

萝卜2芥蓝异源四倍体 F₄ 和 F₁₀世代 DNA 甲基化变异的 MSAP 分析*

李象松¹ 魏丽华¹ 李炫丽¹ 汪艳杰¹ 王冰¹ 吴江生² 龙鸿^{1*}

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以人工合成的萝卜2芥蓝异源四倍体的 F₄ 和 F₁₀ 世代为材料, 用 MSAP 法检测 2 种材料 DNA 甲基化变异情况, 以期为远缘杂交后不同世代间基因组 DNA 甲基化遗传和变异规律提供实验依据。结果表明: F₄ 代和 F₁₀ 代甲基化程度分别为 30.61% 和 33.10%, 共检测 12 种甲基化变异模式, 可以分为 5 种类型, 甲基化变异位点占所有甲基化位点的 41.71%。用甲基化抑制剂 5-氮胞苷处理 F₄ 代、F₁₀ 代材料, 检测到甲基化程度分别为 20.67% 和 25.75%, F₁₀ 代比 F₄ 代受到了更大冲击, 说明不稳定世代对环境的影响更加敏感。

关键词 MSAP; 异源多倍体; DNA 甲基化; 5-氮胞苷

中图分类号 S 631.1; S 565.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0096-05

远缘杂交是指不同种或亚种间以及种以上亲缘关系更远的个体之间的杂交, 包括有性杂交和体细胞杂交。远缘杂交可以导致植物异源多倍体的形成, 从而诱发迅速且广泛的遗传^[1] 和表观遗传变异^[2], 前者主要包括染色体结构重排、DNA 序列消除及基因突变等, 后者主要包括基因沉默、DNA 和组蛋白甲基化、核仁显性、转座子激活和基因组印记等。在自然界中, 约 70% 的显花植物在进化史上曾经发生过至少 1 次的多倍化, 形成了许多天然多倍体, 如香蕉、咖啡、棉花、小麦、油菜、烟草、甘蔗、燕麦等^[3]。生产实践中利用远缘杂交产生多倍体也是遗传改良的主要手段之一, 说明异源多倍体在进化理论研究和农业生产实践上占有重要的地位^[4]。

真核生物中, DNA 甲基化是基因表达的一种常见而又重要的修饰方式。DNA 甲基化以胞嘧啶甲基化(C)为主, 具有表观遗传效应, 导致基因表达、细胞分化和染色质失活等^[5]。DNA 甲基化并不改变基因的碱基排序, 但是改变了遗传信息的表达, 从而引起表型变异, 在植物的发育过程中具有重要的调控作用。许多研究表明, 物种间的远缘杂交伴随着大量的表观遗传变异现象发生, 其中包含大量的 DNA 胞嘧啶甲基化变异, 它开启或关闭某些基因的转录表达程序^[6,7], 通过对大米草^[7]、水稻^[8]、拟南芥^[9]等植物的研究发现, 杂交后代基因组中 DNA

甲基化比例相对于亲本发生了明显的变异, 并且不同位点的甲基化模式表现出丰富的多态性, 杂交后代一些位点与亲本相比表现为去甲基化, 而另一些位点表现为甲基化水平增加, 还有一些位点表现为组织特异性。研究者认为, 这种 DNA 甲基化水平及模式的变异是一种普遍现象, 可能与杂交后代全新基因调控系统的形成密切相关, 对于物种适应不同的生长环境更是必须的^[2,9]。受材料限制, 对远缘杂交后代从不稳定世代到稳定世代间 DNA 甲基化的遗传变异规律研究很少。

笔者利用人工合成的萝卜2芥蓝异源四倍体的不稳定的 F₄ 代和稳定的 F₁₀ 代为材料, 用 MSAP 法检测其 DNA 甲基化变异程度和变异类型, 为研究甲基化在远缘杂交后代不同世代间的遗传变异规律提供试验依据。另外, 用 DNA 甲基化抑制剂 5-氮胞苷分别处理了 F₄ 代和 F₁₀ 代, 检测其 DNA 甲基化变异受到的冲击大小, 以期为远缘杂交稳定世代和不稳定世代基因组 DNA 甲基化变异受到环境影响的程度提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

人工合成的萝卜2芥蓝异源四倍体(RRCC)由萝卜(*Raphanus sativus* L., RR)和芥蓝(*Brassica*

收稿日期: 200920-220; 修回日期: 200907015

* 教育部留学回国人员基金项目(4002-082017)资助

** 通讯作者。E-mail: longhong@mail.hzau.edu.cn

李象松, 男, 1981 年生, 硕士研究生。研究方向: 植物细胞分子生物学。E-mail: xs20022908@163.com

alboglabra Bailey, CC) 人工去雄杂交并经胚抢救和后代基因组加倍得到^[10], F₄ 代和 F₁₀ 代种子均保存于华中农业大学国家油菜工程中心。

1.2 试验方法

1) 材料培养。在培养皿中用 0.1 mg/mL 的 52 氮胞苷溶液和水分别培养异源四倍体 F₄ 代、F₁₀ 代种子, 每天换液, 待种子萌发根长 1~2 cm 时转移至装有蛭石的盆中, 用加入和未加入 52 氮胞苷的 Haugland 营养液浇灌, 于 20 e 培养箱中培养。

2) CTAB 法提取植物基因组 DNA。分别取培养 30 d 的 F₄ 代和 F₁₀ 代(末用 52 氮胞苷处理与用 52 氮胞苷处理) 萌发后培养植株的叶片, 以 CTAB 法提取基因组 DNA, 紫外分光光度计检测其浓度。

3) MSAP 法检测基因组的甲基化变异。DNA 样品分别用 EcoR⁺/Hpa⁰ 和 EcoR⁺/Msp⁺ 2 组限制性内切酶进行酶切, 为减少实验误差, 酶切和连接同时进行。酶切和连接体系(20 LL)为: 300 ng 模板 DNA, 4 U EcoR⁺, 4 U Hpa⁰ (或 Msp⁺), 1 U T₄ DNA 连接酶, 2 pmol EcoR⁺ 接头, 2 pmol Hpa⁰/Msp⁺ 接头, 1 @ 反应缓冲液(10 mmol/L Tris⁺HCl, pH 7.5, 10 mmol/L Mg(Ac)₂, 50 mmol/L KAc, 10 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L ATP)。反应混合液在 37 e 保温过夜, 然后 65 e 灭活 10 min, 并用 ddH₂O 稀释 10 倍作为预扩增的底物。取 5 LL 酶切连接产物进行预扩增反应。所得的 PCR 产物稀释 50~100 倍后再次用于选择性

表 1 MSAP 筛选的选择性扩增引物¹⁾

Table 1 Primers of selective amplification used in MSAP

预扩增引物 Preselective primers	选择性扩增引物 Selective primers
	EcoR ⁺ + AAC/ EcoR ⁺ + ACC/
	Hpa ⁰ /Msp ⁺ + AGT Hpa ⁰ /Msp ⁺ + TAG
	EcoR ⁺ + ACT/ EcoR ⁺ + AGC/
	Hpa ⁰ /Msp ⁺ + TGA Hpa ⁰ /Msp ⁺ + AGC
	EcoR ⁺ + ACT/ EcoR ⁺ + ATT/
EcoR ⁺ + A /	Hpa ⁰ /Msp ⁺ + TAG Hpa ⁰ /Msp ⁺ + GCA
Hpa ⁰ /Msp ⁺ + 0	EcoR ⁺ + ATT/ EcoR ⁺ + AGG/
	Hpa ⁰ /Msp ⁺ + ACC Hpa ⁰ /Msp ⁺ + GAT
	EcoR ⁺ + ATG/ EcoR ⁺ + AGG/
	Hpa ⁰ /Msp ⁺ + ACG Hpa ⁰ /Msp ⁺ + TCG
	EcoR ⁺ + ACC/ EcoR ⁺ + ACA/
	Hpa ⁰ /Msp ⁺ + TAA Hpa ⁰ /Msp ⁺ + GCA

1) 引物的核心序列 Hpa⁰/Msp⁺ 为 52ATCATGAGTCCT2 GCTCGG23, EcoR⁺ 为 52GACTGCGTACCAATT23 Core sequences of Hpa⁰/Msp⁺ and EcoR⁺ are 52ATCATGAGTCCT2 GCTCGG23 and 52GACTGCGTACCAATT23, respectively; 后面附加的 3 个碱基为选择性碱基 Three bases added in Hpa⁰/Msp⁺ and EcoR⁺ are selective.

扩增反应, 并进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和硝酸银染色检测。经过引物筛选, 确定了 12 对扩增效果较好的 EcoR⁺/Hpa⁰2Msp⁺ 引物(表 1)。

2 结果与分析

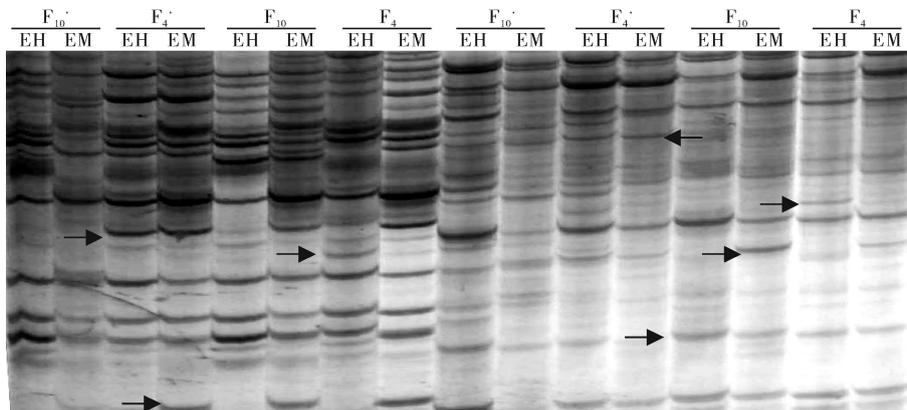
目前, 用于 DNA 甲基化分析的方法较多, 如高效液相色谱(HPLC)法、重亚硫酸盐法、甲基化特异性 PCR(Methylation2specific PCR, MSP)、基因测序法^[11]以及 MSAP(Methylation2sensitive amplifi2 cation polymorphism, 甲基化敏感性扩增多态性)等。MSAP 分析是基于选择性 PCR 的一种技术, 结合了 AFLP 的优点, 能够检测样品 DNA 中大量的甲基化位点, 多态性高^[9]。MSAP 技术对模板 DNA 的质量有严格的要求, DNA 的提取质量对实验结果有较大影响。为此, 笔者采用改进的 CTAB 法提取 4 种材料的 DNA 做预备实验, 以获得信号强、稳定性好的 MSAP 谱带。采用标准的 MSAP 程序, 经过必要的调整和优化, 以各种材料 DNA 为模板的扩增反应都获得了清晰可读、条带丰富的 MSAP 谱带。笔者对扩增反应进行了多次重复, 发现 MSAP 带型具有很好的稳定性, 说明 MSAP 技术可以有效地应用于萝卜芥蓝杂交物种基因组的甲基化检测。

2.1 CCGG 位点的甲基化水平分析

同裂酶 Hpa⁰ 和 Msp⁺ 的酶切位点均为 /CCGG/GGCC0, 但二者对酶切位点 DNA 序列的甲基化敏感程度却不同: Hpa⁰ 能识别并切割非甲基化和半甲基化位点(双链 DNA 中只有 1 条链的外侧胞嘧啶发生甲基化, 即^mCCGG/GGCC), 而不能切割全甲基化位点(双链 DNA 中 2 条链的内侧胞嘧啶均发生甲基化, 即 C^mCGG/GG^mCC); Msp⁺ 能识别并切割非甲基化和全甲基化位点而不能切割半甲基化位点。因而当以此同裂酶分别与 EcoR⁺ 组合进行 AFLP 反应时, 每个扩增位点均代表 1 个(CCGG/GGCC)位点, 而对比 Hpa⁰ 与 Msp⁺ 不同的扩增模式就可反映出该位点的甲基化状态及程度, 可分为: A 型, 都有条带(Hpa⁰+ /Msp⁺+), 代表非甲基化位点(或单链内侧甲基化); B 型, Hpa⁰ 无带、Msp⁺ 有带(Hpa⁰- /Msp⁺+), 代表全甲基化位点; C 型, Hpa⁰ 有带、Msp⁺ 无带(Hpa⁰+ /Msp⁺-), 代表半甲基化位点。经过多次重复实验共筛选出 12 对扩增条带稳定的选择性引物组合, 对其 MSAP 图谱(图 1)进行统计。4 种材料 MSAP 图谱中

分别扩增出 441、421、423、369 条谱带, 4 种材料的甲基化位点分别为 135、187、140、195 条, 整体甲基化水平分别为 F₄ 代材料 30.61%, 5Z 氮胞苷处理的 F₄ 代材料为 20.67%, F₁₀ 代材料为 33.10%, 5Z 氮胞苷处理的 F₁₀ 代材料为 25.75% (表 2)。可见, 杂种材料 F₄ 代、F₁₀ 代用 5Z 氮胞苷处理前后甲基化水平都有明显的降

低, 而且 5Z 氮胞苷对 F₄ 代的影响要明显强于对 F₁₀ 代的影响, 而未用 5Z 氮胞苷处理的 F₄ 代与 F₁₀ 代的甲基化水平虽存在差异但并不十分明显。进一步分析发现 4 种材料的半甲基化水平分别为 20.86%、19.62%、13.54%、14.91%, 全甲基化比例依次为 9.75%、13.48%、7.13%、10.84% (表 2)。



引物组合为 EcoR⁺ + AAC/Hpa⁺/Msp⁺ + GAT 和 EcoR⁺ + ACT/Hpa⁺/Msp⁺ + TGA Primers are EcoR⁺ + AAC/Hpa⁺/Msp⁺ + GAT and EcoR⁺ + ACT/Hpa⁺/Msp⁺ + TGA; F₄、F₁₀ 为水培材料 The materials of F₄ and F₁₀ are not treated with 5Zaz2 cytidine; F₄⁻、F₁₀⁻ 为 5Z 氮胞苷处理的材料; The materials of F₄⁻ and F₁₀⁻ are treated with 5Zaz2 cytidine; 箭头示甲基化变异位点 Arrows indicate the sites of methylation variations.

图 1 F₄ 和 F₁₀ 世代的 MSAP 图谱示例

Fig. 1 Examples of MSAP in F₄ and F₁₀

表 2 F₄ 和 F₁₀ 世代 MSAP 扩增统计结果

Table 2 Statistical results of MSAP in F₄ and F₁₀

样本 Sample	总带数 Numbers of bands	未甲基化的 CCGG 及比例/% Nonmethylated sites and percentage	完全甲基化位点(内侧 C)及比例/% Fullmethylation sites and percentage	半甲基化位点(外侧 C)及比例/% Halfmethylated sites and percentage	总甲基化位点及比例 Tot1 methylation sites and percentage
F ₄	441	306 69.39	43 9.75	92 20.86	135 30.61
F ₁₀	423	283 66.90	57 13.48	83 19.62	140 33.10
F ₄ 5ZAC	421	334 79.33	30 7.13	57 13.54	87 20.67
F ₁₀ 5ZAC	369	274 74.25	40 10.84	55 14.91	95 25.75

2.2 CCGG 位点甲基化模式的变异分析

通过对 MSAP 图谱分析, 可将 F₄、F₁₀ 材料 CCGG 位点的甲基化变异模式分为 () 单态性甲基化位点, 即同一 CCGG 位点在 F₄ 代和 F₁₀ 代中甲基化模式相同; () 多态性位点, 即同一 CCGG 位点在 F₄ 代和 F₁₀ 代表现不一致。F₄ 代和 F₁₀ 代水培材料的数据显示, 它们的单态性位点共有 102 条(其中全甲基化位点有 74 个, 半甲基化位点有 28 个), 占所有甲基化位点的 58.29%, 说明 F₄ 代和 F₁₀ 代材料大部分 CCGG 甲基化位点可稳定遗传, 多态性位点共有 73 个, 可分为 5 种变异类型(表 3), F₄ 代与 F₁₀ 代的变异类型主要以 A、B 2 种类型为主, 分别占所有甲基化位点的 15.42% 和 10.29%, 而 C、D、E 类型分别占 6.29%、5.71% 和 4.00% (表 3)。此外,

表 3 F₄ 和 F₁₀ 世代 DNA 甲基化状态变异模式分析¹⁾

Table 3 Analysis of models of methylation variations in F₄ and F₁₀

F ₄		F ₁₀		带型 Types of bands	位点数目 Numbers of bands	合计 Totle	比例/% percentage
H	M	H	M				
-	-	+	+	A1	10	27	15.42
-	+	+	+	A2	6		
+	-	+	+	A3	11	18	10.29
+	+	-	-	B1	3		
+	-	-	-	B2	7		
-	+	-	-	B3	8		
-	-	-	+	C1	3	11	6.29
-	-	+	-	C2	8		
+	+	-	+	D1	2	10	5.71
+	+	+	-	D2	8		
+	-	-	+	E1	2	7	4.00
-	+	+	-	E2	5		

1) H. EcoR⁺ / Hpa⁺ 的酶切、扩增产物 Products of digestion and amplified of EcoR⁺ / Hpa⁺; M. EcoR⁺ / Msp⁺ 的酶切、扩增产物 Products digestion and amplified of EcoR⁺ / Msp⁺; +. 有扩增产物 Having bands; -. 无扩增产物 No bands.

经过52氮胞苷处理的 F_4 代和 F_{10} 代材料检测到的甲基化变异位点分别占有所有甲基化位点的64.16%和71.25% (统计表未显示), 52氮胞苷处理后 F_{10} 代DNA甲基化变异高于 F_4 代, 由于52氮胞苷对基因组甲基化位点的抑制是随机的, 所以其甲基化变异模式更具多样性, 并无明显规律。

3 讨论

大量研究表明, DNA甲基化模式可以随细胞的有丝分裂和(或)减数分裂传递给后代^[12], 同时也有报道DNA甲基化的动态变化和模式重塑现象, 这种现象在种间杂交以及异源多倍体化现象中尤其普遍^[79]。本研究结果表明, F_4 代和 F_{10} 代甲基化变异占有所有甲基化位点41.71%, 说明不稳定世代与稳定世代间的甲基化位点大部分可以稳定遗传, 在所有的变异位点中类型A与B分别占有所有甲基化位点的15.42%和10.29%, 表明其变异类型主要以这2种为主, 其余3种类型较少, 分别占6.29%, 5.71%, 4.00%; 52氮胞苷处理的 F_4 代和未处理的 F_4 代的相比, 甲基化变异位点占有所有甲基化位点的64.16%, 而52氮胞苷处理的 F_{10} 代和未处理的 F_{10} 代相比, 甲基化变异位点所占比例为71.25%, 而且其甲基化变异位点无明显的倾向性, 说明52氮胞苷对各种甲基化位点的影响是随机的, 而且其对 F_{10} 代的影响也大于对 F_4 代的影响。

本研究探讨了远缘杂交不同世代(F_4 , F_{10})间的DNA甲基化变化规律, 试验结果显示, F_4 代和 F_{10} 代的甲基化位点分别占有所有位点的30.61%和33.10%, 差别不大, 说明稳定世代和不稳定世代的总体甲基化水平无明显差异, 这一结果与水稻剑叶组织16.3%的甲基化水平差别很大^[8], 但与拟南芥幼苗组织35%~43%的甲基化水平相近^[9], 这种不同物种间DNA甲基化水平的差异, 一方面可能与检测方法(如引物数目、扩增条件、电泳时间和显带方法等)和供试材料(如种子、幼苗和成熟叶片等)有关, 另一方面可能是遗传控制的结果; F_4 和 F_{10} 世代的半甲基化(外侧胞嘧啶)水平分别为20.86%和19.62%, 全甲基化水平分别为9.75%和13.48%, 可以看出无论是不稳定世代 F_4 代还是稳定世代 F_{10} 代, 它们都是以半甲基化为主要的甲基化方式, 而全甲基化水平 F_{10} 代则明显高于 F_4 代, 说明从不稳定世代(F_4)到稳定世代(F_{10})其DNA甲基化变异主要在CCGG全甲基化位点。52氮胞苷是一种广泛用

于动植物研究的甲基化抑制剂, 其对植物基因组的影响是随机的, 能够引起广泛的基因组甲基化变异和染色体改构^[13], 52氮胞苷处理后的 F_4 与 F_{10} 世代总的甲基化位点分别占总位点的20.67%和25.75%, 相对于没有处理的 F_4 代的30.61%和 F_{10} 代的33.10%, 说明52氮胞苷处理后基因组的甲基化程度明显降低。

MSAP技术有许多优点, 如技术简单, 无需大型仪器, 成本低, 效率高, 而且分析结果直接与基因序列联系起来, 为研究基因表达与DNA甲基化的相互关系提供了十分有效的方法。然而, MSAP在应用中也有一些局限性, 由于使用了4%~6%的测序胶, 该方法只能有效检测分子质量在50~1500bp范围内的片段^[14], 分子质量过大或过小都无法显示; 由于使用了同裂酶Hpa^Ⅱ和Msp^Ⅰ, 该方法只能检测基因组中CCGG序列的甲基化情况^[8], 且由于所使用的同裂酶的分辨能力限制, 只能检测CCGG位点中的部分甲基化情况, 对于某些甲基化情况是无法识别和检测的, 造成检测结果偏低^[8]。

参 考 文 献

- [1] COMAI L, TYAGI A P, WINTER K, et al. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids [J]. *The Plant Cell*, 2000(12): 1552-1568.
- [2] LIU B, WENDEL J F. Non-Mendelian phenomena in polyploid genome evolution [J]. *Current Genomics*, 2002, 3: 482-506.
- [3] MASTERSON J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms [J]. *Science*, 1994, 264: 4212-4244.
- [4] 石淑稳, 刘后利. 甘蓝型油菜及其种间和属间杂种小孢子胚体的诱导 [J]. *华中农业大学学报*, 1993, 12(6): 542-550.
- [5] GONZALGO M L, JONES P A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation [J]. *Mutat Res*, 1997, 386(2): 107-118.
- [6] CHAN S W, HENDERSON I R, JACOBSEN S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 351-360.
- [7] SALMON A, AINOUCHE M L, WENDEL J F. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae) [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14: 1163-1175.
- [8] XIONG L Z, XU C G, MAROOF M A S, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by methylation sensitive amplification polymorphism technique [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 432-446.
- [9] MADLUNG A, MASUPELLI R W, WATSON B, et al. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic Arabidopsis allotetraploids [J]. *Plant*

- Physiol, 2002, 129: 732746.
- [10] CHEN H G, WU J S. Characterization of fertile amphidiploid between *Raphanus sativus* and *Brassica alboglabra* and the crossability with *Brassica* species[J]. Genet Resour Crop Evol, 2008, 55: 1432150.
- [11] DAHL C, GULDBERG P. DNA methylation analysis techniques[J]. Biogerontology, 2003(4): 2332250.
- [12] SAZE H, MITTELSTEN SCHEID O, PASZKOWSKI J. Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis[J]. Nat Genet, 2003, 34(1): 65269.
- [13] KAKUTANI T, JEDDELOH J A, FLOWERS S K, et al. Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93: 12406212411.
- [14] XU M L, LI X Q, KORBAN S S. AFLP2based detection of DNA methylation[J]. Plant Mol Biol Rep, 2000, 18(4): 3212330.

Methylation Variation of Different Generations of Artificial *Raphanus sativus* @ *Brassica alboglabra* Allopolyploids Analysed with MSAP

LI Xiangsong¹ WEI Lihua¹ Li Xuanli¹ WANG Yanjie¹
WANG Bing¹ WU Jiangsheng² LONG Hong¹

1. College of Life Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Methylation variations of artificial F₄ and F₁₀ generations of *Raphanus sativus* @ *Brassica alboglabra* allopolyploid were examined with MSAP. The results showed that the methylation levels of F₄, F₁₀ were 30.61% and 33.10%, respectively. Twelve different models of methylation variations were detected, and these models could be divided into 5 types, with 41.71% variable methylation sites. The methylation levels of F₄ and F₁₀ after 5-azacytidine treatment were 20.67% and 25.75%, respectively. The results showed that after 5-azacytidine treatment, methylation variations of F₁₀ were stronger than those of F₄.

Key words MSAP; allopolyploids; DNA methylation; 5-azacytidine

(责任编辑: 陆文昌)