 分子植物育种, 2013, **11**(4): 551 – 558.
WANG Congcong, LI Jihong, XING Shiyan, *et al.* Analysis on DNA methylation of *Ginkgo biloba* L. var. *epiphylla* Mak. by MSAP [J]. *Mol Plant Breed*, 2013, **11**(4): 551 – 558.
- [21] AVRAMIDOU E V, DOULIS A G, ARAVANOPOULOS F A. Determination of epigenetic and genetic inheritance, and estimation of genome DNA methylation in a full-sib family of *Cupressus sempervirens* L. [J]. *Gene*, 2015, **562**: 180 – 187.
- [22] 魏华丽, 吴涛, 杨文华, 等. 落叶松体细胞胚胎发生过程中 DNA 甲基化模式变化分析[J]. 东北林业大学学报, 2011, **39**(2): 33 – 37.
WEI Huali, WU Tao, YANG Wenhua, *et al.* DNA methylation pattern changes during somatic embryogenesis of *Larix* [J]. *J Northeast For Univ*, 2011, **39**(2): 33 – 37.
- [23] 马开峰, 张志毅, 王斯琪, 等. 毛白杨 MSAP 体系优化及 DNA 甲基化的初步分析[J]. 东北林业大学学报,

- 2012, **40**(12): 1 – 7.
- MA Kaifeng, ZHANG Zhiyi, WANG Siqi, *et al.* Optimization of MSAP system and preliminary analysis of DNA methylation in *Populus tomentosa* [J]. *J Northeast For Univ*, 2012, **40**(12): 1 – 7.
- [24] 郭金剑. 山核桃群体结构及多样性的研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2008.
- GUO Jinjian. *Study of Population Structure and Diversity in Carya cathayensis Sarg.* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2008.
- [25] 刘冰. 平菇主栽品种 DNA 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- LIU Bing. *Methylation Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) Analysis of Mainly Cultivated Oyster Mushroom* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.
- [26] 吕晓婷, 赵春梅, 王爱华, 等. 苹果 MSAP 技术体系的优化及其应用[J]. 中国农业通报, 2012, **28**(22): 287 – 292.
- LÜ Xiaoting, ZHAO Chunmei, WANG Aihua, *et al.* Optimization and establishment of MSAP reaction system for apple [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, **28**(22): 287 – 292.
- [27] 洪柳, 邓秀新. 应用 MSAP 技术对脐橙品种进行 DNA 甲基化分析[J]. 中国农业科学, 2005, **38**(11): 2301 – 2307.
- HONG Liu, DENG Xiuxin. Analysis of DNA methylation in navel oranges based on MSAP marker [J]. *Sci Agric Sin*, 2005, **38**(11): 2301 – 2307.
- [28] 高寰, 张铮, 周婷, 等. 三叶木通 MSAP 反应体系的优化及引物筛选[J]. 中草药, 2012, **43**(3): 572 – 576.
- GAO Huan, ZHANG Zheng, ZHOU Ting, *et al.* Optimization of MSAP reaction system for *Akebia trifoliata* and primers screening [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2012, **43**(3): 572 – 576.
- [29] PÉREZ-FIGUEROA A. msap: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data [J]. *Mol Ecol Resour*, 2013, **13**(3): 522 – 527.
- [30] FLETCHER H, HICKEY I. *BIOS Instant Notes in Genetics* [M]. 4th Ed. Boca Raton: CRC Press, 2013.
- [31] GUPTA V, BIJO A J, KUMAR M, *et al.* Detection of epigenetic variations in the protoplast-derived germlings of *Ulva reticulata* using methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Marine Biotechnol*, 2012, **14**(6): 692 – 700.
- [32] 杜亚琼, 王子成, 李霞, 等. 土霉素胁迫下拟南芥基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析[J]. 生态学报, 2011, **31**(10): 2846 – 2853.
- DU Yaqiong, WANG Zicheng, LI Xia, *et al.* MSAP analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* under Oxytetracycline stress [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, **31**(10): 2846 – 2853.
- [33] SCHULZ B, ECKSTEIN R L, DURKA W. Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies [J]. *Mol Ecol Resour*, 2013, **13**(4): 642 – 653.
- [34] HERRERA C M, BAZAGA P. Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis* [J]. *New Phytol*, 2010, **187**(3): 867 – 876.
- [35] YEGNASUBRAMANIAN S, LIN X, HAFFNER M C. Combination of methylated-DNA precipitation and methylation-sensitive restriction enzymes (COMPARE-MS) for the rapid, sensitive and quantitative detection of DNA methylation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(3): e19. doi: 10.1093/nar/gnj022.
- [36] MASSICOTTE R, ANGERS B. General-purpose genotype or how epigenetics extend the flexibility of a genotype [J]. *Gene Res Int*, 2012, **2012**: 1 – 7. doi:10.1155/2012/317175.
- [37] WANG Jun, FAN Chuanzhu. A neutrality test for detecting selection on DNA methylation using single methylation polymorphism frequency spectrum [J]. *Genome Biol Evol*, 2015, **7**(1): 154 – 171.
- [38] KEUNG A J, KHALIL A S. Single-cell tracking reveals a common “algorithm” of operation used by chromatin regulators [J]. *Science*, 2016, **351**(6274): 661 – 662.
- [39] 李顺福, 胡恒康, 张秋露, 等. 基于 ISSR 分子标记技术的山核桃幼胚 DNA 甲基化初步研究[J]. 浙江农林大学学报, 2014, **31**(4): 521 – 527.
- LI Shunfu, HU Hengkang, ZHANG Qiulu, *et al.* ISSR analysis of DNA methylation variety on immature embryos of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2014, **31**(4): 521 – 527.
- [40] SAILER C, SCHMID B, GROSSNIKLAUS U. Apomixis allows the transgenerational fixation of phenotypes in hybrid

- plants [J]. *Curr Biol*, 2016, **26**: 331 – 337.
- [41] NISHIYAMA A, YAMAGUCHI L, NAKANISHI M. Regulation of maintenance DNA methylation via histone ubiquitylation [J]. *J Biochem*, 2016, **159**(1): 9 – 15.
- [42] ZHONG Silin, FEI Zhangjun, CHEN Yunru, *et al.* Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(2): 154 – 160.
- [43] WANG Wensheng, PAN Yajiao, ZHAO Xiuqin, *et al.* Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Exp Bot*, 2011, **62**: 1951 – 1960.
- [44] 陈小强, 王春国, 李秀兰, 等. 大花蕙兰子房授粉前后基因组 DNA 胞嘧啶甲基化状态的 MSAP 分析[J]. 云南植物研究, 2008, **30**(4): 464 – 470.
- CHEN Xiaoqiang, WANG Chunguo, LI Xiulan, *et al.* Analysis of DNA cytosine methylation between the non-pollinated and pollinated ovaries of *Cymbidium hybridum*(Orchidaceae)based on MSAP [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2008, **30**(4): 464 – 470.
- [45] 崔影影, 张大明. 野生稻 *Oryza nivara* 和 *O. rufipogon* DNA 甲基化多样性[J]. 生物多样性, 2010, **18**(3): 227 – 232.
- CUI Yingying, ZHANG Daming. Surveying DNA methylation diversity in the wild rice, *Oryza nivara* and *O. rufipogon* [J]. *Biodiversity Sci*, 2010, **18**(3): 227 – 232.
- [46] 段永红, 王铭, 孙毅, 等. 高粱甲基化连锁群 A, B 的构建及甲基化位点、甲基化模式的分析[J]. 中国农业科学, 2012, **45**(18): 3699 – 3708.
- DUAN Yonghong, WANG Ming, SUN Yi, *et al.* Construction of methylation linkage groups A and B in sorghum with MSAP and SSR markers and analysis of methylation sites and patterns [J]. *Sci Agric Sin*, 2012, **45**(18): 3699 – 3708.
- [47] OZIAS-AKINS P, CONNER J A. Regulation of apomixis [C]//ALTMAN A. *Plant Biotechnology and Agriculture - Prospects for the 21st Century*. Pittsburgh: Academic Press, 2011: 243 – 254.
- [48] HAND M L, KOLTUNOW A M G. The genetic control of apomixis: asexual seed formation [J]. *Genetics*, 2014, **197**: 441 – 450.
- [49] RODRIGUEZ-LEAL D, VIELLE-CALZADA J P. Regulation of apomixis: learning from sexual experience [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2012, **15**: 549 – 555.
- [50] GRIMANELLI D. Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2012, **15**: 57 – 62.
- [51] ABDI S, SHASHI, DWIVEDI A, *et al.* *Harnessing Apomixis for Heterosis Breeding in Crop Improvement* [M]. Beilin: Springer-Verlag, 2016: 79 – 99.
- [52] SHIRASAWA K, HAND M L, HENDERSON S T, *et al.* A reference genetic linkage map of apomictic *Hieracium* species based on expressed markers derived from developing ovule transcripts [J]. *Ann Bot*, 2015, **115**(4): 567 – 580.
- [53] MAUA M, LOVELL J T, CORRAL J M, *et al.* Hybrid apomicts trapped in the ecological niches of their sexual ancestors [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2015, **112**(18): E2357-65. doi: 10.1073/pnas.1423447112.