

基于 cDNA-AFLP 及 MSAP 技术分析西瓜同源二倍体和四倍体低温胁迫差异表达

杨炳艳, 刘云婷, 胡文靖, 么大轩, 段会军

(河北农业大学/华北作物种质资源研究与利用教育部重点实验室, 保定 071001)

摘要: 为了研究西瓜二倍体及同源四倍体在低温胁迫下的分子机制, 以西瓜京欣 1 号母本 83166 (二倍体) 及其同源四倍体为材料, 利用 MSAP 及 cDNA-AFLP 技术研究低温处理前后基因表达的差异, 并对差异带进行克隆、测序和比对。22 对 MSAP 引物扩增得到 1564 个位点, 其中二倍体经低温处理后总甲基化率下降 2.8%, 四倍体下降 6.4%。将 12 条差异带与西瓜基因组数据库比对, 有 7 条带确定是西瓜基因组序列。26 对 cDNA-AFLP 引物组合扩增出 1267 条带, 其中二倍体上调表达占 48.2%, 下调表达占 51.8%; 四倍体上调表达占 58.6%, 下调表达占 41.4%。23 条差异带在 NCBI 中找到了同源序列基因, 包括假定蛋白 (39.13%)、能量与代谢 (43.48%)、物质运输 (8.70%)、转录相关 (4.35%) 以及逆境相关 (4.35%), 另有 10 条无同源序列。低温胁迫后, 四倍体去甲基化率与上调表达量均高于二倍体, 而且四倍体诱导出的差异基因参与了物质的能量代谢调控及逆境胁迫过程, 说明四倍体较二倍体有更强的耐冷性。

关键词: 西瓜; 低温处理; DNA 甲基化; cDNA-AFLP

Depend on cDNA-AFLP and MSAP Technical Analysis of Homologous Diploid and Tetraploid Watermelon Under Cold Stress

YANG Bing-yan, LIU Yun-ting, HU Wen-jing, YAO Da-xuan, DUAN Hui-jun

(Agricultural University of Hebei, Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: Homologous gene expression in diploid watermelon 83166 and its auto-tetraploid stressed by low-temperature were profiled by MSAP and cDNA-AFLP. A total of 1564 fragments were amplified by 22 MSAP primer combinations. Cold stress induced decline of methylation by 2.8% and 6.4% respectively in diploid and the tetraploid. Twelve fragments were sequenced and searched in watermelon genome database, in which seven fragments were certified as watermelon genome sequence. In addition, 1267 fragments were amplified with 26 cDNA-AFLP primer combinations, in which 48.2% were up-regulated, 51.8% down-regulated in the diploid watermelon; but in tetraploid, 58.6% were up-regulated, 41.4% down-regulated. NCBI Blast search showed that 23 fragments were homologous to functional genes, including hypothetical protein (39.13%), energy and metabolism protein (43.48%), material transportation protein (8.70%), transcription relation protein (4.35%) and stress-related protein (4.35%), the function of the other 10 fragments were unclear yet. After low temperature stress, more gene's were demethylation and up-regulated in the tetraploid than in the diploid. They are mainly genes involved in energy and metabolism and stress-related process.

Key words: watermelon; cold stress; DNA methylation; cDNA-AFLP

西瓜源产自热带非洲, 具有喜温耐热的特性, 多数西瓜品种耐冷性弱, 且缺乏耐冷性种质资源^[1-2]。许勇等^[3]研究发现野生西瓜在偏低温下表现出较

强的耐冷性, 但是由于野生西瓜口感较差, 在大田生产应用中受到限制。前人研究发现, 植物多倍体的抗逆性比相应二倍体高。刘文革等^[4]以‘蜜枚’二

收稿日期: 2015-01-13 修回日期: 2015-03-10 网络出版日期: 2015-10-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151014.1128.006.html>

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2007000547)

第一作者研究方向为作物生理与分子生物学。E-mail: yangbingyan88@126.com

通信作者: 段会军, 研究方向为作物生理与分子生物学。E-mail: hjduan@hebau.edu.cn

倍体西瓜与同源四倍体和三倍体为材料,研究耐冷性差异,发现经过冷锻炼的四倍体耐低温能力得到了提高,超过了二倍体。陈圣栋^[5]研究番茄二倍体与四倍体的抗冷性发现,经低温处理后四倍体各项生理指标均优于二倍体,表现出更好的耐冷性。因此更好地应用四倍体的种质资源创造耐冷性西瓜品种将是未来发展的一个方向。分子标记技术 RAPD^[6]、SSR^[7]、AFLP^[8]已经应用于研究西瓜遗传多样性,刘文革等^[9]以‘蜜枚’和 JM 西瓜品种二倍体及同源四倍体、三倍体为材料,利用 AFLP 技术分析不同倍性间的遗传差异,结果不同倍性西瓜在 DNA 水平上的多态性低。cDNA-AFLP (cDNA amplified fragment length polymorphism) 技术是 C. W. B. Bachem 等^[10]提出的一种差异表达鉴定技术,主要用于研究 mRNA 差异表达图谱,其主要特点是多态性丰富、稳定性高、重复性好且效率高^[11],在研究不同倍性西瓜的耐冷性上未见报道。甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 是一种改良的 AFLP 技术,主要用于研究 DNA 甲基化的水平及模式, DNA 甲基化与植物的逆境胁迫相关^[12]。聂丽娟等^[13]对 3 个西瓜品种的二倍体及同源四倍体进行 MSAP 分析发现品种内二倍体和同源四倍体间的 DNA 甲基敏感多态性差异不大。朱红菊^[14]研究发现 NaCl 胁迫后,四倍体西瓜去甲基化率及过甲基化率均高于二倍体。前人研究发现,不同倍性西瓜在 DNA 一级结构的差异很小,但是在低温胁迫下的生理生化变化差异很大,猜想不同倍性西瓜在 DNA 的甲基化及差异表达上存在差异。本研究中以京欣 1 号母本 83166 (二倍体) 及其同源四倍体为材料,利用 MSAP 和 cDNA-AFLP 技术对两者在低温胁迫前后基因表达的差异进行分析,将差异片段进行测序比对并推测其可能的生物学功能,旨在进一步揭示二倍体及同源四倍体西瓜耐冷性的分子机制,为西瓜耐冷性分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2010 年本实验室采用浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的胺磺灵 (oryzalin) 诱变京欣 1 号母本 83166 (二倍体) 的种子 (河北保定大农种子公司提供) 获得四倍体。

1.2 试验方法

1.2.1 幼苗培养及低温处理 将西瓜种子用 55℃ 温水浸种,不断搅拌 15 min,自然降温 7 h,播种于盛有灭菌蛭石的塑料营养钵中,每钵 3 粒,置于 PGX-3500-DN 型光照培养箱中 (25℃/15℃, 14 h 光照/10 h

黑暗,光照度 1500 lx)。培养至 3 叶 1 心时进行 4℃ 低温处理 12 h,处理和对照各 15 株。

1.2.2 叶片 DNA 的提取及纯化 取西瓜新鲜叶片 5 g,用 CTAB 法提取 DNA。将 DNA 溶于 ddH₂O 后加入 RNA 酶,于 37℃ 水浴锅中处理 2 h,除去 RNA。纯化后的 DNA 用琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪 (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) 检测,于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 叶片 RNA 的提取与单链 cDNA 的合成 取液氮研磨后的西瓜叶片 0.5 g,用天根 TRNzol 总 RNA 提取试剂提取总 RNA,经过琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪对总 RNA 的质量和浓度进行检测后,于 -80℃ 保存备用。利用康为世纪的 cDNA 合成试剂盒合成单链 cDNA,并利用琼脂糖凝胶电泳检测,于 -20℃ 保存备用。

1.2.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 MSAP 体系和主要步骤包括:750 ng DNA、3U *EcoR* I 和 3U *Msp* I/3U *Hpa* II 在 37℃ 酶切 7 h,取酶切片段用 5 pmol *EcoR* I 接头,50 pmol *Msp* I ~ *Hpa* II 接头在 2U *T₄* 连接酶 16℃ 连接过夜,并用稀释 20 倍的连接产物作为预扩增底物,再将所得的预扩增产物稀释 20 倍用于选择性扩增,选择性扩增的产物在 6% 变性的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,银染显色,扩增程序参照 AFLP。

cDNA-AFLP 体系和程序参照 C. W. B. Bachem 等^[10]的方法,主要步骤包括:750 ng cDNA、3U *EcoR* I 和 3U *Mse* I 在 37℃ 酶切 4 h,升温到 65℃ 酶切 1 h 以上,取酶切片段用 5 pmol *EcoR* I 接头,50 pmol *Mse* I 接头和 2U *T₄* 连接酶 16℃ 连接过夜,并用稀释 20 倍的连接产物作为预扩增底物,再将所得的预扩增产物稀释 10 倍用于选择性扩增,选择性扩增的产物在 6% 变性的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,银染显色,扩增程序与 AFLP 相同。

MSAP 以及 cDNA-AFLP 反应体系的引物序列见表 1 和表 2。

1.2.5 差异片段的回收及测序 用单刃刀片小心切下甲基化及 cDNA-AFLP 差异条带的凝胶,置于盛有 30 μL ddH₂O 的 200 μL 的离心管中,在 PCR 仪上加热 15 min,离心 10 min (10000 r/min),4℃ 静置过夜。取上清液进行第 2 次扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后利用北京天根公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。回收产物连接到天根公司提供的 pGM-T 载体上,载体与片段的摩尔比控制在 1:3 ~ 1:8。连接产物转入感受态大肠杆菌 Top10 内,蓝白斑筛选阳性克隆。所得的阳性克隆由上海生工生物工程技术有限公司测序。

表 1 MSAP 扩增引物

Table 1 Primers of MSAP

引物编号 Primer code	序列 Sequence	引物编号 Primer code	序列 Sequence
<i>EcoRI</i> adapter1	CTCGTAGACTGCGTACC	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (H/M) adapter1	GACGATGAGTCTAGAA
<i>EcoRI</i> adapter2	AATTGGTACGCAGTC	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (H/M) adapter2	CGTTCTAGACTCATC
E ₀₀	GACTGCGTACCAATTC	H/M ₀₀	GATGAGTCTAGAACGG
E ₁₁	GACTGCGTACCAATTCAA	H/M ₁	GATGAGTCTAGAACGGTA
E ₁₂	GACTGCGTACCAATTCAC	H/M ₂	GATGAGTCTAGAACGGTC
E ₁₃	GACTGCGTACCAATTCAG	H/M ₅	GATGAGTCTAGAACGGTCA
E ₁₆	GACTGCGTACCAATTCCC	H/M ₆	GATGAGTCTAGAACGGTGT
E ₁₈	GACTGCGTACCAATTCT	H/M ₇	GATGAGTCTAGAACGGTTC
E ₁₉	GACTGCGTACCAATTCGA	H/M ₁₈	GATGAGTCTAGAACGGCT
E ₂₀	GACTGCGTACCAATTCGC	H/M ₁₉	GATGAGTCTAGAACGGGA
		H/M ₈₆	GATGAGTCTAGAACGGCAA
		H/M ₈₉	GATGAGTCTAGAACGGCTA

表 2 cDNA-AFLP 扩增引物

Table 2 Primers of cDNA-AFLP

引物编号 Primer code	序列 Sequence	引物编号 Primer code	序列 Sequence
<i>EcoRI</i> adapter1	CTCGTAGACTGCGTACC	<i>Mse</i> I adapter1	GACGATGAGTCTCTGAG
<i>EcoRI</i> adapter2	AATTGGTACGCAGTC	<i>Mse</i> I adapter2	TACTCAGGACTCAT
E ₀₀	GACTGCGTACCAATTC	M ₀₀	GATGAGTCTCTGAGTAA
E ₁₁	GACTGCGTACCAATTCAA	M ₁₂	GATGAGTCTCTGAGTAAAC
E ₁₂	GACTGCGTACCAATTCAC	M ₁₅	GATGAGTCTCTGAGTAAACA
E ₁₃	GACTGCGTACCAATTCAG	M ₁₆	GATGAGTCTCTGAGTAAACC
E ₁₆	GACTGCGTACCAATTCCC	M ₁₇	GATGAGTCTCTGAGTAAACG
E ₁₇	GACTGCGTACCAATTCCG	M ₁₈	GATGAGTCTCTGAGTAAACT
E ₁₈	GACTGCGTACCAATTCT	M ₁₉	GATGAGTCTCTGAGTAAAGA
E ₂₀	GACTGCGTACCAATTCGC	M ₂₀	GATGAGTCTCTGAGTAAAGC
		M ₂₁	GATGAGTCTCTGAGTAAAGG

1.2.6 生物信息学分析 将测序得到的序列去除载体后与西瓜基因组数据库 (<http://www.icugi.org/>) 及 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中的 BLASTX 进行同源比对。

1.2.7 差异片段 Real Time PCR 验证 选取 cDNA-AFLP 差异片段中的 1 条,采用 Light Cycler[®] 1.5 实时荧光定量 PCR 系统进行 Real Time PCR 验证。选取西瓜内参基因 18s rRNA,使用 Primer 6.0 设计引物包括内参基因 18s rRNA 的引物 (F: AGTCGGGGGCATTCG-TATTT, R: CCCTGGTCGGCATCGTTTAT) 和锌指蛋白的引物 (F: AGGGCTGGGTATAGTGGCTCAT, R: ACT-GCGTACCAATTCTGACCT)。RNA 反转录合成的第 1 链 cDNA 作为内参基因 18s rRNA 和目的基因锌指蛋白的标准品。

PCR 体系: 10 μ L SYBR[®] Premix DimerEraserTM (2 \times)、0.6 μ L PCR Forward Primer (10 μ mol/L)、0.6 μ L PCR Reverse Primer (10 μ mol/L)、1 μ L Template cDNA、7.8 μ L ddH₂O, 共 20 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 15s, 58 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 15s, 40 个循环。

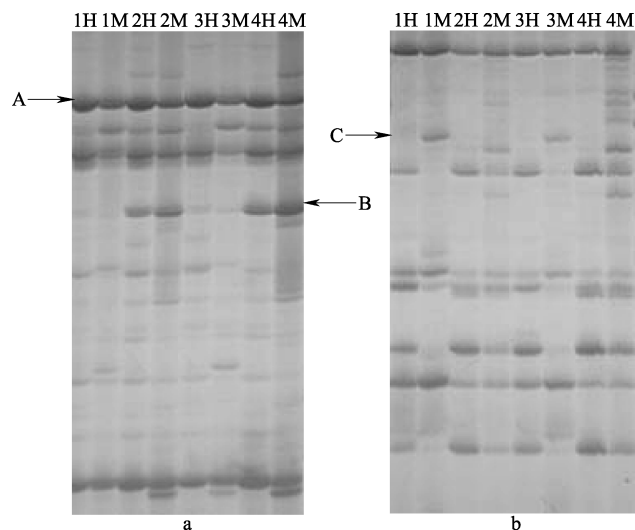
1.2.8 数据分析 利用两个样本平均数比较的 u 检验方法对甲基化水平上的差异进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 MSAP 的结果及分析

2.1.1 甲基化水平分析 采用 CTAB 法提取的西瓜叶片基因组 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 ~ 1.9 之间。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测主带清晰, 不含 RNA, 满足 MSAP 对模板的要求。

利用 22 对 MSAP 通用引物对二倍体、四倍体及低温处理后材料进行扩增,统计 100 ~ 500 bp 范围内的条带共得到 1596 个(图 1)。根据 *Msp* I 与 *Hpa* II 对甲基化位点 CCGG 的敏感程度不同,两种酶对应的扩增结果呈现出 4 种不同的带型,I(0 0)带型表示两种酶切在某位点处均没有带,II(0 1)带型表示 *Hpa* II 酶切在某位点处没带而 *Msp* I 酶切在该位点处有带,III(1 0)带型表示 *Hpa* II 酶切在某位点处有带而 *Msp* I 酶切在该位点处没带,IV(1 1)带型表示两种酶切在某位点处均有带(表 3)。由表 3 数据可知二倍体、低温处理二倍体、四倍体及低温处理四倍体未发生甲基化的比例分别为 49.1%、51.9%、46.8%、53.1%;CCGG 位点的甲基化类型以双链 DNA 内部甲基化为主,在二倍体、低温处理二倍体、四倍体及低温处理四倍体中的比例分别为 24.8%、23.5%、26.1%、21.1%。统计甲基化带型(表 4),二倍体经低温处理后总甲基化率下降 2.8%,四倍体下降了 6.2%。显著差异分析结果只有四倍体与低温处理的四倍体在半甲基化水平上的差异有统计学意义。



1:二倍体;2:低温处理的二倍体;3:四倍体;4:低温处理的四倍体。
H;*Eco*R I + *Hpa* II 双酶切;M;*Eco*R I + *Msp* I 双酶切。A:非甲基化;
B:去甲基化;C:过甲基化
1:The diploid,2:The diploid in cold stress,3:The tetraploid,4:The tetra-
ploid in cold stress. H;*Eco*R I + *Hpa* II double digestion, M;*Eco*R I +
Msp I double digestion. A: Non-methylated sites, B: Demethylation, C: Hy-
permethylation

图 1 西瓜基因组 DNA 的 MSAP 扩增图谱

Fig.1 MSAP fingerprints of watermelon genomic DNA

表 3 供试材料中各甲基化类型数目及比例

Table 3 Number and percentage of different methylation types in materials

甲基化类型 Type	甲基化状态 Methylation status	数目(比例%) Number(Percentage)			
		二倍体 Diploid	低温处理二倍体 Diploid in cold	四倍体 Tetraploid	低温处理四倍体 Tetraploid in cold
I(0 0)	双链 DNA 外部甲基化	53(13.3)	61(15.3)	49(12.3)	70(17.5)
II(0 1)	双链 DNA 内部甲基化	99(24.8)	94(23.5)	104(26.1)	84(21.1)
III(1 0)	单链 DNA 外部甲基化	51(12.8)	37(9.3)	59(14.8)	33(8.3)
IV(1 1)	无甲基化	196(49.1)	207(51.9)	187(46.8)	212(53.1)

表 4 基因组 DNA 经 MSAP 分析的甲基化水平

Table 4 DNA methylation levels based on MSAP analysis

材料 Materials	全甲基化 Full methylated		半甲基化 Hemimethylated		总甲基化 Total methylated	
	位点 Sites	比例(%) Percentage	位点 Sites	比例(%) Percentage	位点 Sites	比例(%) Percentage
二倍体	152	38.1	51	12.8	203	50.9
低温处理的二倍体	155	38.8	37	9.3	192	48.1
四倍体	153	38.3	59	14.8**	212	53.1
低温处理的四倍体	154	38.6	33	8.3	187	46.9

全甲基化 = I + II; 半甲基化 = III; 总甲基化 = I + II + III; * 表示差异显著; ** 表示差异极显著; 不标表示差异不显著

Full methylated = I + II, Hemimethylated = III, Total methylated = I + II + III, * Indicates significant differences, ** Indicates very significant difference, No marked indicate no significant difference

2.1.2 甲基化模式分析 将聚丙烯凝胶电泳上检测到的扩增位点计为“1”,未检测到的位点计为“0”,电泳谱带可分为 A、B、C、D,其中 A 包含 3 个亚类;B、C

分别包含 5 个亚类;D 包含 2 个亚类(表 5)。类型 A 为单态性位点,处理和对照之间 DNA 甲基化模式未发生改变,其中二倍体这种未发生甲基化模式变化的位

点数占所检测位点总数的 61.99%, 四倍体为 64.34%。类型 B 是指低温处理后较对照发生去甲基化的位点类型, 其中二倍体这种甲基化程度降低的位点占 18.37%, 四倍体占 17.83%。类型 C 是指低温处理后较对照发生过甲基化的类型位点, 二倍体和四倍体这种甲基化程度升高的位点分别占 18.37% 和 16.02%。类型 D 所占比率极低, 该类型位点甲基化程度和模式

都发生改变, 无法辨认 DNA 甲基化变动模式, 因此不在分析之列。受到低温胁迫后二倍体和四倍体均以未发生甲基化模式为主, 两者发生去甲基化和过甲基化的比例略有差异, 四倍体在去甲基化和过甲基化模式上的比例均低于二倍体, 说明四倍体较二倍体激活基因的数目少且沉默的基因数目也少, 二倍体和四倍体之间存在不同的甲基化模式机制抵御低温胁迫。

表 5 低温处理前后 DNA 甲基化模式变化比较分析

Table 5 Comparison of the changes of DNA methylation patterns between control and cold stress treatment

类型 Type	亚类型 Sub type	对照 CK		低温处理 In cold		位点数及比率 Number and frequency of patterns	
		H	M	H	M	二倍体 Diploid	四倍体 Tetraploid
A	A-1	1	1	1	1	165	172
	A-2	1	0	1	0	24	25
	A-3	0	1	0	1	54	52
合计 Total						243 (61.99%)	249 (64.34%)
B	B-1	1	0	1	1	20	23
	B-2	0	1	1	1	6	9
	B-3	0	0	1	1	16	8
	B-4	0	0	1	0	3	2
	B-5	0	0	0	1	27	27
合计 Total						72 (18.37%)	69 (17.83%)
C	C-1	1	1	1	0	7	1
	C-2	1	1	0	1	11	3
	C-3	1	1	0	0	13	11
	C-4	1	0	0	0	5	9
	C-5	0	1	0	0	36	38
合计 Total						72 (18.37%)	62 (16.02%)
D	D-1	0	1	1	0	3	5
	D-2	1	0	0	1	2	2
合计 Total						5 (1.28%)	7 (1.81%)

2.1.3 甲基化多态性片段分析及功能预测

MSAP 分析共回收了 12 条差异片段, 其甲基化模式均是二倍体与四倍体共同发生去甲基化和过甲基化。将差异片段进行二次扩增、回收、克隆、测序, 其中 6 条序列与西瓜数据库比对后相似度达到 99%~100%。再利用 NCBI 网站的 BLASTX 程序对 7 条差异片段进行同源序列比对 (表 6), 可以看出 M5、M6 与 M7 均为假定蛋白, M1 序列的相似蛋白与植物生长发育有关, M2 参与蛋白质磷酸化过程间接参与低温胁迫, M3 是一种能与真核启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用的转录因子。M4

序列识别调控序列的结合位点, 催化 DNA 的转录过程。

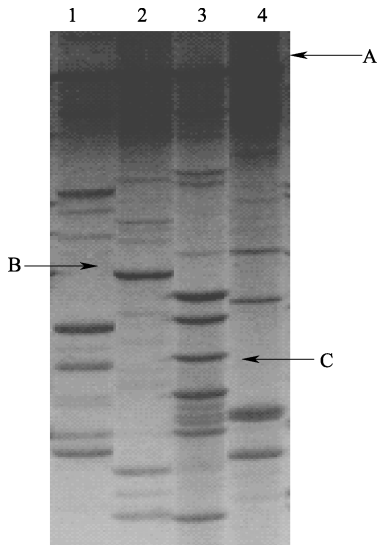
2.2 cDNA-AFLP 的结果及分析

2.2.1 差异表达分析 提取的总 RNA 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 可清晰看出 RNA 的 28S、18S 和 5.8S 3 条谱带, RNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 值在 2.0 左右, 说明 RNA 的提取质量较高, 可以满足反转录试验的要求。RNA 反转录后的单链 cDNA, 主要弥散在 100~1000 bp 之间, 质量较好, 可以进行下一步 cDNA-AFLP 标记分析。

表 6 MSAP 分离低温胁迫差异表达基因的同源性分析
Table 6 Homologies of sequences isolated by MSAP analysis in cold stress

TDFs	大小(bp) Size	登录号 Accession	模式 Pattern	编码相似蛋白 Similar protein	功能 Function
M1	292	EOX96331.1	去甲基化	C ₂ H ₂ 型锌指蛋白家族	参与植物的生长发育和对环境胁迫的应答等过程
M2	258	EOY28153.1	去甲基化	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	主要参与蛋白质的磷酸化过程,既可以调节蛋白质的结构也可以作为信号因子
M3	100	NP_173523.1	过甲基化	富含组氨酸的 C1 结构域家族蛋白	是真核启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用的转录因子
M4	145	CAC51380.1	过甲基化	RNA 聚合酶 β 亚基	RNA 聚合酶的重要组成部分,参与转录过程
M5	385	XP_643160.1	过甲基化	假定蛋白	无
M6	214	XP_004167709.1	去甲基化	假定蛋白	无
M7	150	EOY02413.1	过甲基化	假定蛋白	无

利用 cDNA-AFLP 技术检测了西瓜二倍体以及四倍体表达图谱(图 2)的差异,图 2 中显示 1 对通用引物扩增结果。用 26 对引物进行选择性地扩增,共得到 1267 条带,片段多集中于 100 ~ 500 bp 之间,平均每对引物组合扩增出约 49 条带。统计差异带结果:二倍体共 353 条差异带,其中上调表达 170 条(48.2%),下调表达 183(51.8%);四倍体共 394 条差异带,其中上调表达 231 条(58.6%),下调表达 163 条(41.4%)。



1:二倍体;2:低温处理的二倍体;3:四倍体;4:低温处理的四倍体。
A:相似表达;B:上调表达;C:下调表达
1:The diploid,2:The diploid in cold stress,3:The tetraploid,
4:The tetraploid in cold stress. A:Similar expression,
B:Down-regulated expression,C:Up-regulated expression

图 2 部分 cDNA-AFLP 扩增图谱

Fig. 2 Part of electrophoresis maps on cDNA-AFLP

2.2.2 差异片段分析及功能预测

cDNA-AFLP 共回收了 33 条差异片段,对差异

片段进行 2 次扩增、回收、克隆、测序,利用 NCBI 网站的 BLASTX 程序对 33 条差异片段进行比对。结果显示:与已知基因有同源性的片段有 23 条,约占测序数的 69.7%,包括假定蛋白 9 条(39.13%),能量与代谢相关 10 条(43.48%),物质运输相关 2 条(8.70%),转录因子相关 1 条(4.35%),逆境相关 1 条(4.35%),另外的 10 条片段与已知基因或序列无同源性,可能是尚未发现的新基因。表 7 中列出了测序所得到的 14 条 cDNA 片段信息。

2.2.3 差异片段 Real Time PCR 验证 选取任意一个上调的 cDNA-AFLP 差异片段进行 Real Time PCR 检测(图 3)。从图中可以看到低温处理后回收的锌指蛋白基因在低温处理后表达量较对照的表达量上升了。

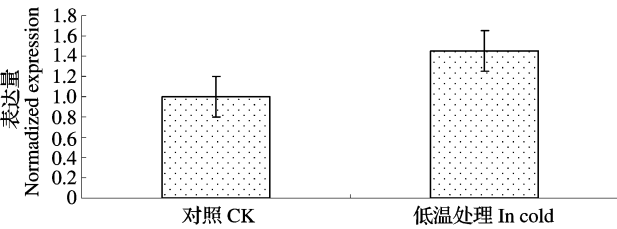


图 3 cDNA-AFLP 差异片段 Real Time PCR 验证
Fig. 3 Real time PCR verification of differential fragments by cDNA-AFLP

3 讨论

3.1 低温胁迫下西瓜幼苗甲基化分析

MSAP 技术利用两对酶 *EcoR* I + *Hpa* II/*EcoR* I + *Msp* I 对相同位点(CCGG/GGCC)中胞嘧啶甲基化修饰敏感性的不同对基因组分别进行酶切,且 MSAP 技术已被广泛应用于各种植物表观遗传学研究中^[15-16]。本试验统计 CCGG 位点甲基化类型发

表 7 cDNA-AFLP 分离低温胁迫差异表达基因的同源性分析

Table 7 Homologies of TDF sequences isolated by cDNA-AFLP analysis in cold stress

类型 Type	名称 Name	大小(bp) Size	登录号 Accession	相似蛋白 Similar protein	功能 Function
能量与代谢相关	TDF1	304	WP_016990997.1	1,4-二羟基-2-萘甲酸异戊烯转移酶	将异戊烯单元融入含有芳环的化合物,形成各类活性分子
	TDF2	327	ABN08973.1	天门冬氨酸酞酶	在酸性 PH 下有活性的蛋白水解酶
	TDF3	134	WP_022847483.1	脯氨酰-tRNA 合成酶	催化脯氨酸与同源 tRNA 氨酰化
	TDF4	195	AHB61201.1	Nef 蛋白	存在于细胞质和细胞膜上的负调控因子
	TDF5	213	AAO61995.1	Nef 链接蛋白	与 Nef 有关的链接蛋白质
	TDF6	179	YP_006809469.1	非核糖体肽合成酶	作为调节生长、繁殖和分化的信号分子
	TDF7	150	YP_007643274.1	天门冬氨酸氨甲酞基	是天门冬氨酸氨甲酞酶的组成亚基,是生物合成途径中的一种调节酶
	TDF8	313	XP_007016017.1	丝氨酸羧酞酶 S28 家族蛋白	与植物抗逆境相关
	TDF9	227	YP_003331565.1	DNA 的包装被膜蛋白 UL17	保护 DNA 结构的功能
	TDF10	179	ACN88213.1	NADH 脱氢酶亚基 4(线粒体)	是 NADH 脱氢酶的重要组成部分
物质运输相关	TDF11	159	YP_007542023.1	主要协助转运蛋白超家族	在细胞物质交换和能量代谢过程中起重要作用
	TDF12	297	GAE26757.1	L-阿拉伯糖转运 ATP 结合蛋白 ARAG	特异性识别 ATP,与能量供应有关
逆境相关	TDF13	192	NP_001001415.2	锌指蛋白	参与植物的生长发育和对环境胁迫的应答等过程
转录相关	TDF14	171	ACH47337.1	RNA 聚合酶 β 亚基	RNA 聚合酶的重要组成部分,参与转录过程

现,各个材料发生甲基化的类型均以双链 DNA 内部甲基化为主。就甲基化水平而言,研究发现二倍体和四倍体的全甲基化率、半甲基化率及总甲基化率差异均不显著,与聂丽娟等^[13]的研究结果一致,即品种内的二倍体和同源四倍体间的 DNA 甲基化敏感多态性差异不大。经低温处理后只有四倍体材料与低温处理的四倍体材料之间的半甲基化率下降的最为明显,说明了四倍体西瓜幼苗的甲基化水平受到低温影响显著。甲基化模式分析,二倍体和四倍体遇到低温后均发生了不同程度的去甲基化和过甲基化变化,说明了二倍体和四倍体存在不同甲基化机制抵御低温胁迫,从而使得更多的耐逆基因得到表达。MSAP 具有多态性高,无需预先知道所分析 DNA 的序列的特点即可对全基因组范围内胞嘧啶甲基化程度进行分析,又能检测 DNA 片段特异性位点甲基化状态^[17],但是植物 DNA 甲基化不仅发生在核基因组中,也出现在线粒体、叶绿体等细胞器中^[18],不仅有 5-甲基胞嘧啶(5-mC)甲基化,也有少量 N₆-甲基腺嘌呤(N₆-mA)及 7-甲基鸟嘌呤(7-mG)甲基化,而本试验仅分析了核基因组中 CCGG 的胞嘧啶甲基化程度,不能准确反映植物实际的甲基化水平。

差异带的测序结果显示 7 条带与西瓜基因组数据库比对后相似度很高,可以确定为西瓜基因,此 7 条带与 NCBI 数据库比对结果:3 条是假定蛋白,4 条是有意序列,分别是去甲基化模式的 M1、M2,过甲基化模式的 M3、M4。M1 序列与 C₂H₂ 型锌指蛋白家族同源性最高,此蛋白家族主要涉及植物的生长发育和对环境胁迫的应答^[19]。M2 序列编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要参与蛋白质的磷酸化过程,一方面可以调节蛋白质的活性,另一方面还可将细胞外刺激信号,如生长因子、植物激素、环境刺激等,转导至细胞及其核内,磷酸化为特异的转录因子^[20-22],此序列发生去甲基化使得该基因重新获得表达,从而使二倍体和四倍体响应低温胁迫。M3 编码富含组氨酸的 C1 结构域家族蛋白,是一种转录因子,与真核启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用,M3 发生过甲基化抑制转录调控低温反应。M4 序列与 RNA 聚合酶 β 亚基同源性最高,是 RNA 聚合酶的重要组成部分,主要作用是催化 DNA 的转录过程,从而起到抵御低温的作用。

3.2 低温胁迫下西瓜幼苗 cDNA-AFLP 分析

cDNA-AFLP 分析结果显示四倍体的上调表达量高于二倍体的上调表达量,说明低温条件可能诱

导了西瓜二倍体和四倍体中抗冷基因表达,尤其是四倍体,从而使得四倍体较二倍体有更好的耐冷性。本次试验得到的 33 条基因片段中有 23 条在 NCBI 中找到了同源序列,14 条 TDF 片段参与了能量与代谢、物质运输、转录等过程,表明这些基因可能参与了低温的响应过程,对二倍体及同源四倍体西瓜抵御低温胁迫起到了关键性作用,具体的调控过程有待进一步探讨。

TDF2 与 TDF4 属于二倍体的上调基因,而 TDF1、TDF3、TDF11 以及 TDF12 属于二倍体的下调基因。TDF1 为编码 1,4-二羟基-2-萘甲酸异戊烯转移酶的基因,根据异戊烯基转移酶的分类可归为芳香族异戊烯基转移酶,主要功能是将异戊烯单元融入含有芳环的化合物,从而形成具有重要生物学功能的各类活性分子,包括初生代谢中的泛醌、质体醌和维生素 E 以及植物次生代谢中的异戊烯类黄酮和真菌代谢物^[23]。TDF3 序列编码表达脯氨酰-tRNA 合成酶,主要作用是催化脯氨酸与同源 tRNA 氨酰化^[24]。低温处理后此基因不表达,从而使二倍体西瓜积累较多的脯氨酸,提高其自身抗冷性。TDF8 与 TDF9 在四倍体的低温胁迫中下调。TDF8 与丝氨酸羧肽酶 S28 家族蛋白的同源性较高,王育华等^[25]研究发现丝氨酸羧肽酶类蛋白与抗逆境相关,说明四倍体可以通过调控此基因抵御低温的迫害。TDF5、TDF6、TDF7、TDF13 及 TDF14 在四倍体的低温胁迫中上调。TDF13 序列编码锌指蛋白,田路明等^[26]发现低温能够诱导植物体内一些锌指蛋白基因发挥作用,使植物耐受低温胁迫。陈林波等^[27]在研究茶树的冷诱导基因时也分离到了锌指结构 B-box 蛋白,说明了锌指蛋白在不同植物中均有提高其耐冷性的作用。TDF14 是 RNA 聚合酶 β 亚基,催化 DNA 转录过程,表达更多的抗冷性基因。TDF10 是二倍体与四倍体共有的上调基因,编码线粒体中 NADH 脱氢酶亚基 4, NADH 脱氢酶的作用催化电子从 NADH 传递给辅酶 Q,完成氧化磷酸化过程,从而生成 ATP,为各种生理过程提供能量。贾晋等^[28]研究盐爪爪的耐盐基因时同样分离出了 NADH 脱氢酶亚基和 RNA 聚合酶 β 亚基 2 个基因片段,说明此 2 个基因在植物的抗逆过程中均发挥作用。本试验在 DNA 甲基化水平上分离出了 C₂H₂ 型锌指蛋白家族基因,在差异表达中分离出的 TDF13 序列同样编码锌指蛋白,MSAP 技术是在基因组 DNA 的水平上,而 cDNA-AFLP 技术是在 mRNA 反转录后得到的 cDNA 的基础上,两种技术分析利用的模板不同,不

能相互替代但是可以相互补充。

试验利用 Real Time PCR 检测 1 条上调表达基因锌指蛋白,结果在低温处理后此基因的表达量确实上升了,说明低温可促使某些基因的上调表达抵御低温迫害。

试验分离得到的差异片段大小为 100 ~ 500 bp,片段偏短,原因是 *EcoR* I 与 *Mse* I 双酶切获得的 cDNA 片段较短,可以通过 RACE 方法获得全长 cDNA 序列进而获得更准确的差异片段信息。而且本次试验中只考虑了条带的有无,忽略了条带明暗及粗细差异,可以通过利用不同酶切组合引物的筛选来弥补此试验的缺陷。

4 结论

西瓜四倍体的全甲基化率、半甲基化率与总甲基化率和二倍体相比较均有不同,且四倍体的半甲基化率在受到低温迫害后较二倍体下降最为明显,差异片段经过测序后发现与环境胁迫有关。对二倍体及四倍体的 cDNA 差异表达分析发现,低温处理的四倍体较二倍体上调表达量上升了,说明四倍体诱导了更多抗冷基因的表达响应低温迫害,从而使四倍体耐冷性高于二倍体;cDNA-AFLP 分析中 14 条带分别参与了能量与代谢、物质运输、逆境相关以及转录相关过程,为下一步研究西瓜二倍体和四倍体耐冷性的调控机制奠定基础。

参考文献

- [1] 李艳梅.西瓜种质资源耐冷性评价及遗传多样性分析[D].保定:河北农业大学,2007
- [2] 张爱华,王静华,李艳梅,等.西瓜种质资源耐低温性评价[J].中国农学通报,2010,26(18):219-223
- [3] 许勇,张海英,康国斌,等.西瓜野生种质幼苗耐冷性的生理生化特性与遗传研究[J].华北农学报,2000,15(2):67-71
- [4] 刘文革,王鸣,阎志红,等.冷锻炼对不同倍性西瓜幼苗 SOD、POD 活性及 MDA 含量的影响[J].西北植物学报,2004,24(4):578-582
- [5] 陈圣栋.四倍体番茄的诱导及与二倍体番茄抗冷性、品质比较的研究[D].泰安:山东农业大学,2007
- [6] Zhang X P, Rhodes B B, Skorupska H. RAPD molecular markers in watermelon[J]. Cucurbit Genet Coop Rep, 1994, 34(17): 116-119
- [7] Joobeur T, Gusmini G, Zhang X, et al. Construction of a watermelon BAC library and identification of a SSRs anchored to melon or *Arabidopsis* genomes [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 1553-1562
- [8] Levi A, Thomas C E, Newman M, et al. ISSR and AFLP marker differ among American watermelon cultivars with limited genetic diversity[J]. J Am Soc Hortic Sci, 2004, 129(4): 553-558
- [9] 刘文革,王鸣,阎志红.西瓜二倍体及同源多倍体遗传差异的 AFLP 分析[J].果树学报,2004,21(1):46-49
- [10] Bachem C W B, Heoven R S van der, Bruijn S M de, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of

- RNA fingerprinting based on AFLP; Analysis of gene expression during potato tuber development [J]. Plant J, 1996, 9 (5): 745-753
- [11] 赵继荣, 李宁, 刘红霞, 等. 小麦抗黄萎病相关基因 cDNA-AFLP 差异表达片段的验证[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10 (1): 16-30
- [12] 郭广平, 袁金玲, 吴晓丽, 等. DNA 甲基化在植物研究中的应用现状和前景[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12 (3): 425-430
- [13] 聂丽娟, 王子龙, 王一帆, 等. 二倍体和同源四倍体西瓜的 DNA 甲基化差异分析[J]. 核农学报, 2009, 23 (1): 80-84
- [14] 朱红菊. NaCl 胁迫对不同倍性西瓜幼苗影响及 DNA 甲基化分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012
- [15] Jagesh K T, Shaumaya S, Poonam C, et al. Analysis of genetic and epigenetic variation in *in vitro* propagated potato somatic hybrid by AFLP and MSAP marker[J]. Electron J Biotechn, 2013, 16 (6): 1-9
- [16] Park S Y, Murthy H N, Chakrabarthy D, et al. Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis[J]. Somatic Cell Genet, 2009, 45: 104-108
- [17] 李际红, 邢世岩, 王聪聪, 等. 银杏基因组 DNA 甲基化修饰位点的 MSAP 分析[J]. 园艺学报, 2011, 38 (8): 1429-1436
- [18] Finnegan E J, Kovae K A. Plant DNA methyltransferase[J]. Plant Mol Biol, 2000, 43: 189-201
- [19] 黄骥, 王建飞, 张红生. 植物 C₂H₂ 型锌指蛋白的结构与功能[J]. 遗传, 2004, 26 (3): 414-418
- [20] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade[J]. FASEB J, 1995, 9: 726-735
- [21] Robinson M J, Cobb M H. Mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9: 180-186
- [22] Khokhlatchev A V, Canagarajah B, Wilsbacher J, et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation[J]. Cell, 1998, 93: 605-615
- [23] Botta B, Monache G D, Menendez P, et al. Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation[J]. Trends Pharmacol Sci, 2005, 26 (12): 606-608
- [24] 周勤华, 周盛梅. 氨酰-tRNA 合成酶的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29 (6): 130-134
- [25] 王育华, 邹杰, 陈信波. 植物丝氨酸羧肽酶及其类蛋白的研究进展[J]. 生物学杂志, 2010, 27 (6): 72-75
- [26] 田路明, 黄丛林, 张秀海, 等. 逆境相关植物锌指蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2005 (6): 12-16
- [27] 陈林波, 李叶云, 房超, 等. 茶树冷诱导基因的 AFLP 筛选及其表达分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31 (1): 1-7
- [28] 贾晋, 蔡禄, 张鲁刚, 等. 盐爪爪耐盐相关基因的 cDNA-AFLP 分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31 (2): 280-285

欢迎订阅 2016 年《杂交水稻》

《杂交水稻》是由国家杂交水稻工程技术研究中心和湖南杂交水稻研究中心主办的、对国内外公开发行的专业技术刊物。本刊为历届全国中文核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 核心库来源期刊、《中国核心期刊 (遴选) 数据库》收录期刊、中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、《中国期刊网》和《中国学术期刊 (光盘版)》全文收录期刊、万方数据资源系统数字化期刊群全文收录期刊、湖南省一级期刊、湖南省十佳科技期刊、中国期刊方阵双效期刊。

本刊主要宣传报道我国及国外杂交水稻研究、应用中的最新成果、进展、动态、技术经验和信息等。辟有专题与综述、选育选配、栽培技术、繁殖制种、新组合、基础理论、国外动态和简讯等栏目。

双月刊, 每期定价 10 元, 全年 60 元。可到当地邮局订阅, 邮发代号: 42-297, 也可直接向本刊杂志社订阅。

地址: 长沙市芙蓉区马坡岭远大二路 736 号《杂交水稻》杂志社

邮编: 410125

电话: (0731) 82872955/82872954

E-mail: zjsdzs@163.com; zjsd@chinajournal.net.cn

网址: <http://zjsd.cbpt.cnki.net>