

蔡志翔, 沈志军, 马瑞娟, 等. 桃同株叶片杂色材料的 MSAP 分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 662-667.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.027

桃同株叶片杂色材料的 MSAP 分析

蔡志翔, 沈志军, 马瑞娟, 严娟, 俞明亮

(江苏省农业科学院园艺研究所, 江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为探寻桃同株叶片杂色材料 PCM-1 的突变机制, 建立了桃 PCM-1G 和 PCM-1R DNA 样品的基因池, 用 256 对甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 选择性扩增引物进行全基因组甲基化 MSAP 分析。筛选出 23 对条带清晰、丰富且重复性好的引物组合。扩增出 200~1 000 bp 的位点 397 个, 其中 PCM-1G、PCM-1R 两种类型半甲基化位点分别为 38 个和 44 个, 分别占全部位点的 9.6% 和 11.1%; 全甲基化位点分别为 64 个和 67 个, 分别占全部位点的 16.1% 和 16.9%; 总甲基化率分别为 25.7% 和 28.0%。成功分离了 29 条甲基化修饰 DNA 序列, 通过测序发现有 22 条能够得到桃基因组支持且同源性较高, 其中 2 条来自于类胡萝卜素裂解双加氧酶 4 (*CCD4*)、3 条来自于 Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶; 推测 *CCD4* 和 Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶可能与叶色嵌合突变有关。

关键词: 桃; 嵌合体; DNA 甲基化; 甲基化敏感多态性扩增 (MSAP)

中图分类号: S662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0662-06

Analysis of leaf-variegated peach by methylation-sensitive amplification polymorphism

CAI Zhi-xiang, SHEN Zhi-jun, MA Rui-juan, YAN Juan, YU Ming-liang

(Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: To explore the mutation mechanism of leaf-variegated peach material PCM-1, a peach gene pool of the PCM-1G and PCM-1R DNA was established. 256 pairs of primers were used for genome-wide methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis. The 23 pairs of primers, which amplified clear, rich and repeatable fragments, were selected to identify 397 loci in 200~1 000 bp. 44 hemimethylated DNA loci were in PCM-1R and 38 in PCM-1G, and 67 full methylated DNA loci were in PCM-1R and 64 in PCM-1G. The total methylation rates were 25.7% and 28.0% in PCM-1G and PCM-1R respectively. 29 methylated DNA sequences were successfully isolated from these loci, 22 of which could be supported by the peach genome with high homology. Two sequences out of 22 came from carotenoid cleavage dioxygenase 4 (*CCD4*), and three from omega-hydroxypalmitate O-feruloyltransferase. It was speculated that *CCD4* and omega-hydroxypalmitate O-feruloyltransferase were related with the leaf color chimeric mutation.

Key words: *Prunus persica*; chimera; DNA methylation; methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)

收稿日期: 2015-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101517); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(12)5034]

作者简介: 蔡志翔 (1979-), 江苏南京人, 硕士, 助理研究员, 从事桃种质资源研究。(E-mail) czx1y05@163.com;
(Tel) 025-84390855

DNA 甲基化是真核细胞基因组主要的修饰方式之一, DNA 甲基化特别是胞嘧啶甲基化具有表观遗传效应和突变效应, 与基因表达调控、细胞分化、基因组印记、性染色体失活及细胞记忆等生物学过程密切相关^[1-5]。1995 年, Vos 等首次将随机扩增多

态性与限制性内切酶片段长度多态性两种分子标记有机结合^[6],建立了扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)分析技术,为甲基化敏感多态性扩增(Methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)的诞生打下了基础。Xiong 等^[7]1999 年首次证明 MSAP 是一种可靠的检测植物 DNA 甲基化的方法,具有操作相对便捷、可检测出样品 DNA 中大量甲基化位点、多态性高、引物设计简单等优点而被广泛应用^[8-12]。

桃同株叶片杂色材料是本项目组 2009 年在观赏桃实生苗中偶然发现的一个单株(原代号 PCM-1,现定名为金陵锦桃),性状表现为绿-红杂色。该材料芽接繁殖后分离出叶片全部紫红的 PCM-1R 和叶片全部绿色的 PCM-1G,且红叶性状稳定保留,所以初步推测该嵌合体为混合型嵌合体或称边缘嵌合体。通过徒手切片观察呈色细胞的分布,发现 PCM-1 与对照白碧桃(叶片绿色)和红粉佳人(叶片紫红色)在颜色上的差异集中在表层细胞。通过透射电镜和扫描电镜未能在 PCM-1 不同颜色的细胞之间发现明显形态差异。用基于普通引物的 174 个 SSR 标记进行鉴定,未发现 PCM-1、PCM-1G、PCM-1R 之间存在差异,用基于荧光标记引物的 150 个 SSR 标记鉴定,也未发现三者之间存在差异^[13],这在一定程度上表明三者基因组水平上相似度很高。李凡等构建了桃 cDNA-AFLP 反应体系,通过 TDFs 的克隆测序,发现 5 个基因在白花、绿叶基因型中表达量高,2 个基因在粉(或红)花、紫红叶片基因型中表达量高,表明 PCM-1、PCM-1G、PCM-1R 在基因表达上存在差异^[14]。本研究通过分析 PCM-1G、PCM-1R 基因组 DNA 甲基化状态的变化特征,试图寻找出 DNA 甲基化差异位点,为其突变机制研究寻找理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

桃同株叶片杂色材料 PCM-1、无性繁殖后代纯红叶植株 PCM-1R 和纯绿叶植株 PCM-1G,均保存于国家果树种质南京桃资源圃。

1.2 试验试剂

*Eco*R I、*Msp* I、*Hpa* II 等限制性内切酶购自 NEW ENGLAND BioLabs 公司, *Taq* DNA Polymerase 购自 Thermo scientific 公司,其他试剂为国产或进口

分析纯。接头及引物(表 1)由 Invitrogen 公司合成。

表 1 MSAP 分析的接头和引物序列

Table 1 Adapters and primers sequences for MSAP

引物/接头		序列(5'→3')
接头	<i>Eco</i> R I-adapter I	CTCGTAGACTGCGTACC
	<i>Eco</i> R I-adapter II	TTGGTACGCAGTCTAC
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I-adapter I	GATCATGAGTCCTGCT
	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I-adapter II	CGAGCAGGACTCATGA
预扩增引物	EA	GACTGCGTACCAATTCA
	H/MT	ATCATGAGTCCTGCTCGGT
选择性扩增引物	EA+2	GACTGCGTACCAATTCA+2
	H/MT+2	ATCATGAGTCCTGCTCGGT+2

1.3 试验方法

1.3.1 桃叶片 DNA 的提取及基因池的建立 桃叶片 DNA 提取方法参考文献[15]。根据分离体分组混合分析法(BSA)的原理,取 PCM-1R、PCM-1G 各 10 株,将其 DNA 等量混合,组成红叶性状与绿叶性状近等基因池。

1.3.2 MSAP 分析 酶切:500 ng 模板 DNA,10×NEB Buffer 2 μl,内切酶 *Eco* R I、*Msp* I、*Hpa* II 用量均为 10 U,用去离子水补足体系至 20 μl。体系混匀后于 PCR 仪上 37 ℃温育 6 h,80 ℃失活 20 min,取 5 μl 在 1%琼脂糖凝胶上检测酶切效果。预扩增:10×*Taq* Buffer 2.50 μl,dNTP(0.2 mmol/L)2.50 μl,预扩增引物 EA、H/MT 0.50 μmol/L,模板 DNA 2.00 μl(连接产物稀释 10 倍),2.50 mmol/L MgCl₂ 2.50 μl, *Taq* DNA Polymerase 0.25 μl,去离子水补足至 25.00 μl。扩增程序:95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,36 个循环,72 ℃ 15 min。选择性扩增:采用 EA+2 /HMT+2 引物组合。预扩增产物稀释 20 倍作为模板,反应体系与预扩增反应体系相同。扩增程序为:95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s(每循环降低 0.7 ℃),72 ℃ 1 min,共 13 个循环;95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 23 个循环;最后于 72 ℃延伸 15 min。扩增体系优化后,对 256 对选择性扩增引物对进行筛选。产物于 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。选择性扩增产物经 2.0%琼脂糖电泳检测后,95 ℃变性 10 min,采用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳。银染参照梁宏伟等的方法^[16]。

萝卜素裂解双加氧酶 4 (*CCD4*) 基因与 Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶 (Omega-hydroxypalmitate O-feruloyltransferase) 基因。*CCD4* 促进类胡萝卜素的裂解,产生颜色更深或无色的脱辅基类胡萝卜素。Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶干预了阿魏酸合成成分的积累,可能间接干扰花色苷合成。

表 3 桃基因组 DNA 甲基化修饰位点序列分析
Table 3 Sequence analysis of the methylated loci in *Prunus persica* genome

序列号	相似度 (%)	E 值	来源物种	编码蛋白
XP_007217322.1	88	0.9	<i>Prunus persica</i>	Tryptophan synthase beta chain 2
XP_007215265.1	98	5.00×10 ⁻²⁰	<i>P. persica</i>	Protein DGCR14
XP_007223246.1	93	1.00×10 ⁻¹⁰	<i>P. persica</i>	Metalloendoproteinase 1
ACA30554.1	96	8.00×10 ⁻⁸	<i>Oenothera elata</i> subsp. <i>elata</i>	Photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein
ACA30554.1	92	4.00×10 ⁻⁷	<i>O. elata</i> subsp. <i>elata</i>	Photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein
XP_007218208.1	86	2.00×10 ⁻¹⁰	<i>P. persica</i>	Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 2
ACA30554.1	96	8.00×10 ⁻⁸	<i>O. elata</i> subsp. <i>elata</i>	Photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein
XP_007203829.1	84	6.00×10 ⁻³⁴	<i>P. persica</i>	Putative AC transposase
XP_007200171.1	96	2.00×10 ⁻³⁷	<i>P. persica</i>	Omega-hydroxypalmitate O-feruloyltransferase
XM_007204192.1	100	3.00×10 ⁻⁵	<i>P. persica</i>	Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g32230, mitochondrial
JX310001.1	90	4.00×10 ⁻⁴³	<i>P. persica</i>	Carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4)
XP_007202914.1	98	9.00×10 ⁻¹⁶	<i>P. persica</i>	Protein MKS1
JX310001.1	90	3.00×10 ⁻⁴³	<i>P. persica</i>	Carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4)
XM_007204192.1	100	5.00×10 ⁻⁵	<i>P. persica</i>	Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g32230, mitochondrial
YP_005415557.1	80	0.019	<i>Rhodospirillum photometricum</i>	Hypothetical protein RSPPHO_03248, partial
XM_007223388.1	100	6.00×10 ⁻¹⁰	<i>P. persica</i>	Pathogenesis-related protein PR-1
XP_007227357.1	100	1.00×10 ⁻⁵⁵	<i>P. persica</i>	TMV resistance protein N
XP_007211072.1	100	9.00×10 ⁻¹⁷	<i>P. persica</i>	Unknown protein
XP_007208940.1	100	4.00×10 ⁻³⁷	<i>P. persica</i>	Uncharacterized protein L728
XP_007217690.1	95	1.00×10 ⁻¹⁴	<i>P. persica</i>	Auxin response factor 6
XP_007210584.1	93	6.00×10 ⁻⁸	<i>P. persica</i>	Low affinity cationic amino acid transporter 2
XP_007203523.1	94	4.00×10 ⁻¹³	<i>P. persica</i>	Serine/threonine-protein kinase CTR1
XP_007203523.1	94	7.00×10 ⁻¹⁴	<i>P. persica</i>	Serine/threonine-protein kinase CTR1
XP_007217088.1	99	1.00×10 ⁻³⁹	<i>P. persica</i>	Unknown
XP_007200171.1	94	9.00×10 ⁻¹⁸	<i>P. persica</i>	Omega-hydroxypalmitate O-feruloyltransferase
XP_007200171.1	58	1.00×10 ⁻⁷	<i>P. persica</i>	Omega-hydroxypalmitate O-feruloyltransferase

3 讨论

甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 技术由 Reyna 等^[17] 首先报道,并被用于检测双相型真菌的 DNA

甲基化,它是在扩增片段长度多态性技术的基础上建立起来的。这种方法在研究动植物基因组甲基化上有广泛应用。MSAP 技术相对其他测定 DNA 甲基化程度的技术有如下优点: (1) 不需知道被测

DNA 的序列信息,在不同生物上具有通用性;(2)操作相对简便,在 AFLP 技术体系的基础上无需作重大改进即可操作;(3)可在全基因组范围检测 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化变化。

DNA 甲基化广泛存在于各种植物中,不同植物甲基化程度、甲基化位点各异,同种植物不同年龄甲基化程度与甲基化位点也存在差异,即使同一植株不同部位的 DNA 甲基化程度与甲基化位点也不尽相同。本试验材料为嵌合体无性繁殖后代,经 SSR 检验没有发现差异位点,DNA 背景几乎完全相同,然而不同植株间甲基化的差异仍然是巨大的。本试验初期选取不同单株的 DNA 进行 MSAP 分析,结果显示巨量差异位点,无法继续进行有效分析。有鉴于此,我们参考集团分离分析法(BSA),选择 PCM-1R、PCM-1G 各 10 株,提取 DNA 等量混合,建立无性分离后代的叶色近等基因池,尽量排除非叶色相关甲基化修饰位点的干扰,为后续 MSAP 分析提供了条件。

2001 年, Schwartz 等首次在拟南芥等植物体内发现了类胡萝卜素裂解双加氧酶,这种酶可以在 9, 10 和 9', 10' 双键处将线型或环化的类胡萝卜素裂解,从而产生 2 个分子挥发性的 C_{13} -降异戊二稀类化合物和 1 个分子不具有挥发性的 C_{14} 化合物,同时他预言这种基因的同源基因将普遍存在于植物中^[18],随后在很多种植物中都发现了这种酶的存在。目前,类胡萝卜素裂解双加氧酶的同源基因已从多个物种中得到分离纯化,如番红花、黄瓜、猕猴桃、菊花、番茄等。类胡萝卜素裂解双加氧酶的催化活性需要 Fe^{2+} 作为辅因子,它们含有与铁结合的 4 个组氨酸^[19]。

在高等植物中,类胡萝卜素存在于花和果实的色素母细胞中,使花和果实呈亮黄色、橙色或红色^[20]。类胡萝卜素裂解双加氧酶通过降解特定类胡萝卜素,产生颜色更深或无色的脱辅基类胡萝卜素,从而影响果实色泽,是影响果实外观的重要因素^[21]。由此推测类胡萝卜素裂解双加氧酶可能通过裂解类胡萝卜素和合成脱辅基类胡萝卜素影响叶色。

目前关于 Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶的报道很少^[22],只知道它使阿魏酸在 CoA 作用下与 Omega-羟基棕榈酸生成 Omega-阿魏酸含氧棕榈酸。阿魏酸是苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL)的催化

作用下生成的肉桂酸衍生物, Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶的催化反应,消耗了植物体中的阿魏酸,也就间接消耗了初始原料苯丙氨酸。花色苷合成途径显示苯丙氨酸为花色苷初始合成原料,由此推测 Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶的催化反应极有可能与花色苷合成竞争初始原料,进而抑制花色苷的合成。

本试验测序的 26 条片段中有 2 条序列定位在 *CCD4* 上,同源性均为 90%, E 值小于 4.00×10^{-43} ; 有 3 条序列定位在 Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶基因上,其中 2 条同源性超过 90%, E 值小于 1×10^{-7} 。因此推测 *CCD4* 和 Omega-羟基棕榈酸阿魏酸转移酶基因上的甲基化修饰与叶色嵌合突变有关,进一步的验证和分析仍在进行中。

参考文献:

- [1] DAHL C, GULDBERG P. DNA methylation analysis techniques [J]. Biogerontology, 2003, 4(4): 233-250.
- [2] BIRD A P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation [J]. Nature, 1986, 321(6067): 209-213.
- [3] KLOSE R J, BIRD A P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators [J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(2): 89-97.
- [4] VANYUSHIN B F, KIRNOS M D. DNA methylation in plants [J]. Gene, 1988, 74: 117-121.
- [5] GRUENBAUM Y, NAVEHMANY T, CEDAR H, et al. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA [J]. Nature, 1981, 292(27): 860-862.
- [6] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFIP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23: 4407-4414.
- [7] XIONG L Z, XU C G, MAROOF M A S. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parentallines, detected by a methylation sensitive amplification polymorphism technique [J]. Mol Gen Genet, 1999, 261: 439-446.
- [8] 洪 柳, 邓秀新. 应用 MSAP 技术对脐橙品种进行 DNA 甲基化分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2301-2307.
- [9] 柳李旺, 宋贤勇, 龚义勤, 等. 萝卜 MSAP 体系优化与抽薹过程中 MSAP 分析 [J]. 江苏农业科学, 2006(6): 203-206.
- [10] 彭 海, 江光怀, 张 静, 等. 中国杂交水稻 DNA 甲基化多样性与遗传稳定性 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(1): 45-53.
- [11] 吴春太, 李维国, 黄华孙. 橡胶树 MSAP 反应体系的建立及其对无性系 DNA 的甲基化分析 [J]. 广东农业科学, 2011(9): 141-144.
- [12] 吕晓婷, 赵春梅, 王爱华, 等. 苹果 MSAP 技术体系的优化及其应用 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(22): 287-292.
- [13] 沈志军, 马瑞娟, 俞明亮, 等. 桃同株花果茎叶杂色材料的获得和特征特性初探 [J]. 园艺学报, 2014, 41(7): 1326-1334.

- [14] 李 凡,沈志军,马瑞娟,等. 桃同株花色叶色嵌合体差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析[J]. 果树学报, 2014, 31(4): 536-543.
- [15] 王富荣,佟兆国,章 镇,等.野生桃幼叶 DNA 提取方法的改良研究[J]. 江苏农业科学,2006(5): 66-69.
- [16] 梁宏伟,王长忠,李 忠,等.聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立[J].遗传,2008,30(10):1379-1382.
- [17] REYNA-LOPEZ G E, SIMPSON J, RUIZ-HERRERA J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1997, 253: 703-710.
- [18] SCHWARTZ S H, QIN X, ZEEVAART J A. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants.[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(27):25208-25211.
- [19] 温可睿. 葡萄类胡萝卜素裂解双加氧酶基因克隆及功能鉴定[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2012.
- [20] 由淑贞,杨洪强. 类胡萝卜素裂解双加氧酶及其生理功能[J]. 西北植物学报, 2008, 28(3):630-637.
- [21] 郑雄杰,朱凯杰,徐 强,等. 柑橘 *CCD4* 基因的克隆与等位多态性分析[C]//中国园艺学会.2014 年学术年会论文摘要集. 南昌:中国园艺学会, 2014.
- [22] DIETMAR S, IDA S. ω -hydroxypalmitate O-feruloyl transferase 2.3.1.188[M]//CHANG A,SCHOMBURG D,SCHOMBURG I. Class 2-3.2 Transferases, Hydrolases. Berlin: Springer, 2013: 133-136.

(责任编辑:张震林)