

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00588

## 盐胁迫下棉花基因组 DNA 表观遗传变化的 MSAP 分析

李雪林<sup>1,2</sup> 林忠旭<sup>1</sup> 聂以春<sup>1</sup> 郭小平<sup>1</sup> 张献龙<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070; <sup>2</sup>河南科技大学农学院, 河南洛阳 471003

**摘要:** 盐胁迫是非生物逆境中对作物危害比较严重的自然灾害之一, 严重影响和制约作物的产量和种植面积。本研究以陆地棉品系 YZ1 为材料, 调查不同 NaCl 浓度下棉花幼苗生长及根基因组 DNA 的甲基化水平和变化模式。结果表明, 对棉花幼苗的株高和根生长 100 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 有促进作用, 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 有显著抑制作用; 100~200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫严重抑制棉花幼苗的侧根数量。甲基化敏感扩增多态性(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)分析表明, 经 100、150 和 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 处理后根基因组 DNA 甲基化比率分别为 38.1%、35.2% 和 34.5%, 均低于对照(41.2%), 同时棉花幼苗根 DNA 的甲基化水平与 NaCl 处理浓度呈显著负相关( $r = -0.986$ )。与对照相比, 100、150 和 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下棉花幼苗根基因组 DNA 的甲基化和去甲基化分别为 6.4%、7.6%、11.3% 和 12.7%、11.1%、8.2%。此外, 序列和 RT-PCR 分析表明, 与 MSAP 差异片段高度同源的基因的表达在处理与对照间差异显著。

**关键词:** 棉花; 盐胁迫; DNA 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性; RT-PCR

## MSAP Analysis of Epigenetic Changes in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under Salt Stress

LI Xue-Lin<sup>1,2</sup>, LIN Zhong-Xu<sup>1</sup>, NIE Yi-Chun<sup>1</sup>, GUO Xiao-Ping<sup>1</sup>, and ZHANG Xian-Long<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup>College of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

**Abstract:** Salinity is one of the important limiting factors in plant production worldwide. The objectives of the study were to assess the effect of salt stress on the plant growth and to determine if DNA can be methylated in cotton plants (*Gossypium hirsutum*) by methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) technique. The results showed that 100 mmol L<sup>-1</sup> NaCl obviously promoted plant height and root length of cotton seedlings, but 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl significantly inhibited plant growth; 100–200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl inhibited the number of lateral root considerably. The analysis of MSAP showed that the level of global DNA methylation decreased from 41.2% to 34.5% as the salt concentrations increased; there was a significantly negative correlation ( $r = -0.986$ ) between NaCl concentrations and the level of DNA methylation in cotton roots. Under stresses of 100, 150 and 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, methylation and demethylation of DNA were 6.4%, 7.6%, 11.3% and 12.7%, 11.1%, 8.2%, respectively. In addition, the analyses of sequences and RT-PCR showed that expressions of genes homologous to MSAP fragments in roots were different between control and treated plants under salt stress, suggesting that these genes would play an important role in the cotton adaptation of salt stress.

**Keywords:** Cotton; Salt stress; DNA methylation; MSAP; RT-PCR

DNA 甲基化(DNA methylation)是一种主要的表观遗传修饰形式, 是调节基因功能的重要手段, 在高等植物中普遍存在。DNA 甲基化主要发生在 5'-CpG-3' 二核苷酸序列(偶尔为 5'-CpNpG-3')上, 产生 5-甲基脱氧胞嘧啶核苷酸(m<sup>5</sup>C)<sup>[1]</sup>。植物 DNA 甲基

化是一种普遍现象, 但 DNA 甲基化水平因植物种类而异, 大约 30%~50% 的基因组 DNA 胞嘧啶处于甲基化状态<sup>[2]</sup>。DNA 甲基化在真核生物基因表达、细胞分化及系统发育中起着重要的调控作用, 它与基因的转录失活(尤其转基因的沉默)、转座子的转移失活、基

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA00105)和国家棉花产业创新体系项目资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 张献龙, E-mail: xlzhang@mail.hzau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: xuelin@webmail.hzau.edu.cn

Received(收稿日期): 2008-10-12; Accepted(接受日期): 2009-01-10.

基因组印记等多种表观遗传存在密切的关系<sup>[1,3-7]</sup>。根据不同来源的DNA甲基化程度和甲基化位点的差别可对外来基因进行识别,因而DNA甲基化还与生物防御有关<sup>[8]</sup>。

甲基化敏感扩增多态性(MSAP)是改良的AFLP技术<sup>[9]</sup>,采用对基因组甲基化敏感性不同的两种限制性内切酶*Hpa* II和*Msp* I对5'-CCGG位点甲基化进行特异性切割。*Hpa* II和*Msp* I都能识别并切割CCGG序列,但对该位点胞嘧啶甲基化的敏感性不同,可产生不同的DNA切割片段来揭示甲基化位点。因此,能够很好地反映基因组DNA 5'-CCGG位点胞嘧啶的甲基化状态和程度等<sup>[10]</sup>。现在,MSAP技术被广泛应用于水稻、拟南芥、柑橘等基因组的胞嘧啶甲基化评定<sup>[11-13]</sup>,已成为检测基因组甲基化水平和模式的重要方法之一<sup>[14]</sup>。

盐胁迫对于农业生产是一种严重的制约因素,所以植物耐盐适应性问题一直是世界各国的重要研究热点<sup>[15]</sup>。研究表明,植物在发育的不同时期,通过遗传及环境变化调控内源基因的表达来进行不同的发育反应,植物DNA甲基化水平的变化在这种调节中起着重要的作用<sup>[16-17]</sup>,如春化作用促进开花可能就是由于对诱导开花非常重要的基因或基因启动子的去甲基化引起的<sup>[18]</sup>。此外,大量研究显示,转基因沉默现象与转入基因的编码区和启动子区的甲基化有关,这种甲基化严重影响了被转入基因的正常表达<sup>[19]</sup>。近年来,以拟南芥为模式植物,*DREB2A*、*DREB2B*、*bZIP*、*MYC/MYB*、*SOS*等盐应答相关基因及其作用方式陆续被发现,盐胁迫下钙信号通路和基因调控模式的研究也开始进行<sup>[15,20-22]</sup>。然而在重要的纤维作物如棉花中,人们对于盐胁迫下棉花基因组DNA甲基化水平与基因表达调控的关系研究较少。为了解DNA甲基化在棉花盐诱导下基因表达调控中的作用及其方式,我们使用基于AFLP的甲基化敏感扩增多态性的方法分析了盐胁迫后棉花CCGG位点胞嘧啶甲基化水平和模式的变化,并分离了盐诱导的甲基化差异片段,为从DNA水平上揭示高盐胁迫与植物对高盐胁迫的反应机制提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

陆地棉品系(YZ1),由本实验室保存。在华中农业大学的试验地种植,经自交保纯后收获种子用作

试验材料。

### 1.2 植物培养与高盐胁迫处理

YZ1 种子经 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒后,用无菌水冲洗干净,于无菌苗培养基(1/2 大量元素+1.5%葡萄糖+0.6%琼脂粉)中萌发。2 d后挑选发芽一致的种子转移到无菌苗培养基中进行不同浓度的盐胁迫处理,NaCl(分析纯,上海国药集团)浓度为 100、150 和 200  $\text{mmol L}^{-1}$ ,对照为无NaCl的无菌苗培养基。培养 3 周,每个处理 30 株棉花苗。培养物在  $28 \pm 2$  ,光照强度(冷光源)  $135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,每天光照 14 h的条件下进行培养。

### 1.3 棉花幼苗的生长测定

处理培养 3 周后分别测定每个处理的棉花幼苗株高(cm)、每株主根长(cm)和侧根数。根长和侧根数测定采用直接法,把待测根系放置在有浅水层的玻璃盘中,用蒸馏水湿润,然后将玻璃盘放在带有毫米刻度的方格坐标纸上,用镊子把根拉直并用一块玻璃板压着使其不移动,根据坐标刻度计算根系长度(精确到 0.1 cm)并统计侧根数。

### 1.4 基因组 DNA 及 RNA 提取纯化

对照和处理的棉花幼苗培养 3 周后用于提取DNA和RNA。以改良CTAB法提取DNA<sup>[23]</sup>,DNA溶于TE缓冲液后加入RNA酶( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ )去除RNA,纯化后的DNA质量和浓度采用 0.8%琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪(Backman DU800)进行检测,于 4 或  $-20$  冰箱中保存备用。同时,参考朱龙付等<sup>[24]</sup>方法分别取其叶片和根(对照和 200  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl的处理)提取总RNA并合成cDNA第一链,合成的cDNA稀释到 200  $\mu\text{L}$ 后  $-20$  冰箱中保存用作RT-PCR(reverse transcription PCR)分析。

RT-PCR 以 1.5  $\mu\text{L}$  cDNA 为模板,退火温度为 60 ,扩增反应 26 循环,*Gbpolyubiquitin-1* 基因用作参照。扩增引物为 M2, 5'-GACATCTTGGTCTATTCAGGAG-3', 5'-GAACTCACACTTACTGAACTTAGC-3'; M3, 5'-CTATTCAGGAGATGAGACCG-3', 5'-CATGACCCAAGAAGCTAACC-3'。

### 1.5 MSAP 分析及聚丙烯酰胺凝胶电泳

MSAP分析采用Zhao等<sup>[25]</sup>方法,采用的接头、预扩增引物及选择性扩增引物见表1。MSAP扩增产物经6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,硝酸银染色后进行H(*EcoR* I/*Hpa* II)和M(*EcoR* I/*Msp* I)泳道条带数及带型统计分析。每一条带代表一个酶切识别位点,清晰可见的条带有无分别记为1和0。

表 1 MSAP 分析所用的接头和引物序列  
Table 1 Sequences of adaptors and primers for MSAP analysis

接头与引物 Adaptor and primer	序列 Sequence	
	<i>EcoR</i> I (E)	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (HM)
接头 Adaptor	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3' 3'-CTACTCAGATCTTGC-5'
预扩增引物 Pre-amplification primer	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCA-3' (E+A)	5'-GATGAGTCTAGAACGGT-3' (HM+T)
选择性扩增引物 Selective-amplification primer	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCAAC-3' E+AAC (E4) 5'-GTAGACTGCGTACCAATTCATA-3' E+ATA (E5) 5'-GTAGACTGCGTACCAATTCAGG-3' E+ACG (E15) 5'-GTAGACTGCGTACCAATTCAGC-3' E+AGC (E16)	5'-GATGAGTCTAGAACGGTCA-3' HM+TCA (HM25) 5'-GATGAGTCTAGAACGGTCC-3' HM+TCG (HM27) 5'-GATGAGTCTAGAACGGTCC-3' HM+TCC (HM28) 5'-GATGAGTCTAGAACGGTGA-3' HM+TGA (HM29) 5'-GATGAGTCTAGAACGGTGT-3' HM+TGT (HM30)

E: *EcoR* I 接头; HM: *Hpa* II-*Msp* I 接头。E: *EcoR* I adaptor; HM: *Hpa* II-*Msp* I adaptor.

## 1.6 MSAP 差异片段的回收与克隆

用干净手术刀切下差异显示带, 放入离心管中, 加双蒸水洗涤, 然后 1×PCR 缓冲液洗涤, 100 μL 1×PCR 缓冲液 94 保温 0.5 h, -20 保存留作 PCR 重扩增。纯化后的重扩增产物连接入 T-Vector (Promega, USA) 后转化入 *E. coli* DH5α。经蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆测序(北京奥科生物技术有限责任公司), 并在 GenBank 中进行了 Blast 序列分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

## 1.7 数据分析

采用 Excel 分析数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐胁迫对棉花的生长影响

从图 1 可以看出, 100 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 对株高和根长有明显的促进作用, 当 NaCl 浓度达 200 mmol L<sup>-1</sup> 时会显著抑制株高和根长。因为 Na<sup>+</sup> 是细胞活性的必需元素, 但过量的 Na<sup>+</sup> 会影响细胞的渗透势, 同时细胞内累积大量的 Na<sup>+</sup> 还会造成毒害。另外, 在 100、150 和 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 处理下棉花幼苗侧根的数量被显著地抑制。这可能与棉花吸收的 Na<sup>+</sup> 主要存储在根系而造成离子毒害有关<sup>[26]</sup>。

### 2.2 NaCl 胁迫引起的甲基化水平的变化

样品 DNA 经 *Hpa* II/*EcoR* I (H) 和 *Msp* I/*EcoR* I (M) 酶切后的产物通常有 4 种甲基化类型(图 2-A), 但在聚丙烯酰胺凝胶电泳分析胶上只能检测出 3 种甲基化类型(如图 2-B)。其中, 类型 I (type I) 表明 CCGG 位点未发生甲基化, 类型 II (type II) 表明 CCGG 位点

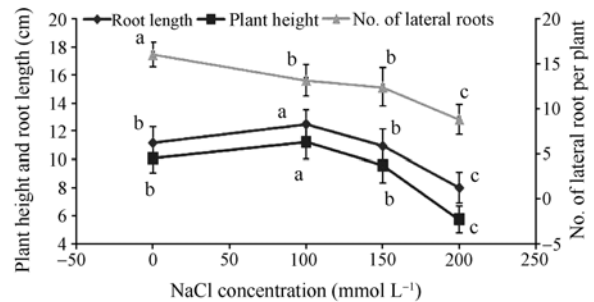


图 1 NaCl 对棉花苗生长的影响

Fig. 1 Effect of NaCl on the growth of cotton seedlings  
每个处理 30 株, 不同处理之间的差异显著性水平用不同的字母表示 ( $P < 0.05$ )。

Data are means±SD ( $n=30$ ). Significant differences between treatments are shown at  $P < 0.05$  with different letters.

发生半甲基化, 类型 III (type III) 表明 CCGG 位点发生全甲基化。

为了检测棉花在响应盐胁迫过程中的 DNA 甲基化模式, 利用不同的引物组合(表 1)对来自对照和盐处理的棉花根基因组 DNA 进行 MSAP 分析。表 2 表明, 3 种不同浓度的 NaCl 胁迫能导致棉花幼苗根中全基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平的降低, 而且全甲基化率高于半甲基化率。由此推测, 在盐胁迫下棉花根基因组 CCGG 位点发生甲基化的方式主要是以双链全甲基化 (C<sup>m</sup>CGG) 为主。另外, 随着 NaCl 处理浓度的升高, 棉花根基因组 DNA 甲基化水平呈下降的趋势, 甲基化水平的增加与处理浓度之间存在显著的剂量效应关系 ( $r = -0.986$ )。

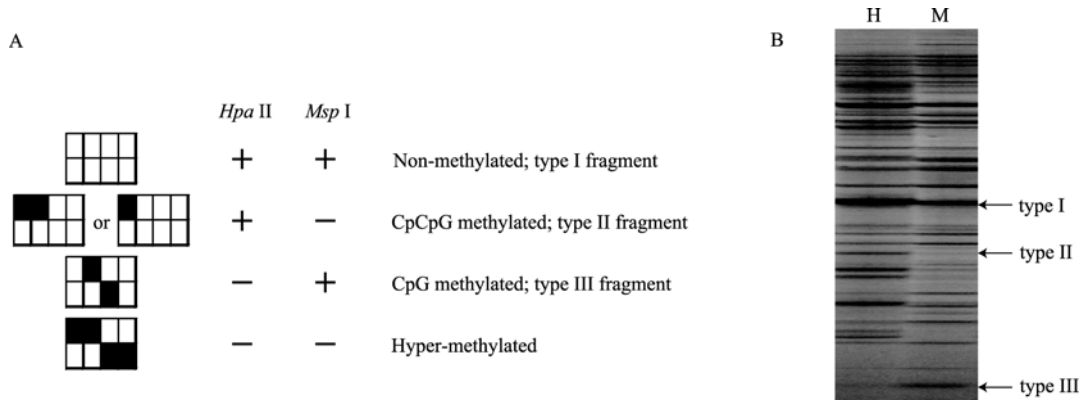


图 2 *Msp I* 和 *Hpa II* 对 5'-CCGG 甲基化状态的敏感性(A, 来自 REBASE)及 PAGE 胶带型(B)

Fig. 2 *Msp I* and *Hpa II* sensitivities to 5'-CCGG methylation status (A, from REBASE) and types of bands from PAGE(B)

方块: 双链的 *Hpa II*-*Msp I* 识别位点 CCGG; 黑色方块: 甲基化的胞嘧啶; +: 有酶切; -: 无酶切。类型 I: 无甲基化; 类型 II: 半甲基化(即一条链甲基化); 类型 III: 全甲基化(即双链甲基化)。

White boxes: the double-stranded, four-base *Hpa II*-*Msp I* recognition site (CCGG); black boxes: methylated cytosine; +: digestion; -: undigestion; type I: MSAP band of unmethylated site; type II: MSAP band of hemimethylated site (5'-CCGG-3' in single strand); type III: MSAP band of fully-methylated site (5'-CCGG-3' in double strands).

表 2 不同浓度 NaCl 处理对棉花幼苗根基因组 DNA 甲基化水平的影响

Table 2 Effects of different NaCl concentrations on the levels of genomic DNA methylation in cotton seedling roots

NaCl 浓度 NaCl concentration	甲基化扩增类型 Types of amplified bands			总扩增带数 <sup>a</sup> Total amplified bands <sup>a</sup>	全甲基化比率 Fully methylated loci ratio (%)	总甲基化带数 <sup>b</sup> Total methylated bands <sup>b</sup>	MSAP (%)
	类型 I Type I	类型 II Type II	类型 III Type III				
0 mmol L <sup>-1</sup>	163	27	87	277	31.4	114	41.2
100 mmol L <sup>-1</sup>	172	18	88	278	31.7	106	38.1
150 mmol L <sup>-1</sup>	169	13	79	261	30.3	92	35.2
200 mmol L <sup>-1</sup>	169	13	76	258	29.5	89	34.5

<sup>a</sup>: 总扩增带数=I+II+III; <sup>b</sup>: 总甲基化带数=II+III; 全甲基化比率=类型III/总扩增带数; MSAP=总甲基化带数/总扩增带数。

<sup>a</sup>: total amplified bands=I+II+III; <sup>b</sup>: total methylated bands=II+III. Fully methylated loci ratio=III/(I + II + III); MSAP=(II + III)/(I + II + III).

### 2.3 NaCl 胁迫引起的甲基化状态变化

利用不同的引物组合在 3 个 NaCl 处理和对照样品 DNA 的 *Hpa II*/*EcoR I*(H)和 *Msp I*/*EcoR I*(M)酶切产物中进行选择性扩增, 共扩增出 286 条带。各引物组合检测到条带数目为 25~50, 平均约 41 条。NaCl 处理与对照的甲基化敏感性扩增共出现 12 种带型(图 3 和表 3)。甲基化带型主要有多样性和单态性 2 种。多样性即对照与处理在甲基化模式上不同, 表明 CCGG 位点甲基化状态在 NaCl 处理后发生改变。该多样性又有 3 种状态即甲基化(A 型)、去甲基化(B 型)和不定类型(C 型)。其中, A 型中的 A1 和 A2 为重新甲基化(对照 H 和 M 泳道都有带, 而处理仅 H 或 M 泳道有带), A3 和 A4 为超甲基化(对照仅 H 或 M 有一条带, 而处理 H 和 M 泳道都没带)。A 型表明盐胁迫诱导棉花根基因组 DNA 发生了甲基化水平增加的变化; B 型含 B1、B2、B3 和 B4, 为去甲基化类型, 甲基化状态与 A 型相反, 表明盐胁迫

后基因组 DNA 发生了甲基化水平下降的变化; C 型为不定类型, 对照组与处理组中 DNA 甲基化程度的差异无法确定。单态性即对照与处理之间有相同的带型(D 型), 表明 NaCl 处理后在 CCGG 位点的甲基化状态没发生变化。其中, D1 型为未甲基化, D2 和 D3 为半甲基化。处理与对照的甲基化模式带型 A、B、C 和 D 及相应的位点数见表 3。

由表 3 可以看出, 100、150 和 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 处理的棉花幼苗根基因组 DNA 甲基化(A 型)位点数分别为 17、20 和 29, 占总甲基化多样性扩增位点数的 6.4%、7.6%和 11.3%; 去甲基化(B 型)位点数分别为 34、29 和 21, 占总甲基化多样性扩增位点数的 12.7%、11.1%和 8.2%。其中, 与对照相比, 100、150 和 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 处理后的总甲基化多样性分别为 19.5%、19.6%和 20.3%, 甲基化状态未发生变化(D 型)比率分别为 80.5%、80.4%和 79.7%。由此可以看出, NaCl 胁迫处理后, 棉花幼苗根基因组 DNA 的甲基化程

度增加; 在扩增的甲基化位点中, 低浓度NaCl胁迫会诱导去甲基化的位点数高于发生甲基化的位点数, 但随着NaCl浓度的增加发生甲基化的位点数高于去甲基

化的位点数(图 4), 同时基因组DNA甲基化多态性也随之增加。表明棉花幼苗根基因组DNA的甲基化和去甲基化之比会随着NaCl胁迫的增强而逐步提高。

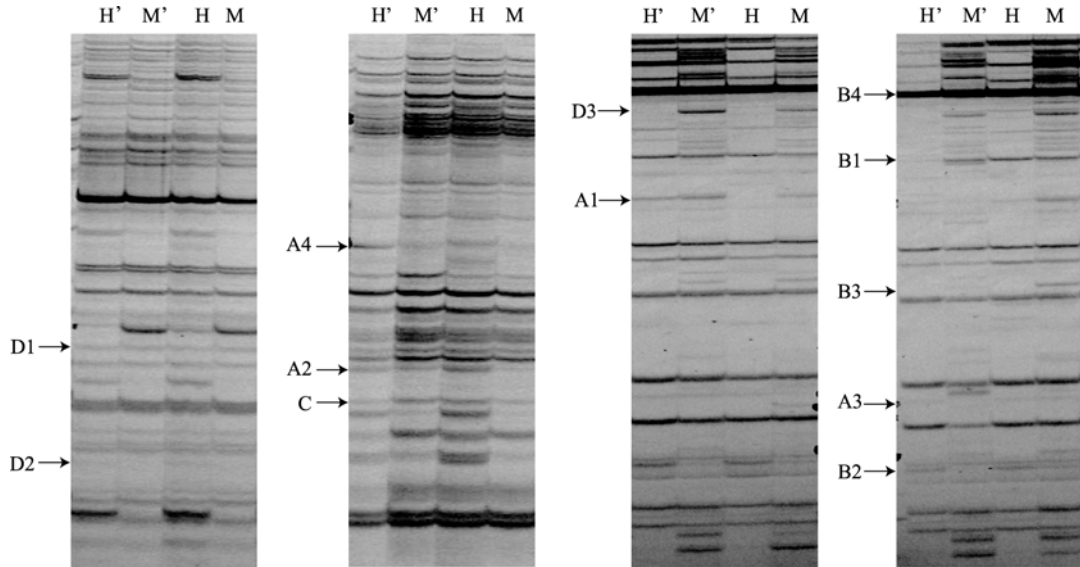


图 3 NaCl 处理与对照之间植株根基因组的甲基化敏感性扩增结果

Fig. 3 Profiles of MSAP between control and NaCl treatments

H'和H为 *Hpa II/EcoR I* 酶切, M'和M为 *Msp I/EcoR I* 酶切。H'和M'泳道为对照组的MSAP带型, 而H和M泳道为处理组的MSAP带型。A、B、C和D所示带型见表3。

H' and H represent digestion with *Hpa II/EcoR I*, M' and M represent digestion with *Msp I/EcoR I*. Lanes H' and M' are MSAP patterns of control, while Lanes H and M are those of NaCl treatments. Band patterns of A, B, C, and D are referred to Table 3.

表 3 NaCl 处理与对照的甲基化状态

Table 3 Patterns of DNA methylation in NaCl treatments and control

酶切 <sup>a</sup> Digestion <sup>a</sup>				甲基化状态变化 Changes of methylation status		差异数量 Numbers of sites			带型 <sup>b</sup> Band pattern <sup>b</sup>
H	M	H	M	处理前 Before treatment	处理后 After treatment	CK-100	CK-150	CK-200	
0	0	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	7	5	4	B3
0	0	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	4	3	2	B4
0	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	11	8	6	B1
1	0	1	1	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	12	13	9	B2
1	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	3	4	6	A2
1	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	6	5	9	A1
0	1	0	0	CCGG GGCC	CCGG GGCC	5	7	9	A3
1	0	0	0	CCGG CCGG GGCC GGCC	CCGG GGCC	3	4	5	A4
0	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	1	2	2	C
1	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	147	145	150	D1
1	0	1	0	CCGG CCGG GGCC GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	20	22	19	D2
0	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	48	44	35	D3

<sup>a</sup>: H和M分别代表 *Hpa II/EcoR I* 和 *Msp I/EcoR I* 酶切; <sup>b</sup>: 带型参考图 3; C和CC表示甲基化的胞嘧啶; 1: 有带, 0: 无带。

<sup>a</sup>: H and M represent digestion with *Hpa II/EcoR I* and *Msp I/EcoR I* respectively; <sup>b</sup>: band patterns are referred to Fig. 3; C and CC represent methylated cytosine; 1: presence of band; 0: absence of band.

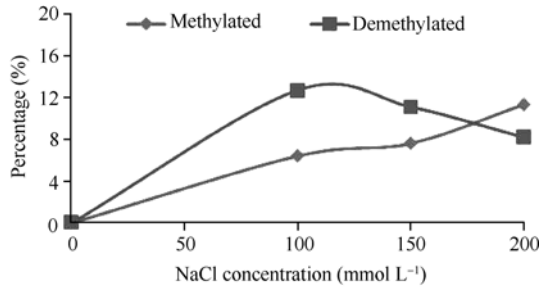


图4 NaCl胁迫引起的棉花幼苗根基因组DNA甲基化和去甲基化的变化趋势

Fig. 4 Trends of DNA methylation and demethylation changes in cotton roots under NaCl stress

## 2.4 MSAP多态性片段的序列分析

通过MSAP分析, 处理(200 mmol L<sup>-1</sup>)和对照之间10条差异的片段被分离和测序。同源分析结果表明, 有5条片段与已知具有功能特征的基因同源, 其中M2和M3片段分别与棉花基因组功能基因GH\_TMO *Gossypium hirsutum* cDNA (*E*-value of 3E-54) and *Gossypium barbadense* strain Giza 45 gypsy retrotransposon reverse transcriptase gene (*E*-value of 5E-52) 高度同源(表4)。M6片段与棉花

功能基因GR\_Ea *Gossypium raimondii* cDNA clone GR\_Ea04F21 3', mRNA sequence (*E*-value of 5E-57) 高度同源。这些与棉花功能基因同源的MSAP差异片段在对照与处理(200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl)之间存在甲基化状态的变异, 表明其可能调控与盐胁迫响应的基因表达有关, 或者直接表达而参与盐胁迫响应。

为了进一步确定盐胁迫下这些甲基化片段的甲基化模式变化与其基因表达有关, 本实验利用与M2和M3高度同源的陆地棉cDNA基因GH\_TMO和海岛棉gypsy反转座子反转录酶基因设计的两对引物, 对棉花幼苗的根和叶进行了RT-PCR分析。利用合成的引物进行RT-PCR分析结果表明(图5), 与M2和M3同源的陆地棉cDNA克隆GH\_TMO和海岛棉gypsy反转座子反转录酶基因仅在对照的叶片中有很低的表达, 而在NaCl处理的叶片中没有表达; 与此相反, 这两个基因在对照的根中没有表达, 而在NaCl处理的根中有很高的表达。与对照相比, NaCl处理下(200 mmol L<sup>-1</sup>)这两个片段都是发生胞嘧啶去甲基化的。由此可以看出, NaCl胁迫诱导这两个甲基化相关的基因发生去甲基化而表达以适应逆境胁迫。

表4 MSAP片段的序列分析  
Table 4 Sequence analysis of MSAP fragments

片段 <sup>a</sup> Fragment <sup>a</sup>	长度 <sup>b</sup> Length <sup>b</sup> (bp)	引物组合 <sup>c</sup> Combination <sup>c</sup> E/HM	模式 <sup>d</sup> Pattern <sup>d</sup>	GenBank accession No.	同源序列 Homologous sequence	<i>E</i> 值 <i>E</i> -value
M2	120	AGG/TCC	II→I	ES806581	GH_TMO <i>Gossypium hirsutum</i> cDNA	3E-54
M3	138	AGG/TCC	II→I	GBU75247	<i>Gossypium barbadense</i> strain Giza 45 gypsy retrotransposon reverse transcriptase gene	5E-52
M6	237	AAC/TGC	II→—	CO086416.1	GR_Ea <i>Gossypium raimondii</i> cDNA clone GR_Ea04F21 3', mRNA sequence	3E-57
M1	156	AGG/TCC	I→II	EU532253.1	<i>Gossypium barbadense</i> clone I6-1 ISSR marker genomic sequence	1E-20
M4	132	AGG/TGA	—→III	CO071702	<i>Gossypium raimondii</i> cDNA clone GR_Ea30D16 3', mRNA sequence	1E-18
M5	78	AGC/TGT	I→II	EE611552	CHW(LMS) silverleaf sunflower <i>Helianthus argophyllus</i> cDNA clone CHWL858, mRNA sequence	3E-16

<sup>a</sup>: 对照和处理(200 mmol L<sup>-1</sup>)之间的MSAP多态性片段; <sup>b</sup>: MSAP多态性片段长度; <sup>c</sup>: MSAP片段扩增所用引物组合(E为*EcoR* I引物; HM为*Hpa* II/*Msp* I引物); <sup>d</sup>: 对照与处理(200 mmol L<sup>-1</sup>)之间带型转变, 带型参考图2-B。

<sup>a</sup>: MSAP fragment between control and the treatment (200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl); <sup>b</sup>: length of MSAP fragment; <sup>c</sup>: combination of primers used in the amplification of the MSAP fragment (E: *EcoR* I primers; HM: *Hpa* II/*Msp* I primers); <sup>d</sup>: transition of band patterns between control and treatment (200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl). —: absence; →: change to. Types of band are referred to Figure 2-B.

## 3 讨论

植物在生长发育过程中, DNA甲基化水平的改变在调控重要功能基因表达、基因组防御以及细胞发育与分化等方面具有重要作用<sup>[27-28]</sup>。一般认为, 植物基因中的启动子和编码区的过度甲基化能阻碍转录因子复合体与DNA的结合抑制基因的表达, 引

起基因沉默; 而去甲基化则有利于基因表达。因此, 掌握基因组甲基化水平的变化有助于研究功能基因的表达调控以及植物适应逆境胁迫的分子机理。

在本研究中, 100 mmol L<sup>-1</sup> NaCl对棉花幼苗有促进作用, 但200 mmol L<sup>-1</sup>会严重抑制其生长。这与在角果木(*Ceriops tagal*)和油菜(*Brassica napus*)中的报道相似<sup>[29-30]</sup>。低盐促进植物生长主要是因为Na<sup>+</sup>是

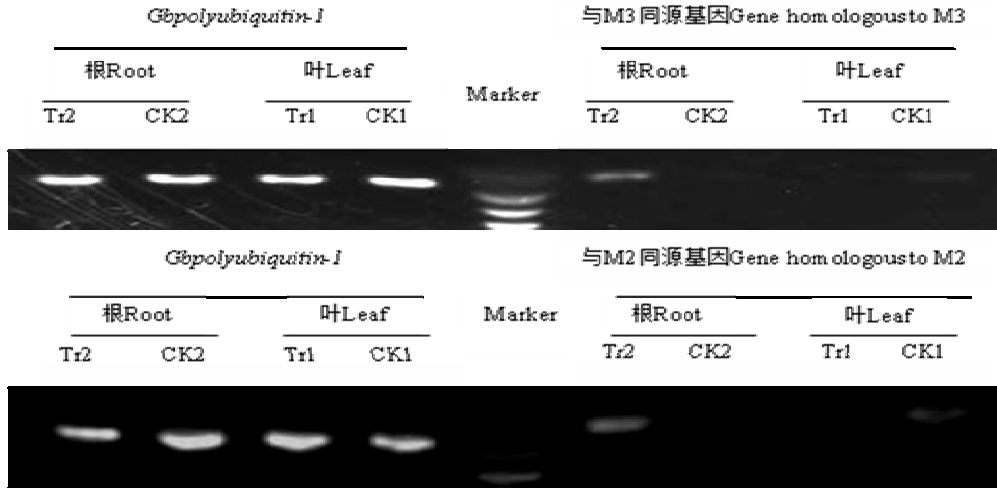


图 5 M2 和 M3 同源的基因在棉花幼苗根和叶中的表达分析(*Gbpolyubiquitin-1* 基因作为参照)

Fig. 5 Expressions of genes homologous to M2 and M3 respectively in leaf and root of cotton treated and untreated with NaCl (*Gbpolyubiquitin-1* gene was amplified as a loading control)

CK1 和 Tr1 分别为对照及 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 处理的叶片; CK2 和 Tr2 分别为对照及 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 处理的根。

CK1 and Tr1 represent leaves of control and treatment with 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl respectively; CK2 and Tr2 represent roots of control and treatment with 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl respectively.

细胞活性的必需元素,特别是盐生植物<sup>[30]</sup>。然而,过量的盐会造成植物细胞早期水分亏缺,降低了植物的吸水能力而影响植物生长;后期会对植物细胞造成毒性作用影响细胞代谢而进一步抑制植物生长。另外,盐胁迫显著降低棉花幼苗的侧根数,这与前人的研究结果一致<sup>[32]</sup>。导致侧根数量降低的主要原因是在水分胁迫下侧根的起始与延伸被抑制了<sup>[33-34]</sup>。

通常高等植物DNA被甲基化的碱基是胞嘧啶,不同植物及不同组织DNA甲基化不完全一致<sup>[27]</sup>。从本研究对正常生长的棉花幼苗根的MSAP分析来看,其甲基化敏感扩增位点多态性(全甲基化和半甲基化位点)占总扩增位点数的比例达到了41%,这一结果高于Zhao等<sup>[25]</sup>人的结果,这可能与其所用材料不同有关。但本研究结果与拟南芥的甲基化水平(35%~43%)相近<sup>[35]</sup>。另外,在植物基因组中CAG、CTG和CCG位点也经常发生甲基化,但MSAP方法只能检测CG和部分CCG的甲基化情况且对于双链内外胞嘧啶甲基化无法检测,因此整个基因组中胞嘧啶的实际甲基化率可能高于本实验的结果。

逆境胁迫能够提高DNA甲基化水平,如重金属(Cd、Pb)可以引起水稻、小麦、油菜等幼苗基因组中的总甲基化水平升高<sup>[36-37]</sup>。但在本研究中,不同浓度NaCl胁迫处理下,棉花幼苗根基因组中的总甲基化水平逐渐下降,且与NaCl浓度呈有负相关。这与在重金属胁迫苜蓿的结果相一致<sup>[38]</sup>。盐胁迫下的

棉花幼苗根基因组DNA甲基化水平的降低,推测是由于胁迫引起低甲基化与基因表达有关。研究表明,低甲基化被认为是一种简单且间接影响逆境胁迫的方式或者是一种准确调控基因表达的防御机制,因此特异序列的甲基化变异经常与改变的基因表达有关<sup>[39]</sup>。

通过对不同浓度NaCl胁迫下棉花幼苗根基因组DNA甲基化模式的分析,发现NaCl处理和对照之间甲基化带型的变化主要有4种。随着NaCl浓度的增加,棉花幼苗根基因组DNA甲基化的比率持续上升,而去甲基化比率却下降(图5)。这与其他逆境胁迫下的DNA甲基化模式变化趋势一致<sup>[39]</sup>。另外,NaCl胁迫下棉花幼苗根基因组DNA的甲基化模式变化趋势也与其生长趋势相似。NaCl浓度在100 mmol L<sup>-1</sup>时棉花幼苗根基因组DNA的去甲基化高于甲基化,其生长是受到促进的;但是当NaCl浓度达到200 mmol L<sup>-1</sup>时棉花幼苗根基因组DNA的去甲基化急剧降低,而甲基化显著升高,生长也受到抑制。由此推测,棉花幼苗经NaCl胁迫处理后基因组DNA某些位点的甲基化状态发生变化而使基因表达发生了改变,产生或启动对NaCl胁迫的能动应激机制,将毒害降到最小,从而有利于植株的生长发育<sup>[36]</sup>;当胁迫持续增强时利用甲基化关闭相关基因而终止其表达,以减少消耗来维持最低的生长发育。这与生长在高电离辐射区的松树基因组DNA发生甲基化程度升高的

变异, 构建基因组防御体系以维持基因组稳定的机制相似<sup>[39]</sup>。

植物基因组DNA的甲基化是调节基因功能的重要手段, 例如许多内源基因在经甲基化抑制剂 5-氮胞苷(5-azacytidine)处理后被激活<sup>[17]</sup>。为了深入了解功能基因的甲基化与响应NaCl胁迫是否有关, 我们将对照与处理(200 mmol L<sup>-1</sup>)之间的多态性片段进行了测序。利用Blast分析发现 5 条片段与具有功能特征的基因同源(表 4), 分别是陆地棉cDNA基因GH\_TMO、海岛棉gypsy反转座子反转录酶基因、雷蒙德棉cDNA克隆GR\_Ea04F21 的 3'端mRNA序列、雷蒙德棉cDNA克隆GR\_Ea30D16 的 3'端mRNA序列和向日葵cDNA克隆CHWL858 的mRNA序列。这些基因在对照与处理之间存在不同的甲基化修饰(表 4), 显示其可能参与了盐胁迫响应。其中, 与M3 片段同源的基因编码反转座子的反转录酶, 是转座子转座所必需。反转座子是植物基因组中最丰富的移动元件, 在环境胁迫诱导的基因组重组中起着重要作用<sup>[40-41]</sup>。在植物基因组中, 反转座子中包含有DNA甲基化的一些位点。这些序列通过被甲基化和沉默来保护宿主基因组。Cheng等<sup>[42]</sup>研究反转座子Tos17 的甲基化模式与转座行为的相互关系时, 发现其转座活性与其DNA甲基化水平呈负相关。反转座子除通过其本身的转座以使植物基因组适应逆境胁迫外, 还具有改变其临近基因表达的潜力<sup>[42-43]</sup>。在本研究中, RT-PCR分析结果表明在 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl胁迫下反转座子反转录酶基因在棉花幼苗根中表达升高, 而在对照中没有表达, 说明在盐胁迫下棉花幼苗根中反转座子的转录活性得到增强。

总之, 通过 MSAP 检测到在不同的盐胁迫下棉花幼苗根基因组中的胞嘧啶甲基化存在差异, 至少有些差异的片段是与棉花幼苗的根响应盐胁迫有关。然而, 还需要更多包含甲基化修饰的 5'-CCGG-3'序列的分离和基因功能的研究才能更深入地理解盐胁迫下基因组 DNA 的甲基化及逆境适应的机制。

#### 4 结论

棉花幼苗对不同浓度NaCl的胁迫反应不同。100 mmol L<sup>-1</sup> NaCl对棉花幼苗的生长有促进作用, 而NaCl浓度超过 150 mmol L<sup>-1</sup>时会抑制其生长; 同时盐胁迫还抑制棉花幼苗侧根的数量。棉花幼苗根基因组DNA的甲基化水平随着NaCl盐胁迫浓度的升高而逐渐降低, 以此启动基因的表达来响应盐胁迫。

#### References

- [1] Saze H, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J. Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet*, 2003, 34: 65–69
- [2] Chan S W L, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome DNA methylation *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 351–360
- [3] Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1991, 55: 451–458
- [4] Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 662–673
- [5] Jablonka E, Goiten R, Marcus M, Cedar H. DNA hypomethylation causes an increase in DNase I sensitivity and an advance in the timing of replication of the entire X chromosome. *Chromosoma*, 1985, 93: 152–156
- [6] Jullien P E, Kinoshita T, Ohad N, Berger F. Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell*, 2006, 18: 1360–1372
- [7] Adams K L, Percifield R, Wendel J F. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*, 2004, 168: 2217–2226
- [8] Zluvova J, Janousek B, Vyskot B. Immuno-histochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *J Exp Bot*, 2001, 52: 2263–2273
- [9] Jaligot E, Beule T, Rival A. Methylation-sensitive RFLPs: Characterization of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 1263–1269
- [10] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonuclease and DNA modification methyltransferases. *Nucl Acids Res*, 1994, 17: 3640–3659
- [11] Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars. *Plant Mol Biol*, 2001, 45: 31–39
- [12] Cervera M T, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater J M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol Genet Genom*, 2002, 268: 543–552
- [13] Hao Y J, Deng X X. Stress treatments and DNA methylation affected the somatic embryogenesis of *Citrus* callus. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 673–677
- [14] Portis E, Acquadro A, Comino C, Lanteri S. Analysis of DNA methylation during germination pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci*, 2004, 166: 169–178
- [15] Xiong L M, Karen S S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 2002, 14(suppl): 165–183
- [16] Richards E J, Peacock W J, Dennis E S. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10: 217–223
- [17] Xiao W, Custard K D, Brown R C, Lemmon B E, Harada J J,



- Goldberg R B, Fischer R L. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*, 2006, 18: 805–814
- [18] Finnegan E J, Genger R K, Kovac K, Kovac K, Peacock W J, Dennis E S. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5824–5829
- [19] Wassenegger M, Pelissier T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 349–362
- [20] Edward K, Catherine A, Jim H, Mark A, Marc R. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J*, 2000, 23: 267–278
- [21] Hu H H, Dai M Q, Yao J L, Xiao B Z, Li X H, Zhang Q F, Xiong L Z. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12987–12992
- [22] He X J, Mu R L, Cao W H, Zhang Z G, Zhang J S, Chen S Y. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J*, 2005, 44: 903–916
- [23] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, He D H, Wu M Q. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. *Chin Sci Bull*, 2003, 48: 2063–2067
- [24] Zhu L-F(朱龙付), Tu L-L(涂礼丽), Zeng F-C(曾范昌), Liu D-Q(刘迪秋), Zhang X-L(张献龙). An improved simple protocol for isolation of high quality RNA from *Gossypium* spp. suitable for cDNA library construction. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(12): 1657–1659 (in Chinese with English abstract)
- [25] Zhao Y, Yu S, Xing C, Fan S, Song M. Analysis of DNA methylation in cotton hybrids and their parents. *Mol Biol*, 2008, 42: 169–178
- [26] Ye W-W(叶武威), Pang N-C(庞念厂), Wang J-J(王俊娟), Fan B-X(樊宝相). Characteristics of absorbing, accumulating and distribution of Na<sup>+</sup> under the salinity stress on cotton. *Cotton Sci* (棉花学报). 2006, 18(5): 279–283(in Chinese with English abstract)
- [27] Richards E J. DNA methylation and plant development. *Trends Genet*, 1997, 13: 319–323
- [28] Yoder J A, Walsh C P, Bester T H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 1997, 13: 335–340
- [29] Khan M A. Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from the Indus delta, Pakistan. *Aquatic Bot*, 2001, 70: 259–268
- [30] Lu G Y, Wu X M, Chen B Y, Gao G Z, Xu K. Evaluation of genetic and epigenetic modification in rapeseed (*Brassica napus*) induced by salt stress. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49: 1599–1607
- [31] Parida A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2005, 60: 324–349
- [32] Spollen W G, Sharp R E, Saab I N, Wu Y. Regulation of Cell Expansion in Roots and Shoots at Low Water Potentials. In: Smith J A C, Griffiths H, eds. Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1993. pp 37–52
- [33] Van der Weele C M, Spollen W G, Sharp R E, Baskin T I. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J Exp Bot*, 2000, 51: 1555–1562
- [34] Deak K I, Malamy J. Osmotic regulation of root system architecture. *Plant J*, 2005, 43: 17–28
- [35] Cervera M T, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater J M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol Genet Genom*, 2002, 268: 543–552
- [36] Ge C-L(葛才林), Yang X-Y(杨小勇), Liu X-N(刘向农), Sun J-H(孙锦荷), Luo S-S(罗时石), Wang Z-G(王泽港). Effect of heavy metal on levels of methylation in DNA of rice and wheat. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与生物化学学报), 2002, 28: 363–368 (in Chinese with English abstract)
- [37] Labra M, Ghiani A, Citterio S, Sgorbati S, Sala F, Vannini C, Ruffini-Castiglione M, Bracale M. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips. *Plant Biol*, 2002, 4: 694–699
- [38] Aina R, Sgorbati S, Santagostino A, Labra A, Ghiani A, Citterio S. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiol Plant*, 2004, 121: 472–480
- [39] Kovalchuk O, Burke P, Arkhipov A, Kuchma N, Jill James S, Kovalchuk I, Pogribny I. Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl—A mechanism for radiation adaptation? *Mutation Res*, 2003, 529: 13–20
- [40] Kumar A, Bennetzen J L. Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet*, 1999, 33: 479–532
- [41] Feschotte C, Jiang N, Wessler R S. Plant retrotransposable elements: Where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 329–341
- [42] Cheng C, Daigen M, Hirochika H. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Mol Genet Genom*, 2006, 276: 378–390
- [43] Kashkush K, Feldman M, Levy A A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat Genet*, 2003, 33: 102–106