

二甲基亚砷对拟南芥基因组DNA甲基化的影响

李忠爱, 杜亚琼, 李杰, 王子成*

河南大学农业技术研究所, 河南开封475004

摘要: 本文以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为材料, 研究不同浓度二甲基亚砷(DMSO)处理下拟南芥幼苗生长发育及基因组DNA的甲基化水平和变化模式。结果表明, 130、260、400和500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理影响拟南芥幼苗的根长、株高以及抽薹和开花时间; 甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)分析表明, 经130、260、400和500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理后基因组DNA甲基化比率分别为24.26%、14.36%、16.58%和13.02%, 对照为22.50%。即拟南芥经DMSO处理后存在基于DNA甲基化水平和模式改变的表现遗传变异, 5-甲基胞嘧啶百分含量的变化与DMSO处理浓度之间存在显著的剂量效应关系。与对照相比, 130、260、400和500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理下拟南芥幼苗基因组DNA的甲基化和去甲基化分别为7.21%、6.03%、11.62%、10.20%和6.25%、10.05%、8.08%、8.67%。

关键词: 拟南芥; 二甲基亚砷; DNA甲基化; MSAP

二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO), 是一种小分子量双亲性物质, 较易穿过细胞膜。DMSO可用作抗旱剂、抗冷剂、生长促进剂、细胞融合剂、细胞分化诱导剂、膜渗透增强剂等(Capriotti和Capriotti 2012)。在适当的浓度范围内, DMSO对植物的营养吸收、转化及转运具有促进作用, 从而促进植物生长。在农业上, 使用DMSO在柑橘叶片进行喷雾施肥, 可以加快铁元素的吸收(Lc-cmard 1967); 用适宜浓度(0.1%~0.5%)的DMSO浸种可促进小麦种子萌发, 提高小麦幼苗的株高、生物干重及根系活力, 促进小麦根系或叶面对营养元素的吸收以及在体内的转运及转化, 从而促进植物生长。基于DMSO的生理活性, DMSO可望用于种子包衣处理(宗学风等2002)。已有研究表明DMSO可作为植物细胞膜的通透剂使细胞内储存的一些代谢物质释放到细胞外, 从而促进目的产物产量的增加和提取, 并且对细胞的活性没有明显影响(Lundberg等1986)。

近年来有研究表明, DMSO作为一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 对动物细胞DNA甲基化产生一定的影响(纪少琿等2010)。在高等真核生物中, DNA甲基化(DNA methylation)通过对染色质的转录调控参与到胚胎发生, 体内稳态和癌症发生的过程中(Ehrlich 2003; Robertson 2001; Geiman和Robertson 2002)。DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)是DNA甲基化过程中起主要作用的酶(Li等1992; Okano等1999)。在体外, 通过向反应液中添加DMSO能够刺激甲基转移酶3a(Dnmt3a)的活性(Yokochi等2004)。最近的研究表

明, DMSO处理前造骨细胞, 增加了全基因组范围和基因特异性羟甲基化(Thaler等2012)。DNA甲基化(羟甲基化)特别是胞嘧啶的甲基化具有表现遗传效应和突变效应, 涉及一系列的生物学过程, 如基因组的稳定、X染色体的失活、基因的转录调节和转座子元件的活性、基因沉默、基因组印迹等(Bird和Wolffe 1999; Bestor 2000; Bender 2004; Chan等2005)。

目前, 尚无人对DMSO对植物基因组DNA甲基化的影响进行研究。为了研究DMSO诱导下植物基因组DNA甲基化水平的变异, 本文以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为材料, 观察不同浓度DMSO对其生长发育的影响, 采用MSAP方法分析DMSO处理下拟南芥CCGG位点胞嘧啶甲基化水平和模式的变化, 为从DNA水平上揭示植物对DMSO处理的反应机制提供一定的理论依据。

材料与方法

1 实验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)以Col-0生态型为实验材料。DMSO为分析纯, 购于天津德恩化学试剂有限公司。

2 实验材料的培养与DMSO胁迫处理

拟南芥干燥的种子经75%乙醇表面消毒30 s,

收稿 2015-10-08 修定 2016-01-01

资助 国家自然科学基金(31171982、31372090)和河南大学科研基金(xxjc. 20140008)。

* 通讯作者(E-mail: wzc@henu.edu.cn)。

移去乙醇,加入0.1%升汞表面消毒5~8 min, 无菌水冲洗6~8次后, 点种于MS固体培养基(MS盐+3%蔗糖+0.6%琼脂, pH 5.8)上, 于4°C条件下春化3 d, 放于培养间(光/暗为16 h/8 h, 温度18~22°C, 光照强度 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度80%)中培养2周后供实验用。根据预实验的结果, $575 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上DMSO处理拟南芥幼苗全部死亡, 所以DMSO处理浓度分别选取130、260、400和 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对照为无DMSO的MS培养基。DMSO处理2周, 每个处理100株拟南芥, 重复3次。生长2周的幼苗从培养皿转移到蛭石:营养土=1:1的土壤中继续于培养间培养, 用透明塑料罩遮盖好, 保持幼苗处于湿度较高的环境, 大约2周后即可把罩子取掉, 9周后可以收获拟南芥种子。

3 不同浓度DMSO处理拟南芥后的生长测定

统计拟南芥1至6 d内的萌发率。DMSO处理14 d后, 测定幼苗每株主根长(cm)。根长测定采用

直接法(李雪林等2009)。移苗后记录抽薹和开花时间以及种子成熟时株高等表型特征。

4 拟南芥DNA的提取

拟南芥幼苗培养14 d后用于提取DNA。每个处理的材料, 分别取30~40株幼苗上的嫩叶混合, 采用CTAB法(Micheli等1994)提取DNA。去除RNA 纯化后的DNA 质量和浓度检测采用0.8%的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计(北京普析, TU-1800)进行检测, 于4°C或-20°C冰箱中保存备用。

5 MSAP分析

MSAP分析操作过程均参照何艳霞等(2007)和王子成等(2009)所述方法。分子标记检测所用的接头及引物均由上海生工公司合成。

实验结果

1 DMSO对拟南芥生长发育的影响

DMSO处理影响植物的生长发育(图1)。统计

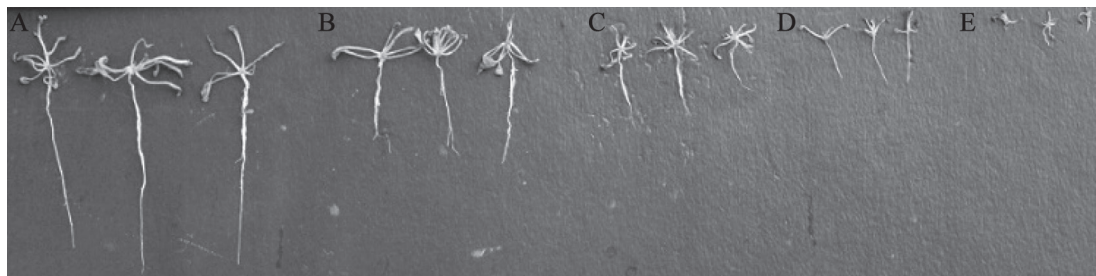


图1 二甲基亚砷处理影响植物的生长发育

Fig.1 DMSO treatment affects plant growth and development

二甲基亚砷处理14 d的拟南芥幼苗, DMSO浓度分别为A: $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, B: $130 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C: $260 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D: $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, E: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

不同浓度DMSO处理后拟南芥种子的萌发率, 与对照相比, 130、260、400和 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理下第2天萌发率显著下降(图2)。DMSO对拟南芥幼苗根生长有明显的抑制作用, 浓度越高抑制作用越显著(图3)。移苗于营养土, 待种子成熟时测量株高, 与对照相比, 经DMSO处理的拟南芥在解除胁迫生长60 d后, $260 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO对株高有促进作用; 其他浓度的DMSO处理对株高均有抑制作用(图3)。DMSO影响拟南芥抽薹和开花时间, 当DMSO浓度为 $130 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抽薹和开花时间均早于对照; $260 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抽薹和开花时间与对照一致; 而当浓度在 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时, 抽薹和开

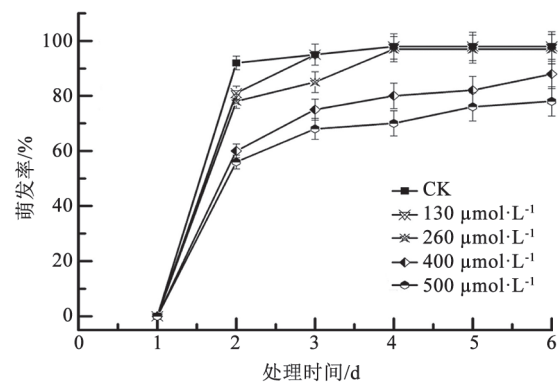


图2 不同浓度二甲基亚砷处理的拟南芥种子萌发率
Fig.2 The germination rate of *Arabidopsis* seeds in different treatment concentrations of DMSO

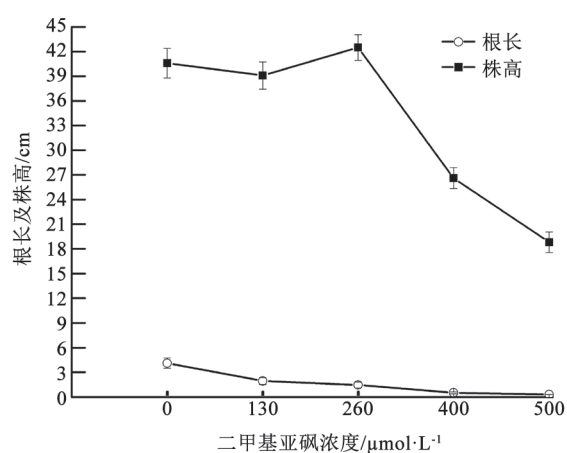


图3 二甲基亚砜对拟南芥生长的影响

Fig.3 Effect of DMSO on the growth of *Arabidopsis* seedlings
每个处理100株,重复3次。

花时间均晚于对照(图4)。这可能是由于高浓度的DMSO对植株有一定的毒性,使拟南芥的生长发育受到明显抑制。

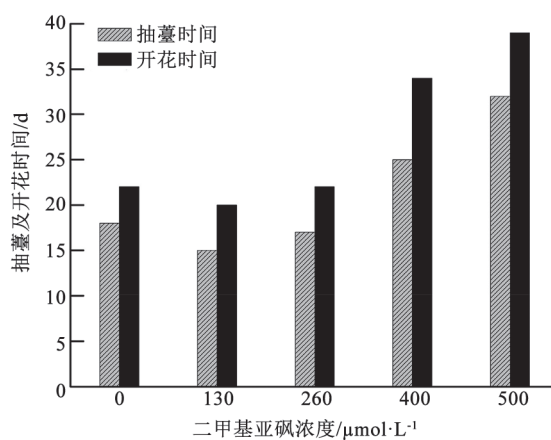


图4 不同浓度二甲基亚砜处理对拟南芥抽薹和开花时间的影响

Fig.4 The bolting and flowering time of *Arabidopsis* in different treatment concentrations of DMSO

2 DMSO处理引起的甲基化水平变化

*HpaII*和*MspI*是一组同裂酶,二者均识别并切割5'-CCGG-3'序列,但是,*HpaII*对胞嘧啶的甲基化极其敏感,它不能切割任何1个或2个胞嘧啶均甲基化的序列,也即*HpaII*对5'-CmCGG-3'、5'-mC-CGG-3'和5'-mCmCGG-3'都不能表现活性,但是若只在单链发生甲基化,它是能够识别并切割的。

而*MspI*只对外部胞嘧啶的甲基化敏感,即*MspI*可以切割5'-CmCGG-3',但不能切割5'-mCCGG-3'。样品DNA经*HpaII/EcoRI*(H)和*MspI/EcoRI*(M)酶切后的产物通常有4种甲基化带型,但在聚丙烯酰胺凝胶电泳分析胶上只能检测出3种甲基化带型(图5)。I型带是在*EcoRI/HpaII*和*EcoRI/MspI*两种酶切组合中均出现的带,表明CCGG位点未发生甲基化;II型带是在*EcoRI/HpaII*酶切中不出现但在*EcoRI/MspI*中出现,表明CCGG位点发生全甲基化;III型带是在*EcoRI/HpaII*酶切中出现但在*EcoRI/MspI*中不出现的带,表明CCGG位点发生半甲基化。用*EcoRI*和*HpaII-MspI*的16对引物组合共扩增出1952条带,带型分布见表1。

为了检测拟南芥在响应DMSO处理过程中的DNA甲基化模式,利用不同的引物组合对来自对照和DMSO处理的拟南芥基因组DNA进行MSAP分析。结果表明,不同浓度的DMSO处理能导致拟

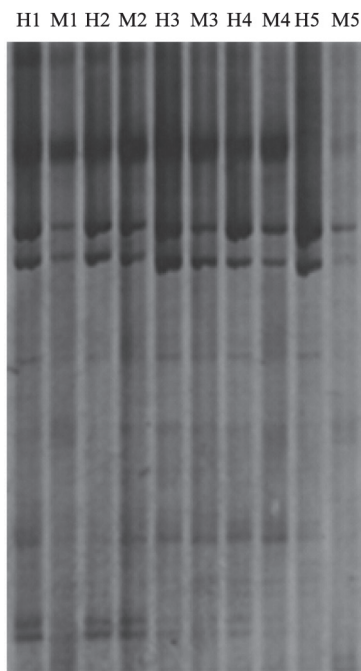


图5 二甲基亚砜处理与对照之间拟南芥幼苗基因组的甲基化敏感性扩增结果

Fig.5 Profiles of MSAP in *Arabidopsis* between control and DMSO treatments

H1、H2、H3、H4、H5为*HpaII/EcoRI*酶切, M1、M2、M3、M4、M5为*MspI/EcoRI*酶切。H1和M1泳道为对照组的MSAP带型。而H2、H3、H4、H5和M2、M3、M4、M5泳道为处理组的MSAP带型。

表1 不同浓度二甲基亚砜处理对拟南芥幼苗基因组DNA甲基化水平的影响

Table 1 Effects of different DMSO concentrations on the levels of genomic DNA methylation in *Arabidopsis* seedlings

DMSO浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	甲基化扩增类型						总扩增带数	总甲基化带数	总甲基化比率/%
	未甲基化的CCGG位点		甲基化的CCGG位点						
			完全甲基化位点		半甲基化位点				
	带型I	比率/%	带型II	比率/%	带型III	比率/%			
0 (CK)	310	77.50	44	11.00	46	11.50	400	90	22.50
130	306	75.74	44	10.89	54	13.37	404	98	24.26
260	334	85.64	34	8.72	22	5.64	390	56	14.36
400	312	83.42	46	12.30	16	4.28	374	62	16.58
500	334	86.98	38	9.90	12	3.13	384	50	13.02

总扩增带数=I+II+III; 总甲基化带数=II+III; 完全甲基化比率=类型II/总扩增带数; 半甲基化比率=类型III/总扩增带数; 总甲基化比率=总甲基化带数/总扩增带数。

南芥幼苗全基因组DNA胞嘧啶甲基化水平的改变,而且130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理时半甲基化比率高于全甲基化比率, 260、400和500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理时半甲基化比率均低于全甲基化比率(见表1)。由此推测, 拟南芥经DMSO处理后存在基于DNA甲基化水平和模式改变的表观遗传变异, 对照和DMSO处理样品在所检测到的内侧C完全甲基化水平上有升有降, 均表现出不同程度的变异, 但无统一规律。而外侧C半甲基化水平随DMSO处理浓度的增加呈下降的趋势。在130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理时拟南芥基因组CCGG位点发生甲基化的方式主要是以双链半甲基化($^m\text{CCGG}$)为主; 260 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上DMSO处理时拟南芥基因组CCGG位点发生甲基化的方式以双链全甲基化(C^mCCGG)为主, 575 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上DMSO处理幼苗全部死亡。

3 DMSO处理引起的甲基化状态变化

利用不同的引物组合在4种DMSO处理和对照样品DNA的HpaII/EcoRI(H)和MspI/EcoRI(M)酶切产物中进行选择性扩增。各引物组合检测到条带数目为15~40, 平均约25条。

DMSO处理与对照的甲基化敏感性扩增共出现12种带型(表2)。甲基化带型主要有多态性和单态性2种。多态性即对照与处理在甲基化模式上不同, 表明CCGG位点甲基化状态在DMSO处理后发生改变。该多态性又有3种状态即甲基化(A型)、去甲基化(B型)和不定类型(C型)。其中, A型中的A1和A2为重新甲基化(对照H和M泳道都有带, 而处理仅H或M泳道有带), A3和A4为超甲基化

(对照仅H或M有一条带, 而处理H和M泳道都没带)。A型表明DMSO诱导拟南芥幼苗基因组DNA发生了甲基化水平增加的变化; B型含B1、B2、B3和B4为去甲基化类型, 甲基化状态与A型相反, 表明DMSO处理后基因组DNA发生了甲基化水平下降的变化; C型为不定类型, 对照组与处理组中DNA甲基化程度的差异无法确定。单态性即对照与处理之间有相同的带型(D型), 表明DMSO处理后CCGG位点的甲基化状态没发生变化。其中, D1型为未甲基化, D2和D3为半甲基化。处理与对照的甲基化模式带型A、B、C和D及相应的位点数见表2。

130、260、400和500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理的拟南芥幼苗基因组DNA甲基化(A型)位点数分别为15、12、23和20, 分别占总甲基化多态性扩增位点数的7.21%、6.03%、11.62%和10.20%; 去甲基化(B型)位点数分别为13、20、16和17, 占总甲基化多态性扩增位点数的6.25%、10.05%、8.08%和8.67%。与对照相比, 130、260、400和500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理后的总甲基化多态性分别为14.42%、17.59%、20.20%和19.39%, 甲基化状态未发生变化(D型)比率分别为85.58%、82.41%、79.80%和80.61% (表3)。由此推测, DMSO处理后拟南芥幼苗基因组DNA的甲基化程度发生不同程度的变异; 在扩增的甲基化位点中, 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理诱导甲基化的位点数稍高于发生去甲基化的位点数, 260 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理诱导甲基化的位点数低于发生去甲基化的位点数, 而400和

表2 二甲基亚砜处理与对照的甲基化状态

Table 2 Patterns of DNA methylation in DMSO treatments and control

酶切				甲基化状态变化		对照与各处理间的差异				带型
H	M	H	M	处理前	处理后	130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs CK	260 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs CK	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs CK	500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs CK	
0	0	0	1	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	7	3	5	1	B3
0	0	1	1	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	CCGG GGCC	2	2	1	1	B4
0	1	1	1	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	CCGG GGCC	2	7	1	10	B1
1	0	1	1	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> GG <u>CC</u> GGCC	2	8	9	5	B2
1	1	1	0	CCGG GGCC	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> GG <u>CC</u> GGCC	7	3	4	3	A2
1	1	0	1	CCGG GGCC	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	0	0	2	5	A1
0	1	0	0	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	3	2	8	4	A3
1	0	0	0	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> GG <u>CC</u> GGCC	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	5	7	9	8	A4
0	1	1	0	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> GG <u>CC</u> GGCC	2	3	1	1	C
1	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	147	150	145	149	D1
1	0	1	0	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> GG <u>CC</u> CCGG	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> GG <u>CC</u> GGCC	16	4	1	2	D2
0	1	0	1	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>	15	10	12	7	D3

H和M分别代表HpaII/EcoRI和MspI/EcoRI酶切; C和CC表示甲基化的胞嘧啶; 1: 有带; 0: 无带。130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vs CK 表示130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二甲基亚砜处理组与对照组相比, 各种带型出现的数量; 其余类推。

表3 二甲基亚砜处理对拟南芥幼苗基因组DNA甲基化状态的影响

Table 3 Effects of different DMSO concentrations on the patterns of genomic DNA methylation in *Arabidopsis*

DMSO浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	甲基化带 ^a	总甲基化多态性带型								单态性带型	
		A型	比率/%	B型	比率/%	C型	比率/%	多态性带 ^b	比率/%	D型	比率/%
CK-130	208	15	7.21	13	6.25	2	0.96	30	14.42	178	85.58
CK-260	199	12	6.03	20	10.05	3	1.51	35	17.59	164	82.41
CK-400	198	23	11.62	16	8.08	1	0.51	40	20.20	158	79.80
CK-500	196	20	10.20	17	8.67	1	0.51	38	19.39	158	80.61

a: 甲基化带数=A+B+C+D; b: 多态性带数=A+B+C; 总甲基化多态性比率=A+B+C/总甲基化带数; 单态性比率=D/总甲基化带数; CK-130, CK-260, CK-400, CK-500分别表示拟南芥在不同浓度二甲基亚砜处理后与对照相比甲基化位点的差异变化。

500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理诱导甲基化的位点数均高于发生去甲基化的位点数(图6), 同时基因组DNA甲基化多态性也随之升高。表明拟南芥幼苗基因组DNA的甲基化和去甲基化之比会随着DMSO胁迫的增强而发生不同程度的变异。

讨 论

DMSO是一种亲脂的有机溶剂, 分子量小, 较易穿过细胞膜, 并能够代替DNA和腺苷蛋氨酸(AdoMet)底物周围的水分子, 导致酶的疏水性和

亲水性改变, 在底物周围形成一个DMSO聚簇或微团, 在Dnmt3a活性部位的过渡态下, 有利于电子的转移和共价键的形成, 体外刺激Dnmt3a的催化活性, 在反应底物(DNA寡核苷酸类和AdoMet)存在时, DMSO使Dnmt3a的活性提高4倍(Yokochi和Robertson 2004)。本研究结果表明, 适宜浓度的DMSO处理, 可以提高拟南芥的株高, 但与对照相比, 株高的提高未达到显著水平; 还可以提早拟南芥幼苗的抽薹和开花时间, 并且促进侧根的起始与延伸, 促进根毛的生长。值得注意的是, DMSO

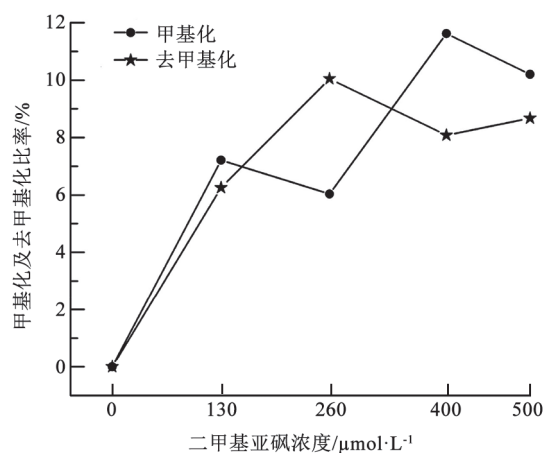


图6 二甲亚砷处理引起的拟南芥幼苗基因组DNA甲基化和去甲基化的变化趋势

Fig.6 Trends of DNA methylation and demethylation changes in *Arabidopsis* under DMSO stress

浓度过高,可造成脂膜结构严重破坏,保护酶系统崩溃,导致脂膜透性大大增强,生理代谢紊乱,植株早衰。本试验中,高浓度的DMSO处理拟南芥后,幼苗的根长、抽薹和开花时间、植株株高和单株结实率均受到显著抑制。

植物在生长发育过程中, DNA甲基化水平的改变在调控重要功能基因表达、基因组防御以及细胞发育与分化等方面具有重要作用(Richards 1997)。植物基因中的启动子和编码区的过度甲基化能阻碍转录因子复合体与DNA的结合抑制基因的表达,引起基因沉默;而去甲基化则有利于基因表达。因此,掌握基因组甲基化水平的变化有助于研究功能基因的表达调控以及植物适应逆境胁迫的分子机理。通常高等植物DNA被甲基化的碱基是胞嘧啶,不同植物及不同组织DNA甲基化不完全一致(Richards 1997)。另外,在植物基因组中,CAG、CTG和CCG位点也经常发生甲基化,但MSAP方法只能检测CG和部分CCG的甲基化情况且对于双链内外胞嘧啶甲基化无法检测,因此整个基因组中胞嘧啶的实际甲基化率可能高于本实验的结果。逆境胁迫能够提高DNA甲基化水平,如重金属(Cd、Pb)可以引起水稻、小麦、油菜等幼苗基因组中的总甲基化水平升高(葛才林等2002; Labra等2002)。在本研究中,拟南芥在DMSO处理下存在基于DNA甲基化水平和模式改变的表观遗

传变异。DMSO处理浓度与拟南芥基因组DNA甲基化水平变化呈剂量依赖效应, $130 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO处理下的拟南芥幼苗基因组DNA甲基化水平高于对照,其他浓度DMSO处理下的拟南芥幼苗基因组DNA甲基化水平均低于对照。不同浓度DMSO处理下, DNA甲基化模式的变异有明显差异;甲基化变异模式以甲基化为主(6.03%~11.62%),去甲基化变异较少(6.25%~10.05%)。 $260 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上DMSO处理下的拟南芥幼苗基因组DNA甲基化水平均低于对照,推测是由于胁迫引起低甲基化与基因表达有关。研究表明,低甲基化被认为是一种简单且间接影响逆境胁迫的方式或者是一种准确调控基因表达的防御机制,因此特异序列的甲基化变异经常与基因表达改变有关(Labra等2002)。

对DMSO处理下拟南芥基因组DNA甲基化模式的分析表明,在高浓度DMSO胁迫下,拟南芥幼苗基因组DNA甲基化的比率高于去甲基化比率(图6),这与其他逆境胁迫下DNA甲基化模式变化趋势一致(Kovalchuk等2003)。另外, DMSO处理下拟南芥基因组DNA的甲基化模式变化趋势也与其生长趋势相似。在 $400\sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO胁迫时拟南芥基因组DNA的去甲基化比率均低于甲基化比率,生长受到抑制。由此推测,拟南芥经DMSO处理后基因组DNA某些位点的甲基化状态发生变化而使基因表达发生了改变,产生或启动对DMSO胁迫的能动应激机制,当胁迫持续增强时利用甲基化关闭相关基因而终止其表达,以减少消耗来维持最低的生长发育(葛才林等2002)。植物在受到DMSO胁迫时,需要调动体内的某些防御机制,其中涉及许多生物化学反应,而生化反应绝大多数需要酶的催化,正是由于去甲基化的发生,编码与抗逆性生化反应有关的各种酶的基因得以表达,从而提高了植物对于DMSO胁迫的抗性。

通过MSAP检测到在不同浓度DMSO处理下拟南芥基因组中的胞嘧啶甲基化存在差异,这些差异的片段与拟南芥响应DMSO胁迫是否有关,具体涉及哪些基因,尚需进一步研究才能更深入地理解DMSO处理下基因组DNA的甲基化及逆境适应的机制。

参考文献

- Bender J (2004). DNA methylation and epigenetics. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 41–68
- Bestor TH (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human Mol Genet*, 9: 2395–2402
- Bird AP, Wolffe AP (1999). Methylation-induced repression—belts brace and chromatin. *Cell*, 99: 451–454
- Capriotti K, Capriotti JA (2012). Dimethyl sulfoxide history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol*, 5 (9): 24–26
- Chan SWL, Henderson IR, Jacobsen SE (2005). Gardening the genome DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, 6: 351–360
- Ehrlich M (2003). Expression of various genes is controlled by DNAmethylation during mammalian development. *Cell Biochem*, 88: 899–910
- Ge CL, Yang XY, Liu XN, Sun JH, Luo SS, Wang ZG (2002). Effect of heavy metal on rice and wheat of DNA methylation level. *J Plant Physiol Mol Biol*, 28 (5): 363–368 (in Chinese) [葛才林, 杨小勇, 刘向农, 孙锦荷, 罗时石, 王泽港(2002). 重金属对水稻和小麦DNA甲基化水平的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 28 (5): 363–368]
- Geiman TM, Robertson KD (2002). Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation—How does it all fit together? *J Cell Biochem*, 87: 117–125
- He YX, Wang ZC, Cao HP, Zhang CW (2007). Initial study of DNA methylation difference of garlic (*Allium sativum* L.) growing in light and darkness. *Plant Physiol Commun*, 32: 85–88 (in Chinese with English abstract) [何艳霞, 王子成, 曹红平, 张成婉(2007). 光暗条件下大蒜甲基化差异的初步研究. *植物生理学通讯*, 32: 85–88]
- Ji SH, Wang XH, Ji WZ, Jin LF (2010). Relative quantitative analysis of histone methylation and acetylation in synchronized mouse embryonic fibroblasts. *J Jiangxi Agric Univ*, 32: 350–355 (in Chinese with English abstract) [纪少琿, 王喜宏, 季维智, 金立方(2010). 同步化处理后小鼠成纤维细胞表观遗传水平的相对定量分析. *江西农业大学学报*, 32: 350–355]
- Kovalchuk O, Burke P, Arkhipov A, Kuchma N, Jill James S, Kovalchuk I, Pogribny I (2003). Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chemobyl-A mechanism for radiation adaptation. *Mutat Res*, 529: 13–20
- Labra M, Ghiani A, Citterio S, Sgorbati S, Sala F, Vannini C, Ruffini-Castiglione M, Bracale M (2002). Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips. *Plant Biol*, 4: 694–699
- Lecmard CD (1967). Use of DMSO as a Carrier for iron in nutrition foliar sprays applied to citrus. *Ann N Y Acad Sci*, 207: 148–158
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69: 915–926
- Li XL, Lin ZX, Nie YC, Guo XP, Zhang XL (2009). MSAP analysis of epigenetic changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under salt stress. *Acta Agron Sin*, 35: 588–596 (in Chinese with English abstract) [李雪林, 林忠旭, 聂以春, 郭小平, 张献龙(2009). 盐胁迫下棉花基因组DNA表观遗传变化的MSAP分析. *作物学报*, 35: 588–596]
- Lundberg P, Linsefors L, Vogel HJ, Brodelius P (1986). Permeabilization of plant cells: phosphorus – 31 NMR studies on the permeability of the tonoplast. *Plant Cell Rep*, 5: 13–16
- Micheli MR, Bova R, Pascale E, Ambrosio D (1994). Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res*, 22: 1921–1922
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99: 247–257
- Richards EJ (1997). DNA methylation and plant development. *Trends Genet*, 13: 319–323
- Robertson KD (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, 20: 3139–3155
- Thaler R, Spitzer S, Karlic H, Klaushofer K (2012). DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Epigenetics*, 7 (6): 635–651
- Wang ZC, Ma HY, He YX (2009). Effects of cadmium on *Arabidopsis thaliana* DNA methylation. *Plant Physiol Commun*, 45: 115–118 (in Chinese with English abstract) [王子成, 马红艳, 何艳霞(2009). 重金属镉对拟南芥DNA甲基化的影响. *植物生理学通讯*, 45: 115–118]
- Yoder JA, Walsh CP, Bester TH (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13: 335–340
- Yokochi T, Robertson KD (2004). Dimethyl sulfoxide stimulates the catalytic activity of *de novo* DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) *in vitro*. *Bioorg Chem*, 32: 234–243
- Zong XF, Wang SG, Zhong T, Gu Y (2002). Effects of dimethylsulfoxide (DMSO) on germination percentage of wheat seeds and the quality of the seedlings. *J Southwest Agric Univ*, 24 (5): 389–392 (in Chinese with English abstract) [宗学风, 王三根, 钟涛, 古玉(2002). DMSO对小麦种子发芽率及其幼苗素质影响的研究. *西南农业大学学报*, 24 (5): 389–392]

Effects of dimethyl sulfoxide on *Arabidopsis thaliana* DNA methylation

LI Zhong-Ai, DU Ya-Qiong, LI Jie, WANG Zi-Cheng*

Institute of Agricultural Biotechnology, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

Abstract: The objectives of this research were to assess the effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) stress on the development as well as genomic DNA methylation levels and patterns of *Arabidopsis thaliana* seedlings. Dimethyl sulfoxide at concentrations of 130, 260, 400 and 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ affected *Arabidopsis thaliana* seedlings root length, plant height, bolting and flowering time. Methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis showed that genomic DNA methylation levels of dimethyl sulfoxide stressed seedlings were lower than that of the untreated plants. The results indicated that dimethyl sulfoxide stress induced epigenetic variations in *A. thaliana* seedlings, and DMSO treatment concentration had significant dose effect relationship with the change of 5-methylcytosine percentage. At dimethyl sulfoxide concentrations of 130, 260, 400 and 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, methylation and demethylation of *A. thaliana* seedling genomic DNA were respectively 7.21%, 6.03%, 11.62%, 10.20% and 6.25%, 10.05%, 8.08%, 8.67%.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; dimethyl sulfoxide; DNA methylation; MSAP

Received 2015-10-08 Accepted 2016-01-01

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31171982, 31372090) and Scientific Research Foundation of Henan University (Grant No. xxjc. 20140008).

*Corresponding author (E-mail: wzc@henu.edu.cn).