

黄顶菊种子萌发过程中DNA甲基化的MSAP分析

全志星^{1,2} 田佳源^{1,3} 张思宇¹ 皇甫超河¹ 杨殿林¹ 王 慧^{1*}

(1. 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 山西农业大学, 太谷 030801; 3. 天津农学院, 天津 300384)

摘要: 为明确入侵植物黄顶菊 *Flaveria bidentis* 生长发育与DNA甲基化之间的相互关系, 采用甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 方法研究了黄顶菊种子萌发过程中DNA甲基化的动态变化。结果表明, DNA甲基化与去甲基化两者共同调控黄顶菊生命初期的生长发育, 且去甲基化的变化在种子萌发过程中占主导。筛选出的12对引物共扩增出998条MSAP条带, 其中多态性条带为951条, 多态性百分比为95.37%。黄顶菊种子萌发过程中胞嘧啶发生甲基化主要以双链甲基化形式为主, 位点数为94个, 而单链甲基化位点数仅为50个; 多态性位点数占总位点数比率为48.95%, 表明有近一半的位点发生了DNA甲基化和去甲基化的变化; 发生去甲基化变化的多态性片段有73个, 而发生甲基化变化的有21个, 说明黄顶菊种子萌发阶段DNA甲基化的变化主要以去甲基化形式为主, 且在萌发第4天后去甲基化数目持续快速上升。

关键词: 黄顶菊; 种子萌发; DNA甲基化; 甲基化敏感扩增多态性

Analysis of *Flaveria bidentis* DNA methylation during seed germination by using MSAP method

Quan Zhixing^{1,2} Tian Jiayuan^{1,3} Zhang Siyu¹ Huangfu Chaohe¹ Yang Dianlin¹ Wang Hui^{1*}

(1. Institute of Agro-Environmental Protection, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2. Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 3. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: In order to find the relationship between plant growth and DNA methylation, MSAP (methylation sensitive amplification polymorphism) method was used to study the dynamic changes of the DNA methylation in *Flaveria bidentis* during seed germination. The results showed that both DNA methylation and demethylation played an important role in regulating early growth and development of *F. bidentis*, and the demethylation change was dominant. By using 12 pairs of primers, we got 998 MSAP bands, of which 951 were polymorphic bands and polymorphic percentage was 95.37%. During the seed germination of *F. bidentis*, cytosine methylation occurred mainly in the form of double-stranded methylation. The number of double-stranded methylation sites was 94, while the number of single-stranded methylation sites was only 50. The number of polymorphic loci accounted for 48.95% of the total site number, indicating that nearly half of the sites had DNA methylation and demethylation. Demethylation occurred in 73 polymorphic fragments, while 21 sites were methylated, indicating that DNA methylation of *F. bidentis* during seed germination mainly took the form of demethylation, and the number of demethylation sites continued to rise rapidly in four days.

Key words: *Flaveria bidentis*; seed germination; DNA methylation; MSAP

DNA甲基化是表观遗传修饰的主要方式, 它是指在DNA甲基转移酶的催化下, 以S-腺苷甲硫氨

基金项目: 国家自然科学基金(31401811), 天津市应用基础与前沿技术研究计划(15JCQNJC15300)

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: wanghui03@caas.cn

收稿日期: 2017-03-07

酸为甲基供体,将甲基转移到DNA分子中特定碱基上的过程,主要形成5-甲基胞嘧啶。DNA甲基化通过改变染色质结构、DNA构象、DNA稳定性及DNA与蛋白质相互作用方式,关闭某些基因的活性从而控制基因表达。DNA甲基化参与植物的生长发育和组织分化(Feng et al., 2012; Schulz et al., 2013; Deleris et al., 2016),在同一植株不同发育期的甲基化水平也不同,如水稻幼苗期的甲基化水平高于其它组织(Xiong et al., 1999)。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中,成熟叶片DNA甲基化水平比幼苗高20%,而种子的高于成熟叶片,但种子在发芽时发生去甲基化,甲基化水平又下降。Finnegan et al. (1998)研究发现花期提前的植株其甲基化水平比正常开花植株低,说明去甲基化更能促进开花基因的表达。DNA甲基化不仅参与花期调控,还参与种子萌发过程。Xiao et al. (2006)研究表明,DNA甲基化水平变化直接调控拟南芥种子萌发过程,拟南芥种子活力不同,DNA甲基化水平也存在差异。玉米种子萌发过程中存在甲基化现象,发芽的玉米种子甲基化水平远低于未萌发的玉米种子(Wang et al., 2015)。总之,DNA甲基化修饰在植物的基因表达、细胞分化、生长发育过程中起着重要的调节作用。

黄顶菊 *Flaveria bidentis* 又称二齿黄菊,隶属菊科堆心菊族黄菊属,是入侵我国华北地区的主要外来植物(张天瑞等,2011)。目前有关黄顶菊等外来植物的研究多集中在其入侵途径、传播方式、危害与防控、生物学特性(王春林等,2005;冯建永等,2009;张凤娟等,2009)及生理生化指标(陈冬青等,2012)等变化规律方面,而关于表观遗传学应用的报道较少,黄顶菊生长发育与DNA甲基化相互关系的相关报道更少。因此,本研究采用甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术(韩雅楠等,2010; Emidio & Gianpiero, 2014),通过建立黄顶菊种子萌发过程的甲基化MSAP体系,分析黄顶菊生长发育初始阶段基因组DNA的甲基化模式和甲基化状态的变化特征,以期为进一步研究黄顶菊生态适应性获得的表观遗传机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试种子:2016年9月下旬在河北省邯郸市永年县随机采集黄顶菊成熟种子,4℃冰箱保存备用。挑选饱满的黄顶菊种子,经5‰高锰酸钾溶液消毒

后用无菌水冲洗,用蒸馏水浸泡24 h后随机取100粒种子均匀撒在直径为10 cm的培养皿中,皿底垫有两层滤纸,每天加入2 mL ddH₂O以维持适宜的湿度。在25℃、光周期L:D为12 h:12 h光照培养箱中进行发芽。每天观察种子发芽情况,将种子幼根长度大于种子直径视为正常发芽种子,用于试验。

试剂及仪器:T4 DNA连接酶及其它限制性内切酶,宝生物工程(大连)有限公司;接头和引物序列,北京奥科鼎盛生物科技有限公司;RNaseA和蛋白酶K,生工生物工程(上海)股份有限公司;其它试剂均为国产分析纯。GXZ-160A全自动光照培养箱,宁波市科技园区新江南仪器有限公司;DU 800核酸蛋白分析仪,美国贝克曼库尔特有限公司;C1000™ PCR扩增仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;JY-CX2B垂直电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取

选取黄顶菊种子萌发0、2、4、6、8 d长势一致的幼苗(种子),采用改进的SDS法(杨丽等,2008)提取总基因组DNA。称取0.1 g种子(幼苗),液氮碾磨后加入SDS裂解液1 mL和蛋白酶K 50 μL,65℃恒温混匀仪混匀2 h,再加入RNaseA溶液20 μL,37℃混匀30 min后高速离心,抽取上清液分别加入等体积饱和酚溶液和酚-氯仿-异戊醇混合溶液进行抽提,最后取上清液加入1/10体积的乙酸钾溶液和2倍体积的95%乙醇溶液沉淀DNA。

1.2.2 MSAP体系建立与优化

20 μL酶切连接反应体系:T4 DNA Ligase Buffer 2.5 μL、5 μmol/L EcoR I Adaptor 0.5 μL、50 μmol/L Hpa II /Msp I Adaptor 0.5 μL、0.1% BSA 1.0 μL、Hpa II/Msp I 0.5 μL、EcoR I 0.5 μL、T4 DNA Ligase 0.1 μL、模板DNA 400 ng,补ddH₂O至20 μL。PCR反应程序:37℃酶切6 h,16℃连接8 h,65℃失活10 min,4℃冰箱保存备用。

25 μL预扩增反应体系:酶切连接产物(稀释10倍)2.0 μL、2.5 μmol/L dNTPs 2.0 μL、10×PCR Buffer 2.5 μL、5 μmol/L引物pre-E-A 1.0 μL、5 μmol/L引物pre-H/M-T 1.0 μL、Taq DNA Polymerase 0.25 μL,补ddH₂O至25 μL。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃复性60 s,72℃延伸60 s,共进行30个循环;72℃延伸10 min,4℃冰箱保存备用。25 μL选择性扩增反应体系:除引物3'末端添

加2个选择性碱基外,其余与预扩反应体系相同。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,65℃复性60 s,72℃延伸60 s,之后每个循环温度递减0.7℃,扩增13个循环;94℃变性45 s,55℃复性45 s,72℃延伸90 s;共进行23个循环,72℃延伸10 min,4℃冰箱保存备用。接头和引物序列见表1。

表1 本研究中接头和引物序列信息

Table 1 Sequence information of adaptors and primers used in this study

接头和引物名称 Adaptor and primer name	序列 Sequence
Eco-adaptor I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
Eco-adaptor II	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
H/M-adaptor I	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
H/M-adaptor II	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
pre-E-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
pre-H/M-T	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT-3'
Eco-ANN	5'-GACTGCGTACCAATTCANN-3'
H/M-TNN	5'-GATGAGTCTAGAACGGTNN-3'

NN: 代表引物3'末端添加2个不同的选择性碱基: AG、AC、TG、TC、GA、GT、GG、GC、CA、CT、CG、CC; Eco-ANN和H/M-TNN引物两两一组可组成144对选择性扩增引物组合。NN represents two different selective bases at the 3' end: AG, AC, TG, TC, GA, GT, GG, GC, CA, CT, CG, CC; 144 pairs of selective primer combinations can be obtained from these primers Eco-ANN and H/M-TNN.

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染

制备5% PAGE凝胶(尿素33.6 g、5×TBE 16 mL、40%丙烯酰胺贮液10 mL、TEMED 75 μL、10% APS 320 μL,补足水至50 mL),将凝胶板组装后放入含有1×TBE的电泳槽中,预电泳1 h使胶面温度达到55℃,用注射器上样,55 W恒功率下电泳2 h对选择性扩增产物进行进一步分离。电泳结束后,剥离2块玻璃板,对电泳条带进行固定、银染和显色,清水冲洗且晾干后扫描,并进行条带计数和分析。

1.2.4 MSAP条带读取及类型划分

5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨率在80~500 bp,为避免大小相同但碱基组成不同的片段,本试验只统计100~500 bp范围内清晰的条带。通过Quantity

One 软件读取MSAP条带信息并转化成表型数据0/1矩阵。利用POPGene软件分析引物组合的表观遗传多样性指数:等位基因数(na)、有效等位基因数(ne)、杂合度(h)、香农多样性指数(I)。

甲基化模式类型划分:利用两种同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 对5'-CCGG-3'位点胞嘧啶甲基化敏感程度的不同,该位点能被内切酶切开记作1,不能被内切酶切开记作0,将MSAP甲基化模式分为4种类型(表2):I类型(1,1),此类型甲基化状态为无甲基化;II类型(1,0),此类型甲基化状态为半甲基化;III类型(0,1),此类型甲基化状态为全甲基化;IV类型(0,0),这种类型信息不确定。

表2 黄顶菊种子萌发过程中的MSAP甲基化模式类型

Table 2 MSAP patterns of *Flaveria bidentis* during seed germination

酶 Enzyme	无甲基化	双链甲基化			单链甲基化		
	No methylation	Double-stranded methylation			Single-stranded methylation		
	CCGG	C ^m CGG	^m CCGG	^m C ^m CGG	^m CCGG	C ^m CGG	^m C ^m CGG
	GGCC	GG ^m CC	GGCC ^m	GGC ^m C ^m	GGCC	GGCC	GGCC
<i>Hpa</i> II	1	0	0	0	1	0	0
<i>Msp</i> I	1	1	0	0	0	1	0

m: 双链或单链胞嘧啶甲基化的发生位置。m: Location of double-stranded or single-stranded cytosine methylation.

2 结果与分析

2.1 黄顶菊种子甲基化MSAP条带分析

高质量的基因组DNA是MSAP试验成功的关

键,本试验使用改良SDS法提取了黄顶菊种子基因组DNA,其OD₂₆₀/OD₂₈₀值在1.7~1.9范围内,保证了后续酶切、扩增以及MSAP谱带的稳定性。在144对引物组合中筛选出12对重复性好、条带清晰、分布

均匀的引物组合,用于选择性扩增及黄顶菊种子萌发过程DNA甲基化变化的研究。对所有扩增得到的MSAP条带进行计数,12对引物共扩增出998条MSAP条带(表3),平均每对引物扩增83条。其中

EaHM8引物扩增的条带数最多,为95条;EeHM11引物扩增的条带数最少,仅71条,但数量满足对相关种群遗传多样性的研究。

表3 黄顶菊种子萌发过程中筛选的12对引物组合的序列信息和总条带数
Table 3 Sequence information of the 12 selected primers and their total band number during the seed germination of *Flaveria bidentis*

引物名称Name	Eco-ANN sequence	H/M-TNN sequence	总条带数Total band number
EaHM7	GACTGCGTACCAATTCAAG	GATGAGTCTAGAACGGTGG	91
EaHM8	GACTGCGTACCAATTCAAG	GATGAGTCTAGAACGGTGC	95
EaHM11	GACTGCGTACCAATTCAAG	GATGAGTCTAGAACGGTCC	90
EaHM12	GACTGCGTACCAATTCAAG	GATGAGTCTAGAACGGTCC	91
EbHM1	GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCTAGAACGGTAG	87
EbHM2	GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCTAGAACGGTAC	82
EbHM5	GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCTAGAACGGTGA	77
EcHM6	GACTGCGTACCAATTCATG	GATGAGTCTAGAACGGTGT	86
EdHM9	GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCTAGAACGGTCA	75
EeHM3	GACTGCGTACCAATTCAGA	GATGAGTCTAGAACGGTTG	77
EeHM4	GACTGCGTACCAATTCAGA	GATGAGTCTAGAACGGTTC	76
EeHM11	GACTGCGTACCAATTCAGA	GATGAGTCTAGAACGGTCG	71
总计Total			998

2.2 引物的遗传多样性与贡献率

黄顶菊种子萌发过程中筛选的12对引物等位基因数(na)平均值为1.9537,有效等位基因数(ne)平均值为1.6163,杂合度(h)平均值为0.3561,香农多样性指数(I)平均值为0.5273(表4)。12对引物共扩增出998个条带,其中多态性条带为951条,多态性百分比为95.37%。引物EeHM11多态百分比最高,为98.87%,该引物组合的 ne 、 h 和 I 指标值均高于平均值,表明该引物对表观遗传多样性贡献率最大;引物EaHM7和EbHM5多态百分比最低,仅为92.78%,相应的引物贡献率最小。

2.3 黄顶菊种子萌发过程甲基化模式分析

本试验结果发现,黄顶菊种子萌发过程中甲基化MSAP条带变化主要存在2种类型:(1)单态性:黄顶菊种子萌发前后MSAP条带不发生任何变化,出现II类型(图1-a)或者III类型条带(图1-b);(2)多态性:在种子萌发前有MSAP条带,出现I类型条带,萌发后检测不到条带,出现IV类型条带(图1-c)。在种子萌发前没有出现IV类型条带,萌发后出现I、II或者III类型MSAP条带(图1-d~g)。黄顶菊种子萌发过程DNA甲基化模式类型统计结果表明,12对引物单态性位点数在8~27个之间,总单态性位点数为194个;多态性位点数在4~25个之间,总的多态性位点数为186个,多态性位点数占总位点数

比率为48.95%;双链甲基化位点数为94个,单链甲基化位点数为50个(表5),表明在黄顶菊种子萌发过程中胞嘧啶发生甲基化主要以双链甲基化形式为主,且有近一半的位点发生了DNA甲基化和去甲基化的变化。

2.4 黄顶菊种子萌发过程DNA甲基化状态变化

黄顶菊种子萌发过程中发生的甲基化状态变化共有10种类型(表6),A~E为去甲基化变化类型,F~J为甲基化变化类型。共有94个多态性片段在黄顶菊种子萌发过程中发生DNA甲基化和去甲基化的变化,其中发生去甲基化和甲基化的分别有73个和21个多态性片段,说明黄顶菊种子萌发过程中基因组DNA的甲基化变化主要以去甲基化类型为主。A类型条带在去甲基化类型中数目最多,为26个片段,即在去去甲基化类型中有35.61%的片段发生了A类型的去甲基化变化,种子萌发前,H、M两个泳道均检测不出条带,而在萌发后均能检测出条带;G类型条带在甲基化类型中数目最多,为6个片段,即在甲基化类型中有28.57%的片段发生了G类型的甲基化变化,种子萌发前H泳道能检测出条带,而萌发后H、M两个泳道均检测不出条带。黄顶菊种子萌发过程中同时存在DNA甲基化和去甲基化现象,种子萌发的0~4 d,发生DNA甲基化和去甲基化的条带数目均缓慢上升且二者变化趋势相同,萌发

4 d后,发生甲基化的条带数目开始下降,而发生去甲基化的条带数目却持续快速上升,使黄顶菊种子萌发过程中基因组DNA去甲基化位点数不断增加(图2)。

表4 黄顶菊种子萌发过程中筛选的12对引物组合的遗传多样性分析

Table 4 Genetic diversity analysis of the 12 selected primers during the seed germination of *Flaveria bidentis*

引物名称	样本数量					多态性条带数	总条带数	多态百分比
Name	Sample size	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	Polymorphic band	Total band number	Polymorphic rate (%)
EaHM7	10	1.9341±0.2216	1.6063±0.3104	0.3781±0.1368	0.5273±0.1789	85	91	92.78
EaHM8	10	1.9787±0.1997	1.7563±0.2802	0.3651±0.1389	0.5573±0.1798	89	95	93.71
EaHM11	10	1.9888±0.2004	1.5563±0.2504	0.3511±0.1356	0.4973±0.1656	88	90	97.86
EaHM12	10	1.9456±0.2456	1.5643±0.3057	0.3601±0.1392	0.5226±0.1646	89	91	97.62
EbHM1	10	1.9538±0.2104	1.5523±0.3204	0.3156±0.1367	0.5052±0.1846	82	87	94.63
EbHM2	10	1.9658±0.2056	1.5753±0.2926	0.3056±0.1408	0.5387±0.1767	78	82	94.67
EbHM5	10	1.9658±0.2054	1.6873±0.3004	0.3659±0.1375	0.5420±0.1856	71	77	92.78
EcHM6	10	1.9456±0.2029	1.6163±0.3004	0.3481±0.1402	0.4893±0.1846	82	86	94.56
EdHM9	10	1.9586±0.2004	1.6163±0.3402	0.3677±0.1364	0.5613±0.1756	73	75	96.84
EeHM3	10	1.9586±0.1956	1.6163±0.3209	0.3898±0.1359	0.5279±0.1806	72	77	94.56
EeHM4	10	1.9285±0.2045	1.5763±0.2814	0.3682±0.1407	0.5293±0.1791	72	76	95.56
EeHM11	10	1.9206±0.2345	1.6728±0.3020	0.3581±0.1423	0.5297±0.1756	70	71	98.87
Total	120	1.9537±0.2105	1.6163±0.3004	0.3561±0.1384	0.5273±0.1776	951	998	95.37

na: 等位基因数; *ne*: 有效等位基因数; *h*: 杂合度; *I*: 香浓多态性指数。 *na*: Number of alleles; *ne*: effective number of alleles; *h*: heterozygosity; *I*: aromatic polymorphism index.

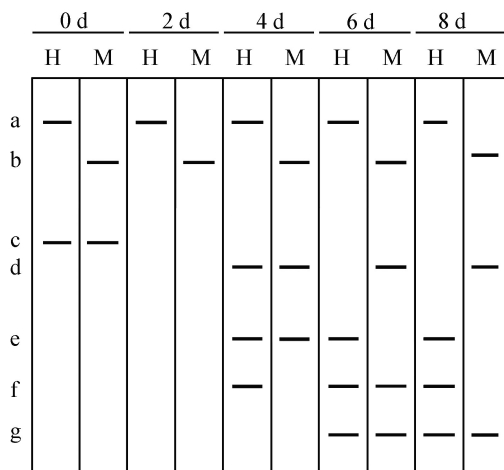


图1 黄顶菊种子萌发阶段MSAP条带分析模拟图

Fig. 1 Simulated diagram of MSAP bands during the seed germination of *Flaveria bidentis*

H: *EcoR* I/*Hpa* II 酶切组合; M: *EcoR* I/*Msp* I 酶切组合。 H: Combined DNA cleavage of *EcoR* I and *Hpa* II; M: combined DNA cleavage of *EcoR* I and *Msp* I.

3 讨论

检测DNA甲基化常用方法有亚硫酸氢盐转化法(刘洋洋和崔恒宓,2015)、MSAP技术(More et al.,2016)、亲和层析与免疫沉淀(范保星,2002)、基

因芯片(田筱青等,2008)和高通量测序(Klughammer et al.,2015)。MSAP技术是在扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,AFLP)技术(Emidio & Gianpiero,2014)的基础上建立的,该技术优点在于设计引物简单,操作方便,成本低,不需要知道被检测样的DNA序列便可以检测出样品中大量的甲基化位点。李卫国和陈文波(2010)建立了入侵植物喜旱莲子草 *Alternanthera philoxeroides* DNA甲基化的MSAP分析体系;池春玉等(2014)利用MSAP技术研究不同氮水平对原产地和入侵地飞机草 *Chromolaena odorata* DNA甲基化的影响。而MSAP方法只能检测CCGG位点的胞嘧啶甲基化变化,对非CCGG位点的双链内外胞嘧啶甲基化无法检测。通常高等植物基因组DNA被甲基化修饰的碱基是胞嘧啶,且不同植物或不同组织器官的DNA甲基化也不完全一致。在植物基因组中,CTG、CAG和CCG位点也经常发生甲基化,因此在黄顶菊整个基因组中胞嘧啶的实际甲基化率可能高于本试验的结果。由于全基因组的胞嘧啶甲基化检测需要被测物种完整的序列信息,在黄顶菊的全基因组序列未知的情况下,MSAP技术无疑是进行黄顶菊DNA甲基化分析的最优手段。

表5 黄顶菊种子萌发过程DNA甲基化类型统计表

Table 5 Statistical list of DNA methylation types during seed germination of *Flaveria bidentis*

引物 Primer	单态性位点数 Number of single locus	多态性位点数 Number of polymorphic loci	双链甲基化位点数 Number of double- stranded methylation	单链甲基化位点数 Number of single- stranded methylation	条带数 Number of bands
EaHM7	27	21	10	7	91
EaHM8	24	20	8	5	95
EaHM11	22	18	9	7	90
EaHM12	21	17	10	5	91
EbHM1	17	16	9	6	87
EbHM2	18	25	12	4	82
EbHM5	16	20	11	4	77
EcHM6	12	14	8	6	86
EdHM9	8	4	3	0	75
EeHM3	10	9	5	2	77
EeHM4	11	10	3	2	76
EeHM11	8	12	6	2	71
总计 Total	194	186	94	50	998

表6 黄顶菊种子萌发阶段甲基化状态变化

Table 6 Methylation state changes of *Flaveria bidentis* during seed germination

类型 Type		未萌发 No germination		萌发 Germination		CCGG 位点变化 CCGG site change				条带数 Number of bands
		H	M	H	M	未萌发 No germination		萌发 Germination		
去甲基化类型 Demethylation	A	0	0	1	1	^m CCGG GGCC ^m	^m C ^m CGG GGCC	CCGG GGCC		26
	B	0	0	1	0	^m CCGG GGCC ^m	^m C ^m CGG GGCC	^m CCGG GGCC		11
	C	0	0	0	1	^m CCGG GGCC ^m	^m C ^m CGG GGCC	C ^m CGG GG ^m CC	C ^m CGG GGCC	14
	D	1	0	1	1	^m CCGG GGCC		CCGG GGCC		12
	E	0	1	1	1	C ^m CGG GG ^m CC	C ^m CGG GGCC	CCGG GGCC		10
甲基化类型 Methylation	F	0	1	0	0	C ^m CGG GG ^m CC	C ^m CGG GGCC	^m CCGG GGCC ^m	^m C ^m CGG GGCC	5
	G	1	0	0	0	^m CCGG GGCC		^m CCGG GGCC ^m	^m C ^m CGG GGCC	6
	H	1	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GG ^m CC	C ^m CGG GGCC	C ^m CGG GGCC	3
	I	1	1	1	0	CCGG GGCC	^m CCGG GGCC			4
	J	1	1	0	0	CCGG GGCC	CCGG GGCC ^m	^m CCGG GGCC	^m C ^m CGG GGCC	3

H: *EcoR* I/*Hpa* II 酶切组合; M: *EcoR* I/*Msp* I 酶切组合; 1: 有条带; 0: 没有条带; m: 代表双链或单链胞嘧啶甲基化的发生位置。H: Combined DNA cleavage of *EcoR* I and *Hpa* II; M: combined DNA cleavage of *EcoR* I and MSP; 1: band; 0: no band; m: location of double-stranded or single-stranded cytosine methylation.

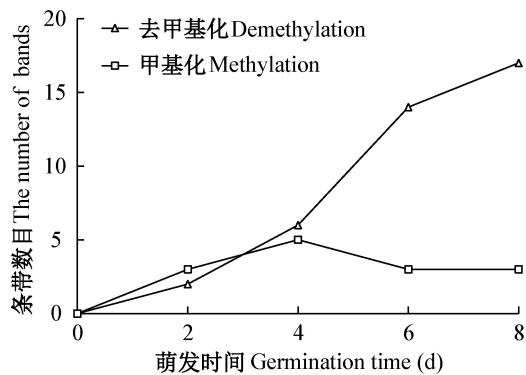


图2 黄顶菊种子萌发过程甲基化与去甲基化变化趋势
Fig. 2 Methylation and demethylation of *Flaveria bidentis* during seed germination

本试验结果发现,黄顶菊种子萌发过程中同时存在DNA的甲基化和去甲基化变化类型,且发生去甲基化的数目显著高于DNA甲基化的数目,这与油菜、水稻、辣椒种子的萌发过程是一致的(Ezio et al., 2004; 陆光远等, 2005; 郑鑫等, 2009)。DNA甲基化的变化是一个复杂的过程(邓大君, 2014),植物可能利用甲基化和去甲基化的方式调控基因的表达,在基因组某些基因的内部或附近区域发生甲基化能够抑制这些基因的表达,而当胞嘧啶发生去甲基化以后又可以重新激活这些基因的表达,进而参与植物的生长发育、器官分化等重要的生命过程。因此,推测在黄顶菊种子萌发过程中发生的大量去甲基化变化,与种子萌发过程中大量基因表达的开启相一致,而存在少量的DNA甲基化,是因为随着种子萌发时间的变化,一些不需要表达的基因发生失活。总之,甲基化与去甲基化两者共同调控黄顶菊种子萌发过程中基因的表达,来参与完成黄顶菊生命初期的生长发育。在今后的试验中,将进一步研究黄顶菊不同组织器官DNA甲基化水平的差异。

参考文献 (References)

Chen DQ, Huangfu CH, Wang NN, Yang DL. 2012. Effect of extracts of *Flaveria bidentis* in different growth habitats on *Lolium perenne* germination and seedling growth. *Journal of Chinese Ecological Agriculture*, 20(5): 586–591 (in Chinese) [陈冬青, 皇甫超河, 王楠楠, 杨殿林. 2012. 不同生长环境下黄顶菊浸提液对多年生黑麦草萌发与生长的影响. *中国生态农业学报*, 20(5): 586–591]

Chi CY, Guo DD, Chen X, Wang R, Xu ZD, Liu BD, Ding GH. 2014. Effect of different nitrogen level on DNA methylation in *Chromolaena odorata* L. from native and invasive region. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 28(9): 1591–1596 (in Chinese) [池春玉, 郭丹蒂, 陈曦, 王锐, 许志东, 刘保东, 丁国华. 2014.

不同氮水平对原产地和入侵地飞机草 (*Chromolaena odorata* L.) DNA甲基化的影响. *核农学报*, 28(9): 1591–1596]

Deleris A, Halter T, Navarro L. 2016. DNA methylation and demethylation in plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1): 579–603

Deng DJ. 2014. DNA methylation and demethylation: current status and future perspective. *Hereditas*, 36(5): 403–410 (in Chinese) [邓大君. 2014. DNA甲基化和去甲基化的研究现状及思考. *遗传*, 36(5): 403–410]

Emidio A, Gianpiero M. 2014. Methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) marker to investigate drought-stress response in Montepulciano and Sangiovese grape cultivars. *Methods in Molecular Biology*, 1112: 151–164

Ezio P, Alberto A, Cinzia C, Sergio L. 2004. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science*, 166(1): 169–178

Fan BX. 2002. DNA methylation detection methods. *International Journal of Genetics*, 25(2): 99–101 (in Chinese) [范保星. 2002. DNA甲基化检测方法. *国外医学(遗传学分册)*, 25(2): 99–101]

Feng JY, Pang MH, Liu YC, Dong JG. 2009. Economic threshold and critical period of competition of *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze in the cotton field. *Journal of Plant Protection*, 36(6): 561–566 (in Chinese) [冯建永, 庞民好, 刘颖超, 董金皋. 2009. 棉田黄顶菊的经济阈值及竞争临界期. *植物保护学报*, 36(6): 561–566]

Feng W, Dong Z, He B, Wang KJ. 2012. Analysis method of epigenetic DNA methylation to dynamically investigate the functional activity of transcription factors in gene expression. *BMC Genomics*, 13(1): 532

Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, Peacock WJ, Dennis ES. 1998. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10): 5824–5829

Han YN, Zhao XJ, Cai L. 2010. Application of methylation-sensitive amplified polymorphism technology in plant stress resistance. *Biological Technical Bulletin*, 11(6): 71–74, 179 (in Chinese) [韩雅楠, 赵秀娟, 蔡禄. 2010. MSAP技术在植物抗逆性方面的应用. *生物技术通报*, 11(6): 71–74, 179]

Klughhammer J, Datlinger P, Printz D, Sheffield NC, Farlik M, Hadler J, Fritsch G, Bock C. 2015. Differential DNA methylation analysis without a reference genome. *Cell Reports*, 13(11): 2621–2633

Li WG, Chen WB. 2010. Establishment of the optimized MSAP analysis system for *Alternanthera philoxeroides*. *Biotechnology*, 20(4): 32–34 (in Chinese) [李卫国, 陈文波. 2010. 喜旱莲子草MSAP分析技术反应体系的建立. *生物技术*, 20(4): 32–34]

Liu YY, Cui HM. 2015. The method of estimating bisulfite conversion rate in DNA methylation analysis. *Hereditas*, 37(9): 939–944 (in Chinese) [刘洋洋, 崔恒必. 2015. DNA甲基化分析中重亚硫酸盐处理DNA转化效率的评估方法. *遗传*, 37(9): 939–944]

Lu GY, Wu XM, Chen BY, Gao GZ, Xu K, Li XZ. 2005. In the process of rape seed germination MSAP analysis of DNA methylation. *Chinese Science Bulletin*, 50(24): 2750–2756 (in Chinese) [陆光

- 远, 伍晓明, 陈碧云, 高桂珍, 许鲲, 李响枝. 2005. 油菜种子萌发过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析. 科学通报, 50(24): 2750–2756]
- More P, Agarwal P, Mastan SG, Agarwal PK. 2016. MSAP marker based DNA methylation study in *Salicornia brachiata* DREB2A transgenic tobacco. Plant Gene, 6(4): 77–81
- Schulz B, Eckstein RL, Durka W. 2013. Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. Molecular Ecology Resources, 13(4): 642–653
- Tian XQ, Sun DF, Zhang YJ, Fang JY. 2008. Microarray-based methods to identify DNA methylation in cancer. Hereditas, 30(3): 295–303 (in Chinese) [田筱青, 孙丹凤, 张燕捷, 房静远. 2008. 芯片技术与肿瘤中 DNA 甲基化研究. 遗传, 30(3): 295–303]
- Wang CL, Zhang ZY, Huang YL. 2005. Strategies to counter the invasion of exotic and harmful plant pests. Journal of Plant Protection, 32(1): 104–108 (in Chinese) [王春林, 张宗益, 黄幼玲. 2005. 外来植物有害生物入侵及其对策. 植物保护学报, 32(1): 104–108]
- Wang P, Xia H, Zhang YC, Zhao S, Zhao C, Hou L, Li C, Li A, Ma C, Wang X. 2015. Genome-wide high-resolution mapping of DNA methylation identifies epigenetic variation across embryo and endosperm in maize (*Zea mays*). BMC Genomics, 16(1): 21
- Xiao WY, Custard KD, Brown RC, Lemmon BE, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL. 2006. DNA methylation is critical for arabidopsis embryogenesis and seed viability. Plant Cell, 18(4): 805–814
- Xiong LZ, Xu CG, Maroof S, Zhang QF. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Molecular and General Genetics MGG, 261(3): 439–446
- Yang L, Zhang JH, Sun HY, Wang YZ. 2008. Study on apricot genomic DNA extraction by modified SDS method. Chinese Agricultural Science Bulletin, 24(4): 69–71 (in Chinese) [杨丽, 张俊环, 孙浩元, 王玉柱. 2008. 基于改良 SDS 法的杏基因组 DNA 提取. 中国农学通报, 24(4): 69–71]
- Zhang FJ, Li JQ, Xu XY, Guo AY, Hu JR, Du SX, Wang FH. 2009. Influence of environmental factors on seed germination of *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze. Acta Ecologica Sinica, 29(4): 1947–1953 (in Chinese) [张凤娟, 李继泉, 徐兴友, 郭艾英, 胡京蕊, 杜淑欣, 万方浩. 2009. 环境因子对黄顶菊种子萌发的影响. 生态学报, 29(4): 1947–1953]
- Zhang TR, Huangfu CH, Yang DL, Bai XM. 2011. Invasion mechanism and ecological management of exotic plant *Flaveria bidentis*. Chinese Journal of Aeronautics, 20(3): 268–278 (in Chinese) [张天瑞, 皇甫超河, 杨殿林, 白小明. 2011. 外来植物黄顶菊的入侵机制及生态调控技术研究进展. 草业学报, 20(3): 268–278]
- Zheng X, Ma XG, Chi DZ, Lu XX. 2009. DNA methylation changes analysis of high vigor rice seeds during germination by MSAP. Journal of Qinghai University, 27(2): 53–56 (in Chinese) [郑鑫, 马晓岗, 迟德钊, 卢新雄. 2009. 高活力水稻种子萌发过程中 DNA 甲基化变化的 MSAP 分析. 青海大学学报, 27(2): 53–56]

(责任编辑: 高峰)