

## 红豆杉脱分化过程中的遗传和表观遗传变异

李丽琴, 付春华, 赵春芳, 吴文娟, 余龙江\*

华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

**摘要:** 采用扩增片段长度多态性(AFLP)和甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术分析红豆杉脱分化前后基因组DNA和DNA甲基化状态的变化。选用32个AFLP引物组合从红豆杉植株及其愈伤组织分别扩增出1 834个片段, 无多态性片段产生。这说明红豆杉植株在诱导形成愈伤组织的过程中基因组DNA保持高度的遗传稳定性。另用32个MSAP引物组合从红豆杉植株及其愈伤组织分别扩增出1 197个片段, 总扩增位点的甲基化水平由脱分化前的12.4%上升为16.2%, 表明红豆杉在脱分化过程中的某些位点发生了甲基化。红豆杉脱分化前后的DNA甲基化模式也存在较大差异, 说明DNA甲基化对愈伤组织形成有调控作用。

**关键词:** 脱分化; 红豆杉; AFLP; MSAP

## Genetic and Epigenetic Variations of *Taxus media* L. cv. *Hicksii* during Process of Dedifferentiation

LI Li-Qin, FU Chun-Hua, ZHAO Chun-Fang, WU Wen-Juan, YU Long-Jiang\*

School of Biological Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

**Abstract:** The amplified fragment-length polymorphism (AFLP) and methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) techniques were used to assess genetic and epigenetic variations of *Taxus media* during process of dedifferentiation. 1 834 bands were amplified from *Taxus media* plant and its callus with 32 pairs of AFLP primers, and no polymorphism fragments were detected. These indicated DNA genome of *Taxus media* kept highly genetic stability during the process of dedifferentiation. At the same time, 1 197 bands were amplified from *Taxus media* plant and its callus with 32 pairs of MSAP primers, methylation level rose from 12.4% to 16.2%, and epigenetic changes due to methylation were detected. What's more, methylation patterns experienced markedly variation, which meant DNA methylation would play role during the process of dedifferentiation.

**Key words:** dedifferentiation; *Taxus media*; AFLP; MSAP

植物组织培养的愈伤组织形成过程中细胞的超微结构常发生变化, 如细胞质生长很快, 细胞质中多聚核糖体数量增加, 线粒体增加, 高尔基体和内质网不断增加, 并不断产生囊泡(许萍和张丕方1996)。据王亚馥和王仑山(1989)报道, 枸杞子叶脱分化时RNA和可溶性蛋白含量均有明显变化。但是, 对于基因组DNA在细胞脱分化形成愈伤组织过程中的遗传变异情况尚不清楚。此外, 正常植物组织和其相应的愈伤组织不仅是细胞形态和组织结构有很大区别, 其次代谢产物的种类和含量也有改变。如张洁等(2006)检测红豆杉及其愈伤组织粗提物中紫杉烷的结果表明, 2种粗提液中紫杉烷的种类和含量不尽相同。本文从基因组DNA的遗传稳定性和表观遗传稳定性两个方面研究红豆杉愈伤组织形成过程中遗传性状改变的物质基础。细胞表观遗传是指不因DNA序列的变化而形成的基

因功能改变, DNA甲基化是表观遗传学的重要的研究内容之一, 参与调控基因表达、生物防御和生长发育。据报道, 在番茄(Messeguer等1991)、玉米(Lund等1995)、水稻(Dhar等1990)等植物中, 不同组织间的甲基化水平有差异, 这暗示甲基化在器官发育和细胞分化过程中可能起作用。但是DNA甲基化是否参与愈伤组织形成的脱分化过程尚未见研究。本文采用扩增片段长度多态性(AFLP)和甲基化敏感扩增多态性(MSAP)两种分子标记技术探讨红豆杉愈伤组织形成前后的遗传和表观遗传变异。

收稿 2009-02-11 修定 2009-05-21

资助 国家自然科学基金(20776058)和2006年教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0646)。

\* 通讯作者(E-mail: yulj@hust.edu.cn; Tel: 027-87792264)。

## 材料与方法

取培养于本校苗圃、长势良好的曼地亚红豆杉(*Taxus media* L. cv. *Hicksii*)的当年生嫩茎(采于2008年7月), 分别用75%乙醇消毒10 s, 双氧水消毒5 min, 0.5%氯化汞消毒8 min, 无菌水漂洗5次, 切成1~2 cm长的小段, 接种在MS培养基上诱导愈伤组织。用于愈伤组织诱导的MS培养基中含30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖、0.2 mg·L<sup>-1</sup>二氯苯氧乙酸和0.5 mg·L<sup>-1</sup>α-萘乙酸, pH 5.8。愈伤组织形成后转入新鲜培养基中继代, 培养温度为(24±1) °C, 暗培养。

采用改良的SDS-CTAB法从红豆杉嫩茎和新生愈伤组织中提取DNA。紫外分光光度计测定DNA样品浓度。1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量, 检测后将样品稀释至50 ng·μL。

AFLP分析参照Vos等(1995)文中的方法并适当修改。取200 ng DNA样品用*EcoRI*/*MseI*限制性内切酶(NEB) 37 °C酶切3 h, 2 U T4 DNA连接酶(MBI) 22 °C连接3 h。连接产物稀释5倍后采用E00/M00引物对进行预扩增, 预扩增产物稀释20倍作为选择性扩增DNA模板。选择性扩增采用(E+3)/(M+3)引物组合, 扩增产物进行变性凝胶电泳分离和硝酸银染色检测, 接头及引物序列见表1~3。

MSAP分析参考Smykal等(2007)文中的方法并适当修改。取200 ng DNA样品分别采用*EcoRI*/*HpaII* (H)和*EcoRI*/*MspI* (M) 2组限制性内切酶消化并以*HpaII*或*MspI*的识别位点(CCGG)为基础设计一对双链接头代替AFLP技术中的*MseI*接头, 其它步骤与AFLP技术相同, 接头及引物序列见表1~3。

SDS-PAGE分析中同一引物扩增产物中电泳

表1 AFLP和MSAP的接头序列

Table 1 Adapters used for AFLP and MSAP amplification

接头	序列(5'-3')
Ad-I <i>EcoRI</i>	CTCGTAGACTGCGTACC
Ad-II <i>EcoRI</i>	AATTGG TACGCAGTC
Ad-I <i>MseI</i>	GACGATGAGTCCTGAG
Ad-II <i>MseI</i>	TACTCAGGACTCAT
Ad-I HM	GATCATGAGTCCTGCT
Ad-II HM	CGAGCAGGACTCATGA

表2 AFLP和MSAP的预扩增序列

Table 2 Pre-amplification primers used for AFLP and MSAP

预扩增引物	序列(5'-3')
E+A	GACTGCGTACCAATTCA
M+C	GATGAGTCCTGAGTAAC
HM+T	ATCATGAGTCCTGCTCGGT

迁移率一致的条带被认为具有同源性, 按照相同迁移位置上有扩增条带记为“1”、无带为“0”的方法记录电泳谱带, 仅清晰、可重复的并且长度在200~1 000 bp范围内的扩增条带才被记录。

## 结果与讨论

### 1 愈伤组织形成过程中基因组DNA的遗传稳定性

用32个引物组合(*Eco*+8/*Mse*+4)对红豆杉植株嫩茎及其愈伤组织分别扩增出1 834个片段, 无多态性片段产生(图1)。说明红豆杉植株在诱导形成愈伤组织的过程中基因组DNA保持高度的遗传稳定性。

此外, 分析愈伤组织形成过程中的甲基化水平的结果表明, 红豆杉愈伤组织形成前后的DNA分别

表3 AFLP和MSAP的选择性扩增序列

Table 3 Selective amplification primers used for AFLP and MSAP amplification

选择性扩增引物	序列(5'-3')	选择性扩增引物	序列(5'-3')
E+AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG	M+CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA
E+ACA	GACTGCGTACCAATTCACA	M+CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG
E+ACT	GACTGCGTACCAATTCACT	M+CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT
E+AAC	GACTGCGTACCAATTCAAC	M+CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC
E+AGG	GACTGCGTACCAATTCAGG	HM+TAA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA
E+AGT	GACTGCGTACCAATTCAGT	HM+TCA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCA
E+AGC	GACTGCGTACCAATTCAGC	HM+TCC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
E+ACC	GACTGCGTACCAATTCACC	HM+TTC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC

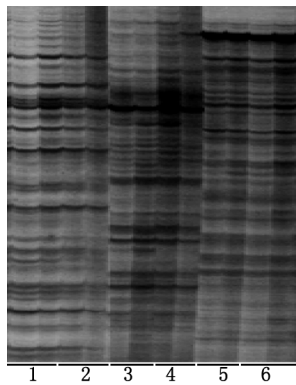


图1 红豆杉脱分化过程的AFLP模式  
Fig.1 AFLP patterns of *T. media* during process of dedifferentiation

1、3、5 分别表示以 E+AGC/M+CAC、E+AGC/M+CAA、E+AAG/M+CAC 为引物的红豆杉植株嫩茎扩增产物; 2、4、6 分别表示以 E+AGC/M+CAC、E+AGC/M+CAA、E+AAG/M+CAC 为引物的红豆杉愈伤组织扩增产物; 相邻的 2 个泳道为平行样品。

用限制性内切酶组合 *EcoRI/HpaII* (H)和 *EcoRI/MspI* (M)分别消化、连接、2 次扩增, 每个引物组合共产生 4 个泳道。32 个引物组合(*Eco*+8/*HM*+4)检测到的片段数目从 25~50 条不等。红豆杉植株及其愈伤组织扩增的总片段数为 1 197。其中, 总甲基化的位点数(包括全甲基化和只有一条链甲基化的半甲基化)分别为 149 和 194, 总扩增位点的甲基化水平分别为 12.4% 和 16.2%; 其中全甲基化的带数分别为 111 和 143, 全甲基化率分别为 9.3% 和 11.9%。红豆杉脱分化前后无论是总甲基化水平还是全甲基化率都显著升高。

## 2 愈伤组织形成过程中 DNA 甲基化的类型

比较红豆杉植株嫩茎及其愈伤组织 DNA 甲基化状态并根据带型的有无出现 14 种扩增带型的结果(表 4)表明, 14 种带型主要分为两大类。I 型

表 4 红豆杉脱分化过程中甲基化类型和位点数目

Table 4 Methylation patterns and number of sites in *T. media* during process of dedifferentiation

甲基化类型		嫩茎		愈伤组织		甲基化变化*		位点数目
		H	M	H	M	嫩茎	愈伤组织	
I 型	I-1	+	+	+	+	CCGG	GGCC	923
	I-2	-	+	-	+	CCGG	GGCC	32
	I-3	+	-	+	-	CCGG	GGCC	7
II 型	A1	+	+	-	-	CCGG	GGCC	41
	A2	+	+	+	-	CCGG	GGCC	38
	A3	+	+	-	+	CCGG	GGCC	46
	A4	+	-	-	-	CCGG	GGCC	3
	B1	-	-	+	+	CCGG	GGCC	34
	B2	-	+	+	+	CCGG	GGCC	26
	B3	+	-	+	+	CCGG	GGCC	20
	B4	-	-	+	-	CCGG	GGCC	6
	C1	+	-	-	+	CCGG	GGCC	8
	C2	-	-	-	+	CCGG	GGCC	8
	C3	-	+	-	-	CCGG	GGCC	5

H: *EcoRI/HpaII* 的酶切、扩增产物; M: *EcoRI/MspI* 的酶切、扩增产物; +: 有扩增产物; -: 无扩增产物; \* 表示带下划线胞嘧啶发生了甲基化。

为单态性位点, 脱分化前后带型模式相同, 不表现多态性, 说明DNA在脱分化前后甲基化状态保持不变; II型为多态性位点, 脱分化前后带型出现差异, 显示多态性条带, 说明DNA甲基化状态在脱分化前后发生了改变。某些片段出现在红豆杉植株嫩茎中, 但在其愈伤组织中却消失, 而另一些片段仅在愈伤组织中才能检测到, 这样的片段共有235条, 可分为A、B和C 3种类型(表4)。A型(甲基化)有128条片段, A1~A3在嫩茎的H和M泳道都有带, 而在愈伤组织中仅有一条带或都没带; A4在嫩茎H泳道有带, 但在愈伤组织中全无, 说明愈伤组织形成过程中基因组DNA的甲基化水平增加。B型(去甲基化)有86条片段, 嫩茎的H和M泳道无带或仅有其中一个泳道有带, 但愈伤组织中均出现条带, 说明在愈伤组织形成过程中甲基化水平下降。C型表示愈伤组织形成后甲基化水平有差异无法确定, 有21条带(图2)。

以上结果表明, 在红豆杉植株形成愈伤组织的脱分化过程中, 基因组DNA显示出高度的遗传稳定性, 但是DNA甲基化水平和模式均发生改变。DNA甲基化是表观遗传学中参与基因的差异表达、胚胎发育、细胞分化、染色质失活、转基因沉默等生物学过程。检测DNA甲基化的方法有多种, 有高效液相色谱(HPLC)法、重亚硫酸盐法、甲基化特异性PCR (methylation-specific PCR,

MSP)、基因测序法以及MSAP等分析技术。其中MSAP分析是基于选择性PCR的一种新技术, 有AFLP的优点, 能够检测样品DNA中大量的甲基化位点, 多态性高, 已广泛应用于多种植物基因组DNA甲基化的水平和模式分析(Peraza-Echeverria等2001; Chakrabarty等2003; Lu等2008)。有研究表明, DNA甲基化在植物的生长发育过程中起调控作用, 在不同组织或同一组织的不同发育阶段, 基因组DNA的甲基化水平和模式均存在差异(Portis等2004; Zhao等2007)。陈小强等(2008)已有研究证明, 大花蕙兰子房授粉前后DNA甲基化水平和甲基化模式均有较大差异。陆光远等(2005)的研究证明, 油菜种子萌发过程中同时发生甲基化和去甲基化事件, 以去甲基化占据主导地位; 该研究同时表明, 不同器官组织的甲基化水平也有一定的差异, 油菜可能通过甲基化和去甲基化的方式调控基因的表达, 并最终决定植株的生长发育和器官分化。这表明植物在生长发育过程中通过DNA甲基化和去甲基化等表观遗传方式可实现基因的有序表达。本文用MSAP方法证明红豆杉细胞脱分化前后存在DNA甲基化水平的差异, 从表观遗传学的角度探讨了植物愈伤组织形成过程中发生的分子变化机制。

### 参考文献

- 陈小强, 王春国, 李秀兰, 宋文芹, 陈瑞阳(2008). 大花蕙兰子房授粉前后基因组DNA胞嘧啶甲基化状态的MSAP分析. 云南植物研究, 30: 464~470
- 陆光远, 伍晓明, 陈碧云, 高桂珍, 许鲲, 李响枝(2005). 油菜种子萌发过程中DNA甲基化的MSAP分析. 科学通报, 50: 2750~2756
- 王亚馥, 王仑山(1989). 枸杞组织培养中过氧化物酶和可溶性蛋白质的变化. 实验生物学报, 22: 1~8
- 许萍, 张丕方(1996). 关于植物细胞脱分化的研究概况. 植物学通报, 13: 20~24
- 张洁, 段继诚, 梁振, 张维冰, 张丽华, 霍玉书, 张玉奎(2006). 东北红豆杉及其愈伤组织粗提取物中紫杉醇的HPLC-ESI-MS/MS分析研究. 药学学报, 41: 863~886
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003). Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). Plant Sci, 165: 61~68
- Dhar MS, Pethe VV, Gupta VS, Ranjekar PK (1990). Predominance and tissue specificity of adenine methylation in rice. Theor Appl Genet, 80: 402~408
- Lu Y, Rong T, Cao M (2008). Analysis of DNA methylation in different maize tissues. Journal of Genetics and Genomics, 35: 41~48
- Lund G, Messing J, Viotti A (1995). Endosperm specific demethylation and activation of specific alleles of alpha-

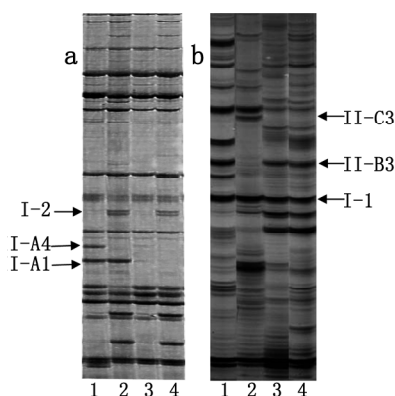


图2 红豆杉脱分化过程的MSAP模式

Fig.2 MSAP patterns of *T. media* during process of dedifferentiation

a: 扩增用引物E+AAG/HM+TAA; b: 扩增用引物E+ACA/HM+TCA。1: 植株嫩茎 *EcoRI/HpaII* 的酶切、扩增产物; 2: 植株嫩茎 *EcoRI/MspI* 酶切、扩增产物; 3: 愈伤组织 *EcoRI/HpaII* 的酶切、扩增产物; 4: 愈伤组织 *EcoRI/MspI* 酶切、扩增产物。箭头示愈伤组织形成前后的甲基化差异条带型(表4)。

- tubulin genes of *Zea mays*. *Mol Gen Genet*, 246: 716~722
- Messeguer R, Ganai MW, Steffens JC (1991). Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol Boil*, 16: 753~770
- Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia VA, James-Kay A (2001). Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci*, 161: 359~367
- Portis E, Acquadro A, Comino C, Lanteri S (2004). Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci*, 166: 169~178
- Smykal P, Valledor L, Rodriguez R, Griga M (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep*, 11: 1985~1998
- Vos PR, Hogers M, Bleeker M, van de Lee Reijans T, Hornes M, Fritjers A, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407~4414
- Zhao X, Chai Y, Liu B (2007). Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Sci*, 172: 930~938