

冷驯化草莓组培苗 DNA 甲基化水平及模式的变化

苗徐静^{1,2}, 文 壮^{1,2}, 文晓鹏^{2*}

(1. 贵州大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 农业生物工程研究院 / 山地植物资源保护与种质创新教育部实验重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: DNA 甲基化是植物表观遗传的重要方式之一, 非生物胁迫会引起植物 DNA 甲基化水平及模式的改变。为探讨草莓的低温响应与 DNA 甲基化的关系, 本文以章姬组培苗为材料, 利用甲基化敏感多态性技术 (MSAP) 检测冷驯化 (4℃) 不同时间及恢复后的植株 DNA 甲基化水平及模式变化。结果表明, 14 对选择性引物在冷驯化过程中共检测出 2499 个基因位点; 冷驯化过程中, DNA 总甲基化水平整体呈下降趋势, 0 d、1 d、3 d、5 d、7 d 和 10 d, 基因组 MSAP 比率分别为 27.17%、20.73%、25.77%、22.69%、22.69% 和 22.41%, 恢复 5 d 后 MSAP 比率上升为 26.05%; 在 DNA 甲基化模式变化方面, 有甲基化和去甲基化现象发生, 且以去甲基化现象为主。回收、克隆并测序某些草莓基因组的甲基化修饰位点, 分离得到 5 条存在甲基化修饰的基因组 DNA 序列。BLAST 比对分析表明, 在这些序列中都存在明显的“CCGG”二核苷酸成簇富集现象, 与 MSAP 结果一致。

关键词: 草莓; 冷驯化; 甲基化; MSAP

中图分类号: Q813.1+2 文献标识码: A

文章编号: 1008-0457(2018)02-0007-07

国际 DOI 编码: 10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2018.02.002

Changes of DNA Methylation Level and Patterns in Tissue Culture Seedlings of Strawberry (*Fragaria Ananassa* 'Akihime') in Response to Cold Acclimation

MIAO Xu-jing^{1,2}, WEN Zhuang^{1,2}, WEN Xiao-peng^{2*}

(1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Institute of Agro-bioengineering/The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: DNA methylation is one of the important ways of epigenetic modifications, which can be altered by environmental stress. In order to research the relationship between low temperature and DNA methylation, we explored effects of cold acclimation (4℃) on the extent of genetic diversity and recovery of in vitro strawberry (*Fragaria ananassa* 'Akihime') by MSAP. The results showed that 2499 fragments were amplified by using 14 pairs of selective primers. The total methylation level of DNA decreased across the cold treatment. Total DNA methylation ratios were 27.17%, 20.73%, 25.77%, 22.69%, 22.69% and 22.41% in the samples exposed by cold stress for 0, 1, 3, 5, 7 and 10 days, respectively. However, after the samples recovered for 5 days, total DNA methylation ratio increased by 26.05%. Furthermore, the demethylation was the main feature though both methylation and demethylation were triggered by cold acclimation. Five methylated sites were extracted, cloned and sequenced finally. NCBI Blast results showed that these fragments were homologous to functional genes which were the region of CCGG rich clusters. So these sequences demonstrated the results of DNA methylation by MSAP effectively.

Key words: *Fragaria ananassa*; cold acclimation; DNA Methylation; mSAP

收稿日期: 2018-03-08; 修回日期: 2018-03-23

基金项目: 本研究由贵州省高层次创新型人才培养项目(黔科合人才(2016)4010资助)。

* 通讯作者: 文晓鹏(1965-), 男, 博士, 教授, 主要从事植物学、果树学专业生物技术与遗传育种研究; E-mail: xpwenc@hotmai.com。

草莓(*Fragaria ananassa*)具有营养丰富、种植周期短、收益高等优点,其属喜温植物,最适生长温度范围15~30℃。但近年来全球气温不稳定,冬季我国多地如浙江^[1]、四川^[2]出现寒潮以及罕见的低温冻害,严重影响了冬草莓的产量与品质^[3],给农户带来巨大的经济损失,因此预防低温给草莓生长造成的伤害,提升草莓的抗寒能力至关重要。怎样提高冬草莓的抗寒性,已成为生产的关键问题之一。有研究表明,茶树、椰子和草莓^[4-6]等植物在通过冷驯化后抗寒性能明显提高。植物冷驯化过程中所发生的变化是通过改变基因表达而引起的^[7-8],而植物DNA甲基化与基因表达存在关联性,DNA发生甲基化与基因的沉默有密切关系,去甲基化则可以导致基因表达^[9-10]。植物在逆境胁迫响应过程中表观遗传起着重要作用,其中基因组DNA甲基化则是表观遗传的重要形式^[11-13]。甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术是从扩增片段长度多态性(AFLP)技术改良来的,分别采用*EcoR*I与*Msp*I和*Hpa*II组合切割植物全基因组DNA。由于*Msp*I和*Hpa*II是对甲基化敏感的同裂酶,因此能够识别相同的DNA序列(CCGG),但这两种酶对甲基化的敏感性不同,因此最终切割后产生的片段能够反映出DNA序列中胞嘧啶的甲基化水平和模式。此技术是当前研究DNA甲基化水平和模式的重要方法之一,现已广泛运用于拟南芥、草莓和西瓜^[14-16]等植物上。

本文拟采用MSAP技术,探究不同冷驯化时间章姬(*F. ananassa* 'Akihime')草莓基因组的DNA甲基化水平及模式的变化。以期揭示冷驯化对草莓DNA水平变化的影响及对低温胁迫耐受性机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验选用培养室继代10次,长势一致的草莓栽培品种'章姬'试管苗为试验材料。将组培苗放入4℃人工气候箱进行低光照(600 lx,光照时间10 h/d)冷驯化处理,取冷驯化1 d、3 d、5 d、7 d、10 d和恢复5 d的草莓叶片,以及未进行冷驯化处理的叶片作为对照(CK),每个处理随机剪去15株草莓叶片混合做DNA甲基化检测。

1.2 基因组DNA提取

对照组和处理组群体样本的基因组DNA,用天根生化科技(北京)有限公司的植物基因组DNA

提取试剂盒提取。总核酸蛋白测定仪(Kaiao, K5500)和1%的琼脂糖凝胶电泳(120 V, 30 min)检测基因组DNA浓度和质量。DNA样品在-20℃条件下储存。

1.3 MSAP反应

酶切体系:用*EcoR*I/*Hpa*II和*EcoR*I/*Msp*I两组酶(Fermentas),对基因组DNA进行双酶切。分两次对DNA进行酶切,*EcoR*I酶切体系(40 μL):4 μL 10×Buffer *EcoR*I,1 μL *EcoR*I(10 U/μL),DNA模板12 μL(约600 ng),ddH₂O补足至40 μL,混匀后37℃酶切4 h。*Hpa*II或*Msp*I酶切体系(20 μL):10 μL *EcoR*I酶切产物,0.25 μL *Hpa*II或*Msp*I(10 U/μL),2 μL 10×Buffer Tango, ddH₂O补足至20 μL,混匀后37℃酶切5~8 h。取5 μL酶切产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,以确定酶切是否完全。连接体系(30 μL):取酶切产物20 μL,加入10 pmol/μL *EcoR*I接头和50 pmol/μL *Hpa*II或*Msp*I接头(表1)各1 μL,0.5 μL T4 DNA Ligase(5 U/μL),3 μL 10×Ligase buffer,ddH₂O补足至30 μL,充分混匀后22℃连接5~8 h。预扩增反应体系(30 μL):2 μL连接产物,2 μL E00预扩增引物,2 μL LHM00预扩增引物(表5),10 μL 2×PCR MasterMix(天根生化科技有限公司),4 μL ddH₂O,混匀。程序:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸2 min,28~35个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,并将产物稀释50倍用于选择性扩增模板。选择性扩增体系(20 μL):3 μL预扩增稀释产物,2 μL选择性扩增引物*EcoR*I(5 μmol/L)及*Hpa*II/*Msp*I(5 μmol/L)(表1),5 μL 2×PCR MasterMix,8 μL ddH₂O,混合液轻轻混匀。程序:94℃预变性30 s;94℃变性30 s,65℃退火30 s,72℃延伸2 min,每个循环减少0.7℃(13个循环);94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸2 min(25~27个循环);72℃延伸10 min;4℃保存。

加入4 μL上样缓冲液97℃变性10 min后置于冰上,取5 μL MSAP扩增产物进行6%聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染方法参考梁弘伟等^[17]。同一酶切位点条带的有、无分别用1、0表示,对带型进行统计分析。

MSAP片段分为4种类型^[18]。双酶切后的PAGE胶图上出现4种甲基化形式:I型是非甲基化位点,表示*EcoR*I分别与*Hpa*II和*Msp*I双酶切后都产生了条带,即(1,1)型。II型是半甲基化位

点表示 *EcoR* I 与 *Hpa* II 酶切后产生了条带,而 *EcoR* I 与 *Msp* I 酶切后没有产生条带,即(1,0)型。III 型是全甲基化位点,表示 *EcoR* I 和 *Msp* I 酶切后没有产生条带,而 *EcoR* I 和 *Hpa* II 酶切后没有产

生条带,即(0,1)。IV 是超甲基化位点,表示 *EcoR* I 分别与 *Hpa* II 和 *Msp* I 双酶切后都没有产生条带,即(0,0)型。

MSAP 试验进行了 3 个技术重复和生物学重复。

表 1 MSAP 分析的接头和引物序列

Tab. 1 Sequences of adapters and primers used for MSAP analysis

接头和引物	序列(5'-3')	
	<i>EcoR</i> I(E)	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I(HM)
接头	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTC	GACGATGAGTCCTGAG CGCTCAGGACTCAT
预扩增引物	GTAGACTGCGTACCAATTC (E00)	GAGTCCTGAGCGG(HM00)
	GTAGACTGCGTACCAATTCAAG(E00+AAG)	GAGTCCTGAGCGGCAC(HM00+CAC)
	GTAGACTGCGTACCAATTCAAC(E00+AAC)	GAGTCCTGAGCGGCAG(HM00+CAG)
	GTAGACTGCGTACCAATTCAAT(E00+AAT)	GAGTCCTGAGCGGCTA(HM00+CTA)
	GTAGACTGCGTACCAATTCAACA(E00+ACA)	GAGTCCTGAGCGGCCA(HM00+CCA)
选择性	GTAGACTGCGTACCAATTCACG(E00+ACG)	GAGTCCTGAGCGGGCT(HM00+GCT)
扩增引物	GTAGACTGCGTACCAATTCAGA(E00+AGA)	GAGTCCTGAGCGGGAC(HM00+GAC)
		GAGTCCTGAGCGGAAAC(HM00+AAC)
		GAGTCCTGAGCGGAGA(HM00+AGA)
		GAGTCCTGAGCGGAAG(HM00+AAG)
		GAGTCCTGAGCGGTCA(HM00+TCA)

1.4 甲基化位点回收、克隆、测序、序列比对

在 MSAP 试验完成后,切取 MSAP 片段(CK),编号后放入 1.5 mL 的离心管内,加 80~100 μ L ddH₂O 摇晃清洗,短暂离心后吸去 ddH₂O,然后加入 20~30 μ L TE buffer,用枪头尖端将其捣碎,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜。次日取上清液 3 μ L 作为扩增模板,用相对应的选择性扩增引物以及选择性扩增体系和条件进行扩增。取 4 μ L 扩增产物,克隆到 pEASY-T1 载体中(pEASY-T1 Cloning Vector,北京全式金生物技术有限公司),25 $^{\circ}$ C 连接 5~10 min。在 1.5 mL 离心管中,取 2 μ L 连接产物转化 50 μ L 大肠杆菌感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司),加入 950 μ L LB 液体培养基,固定在摇床上(150 r/min、37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1.5~2 h)。取 80~100 μ L 菌液涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑出单克隆,加入 5 mL LB 液体培养基,固定在摇床上(150 r/min、37 $^{\circ}$ C 振荡培养 8 h),菌液送公司测序(生工生物工程(上海)股份有限公司),测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 序列分析。

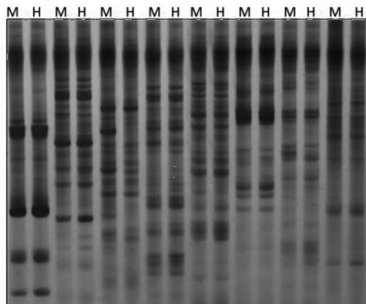
2 结果与分析

2.1 MSAP-PCR 引物筛选

得到质量理想的 DNA 后,从 297 对选择性扩增引物中筛选出条带清晰、扩增结果多态性高、重复性和稳定性最好的 14 对引物,进行选择扩增展现一定的多态性(图 1)。扩增结果表明,14 对引物平均每对引物扩增出 25.5 条谱带(表 2)。

2.2 冷驯化时间对 DNA 甲基化水平变化的影响

对不同冷驯化时间及恢复后的草莓叶片进行甲基化敏感扩增多态性分析(表 2)。结果得出,所有样品中扩增总数为 2499 个位点(图 2),对照组与处理组从甲基化类型来看,草莓 CCGG 位点的甲基化主要是超甲基化(IV),全甲基化(III)频率高于半甲基化(II)。冷驯化过程中 DNA 总甲基化水平整体呈下降趋势,0 d、1 d、3 d、5 d、7 d 和 10 d,基因组 MSAP 比率分别为 27.17%、20.73%、25.77%、22.69%、22.69%和 22.41%。去甲基化水平的最大值出现在低温胁迫 1 d。恢复后,DNA 甲基化水平有所回升,说明了除去低温胁迫后,可以发生 DNA 甲基化形式的恢复。



注: H: *EcoR* I 和 *Hpa* II 双酶切产生的条带; M: *EcoR* I 和 *Msp* I 双酶切产生的条带。

图 1 MASP 扩增的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

Fig. 1 The result of selective PCR products detected by 6% PAGE

表 2 不同低温处理时间下 DNA 甲基化比率

Tab. 2 DNA methylation level at different cold acclimation periods

模式		MSAP 带型	条带数及比例						
<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I		CK	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	R
1	1	I 非甲基化	260	283	265	276	276	277	264
1	0	II 半甲基化	6	7	15	9	6	8	10
0	1	III 全甲基化	13	16	25	18	35	32	23
0	0	IV 超甲基化	78	51	52	54	40	40	60
总扩增位点			357	357	357	357	357	357	357
总甲基化位点			97	74	92	81	81	80	93
全甲基化位点(III+ IV)			91	67	77	72	75	72	83
总甲基化率(%)			27.17	20.73	25.77	22.69	22.69	22.41	26.05
全甲基化率(%)			25.49	18.77	21.57	20.17	21.01	20.17	23.25
半甲基化率(%)			1.68	1.96	4.20	2.52	1.68	2.24	2.80

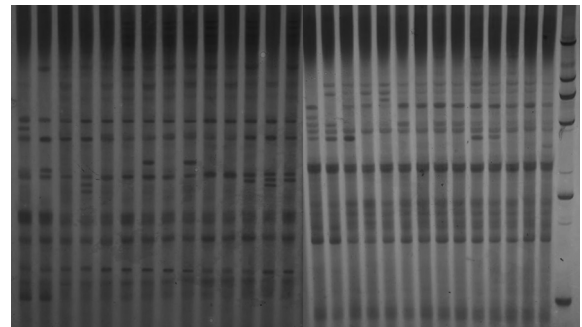
注: CK 为对照组; 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 10 d 为低温时间; R 为恢复组。总甲基化率 = $[(II + III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100\%$ 。全甲基化率 = $[(III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100\%$ 。半甲基化率 = $[(II) / (I + II + III + IV)] \times 100\%$ 。

2.3 冷驯化时间对 DNA 甲基化模式的影响

基于以上试验,不同冷驯化时间处理组、对照组与恢复组的胞嘧啶甲基化和去甲基化变化模式包括 3 种,共 16 种条带类型(表 3)。

模式一即甲基化位点无变化,此模式包含 4 种条带类型(A~D),表示在低温处理前、后 CCGG 位点甲基化状态未变化,占 80.95%~88.25%,说明冷驯化前后材料大部分的 CCGG 甲基化位点并未改变,可以稳定遗传。模式二即甲基化,此模式包含 6 种条带类型(E~J),表示在冷驯化前后发生甲基化位点增多,占 3.08%~5.60%。模式三即去甲基化,包含 6 种条带类型(K~P),表示在冷驯化前、后发生去甲基化位点增多,占 7.56%~13.73%。在低温处理 1 d、3 d、5 d、7 d、10 d 后甲基化比例分别占

5.60%、3.92%、3.36%、3.08%、5.32%,去甲基化比例分别占 11.20%、7.56%、9.80%、12.89%、13.73%。总体而言,冷驯化后章姬 DNA 甲基化模式去甲基化高于甲基化。



注: H: *EcoR* I 和 *Hpa* II 双酶切产生的条带; M: *EcoR* I 和 *Msp* I 双酶切产生的条带; CK: 对照组; R: 恢复组; Mater 为 D2000。

图 2 不同冷驯化阶段 MASP 扩增的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

Fig. 2 MSAP patterns at different cold acclimation periods

2.4 DNA 甲基化位点分析

回收、克隆及测序部分草莓(CK)基因组 DNA 的甲基化位点,成功分离得到 5 条 DNA 序列(表 4)。经 BLAST 比对,在 NCBI 数据库中检索同源序列。从表 4 中可以看出,回收的片段比较小,最大 315 bp,最小 196 bp。每条序列均属于草莓属,包括二氢嘧啶脱氢酶 [NADP(+)](b)、L-抗坏血酸氧化酶同系物(d)以及未注释的蛋白等,表明草莓基因组中存在丰富的甲基化修饰现象,可能通过调节这些功能基因的表达来响应逆境胁迫。

高等植物基因组中“CpG”二核苷酸是胞嘧啶残基甲基化修饰中最主要的方式。跟据 Gardiner-Garden 和 Frommer 对“CpG island”的定义^[19],通过在线 (http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/cpg_islands.html) 分析,设定阈值为“CG”含量 $\geq 50\%$ 、“CpG island”长度 ≥ 200 bp 以及“CpG”二核苷酸实际值数/期望值 ≥ 0.60 ,对草莓回收得到的 5 条甲基化修饰 DNA 序列中“CpG”二核苷酸分布做分析。结果表明,虽然在这 5 条甲基化序列中都发现了存在明显的“CpG”二核苷酸成簇富集现象(与 MSAP 结果一致),但是只得到了 1 个具典型“CpG island”特征的分布区域(c),其总长度为 315 bp,“CG”含量为 57.00%，“CpG”二核苷酸实际值数/期望值为 0.82,“CpG island”长度为 200 bp(表 5)。

表 3 不同低温处理时间下 DNA 甲基化模式变化
Tab. 3 DNA methylation pattern at different cold acclimation periods

模式	类型	带型				不同处理				
		对照组		冷处理		1 d	3 d	5 d	7 d	10 d
		Hap II	Msp I	Hap II	Msp I					
无变化	A	1	1	1	1	249	252	250	251	244
	B	1	0	1	0	3	3	1	1	0
	C	0	1	0	1	5	8	6	9	8
	D	0	0	0	0	40	53	53	39	37
	总位点					297	316	310	300	289
					83.19%	88.52%	86.83%	84.03%	80.95%	
甲基化	E	1	1	1	0	2	1	5	2	5
	F	1	1	0	1	4	5	5	7	10
	G	1	1	0	0	1	2	0	0	1
	H	1	0	0	0	7	3	1	1	0
	I	1	0	0	1	0	0	1	1	0
	J	0	1	0	0	6	3	0	0	3
	总位点					20	14	12	11	19
						5.60%	3.92%	3.36%	3.08%	5.32%
	K	0	1	1	0	0	1	2	0	0
	L	0	1	1	1	0	1	5	4	2
去甲基化	M	1	0	1	1	1	2	2	4	6
	N	0	0	1	1	29	7	19	17	22
	O	0	0	1	0	1	4	2	5	3
	P	0	0	0	1	9	12	5	16	16
	总位点					40	27	35	46	49
						11.20%	7.56%	9.80%	12.89%	13.7%

表 4 草莓基因组 DNA 甲基化位点测序及比对结果
Tab. 4 Sequence analysis of the methylated sites in strawberry

名称	片段长度 (bp)	引物组合 E/HM	同源参考基因登录号	同源序列	一致性 (%)	E 值
a	201	E00+AAG HM00+CAC	XM004288708.2	PREDICTED: <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> uncharacterized LOC101306087 (LOC101306087), mRNA	94	6e~65
b	268	E00+AAG HM00+CAC	XM004299462.2	PREDICTED: <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)](LOC101301107), mRNA	98	4e~49
c	315	E00+AAG HM00+AGA	XM011461509.1	PREDICTED: <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> uncharacterized LOC105350106 (LOC105350106), mRNA	97	9e~130
d	196	E00+AAG HM00+AAG	XM00493256.2	PREDICTED: <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> L-ascorbate oxidase homolog (LOC101297617), mRNA	99	8e~79
e	196	E00+AAG HM00+AAG	XM011461355.1	PREDICTED: <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> uncharacterized LOC101315407 (LOC101315407), mRNA	97	7e~40

表5 草莓基因组 DNA 甲基化修饰位点
CpG island 预测结果

Tab.5 Prediction of CpG islands
of the methylated sites in strawberry

序列 长度 (bp)	起点	终点	CG 含量 (%)	CpG 实际值数/ CpG 期望值	CpG 岛长度 (bp)	
a	201	-	47.26	0.54	-	
b	268	-	41.79	0.35	-	
c	315	46	245	57.00	0.82	200
d	196	-	47.45	0.18	-	
e	196	-	47.45	0.36	-	

3 结论与讨论

不改变 DNA 序列,却发生基因表达的可遗传变异便是表观遗传变异,主要包括 DNA 甲基化修饰、非编码 RNA 调控、组蛋白修饰等^[20]。DNA 甲基化修饰是表观遗传变异的重要方式,植物基因组的相对稳定以及响应外界环境胁迫都与 DNA 甲基化有密切关系^[21]。不同植物甲基化水平及模式会存在差异,即使是相同的植物中不同的组织或是在不同的环境下都会存在较大的差异。在许多外界环境发生改变后,比如冷、热、盐害、干旱、重金属等都会导致 DNA 甲基化水平及模式发生变化^[11, 22]。特别是在冷胁迫下,大多数情况下总甲基化水平降低,也有少部分甲基化水平升高。DNA 发生甲基化与基因沉默有关,而 DNA 发生去甲基化则导致基因表达^[23],表明不同物种在响应外界环境胁迫时,选用不同的方式来调节自身以适应环境改变,部分物种主要发生基因沉默,而部分物种则主要发生基因表达。其原因可能是由于物种不同导致的,充分反映了物种间 DNA 甲基化的差异性,如玉米在冷胁迫 48 h 下甲基化程度降低了 2.2%^[24],低温 24 d 解除牡丹休眠过程中甲基化程度下降了 16.8%^[25],但在茶树冷驯化过程中变化趋势表现为甲基化水平增加了 3.5%^[26],火龙果组培苗在低温胁迫 4 d 后总甲基化水平增加了 1.4%^[27]。本实验结果显示一定程度的冷驯化使草莓的甲基化程度下降了 4.76%,表明在冷驯化过程中会激起草莓基因组内大量基因活跃表达。另有研究表明,棉花籽苗在低温胁迫下导致了棉花基因组 DNA 甲基化水平下降,但当低温胁迫去除后,甲基化水平可以发生一定程度的恢复^[28]。在本研究中利用

MSAP 技术对草莓组培苗冷驯化及恢复后进行甲基化检测,结果表明,与对照相比冷驯化后基因组 DNA 总甲基化水平整体呈现下降趋势,但在恢复后 DNA 甲基化水平有所回升,这与上述前人的研究结果一致。由此可以看出低温下草莓基因组调节了某些位点的甲基化水平,而且这种调节可以在低温去除后发生逆转。有研究表明玉米^[24]在低温胁迫至 24 h 和 48 h 后甲基化水平基本稳定在 32%,本试验也表明在低温胁迫延长到 5 d、7 d、10 d 后甲基化水平基本趋于稳定(表 2),表明了 DNA 甲基化水平的稳定性对维持植物体生存也有着重要意义。试验中还发现草莓在经过 1 d 冷驯化后,其甲基化水平达到最低,与对照组比较甲基化水平下降了 6.44%,分析原因可能是植物体可以通过改变 DNA 甲基化来调控基因表达,以激活某些基因,从而帮助植物面对短暂的逆境环境。

在表观遗传水平上可以通过改变 DNA 甲基化模式来调节基因的表达,从而抵御非生物胁迫,来满足植物的正常生长^[29]。进一步分析发现,在甲基化模式变化方面,草莓产生了丰富的变化模式(12 种),与王小利等^[30]针对高羊茅氮胁迫的试验中高羊茅产生了 11 种甲基化模式的变化结果类似。虽然草莓在低温胁迫后基因组内存在一定数量的 DNA 位点发生甲基化模式变化,但超过 80% 的位点 DNA 甲基化模式与对照相比较并未发生改变,与许多前人研究结果一致^[24, 30],充分表明 DNA 甲基化水平的稳定性对维持植物体生存有着重要意义。

有研究表明 DNA 甲基化是在转录起始阶段参与调控基因的表达,从而影响植物的生长发育^[31]。本试验对部分草莓(CK) DNA 甲基化位点回收,经 BLAST 比对后,本试验获得的序列与草莓属具有较高的同源性,并且 5 条参考序列均为 mRNA 片段,获得了二氢嘧啶脱氢 [NADP(+)]、L-抗坏血酸氧化酶同系物以及未注释的蛋白。因此可以推断草莓基因组甲基化很可能大部分发生在编码区域。其中抗坏血酸氧化酶广泛存在于植物体中,与植物的生长发育、抗衰老有着密切的关系^[32]。有大量研究表示抗坏血酸氧化酶能够抵御生物或非生物胁迫^[33-34]。另有研究表明小麦在病情指数增加的情况下,抗坏血酸氧化酶活性提高了 23.1% 以上,与增强抗病性也有密切关系^[35]。本试验结果表明在未进行冷驯化之前,抗坏血酸氧化酶基因处于甲基化状态即沉默状态,但在经过冷驯化之后,

基因很可能被激活以抵御环境胁迫,这有待于下一步研究。

综上,通过探究植物基因组 DNA 甲基化水平

及模式的变化,可对植物的生长发育、抗逆性研究奠定一定基础,可深入探究植物表观遗传调控的分子机理,对下一步植物育种发挥重要作用。

参 考 文 献:

- [1] 徐云焕,蒋桂华,杨新琴,等. 大棚草莓冻害调查与防冻减灾技术措施[J].浙江农业科学,2016,57(8):1190-1192.
- [2] 陈乐,于成. 2016年冬草莓罕见低温冻害及防御措施[J].四川农业科技,2016(6):34-35.
- [3] 沙春艳. 浅谈草莓低温障碍的发生及防止措施[J].现代园艺,2012(5):55-55.
- [4] 杨亚军,郑雷英,王新超. 冷驯化和 ABA 对茶树抗寒力及其体内脯氨酸含量的影响[J].茶叶科学,2004,24(3):177-182.
- [5] 杨盛昌,谢潮添,张平,等. 冷锻炼对低温胁迫下夏威夷椰子膜脂过氧化及保护酶活性的影响[J].植物资源与环境学报,2002,11(4):25-28.
- [6] 张勇,汤浩茹,罗娅,等. 低温锻炼对草莓组培苗抗寒性及抗氧化酶活性的影响[J].中国农学通报,2008,24(1):325-329.
- [7] Kalberer S R, Wisniewski M, Arora R. Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: Current understanding and emerging concepts[J].*Plant Science*, 2006, 171(1):3-16.
- [8] 李慧,强胜. 植物冷驯化相关基因研究进展[J].植物学报,2007,24(2):208-217.
- [9] Vanyushin B F, Kirnos M D, DNA methylation in plants[J].*Gene*, 1988, 74(1):117-21.
- [10] Wang W, Zhao X, Pan Y, et al. DNA methylation changes detected by methylation-sensitive amplified polymorphism in two contrasting rice genotypes under salt stress[J].*Genet Genomics*, 38(9):419-420.
- [11] Lukens L N, Zhan S. The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement[J].*Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(3):317-322.
- [12] Karan R, Deleon T, Biradar H, et al. Salt Stress Induced Variation in DNA Methylation Pattern and Its Influence on Gene Expression in Contrasting Rice Genotypes[J].*Plos One*, 2012, 7(6):e40203.
- [13] 黄韞宇,张海军,邢燕霞,等. NaCl 胁迫对黄瓜种子萌发的影响及 DNA 甲基化的 MSAP 分析[J].中国农业科学,2013,46(8):1646-1656.
- [14] 李照令,王鹤潼,陈瑞娟,等. 运用 MSAP 研究镉胁迫对拟南芥幼苗基因甲基化的影响[J].农业环境科学学报,2014,33(1):28-36.
- [15] 韩柏明,赵恺,李贺,等. 组织培养导致的草莓 DNA 甲基化变异[J].植物生理学报,2010,46(8):797-802.
- [16] 杨炳艳,霍秀爱,刘云婷,等. 低温胁迫下西瓜同源二倍体和三倍体甲基化及基因表达的差异分析[J].园艺学报,2014,41(11):2313-2322.
- [17] 梁宏伟,王长忠,李忠,等. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立[J].遗传,2008,30(10):1379-1382.
- [18] Tang X M, Tao X, Wang Y, et al. Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique[J].*Molecular Genetics & Genomics Mgg*, 2014, 289(6):1075.
- [19] Gardinergarden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes[J].*Journal of Molecular Biology*, 1987, 196(2):261.
- [20] 王春国,古瑜,陈成彬,等. 不同倍性西瓜基因组 DNA 甲基化水平与模式的 MSAP 分析[J].分子细胞生物学报,2009,42(2):118-126.
- [21] Kinoshita T, Miura A, Choi Y, et al. One-way control of FWA imprinting in Arabidopsis endosperm by DNA methylation[J].*Science*, 2004, 303(5657):521-523.
- [22] 孟华兵,杜雪,姜宇晓,等. 镉胁迫下二倍体和同源四倍体油菜 DNA 甲基化差异分析[J].核农学报,2010,24(6):1297-1304.
- [23] Xie G, Liu S, Tetsuo T, et al. Effects of salt and alkali stress on differential expression of genes in rice seedlings[J].*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2005, 11(2):129-133.
- [24] Shan X, Wang X, Yang G, et al. Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays*, L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms[J].*Journal of Plant Biology*, 2013, 56(1):32-38.

(下转第 45 页)

- [5] Seabrooks L, Hu L. Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 7(4): 409-426.
- [6] 高源, 陈建伟, 李鹏, 等. 九香虫抗凝血作用的研究 [J]. *现代中药研究与实践*, 2010, 24(03): 34-36.
- [7] 檀军, 郭建军, 魏超, 等. 九香虫血淋巴对胃癌 SGC-7901 细胞体外增殖的抑制作用 [J]. *山地农业生物学报*, 2013, 32(02): 119-122.
- [8] Ratcliffe NA, Mello CB, Garcia ES, et al. Insect natural products and processes: new treatments for human disease [J]. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 2011, 41(10): 747-769.
- [9] 李文宾, 吴敏丽, 廉振民, 等. 中国昆虫资源研究开发现状 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2008(04): 21-25.
- [10] Jiang SJ. Anti-cancer insect medicinal materials in China [J]. *Chin. Med. Mater*, 1990(13): 11-14.
- [11] 潘大理. 九香虫治愈血管瘤 4 例 [J]. *中医杂志*, 1987, 28(11): 40.
- [12] 林普莲. 九香抗癌定痛散治癌痛 23 例观察 [J]. *福建中医学院学报*, 2005(S1): 123-124.
- [13] 张卫东, 赵惠儒, 阎影, 等. 斑蝥素诱导人肺癌 A549 细胞凋亡及其分子机制的研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005(06): 330-334.
- [14] 李晓飞, 侯晓晖, 陈祥盛. 芫菁斑蝥素对喉癌细胞和胃癌细胞的抑制作用 [J]. *昆虫学报*, 2009, 52(09): 946-951.
- [15] Gajski G, Garajrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties [J]. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 2013, 36(2): 697-705.

(上接第 13 页)

- [25] 盖树鹏, 张风, 张玉喜, 等. 低温解除牡丹休眠进程中基因组 DNA 甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(3): 261-267.
- [26] 周艳华, 曹红利, 岳川, 等. 冷驯化不同阶段茶树 DNA 甲基化模式的变化 [J]. *作物学报*, 2015, 41(7): 1047-1055.
- [27] 刘鹏飞. 离体条件对火龙果 DNA 甲基化变异的影响 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- [28] Hong H F, Wei J, Li T C, et al. DNA methylation alterations of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) in response to cold stress [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(8): 2445-2453.
- [29] Yaish M W. DNA Methylation-Associated Epigenetic Changes in Stress Tolerance of Plants [M]. *Molecular Stress Physiology of Plants. Springer India*, 2013: 427-440.
- [30] 王小利, 王茜, 舒健虹, 等. 氮胁迫下高羊茅基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(11): 002362-2371.
- [31] 冯素彬, 邹枚伶, 张圣奎, 等. 木薯干旱胁迫下甲基化变化分析 [J]. *分子植物育种*, 2017(4): 1492-1498.
- [32] 郭燕, 朱杰, 许自成, 等. 植物抗坏血酸氧化酶的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2008, 24(3): 196-199.
- [33] Jian-Fang H U, Gui-Fen L I, Gao Z H, et al. Regulation of Water Deficit-Induced Abscisic Acid Accumulation by Apoplastic Ascorbic Acid in Maize Seedlings [J]. *植物学报(英文版)*, 2005, 47(11): 1335-1344.
- [34] 石永春, 刘卫群. 植物中的抗坏血酸氧化酶 [J]. *植物生理学报*, 2008, 44(1): 151-154.
- [35] 余泽高, 乔丽雅. 小麦抗坏血酸氧化酶活性与抗病性关系的初步探讨 [J]. *湖北农业科学*, 2003(1): 31-33.