

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201603024

引文格式: 刘孟, 欧阳学军, 陈洁, 等. 华南植物园锥栗 F-MSAP 采样策略及遗传多样性分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(1):15-21.

LIU M, OUYANG XJ, CHEN J, et al. F-MSAP sampling strategy and genetic diversity analysis of *Castanopsis chinensis* in South China Botanical Garden [J]. Guihaia, 2017, 37(1):15-21.

# 华南植物园锥栗 F-MSAP 采样策略及遗传多样性分析

刘孟<sup>1</sup>, 欧阳学军<sup>1,2</sup>, 陈洁<sup>1</sup>, 全慧敏<sup>1</sup>, 叶万辉<sup>1</sup>, 刘卫<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院华南植物研究所 鼎湖山树木园, 广东 肇庆 526070)

**摘要:** 基因组甲基化修饰受环境因素的影响。在以甲基化为代表的表观遗传学研究中, 如何减少保存环境对异地采后样品的影响, 提高整个实验的准确性和科学性, 目前尚未有系统的认知。该研究选取 5 种常用的采后样品保存方式(液氮冷冻、-20 °C 冷冻、变色硅胶干燥、密封袋密封、75% 酒精浸泡), 分别用 Wilcoxon signed ranks tests 统计分析和 UPGMA 聚类分析方法, 对华南植物园锥栗进行 F-MSAP 研究, 以期找出最佳保存方式。同时, 利用正交试验法对 F-MSAP 体系进行优化, 筛选出 9 对引物(E3-H/M2; E5-H/M2; E6-H/M1; E6-H/M5; E8-H/M1; E8-H/M5; E9-H/M2; E11-H/M5; E14-H/M1), 并对不同发育时期的锥栗甲基化水平及遗传多样性进行了论述。结果表明: 在锥栗 F-MSAP 的研究中, Wilcoxon signed ranks tests 统计分析和 UPGMA 聚类分析结论一致, 密封袋保存效果最佳; 成熟叶半甲基化率(27.83%) 和总甲基化率(51.13%) 高于幼叶(21.35%, 45.90%), 全甲基化率(23.30%) 低于幼叶(24.55%), 平均多态位点百分数 39.60%, 香农信息指数  $0.207 \pm 0.002$ , 表现出较高的甲基化水平和遗传多样性。

**关键词:** 锥栗, 甲基化, F-MSAP, 引物筛选, 样品保存

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)01-0015-08

## F-MSAP sampling strategy and genetic diversity analysis of *Castanopsis chinensis* in South China Botanical Garden

LIU Meng<sup>1</sup>, OUYANG Xue-Jun<sup>1,2</sup>, CHEN Jie<sup>1</sup>, QUAN Hui-Min<sup>1</sup>,  
YE Wan-Hui<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1\*</sup>

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Dinghushan Arboretum, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Zhaoqing 526070, Guangdong, China)

**Abstract:** Genomic methylation characteristics were influenced by environmental factors. In the study of epigenetics, represented by DNA methylation, the preservation environmental of postharvest samples, especially the samples in the remote place, would have an influence on the later experiment. In this reason, standard sampling and preserve operation were crucial in the field of epigenetic. But the related research was few. Therefore, we studied *Castanopsis chinensis* in South China Botanical Garden with F-MSAP sampling strategy using wilcoxon signed rank tests and unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) methods, in order to find out the best way of sample preservation in five different environments (Liquid nitrogen, -20 °C, allochroic silicagel, hermetic bag and 75% alcohol). Using the orthogonal experiment method, we optimized the F-MSAP system and screened nine pairs of primers (E3-H/M2,

收稿日期: 2016-04-21 修回日期: 2016-07-13

基金项目: 国家自然科学基金(311251001) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (311251001)].

作者简介: 刘孟(1988-), 女, 山东济宁市人, 硕士, 主要从事分子生态学, (E-mail) liumeng2009study@gmail.com.

\* 通信作者: 刘卫, 博士, 副研究员, 主要从事分子生态学, (E-mail) liuwei@scbg.ac.cn.

E5-H/M2, E6-H/M1, E6-H/M5, E8-H/M1, E8-H/M5, E9-H/M2, E11-H/M5 and E14-H/M1). Additionally, we briefly described different periods of methylation level and genetic diversity. The results showed that hermetic bag preservation was the most appropriate way. And the half and total methylation rate of mature leaves was 27.83% and 51.13%, higher than that of young leaves. The full methylation rate of mature leaves was 23.30%, lower than that of young leaves. The average percentage of polymorphic loci was 39.60%. Shannon information index was  $0.207 \pm 0.002$ , which showed a higher level of methylation and genetic diversity.

**Key words:** *Castanopsis chinensis*, methylation, F-MSAP, primer selection, sample preservation

目前已有研究证据证明 DNA 甲基化这种重要的表观遗传方式,在植物生长发育及进化过程中起着重要的调节作用,并显著影响所在 DNA 区域的遗传变异速率 (Johannes et al, 2009; Paun et al, 2010; Angers et al, 2010)。近年来, DNA 甲基化已成为生物学研究的热点之一,特别在植物学研究上,由于植物固着生长的特性,使之发展出以表型可塑性为主的适应性机制,因此研究 DNA 甲基化对植物转录表达以及表型适应性变化的影响已经成为植物生理生态适应机制和进化的主要手段之一(高乐旋等, 2008)。但是,相对于基因组序列特征, DNA 甲基化的选择性可遗传特征对实验研究方法的影响却极少被注意和研究。

从目前的研究看,一方面如低温诱导的金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 的转座子 Tam 3 序列的甲基化水平下降,在一个世代内可逆地响应温度变化 (Hashinda et al, 2003); 干旱胁迫诱导水稻 DNA 甲基化水平发生变化,复水后有 70% 回复到初始状态 (Wang et al, 2010); 烟草异染色质 DNA 受到胁迫后甲基化水平上升,当胁迫移除后部分可逆地去甲基化 (Kovar et al, 1997)。另一方面,许多研究表明,表观遗传变异与遗传变异有紧密的联系,且可遗传的表观遗传变异具有适应性,能够影响适应的速度和结果,有助于微进化 (Kaeppler & Phillips, 1993; Stokes et al, 2002; Kironomos et al, 2013; Herrera et al, 2013)。许多由环境改变或胁迫引发的植物 DNA 甲基化,通过有丝分裂和减数分裂,可以在一些植物中遗传数代 (Calarco et al, 2012; Klose & Bird, 2006; Heard & Martienssen, 2014; Morgan et al, 2005; Paszkowski & Grossniklaus, 2011)。

甲基化的选择性可遗传性对具体的试验研究带来了特殊的要求。基因组内,许多位点上甲基化特征的稳定性较低,容易在短时间内因环境因素而变化。尤其在木本植物的生态适应机制的研究中,因采样地点偏远,采样量大等现实问题,无法立即对

DNA 进行提取。而在以甲基化为代表的表观遗传研究中,样品采后保存环境对后期实验具有影响。因此,研究如何进行规范的采样和样品保存操作具有至关重要的现实意义。

锥栗作为森林生态系统的优势种,在生物多样性格局形成中有着举足轻重的地位 (王峥峰等, 2001)。尤其是从微观角度研究锥栗遗传多样性分布格局和生理适应性调节机制已然成为了研究热点 (王峥峰等, 2004)。但在研究初期,锥栗样品采集后,尤其是异地采样后,如何科学完好的保存样品,最大可能的减少外界环境因素对 DNA 甲基化的影响,则鲜有研究报道。因此,本文重点就华南植物园锥栗叶片不同保存方式对 F-MSAP 的影响,不同生长阶段甲基化水平及遗传多样性信息进行了系统研究,以期为研究锥栗甲基化修饰制定科学合理的采样策略和遗传多样性分析提供理论指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品采集

以华南植物园内 25 棵锥栗作为研究对象,分别进行样品保存试验和老幼叶试验。

**样品保存试验:**每棵锥栗采集 5 片健康成熟叶片,共 125 片。叶片沿中脉一分为二,一半为实验组,一半为对照组。老幼叶试验:任选 3 棵胸径相近个体,每棵采 3 片成熟叶和 3 片幼叶,共 18 片。

采后样品均立即带回实验室,进行下一步研究。

### 1.2 DNA 提取

**样品保存试验:**5 个试验组 (液氮冷冻处理组、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻处理组、变色硅胶干燥处理组、密封袋密封处理组、75% 酒精浸泡组),处理 24 h 后,用改良的 CTAB 法提取 DNA (陈昆松等, 2004),对照组及老幼叶试验叶片,采后立即提取 DNA。

Nano Drop 2000/2000c 超微量紫外可见分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行筛选检测,

-20 °C 冷冻保存。

### 1.3 F-MSAP

荧光标记甲基化敏感扩增多态性 (fluorescent labeled methylation sensitive amplified polymorphism, F-MSAP) 是在甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 的基础上对选择性引物进行了荧光标记。F-MSAP 包括 4 个反应体系, 酶切体系、连接体系、预扩增体系和选择性扩增体系 (褚会娟等, 2011)。通过梯度设置参数, 优化体系中的酶切时间、连接时间、退火温度及时间等因素, 结合正交试验法, 对预扩增体系和选择性扩增体系进行优化, 得到锥栗 F-MSAP 技术的最优反应体系。接头序列见表 1。

表 1 F-MSAP 接头序列  
Table 1 F-MSAP adapter sequences

接头名称 Adapter name	接头序列(5'-3') Sequence (5'-3')
<i>EcoR</i> I -adapter I	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>EcoR</i> I -adapter II	AATTGCTACGCACTCTAC
<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I -adapter I	GATCATGAGTCTCTGCT
<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I -adapter II	CGAGCAGGACTCATGA

酶切体系: 50  $\mu\text{L}$  (DNA 500 ng, 10 $\times$ Buffer 5  $\mu\text{L}$ , *EcoR* I 10 U, *Hpa* II/*Msp* I 10 U, 10 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 100  $\times$ BSA 0.2  $\mu\text{L}$ ), 37 °C 恒温孵育 6 h, 65 °C 变性 10 min。

连接体系: 50  $\mu\text{L}$  (酶切液 12.5  $\mu\text{L}$ , 5 pmol  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  *EcoR* I 接头 1  $\mu\text{L}$ , 50 pmol  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  *Hpa* II/*Msp* I 接头 1  $\mu\text{L}$ , 5 U  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  T4 连接酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ T4 Buffer 5  $\mu\text{L}$ ), 16 °C 连接过夜, 65 °C 变性 8 min (Vos et al, 1995)。

预扩增体系: 25  $\mu\text{L}$  (5 U  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  Taq 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 模板 5  $\mu\text{L}$ , 2.5 pmol  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  dNTPs 1.6  $\mu\text{L}$ , 10 pmol  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  引物各 1  $\mu\text{L}$ ), 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

选择性扩增体系: 25  $\mu\text{L}$  (5 U  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  Taq 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ , 2.5 pmol  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  dNTPs 1.6  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 10 pmol  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  引物各 3  $\mu\text{L}$ ), 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 每个循环退火温度降低 0.7 °C, 72 °C 延伸 1 min, 12 个循环; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min,

23 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

### 1.4 引物筛选

在 *EcoR* I、*Hpa* II/*Msp* I 通用引物的基础上, 通过添加随机碱基, 组合出 128 个引物对 (Xiong et al, 1999)。用优化的 F-MSAP 体系进行多态性扩增, 产物先用 1% 琼脂糖凝胶电泳初步筛选, 再用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选, 最终选出 9 对可扩增出完整清晰且多态性高条带的引物对 (表 2, 图 1)。

### 1.5 数据分析

利用 GeneMarker2.2.0 软件读取荧光标记引物扩增产物的高效毛细管电泳 (High performance capillary electrophoresis, HPCE) 结果 (钱晓伟等, 2014; 李金龙等, 2014), 得到表示扩增片段大小的荧光峰值图, 选取 30~500 bp 的片段进行下一步的研究。

利用半区间放置法将表示片段大小的数据转换成 0/1 二元数据矩阵, 即某一特定位点, 有条带记为“1”, 无条带记为“0” (陈秋博等, 2014; 夏寒冰等, 2009)。根据 *Hpa* II/*EcoR* I 和 *Msp* I/*EcoR* I 双酶切位点带型差异, 将基因组甲基化模式分为 3 种: I 型, 记作“1-1”, 双链内胞嘧啶全甲基化; II 型, 记作“1-0”, 单链外胞嘧啶半甲基化; III 型, 记作“0-1”, 胞嘧啶未甲基化 (Salmon et al, 2008)。

根据 Gervera et al (2002) 的方法, 把 MSAP 二元矩阵分为甲基化敏感多态矩阵 (Methylation Sensitive Polymorphisms, MSP), 即将原矩阵中“0-1”“1-0”的位点记为“1”, 其它记为“0”, 以及甲基化不敏感多态矩阵 (Methylation Insensitive Polymorphisms, MISP), 即将原矩阵中“1-1”位点记为“1”, 其它记为“0”。

接着, 将原始数据进行 log 函数归一化标准处理, Kolmogorov-Smirnova 检验, 分析实验组与对照组扩增片段数是否符合正态分布规律。如果符合, 实验组与对照组两两配对, 用参数检验法进一步分析, 否则, 选择非参数检验法 (郭东星等, 2000)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同样品保存方式对锥栗甲基化影响的统计分析

从筛选出的 9 对引物中选取 3 对 (E3-H/M2, E5-H/M2, E9-H/M2) 分别对 5 种样品保存处理组的 DNA 进行 F-MSAP 扩增。基于基因组甲基化带型分类, 统计实验组与对照组各带型的扩增条带数, 然后通过两两配对的统计分析方法, 找出实验组与对

表 2 F-MSAP 引物序列列表

Table 2 F-MSAP adapters and primer sequences

项目 Item	名称 Name	接头及引物序列(5'-3') Adapters and primer sequence (5'-3')
预扩增引物 Pre-amplify primer	<i>EcoR</i> I +A	GACTGCGTACCAAT- TCA
	<i>Hap</i> II / <i>Msp</i> I +T	ATCATGAGTCTCT- GCTCGGT
选择性扩增引物 (FAM 为荧光标记) Selective amplification primer (FAM; fluorescent labeled)	E1 (E +AA)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTCAAA
	E2 (E +AC)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC AAC
	E3 (E +AG)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC AAG
	E4 (E +AT)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC AAT
	E5 (E +CA)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ACA
	E6 (E +CC)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ACC
	E7 (E +CG)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ACG
	E8 (E +CT)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ACT
	E9 (E +GA)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC AGA
	E10 (E +GC)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC AGC
	E11 (E +GG)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ACG
	E12 (E +GT)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC AGT
	E13 (E +TA)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ATA
	E14 (E +TC)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ATC
	E15 (E +TG)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ATG
	E16 (E +TT)	FAM-GACTGCGTAC- CAATTC ATT
	H/M 1 (H/M +AA)	FAM-ATCATGAGTC- CTGCTCGGTAA
	H/M2 (H/M +AC)	FAM-ATCATGAGTC- CTGCTCGGTAC
	H/M3 (H/M +AG)	FAM-ATCATGAGTC- CTGCTCGGTAG
	H/M4 (H/M +AT)	FAM-ATCATGAGTC- CTGCTCGGTAT
	H/M5 (H/M +CA)	FAM-ATCATGAGTC- CTGCTCGGTCA
	H/M 6 (H/M +CC)	FAM-ATCATGAGTC- CTGCTCGGTCC
	H/M 7 (H/M +CG)	FAM-ATCATGAGTC- CTGCTCGGTCCG
	H/M8 (H/M +CT)	FAM-ATCATGAGTC- CTGCTCGGTCT
最优引物对 Optimal primers	E3-H/M2; E5-H/M2; E6-H/M1; E6-H/M5; E8-H/M1; E8-H/M5; E9-H/M2; E11-H/M5; E14-H/M1	

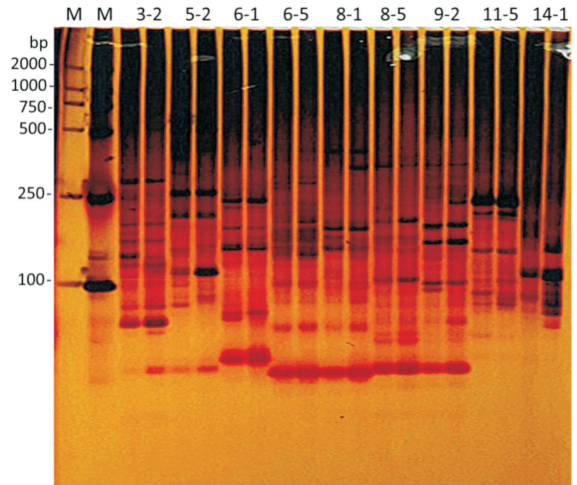


图 1 筛选出的 9 对引物电泳图 M. DL2000; 9 对引物组合: 3-2、5-2、6-1、6-5、8-1、8-5、9-2、11-5、14-1。

Fig. 1 Electrophoregram of nine pairs of primers M. DL2000; nine pairs of optimal primers: 3-2, 5-2, 6-1, 6-5, 8-1, 8-5, 9-2, 11-5 and 14-1.

对照组差异最小的处理组, 选出最优样品保存方式。Kolmogorov-Smirnova 检验结果(表 3)显示, 30 组数据中有 18 组不符合正态分布规律。因此, 实验组与对照组配对差异性分析选用非参数检验法, Wilcoxon signed ranks tests, 检验结果见表 4。

Wilcoxon signed ranks tests 检验结果显示, 与自身对照组相比, 用 75% 酒精保存的锥栗叶片, 3 种甲基化模式扩增条带数均差异极显著; 用 -20 °C 冷冻保存的, 半甲基化、全甲基化扩增条带数差异极显著, 未甲基化无显著差异; 用变色硅胶和液氮保存的, 半甲基化和全甲基化扩增条带数差异不显著, 未甲基化差异极显著; 用密封袋保存的, 3 种甲基化模式均无差异。

5 种样品保存方式对 DNA 甲基化修饰的影响程度由小到大依次为密封袋保存、液氮保存和变色硅胶保存、-20 °C 冷冻保存、75% 酒精保存。初步判定最佳样品保存方式是密封袋保存。

## 2.2 不同样品保存方式对锥栗甲基化影响的聚类分析

利用非参数检验法, 统计分析不同样品保存方式下扩增条带数差异, 可以初步判定不同处理方式对 DNA 甲基化修饰影响的大小程度, 但无法排除其中个体差异和位点差异。利用个体位点信息进行聚类分析, 将相似组归为一类, 相异组进行区分, 可以解决这个问题, 验证上述结论。



表 3 Kolmogorov-Smirnova 检验结果

Table 3 Results of Kolmogorov-Smirnova inspection

实验组与对照组 Experimental group and control group	I 型 Type I	II 型 Type II	III 型 Type III
液氮对照 Liquid nitrogen control	0.017	0.200 *	0.200 *
液氮 Liquid nitrogen	0	0.200 *	0.200 *
-20 °C 对照 -20 °C control	0.079	0.200 *	0.012
-20 °C -20 °C	0.001	0.200 *	0.200 *
75%酒精对照 75% alcohol control	0.200 *	0.058	0.200 *
75%酒精 75% alcohol	0.200 *	0.200 *	0.200 *
密封袋对照 Hermetic bag control	0.007	0.200 *	0.044
密封袋 Hermetic bag	0.008	0.200 *	0.200 *
变色硅胶对照 Allochroic silicagel control	0.01	0.200 *	0.200 *
变色硅胶 Allochroic silicagel	0.009	0.200 *	0.188

注：\* . 达到下限,不符合正态分布。

Note: \* . A lower bound and does not meet the normal distribution.

表 4 Willcoxon signed ranks 检验结果

Table 4 Results of Willcoxon signed ranks

甲基化模型 Methylation type	75%酒精 75% alcohol	-20 °C	变色硅胶 Allochroic silicagel	液氮 Liquid nitrogen	密封袋 Hermetic bag
全甲基化 Full methylation	0 * *	0 * *	0.165	0.341	0.097
半甲基化 Hemi-methylation	0.001 * *	0 * *	0.082	0.073	0.976
未甲基化 Non-methylation	0 * *	0.692	0 * *	0.004 * *	0.857

注：\* . 二尾渐进显著性小于 0.001, 差异极显著；\* . 二尾渐进显著性小于 0.05, 差异显著。

Note: \* . Asymptotic significance (2-tailed)  $P < 0.001$ , extremely significantly different; \* . Asymptotic significance (2-tailed)  $P < 0.05$ , significantly different.

将 5 种处理组的实验组与对照组各视为一类, 根据基因频率得到 MSP 矩阵的 Nei 氏遗传距离, 用 MEGA 软件进行非加权组 (Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 聚类分析 (图 2) (Zhang et al, 2015)。结果显示, 随着遗传距离的增加, 每种处理的实验组与对照组先后聚在一起, 依据聚在一起的先后顺序, 判定不同样品保存方式对甲基化影响。影响程度由小到大依次为密封袋保存、变色硅胶保存、液氮保存、-20 °C 冷冻保存、75%酒精保存。与上述 Wilcoxon signed ranks tests

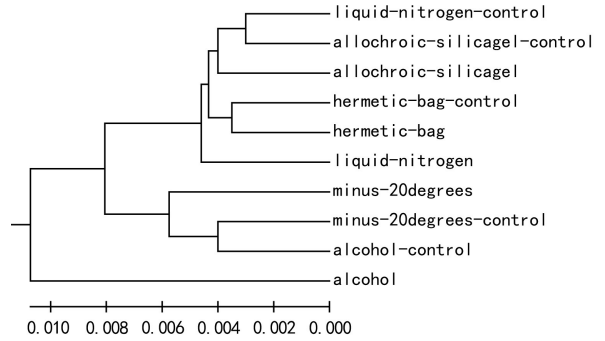


图 2 不同样品保存方式实验组与对照组聚类结果

Fig. 2 Cluster results of different preservation environments

结果基本一致。最终得出结论, 利用 F-MSAP 技术对锥栗甲基化修饰进行研究时, 密封袋保存采后叶片样品, 能最大程度的减少对后期实验的影响, 为最佳保存方式。

### 2.3 锥栗不同发育阶段甲基化特异性分析

锥栗成熟叶和幼叶分别进行 F-MSAP 扩增, 成熟叶扩增出 2 828 条, 幼叶 3 377 条。成熟叶半甲基化率 (27.83%) 和总甲基化率 (51.13%) 均高于幼叶 (21.35%, 45.90%), 而全甲基化率 (23.30%) 低于幼叶 (24.55%) (表 5)。同一个体不同发育阶段甲基化水平的差异, 表明锥栗在生长发育过程中, 生长环境的变化可能诱导了甲基化调控, 出现了一定程度的去甲基化过程 (孙慧敏, 2013; 郭广平, 2011)。

表 5 不同发育阶段老幼叶甲基化水平

Table 5 Methylation levels of different development stages

甲基化水平 Levels of methylation (%)	成熟叶 Mature leaf	幼叶 Young leaf
半甲基化率 Hemi-methylation ratio	27.83	21.35
全甲基化率 Full methylation ratio	23.30	24.55
总的甲基化率 Total methylation ratio	51.13	45.90

注：半甲基化率 (%) = II 型 / (I 型 + II 型 + III 型); 全甲基化率 (%) = III 型 / (I 型 + II 型 + III 型); 总的甲基化率 (%) = (II 型 + III 型) / (I 型 + II 型 + III 型)。

Note: Hemi-methylation ratio (%) = Type II / (Type I + Type II + Type III); Full methylation ratio (%) = Type III / (Type I + Type II + Type III); Total methylation ratio (%) = (Type II + Type III) / (Type I + Type II + Type III).

### 2.4 锥栗甲基化模式与遗传多样性分析

用样品保存试验对照组数据, 对华南植物园锥栗甲基化模式与遗传多样性进行分析。扩增产物中

共检测出 471 个位点,总扩增条带数 56 488 条,其中全甲基化条带数 15 920 条,半甲基化条带数 13 340 条,总甲基化率 51.80%,平均多态位点百分数为 39.60%,香农信息指数  $0.207 \pm 0.002$ ,说明华南植物园锥栗具有较高的甲基化水平和遗传多样性(表 6)。

表 6 锥栗遗传多样性指标  
Table 6 Genetic diversity index

Na	Ne	I	He	uHe	%P
0.840 ± 0.009	1.224 ± 0.003	0.207 ± 0.002	0.136 ± 0.002	0.157 ± 0.002	39.60%

注: Na. 平均等位变异数; Ne. 有效等位变异数; I. 香农信息指数; He. 平均期望杂合度; uHe. 无偏平均期望杂合度; %P. 平均多态位点百分数。

Note: Na. No. of different alleles; Ne. No. of effective alleles; I. Shannon's Information Index; He. Expected Heterozygosity; uHe. Unbiased expected heterozygosity; %P. Average percentage of polymorphic loci.

GenALEx 软件得出锥栗个体遗传距离的范围为 71 ~ 175,通过设置重复个体,得到 Nei Genetic Distance 的范围为 0.031 ~ 0.205 (高宝嘉等,2010)。将 MISP 矩阵与 MSP 矩阵进行 Mantel 检验,  $r = 0.806$ ,  $P = 0.001$ ,基因组遗传变异与表观遗传变异显著相关(覃光莲和谭劲英,2014)。

利用 Pearson 相关分析将全甲基化率、半甲基化率、未甲基化率、总甲基化率分别与胸径进行相关检验,相关系数分别 0.215、-0.012、-0.14、0.131,即全甲基化率和总甲基化率与胸径呈正相关,未甲基化率、半甲基化率与胸径呈负相关。

### 3 讨论

植物从种子萌发到死亡的整个生命过程中,生物或非生物因素的诱导均伴随着 DNA 甲基化的特异性改变 (Vanyushin & Ashapkin, 2011)。DNA 甲基化通常在植物中扮演两个角色。一是保护基因组抵御转座子的干扰,进而调控基因的表达 (Chan et al, 2005)。在逆境胁迫下,通过 DNA 甲基转移酶的作用 (Goll & Bestor, 2005) 和相关机制,如 RNA 干扰 (RNAi) 的介导 (Lukens & Zhan, 2007),甲基基团可以迅速、可逆地对植物基因组 DNA 进行修饰,避免过渡的、不必要的基因重组与种群多样性 (Boyko & Kovalchuk, 2008)。二是在物种受到环境胁迫时, DNA 甲基化模式对不同逆境胁迫表现出不同的水平响应 (Verhoeven et al, 2010),使植物在环境胁迫

下作出快速应答 (Peng & Zhang, 2009; Fulneček & Kovařík, 2014),从而根据发育阶段、环境诱因的变化对基因表达模式进行“可塑性”调节 (Boyko & Kovalchuk, 2008; Grant - Downton & Dickinson, 2006; Rapp & Wendel; 2005)。

DNA 甲基化所扮演的两个角色使得其 MSAP 带谱比 AFLP 蕴含更加复杂的机理。本研究从扩增产物位点差异和扩增产物总量差异两个水平,利用统计分析和聚类分析的方法,分别分析了不同样品保存方式之间 F-MSAP 的差异。非参数检验法 Wilcoxon signed ranks tests 和 UPGMA 聚类结果表明,采后样品保存方式显著影响 F-MSAP 的带谱特征,24 h 内的常温密封保存对样品的影响最小,而其它保存条件显著影响表观遗传修饰。

虽然目前有不少研究表明,甲基化遗传变异标记(如 F-MSAP)可用于区分种内遗传差异。但在实际分析 F-MSAP 结果时,情况可能更加复杂,特别在多年生木本植物中,我们的研究表明不同发育阶段锥栗甲基化修饰的特异性以及胸径与不同甲基化模式之间存在相关性(结果尚未公布)。今后,在对研究结果分析时,这些均值得重点关注。

植物在不同生长发育阶段,通过表观遗传修饰介导基因表达,进而适应环境的不断变化。通常认为, DNA 甲基化水平的升高通常抑制基因表达,而去甲基化可促进基因的表达 (Suzuki & Bird, 2008)。Sherman & Talbert (2002) 研究发现,春化可以通过降低冬小麦的甲基化水平诱导冬小麦开花。马开峰等 (2012) 研究发现,毛白杨子代和亲代之间甲基化水平和模式存在较大的差异;本研究分别对锥栗成熟叶和幼叶甲基化水平和模式进行分析,发现成熟叶扩增条带数 (2 828 条) 低于幼叶 (3 377 条),半甲基化率 (27.83%) 和总甲基化率 (51.13%) 高于幼叶 (21.35%, 45.90%)。成熟叶和幼叶 DNA 甲基化表现出的发育特异性,与前人在其他植物的研究结果一致。因此,在锥栗甲基化修饰研究过程中,有效区分不同生长发育阶段的样品,是制定合理有效采样方案的前提。

### 参考文献:

- ANGERS B, CASTONGUAY E, MASSICOTTE R, 2010. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after [J]. Mol Ecol, 19(7): 1283-1295.
- BOYKO A, KOVALCHUK I, 2008. Epigenetic control of plant

- stress response [J]. *Environ Mol Mutagen*, 49(1):61-72.
- CALARCO JP, BORGES F, DONOGHUE MTA, et al, 2012. Re-programming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA [J]. *Cell*, 151(1): 194-205.
- CERVERA MT, RUIZ-GARCIA L, MARTINEZ-ZAPATER J, 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers [J]. *Mol Genet Genom*, 268(4):543-552.
- CHAN SWL, HENDERSON IR, JACOBSEN SE, 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Rev Genet*, 6(5): 351-360.
- CHEN KS, LI F, XU CJ, et al, 2004. An efficient macro-method of genomic DNA isolation from *Actinidia chinensis* leaves [J]. *Hereditas*, 26(4):529-531. [陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等, 2004. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取 [J]. *遗传*, 26(4):529-531.]
- CHEN QF, ZHOU ZY, LI JL, et al, 2014. Automatic processing of the initial data of methylation level detected by fluorescently labeled MSAP [J]. *Lett Biotechnol*, 25(4):527-531. [陈秋博, 邹智元, 李金龙, 等, 2014. MSAP 荧光检测初始数据的自动分析研究 [J]. *生物技术通讯*, 25(4):527-531.]
- CHU HJ, ZHANG JJ, WU Y, et al, 2011. Optimization and application of MSAP molecular marker reaction system of *Salvia miltiorrhiza* by orthogonal design [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 31(5):920-928. [褚会娟, 张今今, 王喆, 等, 2011. 丹参 MSAP 分子标记技术体系的优化及其应用 [J]. *西北植物学报*, 31(5):920-928.]
- FULNEČEK J, KOVARÍK A, 2014. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles? [J]. *BMC Genet*, 15(1): 1.
- GAO BJ, DU J, GAO SH, et al, 2010. Genetic diversity and differentiations of fall webworm (*Hyphantria cunea*) populations [J]. *Sci Silv Sin*, 46(8):120-124. [高宝嘉, 杜娟, 高素红, 等, 2010. 美国白蛾种群的遗传多样性与遗传分化 [J]. *林业科学*, 46(8):120-124.]
- GAO LX, CHEN JK, YANG J, 2008. Phenotypic plasticity: Eco-Devo and evolution [J]. *J Syst Evol*, 46(4):441-451. [高乐旋, 陈家宽, 杨继, 表型可塑性变异的生态-发育机制及其进化意义 [J]. *植物分类学报* 46(4):441-451.]
- GOLL MG, BESTOR TH, 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases [J]. *Annu Rev Biochem*, 74: 481-514.
- GRANT-DOWNTON RT, DICKINSON H, 2006. Epigenetics and its implications for plant biology 2. The 'epigenetic epiphany': epigenetics, evolution and beyond [J]. *Ann Bot*, 97(1):11-27.
- GUO DJ, HE DW, 2000. The rank sum test for two independent samples and for paired data-the simplified formula of rank sum test [J]. *Chin J Health Stat*, 17(2):83-85. [郭东星, 何大卫, 2000. 成组设计的两样本比较秩和检验与配对设计差值的符合秩和检验 [J]. *中国卫生统计*, 17(2):83-85.]
- GUO GP, 2011. Research on the features of DNA methylation in the process of growth and development in Bamboo [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [郭广平, 2011. 竹类植物生长发育过程中的 DNA 甲基化研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院.]
- HASHIDA S, KITAMURA K, MIKAMI T, et al, 2003. Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon Tam 3 in *Antirrhinum majus* [J]. *Plant Physiol*, 132(3): 1207-1216.
- HEARD E, MARTIENSSEN RA, 2014. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms [J]. *Cell*, 157(1): 95-109.
- HERRERA CM, BAZAGA P, 2013. Epigenetic correlates of plant phenotypic plasticity: DNA methylation differs between prickly and nonprickly leaves in heterophyllous *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae) trees [J]. *Bot J Linn Soc*, 171(3): 441-452.
- JOHANNES F, PORCHER E, TEIXEIRA FK, et al, 2009. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits [J]. *PLoS Genet*, 5(6): e1000530.
- KAEPPLER HF, PEDERSEN JF, 1997. Evaluation of 41 elite and exotic inbred Sorghum genotypes for high quality callus production [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 48(1): 71-75.
- KLIRONOMOS FD, BERG J, COLLINS S, 2013. How epigenetic mutations can affect genetic evolution: model and mechanism [J]. *Bioessays*, 35(6): 571-578.
- KLOSE RJ, BIRD AP, 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators [J]. *Trends Biochem Sci*, 31(2): 89-97.
- KOVAR A, KOUKALOVA B, BEZDE M, et al, 1997. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress [J]. *Theor Appl Genet*, 95(1-2): 301-306.
- LI JL, TANG SQ, ZHOU ZY, et al, 2014. Establishment of fluorescence labeling and capillary electrophoresis in MSAP for Beijing You chicken [J]. *Hereditas*, 36(5):495-502. [李金龙, 唐韶青, 邹智元, 等, 2014. 北京油鸡 MSAP 毛细管电泳荧光检测技术的建立. *遗传*, 36(5):495-502.]
- LUKENS LN, ZHAN S, 2007. The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 10(3): 317-322.
- MA KF, ZHANG ZY, WANG SQ, et al, 2012. Optimization of MSAP system and preliminary analysis of DNA methylation in *Populus tomentosa* [J]. *J NE For Univ*, 40(12):1-7. [马开峰, 张志毅, 王斯琪, 等, 2012. 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*, 40(12):1-7.]
- MORGAN HD, SANTOS F, GREEN K, et al, 2005. Epigenetic re-programming in mammals [J]. *Human Mol Genet*, 14(suppl 1): R47-R58.
- PASZKOWSKI J, GROSSNIKLUS U, 2011. Selected aspects of transgenerational epigenetic inheritance and resetting in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 14(2): 195-203.
- PAUN O, BATEMAN RM, FAY MF, et al, 2010. Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: Orchidaceae) [J]. *Mol Biol Evol*, 27(11): 2465-2473.
- PENG H, ZHANG J, 2009. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding [J]. *Prog Nat Sci*, 19(9): 1037-1045.
- QIAN XW, YUAN YL, RONG P, et al, 2014. Analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism in cotton genome under salt stress based on capillary electrophoresis [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 30(3):298-306. [钱晓伟, 袁有禄, 荣平, 等, 2014. 盐胁迫下棉花基因组基于毛细管电泳的 MSAP 分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 30(3):298-306.]
- QIN GL, TAN JY, 2014. Mantel test and its applications in ecology [J]. *J Biomathem*, 29(03):507-512. [覃光莲, 谭劲英, 2014. (下转第 8 页 Continue on page 8 )