

菊花组织培养继代过程中的 DNA 甲基化变化

聂丽娟, 王子成*, 何艳霞

(河南大学农业生物技术研究所, 河南开封 475001)

摘要: 采用 MSAP (甲基敏感扩增多态性) 方法对菊花 (*Dendranthema ×grandiflorum*) 组织培养继代过程中的 DNA 甲基化情况进行了分析。结果发现, 3 个单芽系的组培苗较田间材料均有 DNA 甲基化增加和减少现象, 采用 7 对引物, 共扩增出 929 条带, 各单芽系 DNA 甲基化变异率分别为 8.929%、8.902% 和 8.986%。继代材料较母体均有甲基化变异发生, 且变异类型中 DNA 甲基化减少的比例高于甲基化增加的比例, 随着继代次数的增加, 两种变异间的差异逐渐减小, 比例相近。同时在同一单芽系内的不同次继代个体间有 DNA 甲基化变化现象, 对 5 次继代的 180 个个体研究发现, 带型变化中 18.38% 的带型不一致, 2.99% 为一个或两个个体发生了变化, 仅有 1.72% 在发生变化后趋于稳定, 另外 10.68% 的带型呈现不稳定的随机变化。

关键词: 菊花; 继代培养; MSAP 方法; DNA 甲基化变化; 变异率

中图分类号: S 682.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 11-1689-06

The Variation of DNA Methylation Variation During Successive Transfer Culture of Chrysanthemum (*Dendranthema ×grandiflorum*)

NIE Li-juan, WANG Zi-cheng*, and HE Yan-xia

(The Institute of Agriculture Biotechnology, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China)

Abstract: This study analysed the DNA methylation statistic during the successive transfer culture of chrysanthemum (*Dendranthema ×grandiflorum*) by MSAP (methylation sensitive amplified polymorphism) technique. The results indicated that three single shoot system of the tissue culture seedling had distinct DNA hypemethylation and hypomethylation variety compared to the field materials. Nine hundred and twenty-nine fragments were amplified using 7 pairs of selective primers, and the mutation rates were 8.929%, 8.902% and 8.986%, respectively. All the successive transfer materials had DNA methylation variety compared to the parent materials. During the variation, hypomethylation were more than hypemethylation. A long with the successive transfer culture, the diversity between the two variety pattern was smaller, and the proportion was almost similar. Meanwhile, the different individual of each single shoot system also existed DNA variation phenomenon. Among the 180 individuals of quintic successive transfer culture, 18.38% bands pattern was not identical during the variational bands pattern, 2.99% was one or two individual variation, 1.72% bands pattern was stabilization after variety, while 10.68% showed unstable stochastic variety.

Key words: chrysanthemum; successive transfer culture; MSAP technique; DNA methylation variation; mutation rate

菊花 (*Dendranthema ×grandiflorum*) 的繁殖主要靠扦插, 但扦插需较多的母株材料, 受季节和外界环境条件的限制, 繁殖速度较慢。

植物组织培养技术既可以进行优良品种的快速繁殖, 又可以进行品种的脱毒、复壮、种质保存等

收稿日期: 2008-06-12; 修回日期: 2008-08-14

基金项目: 河南省教育厅高校青年骨干教师资助项目 (200733529); 河南大学校内基金重点项目 (06ZDZR011)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wzc@henu.edu.cn)

研究, 现已广泛应用于菊花的栽培和育种 (Antequera et al, 1990; Lund et al, 1995; Ronemus et al, 1996; Ramchandani et al, 1999)。但有研究表明组织培养过程中会发生体细胞无性系变异 (Duncan, 1997; Kaeppler et al, 2000), 而组织培养中诱发的 DNA 甲基化变化在一定程度上是体细胞无性系变异的分子机制之一 (Kaeppler et al, 2000)。植物组织培养过程中培养基中一些生长调节因子, 如 2, 4-D, 奈乙酸等的应用均能使基因发生甲基化 (LoSchiavo et al, 1989)。胡萝卜体细胞胚胎发生过程中伴随着 DNA 甲基化变化 (LoSchiavo et al, 1989; Munksgaard et al, 1995), 在早期分化阶段 DNA 甲基化变化少于后期体细胞胚胎发生阶段。水稻、马铃薯、番茄等的再生植株均有 DNA 甲基化变化发生 (Kaeppler & Phillips, 1993; Harding, 1994; Smulders et al, 1995)。

本研究以菊花品种‘墨麒麟’为材料, 对组织培养继代过程中的 DNA 甲基化变化情况进行研究分析, 从而在表观遗传方面为菊花组培过程中的体细胞无性系变异提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

分别取 3 株‘墨麒麟’菊花 (材料源于开封市禹王台公园) 营养生长阶段的茎段作为外植体, 于继代培养基上建立 3 个独立的单芽系, 分别编号为 a、b、c。所用继代培养基为 MS + 6-BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

培养 30 d, 外植体茎段上长出丛生芽时将其进行第 1 次继代, 之后每 40 d 继代 1 次并连续继代 5 次。前 3 代因群体较小, 选所有个体进行分析, 后两代则从各代中随机选取 20 个个体进行分析。以其中一个外植体 b 为例, 其流程示意图见图 1。

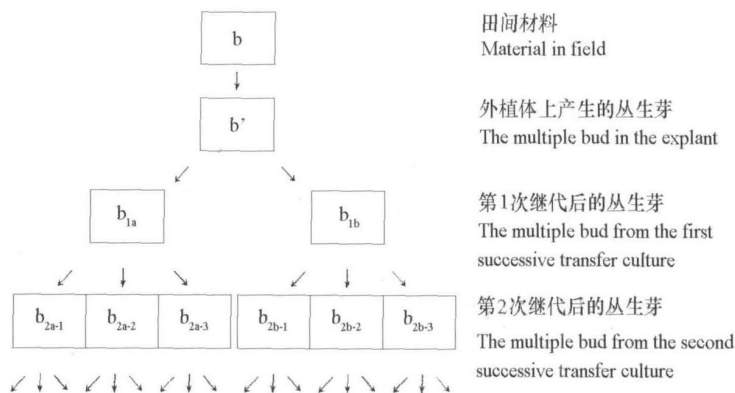


图 1 建立单芽系材料的示意图

Fig. 1 The sketch map of single shoot system

1.2 DNA 的提取

在每次继代的同时, 取所要继代个体的丛生芽叶片, 放置于 -70°C 保存以备提取 DNA。DNA 提取采用 CTAB 法 (陈昆松等, 2004; 肖军等, 2005) 并稍加改良。

1.3 DNA 甲基化分析

采用 MSAP (甲基敏感扩增多态性) 方法分析所有材料基因组的甲基化情况 (何艳霞等, 2007)。所用接头和引物序列见表 1。

试验将 MSAP 方法的带型归结为 4 类: 型带——*Hpa* 和 *Msp* 扩增产物中都有的带, 型带——*Msp* 扩增产物中有而 *Hpa* 扩增产物中没有的带, 型带——*Hpa* 扩增产物中有而 *Msp* 扩增产物中没有的带, 型带——*Hpa* 和 *Msp* 扩增产物中都没有的带。

表 1 MSAP方法的接头和引物序列

Table 1 The adapter sequence and primer sequence of MSAP technique

接头和引物 Adapter and primer	序列 Sequence(5' - 3')
<i>EcoR</i> (接头 Adapter)	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCA GTC
<i>EcoR</i> +ACG (E01)	GACTGCGTACCAA TTCACG
<i>EcoR</i> +ACC (E02)	GACTGCGTACCAA TTCACC
<i>EcoR</i> +AAC (E03)	GACTGCGTACCAA TTCAAC
<i>EcoR</i> +ACT (E04)	GACTGCGTACCAA TTCACT
<i>EcoR</i> +AGG (E05)	GACTGCGTACCAA TTCAGG
<i>Hpa</i> <i>Msp</i> (接头 Adapter)	CGA GCA GGACTCA TGA GATCA TGA GTCCTGCT
<i>Hpa</i> <i>Msp</i> +TCCA	A TCA TGA GTCCTGCTCGGTCCA
<i>Hpa</i> <i>Msp</i> +TCAA	A TCA TGA GTCCTGCTCGGTCAA

1.4 DNA 甲基化变异率计算

在两组内切酶消化产物的扩增条带中, 有一些片段是不同材料共有的片段 (非变异片段), 而有些材料中发生了部分片段的增加或减少, 称这些片段为变异片段。DNA 甲基化的变异率 (%) = 产生变异的片段数 / (产生变异的片段数 + 非变异的片段数) × 100。

2 结果与分析

2.1 田间材料与组培苗的甲基化情况比较

在继代 4 次后, 提取 3 个单芽系连续继代材料以及未经组培的田间植株的叶片 DNA 进行 MSAP 分析。结果表明, 3 个单芽系组织培养材料的一些带型与田间植株的带型不一致, 继代个体中有新产生的带也有消失的带。田间植株的 DNA 甲基化类型在组织培养继代过程中均有所变化, 在 7 对引物的 929 条带中, 3 个单芽系的 DNA 甲基化变异率分别为 8.876%、8.902% 和 8.986% (表 2)。

表 2 不同单芽系材料较未组培的田间材料间的带型变异情况

Table 2 Band patterns variational status of different single shoot system materials compared to the materials in field

材料 Material	非变异带 Non-mutation band		变异带 Mutation band	变异率 / % Mutation rate
a	89	147	72	8.876
b	89	150	68	8.902
c	93	149	72	8.986

相比田间材料而言, 继代个体中有一些条带的带型发生变化。如表 3 所示: 用 E02/TCCA 引物对时, 田间材料的 a_{1a} 型带在继代材料 a_{1a} 中消失, a_{1b} 中的带则由 a_{1a} 型变为 a_{1b} 型; 田间材料的 a_{2a-1} 型带变化为继代材料 a_{2a-1} , a_{3a-1} 和 a_{3b-3} 的 a_{2a-1} 型带, 即新增加了条带。这些变化类型在另外两个单芽系材料 b 和 c 中也存在。上述带型变化情况反应了组织培养过程中发生了甲基化增加 (a_{1a} 型带变为 a_{1b} 型带, a_{2a-1} 型带变为 a_{2a-1} 型带) 和甲基化减少 (a_{3a-1} 型带变为 a_{3b-3} 型带), 其中一些变化在外植体长出的丛生芽上已发生 (表 3)。

表 3 E02/TCCA 引物对扩增的带型情况

Table 3 Band patterns status by E02/TCCA primer combination

材料 Material	带型 The band pattern
a	a_{1a}
a'	a_{1b}
a_{1a}	a_{2a-1}
a_{1b}	a_{2b-2}
a_{2a-1}	a_{3a-1}
a_{2b-2}	a_{3b-3}

在各个单芽系的非变异带中，Ⅱ型带远远多于Ⅰ型和Ⅲ型。表2所示单芽系c的314条非变异带中，149条为Ⅱ型带，占47.45%。这些材料均取自营养生长阶段，Ⅱ型带数量较多，表明在营养生长过程中基因组DNA的5'-CCGG-3'位点多发生了胞嘧啶的甲基化修饰，即5'-CmCGG-3'；而半甲基化（Ⅰ型带）和非甲基化（Ⅲ型带）分别只占到22.93%和29.62%（图2）。

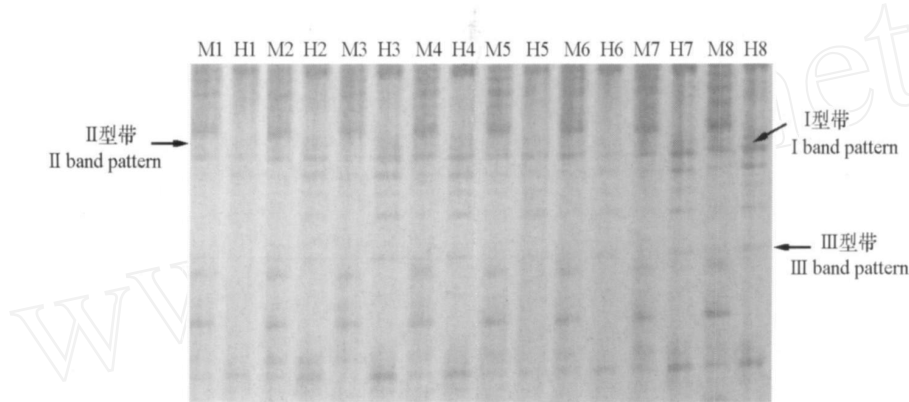


图2 E01/TCCA引物对单芽系c的MSAP带型图谱

1为田间材料，2为外植体上的丛生芽，3和4，5和6，7和8分别为继代2次、3次和4次材料。

M和H分别代表EcoR/Msp和EcoR/Hpa酶切产物。

Fig. 2 Amplified MSAP band patterns of single shoot system c when the E01/TCCA primer combination was used

1 was the material in field, 2 was the multiple bud in the explant, 3 and 4, 5 and 6, 7 and 8 were the materials of the second,

the third and the fourth successive transfer culture, respectively. M and H correspond to two sets of restriction

enzyme combinations, EcoR/Msp and EcoR/Hpa, respectively.

2.2 不同继代次数之间的甲基化情况比较

2.2.1 不同继代次数之间甲基化变化情况 3个单芽系的180个继代个体，较田间材料发生DNA甲基化减少的情况多，占变异类型的66.7%（表4）。综合同一株系各次继代的带型变异，子代较其母代有更多的DNA甲基化减少现象，且前3次继代间的DNA甲基化减少比例和DNA甲基化增加比例相差较大，随着继代次数的增多，基因组中这两种情况虽然发生位点有所不同，但出现的比例基本相同，其中DNA甲基化减少类型基本为Ⅱ型、Ⅰ型、Ⅲ型；甲基化增加则多为Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型（表4）。

表4 同一株系各次继代间的DNA甲基化变化情况

Table 4 The DNA methylation variation in different successive transfer culture of the same strain

同一株系各次继代材料 The different successive transfer culture of the same strain	甲基化减少 Hypomethylation		甲基化增加 Hypermethylation	
	比例/% Proportion	主要带型变化 The mainly variational band pattern	比例/% Proportion	主要带型变化 The mainly variational band pattern
离体材料较田间材料 Materials <i>in vitro</i> compared to field planting	66.70		33.30	
第2次较第1次 The second successive transfer culture compared to the first	81.25		18.75	
第3次较第2次 The third successive transfer culture compared to the second	61.90		38.10	
第4次较第3次 The fourth successive transfer culture compared to the third	50.00		50.00	
第5次较第4次 The fifth successive transfer culture compared to the fourth	53.97		46.03	

2.2.2 不同继代次数之间甲基化变化的稳定性 以单芽系 a 为例，其 5 次继代材料的 MSAP 分析表明，6 对引物扩增的 234 条带中，仅有 4 条带在发生变化后趋于稳定（如表 5 所示，个体 a_{1a} 由 a_{1a} 型带变为 a_{1b} 型带），这种变异在以后的继代个体中稳定下来，能够稳定下来的带占 1.72%；而另一些带型变化趋势则不稳定，同一幼芽产生的丛生芽材料在之后的组织培养继代过程中个别个体也发生 DNA 甲基化变化，产生不同的带型：2.99% 的 DNA 甲基化变化为继代个体间一个或两个个体发生了变化（如表 5 的 a_{4a-4} ）。所有继代个体中 18.38% 的带型不一致，除了一个或两个植株的带型变化外，另有 10.68% 是多个个体（3 个以上）均发生了带型变化，这便使得带型呈现不稳定的随机变化。在这些变化的带型中， a_{1a} 、 a_{1b} 、 a_{2a-1} 、 a_{2a-2} 、 a_{2b-1} 、 a_{2b-2} 、 a_{3a-1} 、 a_{3a-2} 、 a_{3a-3} 、 a_{3b-1} 、 a_{3b-2} 、 a_{3b-3} 、 a_{4a-1} 、 a_{4a-2} 、 a_{4a-3} 、 a_{4a-4} 、 a_{4b-1} 、 a_{4b-2} 、 a_{4b-3} 、 a_{4b-4} 型带间的相互转换没有一定的规律，这表明在组织培养过程中不断的发生着 DNA 甲基化增加或者减少的变化（表 5）。但源于同一丛生芽的个体间带型一致，无明显 DNA 甲基化差异（如图 1 中 b_{2a-1} 、 b_{2a-2} 和 b_{2a-3} 间无差异， b_{2b-1} 、 b_{2b-2} 和 b_{2b-3} 间无差异，数据未列出）。

表 5 E04/TCAA 引物对时不同样本间的条带变化情况

Table 5 The band patterns variational phenomenon in different stylebook by the E04/TCAA primer combination

材料 Material	变异类型 Variant type
a	
a'	
a_{1a}	
a_{1b}	
a_{2a-1}	
a_{2a-2}	
a_{2b-1}	
a_{2b-2}	
a_{3a-1}	
a_{3a-2}	
a_{3a-3}	
a_{3b-1}	
a_{3b-2}	
a_{3b-3}	
a_{4a-1}	
a_{4a-2}	
a_{4a-3}	
a_{4a-4}	
a_{4b-1}	
a_{4b-2}	
a_{4b-3}	
a_{4b-4}	

注：空白处未出现条带，即。

Note: No band in blank type.

3 讨论

对菊花品种‘墨麒麟’组织培养过程中的 DNA 甲基化情况进行分析，发现组织培养材料相对田间材料而言，有部分 DNA 甲基化类型发生了变化，这与之前在苹果中的研究结果（Li et al, 2002）相一致，但并没有发生表型性状变异。试验观测到的 DNA 甲基化变异率约达到 9%，并且高度不稳定，所有单芽系继代材料中，部分个体与田间材料的带型不一致（个体发生了甲基化变化），这可能是由于外界的植株与培养室的组培苗在生长条件上有所差别所致，而这种 DNA 甲基化变异并不引起性状变化。

材料继代过程中不一致的带型变化表明，在组织培养过程中虽然材料之间生长条件比较一致，但仍然在不断进行着 DNA 甲基化减少或者增加的表现遗传变化。DNA 甲基化变化可能是培养基中的植

物生长调节因子所致。Buchema等 (2001) 的研究表明悬浮培养中 DNA 甲基化的程度较高, 并且细胞分裂素导致的甲基化程度高于生长素。另外, 本试验结果表明在菊花营养生长过程中 5'-CCGG-3' 位点较多发生了内胞嘧啶的甲基化修饰, 即 5'-CmCGG-3'; 而半甲基化次之。如果打破这种常规的表观遗传现象, 是否能导致菊花营养生长到生殖生长的转变, 是我们进一步亟待解决的问题。

将组织培养中的体细胞无性系变异与 DNA 甲基化变化相联系具有一定的研究意义。本研究结果表明, 组织培养过程中材料表型性状没有变异, 但基因组 DNA 却发生了无数次的甲基化变化, 这种不稳定的甲基化修饰仅有个别位点能够维持下去 (带型稳定), 大多数在以后的继代过程中会逐渐消失或者产生新的修饰。而 DNA 甲基化有可能阻断遗传信息的传递, 引起形态性状的变化 (Holliday, 1987), 并且 5-mC 易发生变化, 导致 C: G 到 T: A 转变, 亦有可能导致染色质结构改变和基因表达变化。因而在组织培养诱发体细胞无性系变异的过程中可以借助 DNA 甲基化变化来研究相关基因的活性和作用, 如一些结构基因发生了去甲基化或者甲基化增加, 引起这些基因重新激活或使这些基因以及相关基因失活, 从而导致相关的表型变化。所以我们应当关注无性系变异中 DNA 甲基化改变引起的形态变化, 从而由突变表型分析相关基因的作用。

References

- Antequera F, Boyes J, Bird A. 1990. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*, 62: 503 - 514.
- Buchema N, Szabo E, Heszky L E, Nagy I. 2001. DNA methylation and gene expression differences during alternative *in vitro* morphogenetic process in eggplant (*Solanum melongena* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 37: 672 - 677.
- Chen Kun-song, Li Fang, Xu Chang-jie, Zhang Shang-long, Fu Cheng-xin. 2004. An efficient macro method of genomic DNA isolation from *Actinidia chinensis* leaves. *Hereditas*, 26 (4): 529 - 531. (in Chinese)
- 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 张上隆, 傅承新. 2004. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取. *遗传*, 26 (4): 529 - 531.
- Duncan R P. 1997. Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv Agron*, 58: 201 - 240.
- Harding K. 1994. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 37: 31 - 38.
- He Yan-xia, Wang Zi-cheng, Cao Hong-ping, Zhang Cheng-wan. 2007. Initial study of DNA methylation difference of garlic (*Allium sativum* L.) growing in light and darkness. *Plant Physiology Communications*, 43 (1): 85 - 87. (in Chinese)
- 何艳霞, 王子成, 曹红平, 张成婉. 2007. 光暗条件下大蒜 DNA 甲基化差异的初步研究. *植物生理学通讯*, 43 (1): 85 - 87.
- Holliday R. 1987. The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 238 (4824): 163 - 170.
- Kaeppeler SM, Kaeppeler H F, Rhee Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol*, 43: 179 - 188.
- Kaeppeler SM, Phillips P L. 1993. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8773 - 8776.
- Li Xiangqian, Xu Mingliang, Schuyler S Korban. 2002. DNA methylation profiles differ between field- and *in vitro*-grown leaves of apple. *Journal of Plant Physiology*, 159: 1229 - 1234.
- LoSchiavo F, Pito L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet*, 77: 325 - 331.
- Lund G, Ciceri P, Vioti A. 1995. Maternal-specific demethylation and expression of specific alleles of zein genes in the endosperm of *Zea mays* L. *Plant J*, 17: 571 - 578.
- Munksgaard D, Mattsson O, Okkels F T. 1995. Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. *Plant Physiol*, 93: 5 - 10.
- Ramchandani S, Bhattacharya S K, Cervoni N, Szyl M. 1999. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 6107 - 6112.
- Ronemus M J, Galbiati M, Ticknor C, Chen J C, Ldellaporta S. 1996. Demethylation induced developmental pleiotropy in *Ambidopsis*. *Science*, 273: 654 - 657.
- Smulders M J M, Rus-Kortekaas W, Vosman B. 1995. Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theor Appl Genet*, 91: 1257 - 1264.
- Xiao Jun, Yang Li-guo, Yang Tao, Li Zhou-hua, Wang Jin-yan, Ren Zhi-ying. 2005. Comparison on two methods to extract chrysanthemum total DNA. *Liaoning Agricultural Sciences*, (1): 40 - 41. (in Chinese)
- 肖军, 杨立国, 杨涛, 李舟华, 王金艳, 任志颖. 2005. 两种提取菊花总 DNA 方法的比较. *辽宁农业科学*, (1): 40 - 41.