

火龙果组培苗 DNA 甲基化变化及应答赤霉素效应

刘鹏飞 乔光 文晓鹏

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省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025

摘要 以火龙果优良品种‘紫红龙’组培苗为试材, 利用 MSAP 分子标记, 探讨了棱数变异现象与 DNA 甲基化可能存在的联系, 分析了培养时间及继代次数对组培苗 DNA 甲基化的影响; 通过在培养基中添加 0 (对照)、1.5、3.0、4.5 及 6.0 mg/L GA, 处理 5 d 后, 检测 DNA 甲基化变化, 阐述赤霉素对 DNA 甲基化变化的影响。结果显示: 棱数变异与 DNA 甲基化水平变化并不存在相关性, 而与少数位点的甲基化状态有关; 随培养时间的延长和继代次数的增加, 组培苗 DNA 甲基化水平呈现出升高的趋势; 随 GA 质量浓度的增加, 外源赤霉素半甲基化水平呈先升高后降低的趋势, 与内源 GA 含量变化趋势一致, 而内源赤霉素全甲基化水平呈先降低后升高的趋势; 外源 GA 影响了内源 GA 的积累, 与对照相比, DNA 甲基化变异率分别提高 3.6%、4.5%、3.1% 和 2.7%, 表明火龙果组培苗 DNA 甲基化对低浓度 GA 敏感, 而对高浓度 GA 敏感性降低。

关键词 火龙果; 组培苗; DNA 甲基化; 赤霉素; MSAP

中图分类号 S 667.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0018-09

DNA 甲基化作为最重要的表观遗传现象之一, 在调控真核细胞基因表达、维持基因组稳定等方面发挥重要作用。高等植物的细胞核 DNA 中大约有 4.6%~30% 的胞嘧啶存在着甲基化修饰, 且主要集中在 CpG 和 CpNpG 对称序列上^[1], DNA 甲基化分析已在很多研究领域得到应用, 如变异检测、种质资源评估、基因表达调控机理的阐明等^[2]。通过检测植物基因组甲基化水平变化, 可以为植物生长、发育、代谢调控机制的解析提供新信息。

火龙果 (*Hylocereus undatus*) 作为一种营养丰富的亚热带水果, 已在我国贵州等地广泛种植, 具有较高的经济价值^[3]。目前, 在火龙果抗寒^[4]、抗旱^[5]等方面已有较深入研究, 在遗传多样性检测^[6-8]等方面也做了大量工作; 前期工作表明, GA 与火龙果矮化突变体的产生存在一定联系 (未发表)。本研究以火龙果组培苗为材料, 利用 MSAP 技术, 探讨棱数变异与 DNA 甲基化变化的关系, 分析培养时间、继代次数、外源 GA 对 DNA 甲基化的影响, 旨在为揭示火龙果基因表达提供新信息, 为火龙果种质资源改良提供新的途径和理论思路。

1 材料与方法

1.1 材料

选取长势一致的火龙果‘紫红龙’ (*Hylocereus undatus* ‘Zihonglong’) 组培苗为材料, 检测不同棱数 (三棱、四棱、五棱) 幼茎的 DNA 甲基化水平以及培养时间和继代次数对 DNA 甲基化的影响。选取长势一致的组培苗, 外源添加质量浓度分别为 0 (对照)、1.5、3.0、4.5、6.0 mg/L 的 GA (上海生工, Cat. # GB0738) 溶液, 处理 5 d 后, 每个梯度取 3 株做 DNA 甲基化检测。

1.2 基因组 DNA 提取

利用 Plant Genomic DNA Kit (DP305-03, 天根生化科技有限公司) 提取基因组 DNA, 核酸蛋白测定仪 (Kaiao, K5500) 分别测定基因组 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值, 用于计算 DNA 纯度和浓度; 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取的火龙果基因组 DNA 质量 (120 V, 30 min), DNA 保存于 -20 °C 备用。

1.3 MSAP 分析

基因组 DNA 双酶切 (*Msp*I + *Eco*RI, *Eco*RI +

收稿日期: 2015-08-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260464); 贵州省重大专项 (20126006-01); 贵州大学研究生创新基金项目 (研农 2014020)

刘鹏飞, 硕士研究生, 研究方向: 果树分子遗传. E-mail: lpfyehok@yeah.net

通信作者: 文晓鹏, 博士, 教授. 研究方向: 果树生物技术及遗传育种. E-mail: xpwencs@hotmail.com

Hpa II) 并加接头, 以优化的适用于火龙果的 MSAP-PCR 体系进行两轮扩增。接头及引物序列见表 1。

1.4 电泳与银染检测

凝胶电泳, 向 20 μ L 选择性扩增产物中加入 4 μ L 溴酚蓝上样缓冲液, 充分混匀后 94 $^{\circ}$ C 变性 8 min, 立即取出置冰上预冷, 备用。取 3 μ L 变性产

物进行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 90 V 预电泳 10 min, 之后以 150 V 电泳至溴酚蓝条带抵达胶板底部为止。将凝胶取下, 放入托盘中, 用 ddH₂O 冲洗 2 次。加入 500 mL 0.1% 的硝酸银染液, 避光银染 15 min。用 ddH₂O 冲洗 2 次, 每次不超过 5 s, 加入 500 mL 2% NaOH 溶液显色 (使用前先加入 3 mL 甲醛溶液, 并于 -20 $^{\circ}$ C 预冷 10 min), 显色至

表 1 MSAP 接头及引物序列

Table 1 Adapters and primers of MSAP analysis

| 引物名称 Name of primers | 编号 Code No. | 引物序列(5'-3') Sequence(5'-3') |
|---------------------------------------|----------------|--------------------------------|
| <i>Eco</i> R I 接头 | E-I | CTCGTAGACTGCGTACC |
| <i>Eco</i> R I adapters | E-II | AATTGGTACGCGAGTC |
| <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I 接头 | H/M-I | GACGATGAGTCTGAG |
| <i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I adapters | H/M-II | CGCTCAGGACTCAT |
| 预扩增引物 | E+A | GTAGACTGCGTACCAATTCA |
| Pre-amplification primers | H/M+T | GAGTCCTGAGCGGT |
| 选择性扩增引物 | E+AAG | GTAGACTGCGTACCAATTCAAG |
| Selective amplification primers | E+ACG | GTAGACTGCGTACCAATTACAG |
| | E+ACA | GTAGACTGCGTACCAATTACACA |
| | E+ACT | GTAGACTGCGTACCAATTCACT |
| | E+AAC | GTAGACTGCGTACCAATTCAAC |
| | E+AGA | GTAGACTGCGTACCAATTACAGA |
| | H/M+TCT | GAGTCCTGAGCGGTCT |
| | H/M+TAC | GAGTCCTGAGCGGTAC |
| | H/M+TAG | GAGTCCTGAGCGGTAG |
| | H/M+TTA | GAGTCCTGAGCGGTTA |
| | H/M+TCC | GAGTCCTGAGCGGTCC |
| | H/M+TGT | GAGTCCTGAGCGGTGT |
| | H/M+TGG | GAGTCCTGAGCGGTGG |

条带清晰可见后, 用数码相机拍照记录。

1.5 条带统计与分析

对聚丙烯酰胺凝胶图像进行人工读图后, 将条带转化为 Excel 表格上的 0, 1 二维矩阵进行数据分析。每个样品扩增会有 2 条泳道, 分别记为 H(*Hpa* II + *Eco*R I 酶切) 和 M(*Msp* I + *Eco*R I 酶切)。同一位点, 有条带记为 1, 没有条带记为 0, 只对清晰、重复性好、能明显分辨的条带进行统计。

依据同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 对 CCGG 位点甲基化敏感性的差异, 共得到 3 种条带类型: Type I (1, 0)H 中有带而 M 中没有带, 表示该位点为外部 C 半甲基化; Type II (0, 1)H 中没有带而 M 中有带, 表示该位点为内部 C 全甲基化; Type III (1, 1)H 和 M 中都出现条带, 表示该位点为未甲基化或内部 C 半甲基化。位点甲基化形式的变化主要有 3 类: A. 重新甲基化, 表示未甲基化的 CCGG 位点重新出现胞嘧啶半甲基化或胞嘧啶全甲基化或其他甲

基化形式; B. 去甲基化, 表示原先甲基化的位点发生了甲基化的消除; C. 甲基化形式的改变, CCGG 位点的甲基化形式在不同类型之间变化。

2 结果与分析

2.1 棱变异的 DNA 甲基化变化

为探究火龙果组培苗棱变异现象是否与基因组 DNA 甲基化变化有联系, 以 13 对引物对 4 个单株的 12 个样本进行 MSAP 检测, 分别统计各条带类型及比率(表 2)。不同棱数(图 1)间, 基因组 CCGG 位点半甲基化比率分别为 3.6%、3.6% 和 3.4%, 全甲基化比率分别为 27.0%、27.3% 和 27.2%, 总甲基化比率分别为 30.6%、30.9% 和 30.5%, 应用 SPSS 16.0 软件对统计结果进行显著性差异分析发现, 在不同棱数间 DNA 甲基化各类型无显著差异(数据未列出)。说明火龙果组培苗棱数变化与各类型(type I、type II、type III)条带的比率及基因组 DNA 总甲基化比率不存在相关性。

表 2 棱变异组培苗 DNA 甲基化条带数及比率

Table 2 DNA methylation bands and ratio from *in vitro* shoots of different arris

| 棱数 Arris | 单株 Individuals | 条带类型 Band type (Ratio) | | | 总条带数 Total bands | 总甲基化比率/% Total methylation ratio |
|-------------------|-------------------|------------------------|------------|----------|---------------------|-------------------------------------|
| | | Type I | Type II | Type III | | |
| 三棱 Three arris | La | 18 | 102 | 260 | 380 | 30.6 |
| | Lb | 14 | 105 | 270 | 389 | |
| | Lb' | 11 | 106 | 270 | 387 | |
| | Lc | 14 | 104 | 266 | 384 | |
| | 均值 Mean | 14(3.6%) | 104(27.0%) | 267 | 385 | |
| 四棱 Four arris | La | 20 | 102 | 260 | 382 | 30.9 |
| | Lb | 10 | 107 | 268 | 385 | |
| | Lb' | 9 | 107 | 272 | 388 | |
| | Lc | 16 | 103 | 264 | 383 | |
| | 均值 Mean | 14(3.6%) | 105(27.3%) | 266 | 385 | |
| 五棱 Five arris | La | 16 | 100 | 268 | 384 | 30.5 |
| | Lb | 10 | 106 | 266 | 382 | |
| | Lb' | 11 | 106 | 270 | 387 | |
| | Lc | 14 | 104 | 262 | 380 | |
| | 均值 Mean | 13(3.4%) | 104(27.2%) | 267 | 383 | |

注: a, b, c 分别代表不同的单株, Lb 和 Lb' 表示它们来自同一单株; 总条带数 = type I + type II + type III。总甲基化比率 = (type I + type II) / (type I + type II + type III); 下同。Note: a, b, c represented different shoots; Lb and Lb' represented that from the same shoot; Total bands = type I + type II + type III; Total methylation ratio = (type I + type II) / (type I + type II + type III); The same as follows.

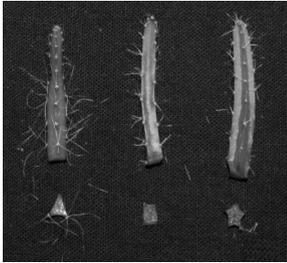


图 1 不同棱数的火龙果组培苗茎

Fig.1 Pitaya *in vitro* shoots of different arris

不同棱数间,位点甲基化形式表现出一定的变化(图 2)。进一步对不同棱数间带型变化的统计分析(表 3)发现,在 3 种类型的变化中,位点间甲基化形式的改变均占有较大比例;与三棱相比,四棱和五棱的去甲基化位点均高于重新甲基化位点(22.2% > 5.6%, 27.8% > 22.2%);与四棱相比,五棱的去甲基化位点也同样高于重新甲基化的位点(42.1% > 21.1%)。因此,随着棱数的增加, DNA 去甲基化位点始终高于重新甲基化位点,即这些位点的甲基化状态与棱数变化有关。

2.2 培养时间和继代次数对组培苗 DNA 甲基化的影响

组培苗培养 2、3、4、5 个月后,以 8 对引物扩增得到 651~668 条带(表 4),随着培养时间的延长,外胞嘧啶半甲基化比率(4.3%→4.5%)和内胞嘧啶全甲

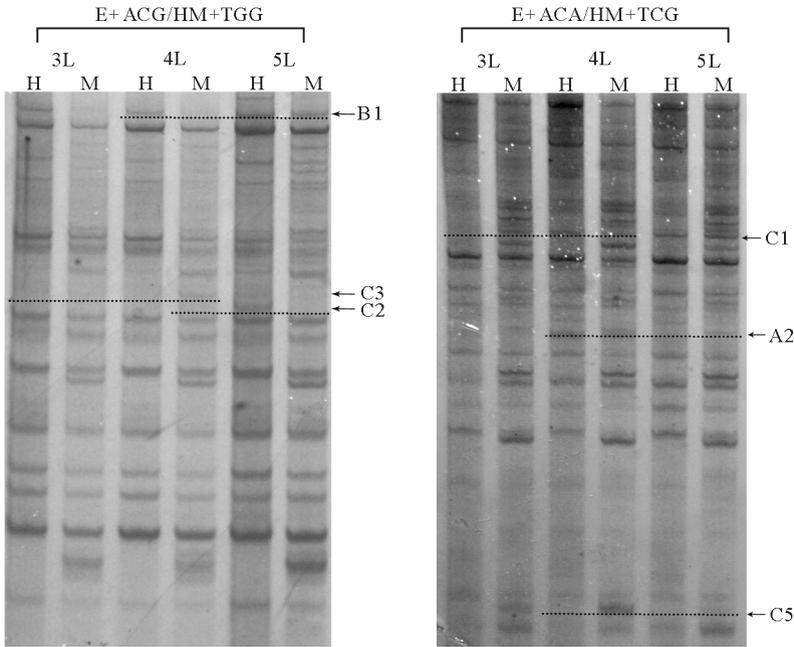
基化比率(19.8%→20.4%)均有一定变化,而基因组总甲基化水平表现出升高的趋势(24.1%→24.9%)。

组培苗继代 4、5、6、7 次后,以 8 对引物扩增得到 652~665 条带(表 5),与继代时间对基因组 DNA 甲基化水平的影响相似,随着继代次数的增加,外胞嘧啶半甲基化比率(4.3%→4.1%)和内胞嘧啶全甲基化比率(19.8%→20.9%)有一定变化,而基因组总甲基化水平同样表现出升高的趋势(24.1%→25.0%)。

综上,火龙果组培苗 DNA 甲基化水平,随培养时间的延长和继代次数的增加均呈现出升高的趋势。

2.3 赤霉素对组培苗 DNA 甲基化水平的影响

以 4 对引物对不同质量浓度 GA 处理的火龙果组培苗进行 MSAP 检测,总共得到 220~228 条带(表 6),随着处理质量浓度的增加,外胞嘧啶半甲基化(type I)比率呈现先升高后降低的趋势,而内胞嘧啶全甲基化(type II)比率呈先降低后升高的趋势, DNA 总甲基化水平表现出一定的波动。说明这 2 种形式的甲基化可以相互调节,从而维持 DNA 总甲基化水平的相对稳定。经过检测,随外源 GA 处理质量浓度的增加,内源 GA 含量也表现出先升高后降低的趋势(406.7、424.3、440.6、398.6、409.1 pg/mL),表现出与 DNA 甲基化变化的相关性。



3L、4L、5L 分别代表三棱、四棱和五棱，下同。3L、4L、5L represented 3 aris, 4 aris, 5 aris, respectively, the same as the following.

图 2 棱变异甲基化检测电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis profiles of MASP amplification from *in vitro* shoots of different aris

表 3 棱变异组培苗 DNA 甲基化模式变化

Table 1 DNA methylation patterns from *in vitro* shoots of different aris

| 类型 Type | | 带型变化 Pattern change | | | | 位点数(比率/%) Number of sites (Ratio) | | | |
|---|-------------|---------------------|---|---|---|-----------------------------------|-----------|----------|----------|
| | | H | M | → | H | M | 3L→4L | 3L→5L | 4L→5L |
| 重新甲基化 Re-methylation | A1 | 1 | 1 | 1 | 0 | | 1 | 1 | |
| | A2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | | |
| | A3 | 1 | 1 | 0 | 0 | | 2 | 3 | |
| | 小计 Subtotal | | | | | | 1 (5.6) | 4 (22.2) | 4 (21.1) |
| 去甲基化 Demethylation | B1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | | 5 | |
| | B2 | 0 | 1 | 1 | 1 | | 2 | 2 | |
| | B3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | |
| | 小计 Subtotal | | | | | | 4 (22.2) | 5 (27.8) | 8 (42.1) |
| 甲基化形式的改变 Change in methylation pattern | C1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | | | |
| | C2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | |
| | C3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | | | |
| | C4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 6 | 5 | 1 | |
| | C5 | 0 | 1 | 0 | 0 | | 3 | 5 | |
| | 小计 Subtotal | | | | | | 13 (72.2) | 9 (50.0) | 7 (36.8) |
| 总变异位点数 (变异率/%) | | | | | | | 18 (1.2) | 18 (1.2) | 19(1.2) |
| Total variation sites (Ratio) | | | | | | | | | |

注：H代表 *EcoR* I / *Hpa* II 酶切组合，M代表 *EcoR* I / *Msp* I 酶切组合，1表示图谱上出现条带，0表示图谱上没有条带。A1-A3，B1-B3、C1-C5 代表具体的条带变化形式。变异率=总变异位点数/总条带数×100%，下同。Note：H represented the *EcoR* I / *Hpa* II digestion combination.M represented the *EcoR* I / *Msp* I digestion combination.1 and 0 indicated presence or absence of the band, respectively,in the gel.A1-A3,B1-B3,C1-C5 represented the detailed change of methylation pattern.Variation ratio= Total variation sites/Total bands×100%，the same as the following.

表 4 不同培养时间下组培苗 DNA 甲基化水平变化

Table 4 DNA methylation levels of *in vitro* shoots with different culture duration

| 条带类型 MSAP band types | 培养时间 Culture time | | | |
|---|-------------------|---------------|---------------|---------------|
| | 2 个月 2 months | 3 个月 3 months | 4 个月 4 months | 5 个月 5 months |
| Type I | 28 | 30 | 32 | 30 |
| Type II | 130 | 127 | 139 | 136 |
| Type III | 498 | 494 | 506 | 501 |
| 总条带 Total bands | 656 | 651 | 668 | 667 |
| 外胞嘧啶半甲基化比率/% Hemi-methylation ratio | 4.3 | 4.6 | 4.8 | 4.5 |
| 内胞嘧啶全甲基化比率/% Internal full methylation ratio | 19.8 | 19.5 | 19.5 | 20.4 |
| 总甲基化比率/% Total methylation ratio | 24.1 | 24.1 | 24.3 | 24.9 |

表 5 不同继代次数下组培苗 DNA 甲基化水平变化

Table 5 DNA methylation levels of *in vitro* shoots with different subculture cycles

| 条带类型 MSAP band types | 继代次数 Subculture cycles | | | |
|---|------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 4 代 4 cycles | 5 代 5 cycles | 6 代 6 cycles | 7 代 7 cycles |
| Type I | 28 | 28 | 25 | 27 |
| Type II | 130 | 129 | 140 | 139 |
| Type III | 498 | 495 | 494 | 499 |
| 总条带 Total bands | 656 | 652 | 659 | 665 |
| 外胞嘧啶半甲基化比率/% Hemi-methylation ratio | 4.3 | 4.3 | 3.8 | 4.1 |
| 内胞嘧啶全甲基化比率/% Internal full methylation ratio | 19.8 | 19.8 | 21.2 | 20.9 |
| 总甲基化比率/% Total methylation ratio | 24.1 | 24.1 | 25.0 | 25.0 |

表 6 GA 处理对火龙果组培苗 DNA 甲基化水平的影响

Table 6 Effects of GA treatment on DNA methylation level of pitaya *in vitro* shoots

| 条带类型 MSAP band types | 对照 Control | GA 质量浓度/(mg/L) GA concentration | | | |
|---|------------|---------------------------------|------|------|------|
| | 0.0 | 1.5 | 3.0 | 4.5 | 6.0 |
| Type I | 5 | 9 | 7 | 6 | 4 |
| Type II | 57 | 54 | 57 | 56 | 58 |
| Type III | 162 | 165 | 160 | 162 | 158 |
| 总条带 Total bands | 224 | 228 | 224 | 224 | 220 |
| 外胞嘧啶半甲基化比率/% Hemi-methylation ratio | 2.2 | 3.9 | 3.1 | 2.7 | 1.8 |
| 内胞嘧啶全甲基化比率/% Internal full methylation ratio | 25.4 | 23.7 | 25.4 | 25.0 | 26.4 |
| 总甲基化比率/% Total methylation ratio | 27.7 | 27.6 | 28.6 | 27.7 | 28.2 |

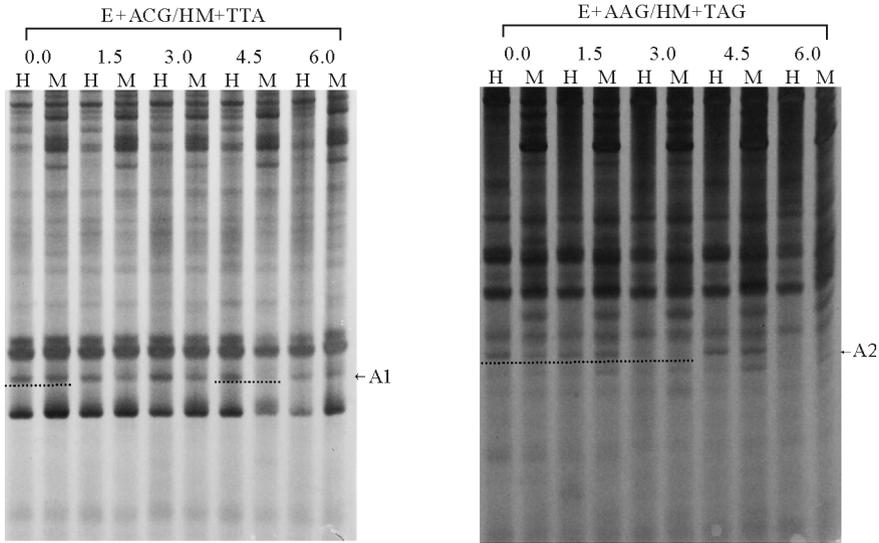
进一步对各处理带型变化进行统计分析,发现不同处理下均存在多个 DNA 位点甲基化形式的调整,图 3 显示出部分甲基化形式之间的变化。由表 7 可见,DNA 甲基化的调整均以不同甲基化形式之

间的转变为主。对总变异位点的统计发现,随着 GA 处理质量浓度的增加,变异位点数有所减少,变异率有降低趋势(3.6% → 4.5% → 3.1% → 2.7%)。表明火龙果组培苗对低质量浓度的 GA 敏感而对高

表 7 GA 处理对火龙果组培苗 DNA 甲基化模式的影响

Table 7 Effects of GA treatment on DNA methylation pattern of pitaya *in vitro* shoots

| 类型 Type | | 带型变化 Pattern change | | | | 位点数 (比率/%) Number of sites (Ratio) | | | | |
|---|-------------|---------------------|---|-----------------|---|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | | 对照 Control | | 处理 Treatment | | GA 质量浓度/(mg/L) GA concentration | | | | |
| | | H | M | → | H | M | 0 →1.5 | 0 →3.0 | 0 →4.5 | 0 →6.0 |
| | | | | | | | | | | |
| 重新甲基化 Re-methylation | A1 | 1 | 1 | → | 1 | 0 | 1 | 1 | | |
| | A2 | 1 | 1 | → | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | |
| | 小计 Subtotal | | | | | | 1 (12.5) | 3 (30.0) | 2 (28.6) | 2 (33.3) |
| 去甲基化 Demethylation | B1 | 0 | 1 | ← | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | |
| | B2 | 0 | 0 | ← | 1 | 1 | 1 | | | |
| | 小计 Subtotal | | | | | | 2 (25.0) | 3 (30.0) | 1 (14.3) | 1 (16.7) |
| 甲基化形式的改变 Change in methylation pattern | C1 | 0 | 1 | ← | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | |
| | C2 | 0 | 0 | ← | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | |
| | C3 | 0 | 0 | ← | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | C4 | 1 | 0 | ← | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | |
| | C5 | 1 | 0 | ← | 0 | 1 | | 1 | | |
| | 小计 Subtotal | | | | | | 5 (62.5) | 4 (40.0) | 4 (57.1) | 3 (50.0) |
| 总变异位点数(变异率/%) Total variation sites (Ratio) | | | | | | 8(3.6) | 10(4.5) | 7(3.1) | 6(2.7) | |



0~6.0 表示不同处理的 GA 质量浓度,mg/L 0~6.0 indicate different GA concentrations,mg/L.

图 3 不同 GA 质量浓度甲基化检测电泳图

Fig.3 Electrophoresis profile of MASP amplification from *in vitro* shoots of different GA treatment

质量浓度 GA 敏感性降低。

3 讨论

3.1 棱变异现象的分析

在离体培养中,畸变或非正常形态植株的出现是较为普遍的现象,这些变化导致农艺学性状的变化,对农业生产造成不利影响;另一方面,畸变形态

的出现也为作物育种与改良提供了新的材料^[9]。在火龙果组培苗中,变异现象频繁发生,本研究探讨了火龙果组培苗棱变异现象同 DNA 甲基化变化之间的关系,结果显示,不同棱数的茎之间,总体 DNA 甲基化水平无差异,CCGG 位点半甲基化和全甲基化水平也不存在差异,说明火龙果组培苗棱数变化与基因组 DNA 甲基化水平不存在相关性。对条带

图谱的进一步比对发现,不同棱数之间均存在着条带变化,但由于变化的条带仅占很小比例,所以并没有引起总体 DNA 甲基化水平的明显变化。实际上,火龙果组培苗幼茎的棱数变化是非常不稳定的,不论外植体棱数如何,在增殖后,均可以得到其他棱数的茎,这很容易让人想到表观遗传,尤其是 DNA 甲基化。稳定的 DNA 甲基化变异可以在亲子代间遗传^[10],而不稳定的 DNA 甲基化变异可能表现环境依赖性,不能在亲子代间传递。很多时候,一些个体间的 DNA 甲基化差异位点可能是随机发生的,也会随机消失^[11],表现出细胞间的甲基化多样性,而对个体遗传性状并没有实质性影响^[12]。

对火龙果不同棱数茎之间的差异位点统计分析发现,这种差异可能是由于单株间的甲基化多样性引起的;进一步对位点的变化分析发现,位点间的变化表现出一定规律,即这些差异位点与棱数变化相关。本研究中随着茎棱数的增加,DNA 去甲基化位点数在增多,由于去甲基化被认为与基因活化有关^[13],这些位点的基因可能更活跃一些,推测可能茎的棱数越多,生理代谢更旺盛。此外,在组培过程中,也观察到当培养基较硬或培养基开始干涸而营养成分变少时,组培苗也趋向于形成较少的棱数,当培养基较软或含水较多时,组培苗则趋向于形成更多的棱数,甚至玻璃化^[14]。在实际栽培中,火龙果植株几乎全为三棱,但幼芽同样呈现出棱数的变化,显然,幼芽的生命活动相对旺盛,芽顶端分生组织也会分泌较多的植物激素而调节植株的生长。

从目前对离体培养畸变材料的研究来看,大多数畸变出现在具有相对稳定变异的材料,这些变异可能是永久性的,也可能会持续几个世代,例如马蹄莲和非洲菊的丛生现象、油棕榈花的畸变等^[12],这些变异现象被认为与表观遗传相关。其共同点体现在都可以相对稳定遗传多个世代,而且发现,这种变异的出现因不同基因型的组培材料而表现不同,即基因型敏感性;其次,植物激素可以诱导这些现象产生。与火龙果组培苗棱数变异现象最相近的一个例子是,在秋海棠的组培中,叶变异形态的出现,即叶长和宽的变化也是一种不稳定的现象,由畸变叶产生的子代,叶片又趋于正常水平,这被认为与表观遗传有关,而且 2,4-D 可诱导此现象^[12]。可见,激素对这些现象的出现有着不可忽视的影响,结合火龙果组培及栽培条件下的一些现象,可以认为,棱数变异这一不稳定性现象的出现,主要是由于营养条件

导致的,其生理生化变化可能涉及到激素的调节。

3.2 组培苗继代对 DNA 甲基化的影响

作为一种‘true-to-type’的遗传方式,离体培养可以在短期内大量扩增繁殖具有遗传均一性的材料,为农业生产及科学研究奠定良好的基础;另一方面,受多种内外因素的影响,变异又是一种普遍存在的现象。过去的研究已表明,遗传和表观遗传变异可能会随着时间的延长而积累^[15],而 DNA 甲基化变异可能会进一步导致遗传变异^[12],如在长期培养的拟南芥细胞悬浮液中,芽分化能力丧失,检测表明,细胞常染色质发生了超甲基化^[16]。在研究工作中,由于对材料的需求量大,对材料的继代增殖与离体保存成为研究工作的基本操作。所以,有必要对这些材料进行遗传稳定性检测,以确定材料是否发生了变异。对超低温保存的五叶草莓的遗传稳定性分析发现,超低温保存的五叶草莓基因组 DNA 没有发生多态性变化,但 DNA 甲基化水平降低^[17],对培养长达 24 a 的豌豆通过 AFLP 和 MSAP 检测发现,变异率分别达到 11% 和 18%^[12],而对菊花继代培养过程中的 DNA 甲基化变化分析发现,亲子代之间、不同继代次数间均存在不同程度的 DNA 甲基化变异^[18]。可见,培养时间和继代次数对组培材料的遗传稳定性具有不可忽视的影响,而且由于 DNA 甲基化的更加易变性,DNA 甲基化层面的变异更容易被检测到。

本研究利用 MSAP 技术对火龙果组培苗进行了培养时间和继代次数下的 DNA 甲基化检测,结果表明,组培苗基因组 DNA 总甲基化水平均呈现随培养时间延长和继代次数增加而增高的趋势。这与前人的研究结果一致,例如对不同生理年龄毛竹研究发现,其基因组 DNA 甲基化水平随着年龄的增长而增加^[19];而在辐射松胚培养过程中,经过几次继代培养之后,DNA 甲基化水平明显增加,认为 DNA 甲基化水平增加导致胚发生能力的丧失^[20]。

3.3 赤霉素对 DNA 甲基化的影响

赤霉素(GA)属于生物体内的一类四环二萜类化合物,GA 作为植物六大类激素之一,在促进植物种子萌发、茎的伸长、叶片发育以及花和果实的形成等方面具有重要作用^[21]。在离体培养中,不同种类的激素和浓度配比都会对培养材料的生长发育产生影响,进而导致表型的差异^[22]。虽然对激素的研究已取得了深入的进展,但多集中于合成、生理、信号转导等方面,在表观遗传方面了解的还不多,激素

与表观调控的关系并不十分明朗^[23]。

在植物离体培养过程中,无论是在外植体脱分化形成愈伤组织,还是愈伤组织经过器官发生途径或胚状体途径形成再生植株,都是激素协同起作用的结果。在研究胡萝卜体细胞胚发生过程中发现,2,4-D 与细胞 DNA 的甲基化有关:当胡萝卜悬浮培细胞在含高浓度的 2,4-D 培养条件下,DNA 甲基化从 16% 增加到 45%,DNA 甲基化增加,表明对基因表达的抑制作用增大;当除去 2,4-D 并降低细胞密度时,DNA 便处于低甲基化状态,可以激活相应的基因表达^[24]。6-BA 和 GA 等激素在植物离体培养中也广泛使用,同样会引起 DNA 甲基化变化^[25]。本研究中 DNA 甲基化随外源 GA 的施加表现出一定规律的变化,不同质量浓度 GA 处理下内源 GA 质量浓度呈现先升高后降低的趋势,表明,施加外源 GA 会影响火龙果组培苗 DNA 甲基化状态及内源 GA 含量,DNA 甲基化则参与了这一调控过程。其次,不同 DNA 甲基化形式之间可以互相调节,进而维持 DNA 总甲基化水平的相对稳定。随外源 GA 处理浓度增加,DNA 甲基化位点的变异率降低,表明火龙果组培苗对低浓度的 GA 敏感,而对高浓度的 GA 敏感性降低。

虽然 DNA 甲基化形式表现出一定的变化,但具体涉及到哪些位点并不清楚,有待后续的进一步研究。随着对激素调控机制的深入研究,DNA 甲基化参与这一过程的调控作用必将被阐明,可为作物抗性品种的培育和新种质资源的开发、利用提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] HENDERSON I R, JACOBSEN S E. Epigenetic inheritance in plants [J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 418-424.
- [2] BENDER J. DNA methylation and epigenetics [J]. *Annual review of plant biology*, 2004, 55(1): 41-68.
- [3] 谢国芳, 周俊良, 韩秀梅. 火龙果营养研究及开发现状 [J]. *食品工业*, 2013, 34(6): 171-173.
- [4] 高国丽, 张冰雪, 乔光, 等. 火龙果种质资源的耐寒性综合评价 [J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(3): 26-32.
- [5] FAN Q J, YAN F X, QIAO G, et al. Identification of differentially expressed genes potentially implicated in drought response in pitaya (*Hylocereus undatus*) by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray analysis [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 322-331.
- [6] 袁亚芳, 陈明贤, 陈清西, 等. 福建地区火龙果种质资源调查及 ISSR 分析 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(34): 216-220.
- [7] 张冰雪, 范付华. 贵州地方火龙果芽变种质 DNA 指纹图谱及遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *果树学报*, 2013, 30(4): 573-577.
- [8] 陶金, 乔光, 文晓鹏, 等. 火龙果 IRAP 分子标记反应体系的建立与优化 [J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(4): 33-28.
- [9] WANG Q M, WANG L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection [J]. *Plant cell reports*, 2012, 31(9): 1535-1547.
- [10] BOYKO A, BLEVINS T, YAO Y, et al. Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9514.
- [11] ZHAO X, CHAI Y, LIU B. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids [J]. *Plant science*, 2007, 172(5): 930-938.
- [12] SMULDERS M, KLERK G. Epigenetics in plant tissue culture [J]. *Plant growth regulation*, 2011, 63(2): 137-146.
- [13] GOLDBERG A D, ALLIS C D, BERNATEIN E. Epigenetics: a landscape takes shape [J]. *Cell*, 2007, 128(4): 635-638.
- [14] 毕云, 苏艳, 张艺萍, 等. 蓝莓组织培养过程中玻璃化现象的防止技术研究 [J]. *西南农业学报*, 2014, 27(6): 2539-2541.
- [15] GYANA R, ANATH B. *Molecular stress physiology of plants* [M]. New Delhi: Springer India, 2013: 427-440.
- [16] TANURDZIC M, VAUGHN M W, JIANG H, et al. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture [J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(12): 2880-2895.
- [17] 朱文涛, 周厚成, 王子成. 五叶草莓超低温保存及遗传稳定性分析 [J]. *果树学报*, 2013, 30(1): 55-61.
- [18] 聂丽娟, 王子成, 何艳霞. 菊花组织培养继代过程中的 DNA 甲基化变化 [J]. *园艺学报*, 2008, 35(11): 1689-1694.
- [19] 郭广平, 顾小平, 袁金玲, 等. 不同生理年龄毛竹 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. *遗传*, 2011, 33(7): 794-800.
- [20] FRAGA M F, RODRIGUEZ R, CANAL M J. Genomic DNA methylation demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata* [J]. *Tree physiology*, 2002, 22(11): 813-816.
- [21] 李保珠, 赵翔, 安国勇. 赤霉素的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(1): 1-5.
- [22] JAGESH K T, CHANDEL P, GUPTA S, et al. Analysis of genetic stability of in vitro propagated potato microtubers using DNA markers [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2013, 19(4): 587-595.
- [23] ZHU Y X. The epigenetic involvement in plant hormone signaling [J]. *Chinese science bulletin*, 2010, 55(21): 2198-2203.
- [24] LOSCHIAVO F, PITTO L, GIULILANO G. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs [J]. *Theor Appl Genet*, 1989, 77(3): 325-331.
- [25] VLASOVA T, DEMIDENKO Z N, KIRNOS M D. *In vitro* DNA methylation by wheat nuclear cytosine DNA methyltransferase: effect of phytohormones [J]. *Gene*, 1995, 157(1): 279-281.

DNA methylation variation of *in vitro* pitaya shoots and its response to exogenous GA application

LIU Pengfei QIAO Guang WEN Xiaopeng

Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region, Guizhou University/Ministry of Education, Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract Based on MSAP system, we investigated the potential relationship between genomic DNA methylation variation and arris variation of *in vitro* pitaya (*Hylocereus undatus* ‘Zihonglong’) shoots. DNA methylation levels and patterns were detected under different subculture duration and cycles using MSAP marker. Also, the relationship between exogenous GA concentration (0, 1.5, 3.0, 4.5, and 6.0 mg/L), endogenous GA content and DNA methylation variation were illustrated. The results showed that no significant correlation was observed between arris and DNA methylation variation. DNA methylation levels of *in vitro* shoots increased along with the elongation of culture time and subculture cycles. The ratio of semi-methylation in external cytosine were firstly reduced, followed by an increase, which was somewhat consistent with variation of endogenous GA contents (406.7, 424.3, 440.6, 398.6 and 409.1 pg/mL). Ratio of full methylation in internal cytosine of CCGG sites demonstrated a negative correlation with the change of ratio in external cytosine, indicating that, exogenous GA might considerably influence the accumulation of endogenous GA. Furthermore, different forms of methylation patterns might be converted to each other, and thus remained the stability of total DNA methylation level. Along with the increase of the exogenous GA concentrations, the mutation rate of DNA methylation decreased (3.6% → 4.5% → 3.1% → 2.7%), which revealed that, DNA methylation variation of pitaya was more sensitive to low GA concentration.

Keywords pitaya; *in vitro* shoots; DNA methylation; GA; MSAP

(责任编辑:张志钰)