

张思宇, 全志星, 田佳源, 等. 入侵植物黄顶菊不同器官和不同发育阶段 DNA 表观遗传多样性变化特征[J]. 农业资源与环境学报, 2019, 36(3): 368-375.

ZHANG Si-yu, QUAN Zhi-xing, TIAN Jia-yuan, et al. Epigenetic diversity variation characteristics of *Flaveria bidentis* genome DNA of different organs at different developmental stages[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2019, 36(3): 368-375.

入侵植物黄顶菊不同器官和不同发育阶段 DNA 表观遗传多样性变化特征

张思宇^{1,2}, 全志星², 田佳源², 杨殿林², 刘红梅², 王 慧^{2*}

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866; 2. 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘 要: DNA 甲基化是植物 DNA 普遍存在的一种表观遗传修饰方式, 不仅在植物快速适应新环境中发挥重要的作用, 还参与植物生长发育和器官分化特异性过程。本研究通过构建优化的甲基化敏感扩增多态性(MSAP)体系来分析入侵植物黄顶菊不同器官和同一器官不同发育阶段的组织甲基化变异特征。结果表明: 器官特异性 MSAP 体系利用筛选的 13 对引物共扩增 536 条条带, 其中引物 EhHM7 对表观遗传多样性贡献率最大, 多态性百分比为 92.45%; 发育阶段特异性 MSAP 体系利用筛选的 14 对引物共扩增 407 条条带, 其中 EcHM1 对表观遗传多样性贡献率最大, 多态性百分比为 80.56%。甲基化类型变异结果显示, 黄顶菊不同器官(根、茎和叶)间以及同一器官不同发育阶段(老叶和嫩叶)的组织间均表现出显著的甲基化水平差异性, 半甲基化、全甲基化和整体甲基化三种甲基化变异类型中茎组织的甲基化发生率最高, 分别达到 30.28%、19.37% 和 49.66%, 老叶组织的全甲基化和整体甲基化率显著高于嫩叶组织, 分别达到 33.29% 和 52.77%。主成分分析结果显示, 黄顶菊叶片个体分布较根、茎的个体分布更为密集, 且嫩叶较老叶密集, 表明根个体间和茎个体间均存在较大的差异, 这种个体差异大于黄顶菊叶片的个体间差异, 且老叶的个体差异大于嫩叶, 这种个体间差异在样品采集时不可忽视。所以, 在利用表观遗传学方法进行黄顶菊入侵性的研究中, 必须要制定科学的采样方案, 把植物器官和生长发育阶段特异性作为一个重要因素考虑在内。

关键词: 黄顶菊; DNA 甲基化; MSAP; 表观遗传学

中图分类号: X176

文献标志码: A

文章编号: 2095-6819(2019)03-0368-08

doi: 10.13254/j.jare.2018.0243

Epigenetic diversity variation characteristics of *Flaveria bidentis* genome DNA of different organs at different developmental stages

ZHANG Si-yu^{1,2}, QUAN Zhi-xing², TIAN Jia-yuan², YANG Dian-lin², LIU Hong-mei², WANG Hui^{2*}

(1. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China)

Abstract: As one of the epigenetic modifications, DNA methylation has become ubiquitous in plant genome DNA. It not only plays an important role in rapid adaptation to new environments but also participates in the process of plant growth and organ differentiation. In this study, we constructed an optimized MSAP system to analyze the methylation variation characteristics of different organs at different developmental stages of the same organs of *Flaveria bidentis*. The results showed that the organ-specific MSAP system amplified 536 bands by using 13 pairs of primers, in which the primer EhHM7 made the greatest contribution to epigenetic diversity, and the percentage of polymorphism was 92.45%. The developmental stage-specific MSAP system amplified 407 bands by using 14 pairs of primers, in which EcHM1 had the greatest contribution to epigenetic diversity, and the percentage of polymorphism was 80.56%. The results of varying the methylation type showed that there were significant differences in methylation levels among the different organs (roots, stems, and leaves) at different

收稿日期: 2018-09-17 录用日期: 2018-11-05

作者简介: 张思宇(1994—), 女, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 主要从事外来植物入侵机制研究。E-mail: 461691444@qq.com

*通信作者: 王 慧 E-mail: wanghui03@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31401811); 天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目(15JCQNJC15300); 中国农业科学院科技创新工程

Project supported: Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China(31401811); Tianjin Natural Science Foundation(15JCQNJC15300); Agricultural Science and Technology Innovation Program of CAAS

developmental stages of the same organs (old leaves and young leaves), among the three methylation variants of hemi-methylation, full methylation, and overall methylation, the methylation rate of the stem tissue was the highest, reaching 30.28%, 19.37% and 49.66%, respectively. The full-methylated and overall methylated rate of the old leaf tissue were significantly higher than those of the young leaf tissue, reaching 33.29% and 52.77%, respectively. The principal component analysis showed that the individual distribution of leaves of *Flaveria bidentis* were more intensive than that of roots and stem organs, and the young leaves were denser than the old leaves, which indicated that there were larger differences between individual roots and stems. This individual difference was greater than that of the leaves of *Flaveria bidentis*, and the individual difference of old leaves were greater than that of young leaves, which could not be ignored during sample collection. Therefore, during the studies on the invasiveness of *Flaveria bidentis* by using epigenetic methods, it is necessary to formulate a scientific sampling plan and consider plant organ and growth stage specificity as important factors.

Keywords: *Flaveria bidentis*; DNA methylation; MSAP; epigenetics

表观遗传学是基于非基因序列改变所致的基因表达水平的变化^[1-3],表观遗传修饰手段主要包括DNA甲基化、组蛋白共价修饰、染色质重塑、基因印记和RNA干扰等五种^[4],其中DNA甲基化是最重要的表观遗传修饰方式之一,也是目前机制研究最为透彻的表观遗传过程^[5-7]。DNA甲基化是指在不改变DNA双螺旋序列的基础上,在DNA甲基转移酶的催化下将甲基转移到DNA分子中胞嘧啶残基上的过程。DNA甲基化存在器官、组织和发育时段的时空特异性^[8],即不同器官、同一器官不同发育阶段之间的DNA甲基化模式和水平不同。在对拟南芥的子叶、叶片和花进行甲基化敏感扩增多态性(Methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)分析后发现,被检测到的甲基化模式存在着明显的器官特异性^[9]。在拟南芥中,成熟叶片DNA甲基化水平比幼苗高20%,种子DNA甲基化水平又高于成熟叶片,但种子在发芽时发生去甲基化,甲基化水平又下降^[10]。植物DNA甲基化模式的转换在维持植物正常生长发育过程中至关重要^[11-12],在植物基因表达、基因组防御以及系统发育中起着重要的调节作用^[13]。

黄顶菊(*Flaveria bidentis*)是2001年在天津市和河北省衡水湖先后被发现的一种重要外来入侵杂草,后扩散到河南、山东等多省^[14-17]。黄顶菊凭借自身对环境极强的适应能力在新环境中比其他外地植物甚至是本地植物更具有资源竞争优势,除了具有较强的生物学特性,基因组DNA甲基化的改变很有可能是调控入侵植物生境适应能力的重要机制之一,然而目前对黄顶菊基因组DNA甲基化的分布模式、变异情况等还缺乏全面的认识。如前所述,植物不同组织和不同发育阶段的DNA甲基化模式和水平是不同的,植物的不同器官、同一器官的不同发育阶段在DNA甲基化模式上均可能存在差异。在研究黄顶菊表观遗传学与其入侵性的关系之前,应该充分考虑其DNA

甲基化的时空变化是否存在特异性。因此,本实验建立一个合理的MSAP体系来研究黄顶菊不同器官和同一器官不同发育阶段的表观遗传变化特征,为黄顶菊环境适应性获得的表观遗传机制提供理论基础,并从表观遗传学角度为科学采样策略提供思路。

1 材料和方法

1.1 试验设计和样品采集

本试验在农业农村部环境保护科研监测所网室(39°05'N, 117°08'E)内进行。2015年4月底,于天津静海团泊洼水库附近采集长势均一且生长旺盛的黄顶菊植株,移栽至网室花盆(规格为28 cm×18 cm×24 cm)中,每盆装土10 kg,每3日浇水一次,土壤由原土和草炭混合而成,每7日转盆一次以消除环境干扰,移苗60日后采集实验材料。样品采集方法:

(1)黄顶菊不同器官组织的采集。随机筛选20株长势一致的植株,每株采集从上至下第5对无病虫害且完全展开的叶片,用于黄顶菊叶组织的DNA甲基化检测;采集第5节和第6节之间去节间的茎用于黄顶菊茎组织的DNA甲基化检测;把整株黄顶菊植株连根拔起,抖落土壤并清洗干净,采集第一级侧根用于黄顶菊根组织DNA甲基化的检测。

(2)黄顶菊不同发育阶段器官组织的采集。选取同一植株从上至下第2对生长健康且完全展开的叶片作为黄顶菊嫩叶,第5对叶片作为黄顶菊老叶来研究同一器官不同发育阶段的表观遗传变化特征。以上样品采集后均迅速用锡纸包裹并放入液氮中速冻,随后转入-70℃冰箱贮存,用于后续DNA甲基化的检测。

1.2 甲基化MSAP体系建立

1.2.1 DNA提取

为满足MSAP体系对DNA高质量的要求,参照王鹤潼等^[18]CTAB法并对其进行改进,提取黄顶菊不同组织器官的基因组DNA。

1.2.2 MSAP体系建立与优化

将提取的基因组DNA依次进行酶切连接、预扩增、选择性扩增3个PCR体系的扩增反应^[19-20]。PCR体系所用的接头和引物序列见表1。

表1 接头和引物序列信息

Table 1 Sequence information of adaptor and primers

接头和引物 Adaptor and primer	序列 Sequence
Eco-adaptor I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
Eco-adaptor II	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
H/M-adaptor I	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'
H/M-adaptor II	5'-CGTTCTAGACTCATC-3'
pre-E-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
pre-H/M-T	5'-ATCATGAGTCTGCTCGGT-3'
Eco-ANN Sequence	5'-GACTGCGTACCAATTCANN-3'
H/M-TNN Sequence	5'-GATGAGTCTAGAACGGTNN-3'

1.2.3 聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳及银染

制备5% PAGE凝胶,待其完全凝固后经过电泳、银染、显色过程,晾干后扫描并进行条带计数和分析。

1.3 数据统计与分析

采用Quantity One软件将5%变性PAGE凝胶100~500 bp范围的扩增条带进行标记并转化成0/1矩阵。用POP Gene软件分析引物的多样性指数。用SPSS 17软件和Origin 9.1软件分析并绘制黄顶菊各器官、各发育阶段主成分及甲基化状态图,更加直观地反映黄顶菊各器官及各发育阶段表观遗传多样性的变化。

2 结果与分析

2.1 黄顶菊DNA提取和PAGE凝胶电泳

提取高纯度DNA是本实验成功的关键,MSAP技术中样本基因组DNA必须满足 OD_{260}/OD_{280} 为1.7~1.9,本试验中黄顶菊根、茎和叶组织基因组DNA的 OD_{260}/OD_{280} 分别为1.78、1.82和1.88,不同发育阶段老叶和嫩叶组织基因组DNA的 OD_{260}/OD_{280} 分别为1.84和1.86,满足实验要求。进一步用1%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳图中基因组DNA(图1)条带亮、无杂质、无降解,可用于后续MSAP反应体系。

经MSAP体系扩增获得的混合产物通过5%变性PAGE凝胶电泳分离,部分引物的甲基化条带检测结果如图2所示,基因组扩增条带清晰且均匀,可用于扩增条带的统计与分析。本研究选用13对引物通过MSAP体系对黄顶菊不同器官进行甲基化检测,条带统计结果(表2)显示共扩增出536条条带,平均每对

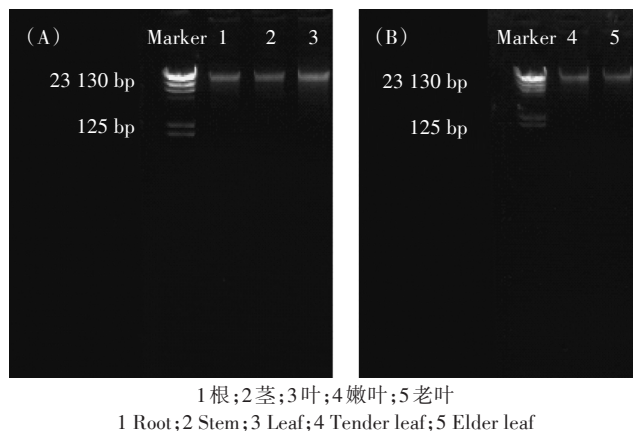


图1 黄顶菊不同器官(A)及不同发育阶段(B)基因组DNA提取
Figure 1 Genomic DNA extraction of the *Flaveria bidentis* in different organs(A) and different development stages(B)

引物扩增41条,其中EhHM7引物扩增获得的条带数最多,为52条,而EkHM5引物扩增的条带数最少,仅获得31条条带。通过MSAP体系选用14对引物对黄顶菊不同发育阶段组织进行甲基化检测(表2),共扩增出407条MSAP条带,平均每对引物扩增29条,其中EjHM7引物扩增获得的条带数最多,而EdHM7引物获得的条带数最少,分别为41条和16条。

2.2 引物的遗传多样性与贡献率

如表3所示,黄顶菊不同器官MSAP体系筛选的引物组合中观察等位基因数(na)平均值为1.842 6,有效等位基因数(ne)为1.623 1,杂合度(h)为0.345 0,香农多态性指数(I)为0.500 4。13对引物共扩增出536个位点,其中多态性位点为451个,多态性百分比为84.26%。全部引物组合的等位基因数、有效等位基因数、杂合度、香农多态性指数均高于平均值,引物多样性指数综合指标偏高,其中EhHM7对表观遗传多样性贡献率最大,多态性百分比为92.45%;EcHM6的贡献率最小,多态性百分比为78.84%。如表4所示,黄顶菊叶器官不同发育阶段MSAP体系筛选的引物组合中观察等位基因数平均值为1.720 5,有效等位基因数为1.462 9,杂合度为0.268 2,香农多态性指数为0.398 5。选用的14对引物的总扩增位点数为407,其中多态性位点为293个,多态性百分比为72.05%。EcHM1对表观遗传多样性贡献率最大,多态性百分比为80.56%;EcHM3的贡献率最小,多态性百分比为64.52%。

2.3 甲基化模式分析

Hpa II和*Msp* I两种内切酶均可以识别真核生物中的甲基化位点,即5'-CCGG-3'位点,其中5'-CC-

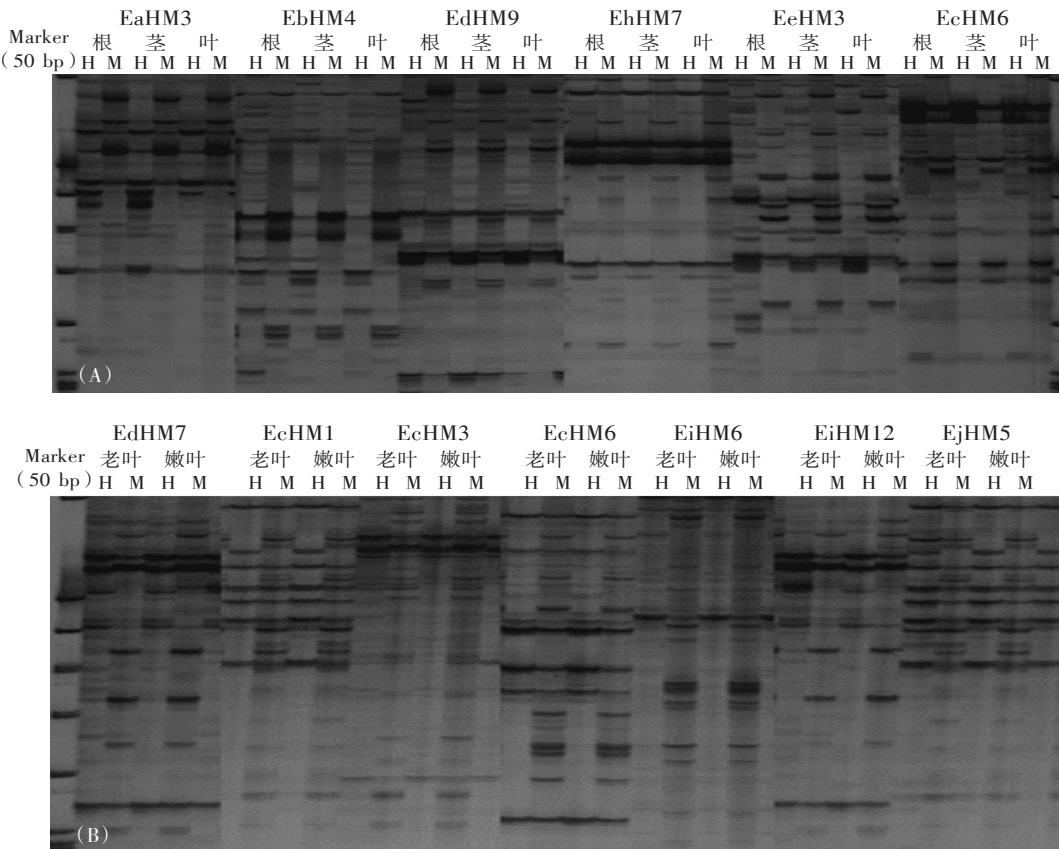


图2 黄顶菊不同器官(A)及不同发育阶段(B)DNA MSAP检测结果

Figure 2 Results of genomic DNA MSAP detection in different organs(A) and different developmental stages(B) of *Flaveria bidentis*

表2 黄顶菊不同器官及不同发育阶段引物组合的序列信息及扩增条带数

Table 2 Sequence information and amplification number of primer combinations in different organs and different development stages of *Flaveria bidentis*

黄顶菊不同器官 Different organs of <i>Flaveria bidentis</i>				黄顶菊叶片不同发育阶段 Different development stages of <i>Flaveria bidentis</i>			
引物 Primer	Eco-ANN Sequence	H/M-TNN Sequence	总条带数 Total strip	引物 Primer	Eco-ANN Sequence	H/M-TNN Sequence	总条带数 Total strip
EaHM1	Eco-AAG	Eco-TAG	40	EcHM1	Eco-ATG	Eco-TAG	34
EaHM2	Eco-AAG	Eco-TAC	36	EcHM2	Eco-ATG	Eco-TAC	28
EaHM3	Eco-AAG	Eco-TTG	46	EcHM3	Eco-ATG	Eco-TTG	31
EaHM7	Eco-AAG	Eco-TGG	42	EcHM6	Eco-ATG	Eco-TGT	28
EbHM4	Eco-AAC	Eco-TTC	40	EcHM7	Eco-ATG	Eco-TGG	36
EcHM6	Eco-ATG	Eco-TGT	39	EdHM7	Eco-ATC	Eco-TGG	16
EdHM9	Eco-ATC	Eco-TCA	38	EiHM2	Eco-ACA	Eco-TAC	26
EeHM3	Eco-AGA	Eco-TTG	45	EiHM6	Eco-ACA	Eco-TGT	31
EeHM4	Eco-AGA	Eco-TTC	36	EiHM10	Eco-ACA	Eco-TCT	27
EhHM4	Eco-AGC	Eco-TTC	47	EiHM11	Eco-ACA	Eco-TCG	29
EhHM7	Eco-AGC	Eco-TGG	52	EiHM12	Eco-ACA	Eco-TCC	21
EiHM8	Eco-ACC	Eco-TGC	44	EjHM1	Eco-ACT	Eco-TAG	20
EkHM5	Eco-ACG	Eco-TGA	31	EjHM5	Eco-ACT	Eco-TGA	39
总计Total			536	EjHM7	Eco-ACT	Eco-TGG	41
				总计Total			407

表3 黄顶菊不同器官引物的遗传多样性分析

Table 3 Primer genetic diversity analysis of different organs of *Flaveria bidentis*

引物 Primer	样本数 Sample number	观察等位 基因数 na	有效等位 基因数 ne	杂合度 h	香农多态性 指数 I	多态位点 Polymorphic site	总位点 Total site	多态百分比 Percentage of polymorphic/%
EaHM1	6	1.872 6±0.387 1	1.613 3±0.360 3	0.340 9±0.180 2	0.520 4±0.244 1	35	40	88.26
EaHM2	6	1.875 2±0.385 7	1.647 1±0.345 3	0.457 2±0.178 6	0.470 2±0.344 6	29	36	79.56
EaHM3	6	1.765 6±0.425 7	1.628 9±0.388 3	0.285 7±0.178 7	0.549 2±0.304 3	37	46	79.48
EaHM7	6	1.842 6±0.295 3	1.658 3±0.400 8	0.305 2±0.180 8	0.510 4±0.280 3	35	42	82.23
EbHM4	6	1.762 6±0.365 3	1.565 6±0.370 1	0.289 1±0.177 9	0.480 4±0.206 3	35	40	86.45
EcHM6	6	1.742 6±0.284 3	1.568 9±0.360 7	0.345 8±0.179 7	0.496 4±0.228 3	31	39	78.84
EdHM9	6	1.932 6±0.404 3	1.588 1±0.364 3	0.367 8±0.174 1	0.524 4±0.221 3	30	38	79.42
EeHM3	6	1.824 1±0.367 3	1.705 4±0.360 3	0.327 5±0.175 3	0.487 4±0.236 3	39	45	86.84
EeHM4	6	1.844 6±0.365 8	1.562 8±0.382 3	0.344 7±0.180 4	0.493 4±0.205 3	29	36	79.68
EhHM4	6	1.842 6±0.347 3	1.621 5±0.365 3	0.325 2±0.179 4	0.560 2±0.248 3	42	47	89.42
EhHM7	6	1.926 2±0.375 0	1.644 8±0.352 3	0.368 2±0.178 8	0.522 4±0.231 3	47	52	92.45
ElHM8	6	1.856 7±0.384 3	1.626 8±0.291 8	0.343 6±0.176 6	0.465 4±0.224 3	38	44	88.48
EkHM5	6	1.866 6±0.363 4	1.669 2±0.342 1	0.384 5±0.180 5	0.425 1±0.201 3	25	31	84.26
平均 Average	6	1.842 6±0.365 0	1.623 1±0.360 3	0.345 0±0.178 5	0.500 4±0.244 3	451	536	84.26

表4 黄顶菊叶片不同发育阶段引物的遗传多样性分析

Table 4 Primer genetic diversity analysis of *Flaveria bidentis* leaves at different development stages

引物 Primer	样本数 Sample number	观察等位 基因数 na	有效等位 基因数 ne	杂合度 h	香农多态性 指数 I	多态位点 Polymorphic site	总位点 Total site	多态百分比 Percentage of polymorphic/%
EcHM1	4	1.742 5±0.428 3	1.522 9±0.380 1	0.270 5±0.184 7	0.428 5±0.289 7	27	34	80.56
EcHM2	4	1.680 5±0.439 3	1.502 9±0.435 7	0.272 4±0.182 1	0.378 4±0.262 3	21	28	74.56
EcHM3	4	1.697 2±0.489 3	1.451 2±0.378 1	0.345 2±0.180 7	0.376 5±0.247 5	20	31	64.52
EcHM6	4	1.702 4±0.588 3	1.462 9±0.396 1	0.256 8±0.190 8	0.354 2±0.228 6	20	28	70.56
EcHM7	4	1.706 8±0.420 7	1.462 9±0.295 7	0.302 7±0.185 6	0.371 5±0.270 3	25	36	70.15
EdHM7	4	1.705 4±0.449 3	1.462 9±0.387 4	0.284 4±0.194 7	0.347 5±0.277 4	12	16	70.45
EiHM2	4	1.754 7±0.479 3	1.392 1±0.346 2	0.225 7±0.197 8	0.378 9±0.288 3	17	26	68.48
EiHM6	4	1.803 4±0.430 1	1.437 2±0.389 3	0.224 5±0.182 5	0.424 1±0.294 2	24	31	76.54
EiHM10	4	1.724 5±0.427 3	1.474 1±0.385 1	0.256 8±0.207 1	0.398 5±0.238 7	21	27	76.05
EiHM11	4	1.674 5±0.379 3	1.484 2±0.368 7	0.235 5±0.204 1	0.435 2±0.265 3	19	29	65.45
EiHM12	4	1.717 5±0.401 3	1.480 7±0.387 1	0.275 2±0.192 1	0.427 4±0.270 3	14	21	68.05
EjHM1	4	1.724 7±0.429 3	1.462 8±0.354 1	0.272 5±0.192 4	0.355 9±0.297 2	15	20	72.45
EjHM5	4	1.732 5±0.479 3	1.421 0±0.372 7	0.264 7±0.203 1	0.504 2±0.284 3	27	39	75.52
平均 Average	4	1.720 5±0.449 3	1.462 9±0.375 1	0.268 2±0.192 1	0.398 5±0.270 3	293	407	72.05

GG -3' 位点能被内切酶切开记作1,不能被内切酶切开记作0,据此可以将 MSAP 甲基化模式分为4种类型(表5)。I 类型甲基化状态为未甲基化,记作(1,1);II 类型甲基化状态为半甲基化,记作(1,0);III 类型甲基化状态为全甲基化,记作(0,1);IV 类型甲基化状态信息不确定,记作(0,0)。

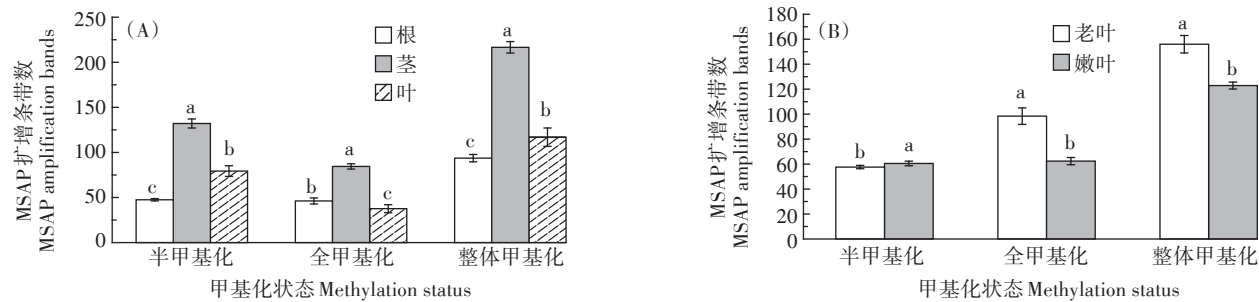
由图3可知,黄顶菊不同器官(根、茎和叶)间以及同一器官不同发育阶段(老叶和嫩叶)组织间的甲基化水平均表现出显著性差异($P<0.05$)。各甲基化

变异类型中,茎组织的甲基化发生率最高。其中,在发生半甲基化变异类型的各组织中,茎组织的甲基化发生率为30.28%,分别较叶组织和根组织高出12.63、19.74个百分点;全甲基化变异类型中,茎组织甲基化发生率为19.37%,分别较根组织和叶组织高出9.11、11.00个百分点;整体甲基化变异类型中,茎组织甲基化发生率为49.66%,分别较叶组织和根组织高出23.64、28.86个百分点;老叶组织的全甲基化和整体甲基化的发生率分别为33.29%和52.77%,分别较

表 5 MSAP 甲基化模式类型

Table 5 MSAP methylation pattern types

甲基化类型 Methylation type	酶切类型 Enzyme type	条带类型 Strip type	甲基化模式 Methylation pattern
I 型	<i>Hpa</i> II 和 <i>Msp</i> I 都能切开	(1,1)	5'-CCGG-3'胞嘧啶未甲基化或内侧胞嘧啶半甲基化
II 型	<i>Hpa</i> II 能切开, <i>Msp</i> I 不能切开	(1,0)	5'-CCGG-3'胞嘧啶外侧半甲基化
III 型	<i>Hpa</i> II 不能切开, <i>Msp</i> I 能切开	(0,1)	5'-CCGG-3'胞嘧啶内侧全甲基化
IV 型	<i>Hpa</i> II 和 <i>Msp</i> I 都切不开	(0,0)	5'-CCGG-3'胞嘧啶内外侧全甲基化



同种甲基化状态下不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Different letters for the same methylation status indicate significant differences ($P<0.05$)

图 3 黄顶菊不同器官(A)和不同发育阶段(B)的甲基化状态

Figure 3 Methylation status of *Flaveria bidentis* in different organs(A) and different development stages(B)

嫩叶组织高出 13.59、13.96 个百分点。

2.4 黄顶菊器官和发育阶段的解释总方差及主成分分析

通过对黄顶菊各器官及同一器官叶片不同发育阶段的总方差分析(表 6),可知其半甲基化、全甲基化、整体甲基化和未甲基化公因子方差分别为 0.892、0.894、0.702、0.981 和 0.669、0.909、0.739、0.961,数值接近则说明变量中大部分信息可用于结果分析,真实性较高。不同器官的主成分分析有且只有一个特征值 3.469(>1),可知半甲基化模式在甲基化水平中起主导作用。从图 4 可知,黄顶菊不同器官根、茎、叶各组织 10 个个体分别聚集在一起,形成了 3 个较为集中的区域,每个区域中个体间距离较近,说明其亲缘关系和甲基化变异类型都相近。根、茎和叶各个区域之间分布存在一定距离,可知不同器官间的甲基化模式有差异。黄顶菊相同器官个体间相互比较,可知叶片个体分布较根、茎的分布更为密集,意味着黄顶菊根、茎的个体间差异大于叶片个体间差异。黄顶菊叶片不同的发育阶段主成分分析只有一个特征值 3.279 (>1),嫩叶和老叶聚集区域显著,但两者分布距离较远,且各自聚集程度并不紧密,说明存在明显的个体间差异,这种个体间差异不可忽视。因此在进行 DNA 甲基化相关研究时,为得出缜密且可靠的实验结果,必须制定科学的采样方案,将植物不同器官以及相同器

表 6 黄顶菊不同器官和不同发育阶段解释总方差

Table 6 Interpretation of total variance of different organs and leaves at different development stages of *Flaveria bidentis*

项目 Items	甲基化类型 Methylation type	初始特征值 Initial Eigenvalues			提取平方和载入 Extraction sums of squared loadings		
		合计 Total	方差百分比 Percentage of variance/%	累积百分比 Cumulative percentage/%	合计 Total	方差百分比 Percentage of variance/%	累积百分比 Cumulative percentage/%
黄顶菊不同器官 Different organs of <i>Flaveria bidentis</i>	半甲基化 Hemi-methylation	3.469	86.724	86.724	3.469	86.724	86.724
	全甲基化 Full methylation	0.381	9.536	96.260			
	整体甲基化 Overall methylation	0.148	3.701	99.961			
	未甲基化 No methylation	0.002	0.039	100.000			
黄顶菊叶片不同 发育阶段 Different development stages of <i>Flaveria bidentis</i>	半甲基化 Hemi-methylation	3.279	81.966	81.966	3.279	81.966	81.966
	全甲基化 Full methylation	0.470	11.751	93.717			
	整体甲基化 Overall methylation	0.225	5.627	99.344			
	未甲基化 No methylation	0.026	0.656	100.000			

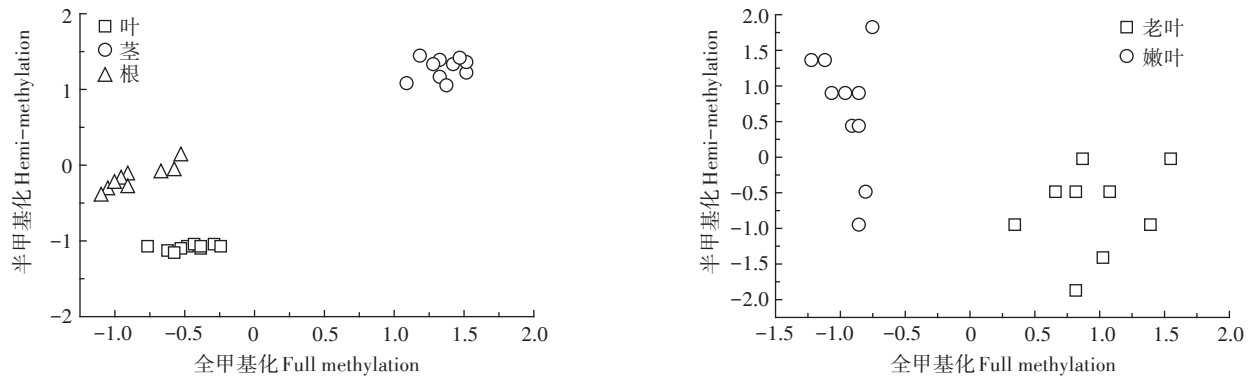


图4 黄顶菊不同器官和不同发育阶段主成分分析

Figure 4 Principal component analysis of different organs and different development stages of *Flaveria bidentis*

官不同发育阶段之间的甲基化特异性考虑在内。

3 讨论

黄顶菊是入侵我国华北地区最严重的杂草之一,为控制其蔓延发生,国内外学者对其入侵机制进行了广泛探究,但已有研究多集中在对不同环境条件下黄顶菊的种子萌发特性、形态、化感效应强弱及生理生化指标变化规律方面^[21-25,16],很少从表观遗传学角度研究其生态适应性机理^[26]。非生物胁迫下植物可以通过甲基化水平及模式的改变调节其基因表达,从而提高其适应性,DNA甲基化变异很可能是调控入侵植物新生境适应能力的重要途径之一,但黄顶菊各器官组织基因组DNA甲基化的相关研究报道还很少。DNA甲基化在植物体内随植物生长发育发生时空变化,包括同一植物的不同器官和同一器官的不同发育阶段^[7]。本研究中,通过对甲基化类型条带的统计,发现黄顶菊不同组织根、茎、叶及同一器官不同发育阶段老叶和嫩叶之间的甲基化水平均表现出显著性差异,说明黄顶菊在生长发育过程中其甲基化状态是一个动态过程,不同器官和同一器官不同发育阶段甲基化存在时空特异性,可能是其适应环境的不同于传统遗传学的一种内在机制。这与Finnegan等^[10]最早对拟南芥的研究结果一致,他们认为拟南芥成熟叶片的甲基化水平较嫩叶高出20%,但成熟叶片的甲基化水平又显著低于种子。

经过主成分分析发现,黄顶菊各组织甲基化水平及变异类型存在时空特异性,其不同器官之间亲缘关系较远,且根的个体间差异较大。黄顶菊老叶和嫩叶之间亲缘关系较远,且老叶和嫩叶个体间差异较为明显。施雯^[27]对喜旱莲子草和刺花莲子草的叶和茎两种器官DNA甲基化的研究中同样发现,两种莲子草的DNA甲基化具有器官特异性,且两种莲子草的器

官差异性均大于个体间差异。喜旱莲子草的不同发育阶段甲基化差异大于个体间差异,而刺花莲子草两者差异相当。陆光远等^[28]研究发现油菜的不同器官胚根、下胚轴和子叶的甲基化水平依次呈现显著升高的趋势,且种子在萌发过程中甲基化模式也发生变化,也说明植物在生长发育过程中甲基化模式及水平是一个动态的过程。由此可见,研究植物的表观遗传变化特征需要考虑器官的特异性差异及同一器官个体间的差异性,这种差异不可忽视。

4 结论

(1)各甲基化变异类型中黄顶菊不同器官中茎组织的甲基化发生率最高,在全甲基化和整体甲基化模式中黄顶菊不同发育阶段甲基化发生率表现为老叶>嫩叶,黄顶菊不同器官(根、茎和叶)间以及同一器官不同发育阶段(老叶和嫩叶)的组织间均表现出显著的甲基化水平差异性,这可能是其适应新生境的表观遗传学机理之一。

(2)黄顶菊根个体间、茎个体间、老叶与嫩叶个体间均存在较大的差异性,在采样过程中应充分考虑植物器官和生长发育阶段特异性。

参考文献:

- [1] Mirouze M, Paszkowski J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14:1-8.
- [2] Yan S, Rui H, Fu X, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in five tissues of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1):e86232.
- [3] Richards C L, Schrey A W, Pigliucci M. Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation[J]. *Ecology Letters*, 2012, 15(9):1016-1025.
- [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.
FAN Shi-cai, ZHANG Xue-gong. Progress of bioinformatics study in DNA methylation[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36(2):143-150.

- [5] 李新玲, 徐香玲. 植物DNA甲基化与表观遗传[J]. 中国农学通报, 2008, 24(1): 123-126.
LIN Xin-ling, XU Xiang-ling. DNA methylation in plants and its epigenetic[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(1): 123-126.
- [6] 李娜, 张旸, 解莉楠, 等. 植物DNA甲基化研究进展[J]. 植物生理学报, 2012, 48(11): 1027-1036.
LI Na, ZHANG Yang, XIE Li-nan, et al. Research progress in DNA methylation in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(11): 1027-1036.
- [7] 唐晓梅, 王艳, 马东伟, 等. 干旱胁迫下高羊茅基因组甲基化分析[J]. 草业学报, 2015, 24(4): 164-173.
TANG Xiao-mei, WANG Yan, MA Dong-wei, et al. Methylation analysis of tall fescue genome under drought stress[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(4): 164-173.
- [8] Iwasaki M, Paszkowski J. Identification of genes preventing transgenerational transmission of stress-induced epigenetic states[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(23): 8547-8552.
- [9] Ruizgarcía L, Cervera M T, Martínezzapater J M. DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development[J]. *Planta*, 2005, 222(2): 301-306.
- [10] Finnegan E J, Genger R K, Kovac K, et al. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(10): 5824-5829.
- [11] Sahu P P, Pandey G, Sharma N, et al. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(8): 1151-1159.
- [12] Marconi G, Pace R, Traini A, et al. Use of MSAP markers to analyse the effects of salt stress on DNA methylation in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera*) [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e75597.
- [13] Feng W, Dong Z, He B, et al. Analysis method of epigenetic DNA methylation to dynamically investigate the functional activity of transcription factors in gene expression[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 532.
- [14] 李香菊, 王贵启, 张朝贤, 等. 外来植物黄顶菊的分布、特征特性及化学防除[J]. 杂草科学, 2006(4): 58-61.
LI Xiang-ju, WANG Gui-qi, ZHANG Chao-xian, et al. The distribution of alien plants *Flaveria bidentis*, characteristics and chemical control[J]. *Weed Science*, 2006(4): 58-61.
- [15] 郭成亮, 胡文多, 朱敏峰, 等. 有害杂草黄顶菊在河北衡水的入侵途径调查[J]. 植物检疫, 2007, 2(3): 187-188.
GUO Cheng-liang, HU Wen-duo, ZHU Min-feng, et al. Harmful weeds *Flaveria bidentis* in Hebei Hengshui invading route survey[J]. *Plant Quarantine*, 2007, 2(3): 187-188.
- [16] 芦站根, 崔兴国, 蒋文静. 衡水湖黄顶菊的入侵情况的初步调查研究[J]. 衡水学院学报, 2006, 8(1): 69-71.
LU Zhan-gen, CUI Xing-guo, JIANG Wen-jing. The primary investigation and studies on the alien invasion of *Flaveria Bidentis* Kuntze in Hengshui Lake[J]. *Hengshui College Journal*, 2006, 8(1): 69-71.
- [17] 赵晓红, 杨殿林, 王慧, 等. 黄顶菊入侵对不同地区土壤氮循环及微生物量的影响[J]. 草业学报, 2015, 24(2): 62-69.
ZHAO Xiao-hong, YANG Dian-lin, WANG Hui, et al. Effects of the invasion of *Flaveria bidentis* on soil nitrogen cycling and microbial biomass in different regions[J]. *Acta Pratacultura Sinica*, 2015, 24(2): 62-69.
- [18] 王鹤潼, 何蕾, 宋杰, 等. 改进MSAP-RCR技术应用于Cd胁迫下拟南芥DNA甲基化分析[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(8): 1618-1624.
WANG He-tong, HE Lei, SONG Jie, et al. Assay of DNA methylation in *Arabidopsis* under Cd stress using improved MSAP-PCR technique[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(8): 1618-1624.
- [19] 张燕, 陈波. DNA甲基化敏感扩增多态性技术及其在作物遗传研究中的应用[J]. 西昌学院学报, 2009, 12(7): 7-11.
ZHANG Yan, CHEN Bo. DNA methylation-sensitive amplified polymorphism and its application in plant genetics[J]. *Xichang College Journal*, 2009, 12(7): 7-11.
- [20] 陈瑞娟, 何蕾, 孙梨宗, 等. 铜胁迫对拟南芥幼苗生长和基因组DNA甲基化的影响[J]. 生态学杂志, 2014, 19(4): 2650-2657.
CHEN Rui-juan, HE Lei, SUN Li-zong, et al. Effects of copper stress on the growth and genomic DNA methylation of *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 19(4): 2650-2657.
- [21] Huangfu C, Li H, Chen X, et al. Response of an invasive plant, *Flaveria bidentis*, to nitrogen addition: A test of form-preference uptake[J]. *Biological Invasions*, 2016, 18(11): 1-16.
- [22] Tetu S G, Tanz S K, Vella N, et al. The *Flaveria bidentis* beta-carbonic anhydrase gene family encodes cytosolic and chloroplastic isoforms demonstrating distinct organ-specific expression patterns[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(3): 1316-1327.
- [23] 乔建国, 张玉蕊, 康利芬. 黄顶菊物候和种子发芽特征研究[J]. 现代园林, 2008, 12: 84-86.
QIAO Jian-guo, ZHANG Yu-rui, KANG Li-fen. Study on phenology and seed germination characteristics of *Flaveria bidentis*[J]. *Modern Garden*, 2008, 12: 84-86.
- [24] 任艳萍, 江莎, 古松, 等. 外来入侵植物黄顶菊研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 6(4): 390-396.
REN Yan-ping, JIANG Sha, GU Song, et al. Research progress of invasive plants of *Flaveria bidentis*[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2008, 6(4): 390-396.
- [25] 樊翠芹, 王贵启, 李秉华, 等. 黄顶菊的生长繁殖特性[J]. 杂草科学, 2008(3): 37-39.
FAN Cui-qin, WANG Gui-qi, LI Bing-hua, et al. The growth and reproduction characteristics of *Flaveria bidentis*[J]. *Weed Science*, 2008(3): 37-39.
- [26] 全志星, 田佳源, 张思宇, 等. 不同入侵地区黄顶菊DNA表观遗传多样性变化特征[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(4): 625-634.
QUAN Zhi-xing, TIAN Jia-yuan, ZHANG Si-yu, et al. The epigenetic diversity of DNA of *Flaveria bidentis* in different invasive areas[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(4): 625-634.
- [27] 施雯. 植物DNA甲基化的器官特异性及其对生态遗传学采样策略的启示[D]. 昆明: 云南大学, 2012.
SHI Wen. Organ specificity of plant DNA methylation and its implications for ecological genetic sampling strategies[D]. Kunming: Yunnan University, 2012.
- [28] 陆光远, 伍晓明, 陈碧云, 等. 油菜种子萌发过程中DNA甲基化的MSAP分析[J]. 科学通报, 2005, 50(24): 2750-2756.
LU Guang-yuan, WU Xiao-ming, CHEN Bi-yun, et al. MSAP analysis of DNA methylation in rape seed germination[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(24): 2750-2756.