

萘胁迫对水稻基因组 DNA 甲基化模式及水平的影响

范建成^{1,2}, 刘宝³, 王隽媛^{1,2}, 盛连喜^{1,2*}

(1. 东北师范大学城市与环境科学学院, 长春 130024; 2. 东北师范大学国家环境保护湿地生态与植被恢复重点实验室, 长春 130024; 3. 东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

摘要 运用 MSAP 技术测定水稻 (*Oryza sativa* L.) 纯系品种‘日本晴’和‘松前’经萘染毒胁迫后, 不同生长时期叶片基因组 DNA 甲基化变异的情况. 结果表明, 水稻经萘胁迫后存在基于 DNA 甲基化水平和模式改变的表观遗传变异. 5-甲基胞嘧啶百分含量的变化无统一趋势或规律. 全部检测到的 1051 个位点中, 日本晴有 16.56% 发生了变异, 相对于松前的 12.08% 具有显著差异, 一定程度上说明抗萘胁迫能力与基因型有关. 松前强于日本晴. 不同基因型及不同生长时期 DNA 甲基化模式的变异存在明显差异, 表现为以去甲基化为主 (0.48% ~ 10.41%), 超甲基化较少 (0.10% ~ 1.92%), 由此推测 DNA 去甲基化可能是植物抗萘胁迫机制的一部分.

关键词 水稻; 日本晴; 松前; 萘; DNA 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性

中图分类号 X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 0250-3301(2010)03-0793-08

Effect of Napthalene on the DNA Methylation Patterns and Level in Rice (*Oryza sativa* L.)

FAN Jian-cheng^{1,2}, LIU Bao³, WANG Jun-yuan^{1,2}, SHENG Lian-xi^{1,2}

(1. College of Urban and Environmental Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China; 2. State Environmental Protection Key Laboratory of Wetland Ecology and Vegetation Restoration, Northeast Normal University, Changchun 130024, China; 3. College of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract In this study, two elite rice inbred lines, Nipponbare and Mastumae were selected and irrigated with naphthalene solution with different concentrations. Epigenetic instabilities in the blade of the plants in tillering and heading stage were assessed by MSAP marks. The results showed that naphthalene exposure induced epigenetic variations in all the samples based on different levels and patterns of DNA methylation. The changes of the percentage of 5-methylcytosine have no regulation. In total 1051 sites tested, the variation of 16.56 percentage of Nipponbare has significant difference compared with the variation of 12.08 percentage of Mastumae, which showed that the capability to resist naphthalene pollution was related to genotype and Mastumae was stronger than Nipponbare in the capability to resist naphthalene pollution. The variations of DNA methylation in different genotypes and different growth periods have significant differences. In general, the frequencies of demethylation (0.48% - 10.41%) were higher than hypermethylation (0.10% - 1.92%). We concluded that DNA demethylation might be one part of in plants mechanism to resist naphthalene pollution in plants.

Key words rice; Nipponbare; Mastumae; naphthalene; DNA methylation; methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)

萘 (NAP) 及其衍生物作为有机合成原料常应用于塑料、石油和煤加工、制革、纺织和皮毛生产中, 或用于染料和制药工业, 但这类有机化合物不仅是有毒物, 而且有些为致癌物或为可疑致癌物^[1]. 目前, 全世界许多水体中均发现有萘及其衍生物的存在^[2]. 美国环保局 (EPA) 已把萘和 2-氯萘列入 56 种环境优先污染物, 我国也把萘列为环境优先污染物. 国内外已经对 PAHs 的环境行为展开了大量的研究^[3-5], 但是有关 PAHs 尤其是萘的植物毒性的研究却鲜有报道^[6].

近年来, 作为表观遗传学的研究热点问题之一, 植物 DNA 甲基化的研究与发展占有重要位置^[7]. 甲基化是基因组 DNA 的一种主要表观遗传修饰形式, 是调节基因功能的重要手段^[8-12]. DNA 甲基化可以

引起 DNA 高级结构的变化, 从而引发一系列的生物学功能. 在植物中, 甲基化的胞嘧啶主要出现在 B 型 DNA 的沟内, 而该部位正是 DNA 结合蛋白相互作用的部位. 研究认为, 特异蛋白与甲基化的 DNA 序列结合提供了一个染色质修饰复合物作用的平台, 从而将甲基化区域组装成异染色质^[13]. 因此, DNA 甲基化可以引起由于染色质结构的变化而不是 DNA 序列变化的基因表达差异, 即表观遗传现象. DNA 甲基化在植物基因组防御、调控基因表达

收稿日期 2008-12-25 修订日期 2009-09-11

基金项目 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2008ZX07207-009-03); 吉林省科技发展计划项目 (20065021)

作者简介 范建成 (1982 ~), 男, 硕士, 主要研究方向为环境生态学, E-mail fan82627@126.com

* 通讯联系人, E-mail shenglx@nenu.edu.cn

以及控制植物生长和发育中起重要作用^[14~16],对植物本身有着积极意义。

水稻作为中国第一大粮食作物,也是消耗水分最多的作物,而水是有机污染物迁移的最主要的载体,因而水稻是最易受到有机污染危害的粮食作物。特别是一些工业较发达的地区,工业有机物污染已成为影响水稻生产安全的严重问题^[17]。

本实验以 2 个水稻纯系品种为材料,研究了萘对水稻分蘖期和抽穗期基因组 DNA 甲基化模式及水平的影响,初步探讨了水稻对有机污染物萘的耐性机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验选用的水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种为日本晴 (Nipponbare) 和松前 (Mastumae)。前者属籼稻型,后者属粳稻型。

萘为分析纯,购于北京化工厂。

1.2 水稻秧苗的培养

于恒温暗培养箱中用培养皿进行水稻催芽,温度保持在 30~35℃,48~72 h 后水稻破胸,将种子转移置光照培养箱中,在 100 mL 小烧杯中覆土培养,温度降为 20~25℃,光照时间 12 h/d,促使根芽齐壮,培养至三叶期。

1.3 水稻秧苗的处理

利用塑料桶 ($d=24$ cm, $h=18$ cm) 作为秧苗栽培器皿,每个桶内装 3 kg 风干土,调节 pH 值至 5.0~5.5。

有机物萘先用 5 mL 丙酮溶解,加入容量瓶中,于超声波发生器中助溶,用所得溶液灌溉土壤,并搅拌均匀。溶液浓度为 0、30、60、120、240 mg/L,对应土壤浓度为 0、10、20、40、80 mg/kg,另设助溶剂丙酮对照 (含丙酮 5 mL/L)。

用曝气处理后的自来水灌溉栽培器皿,然后移栽水稻秧苗,每盆栽秧 5 穴。全部器皿置于露天实验田,雨天遮盖塑料薄膜,晴天则揭去,以防 NAP 淋失。

第 1 次取样时间为分蘖期 (移栽后第 16 d),第 2 次取样时间为抽穗期 (移栽后第 54 d)。

采样时随机取植株新生幼嫩叶片作为分子检测的植物材料。

1.4 实验方法

1.4.1 基因组总 DNA 的提取

用改良的 CTAB 法提取上述植物材料的基因组总 DNA,并将最后纯化所得 DNA 溶于 50 μ L TE 中,

-20℃ 保存备用。采用紫外分光光度法检测 DNA 的纯度和浓度。

1.4.2 MSAP^[18] 分子标记分析

用限制性内切酶组合 *EcoR* I / *Hpa* II 和 *EcoR* I / *Msp* I 于 37℃ 进行酶切反应 8 h,然后用 T4 DNA 连接酶于 8℃ 进行接头连接反应 4 h,4℃ 保存。

加入特异性低的引物,按下列参数进行 PCR 预扩增反应:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 60 s,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。根据检测结果,用 0.1 $\times$ TE buffer 稀释预扩增产物 1/10~1/40,作为 PCR 选择性扩增的 DNA 模板。

利用筛选出的特异性高的 MSAP 引物组合,按下列参数进行 PCR 选择性扩增反应:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,65℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 80 s,以后每轮循环温度递减 1℃,扩增 10 轮。接着 94℃ 变性 30 s,55℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 80 s,共进行 40 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。其中实验所用接头及预扩增、选择性扩增引物序列见表 1。

反应所得产物加入等体积上样缓冲液 (loading buffer) 后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE (0.089 mol/L Tris-borate,0.089 mol/L Boric Acid,0.002 mol/L EDTA)。上样前,DNA 样品 95℃ 变性 5 min,立即冰浴,加 3 $\times$ loading buffer (300 mmol/L NaOH,97% formamide,0.2% bromophenol blue),混匀,瞬时离心,恒定功率 55 W 电泳到指定位置,即可卸板染色。

1.4.3 银染检测

银染检测采用 10% 冰乙酸固定,硝酸银溶液染色,碳酸钠与硫代硫酸钠的混合溶液显影,凝胶板晾干后照相,统计条带。

2 结果与分析

2.1 萘胁迫对出芽率、成活率、分蘖数的影响

出芽率达 95% 以上。土壤经萘溶液灌溉后栽入水稻秧苗,成活率达到 80%~100%。

第 1 次取样时间为分蘖期 (移栽后第 16 d),经统计,各浓度下水稻分蘖数存在明显差异 (表 2)。

由表 2 可知,无论日本晴还是松前,分蘖数都随土壤中萘浓度的增加而降低;而未加任何处理的空白样品均分别低于添加了丙酮的对照样品。说明萘对水稻分蘖有明显抑制作用,而丙酮在 5 mg/L (1.67 mg/kg) 的浓度下对于水稻分蘖却有一定促进作用。

表 1 实验所用接头及预扩增、选择性扩增引物序列

Table 1 Adapter sequences,pre-selective primers and selecting amplified used in MSAP		
Adapters	<i>Eco</i> R I -adapter I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	<i>Eco</i> R I -adapterI I	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
	<i>H/M</i> -adapter I	5'-GATCATGAGTCCTGCT-3' (methylation)
	<i>H/M</i> -adapterI I	5'-CGAGCAGGACTCATGA-3' (methylation)
Pre-selective primers	<i>Eco</i> R I + A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
	<i>H/M</i> + 0	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG-3' (methylation)
<i>Eco</i> R I primers	a. <i>E</i> -AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
	b. <i>E</i> -AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
	c. <i>E</i> -ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
	d. <i>E</i> -ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
	e. <i>E</i> -ACC	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
	f. <i>E</i> -ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'
	g. <i>E</i> -AGC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
	h. <i>E</i> -AGG	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
	i. <i>E</i> -AGA	5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3'
	j. <i>E</i> -ATC	5'-GACTGCGTACCAATTC ATC-3'
	<i>H/M</i> primers	
	1. <i>H/M</i> -TCT	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT-3' (methylation)
Selective primers	2. <i>H/M</i> -TCG	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC-3' (methylation)
	3. <i>H/M</i> -TCC	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC-3' (methylation)
	4. <i>H/M</i> -TTC	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC-3' (methylation)
	5. <i>H/M</i> -TTG	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTTG-3' (methylation)
	6. <i>H/M</i> -TTA	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA-3' (methylation)

表 2 水稻分蘖数差异表¹⁾

Table 2 Differences on tiller number in rice (<i>Oryza sativa</i> L.)												
项目	AR0	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	AS0	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5
成活率/%	100	80	80	100	80	100	80	100	100	80	80	100
分蘖数	4	5	4	4	3	2	4	5	3	4	3	2
	4	4	5	4	2	2	4	6	3	3	3	3
	4	6	3	3	3	3	4	4	4	2	3	3
	4	7	8	4	5	4	4	4	4	4	1	3
	3			4		4		4	4			3
平均分蘖	3. 8	5. 5	5	3. 8	3. 25	3	4	4. 6	3. 6	3. 25	2. 5	2. 8

1) 表中 AR0…AR5,AS0…AS5 分别代表分蘖期的日本晴和松前的不同浓度组 0、丙酮对照、10、20、40 和 80 mg/kg

2.2 蒽胁迫对 DNA 甲基化水平和模式的影响

在 100 对 *E* + 3 和 *H/M* + 3 的选择性扩增引物组合中,共优选出 20 对重复性好、条带清晰的引物组合(表 3),进行了 MSAP 选择性扩增(图 1)。

2.2.1 对 CCGG 位点的甲基化水平变异影响分析

Hpa II 和 *Msp* I 识别相同的四核苷酸位点 CCGG(真核生物中主要的甲基化位点),但对甲基化的敏感程度不同:*Hpa* II 对内外侧胞嘧啶甲基化均敏感,即不能消化甲基化的 CCGG 位点,但对内外侧胞嘧啶的半甲基化不敏感,即能消化半甲基化的 CCGG 位点;*Msp* I 对外侧胞嘧啶甲基化和半甲基化均敏感,即不能消化外侧胞嘧啶甲基化的 CCGG 位点^[19]。

因此,在 PAGE 胶上得到的谱带数即是被检测到的 CCGG 位点数。在任何一个 CCGG 位点,任一材

料的 *E* + *H* 和 *E* + *M* 这 2 种酶切都可能出现 4 种谱带情况(表 4)。

因此,*Hpa* II 和 *Msp* I 这 2 种酶只能准确识别前 3 种情况,故本实验统计的甲基化水平可能比实际的要低。但一些资料表明,2 种酶所不能识别的前述甲基化类型出现的频率很低。根据这样的原则,用此 20 对引物组合扩增,分别检测到 913 ~ 998 条 DNA 片段。所有分析样本在 MSAP 电泳图谱上显示的未甲基化、半甲基化和完全甲基化的 CCGG 位点数统计结果见表 5。

未做任何处理的样品 AR0、BR0、AS0 和 BS0 中,检测其甲基化总体水平分别为 19.28%、20.81%、20.42% 和 20.94%。其中,内侧 C 完全甲基化水平为 12.16%、15.74%、14.96% 和 15.73%,外侧 C 半甲基化水平为 7.12%、5.08%、5.46% 和

表 3 MSAP 选择性扩增引物筛选结果

Table 3 Selecting amplified primer pairs used in MSAP		
<i>E</i> + 3	<i>H</i> / <i>M</i> + 0	条带
e	5	62
a	1	66
a	4	77
a	5	70
b	2	36
b	1	53
g	6	19
i	6	58
a	7	59
b	5	61
c	1	51
h	5	59
h	2	76
d	5	48
e	4	41
b	4	60
h	4	55
c	2	37
e	3	28
a	2	35

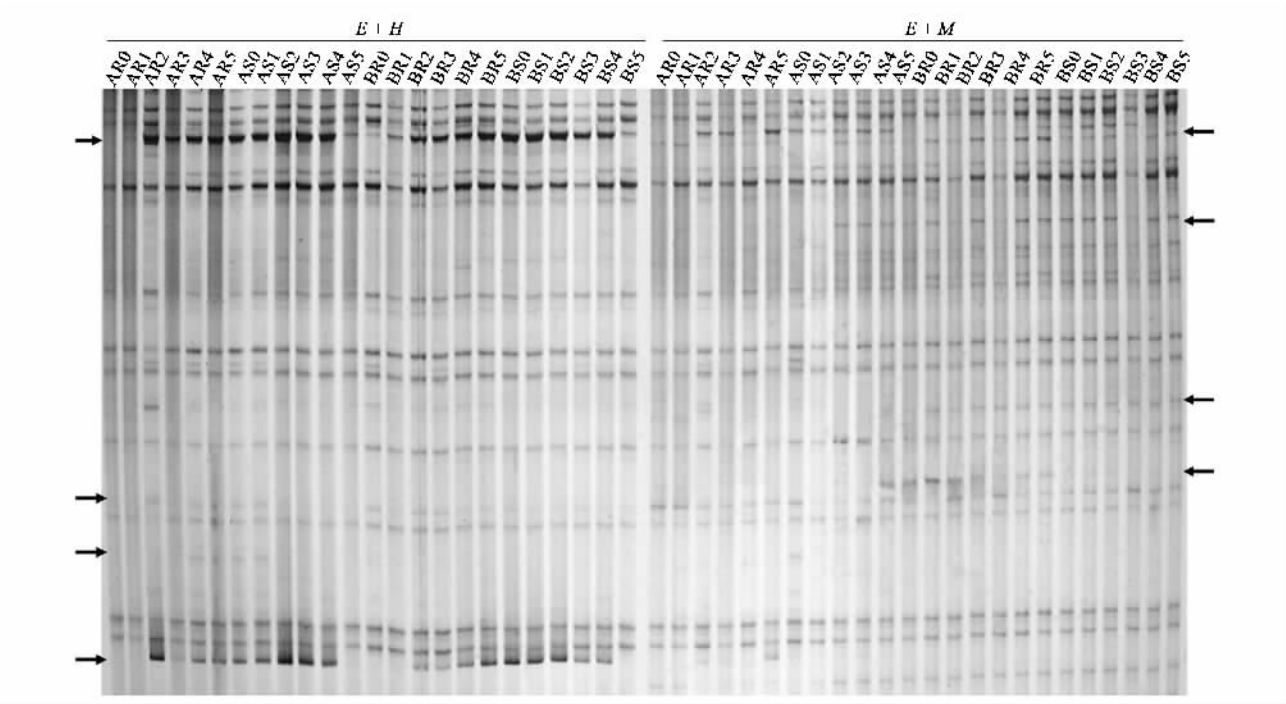
5. 21%。与未作处理的空白样品相比较,丙酮对照及蔡处理的样品在所检测到的外侧 C 半甲基化和内侧 C 完全甲基化水平上有升有降,均表现出不同程度的变异,但无统一规律。

2. 2. 2 对 CCGG 位点的甲基化模式变异影响分析

CCGG 位点中内侧胞嘧啶甲基化的位点称为 CG 位点;外侧胞嘧啶的甲基化位点称为 CNG 位点;内外侧同时甲基化的位点既是 CG 位点,也是 CNG 位点^[20~22]。

通过比较分析 MSAP 电泳图谱,可对某一特定 CCGG 位点的甲基化模式变异进行分析。结果表明,以未经任何处理的营养生长期空白水稻作为对照,在丙酮对照和各浓度蔡处理样品中的某些特定 CCGG 位点上发生了明显的甲基化模式变异(见表 6)。由此可以看出,CCGG 位点甲基化模式变异主要表现为:①相对于未经任何处理的空白水稻,在丙酮对照和各浓度蔡处理样品中其甲基化模式保持不变;②或者由于 CCGG 的外侧或者内侧 C 分别或同时发生了超甲基化,或者由于序列变异而造成了位点缺失;③CCGG 的外侧或者内侧 C 分别或同时发生了去甲基化,从而造成了扩增带的增加(也有很小的可能是序列变异而造成的)。

同时,本研究还检测到一些在 *Eco*R I / *Hpa* II 和 *Eco*R I / *Msp* I 电泳图谱上同时产生或同时消失的 DNA 片段。虽然,CCGG 位点 2 个 C 对应的甲基化变异也可导致这样的变化,但笔者认为至少有部分这样的模式变异是由序列变异造成的。



箭头所指为发生变异的带,引物组合为 e5;AR0…AR5,AS0…AS5 与表 2 中意义相同,BR0…BR5,BS0…BS5 分别代表抽穗期日本晴和松前的不同浓度组 0、丙酮对照、10、20、40 和 80 mg/kg

图 1 MSAP 选择性扩增模式图

Fig. 1 Example of MSAP band profiles produced by primer pairs e5

表 4 DNA 分子甲基化变化情况分子基础分析
Table 4 Analysis of DNA methylation variation with
molecular mechanism

酶切结果		DNA 分子甲基化变化情况
<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	
+	+	无甲基化或内侧半甲基化 (CmCGG)
+	-	外/内外侧半甲基化 (mCCGG、mCmCGG)
-	+	内/内外侧完全甲基化 (CmCGG、mCmCGG)
-	-	外侧完全甲基化 (mCCGG、mCmCGG) 或序列无法被限制性内切酶识别 (序列变异)

表 5 MSAP 检测到的 CCGG 位点甲基化水平

Table 5 Total number of bands and number of DNA methylation events detected by MSAP

样本	总带数	未甲基化的 CCGG 位点		甲基化的 CCGG 位点				总计	
				完全甲基化位点 (内侧 C)		半甲基化位点 (外侧 C)			
		位点数	比例/%	位点数	比例/%	位点数	比例/%	位点数	比例/%
AR0	913	737	80. 72	111	12. 16	65	7. 12	176	19. 28
AR1	922	749	81. 24	113	12. 26	60	6. 51	173	18. 76
AR2	949	775	81. 66	109	11. 49	65	6. 85	174	18. 34
AR3	925	752	81. 30	112	12. 11	61	6. 59	173	18. 70
AR4	944	767	81. 25	111	11. 76	66	6. 99	177	18. 75
AR5	938	771	82. 20	115	12. 26	52	5. 54	167	17. 80
BR0	985	780	79. 19	155	15. 74	50	5. 08	205	20. 81
BR1	988	781	79. 05	152	15. 38	55	5. 57	207	20. 95
BR2	990	783	79. 09	156	15. 76	51	5. 15	207	20. 91
BR3	988	785	79. 45	151	15. 28	52	5. 26	203	20. 55
BR4	993	789	79. 46	153	15. 41	51	5. 14	204	20. 54
BR5	997	791	79. 34	155	15. 55	51	5. 12	206	20. 66
AS0	989	787	79. 58	148	14. 96	54	5. 46	202	20. 42
AS1	993	784	78. 95	149	15. 01	60	6. 04	209	21. 05
AS2	992	791	79. 74	144	14. 52	57	5. 75	201	20. 26
AS3	989	791	79. 98	147	14. 86	51	5. 16	198	20. 02
AS4	987	789	79. 94	149	15. 10	49	4. 96	198	20. 06
AS5	981	780	79. 51	147	14. 98	54	5. 50	201	20. 49
BS0	998	789	79. 06	157	15. 73	52	5. 21	209	20. 94
BS1	993	784	78. 95	161	16. 21	48	4. 83	209	21. 05
BS2	994	786	79. 07	159	16. 00	49	4. 93	208	20. 93
BS3	991	786	79. 31	156	15. 74	49	4. 94	205	20. 69
BS4	994	784	78. 87	158	15. 90	52	5. 23	210	21. 13
BS5	994	788	79. 28	156	15. 69	50	5. 03	206	20. 72

2. 2. 3 基于甲基化敏感多态性矩阵的聚类分析

只对与引物组合筛选时结果都一致 (2 次独立的实验) 的清晰条带进行统计. 根据条带统计结果, 将 *Eco*R I /*Hpa* II 和 *Eco*R I /*Msp* I 只有一种组合能切开的情况标记为“1”, 其它情况标记为“0”, 获得甲基化敏感多态矩阵 (methylation-sensitive polymorphisms, MSP), 并应用 NTSYS-PC version 2. 10e 软件包分别对上述二维矩阵进行分析, 采用 SIMQUAL (similarity of qualitative data) 程序的

根据表 6 数据显示 :日本晴无论在分蘖期还是抽穗期 CG 甲基化变异频率均小于 CNG 甲基化的变异频率, 这可能与甲基化模式主要以外侧胞嘧啶的甲基化为主有关 ;且各时期甲基化降低频率明显大于甲基化升高的频率. 而松前, 在大多数情况下分蘖期 CG 甲基化变异频率均大于 CNG 甲基化的变异频率, 但抽穗期则相反 ;且各时期甲基化降低频率均大于甲基化升高的频率.

Jaccard's similarity index (JSI) 方法产生遗传相似性矩阵, 采用非加权配对算术平均法-UPGMA (unweighted pair-group method, arithmetic average) 方法进行聚类分析 (见图 2). 所有分析样本彼此间的遗传相似性系数处于 0. 611 ~ 0. 986 之间. 若以相似系数 0. 810 为标准, 可将供试材料明显分为 3 大类, 即 2 个时期的松前为一类, 抽穗的日本晴和分蘖期的日本晴各为一类. 在第 3 类中, AR4 和 AR5 明显与其它样本分开, 表明在该浓度范围下可能发生了

表 6 CCGG 位点甲基化变异模式

Table 6 Cytosine methylation variation patterns within CCGG sites

样品	CCGG 位点	CNG 位点	CG 位点	CG 升高位点 数及比例		CG 降低位点 数及比例		CNG 升高位点 数及比例		CNG 降低位点 数及比例		总升高位点 数及比例		总降低位点 数及比例	
AR0	1037	75	121												
AR1	1 037	61	114	1	0. 10%	8	0. 77%	1	0. 10%	15	1. 45%	2	0. 19%	23	2. 22%
AR2	1 037	69	113	2	0. 19%	40	3. 86%	9	0. 87%	45	4. 34%	11	1. 06%	85	8. 20%
AR3	1 037	64	115	1	0. 10%	12	1. 16%	4	0. 39%	20	1. 93%	5	0. 48%	32	3. 09%
AR4	1 037	40	115	3	0. 29%	34	3. 28%	8	0. 77%	38	3. 66%	11	1. 06%	72	6. 94%
AR5	1 037	54	117	1	0. 10%	22	2. 12%	4	0. 39%	42	4. 05%	5	0. 48%	64	6. 17%
BR0	1 037	59	164	14	1. 35%	42	4. 05%	12	1. 16%	99	9. 55%	26	2. 51%	141	13. 60%
BR1	1 037	59	156	6	0. 58%	40	3. 86%	9	0. 87%	94	9. 06%	15	1. 45%	134	12. 92%
BR2	1 037	58	163	11	1. 06%	43	4. 15%	12	1. 16%	103	9. 93%	23	2. 22%	146	14. 08%
BR3	1 037	58	156	7	0. 68%	44	4. 24%	12	1. 16%	101	9. 74%	19	1. 83%	145	13. 98%
BR4	1 037	58	160	10	0. 96%	48	4. 63%	12	1. 16%	106	10. 22%	22	2. 12%	154	14. 85%
BR5	1 037	56	160	7	0. 68%	47	4. 53%	10	0. 96%	108	10. 41%	17	1. 64%	155	14. 95%
AS0	1 040	61	155												
AS1	1 040	63	152	2	0. 19%	5	0. 48%	14	1. 35%	9	0. 87%	16	1. 54%	14	1. 35%
AS2	1 040	67	154	9	0. 87%	16	1. 54%	13	1. 25%	8	0. 77%	22	2. 12%	24	2. 31%
AS3	1 040	59	155	9	0. 87%	10	0. 96%	8	0. 77%	8	0. 77%	17	1. 63%	18	1. 73%
AS4	1 040	58	158	13	1. 25%	10	0. 96%	8	0. 77%	6	0. 58%	21	2. 02%	16	1. 54%
AS5	1 040	69	162	17	1. 63%	10	0. 96%	17	1. 63%	5	0. 48%	34	3. 27%	15	1. 44%
BS0	1 040	65	170	16	1. 54%	16	1. 54%	15	1. 44%	18	1. 73%	31	2. 98%	34	3. 27%
BS1	1 040	63	176	20	1. 92%	11	1. 06%	15	1. 44%	18	1. 73%	35	3. 37%	29	2. 79%
BS2	1 040	64	174	19	1. 83%	13	1. 25%	15	1. 44%	17	1. 63%	34	3. 27%	30	2. 88%
BS3	1 040	65	172	18	1. 73%	12	1. 15%	17	1. 63%	17	1. 63%	35	3. 37%	29	2. 79%
BS4	1 040	66	172	18	1. 73%	13	1. 25%	16	1. 54%	16	1. 54%	34	3. 27%	29	2. 79%
BS5	1 040	67	173	19	1. 83%	16	1. 54%	16	1. 54%	16	1. 54%	35	3. 37%	32	3. 08%

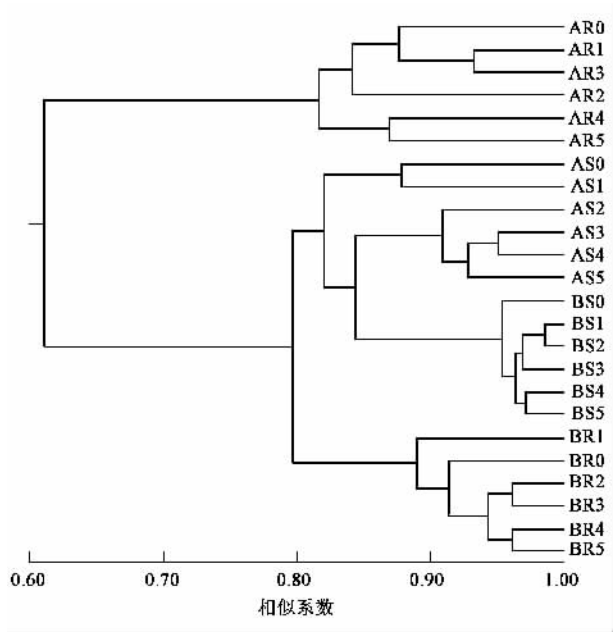


图 2 基于 MSAP 分析的甲基化敏感 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram using UPGMA cluster analysis based on MSAP JSI coefficient

某些比较广泛的甲基化变异.

3 讨论

3.1 水稻不同基因型对于抗寒胁迫能力的影响

从检测到的变异条代数上看,总共 1 051 条带中,两基因型完全一致的条代数为 824 ,同时日本晴特有的但未发生变异的条代数为 53,松前特有的但未发生变异的条代数为 100 ;日本晴有 174 个变异(占总条代数的 16. 56%),而松前有 127 个变异(占总条代数的 12. 08%),两者具有显著差异,一定程度说明抗寒胁迫能力与基因型有关,松前对于寒胁迫的抗性强于日本晴.

3.2 寒胁迫水稻变异特点和规律

3.2.1 在 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化的相对水平

本研究结果表明,各个基因型的水稻经寒溶液苗期灌溉后,CCGG 位点上的外侧 C 半甲基化和内侧 C 完全甲基化及甲基化总体水平均无特别明显的变化趋势或规律. 尽管本实验所采用方法对于植

物来说可能是一个十分严峻的胁迫过程,在这个过程中可能有原来受甲基化影响而沉默的基因因去甲基化作用而转录、表达,但这些还需要进一步研究.

3.2.2 CCGG 位点甲基化变异模式分析

进一步分析则发现,甲基化变异的主要模式是去甲基化变异,最高达到 10.41%,而超甲基化变异较少,在 0.10% ~ 1.92% 之间,并且发现 CCGG 位点 CNG 是甲基化变异的主要位点.

Steward 等^[23]在受到冷胁迫的玉米 (*Zea mays* L.) 幼苗根基因组 DNA 中也发现了此现象,去甲基化可能是作为受环境因子调控的许多基因的公共开关,植物以此对环境变化做出响应.

在植物中,DNA 甲基化的生物学作用主要体现在基因表达调控和维持基因组的稳定性 2 个大方面^[15]. 基因的甲基化可抑制基因的表达,当基因处于表达状态时甲基化水平往往很低,随着生长发育的进行需要将该基因关闭,就会在该基因的启动子或编码区发生重新甲基化,使基因转录受到抑制,基因失活,从而终止其表达^[24].

植物在受到蒽胁迫时,需要调动体内的某些防御机制,这其中一定涉及许多生物化学反应,而生化反应绝大多数需要酶的催化,正是由于去甲基化的发生,编码与抗逆性生化反应有关的各种酶的基因得以表达,从而提高了植物对于蒽胁迫的抗性. 具体涉及哪些基因,尚需进一步研究证实.

4 结论

(1) 抗蒽胁迫能力在水稻上存在明显的基因型间差异. 松前对蒽胁迫的抗性明显强于日本晴.

(2) 水稻在经蒽胁迫处理过程中存在基于 DNA 甲基化水平和模式改变的表观遗传变异.

(3) 蒽污染胁迫浓度与水稻叶片基因组 DNA 甲基化水平变化无线性相关性. 然而,营养生长期 DNA 甲基化水平明显低于生殖生长期.

(4) 不同基因型及不同生长时期 DNA 甲基化模式的变异有明显差异;甲基化变异模式以去甲基化为主 (0.48% ~ 10.41%),超甲基化变异较少 (0.10% ~ 1.92%).

参考文献:

[1] 国家环境保护局. 化学品毒性法规环境数据手册 [M]. 北京: 中国环境科学出版社,1992.

[2] Li A N, Razak IA Ab, Ni F, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediment of the Milwaukee Harbor Estuary, Wisconsin USA [J]. *Water Air Soil Poll*, 1998, **101** (1/4):

417-434.

[3] Baqar R Z, Syed H L. Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the Caribbean coastal water [J]. *Mar Pollut Bull*, 1999, **38** (8) 737-742.

[4] Edwards N T. Uptake, translocation and metabolism of anthracene in bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1986, **5** (5) 659-665.

[5] Cuypers C, Tim G, Jan J, *et al.* Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soils and sediments [J]. *Environ Sci Technol*, 2000, **34** (10) 2057-2063.

[6] 宋玉芳, 周后星, 许华夏, 等. 菲, 芘, 1,2,4-三氯苯对土壤高等植物根伸长抑制的生态毒性效应 [J]. *生态学报*, 2002, **22** (11) 1945-1950.

[7] 南楠, 曾凡锁, 詹亚光. 植物 DNA 甲基化及其研究策略 [J]. *植物学通报*, 2008, **25** (1) 102-111.

[8] Henikoff S, Matzke M A. Exploring and explaining epigenetic effects [J]. *Trends Genet*, 1997, **13** (8) 293-295.

[9] Curradi M, Izzo A, Badaracco G, *et al.* Molecular Mechanisms of Gene Silencing Mediated by DNA Methylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** 3157-3173.

[10] Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection [J]. *EMBO J*, 1998, **17** (17): 4905-4908.

[11] Ronemus M J, Galbiati M, Ticknor C, *et al.* Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1996, **273** (5275) 654-657.

[12] Liu B, Piao H M, Zhao F S, *et al.* DNA methylation changes in rice induced by *Zizania latifolia* (Griseb.) DNA introgression [J]. *Hereditas*, 1999, **131** (1) 75-78.

[13] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J]. *Gene Dev*, 2002, **16** 5.

[14] Finnegan E J, Kovac K A. Plant DNA methyltransferases [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, **43** (2-3) 189-201.

[15] Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, **10** (2) 217-223.

[16] 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.

[17] 杜青平, 贾晓珊, 袁保红. 1,2,4-三氯苯对水稻种子萌发及幼苗生长的毒性机理 [J]. *应用生态学报*, 2006, **17** (11): 2185-2188.

[18] Portis E, Acquadro A, Comino C, *et al.* Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Plant Sci*, 2004, **166** (1) 169-178.

[19] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restrictive endonucleases and DNA modification methyltransferases [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (17): 3640-3659.

[20] Xiong L Z, Xu C G, Shagi-Maroo M A, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected

- by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, **261** (3) 439-446.
- [21] Long L K, Lin X Y, Zhai J Z, *et al.* Heritable alteration in DNA methylation pattern occurred specifically at mobile elements in rice plants following hydrostatic pressurization [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2006, **340** (2) 369-376.
- [22] Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, **45** (1) : 31-39.
- [23] Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, *et al.* Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (40) 37741-37746.
- [24] Wassenegger M. RNA-directed DNA methylation [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, **43** (2-3) 203-220.