

马哈利樱桃矮化砧的 DNA 甲基化水平及模式分析

李向男, 蔡宇良*

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨陵 712100)

摘要: 该研究利用 MSAP 技术, 对 25 株矮化马哈利樱桃和 25 株半矮化马哈利樱桃进行甲基化水平和模式分析, 以探讨其矮化的表现性状与其基因组甲基化修饰的关系。结果表明: (1) 从 64 对引物中筛选出 15 对引物, 在半矮化组中共扩增 4 577 个条带, 其中半甲基化 336 个, 全甲基化 1 274 个; 在矮化组中共扩增 4 444 个条带, 其中半甲基化 349 个, 全甲基化 1 383 个; *t* 检验和方差分析表明, 矮化组与半矮化组在总甲基化水平和全甲基化水平上差异极显著, 在半甲基化水平上差异显著, 矮化组甲基化水平高于半矮化组。(2) 半矮化组单态性位点 23 个, 多态性位点 136 个; 矮化组单态性位点 17 个, 多态性位点 142 个, 表明矮化组多态性高于半矮化组。(3) 多态性类型分析表明, 矮化组出现 A4 类型的频率较半矮化组高, A2 类型的频率较半矮化组低, 即矮化组中发生超甲基化的位点多于半矮化组, 且“马哈利”基因组甲基化多态性位点主要发生在双链内侧甲基化位点以及超甲基化位点上。研究认为, 马哈利樱桃矮化和半矮化的基因组甲基化水平及模式存在差异, 马哈利砧木的矮化性状与其基因组甲基化修饰有关。

关键词: 马哈利樱桃; DNA 甲基化; MSAP; 矮化砧木

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Analysis of DNA Methylation Levels and Patterns in Dwarf Rootstock of *Prunus mahaleb*

LI Xiangnan, CAI Yuliang*

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: We analyzed the levels and patterns of DNA methylation in 25 dwarf rootstocks and 25 semi-dwarf rootstocks of *Prunus mahaleb* by methylation-sensitive amplification polymorphism marker (MSAP), in order to explore the correlation between dwarf characteristic and genome methylation modification. The results showed that: (1) 15 pairs were selected from 64 pairs of the MSAP primers. Methylation loci of 25 semi-dwarf rootstocks of *P. mahaleb* were 4 577, hemi-methylation loci were 336, and full methylation loci were 1 274. The total methylation loci of 25 dwarf rootstocks of *P. mahaleb* were 4 444, hemi-methylation loci were 349, and full methylation loci were 1 383. T-test and one-way ANOVA showed that the level of full methylation and total methylation in semi-dwarf group were extremely significantly different than that in dwarf group, and the level of hemi-methylation was significantly different between the two groups. Meanwhile, the level of methylation in dwarf group was higher than that in semi-dwarf group. (2) The singleton loci were 23 and polymorphic loci were 136 in semi-dwarf group. The singleton loci were 17 and polymorphic loci were 142 in dwarf group. So it was concluded that the methylation poly-

收稿日期: 2017-02-24; 修改稿收到日期: 2017-05-05

基金项目: 国家重点研发专项(2016YFE0130900); 陕西省科技统筹项目(2015KTTSNY02-01)

作者简介: 李向男(1992-), 女, 在读硕士, 研究生, 主要从事樱桃育种及栽培研究。E-mail: 853707043@qq.com

* 通信作者: 蔡宇良, 教授, 博导, 主要从事果树育种与分子生物学研究。E-mail: cylxlcz0673@sina.com

morphism in dwarf group was higher than that in semi-dwarf group. (3) Further analysis of the types of polymorphism showed that the frequency of A4 type was higher in dwarf group than that in semi-dwarf group, and the frequency of A2 type was lower in dwarf group than that in semi-dwarf group, indicating that the locus of hypermethylation in dwarf group was higher than that in semi-dwarf group. The research indicated the correlation between dwarf characteristic of *P. mahaleb* and genome methylation modification from the differences in DNA methylation levels and patterns between dwarf group and semi-dwarf group. The results might provide theoretical support for further breeding of cherry dwarf rootstock.

Key words: *Prunus mahaleb*; DNA methylation; MSAP; dwarf rootstock

DNA 甲基化是一种表观遗传现象,是高等植物普遍存在的一种 DNA 共价修饰方式^[1-2],甲基化并不改变 DNA 的碱基排列顺序,但是可以抑制遗传信息的传递,从而引起表观性状的变化^[3],它可以遗传,也可以通过去甲基化酶等作用发生去甲基化逆转^[4]。DNA 甲基化的状态对染色体结构、转座子活性以及基因的表达调控等至关重要,甲基化状态的改变可以造成某些基因功能的丧失或发生亚功能化^[5],Miura 等^[6]研究发现 DNA 甲基化水平降低可以导致具亚稳态矮化表型的水稻向正常表型转变,林如涛等^[7]研究发现,从江香猪血液和肝脏基因组的总甲基化程度随体重的增加而下降,刘琼瑶等^[8]发现矮生观赏杉木中参与 MAPK 级联途径的蛋白磷酸酶 IBR5 基因启动子区域的甲基化水平上升,这些研究均表明甲基化与生物体的矮化有关。

目前植物 DNA 甲基化的研究方法很多,如 HPLC、RRBS、MSAP、COBRA、和 RLGS 等^[9],而 MSAP 技术不需要知道被测 DNA 的序列信息,在不同生物上具有通用性,并且 MSAP 技术可以检测植物不同品系的 DNA 甲基化差异,因此,本研究采用此方法对矮化组和半矮化组马哈利樱桃进行甲基化检测。MSAP 是以 AFLP 为基础进行酶切位点的甲基化分析^[10],分别用 *EcoR* I / *Hap* II 和 *EcoR* I / *Msp* I 两组内切酶酶切基因组 DNA,检测其甲基化修饰水平。

西北农林科技大学于 1991 年从匈牙利引进‘马哈利’樱桃,历经 10 年从中选出矮化紧凑的优系,培育出了半矮化、高抗根癌病、抗寒、耐盐碱的‘马哈利’CDR-1,在中国的西北地区种植推广^[11]。对‘马哈利’的现有研究,多集中在砧穗互作^[12-13]、生长动态^[14-15]、激素处理^[16]等生理研究方面,生理研究表明植株在一定条件下可实现早果,但不能解决植株矮化的问题。Masoud^[17]用 SRAP 分子标记、Pedro^[18]用 RAPD 分子标记等研究均发现‘马哈利’种群内基因多态性丰富,但‘马哈利’的变异及其多样性,在砧木繁育中,还没有充分利用^[19]。

本研究,通过从‘马哈利’CDR-1 自然状态下自交后代中选择较矮化的植株,并与‘马哈利’CDR-1 作对比,借助 MSAP 技术检测它们的甲基化多态性,分析它们的甲基化水平和模式,进而推测其矮化的表观性状与其基因组甲基化修饰的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

所用‘马哈利’砧木均来自于西北农林科技大学樱桃试验站岐山苗圃。2014 年 12 月,在‘马哈利’1 年生砧木(种子为‘马哈利’CDR-1 的自然授粉种)落叶后,按照节间密度较密、主干顶部直径与基部直径比约 1 : 2、分叉较少或几乎不分叉、植株高度较矮等条件,筛选一批矮化砧木,经 2015 年和 2016 年再次选择确定矮化特征后,对矮化趋势明显的 25 棵植株,采集叶片,记为矮化组,同时选择‘马哈利’CDR-1 普通高度植株 25 株,采集叶片,记为半矮化组。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法提取 DNA^[20],粗提的 DNA 溶于 ddH₂O 后,加 2 μL RNA 酶(10 mg/mL)去除 RNA,纯化后的 DNA 于 -20 °C 冰箱中保存备用。DNA 样品浓度和质量用 NanoDrop 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 MSAP 分析 MSAP 分析程序使用 Xiong 等^[21]的方法并适当调改,接头及引物参照 Evangelia 等^[22],分别用 *EcoR* I / *Hap* II 和 *EcoR* I / *Msp* I 内切酶组合对每个 DNA 样品进行双酶切,在酶切片断的两端,分别加上与 *EcoR* I 和 *Hap* II / *Msp* I 酶切位点互补的人工接头(表 1)。酶切反应体系:500 ng 模板 DNA,15 U *EcoR* I,12 U *Hap* II (或 *Msp* I),2.5 μL 10 × Buffer,2.5 μL BSA,补水到 25 μL,反应混合液于 37 °C 酶切 6 h,80 °C 灭活 15 min。连接反应体系:取酶切产物 20 μL,再加 *EcoR* I 接头(10 pmol)和 *Hap* II / *Msp* I 接头(50 pmol)各 1.5 μL,1 μL T4 连接酶,3 μL 10 × T4 Buffer,补水到 30 μL,反应混合液于 16 °C 连接 16 h,80 °C 灭活

表 1 接头及引物序列

Table 1 The sequences of adapters and primers

项目 Item	引物序列 Primer sequence(5'→3')	
	<i>EcoR</i> I	<i>Hap</i> II / <i>Msp</i> I
接头 Adapters	CTCGTAGACTGCGTACC GACGATGAGTCTCGAT	AATTGGTACGCAGTC CGATCGAGACTCAT
预扩引物 Preselective primers	GACTGCGTACCAATTC A	ATGAGTCTCGATCGG
选择性引物 Selective primers	GACTGCGTACCAATTC AAC(E1)	ATGAGTCTCGATCGGTCA(H/M1)
	GACTGCGTACCAATTC AAG(E2)	ATGAGTCTCGATCGGTCT(H/M2)
	GACTGCGTACCAATTC ACC(E3)	ATGAGTCTCGATCGGTTA(H/M3)
	GACTGCGTACCAATTC ATC(E4)	ATGAGTCTCGATCGGTTC(H/M4)
	GACTGCGTACCAATTC AGA(E5)	ATGAGTCTCGATCGGTTG(H/M5)
	GACTGCGTACCAATTC AGG(E6)	ATGAGTCTCGATCGGTGC(H/M6)
	GACTGCGTACCAATTC ATG(E7)	ATGAGTCTCGATCGGTGA(H/M7)
	GACTGCGTACCAATTC ACG(E8)	ATGAGTCTCGATCGGATC(H/M8)

15 min。预扩增反应体系:连接产物 3 μ L, *EcoR* I 引物(10 pmol)和 *Hap* II / *Msp* I 引物(30 pmol)各 1 μ L, 1 μ L *Taq* DNA 聚合酶, 2 μ L dNTPs, 2 μ L 10 \times Buffer, 补水到 20 μ L, PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 预扩产物稀释 10 倍用于后续反应。选择性扩增体系: 3 μ L 稀释后预扩产物, *EcoR* I 引物和 *Hap* II / *Msp* I 引物各 1 μ L, 0.4 μ L *Taq* DNA 聚合酶, 2 μ L dNTPs, 2 μ L 10 \times Buffer, 补水到 20 μ L, PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s(每循环温度减 0.7 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 80 s, 12 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 28 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8 min。

1.2.3 MSAP 条带统计及数据分析 从 64 对引物中筛选条带清晰、重复性及特异性良好的引物对进行扩增, 产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 参照 Schulz^[23], 将扩增出的条带分为 3 种, 第一种为半甲基化型, 记为(+ -), 即 *EcoR* I + *Hap* II 酶切后扩增有带, 而 *EcoR* I + *Msp* I 酶切后扩增无带, 指 5'-mCCGG-3' 位点为外侧胞嘧啶(单链)甲基化; 第二种为全甲基化型, 记为(- +), 即 *EcoR* I + *Msp* I 酶切后扩增有带, 而 *EcoR* I + *Hap* II 酶切后扩增无带, 指 5'-CmCCGG-3' 位点为内侧胞嘧啶(双链)甲基化; 第三种为非甲基化位点或内侧胞嘧啶单链甲基化, 记为(++), 即 *EcoR* I + *Msp* I 和 *EcoR* I + *Hap* II 酶切后扩增都有带。2 个泳道内都没有扩增条带的情况较复杂, 有 3 种可能性: 其一是不存在“CCGG”位点; 其二是“CCGG”位点外侧胞嘧啶全甲基化; 其三是内侧和外侧胞嘧啶同时甲基化。

这种复杂情况不计入甲基化水平统计范围, 只是在甲基化多态性类型分析时予以考虑, 且把 3 种可能性统称为超甲基化。参照 Conchita^[24], 统计条带范围为 150~500 bp, 计算甲基化频率, 并对统计结果利用 SPSS 进行 *t* 测验和单因素方差分析做差异性显著检验。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取及 MSAP 电泳结果

NanoDrop 检测结果表明 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值大部分都在 1.8~2.0 之间, 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 1)显示, DNA 带整齐清晰, 无明显拖尾, 无 RNA 污染, 说明 DNA 提取质量较好, 纯度能够符合充分酶切的实验要求。调试优化后的 MSAP 体系预扩增产物条带在 100~1 000 bp 间均匀分布, 扩增效果较好(图 2)。从 64 对引物组合中筛选出 15 对引物, 所扩增出的 MSAP 条带清晰、多态性丰富、稳定性好(图 3、图 4)。

2.2 DNA 甲基化水平分析与比较

2.2.1 DNA 甲基化水平分析 15 对引物在 25 株矮化‘马哈利’砧木及 25 株半矮化‘马哈利’砧木扩增



图 1 DNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of DNA

条带统计结果(表 2)为:共检测到位点 9 021 个,平均每株个体检测到 180 个位点;半甲基化位点 685 个,平均每株个体检测到 14 个位点,半甲基化率 7.59%;全甲基化位点 2 657 个,平均每株个体检测到 53 个位点,全甲基化率 29.45%。由此说明‘马哈利’砧木基因组“CCGG”位点双链内侧甲基化水平比单链外侧甲基化水平高,其基因组“CCGG”位点甲基化的主要方式为双链内侧的全甲基化。

2.2.2 DNA 甲基化水平差异分析 由表 2 可知,矮化组共检测到 4 444 个位点,半甲基化位点 349 个,全甲基化位点 1 383 个,半甲基化率 7.85%,全甲基化率 31.12%;半矮化组共检测到 4 577 个位点,半甲基化位点 336 个,全甲基化位点 1 274 个,半甲基化率 7.33%,全甲基化率 27.83%。 t 测验结果表明,矮化组与半矮化组在全甲基化水平和总甲基化水平上差异极显著,在半甲基化水平上差异达到显

著水平。故矮化的‘马哈利’基因组的甲基化水平相比半矮化‘马哈利’高,尤其在全甲基化水平和总甲基化水平上变异率高。

为了进一步明确区分组内差异和组间差异,在 t 测验的基础上,又进一步做了单因素方差分析,分析结果(表 3)表明,在全甲基化水平上, F 测验和 t 测验结果一致,均差异极显著,组间均方 135.3,组内

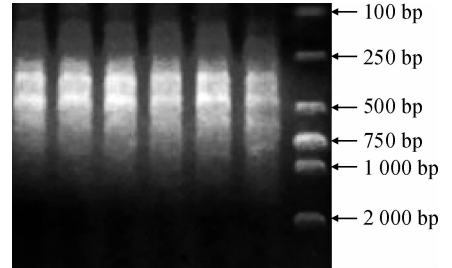
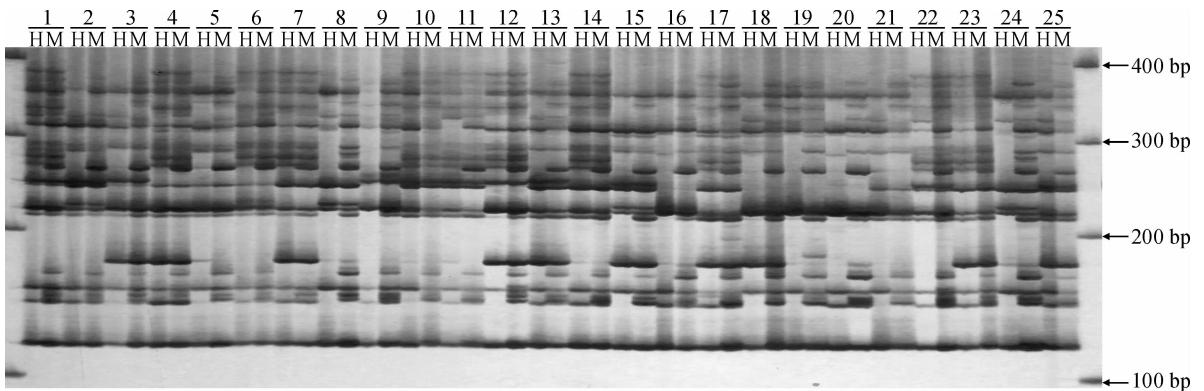


图 2 预扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of preselective amplification



1~25. 25 株个体的编号;H. *EcoR* I / *Hap* II 双酶切;M. *EcoR* I / *Msp* I 双酶切;下同

图 3 引物对 E2 和 H/M1 在‘马哈利’矮化组 25 株个体中的 MSAP 扩增图谱

1~25. the code of 25 individuals;H. *EcoR* I / *Hap* II double digestion;M. *EcoR* I / *Msp* I double digestion;the same as below

Fig. 3 MSAP fingerprints of the primer combination (E2 and H/M1) on 25 individuals of dwarf group of *P. mahaleb*

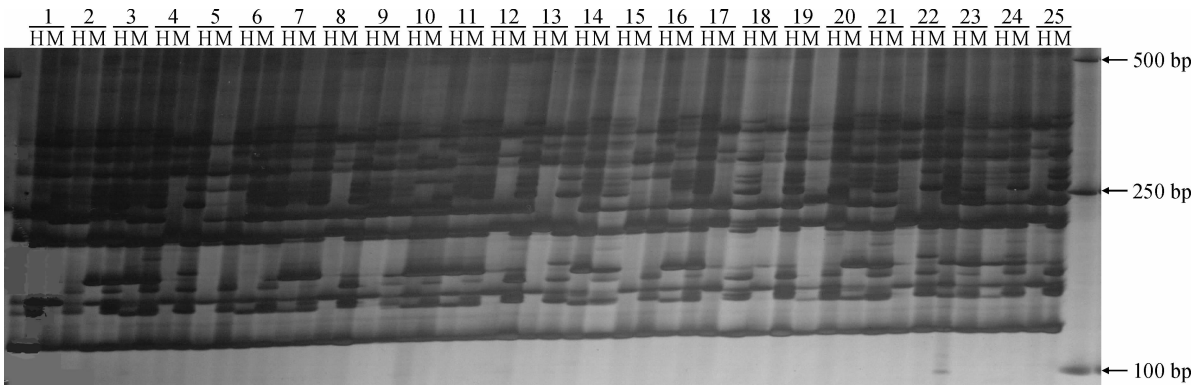


图 4 引物对 E2 和 H/M1 在‘马哈利’半矮化组 25 株个体中的 MSAP 扩增图谱

Fig. 4 MSAP fingerprints of the primer combination (E2 and H/M1) on 25 individuals of semi-dwarf group of *P. mahaleb*

表 2 矮化组与半矮化组‘马哈利’的甲基化水平及 *t* 测验比较

Table 2 The levels of methylation and comparison based on *t* test between on dwarf and hemi-dwarf groups

材料 Material	总带数 Total	半甲基化 Hemi-methylation		全甲基化 Full methylation		总甲基化 Total methylation	
		条带数 Bands	频率 Frequency/%	条带数 Bands	频率 Frequency/%	条带数 Bands	频率 Frequency/%
矮化组 Dwarf group	4 444	349	7.85±0.84 ^a	1 383	31.12±0.74 ^A	1 735	38.97±1.19 ^A
半矮化组 Semi-dwarf group	4 577	336	7.33±0.71 ^b	1 274	27.83±0.62 ^B	1 610	35.16±1.09 ^B
总计 Total	9 021	685	7.59	2 657	29.45	3 345	37.08

注:同列数据肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)

Note: In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letters superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$)

表 3 矮化组与半矮化组‘马哈利’砧木的甲基化水平的 *F* 测验结果

Table 3 *F* test results on dwarf and hemi-dwarf groups for the methylation levels

项目 Item		平方和 Quadratic sum	<i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i>	显著性 Significance
半甲基化率 Hemi-methylation-frequency/%	组间 Between groups	3.309	1	3.309	5.495	0.023
	组内 Among group	28.901	48	0.602		
全甲基化率 Full methylation frequency/%	组间 Between groups	135.307	1	135.307	292.957	0.000
	组内 Among group	22.170	48	0.462		
总甲基化率 Total-methylation/%	组间 Between groups	180.934	1	180.934	138.848	0.000
	组内 Among group	62.549	48	1.303		

均方 0.46,证明差异显著性主要来自组间;在总甲基化水平上,*F* 测验和 *t* 测验结果一致,均差异极显著,组间均方 180.9,组内均方 1.3,表明差异显著性主要来自组间;在半甲基化水平上,*F* 测验和 *t* 测验结果一致,均差异显著,组间均方 3.3,组内均方 0.6,表明差异显著性主要来自组间。研究表明,矮化组与半矮化组‘马哈利’基因组的甲基化水平的确存在显著差异,且矮化组甲基化水平高于半矮化组。

2.3 DNA 甲基化模式及多态性分析与比较

2.3.1 DNA 甲基化模式及多态性分析 同一位点在不同个体基因组中甲基化模式可分为两大类,单态性和多态性。单态性是指“CCGG”位点的甲基化模式在不同个体中保持一致,多态性是指“CCGG”位点的甲基化模式在不同个体植株中表现不同。‘马哈利’矮化组和半矮化组甲基化类型统计结果(表 4)显示,半矮化组单态性位点 23 个,多态性位点 136 个,多态性位点占扩增总位点的 85.53%;矮化组单态性位点 17 个,多态性位点 142 个,多态性位点占扩增总位点的 89.31%。表明在 MSAP 所能检测到的有效位点范围内,多态性位点远多于单态性位点,且矮化组多态性高于半矮化组。

矮化组和半矮化组的多态性类型又可细分为 7 种类型(表 5、图 5),其中多态性类型 A3(+ +、- -)、A4(+ +、- +、- -)、C1(- +、- -)出现频率

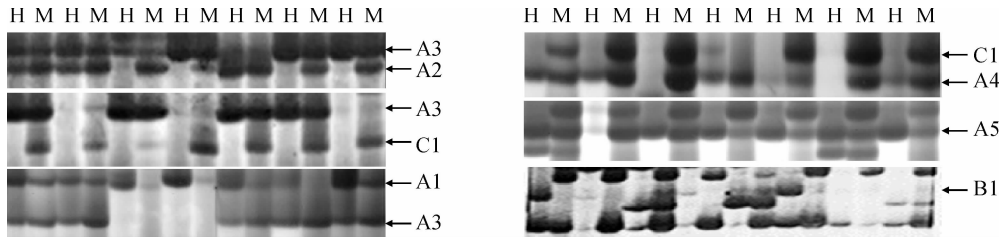
表 4 ‘马哈利’基因组甲基化类型统计

Table 4 The statistics of genome methylation types on *P. mahaleb*

类型 Type	矮化组 Dwarf group		半矮化组 Semi-dwarf group	
	位点数 Sites	类型比 Type frequency/%	位点数 Sites	类型比 Type frequency/%
单态性 Monomorphism	17	10.69	23	14.47
多态性 Polymorphism	142	89.31	136	85.53

较高,A3 类型表明同一“CCGG”位点在矮化组和半矮化组的 25 株个体中出现了非甲基化或超甲基化 2 种修饰类型,A4 类型表明同一“CCGG”位点在矮化组和半矮化组的 25 株个体中出现了非甲基化或双链内侧甲基化或超甲基化 3 种修饰类型,C1 类型表明同一“CCGG”位点在矮化组和半矮化组的 25 株个体中仅出现了单链外侧甲基化修饰类型,由此可知,‘马哈利’基因组甲基化多态性位点主要发生在双链内侧甲基化位点以及超甲基化位点上。

2.3.2 DNA 甲基化多态性类型比较分析 通过对‘马哈利’矮化砧木矮化组和半矮化组进行基因组甲基化多态性类型比较分析,发现甲基化多态性类型 A1、A3、A5、B1 和 C1 之间没有显著差异,其甲基化多态性类型差异主要是 A2 和 A4(表 5)。矮化组 A4



H 和 M 同图 3; A1~C1. 同表 5

图 5 DNA 甲基化多态性类型

H and M the same as Fig. 3; A1~C1. the same as Table 5

Fig. 5 Types of DNA methylation polymorphism

表 5 甲基化多态性类型统计

Table 5 The statistics of methylation polymorphism types

类型 Type	带型 Band type	矮化组 Dwarf group		半矮化组 Semi-dwarf group	
		位点数 Sites	类型比 Type frequency/%	位点数 Sites	类型比 Type frequency/%
A1	++、+-、--	4	2.82	4	2.94
A2	++、-+	12	8.82	18	13.04
A3	++、--	39	27.46	40	29.41
A4	++、-+、--	36	25.35	27	19.85
A5	++、+-、-+	3	2.11	2	1.47
B1	+-、--	6	4.25	7	5.15
C1	-+、--	42	29.58	40	29.41

注: +, 有条带; -, 无条带; ++, *EcoR* I + *Hap* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 两组双酶切都有带; --, *EcoR* I + *Hap* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 两组双酶切都没有带; +-, *EcoR* I + *Hap* II 双酶切有带, *EcoR* I + *Msp* I 双酶切无带; -+, *EcoR* I + *Hap* II 双酶切无带, *EcoR* I + *Msp* I 双酶切有带; A1~C1. 矮化组和半矮化组的 25 株个体的同一“CCGG”位点被 *EcoR* I + *Hap* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 两组双酶切后出现的带型

Note: +, band present; -, band absent; ++, band present between *EcoR* I + *Hap* II and *EcoR* I + *Msp* I; --, band absent between *EcoR* I + *Hap* II and *EcoR* I + *Msp* I; +-, band present in *EcoR* I + *Hap* II and band absent in *EcoR* I + *Msp* I; -+, band absent in *EcoR* I + *Hap* II and band present in *EcoR* I + *Msp* I; A1~C1. The band types of the same “CCGG” by digestion between *EcoR* I + *Hap* II and *EcoR* I + *Msp* I in 25 individuals of dwarf group and semi-dwarf group

类型的频率较半矮化组高, A2 类型的频率较半矮化组低, 故矮化组和半矮化组的甲基化修饰主要差异在 A2、A4 类型对应的位点上, 说明矮化组中发生超甲基化的位点多于半矮化组。对‘马哈利’矮化砧木进行基因组甲基化水平及模式的分析表明, 马哈利砧木的矮化性状与其甲基化修饰有关。

3 讨论

高等植物基因组中, 大约 20%~50% 的胞嘧啶处于甲基化状态, 这是植物维持正常的生长发育所必需的^[25-27], Evangelia 等^[28] 研究发现野生甜樱桃的总甲基化水平在 37.05%~59.39%, 本研究中‘马哈利’基因组 DNA 甲基化比例为 35.16%~38.97%, 与前人结果基本吻合。由于在植物基因组中 CAG、CTG^[29] 和 CCG^[30] 位点也经常发生甲基化, 但 MSAP 方法只能检测 CG 和部分 CCG 的甲基化情况, 因而整个基因组中胞嘧啶的实际甲基化

率可能高于本试验结果。脐橙^[31] 和芥蓝^[32] 中“CCGG”序列甲基化模式以半甲基化为主, 橡胶树^[33]、枇杷^[34]、辣椒^[35]、银杏^[36] 基因组中甲基化的模式主要是以全甲基化为主, 而本研究中 50 份‘马哈利’个体基因组双链内侧全甲基化率都大于单链外侧半甲基化率, 这可能与物种有关, 还有待进一步研究。

在拟南芥^[37] 等植物的甲基化研究中, 发现甲基化变异存在位点特异性, 说明不同品种间具有明显多态性, 本研究发现‘马哈利’CDR-1 自然杂交种不同个体间也存在多态性位点, 且多态性变异的比例明显高于单态性变异, 这与李际红等^[38] 发现叶籽银杏与银杏间甲基化模式存在丰富变异的研究结果一致, 与 Masoud^[17] 用 SRAP 分子标记、Pedro^[18] 用 RAPD 分子标记等研究发现的‘马哈利’种群内基因多态性丰富一致, 说明‘马哈利’群体不仅基因组存在多样性, 且甲基化修饰方式也存在多样性。Evangelia^[28] 对 5 个自然种群的野生甜樱桃的研究

发现,基因组的多样性和表观遗传的多样性不存在相关性,表观遗传变异独立于基因组变异,进而预测表观遗传变异在物种适应环境过程中存在巨大潜能,Clicia^[39]研究表明在应对不同环境压力时,表观遗传会发生丰富变异来更好调控基因表达,适应环境,本研究的‘马哈利’引自匈牙利,故可能在适应本地区的环境过程中发生丰富的表观遗传变异。

基因甲基化模式的改变和甲基化水平的高低都可能影响植株的形态,使植物生长发育形态变得异常^[40]。众多关于甲基化的研究认为,基因组中启动子和编码区的甲基化,能阻碍转录因子复合体与DNA的结合,从而抑制基因的表达,而去甲基化则有利于基因的表达^[41],在对甲基化条带进行回收测序试验中,得到了与转录因子、蛋白激酶等相关的DNA序列^[8,42],这些序列可能参与调控与矮化性状相关基因的表达。

该研究发现矮化组与半矮化组基因组DNA甲基化的主要差异类型是A2、A4,刘琼瑶等^[8]研究发

现矮生观赏杉叶片DNA超甲基化位点多于野生型,并进一步预测IBR5基因启动子序列的甲基化可能与矮化性状相关,故推测马哈利砧木的矮化性可能与其基因组超甲基化有关,且相关超甲基化序列可能集中在矮化组的A4类型所独有的(—)带型所对应的序列位点上,这些特异的超甲基化位点可能位于启动子附近,抑制基因表达,致使植株表现矮化性状,如已发现的PcAHS基因^[43]、IBR5基因^[8]启动子甲基化导致相关基因失活,进而产生矮化性状,进一步的验证还需要对差异片段进行回收测序。另外,根据田间观察,矮化组中存在节间距较密、叶片较密较小、叶形偏尖椭圆等,矮化性状特别突出的个体,且其在MSAP扩增中较半矮化植株存在更多超甲基化位点,也可从这几株特定个体入手,结合矮化组所独有的A4类型中的超甲基化位点,对其差异带进行回收测序,进而从基因注释中寻求甲基化与矮化性状的调控机制,为矮化植株的选育提供分子水平上的理论依据。

参考文献:

- [1] FINNEGAN E J, PEACOCK W J, *et al.* DNA methylation, a key regulation of plant development and other processes[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2000, **10**(2): 217-223.
- [2] VAUGHN M W, TANURDŽIĆ M, LIPPMAN Z, *et al.* Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Biology*, 2007, **5**(7): 174-179.
- [3] HOLLIDAY R. The inheritance of epigenetic defects [J]. *Science*, 1987, **238**(4 824): 163-170.
- [4] HENIKOFF S, MATZKE M A. Exploring and explaining of epigenetic effects[J]. *Trends in Genetics*, 1997, **13**(8): 293-295.
- [5] RAPP R A, WENDEL J F. Epigenetics and plant evolution [J]. *New Phytologist*, 2005, **168**(1): 81-91.
- [6] MIURA K, AGETSUMAA M, KITANO H, *et al.* A meta-stable DWARF1 epigenetic mutant affecting plant stature in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, **106**(27): 11 218-11 223.
- [7] 林如涛,冉雪琴,王嘉福. 从江香猪基因组甲基化修饰与体重之间的相关性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, **42**(4): 973-979.
LIN R T, RAN X Q, WANG J F. Relationship between genomic DNA methylation and body weight of Congjiang Xiang pig[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, **42**(4): 973-979.
- [8] 刘琼瑶,黄华宏,等. 矮生观赏杉木DNA甲基化的水平与模式分析[J]. *园艺学报*, 2015, **42**(10): 2 015-2 022.
LIU Q Y, HUANG H H, *et al.* Analysis of DNA methylation levels and patterns in dwarf ornamental *Cunninghamia lanceolata* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, **42**(10): 2 015-2 022.
- [9] 李娜,张晔,等. 植物DNA甲基化研究进展[J]. *植物生理学通讯*, 2012, **48**(11): 1 027-1 036.
- [10] LI N, ZHANG Y, *et al.* Research progress in DNA methylation in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, **48**(11): 1 027-1 036.
- [11] XU M L, LI X Q, KORBAN S S. AFLP-based detection of DNA methylation [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, **18**(4): 361-368.
- [12] 蔡宇良,冯瑛,张雪,等. 樱桃新砧木-马哈利‘CDR-1’的选育[J]. *果树学报*, 2013, **30**(1): 177-178.
CAI Y L, FENG Y, ZHANG X, *et al.* A new cherry dwarf rootstock variety-Mahaleb ‘CDR-1’ [J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, **30**(1): 177-178.
- [13] WEBSTER A D. Strategies for controlling the tree size of sweet cherry trees [J]. *Acta Horticulturae*, 1998, (468): 229-240.
- [14] GONCALVES B, CORREIA C M, SILVA A P, *et al.* Variation in xylem structure and function in roots and stems of scion-rootstock combinations of sweet cherry tree (*Prunus avium* L.) [J]. *Trees*, 2007, **21**(2): 121-130.
- [15] BARYLA P. The estimation of the growth and the branching of the six stocks under the cherry and the sweet cherry trees [J]. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 2005, **4**(1): 119-129.
- [16] GHAYYAD M. Effect of endocarp removal, gibberellin, stratification and sulfuric acid on germination of mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) seeds [J]. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 2010, **49**(1): 27-33.
- [17] SZABÓ V, MAGYAR L, MÁNDY A, *et al.* Germination of *Prunus mahaleb* L. seeds by gibberellic acid (GA) treatments in different seed age [J]. *European Journal of Horticultural*

- Science*,2010,**77**(5):199-203.
- [17] ABEDIAN M,TALEBI M,*et al.* Genetic diversity and population structure of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.) and sweet cherry (*Prunus avium* L.) using SRAP markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*,2012,**40**(40):112-117.
- [18] PEDRO J,JOSÉ A G. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae),an animal-dispersed tree[J]. *Molecular Ecology*,2000,**9**(9):1 293-1 305.
- [19] KOC A,BILGENER S. Morphological characterization of cherry rootstockcandidates selected from Samsun Province in Turkey[J]. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*,2013,**25**(1):57-70.
- [20] 程运江,伊华林,等. 几种木本果树 DNA 的有效提取[J]. 华中农业大学学报,2001,**20**(5):481-483.
CHENG Y J,YI H L,*et al.* An efficient method for genomic DNA extraction from woody fruit plants[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*,2001,**20**(5):481-483.
- [21] XIONG L Z,XU C G,*et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation sensitive amplification polymorphism technique[J]. *Molecular Genetics and Genomics*,1999,**261**(3):439-446.
- [22] AVRAMIDOU E V,GANOPOULOS I V,DOULIS A G,*et al.* Beyond population genetics: natural epigenetic variation in wild cherry (*Prunus avium*) [J]. *Tree Genetics and Genomes*,2015,**11**(5):95-99.
- [23] SCHULZ B,ECKSTEIN R L,DURKA W. Scoring and analysis of methylation sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies [J]. *Molecular Ecology Resources*,2013,**13**(4):642-653.
- [24] CONCHITA A,RICARDO P,PILAR B,*et al.* MSAP markers and global cytosine methylation in plants;a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species[J]. *Molecular Ecology Resources*,2016,**16**(1):80-90.
- [25] CHAN S W,HENDERSON I R,JACOBSEN S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature Reviews Genetics*,2005,**6**(5):351-360.
- [26] ZHANG X,YAZAK J,SUNDARESAN A,*et al.* Genome wide high resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* [J]. *Cell*,2006,**126**(6):1 189-1 201.
- [27] ZILBERMAN D,GEHRING M,TRAN R K,*et al.* Genome wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription[J]. *Nature Genetics*,2007,**39**(5):61-69.
- [28] EVANGELLIA V,AVRAMIDOU I V,*et al.* Beyond population genetics: natural epigenetic variation in wild cherry (*Prunus avium*) [J]. *Tree Genetics and Genomes*,2015,**11**(5):1-9.
- [29] VOS P,HOGERS R,BLEEKER M,*et al.* AFLP:A new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*,1995,**23**(21):4 407-4 414.
- [30] GMENBAUM Y,NAVEH-MAILY T,CEDAR H,*et al.* Sequence specificity of memylation in higher plant DNA [J]. *Nature*,1981,**292**:860-862.
- [31] 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):2 301-2 307.
- HONG L,DENG X X. Analysis of DNA methylation in navel oranges based on MSAP marker [J]. *Scientia Agricultura Sinica*,2005,**38**(11):2 301-2 307.
- [32] 史卫东,黄如葵,等. 利用 MSAP 分析 18 个芥蓝齐口期的表观遗传多样性[J]. 基因组学与应用生物学,2012,(5):505-512.
SHI W D,HUANG R K,*et al.* The epigenetic genetic diversity of 18 Chinese Kales analyzed by MSAP when Initiated Flowering[J]. *Genomics and Applied Biology*,2012,(5):505-512.
- [33] 李海林,李维国,杨朝渠. 橡胶树幼态与老态无性系间的 MSAP 分析[J]. 热带作物学报,2014,**35**(4):617-621.
LI H L,LI W G,YANG C Q. MSAP analysis of juvenile clones and mature clones of *Hevea brasiliensis* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*,2014,**35**(4):617-621.
- [34] 汪卫星. 天然与人工合成三倍体批把基因组变异及其 DNA 甲基化分析[D]. 重庆:西南大学,2008.
- [35] 李涛,徐小万,李颖,等. 一年生辣椒与中华辣椒 DNA 甲基化多样性分析[J]. 分子植物育种,2014,**2**(12):306-315.
LI T,XU X W,LI Y,*et al.* Surveying DNA methylation diversity in the *Capsicum annum* L. and *Capsicum chinense* Jacquin [J]. *Molecular Plant Breeding*,2014,**2**(12):306-315.
- [36] 李际红,邢世岩,王聪聪,等. 银杏基因组 DNA 甲基化修饰位点的 MSAP 分析[J]. 园艺学报,2011,**38**(8):1 429-1 436.
LI J H,XING S Y,WANG C C,*et al.* Analysis on genomic DNA methylation modification of *Ginkgo biloba* by methylation sensitive amplification polymorphism[J]. *Acta Horticulturae Sinica*,2011,**38**(8):1 429-1 436.
- [37] RUIZ-GARCÍA L,CERVERA M T,MARTÍNEZ-ZAPATER J M. DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development[J]. *Planta*,2005,**222**(2):301-306.
- [38] 李际红,邢世岩,张倩,等. 叶籽银杏 DNA 甲基化水平与模式变异的研究[J]. 园艺学报,2014,**41**(8):1 535-1 544.
LI J H,XING S Y,ZHANG Q,*et al.* The changes in DNA methylation levels and patterns of *Ginkgo biloba* var. *epiphylla* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*,2014,**41**(8):1 535-1 544.
- [39] CLÍCIA G,ADRIANA S H,PAULO C F,*et al.* Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*,2012,**1 819**(2):176-185.
- [40] BENDER J. DNA methylation and epigenetics[J]. *Annual Review of Plant Biology*,2004,**55**(1):41-68.
- [41] 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.
- [42] 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,**1**(9):69-73.
LI L H,WU C T,LI W G. Analysis on DNA methylation of rubber by methylation sensitive amplification polymorphism [J]. *Molecular Plant Breeding*,2011,**1**(9):69-73.
- [43] 汤常永. 梨‘中矮 1 号’矮生基因的筛选及 PcAHS 克隆与表达分析[D]. 郑州:中国农业科学院果树研究所,2015.