

连作对穿心莲基因组 DNA 甲基化的影响

李俊仁, 陈秀珍, 曾湘达, 卓一南, 何瑞*, 詹若挺

(广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室,
国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探究连作条件下穿心莲基因组 DNA 的甲基化水平及模式变化情况。**方法:**结合甲基化敏感扩增多态性 (methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP) 技术和液相色谱-质谱 (LC-MS/MS) 法对 3 个连作年限 (0, 1, 2 年) 穿心莲基因组 DNA 的甲基化水平及模式进行分析。**结果:**LC-MS/MS 测定的连作 0~2 年穿心莲基因组 DNA 甲基化水平为 13.91%, 12.72%, 10.26%, MSAP 测定的结果则为 10.16%, 9.64%, 8.98%, 两者均表明穿心莲基因组 DNA 的甲基化水平与连作年限呈现负相关, 即 DNA 甲基化水平随着连作时间的延长而逐渐下降。MSAP 技术对 DNA 甲基化模式分析也显示, 穿心莲基因组 DNA 的 CCGG 位点在连作过程中主要发生了去甲基化。**结论:**连作条件下, 穿心莲基因组 DNA 的甲基化水平和模式发生改变并以此来响应连作胁迫。

[关键词] 穿心莲; DNA 甲基化; 连作; 甲基化敏感扩增多态性; 液相色谱-质谱法

[中图分类号] R281; R282; R927; R931.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2018)15-0065-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181312

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.0905.004.html>

[网络出版时间] 2018-04-13 10:53

Effect of Continuous Cropping on DNA Methylation in *Andrographis paniculata*

LI Jun-ren, CHEN Xiu-zhen, ZENG Xiang-da, ZHUO Yi-nan, HE Rui*, ZHAN Ruo-ting

(Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Joint Laboratory of National Engineering Research Center for the Pharmaceuticals of Traditional Chinese Medicines, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the DNA methylation level and pattern changes of *Andrographis paniculata* under continuous cropping conditions. **Method:** DNA methylation level and patterns of *A. paniculata* samples continuously cropped for 0, 1, 2 years in sheltered pots were determined by using methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). **Result:** The DNA methylation level detected by LC-MS/MS was 13.91%, 12.72%, 10.26%, and 10.16%, 9.64%, 8.98% determined by MSAP. Both results indicated that the DNA methylation level of *A. paniculata* had a gradual decreasing tendency with the increase of the continuous cropping years. MSAP analysis also showed that demethylation was present at CCGG sites of genomic DNA during the continuous cropping process. **Conclusion:** DNA methylation level and pattern of *A. paniculata* were changed to response to the continuous cropping stress.

[Key words] *Andrographis paniculata*; DNA methylation; continuous cropping; methylation-sensitive amplified polymorphism; LC-MS/MS

[收稿日期] 20171230(006)

[基金项目] 广东省协同创新中心创新科研团队建设项目 (A1-AFD01514A04); 广州中医药大学“薪火计划”项目 (XH20140119)

[第一作者] 李俊仁, 在读博士, 从事中药资源开发与利用工作, Tel: 020-39358331, E-mail: leejunren@163.com

[通信作者] * 何瑞, 博士, 研究员, 从事中药资源开发与利用工作, Tel: 020-39358331, E-mail: ruihe@gzucm.edu.cn

作为表观遗传学的重要修饰形式之一, DNA 甲基化参与了植物体许多重要的生物学过程, 在植物的基因表达调控、基因组防御、细胞分化等^[1]方面起到不可或缺的作用, 对植物的正常生长发育极其重要。DNA 甲基化的修饰作用主要是通过基因的表达调控来实现的, 一般情况下, 目标基因发生甲基化会抑制基因的表达, 若发生去甲基化则可以促进基因的表达^[2-5]。研究表明, 在不改变 DNA 序列的前提下, 植物的表观遗传调控如 DNA 甲基化可以通过对基因组进行可塑性的修饰, 使得植物能够及时地调整某些功能基因的表达从而适应新的环境条件^[6], 这对植物的逆境胁迫响应具有重要意义。当植物遭受到非生物逆境如高温、冷冻、干旱、盐、重金属等胁迫时, 植物的生长发育会受到相应的影响, 同时伴随着 DNA 甲基化水平和模式的改变, 而这些改变又会促使植物体调节某些基因的表达情况来响应逆境, 进而达到抵御逆境胁迫的目的。因此, 了解逆境胁迫下植物 DNA 甲基化的水平和模式变化情况, 将有助于探讨逆境胁迫下植物基因的表达调控特征以及植物响应逆境胁迫的分子机制。目前, 甲基化敏感扩增多态性 (methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP) 技术和液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法^[7-9]已被广泛应用于植物全基因组 DNA 甲基化的分析。

中药穿心莲是常用的大宗中药材, 以爵床科植物穿心莲的干燥地上部分入药, 具有清热解毒、凉血消肿的作用, 常用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、泄泻痢疾等证^[10]。穿心莲药材因其疗效显著而在临床上得到广泛使用, 同时穿心莲也作为众多中成药的原料药, 市场需求量越来越大。目前, 商品穿心莲药材均依靠人工种植, 而生产上普遍认为穿心莲存在重茬问题, 在药用穿心莲规范化栽培中明确提出忌连作种植^[11-14], 实际生产上药农也多采用轮作或闲置的方式来避免穿心莲的连作问题。这就限制了穿心莲药材的生产, 严重影响了药材的产量及质量。为了克服穿心莲的连作问题, 达到从源头上保障穿心莲药材产量及质量的目的, 非常有必要对穿心莲的连作机制进行研究。目前, 针对穿心莲的连作问题主要开展了穿心莲营养体^[12, 14]和连作土壤^[13, 15]的化感作用、连作对穿心莲生物学特征和药材质量的影响^[16]等方面的研究, 尚缺乏在分子水平上尤其是从表观遗传如 DNA 甲基化的角度来探讨穿心莲连作机制的相关报道。为此, 本研究结合 MSAP 技术及 LC-MS/MS 技术对连作穿心莲的基因组 DNA

甲基化水平和模式变化情况进行分析, 从而探讨 DNA 甲基化参与穿心莲连作胁迫响应的可能分子机制, 以期为解决穿心莲的连作问题及其规范化种植提供有利参考。

1 材料

1.1 植物及土壤 实验所用土壤为商业园艺专用土“靛土”(台湾翠筠有限公司)。实验所用穿心莲种子经广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺研究员鉴定为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* 的种子, 种子经常规育苗长至 2 对真叶后用于连作实验。

1.2 仪器 OSE-260 型微量分光光度计[天根生化科技(北京)有限公司], INFINITY-1000 型凝胶成像系统(法国 VL 公司), DYY-8C 型水平电泳仪(北京六一仪器厂), PROTEAN II xi Cell 型垂直电泳仪、电泳槽(美国 Bio-Rad 公司), 6430A 型三重四级杆串联质谱(美国 Agilent 公司)。

1.3 试剂 胞色素(Cyt), 5 甲基胞嘧啶(5-mC)(德国 Sigma 公司, 批号分别为 PHR1350, M8570); 甲酸铵, 甲酸, 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司, 批号分别为 150814, 151226, 160217); 30% 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液(美国 Bio-Rad 公司, 批号 1610157); 过硫酸铵(分析纯, 美国 Sigma 公司, 批号 WXBC0687V); 无水乙醇, 苯酚, 三氯甲烷, 异戊醇(分析纯, 天津百世化工有限公司, 批号分别为 150310, 141205, 150205, 141216); 引物及接头由深圳华大基因公司合成; EcoR I 酶, Hpa II 酶, Msp I 酶(美国 NEB 公司, 批号 0101504, 0541409, 0551408); T4 DNA 连接酶, Ex Taq DNA 聚合酶(日本 Takara 公司, 批号 K690164, KA12028); 2 × EasyTaq PCR Supermix for PAGE(北京全式金生物技术有限公司, 批号 J10915); 同位素胞嘧啶 Cyt¹³C¹⁵N₂(加拿大 TRC 公司, 批号 C998952)。

2 方法

2.1 连作设计 连作实验在广州中医药大学大学城校区时珍山荫棚中进行。实验设置 3 个不同处理: 连作 0 年土种植(AP0), 连作 1 年土种植(API)和连作 2 年土种植(AP2)。连作 0 年土为未种植过穿心莲的新土, 连作 1, 2 年土分别指已有 1 年, 2 年穿心莲种植历史的同种土壤。选取生长态势一致的具 2 对真叶的穿心莲幼苗, 随机分组进行盆栽种植, 每个处理移栽 50 株幼苗, 一盆一株。在实验周期内, 各个处理保持相同的水肥管理。在穿心莲收获期, 每个处理组分别随机采集 10 棵穿心莲植株的

叶子混样,采集后迅速投入液氮中速冻,置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

2.2 DNA 甲基化敏感扩增多态性分析 穿心莲基因组 DNA 的提取采用改良的三甲基十六烷基溴化铵 (CTAB) 法^[17]。MSAP 步骤参照 XIONG 等^[18]的方法并作优化,以 *EcoR* I /*Hpa* II 和 *EcoR* I /*Msp* I 作为双酶切组合,实验中所用到的接头和引物序列见表 1。

表 1 穿心莲 MSAP 分析的接头序列、预扩增引物和选择性扩增引物序列及组合

Table 1 Sequence of adaptors, pre-amplification primer and selective amplification primer combinations in *Andrographis paniculata* MSAP analysis

接头与引物	<i>EcoR</i> I (E)	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I (HM)
接头 1	5'-CTCGTAGACTGC GTACC-3'	5'-GATCATGAGT CCTGCT-3'
接头 2	5'-AATTGGTAGGCA GTC-3'	5'-CGAGCAGGACT CATGA-3'
预扩增引物	5'-GACTGCGTACCAA TTCA-3'(E + A)	5'-ATCATGAGTCCTGC TCGG-3'(HM)
选择性扩增引物	E + AAC (E01)	HM + TCT (HM01)
	E + AAG (E02)	HM + TCG (HM02)
	E + ACA (E03)	HM + TCC (HM03)
	E + ACT (E04)	HM + TTC (HM04)
	E + ACC (E05)	HM + TTG (HM05)
	E + ACG (E06)	HM + TTA (HM06)
	E + AGG (E07)	HM + TGA (HM07)
	E + AGC (E08)	HM + TGT (HM08)
	E + AGA (E09)	
	E + ATC (E10)	

2.2.1 MSAP 反应体系 酶切反应体系 25 μL ,包括基因组 DNA 500 ng, *EcoR* I, *Hpa* II /*Msp* I 各 10 U, 10 \times CutSmart 缓冲液, dd H₂O 补充至 25 μL 。反应混合液充分混匀后于 37 °C 恒温孵育 6 h, 65 °C 变性 20 min。反应结束后取酶切产物 10 μL , 分别加入 *Hpa* II /*Msp* I 接头 100 μm , *EcoR* I 接头 10 μm , T4 DNA 连接酶 3 U, 10 \times 连接缓冲液, dd H₂O 补充至 20 μL , 于 16 °C 连接过夜, 反应完后放 -20 °C 保存备用。

预扩增反应体系 25 μL , 包括酶连产物 1 μL , 10 \times Ex *Taq* buffer, 预扩增引物 EA 和 HM 各 2.5 μL , 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 2.5 μL , 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 1 μL , 5 U \cdot μL^{-1} Ex *Taq* polymerase 0.1 μL , 加

dd H₂O 补充至 25 μL 。反应程序为 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min (30 个循环); 72 °C 延伸 10 min。预扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

选择性扩增反应体系 25 μL , 包括预扩增产物 (稀释 30 倍) 2.5 μL , 2 \times Surpermix 缓冲液 7.5 μL , *EcoR* I 及 *Hpa* II /*Msp* I 选择性扩增引物各 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dd H₂O 补充至 25 μL 。反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s (每个循环下降 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)。选扩产物经变性后用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测, 电泳结束后进行银染显色。

2.2.2 MSAP 条带统计 依据聚丙烯酰胺凝胶电泳后 *Hpa* II 和 *Msp* I 泳道内条带的有无, 条带可分为 4 种类型, ① I 型为 2 条泳道内均出现条带, 说明无甲基化发生; ② II 型为 *EcoR* I /*Hpa* II 泳道出现条带, 而 *EcoR* I /*Msp* I 泳道无条带, 说明发生了单链 DNA 的外部甲基化; ③ III 型为 *EcoR* I /*Msp* I 泳道出现条带, 而 *EcoR* I /*Hpa* II 泳道无条带出现, 说明发生了双链 DNA 的内部甲基化; ④ IV 型为 2 条泳道都没有条带出现, 说明发生了超甲基化。

2.3 DNA 甲基化的 LC-MS/MS 分析

2.3.1 基因组 DNA 水解 穿心莲叶片 DNA 经提取纯化后, 取 DNA 1 μg 和内标物 Cyt ¹³C¹⁵N₂ 100 μL (50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 放入反应瓶中, 在 60 °C 条件下用氮气吹干, 然后用 88% 甲酸 200 μL 进行溶解并于 140 °C 反应 90 min, 待自然冷却到室温后再用氮气吹干, 然后再用乙腈-2.5 mmol \cdot L⁻¹ 甲酸铵溶液 (90 : 10) 200 μL 重新溶解, 完全溶解后于 15 000 $\times g$ 离心 5 min, 并吸取上清液用于后续的 LC-MS/MS 分析。

2.3.2 液相色谱串联质谱检测基因组甲基化方法的建立 质谱条件: 离子源为 ESI 电离源, 正离子检测模式, 喷雾电压设为 4 kV, 雾化气流量和气压分别为 10 L \cdot min⁻¹ 及 241.3 kPa, 离子源温度和金属离子传输毛细管温度均为 350 °C。在接口处加热并全过程通入氮气, 在多反应检测 (MRM) 模式下进行定量分析, 相关质谱参数见表 2。

液相色谱条件: Agilent 1200 型液相色谱仪; BEHHILIC 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); 以 2.5 mmol \cdot L⁻¹ 甲酸铵水溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0 ~ 1.5 min, 93% B; 1.5 ~ 3.7 min, 93% ~ 50% B; 3.7 ~ 13.6 min, 50% B; 13.6 ~ 13.7 min, 50% ~ 93% B; 13.7 ~ 20 min, 93% B);

表 2 穿心莲 DNA 甲基化分析质谱参数

Table 2 Mass spectrometer parameters in *Andrographis paniculata* DNA methylation analysis

分析物	母离子 /m/z	碎裂电压 /V	定量离子		定性离子	
			子离子 /m/z	碰撞能 量/V	子离子 /m/z	碰撞能 量/V
Cyt	112	114	95	19	69.1	18
5mC	126.1	121	109.1	19	83.1	19
Cyt13C15N2	115.1	114	97.1	19	70.1	18

流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL, 柱温 20 °C。

建立标准曲线: Cyt 和 5-mC 的混合对照液, Cyt 的质量浓度系列为 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μg·L⁻¹; 5-mC 质量浓度系列为 0.2, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 μg·L⁻¹; 加入 50 μg·L⁻¹ Cyt¹³C¹⁵N₂ 作为内标物质, 分别进样 5 次; 以 Cyt, 5-mC 质量浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

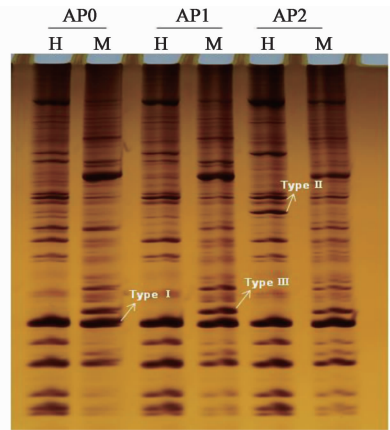
样品测定: 每个连作年限 3 个样品重复, 每个重复进样测定 3 次。数据处理采用内标法定量, 甲基化率 = $M_{5-mC} / (M_{5-mC} + M_{Cyt}) \times 100\%$, M 为摩尔浓度。

3 结果与分析

3.1 连作穿心莲基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析

3.1.1 DNA 甲基化水平变化情况 从 81 对引物中筛选出稳定性较好的 14 对引物, 用筛选的 14 对引物对穿心莲 3 个连作样品进行 MSAP 扩增并统计 4 种条带的出现情况。经 14 对引物扩增后 3 个连

作样品都获得 768 条扩增条带, 均以条带类型 I 居多。连作 0, 1 和 2 年的甲基化条带分别有 69, 74, 78 条, 甲基化水平为 8.98% ~ 10.16%。在 3 个连作年限的甲基化条带总数中, 全甲基化条带占 82.05% ~ 82.61%, 条带类型主要为 III 型; 而半甲基化条带占 17.39% ~ 17.95%, 为 II 型条带。3 个连作年限的全甲基化水平为 7.42% ~ 8.33%, 半甲基化水平为 1.56% ~ 1.82%。MSAP 分析结果显示, 随着连作年限的增加, 穿心莲基因组的 DNA 甲基化水平呈现下降趋势。见图 1, 表 3。



H. *EcoR* I / *Hpa* II 酶切; M. *EcoR* I / *Msp* I 酶切; AP0. 0 年穿心莲样品; AP1. 1 年穿心莲样品; AP2. 2 年穿心莲样品

图 1 3 个连作年限穿心莲样品 MSAP 条带分型

Fig. 1 Methylation-sensitive amplification (MSAP) profiles showing various types of locus-specific DNA methylation of *Andrographis paniculata* continuously cropped for 0, 1 and 2 years

表 3 不同连作年限的穿心莲基因组 DNA 甲基化水平变化情况

Table 3 DNA methylation levels of *Andrographis paniculata* continuously cropped for different years

连作年限	条带类型/个				扩增条带 /个	甲基化条带 /个	全甲基化 条带/个	总甲基化 率/%	全甲基化 率/%	半甲基化 率/%
	I	II	III	IV						
0	690	14	56	8	768	78	64	10.16	8.33	1.82
1	694	13	53	8	768	74	61	9.64	7.94	1.72
2	636	12	47	10	768	69	57	8.98	7.42	1.56

注: 甲基化条带总数 = II + III + IV; 总甲基化率 = $[(II + III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100\%$; 全甲基化率 = $[(III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100\%$; 半甲基化率 = $[II / (I + II + III + IV)] \times 100\%$ 。

3.1.2 DNA 甲基化模式变化情况 根据 DNA 甲基化模式变化情况, 将 MSAP 分析的 4 种条带类型 (I, II, III, IV) 再细分为 4 大类共 12 种带型。其中, A 类 (A1, A2, A3) 为去甲基化带型; B 类为甲基化带型 (B1, B2, B3); C 类 (C1, C2, C3, C4) 为单双链甲基化变换带型; D 类 (D1, D2) 为双链外部甲基化和内部甲基化变换带型。3 个比较组 (AP0-AP1,

AP0-AP2, AP1-AP2) 的多态性条带总数分别为 36, 39, 38 条, 分别占扩增条带总数的 4.69%, 5.08%, 4.95%。3 个比较组 (AP0-AP1, AP0-AP2, AP1-AP2) 中, A 带型占多态性条带总数的比例分别为 41.67%, 38.46%, 21.05%; B 带型占多态性条带总数的比例分别为 36.11%, 23.08%, 18.42%; C 带型占多态性条带总数的比例分别为 13.89%,

17.95%, 34.21%; D 型带占多态性条带总数的比例分别为 8.33%, 20.51%, 26.32%。3 个组的多态性条带类型均以去甲基化带型(A 类)为主, 甲基化类型(B 类)为次。其中, A 类以 A2 带型居多, 条带为 III 型向 I 型转变; B 类中则以 B1 带型为主, 条带为 I 型向 II 型转变。连作 1 年与连作 0 年比较 (AP0-

AP1), 去甲基化条带比甲基化条带多 15.4%, 而在连作 2 年与连作 0 年的比较 (AP0-AP2) 中则增加了 66.7%, 这说明随着连作年限的增加, 穿心莲基因组 DNA 的 CCGG 位点主要发生去甲基化。连作 2 年与连作 1 年比较 (AP1-AP2) 也是以去甲基化条带数目居多, 条带变化类型主要为 C 类和 D 类。见表 4。

表 4 不同连作年限的穿心莲基因组 DNA 甲基化模式变化情况

Table 4 DNA methylation patterns of *Andrographis paniculata* continuously cropped for different years

带型	条带类型		甲基化模式		条带数目/个		
	原始带型	变化带型	原始模式	变化模式	AP0-AP1	AP0-AP2	AP1-AP2
A1	II (1,0)	I (1,1)	mCCGGGGCC	CCGGGGCC	5	6	3
A2	III (0,1)	I (1,1)	CmCCGGGmCC	CCGGGGCC	9	8	3
A3	IV (0,0)	I (1,1)	mCmCCGGGmCmC	CCGGGGCC	1	1	2
B1	I (1,1)	II (1,0)	CCGGGGCC	mCCGGGGCC	7	2	3
B2	I (1,1)	III (0,1)	CCGGGGCC	CmCCGGGmCC	3	4	4
B3	I (1,1)	IV (0,0)	CCGGGGCC	mCmCCGGGmCmC	3	3	0
C1	II (1,0)	III (0,1)	mCCGGGGCC	CmCCGGGmCC	1	0	1
C2	II (1,0)	IV (0,0)	mCCGGGGCC	mCmCCGGGmCmC	1	1	5
C3	III (0,1)	II (1,0)	CmCCGGGmCC	mCCGGGGCC	1	2	3
C4	IV (0,0)	II (1,0)	mCmCCGGGmCmC	mCCGGGGCC	2	4	4
D1	III (0,1)	IV (0,0)	CmCCGGGmCC	mCmCCGGGmCmC	3	7	6
D2	IV (0,0)	III (0,1)	mCmCCGGGmCmC	CmCCGGGmCC	0	1	4

注: 1 表示有条带, 0 表示无条带。类型 I 为非甲基化条带; 类型 II 为半甲基化条带; 类型 III + IV 表示全甲基化条带 (类型 IV 被认为是超甲基化条带)。mC 表示甲基化胞嘧啶。

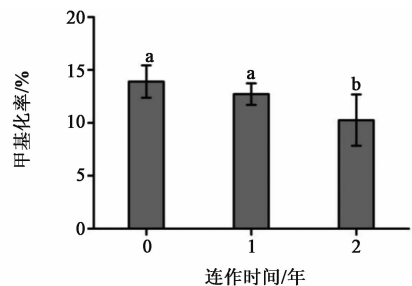
3.2 连作穿心莲基因组 DNA 甲基化的 LC-MS/MS 分析

3.2.1 标准曲线的建立 分别建立 Cyt 和 5-mC 在其浓度范围内的标准曲线, 结果显示, Cyt 在 1 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的回归方程为 $Y = 0.1843X - 2.3746$, 相关系数 R^2 为 0.9956, 表明 Cyt 在其浓度范围内线性关系良好; 5-mC 在 0.2 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的回归方程为 $Y = 0.0432X - 0.3227$ ($R^2 = 0.9954$), 表明 5-mC 在其浓度范围内线性关系良好。

3.2.2 样品测定及甲基化率计算 对 3 个连作年限的穿心莲样品甲基化水平进行 LC-MS/MS 测定, 连作 0, 1 和 2 年的甲基化率分别为 13.91%, 12.72% 和 10.26%。连作 2 年 (AP2) 分别与连作 0 年 (AP0), 连作 1 年 (AP1) 比较, 甲基化水平差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); AP1 与 AP0 之间比较无显著差异。LC-MS/MS 测定结果也显示, 穿心莲基因组的 DNA 甲基化水平随着连作年限的增加而呈现下降趋势。见图 2。

4 讨论

在植物的正常生长发育过程中, DNA 甲基化的



不同的英文字母代表差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)

图 2 不同连作年限穿心莲基因组 DNA 的甲基化水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Genomic DNA methylation levels of *Andrographis paniculata* continuously cropped for different years ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

修饰作用是不可或缺的, DNA 甲基化水平的异常变化往往会导致植物体出现形态学上的变异^[19-20]。大量研究表明, 非生物胁迫会造成植物全基因组和特定位点胞嘧啶甲基化水平的升高或降低, 如在低温胁迫下, 玉米苗^[21]、水稻^[22]的甲基化水平显著降低; 干旱胁迫下霍山石斛 DNA 甲基化水平与对照相比下降 7% ~ 18%^[23]; 盐胁迫下棉花 DNA 甲基化水平与对照组比较降低了 8% ~ 16%^[24]; 镉胁迫下的萝卜^[25]、拟南芥^[26]基因组 DNA 甲基化水平增加。

DNA 甲基化水平的动态变化,使植物能够相对快速地适应新的环境条件,这种调控修饰对植物的生长非常重要。

目前,关于连作胁迫对穿心莲基因组 DNA 甲基化水平影响的研究还尚未有报道。本研究结合 MSAP 技术和 LC-MS/MS 技术,探讨了 3 个连作年限(连作 0 年、连作 1 年和连作 2 年)穿心莲基因组 DNA 甲基化水平和模式的变化情况。对于 3 个连作年限穿心莲基因组 DNA 甲基化水平,MSAP 测定结果为 8.98% ~ 10.16%,而 LC-MS/MS 测定结果是 10.26% ~ 13.91%。两种方法测定的甲基化水平具有一致的变化趋势,均表明穿心莲基因组 DNA 的甲基化水平随着连作时间的延长而呈现下降趋势。MSAP 技术和 LC-MS/MS 技术测定结果的数据偏差,是由两者对基因组 DNA 序列的识别及测定能力造成的。在 MSAP 分析中,同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 只能识别基因组 DNA 序列中 CCGG 位点并检测其中的甲基化水平,而无法对非 CCGG 位点的甲基化水平进行测定;LC-MS/MS 技术则可以对整个基因组 DNA 序列的甲基化水平进行测定。

此外,利用 MSAP 技术对 3 个连作年限穿心莲基因组 DNA 的甲基化模式变化情况也进行了分析,结果表明,随着连作年限的增加,穿心莲基因组 DNA 的 CCGG 位点主要发生了去甲基化。研究表明,去甲基化在植物体的生长发育过程和逆境响应中也发挥着重要作用,基因组 DNA 发生去甲基能够启动特定基因的表达,使基因发挥特定功能并可以重置基因组的后生状态^[27],这使植物体能够适应不同的生长发育阶段和环境条件。WANG 等^[28]研究了盐胁迫下水稻的 DNA 甲基化变化情况,结果表明水稻基因主要发生去甲基化来响应盐胁迫。杜驰等^[29]在盐穗木 DNA 甲基化程度与去甲基化酶基因 *HcRos1* 表达的相关性研究中发现,盐胁迫下 *HcRos1* 基因的表达量与 DNA 甲基化水平呈明显的负相关,盐胁迫能促进 *HcRos1* 基因的表达而使基因组的 DNA 甲基化水平降低,增强了植物的耐盐性。徐小万等^[30]也推测 DNA 去甲基化是辣椒耐高温多湿机制的一部分。本研究中,穿心莲基因组的 DNA 甲基化水平和模式随着连作年限的增加也发生相应的改变,以此来调节某些功能基因的表达来响应连作胁迫。在 MSAP 分析中还发现,连作穿心莲基因组 DNA 中的甲基化条带在 3 个年限中存在多态性差异,后续研究中还需要对其中的差异条带进行回收、克隆及基因的生物信息学分析,以便能够挖掘出

穿心莲的连作胁迫响应基因并对穿心莲的连作机制有进一步的认识。

[参考文献]

- [1] Daniel Z. The evolving functions of DNA methylation [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(5): 554-559.
- [2] 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.
- [3] CHAN S W L, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(5): 351-360.
- [4] ZHANG X, Yazaki J, Sundaresan A, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1189-1201.
- [5] 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]. *Nat Genet*, 2006, 39(1): 61-69.
- [6] Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, et al. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2005, 43(7): 681-691.
- [7] 张俊杰,张立坚,刘春安,等.组织中全基因组 DNA 甲基化的液相色谱-串联质谱分析[J]. *质谱学报*, 2010, 31(6): 326-330.
- [8] 木晓丽,张洁,彭思远,等.液相色谱-串联质谱法同时测定生物组织全基因组 DNA 甲基化和羟甲基化水平[J]. *色谱*, 2014, 32(7): 682-686.
- [9] 张航,胡俊杰,汤瑞华,等.高效液相色谱-串联质谱检测基因组 DNA 甲基化方法的建立[J]. *生物技术通讯*, 2014, 25(4): 537-541.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 268-269.
- [11] 陈蔚文,徐鸿华. 岭南道地药材研究 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2007: 109-120.
- [12] 李明,周晓燕,卢展宏. 穿心莲营养体的化感作用研究 [J]. *中药材*, 2010, 33(12): 1829-1833.
- [13] 曾令杰,刘意,褚晨亮,等. 穿心莲化感作用与 GAP 栽培规范的研究 [J]. *现代中药研究与实践*, 2011, 25(3): 5-7.
- [14] 黎韵琪,李明,唐堃,等. 穿心莲营养体的化感自毒作用研究 [J]. *北方园艺*, 2014(21): 157-160.
- [15] 李俊仁,陈秀珍,刘凯频,等. 穿心莲连作土壤提取物对其种子的化感作用 [J]. *广州中医药大学学报*,

- 2016,33(3):389-395.
- [16] 李俊仁,陈秀珍,汤小婷,等. 连作对穿心莲生长及药材质量的影响[J]. 中药新药与临床药理,2017,28(6):797-801.
- [17] 郭凌飞,邹明宏,曾辉,等. 利用改良 CTAB 法提取澳洲坚果成熟叶片高质量 DNA[J]. 分子植物育种,2007,5(S1):187-190.
- [18] XIONG L Z, XU C G, Maroof M A S, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplication polymorphism technique [J]. Mol Gen Genet, 1999,261(3):439-446.
- [19] Kakutani T, Munakata K, Richards E J, et al. Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetics, 1999, 151(2):831-838.
- [20] CAO X, Jacobsen S E. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2002,99(Suppl 4):16491-16498.
- [21] SHAN X, WANG X, YANG G, et al. Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms[J]. J Plant Biol,2013,56(1):32-38.
- [22] 王亚男,范思静. 低温胁迫下水稻基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析[J]. 安徽农业科学,2017,45(4):135-137,186.
- [23] 樊洪泓,李廷春,李正鹏,等. PEG 模拟干旱胁迫对石斛 DNA 表观遗传变化的 MSAP 分析[J]. 核农学报,2011,25(2):363-368.
- [24] 李雪林,林忠旭,聂以春,等. 盐胁迫下棉花基因组 DNA 表观遗传变化的 MSAP 分析[J]. 作物学报,2009,35(4):588-596.
- [25] 杨金兰,柳李旺,龚义勤,等. 镉胁迫下萝卜基因组 DNA 甲基化敏感扩增多态性分析[J]. 植物生理与分子生物学学报,2007,33(3):219-226.
- [26] 赵晓辉,徐正进,刘宛,等. 镉、铜胁迫下拟南芥基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析[J]. 安徽农业科学,2013,41(5):1911-1915.
- [27] 刘秋香,薛庆中,徐建红. 被子植物 DNA 去甲基化酶基因的进化分析[J]. 遗传,2014,36(3):276-285.
- [28] WANG W, ZHAO X, PAN Y, et al. DNA methylation changes detected by methylation-sensitive amplified polymorphism in two contrasting rice genotypes under salt stress [J]. J Genet Genomics, 2011, 38(9):419-424.
- [29] 杜驰,张冀,张丽丽,等. 盐胁迫下盐穗木 DNA 甲基化程度与去甲基化酶基因 (*Ros1*) 表达的相关性研究[J]. 新疆农业科学,2017,54(5):878-885.
- [30] 徐小万,雷建军,张长远,等. 高温多湿胁迫下辣椒 DNA 甲基化分析[J]. 核农学报,2014,28(7):1175-1180.

[责任编辑 仝燕]