

## 农艺与调制

## 烤烟烟叶 DNA 甲基化与气象因子的关系分析

贾峰<sup>1</sup>, 赵一丹<sup>2</sup>, 刘卫群<sup>1,2</sup>, 魏庆华<sup>1</sup>

1 河南农业大学 国家烟草栽培生理生化重点实验室, 郑州市文化路 95 号 450002;

2 河南农业大学 生命科学学院, 郑州 450002

**摘要:** 为深入研究特色烟叶的形成与气象因子的关系,用灰色关联理论结合生产实际选出与烟叶 DNA 甲基化相关的平均最高温度、总日照时数、平均相对湿度和总降雨量等 4 个气象因子,并建立了 DNA 甲基化(因变量)与 4 个气象因子(自变量)之间修正的 Logistic 模型。单因子效应分析表明,平均最高温度、总日照时数和平均相对湿度与 DNA 甲基化水平呈正相关关系,对烟叶 DNA 甲基化影响的程度依次为,平均最高温度 > 平均相对湿度 > 总日照时数;而总降雨量与 DNA 甲基化的关系为负相关。两因子交互效应分析表明,平均最高温度和平均相对湿度、平均最高温度和总日照时数之间对烟叶的 DNA 甲基化具有协同作用;总降雨量和平均最高温度、总降雨量和总日照时数、总降雨量和平均相对湿度之间对烟叶的 DNA 甲基化有拮抗作用;而平均相对湿度与总日照时数之间对烟叶的 DNA 甲基化水平没有明显的协同作用或拮抗作用。

**关键词:** 烤烟;DNA 甲基化;气象因子;灰色关联分析;修正的 logistic 模型

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2011.02.007

中图分类号: S572; Q143+.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2011)02-0032-07

## The influence of meteorological factors on leaf tobacco DNA methylation

JIA Feng<sup>1</sup>, ZHAO Yi-dan<sup>2</sup>, LIU Wei-qun<sup>1,2</sup>, WEI Qing-hua<sup>1</sup>

1 National Tobacco Physiology &amp; Biochemistry Research Centre, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2 College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** Experiment was conducted to investigate effect of meteorological factors on leaf tobacco DNA methylation. Four key meteorological factors, i. e average highest temperature (MHT), total sunshine hours (TSH), average relative humidity (MRH), and total precipitation (TP), were screened by grey relational analysis (GRA) and practices. Revised logistic model was established between DNA methylation and these four key meteorological factors. Results of single-factor analysis showed that there were positive effects between MRH, TSH, and MHT and level of DNA methylation. The order of these factors affecting DNA methylation was as follows: MHT > MRH > TSH. Negative effect existed between TP and DNA methylation. Results of two-factor interactions showed synergistic effects of both MHT/MHR and MHT/TSH on DNA methylation. Antagonistic effects existed between TP/MHT, TP/TSH, or TP/MRH and DNA methylation respectively. However, no synergistic or antagonistic effect of MRH /TSH on DNA methylation was detected.

**Key words:** DNA methylation; meteorological factors; gray correlation analysis; revised logistic model

烤烟 (*Nicotiana tabacum* L.) 是一种对环境极为敏感的经济作物<sup>[1]</sup>, 多年的烟草生产实践表明, 相同的烟

草品种在不同的生态区生长就会形成不同的烟叶香气风格类型<sup>[2]</sup>, 这种烟叶香气风格特征能够随着种植地的改变而改变。烤烟这种香气风格随着生态区的不同而发生改变的现象, 可能与 DNA 序列外的遗传方式有关<sup>[3]</sup>。DNA 甲基化是在不改变 DNA 序列的情况下, 对胞嘧啶的第 5 个碳位点加上 1 个甲基, 从而影响基因的表达, 使植物适应外界环境的变化<sup>[4-5]</sup>。DNA 甲基化是已知最早被发现与基因抑制相关的表观遗传机制之一<sup>[6]</sup>, 且各种气象因子会造成植物 DNA 甲基化的改变,

**作者简介:** 贾峰, 男, 博士研究生, 工程师, 研究方向为烟草栽培和生理生化, E-mail: mrjiafeng@163.com

刘卫群(通讯作者), 女, 博士, 教授, 研究方向为烟草栽培和生理生化, E-mail: liuweiqun2004@126.com

**基金项目:** 河南省烟草专卖局科技项目: 驻马店平顶山南阳烟叶特色的分子特征与调控措施研究 (No. 20081225)

收稿日期: 2010-07-26

比如,低温处理能够引起植物的 DNA 甲基化水平降低<sup>[7]</sup>;干旱胁迫和降水都能够引起植物 DNA 甲基化水平的变化<sup>[7]</sup>。但是目前关于气象因子对 DNA 甲基化的影响都是定性的研究,要量化气象因子对 DNA 甲基化的影响,必须通过适当的模型来分析二者之间的关系。

灰色关联分析能够在数据相对较少的情况下比较真实和全面地反映生物系统因子之间的联系紧密程度,并已成功地在农艺性状及生理生化的分析<sup>[8]</sup>和作物新品种的综合评估<sup>[9]</sup>中得到应用。同时,修正的 Logistic 方程在研究番茄单个果实生长规律中取得了符合客观规律的效果<sup>[10]</sup>。

本文通过灰色关联的方法从诸多的气象因子中选出与 DNA 甲基化之间关系紧密的平均最高温度、平均相对湿度、总日照时数和总降雨量等 4 个气象因子。并通过修正的 Logistic 方程在 DNA 甲基化水平(因变量)和 4 个气象因子(自变量)之间建立数学模型。旨在通过研究烤烟生长期间气象因子与烟叶 DNA 甲基化的关系,探索不同生态条件下烟叶形成不同香气风格特征的分子机理,为调控烟叶 DNA 甲基化水平,实现特色烟叶的可持续生产提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验地概况

2007-2009 年在河南省驻马店市确山县瓦岗乡进行,土壤类型为黄棕壤,轮作,前茬作物为白花蛇草。烟田土壤 pH 值为 6.4,有机质为  $16.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效氮为  $80.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、铵态氮为  $6.68 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效磷为  $6.61 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效钾为  $154.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。试验所施肥料为烤烟专用无机复合肥(N:P:K 为 10:10:20)、硝酸铵(含氮 30%)、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (含  $\text{P}_2\text{O}_5$  12%)、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ (含  $\text{K}_2\text{O}$  50%)、 $\text{KNO}_3$ (含氮 13%,含  $\text{K}_2\text{O}$  45%),其中 70%作为基肥,30%作为追肥。供试烤烟品种为 NC89,种植行距 120 cm,株距 60 cm。其他栽培管理措施按确山县优质烟叶生产栽培措施进行。

### 1.2 试验设计

在  $60 \text{ hm}^2$  连片种植烟草的试验地中, $5 \text{ hm}^2$  为一个取样单元,每单元内设置 3 个小区,小区面积为  $100 \text{ m}^2$ ( $20 \text{ m} \times 5 \text{ m}$ ),共 36 个小区。在烟草移栽后 50 d 时,小区选取第 18 片(自下而上数)发生一致(5 cm)的烟叶 100 株挂牌,从移栽后 60 d 开始取样,所有样品都采集第 18 片叶同一部位,迅速置于液氮中用于检测 DNA 甲基化水平、基因表达、酶活性和化学成分检测。以后每隔 10 d 取样一次。

### 1.3 测定方法

采用 CTAB 方法提取烟叶总 DNA<sup>[11]</sup>;总 DNA 甲基化水平测定参考贾峰等方法进行<sup>[12]</sup>。采用 Trizol 方法提取 RNA,cDNA 的合成和 RT-PCR 扩增参考戚元成等的方法<sup>[13]</sup>。硝酸还原酶(NR)活性测定参考邹琦的活体法<sup>[14]</sup>;谷氨酰胺合成酶(GS)活性检测参考 Zhang 等方法<sup>[15]</sup>;蔗糖磷酸合成酶<sup>[16]</sup>和蔗糖合酶(SS)活性测定参考 Islam 等方法<sup>[17]</sup>。

### 1.4 气象数据的获取与统计分析处理

气象数据来源于河南省确山县气象局。为更好地反映气象因子对烟叶各时期的影响,把气象因子分为两大类,一类是从烟草移栽到取样时段的气象因子的平均值;一类是从烟草移栽到取样时段的气象因子的累积值。平均值的指标有 6 个,平均温度(Mean daily temperature, MDT)、平均最高温度(Mean highest temperature, MHT)、平均最低温度(Mean lowest temperature, MLT)、平均温差(Average daily temperature difference, ATD)、平均相对湿度(Mean relative humidity, MRH)、平均日照时数(Average sunshine hours, ASH);累积值的指标也有 6 个,总降雨量(Total precipitation, TP)、总日照时数(Total sunshine hours, TSH)、 $\geq 5^\circ\text{C}$  积温( $\geq 5^\circ\text{C}$  accumulated temperature, 5AT)、 $\geq 10^\circ\text{C}$  积温( $\geq 10^\circ\text{C}$  accumulated temperature, 10AT)、 $\geq 15^\circ\text{C}$  积温( $\geq 15^\circ\text{C}$  accumulated temperature, 15AT)和  $\geq 20^\circ\text{C}$  积温( $\geq 20^\circ\text{C}$  accumulated temperature, 20AT)。

### 1.5 气象因子与 DNA 甲基化的灰色关联分析

根据《灰色系统理论及其应用》的理论<sup>[18]</sup>将烟叶 DNA 甲基化水平与气象因子之间看成一个灰色系统,其中,DNA 甲基化作为因变量,记作  $y_0 = [y_0(1), y_0(2), \dots, y_0(k)]$ ;气象因子作为因变量,记作  $x_i = (X_1, X_2, \dots, X_i)$ ,其中, $i$  代表不同的气象因子, $k$  代表测定的次数。 $y_0$  和  $x_i$  之间的灰色关联分析(Grey Relational Analysis, GRA)按下列公式进行计算:

$$\gamma(y_0(k), x_i(k)) = \frac{\Delta_{\min} + \xi \cdot \Delta_{\max}}{\Delta_{0i}(k) + \xi \cdot \Delta_{\max}}, \text{其中, } \Delta_{0i}(k) = |y_0(k) - x_i(k)|, \Delta_{\min} = \min_{\forall i} \min_{\forall k} \Delta_{0i}(k), \Delta_{\max} = \max_{\forall i} \max_{\forall k} \Delta_{0i}(k), \xi \in (0, 1);$$

公式中  $\xi$  值选取为 0.5。则灰色关联度按下列的公式计算:

$$\gamma(y_0, x_i) = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \gamma(y_0(k), x_i(k)), \text{其中, } \gamma(y_0, x_i) \text{ 值大则表明 } x_i \text{ 与 } y_0 \text{ 之间的关系比较密切。}$$

### 1.6 修正的 Logistic 方程构建

构建的修正的 Logistic 方程为:

$$Dm = \frac{K}{(1 + e^{a+bx+cy+dz+em})}$$

式中:  $Dm$  代表 DNA 甲基化水平 (%);  $K$  代表 DNA 甲基化的极值, DNA 胞嘧啶的甲基化水平最高为 100%;  $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$ 、 $e$  分别代表修正的 Logistic 模型的参数;  $x$ 、 $y$ 、 $z$ 、 $m$  分别代表不同的气象因子。烟叶 DNA 甲基化水平的变化的规律符合 Logistic 增长模型, 修正的 Logistic 方程可以反映 4 个气象因子与 DNA 甲基化水平变化之间建立的关系。

### 1.7 计算及统计分析方法

采用 Excel 2003 软件进行修正的 Logistic 方程的计算, 采用 SigmaPlot V10.0 和 DPS V6.55 软件进行数据的制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 大田期气象因子与烟叶 DNA 甲基化的测定结果

烟草移栽后 60 - 100 d 大田的气象因子和 DNA 甲基化水平的结果如表 1。由表 1 可以看出, 烟叶在大田生长期, 平均温度、平均最高温度和平均最低温度都在升高。平均最低温度的升高幅度大于平均最高温度的升高幅度, 表现在平均温差逐渐减少。平均相对湿度也有增加的趋势。而平均日照时数在移栽后 70 d 时达到高峰, 随后持续下降; 积温的变化为,  $\geq 5^\circ\text{C}$  积温和  $\geq 10^\circ\text{C}$  积温一样, 在烟草生长的大田期间, 有个别天气气温低于  $15^\circ\text{C}$ , 温度在  $15 - 20^\circ\text{C}$  之间的积温有  $255.8^\circ\text{C}$ 。烟叶 DNA 甲基化水平在移栽 60 - 80 d 时显著增高, 随后随着烟叶的成熟缓慢增加(表 1)。

表 1 烟草移栽到取样时的气象因子与烟叶总 DNA 甲基化测定结果表

气象因子	移栽后天数/d				
	60	70	80	90	100
平均温度 MDT/ $^\circ\text{C}$	22.26	23.15	23.58	24.18	24.40
平均最高温度 MHT/ $^\circ\text{C}$	27.95	28.82	29.06	29.52	29.53
平均最低温度 MLT/ $^\circ\text{C}$	17.09	17.96	18.68	19.41	19.89
平均温差 ATD/ $^\circ\text{C}$	10.86	10.86	10.38	10.11	9.64
平均相对湿度 MRH/%	69.57	69.80	71.27	71.65	72.21
平均日照时数 ASH/h	6.41	6.71	6.40	6.34	6.00
总降雨量 TP/mm	186.7	237.3	262.2	319.6	333.0
总日照时数 TSH/h	358.9	442.6	499.1	551.7	594.3
$\geq 5^\circ\text{C}$ 积温 5AT/ $^\circ\text{C}$	1246.8	1528.1	1839.4	2103.8	2415.6
$\geq 10^\circ\text{C}$ 积温 10AT/ $^\circ\text{C}$	1246.8	1528.1	1839.4	2103.8	2415.6
$\geq 15^\circ\text{C}$ 积温 15AT/ $^\circ\text{C}$	1208.2	1489.5	1800.8	2065.2	2377
$\geq 20^\circ\text{C}$ 积温 20AT/ $^\circ\text{C}$	952.4	1233.7	1545.4	1809.4	2121.2
DNA 甲基化水平/%	15.30	33.33	44.80	48.09	50.00

### 2.2 DNA 甲基化与气象因子之间的灰色关联分析

由表 2 可以看出, DNA 甲基化水平与气象因子灰色关联程度大小的排序为: 平均最高温度、平均温度、总降雨量、总日照时数、平均最低温度、 $\geq 20^\circ\text{C}$  积温、 $\geq 5^\circ\text{C}$  积温、 $\geq 10^\circ\text{C}$  积温、 $\geq 15^\circ\text{C}$  积温、平均相对湿度、平均日照时数和平均温差, 与 DNA 甲基化水平变化关系密切的 4 个气象因子为平均最高温度、平均温度、总降雨量和平均最低温度。平均最高温度和平均温度都是代表温度的指标, 二者自相关性大, 结合生产实践, 选择平均最高温度作为反映温度指标的气象因子, 总降雨量作为反映降雨量指标的气象因子, 总日照时数作为反映日照指标的气象因子, 平均相对湿度作为反映湿度指标的气象因子, 把这 4 个气象因子与 DNA 甲基化引入修正的 Logistic 方程分析。

表 2 气象因子与烟叶总 DNA 甲基化水平灰色关联分析表

气象因子	关联度	权重	次序
平均最高温度 MHT	0.926	0.100	1
平均温度 MDT	0.885	0.096	2
总降雨量 TP	0.855	0.093	3
总日照时数 TSH	0.843	0.091	4
平均最低温度 MLT	0.832	0.090	5
$\geq 20^\circ\text{C}$ 积温 20AT	0.788	0.085	6
$\geq 5^\circ\text{C}$ 积温 5AT	0.788	0.085	7
$\geq 10^\circ\text{C}$ 积温 10AT	0.788	0.085	8
$\geq 15^\circ\text{C}$ 积温 15AT	0.788	0.085	9
平均相对湿度 MRH	0.772	0.084	10
平均日照时数 ASH	0.492	0.053	11
平均温差 ATD	0.464	0.050	12

### 2.3 4 个气象因子与烟叶 DNA 甲基化的 Logistic 模型构建及分析

修正的 Logistic 方程中 4 个自变量  $x$ 、 $y$ 、 $z$ 、 $m$  分别代表了平均最高温度、平均相对湿度、总日照时数和总降雨量。把这 4 个气象因子与 DNA 甲基化水平的 5 次观测值代人方程求解,得出 DNA 甲基化水平与 4 个气象因子之间的修正的 Logistic 模型:

$$Dm = \frac{100}{(1 + e^{53.834 - 1.653x - 0.102y - 0.005z + 0.016 m})}$$

$F$  检验表明,修正的 Logistic 模型  $Dm$  的显著水平  $P = 0.0019$ ,达到极显著水平,相关系数  $R = 0.9932$ ,说明修正的 Logistic 模型的拟合度良好;Durbin-Watson 统计分析结果  $d = 2.38$ ,检验结果表明,方程 4 个气象因子之间自相关性的可能性不大。模型中的平均最高温度、平均相对湿度、总日照时数和总降雨量的标准偏回归系数分别为,  $-1.653$ 、 $0.102$ 、 $-0.005$  和  $0.016$ ,由模型中标准偏回归系数的大小可以看出,对 DNA 甲基化水平的影响大小顺序为平均最高温度 > 平均相对湿度 > 总降雨量 > 总日照时数,其中平均最高温度和平均相对湿度对 DNA 甲基化的影响较大,是烟草栽培和管理中应该重点考虑的气象因子;而总降雨量和总日照时数的系数相对较小,但由于二者的绝对值较大,所以二者对 DNA 甲基化的作用效果也较大。

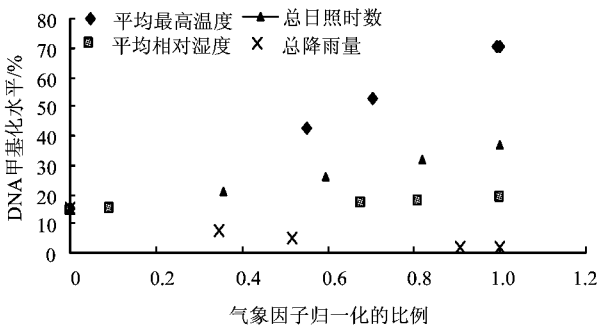


图 1 烟叶 DNA 甲基化对单一气象因子的效应图

单一气象因子对 DNA 甲基化的效应分析,对各气象因子数据进行归一化处理,以 DNA 甲基化为纵坐标,各气象因子为横坐标,作 X-Y 散点图,得到烟叶 DNA 甲基化对单一气象因子的效应图(图 1)。其中,气象因子与 DNA 甲基化水平的斜率表明二者之间的相关性,斜率为正则说明与 DNA 甲基化为正相关,斜率为负说明与 DNA 甲基化为负相关;斜率的大小表明二者之间的相关程度,斜率大说明气象因子对 DNA 甲基化的影响大,斜率小则对 DNA 甲基化的影响小。由图 1 可以看出:平均最高温度、总日照时数和平均相对

湿度与 DNA 甲基化水平呈正相关关系;其中,平均最高温度的变化对确山烤烟烟叶 DNA 甲基化水平的影响最大;其次为总日照时数;平均相对湿度对烟叶 DNA 甲基化水平的影响最小。而总降雨量与 DNA 甲基化水平呈负相关关系,即总降雨量的增加能够使 DNA 甲基化水平降低,尽管其系数绝对值较小,但总降雨量的数值较大,所以总降雨量对 DNA 甲基化的影响也较大。

多个气象因子对 DNA 甲基化的作用可能存在协同作用或拮抗作用。图 2 是两个气象因子对 DNA 甲基化水平影响的 3D 交互效应曲面图。由图 2-A 可以看出,当总降雨量较少时,DNA 甲基化水平随着平均最高温度的升高(27.95 - 29.53 °C)而快速升高;当总降雨量较多时,DNA 甲基化水平随着平均最高温度的升高增加缓慢,说明总降雨量和平均最高温度在一定的范围内对 DNA 的甲基化水平的增加存在着拮抗作用。由图 2-B 可以看出,DNA 甲基化的升高主要受到平均最高温度升高的影响,而受平均相对湿度变化(69.57% - 72.21%)的影响较小,其中平均相对湿度和平均最高温度对 DNA 甲基化水平具有较小的协同作用。由图 2-C 可以看出,总日照时数的延长(358.9 - 594.3 h)和平均最高温度的升高能够使 DNA 甲基化水平升高,平均最高温度对 DNA 甲基化水平升高的作用要大于总日照时数,而总日照时数和平均最高温度对 DNA 甲基化水平的影响具有协同作用,但作用幅度不大。由图 2-D 可以看出,在总日照时数一定的情况下,平均相对湿度的改变对 DNA 甲基化的影响效果不大,而平均相对湿度一定条件下,DNA 甲基化水平随着总日照时数的增加而增加,且作用效果大于平均相对湿度,但是总日照时数和平均相对湿度对 DNA 甲基化水平的交互作用不明显。由图 2-E 可以看出,平均相对湿度一定的情况下,DNA 甲基化水平随着总降雨量(186.7 - 333.0 mm)的增加而减少,而总降雨量一定时,平均相对湿度的变化对 DNA 甲基化的影响不大,但总降雨量和平均相对湿度对 DNA 甲基化具有拮抗作用。由图 2-F 可以看出,当总降雨量较低时,DNA 甲基化水平随着总日照时数的增加快速升高,而当总降雨量较多时,DNA 甲基化水平随着总日照时数的增加变化较小,当总日照时数短的时候,DNA 甲基化水平随着总降雨量的增加而下降较少,当总日照时数长的时候,DNA 甲基化水平随着总降雨量的增加而下降较明显,表明总日照时数与总降雨量对 DNA 甲基化的影响具有拮抗作用。

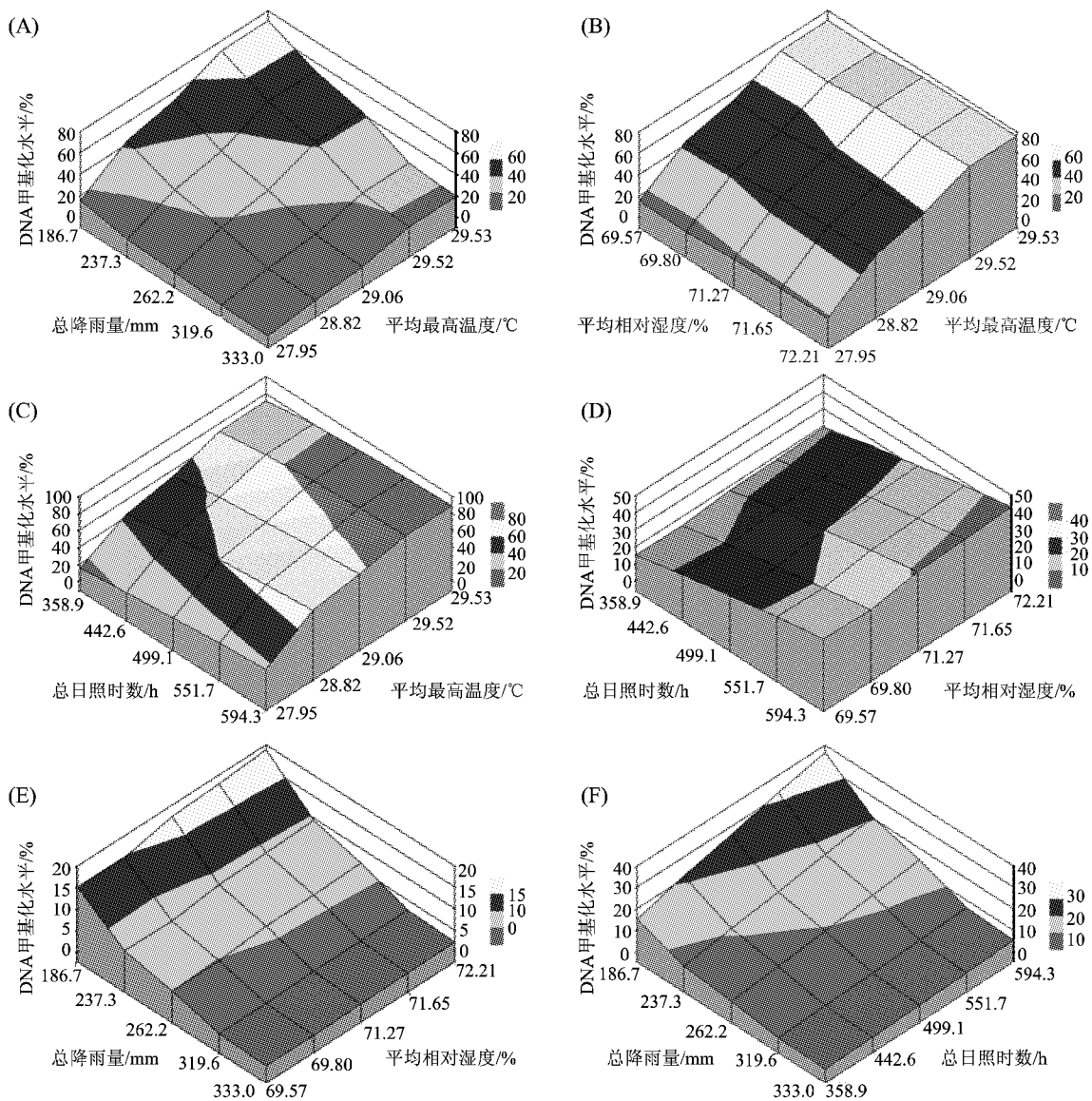


图2 两气象因子对DNA甲基化作用的交互效应分析图

### 3 结论

四个气象因子中的单因子效应分析结果表明,平均最高温度的升高对DNA甲基化水平的升高影响最大,总日照时数次之,平均相对湿度对DNA甲基化的影响最小;DNA甲基化水平随着总降雨量的增加而下降,虽然其系数绝对值较小,但由于总降雨量的数值较大,结果对DNA甲基化的减少幅度也大。

两因素交互效应分析表明,平均最高温度和平均相对湿度、平均最高温度和总日照时数之间对烟叶的DNA甲基化具有协同作用;总降雨量和平均最高温度、总降雨量和总日照时数、总降雨量和平均相对湿度之间对烟叶的DNA甲基化有拮抗作用;而平均相对湿

度与总日照时数之间对烟叶的DNA甲基化水平没有明显的协同作用或拮抗作用。

### 4 讨论

#### 4.1 气象因子对DNA甲基化的调节途径

前人的研究表明,不同的气象因子对DNA甲基化作用的途径是不同的,但是一般是外界初级信号(降雨、温度、日照等)的变化,传递到植物体内产生次级信号(激素、活性氧等),引起植物在表观遗传学(组蛋白修饰、甲基结合因子、小RNAs等)层面的变化,从而导致DNA甲基化的变化,而DNA甲基化的变化又可以分为可遗传的改变和不可遗传的改变<sup>[19]</sup>(图3)。例如,温度因子对DNA甲基化的影响可能是通过甲基

化封闭因子 (methylation blocking factor, MBF) 起作用的, White-Ziegler 等在 *E. coli* 中发现了 1 种类似组蛋白核小体结构的因子 (histone-like nucleoid structuring, H-NS) 作为甲基化封闭因子, 当温度低时能够与 DNA 形成复合体, 阻止 DNA 被甲基化, 当温度升高时, 该因子与 DNA 脱离, 使得 DNA 甲基化升高<sup>[20]</sup>。潘雅姣等的研究表明干旱胁迫能够使水稻的 DNA 甲基化升高<sup>[3]</sup>。Granot 等的研究表明, 沙漠植物霸王 (*Zygophyllum dumosum* Boiss) 从雨季 (wet) 到旱季 (dry) 的过程中, 通过显著减少细胞核的尺寸和组蛋白 H3 氮末端 (N-terminal tail) 的转录后修饰来调节基因的表达<sup>[21]</sup>。

#### 4.2 DNA 甲基化对碳氮代谢相关基因表达的影响

在 DNA 甲基化调控基因表达的模式中, Teixeira 和 Colot<sup>[22]</sup> 提出了比较科学的模式图, 即当 DNA 序列中胞嘧啶甲基化较低时, DNA 甲基结合蛋白 (DRM2) 结合不上, 转录复合子 (RNA Pol II) 能够顺利的进行转录, 基因正常表达。当 DNA 链上的甲基化程度达到一定水平时, DRM2 蛋白与 DNA 结合, 使得 RNA Pol II 不能够有效的结合在 DNA 序列上, 从而使转录不能够正常进行, 即导致基因表达量下调。

图 4 是移栽期 60 - 100 d 时, 烟草氮素代谢中的关

键酶基因及其活性变化的结果。NR 和 GS 酶作为烟草体内氮素代谢中的关键酶, 烟草移栽后 60 - 100 d 中 NR 和 GS 基因表达水平呈现下调趋势 (图 4 A), 而其酶活性也均表现活力下降 (图 4 B), 表明 NR、GS 这两个氮素代谢关键酶与 DNA 甲基化水平的变化呈负相关; SPS 和 SS 作为碳素代谢关键酶, SPS 的基因表达谱 (图 4 A) 与酶活性变化 (图 4 C) 趋势表明与烟叶的 DNA 甲基化水平没有明显的相关性。

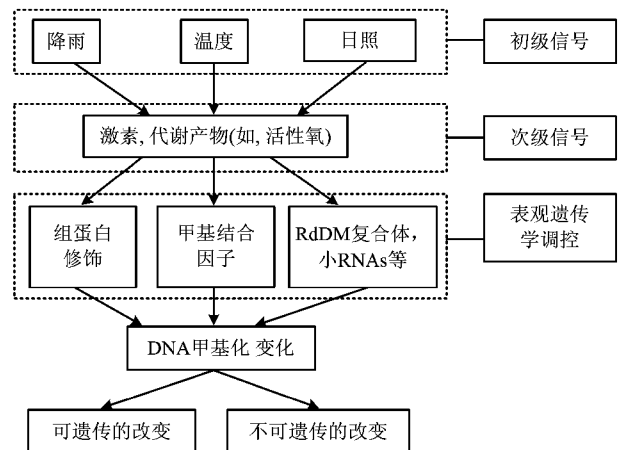


图 3 气象因子对 DNA 甲基化的调节模式图

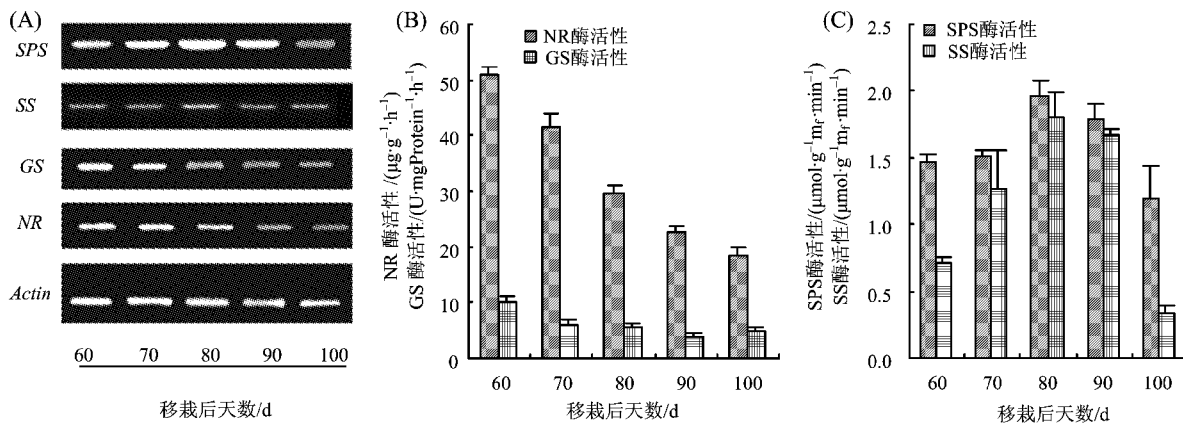


图 4 碳氮代谢关键基因 RT-PCR 和酶活性变化结果

烟叶 DNA 甲基化的变化与基因表达的变化有时候并不一致。利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 发表的烟草碳氮代谢相关基因的 DNA 序列, 笔者通过软件统计了相关基因中的胞嘧啶、鸟嘌呤、HapII 的酶切位点和 CpG 岛的数量得到了表 3。由表 3 可以看出, NR 基因中的胞嘧啶含量和 CpG 岛数量在 5 条基因中最多, 但 HapII 的酶切位点数量却最低; GS 基因中的 CpG 岛的数量最少而 HapII 的酶切位点的数

量最多, 且与 NR 基因的差异较大; 随着烟叶的成熟, 烟叶中 DNA 甲基化水平升高, NR 和 GS 基因的表达量不断的下降 (图 4A), 可能也与 HapII 的酶切位点和 CpG 的数量多少有关。SPS 和 SS 基因中的 CpG 岛的数量和 HapII 的酶切位点的数量基本相当, 处于 NR 和 GS 基因之间, 而 SPS 和 SS 基因的表达量与 DNA 甲基化水平之间没有显著关系, 其中的作用机理需要进一步深入研究。

表3 烟草碳氮代谢相关基因信息表

基因名称	Genbank 登录号	核苷酸 长度/nt	胞嘧啶 含量/%	胞嘧啶和 鸟嘌呤含量/%	HapII 酶切位点 数量 #/1000bp	CpG 岛数量 #/100bp
<i>Actin</i>	AB158612.1	1155	19.66	44.89	1.73	2.34
<i>NR</i>	X06134.1	1682	21.35	46.18	0.59	3.45
<i>GS</i>	FN568471.1	1309	19.01	36.67	2.29	1.60
<i>SPS</i>	AF194022.1	3165	18.23	44.42	0.95	3.00
<i>SS</i>	EU148354.1	1265	19.92	42.37	0.79	2.69

## 参考文献

- [1] 许自成,黎妍妍,肖汉乾,等. 湘南烟区生态因素与烤烟质量的综合评价[J]. 植物生态学报, 2008, 32(1): 226-234.
- [2] 史宏志,邸慧慧,赵晓丹,等. 豫中烤烟碱和总氮含量与中性香气成分含量的关系[J]. 作物学报, 2009, 35(7): 1299-1305.
- [3] 潘雅姣,傅彬英,王迪,等. 水稻干旱胁迫诱导 DNA 甲基化时空变化特征分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3009-3018.
- [4] 凡时财,张学工. DNA 甲基化的生物信息学研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(2): 143-150.
- [5] 李梅兰,曾广文,朱祝军. 冬性与春性白菜品种花芽分化前后生理代谢的比较[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1414-1418.
- [6] Razin A, Riggs A. DNA methylation and gene function[J]. Science, 1980, 210(4470): 604-610.
- [7] Rideout J, Raper J, Miner G. Changes in ratio of soluble sugars and free amino nitrogen in the apical meristem during floral transition of tobacco[J]. International Journal of Plant Sciences, 1992, 153(1): 78-88.
- [8] 王士强,胡银岗,余奎军,等. 小麦抗旱相关农艺性状和生理生化性状的灰色关联度分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2452-2459.
- [9] 刘录祥,孙其信,王士芸. 灰色系统理论应用于作物新品种综合评估初探[J]. 中国农业科学, 1989, 22(3): 22-27.
- [10] 杨丽丽,王一鸣,康孟珍,等. 基于修正 Logistic 模型的番茄单个果实生长规律模拟[J]. 农业机械学报, 2008, 39(11): 81-84.
- [11] 郭兆奎,万秀清,魏继承,等. 适于 PCR 分析的烤后烟叶 DNA 提取方法的研究[J]. 中国烟草科学, 1999(4): 5-7.
- [12] 贾峰,魏庆华,杜铮,等. 烤烟烟叶胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶分离条件的优化[J]. 山东农业科学, 2010(6): 94-97.
- [13] 戚元成,马雷,王菲菲,等. 烟草打顶对腐胺 N-甲基转移酶基因表达的影响[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(7): 684-686.
- [14] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京,中国农业出版社,2000.
- [15] Zhang C F, Peng S B, Peng X X. Response of glutamate synthase informs to nitrogen sucrose in rice roots[J]. Plant Sci, 1997, 125: 163-167.
- [16] Imam E, Kushwaha S, Singh A. Evaluation of suitable tiger habitat in Chandoli National Park, India, using multiple logistic regression[J]. Ecological Modelling, 2009, 220(24): 3621-3629.
- [17] Islam M S, Matsui T, Yoshida Y. Carbohydrate content and the activities of sucrose synthase, sucrose phosphate synthase and acid invertase in different tomato cultivars during fruit development[J]. Scientia Horticulturae, 1996, 65(2-3): 125-136.
- [18] 刘思峰,党耀国,方志耕. 灰色系统理论及其应用[M]. 北京,科学出版社,2004.
- [19] Chinnusamy V, Zhu J K. Epigenetic regulation of stress responses in plants[J]. Current opinion in plant biology, 2009, 12(2): 133-139.
- [20] White-Ziegler C, Hill M, Braaten B, et al. Thermoregulation of Escherichia coli pap transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor[J]. Molecular Microbiology, 2002, 28(6): 1121-1137.
- [21] Granot G, Sikron-Persi N, Gaspan O, et al. Histone modifications associated with drought tolerance in the desert plant *Zygophyllum dumosum* Boiss[J]. Planta, 2009, 231(1): 27-34.
- [22] Teixeira F K, Colot V. Gene body DNA methylation in plants: a means to an end or an end to a means? [J]. The EMBO Journal, 2009, 28: 997-998.