

## 红麻不育系与保持系基因组 DNA 甲基化比较分析

李增强<sup>1,2</sup> 史奇奇<sup>1,2</sup> 孔祥军<sup>1,2</sup> 汤丹峰<sup>1,2</sup> 廖小芳<sup>1,2</sup>  
韦范<sup>1,2</sup> 何冰<sup>1,2</sup> 莫良玉<sup>1,2</sup> 周瑞阳<sup>1,2</sup> 陈鹏<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西大学 农学院, 南宁 530004;

2. 广西高校植物遗传育种重点实验室, 南宁 530004)

**摘要** 为分析红麻不育系中甲基化模式,以红麻不育系 UG93A 和保持系 UG93B 为试验材料,分别提取 2 个材料的苗期叶片、四分体时期和双核期花药的基因组 DNA(gDNA),采用甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法分析比较其不同生长发育时期基因组 DNA 甲基化的变化规律,并研究甲基化变化基因的表达模式。结果表明:1)红麻生长发育过程中基因组 DNA 甲基化呈现一定的时空动态变化规律,不育系 UG93A 和保持系 UG93B 苗期叶片的甲基化率分别为 56.79%(全甲基化率为 44.25%,下同)和 58.89%(43.24%);花药发育的四分体时期的甲基化率分别为 48.08%(36.24%)和 44.25%(33.22%);花药发育的双核期的甲基化率分别为 45.30%(34.15%)和 48.78%(37.98%);2)不育系 UG93A 基因组 DNA 的甲基化率在苗期最高、花药败育发生前的四分体期次之、败育后的双核期最低,在整个生长发育过程中呈现先高后低的趋势;保持系 UG93B 基因组 DNA 的甲基化率在苗期最高、花药发育的四分体期最低、双核期次之,在整个生长发育过程中呈现先高后低、再缓慢上升的趋势。保持系 UG93B 基因组 DNA 的甲基化水平总体上高于不育系 UG93A,但在花药败育发生前的四分体时期,不育系的甲基化水平明显高于保持系;3)ATP8、SCL13、SRF6 和植物磺胺素受体 2 等基因在不育系 UG93A 与保持系 UG93B 中存在甲基化差异。qRT-PCR 分析结果表明,甲基化发生变化的基因在不育系和保持系之间的表达差异显著,推测这些基因的甲基化变化在红麻细胞质雄性不育(CMS)中发挥重要的作用。

**关键词** 红麻; 基因组 DNA 甲基化; CMS; MSAP; qRT-PCR

**中图分类号** S563.5; S311

**文章编号** 1007-4333(2017)11-0017-11

**文献标志码** A

## Comparative analysis on the kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) genomic DNA methylation of its male sterility line and maintainer line

LI Zengqiang<sup>1,2</sup>, SHI Qiqi<sup>1,2</sup>, KONG Xiangjun<sup>1,2</sup>, TANG Danfeng<sup>1,2</sup>, LIAO Xiaofang<sup>1,2</sup>,  
WEI Fan<sup>1,2</sup>, HE Bing<sup>1,2</sup>, MO Liangyu<sup>1,2</sup>, ZHOU Ruiyang<sup>1,2</sup>, CHEN Peng<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Nanning 530004, China)

**Abstract** Taking the CMS line UG93A and maintainer line UG93B of kenaf as materials, gDNA (genomic DNA) were extracted from seedling leaves, tetrad stage anthers and binucleate stage anthers respectively. MSAP (methylation sensitive amplified polymorphism) technology was used to analyze and compare their methylation of gDNA. The expression patterns of methylated genes were studied by qRT-PCR. The results showed that: 1) During the growth and development of kenaf, DNA methylation showed spatio-temporal variation pattern. The gDNA methylation rate (MSAP%) of UG93A and UG93B at seedling stage were 56.79% (full methylated rate was 44.25%, similar as

收稿日期: 2016-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(31260341,31560421); 广西自然科学基金(2015GXNSFAA139059); 国家现代农业产业技术体系(CARS-19-E16)

第一作者: 李增强, 硕士研究生, E-mail: 1134485681@qq.com

通讯作者: 陈鹏, 教授, 主要从事棉麻作物遗传育种和分子生物学研究, E-mail: hustwell@gmail.com

follows) and 58.89% (43.24%); MSAP% at tetrad stage was 48.08% (36.24%) and 44.25% (33.22%); MSAP% at binucleate stage was 45.30% (34.15%) and 48.78% (37.98%), respectively. 2) The ratio of UG93A was the highest at seedling stage, tetrad stage before anther abortion came the second, then binucleate stage after abortion. It displayed a trend of high to low during growth and development. The rate of UG93B was highest at seedling stage, followed by binucleate stage and tetrad stage showing a trend of high to low, and then gradually rising. Although, the rate of UG93B was higher than that of UG93A, but the UG93A was significantly higher than UG93B in the tetrad stage before anther abortion. 3) Gene methylation or demethylation happened in many genes including *atp8*, *SCL13*, *SRF6*, phytosulfokine receptor 2. These genes in UG93A and UG93B were differentially methylated. The results from qRT-PCR analysis reviewed that the differentially expression levels of methylated fragments between the cytoplasmic male sterile line and maintainer line showed significant differences, indicating gene methylation played an important role of in kenaf CMS.

**Keywords** kenaf; DNA methylation; CMS; MSAP; qRT-PCR

DNA 甲基化在基因组防御、基因沉默、转座子活动、植物开花和杂种优势利用等方面发挥极为重要的作用<sup>[1]</sup>。基因组在不同时空的甲基化模式变化是植物正常生长发育所必需的,植物中甲基化的异常都可能导致植株产生明显的异常表型<sup>[2]</sup>。植物细胞质雄性不育(CMS)广泛存在于高等植物中,在作物杂种优势利用中具有重要的作用<sup>[3]</sup>。

Xu 等<sup>[4]</sup>通过 MSAP 技术对水稻 4 种雄性不育胞质和对应的同核异质保持系进行了甲基化检测,发现两者之间的甲基化水平和甲基化位点均存在显著差异。Chen 等<sup>[5]</sup>发现育性得到恢复的杂交种甲基化水平显著高于不育的杂交种甲基化水平,并通过 MS-PCR 验证试验发现一个可能位于不育恢复基因 *Rf5* 区域的甲基化位点,由此推测 DNA 甲基化可能参与了 CMS-C 的育性调控。张艳花等<sup>[6]</sup>通过高效液相色谱法(HPLC),并结合小孢子发育的细胞学观察发现小孢子败育的主要时期(单核期)甲基化水平较高,推测 DNA 甲基化水平的变化可能与花粉败育有关。Lu 等<sup>[7]</sup>对玉米 CMS-C 的研究也表明,CMS 可能与雄穗 DNA 甲基化水平的变化有关。Wei 等<sup>[8]</sup>发现一些发生突变的花粉中,有关发育的基因在减数分裂期被抑制表达,而在四分体突变时期被激活,推测 DNA 甲基化参与到了棉花细胞核雄性不育的表达调控中。郭俊尧<sup>[9]</sup>利用 MSAP 技术分析了新型 CMS 不育系亚棉 A 在花药败育过程中 DNA 甲基化的变化情况,结果表明败育前的甲基化水平明显低于败育时和败育后,推测正是由于甲基化水平的提高,抑制了相关基因的表达,最终造成雄性不育。甲基化敏感扩增多态性(MSAP)是在改良 AFLP 的基础上发展起来的一种技术,它的原理是采用对基因组 DNA 甲基化敏感

性不同的 2 种限制性内切酶 (*Hpa* II 和 *Msp* I) 对 5'-CCGG-3' 位点进行酶切,2 种酶均能识别并切割 CCGG 序列,但是 2 种酶对该位点的敏感性不同,可切割产生不同的片段,通过扩增这些片段来揭示基因组 DNA 的甲基化情况<sup>[10]</sup>。现在,这种技术已经广泛应用到拟南芥、水稻、玉米和棉花等植物,已经成为 DNA 甲基化检测的一种经典方法。

为探索红麻 CMS 发生的机理,本课题组之前做了大量的研究工作<sup>[11-13]</sup>,虽然取得了很大的进展,但是其具体的分子机制目前仍不明晰。本研究拟从基因组 DNA 甲基化这一表观遗传的角度来探讨红麻 CMS 的分子机理。在以往对基因组 DNA 甲基化与植物 CMS 关系的研究中,并未从植物的整个生长发育时期对同核异质的不育系和保持系进行系统的比较分析。本研究主要探索同核异质的红麻不育系 UG93A 和保持系 UG93B 苗期叶片、四分体期和双核期花药的基因组 DNA 甲基化的变化规律,以及两者之间同时期同部位的甲基化差异。以期揭示红麻不育系和保持系生长发育过程中基因组 DNA 甲基化的变化规律及两者的差异,进而阐明基因组 DNA 甲基化调控红麻 CMS 发生的机理。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

选用本课题组多年鉴定保存的红麻同核异质材料不育系 UG93A 和保持系 UG93B,种植于试验田,在植株长到 15 cm 左右的苗期摘取 2 个材料的叶片,在开花期剥取 2 个材料四分体期和双核期的花药,液氮速冻后存于-80 °C 超低温冰箱。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

采用改良 CTAB 法<sup>[14]</sup>提取红麻上述材料的

gDNA, RNA 酶去除 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳及超微量紫外线分光光度计测定 gDNA 的质量及浓度, -20 °C 冰箱保存备用。

### 1.3 甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 分析

参照 Zhao 等<sup>[15]</sup>方法进行 MSAP 分析, 基因组

DNA 经过双酶切 (*EcoR* I / *Hpa* II 和 *EcoR* I / *Msp* I), 连接、预扩增、选择性扩增, 聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染和显色, 条带统计分析, 差异片段的回收、克隆、测序。接头序列、预扩增和选择性扩增引物序列见表 1。

表 1 接头和引物序列

Table 1 Lists of adapter and primer sequences

引物类型 Primer type	引物名称及碱基序列 (5'-3') Primer name and sequence (5'-3')			
	<i>EcoR</i> I (E)		<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I (HM)	
接头 Adapter	<i>EA1</i>	CTCGTAGACTGCGTACC	<i>HMA1</i>	GACGATGAGTCTAGAA
	<i>EA2</i>	AATTGGTACGCAGTC	<i>HMA2</i>	CGTTCTAGACTCATC
预扩增引物 Preamp primer	<i>E0</i>	GACTGCGTACCAATTCA	<i>HM0</i>	GATGAGTCTAGAACGGT
选扩增引物 Selective primer	<i>E1</i>	GACTGCGTACCAATTCAAC	<i>HM1</i>	GATGAGTCTAGAACGGTAG
	<i>E2</i>	GACTGCGTACCAATTCAAG	<i>HM2</i>	GATGAGTCTAGAACGGTAC
	<i>E3</i>	GACTGCGTACCAATTCACA	<i>HM3</i>	GATGAGTCTAGAACGGTTG
	<i>E4</i>	GACTGCGTACCAATTCACT	<i>HM4</i>	GATGAGTCTAGAACGGTTC
	<i>E5</i>	GACTGCGTACCAATTCACC	<i>HM5</i>	GATGAGTCTAGAACGGTGT
	<i>E6</i>	GACTGCGTACCAATTCACG	<i>HM6</i>	GATGAGTCTAGAACGGTGC
	<i>E7</i>	GACTGCGTACCAATTCAGC	<i>HM7</i>	GATGAGTCTAGAACGGTCT
	<i>E8</i>	GACTGCGTACCAATTCAGG	<i>HM8</i>	GATGAGTCTAGAACGGTCG

### 1.4 MSAP 多态性片段比对分析方法

聚丙烯酰胺凝胶经过显色后, 先对图片拍照保存, 然后对甲基化差异条带进行统计分析。 *EcoR* I / *Hpa* II 和 *EcoR* I / *Msp* I 酶切都有带, 记为 I 型 (无甲基化); *EcoR* I / *Hpa* II 酶切有带而 *EcoR* I / *Msp* I 酶切无带, 记为 II 型 (半甲基化); *EcoR* I / *Hpa* II 酶切无带而 *EcoR* I / *Msp* I 酶切有带, 记为 III 型 (全甲基化); *EcoR* I / *Hpa* II 和 *EcoR* I / *Msp* I 酶切都无带的记为 IV 型 (全甲基化)。甲基化率等于 4 种类型条带数目的总和除甲基化条带数目 (即 II、III、IV 型之和), 全甲基化率等于 4 种类型条带数目的总和除全甲基化条带数目 (即 III、IV 型之和)。用此方法统计出不育系 UG93A 和保持系 UG93B 分别在苗期叶片、四分体期和双核期花药的甲基化情况。

### 1.5 甲基化差异片段的表达量检测

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测部分甲基化差异基因的表达水平。分别提取红麻不育系 UG93A 和保持系 UG93B 花药发育的四分体期和双核期的 RNA, 反转录合成 cDNA, -20 °C 冰箱保存备用。进行 qRT-PCR 分析, 收集 CT 值, 采用  $2^{-\Delta CT}$  方法计算基因的相对表达量。内参基因序列以及同源基因引物序列见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 红麻 UG93A 和 UG93B 不同生长发育时期的 MSAP 比对结果

经过 MSAP 分析后, 用文中 1.4 所述方法对差异条带进行统计, 具体统计结果见表 3, 部分聚丙烯酰胺凝胶结果见图 1。

表2 荧光定量PCR引物序列  
Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
(His3)reference gene	GTGGAGTCAAGAAGCCTCACAG	ATGGCTCTGGAAACGCAAA
1(SCL-13)	TGACTTCCAAATAGCACAGGGC	TGGCACATTGTATGACTTGGCA
2(Zinc finger protein MAGPIE)	GATAGTTTCATTACTCACAGAGCCTTC	AACATCGGTTGATTAGCCAGC
3(Alcohol dehydrogenase)	CGGAATAGGGGTAGTAGAGGGAG	ATGGCTTCATTGAGCAAGGGTA
4(Transcript variant X1)	GATTTGCGGATGTTTTTCGGG	GTACAATCACACTGCTTTGCGGC
5(cytochrome P450)	GTCCCTTCCTCGAACTCGTCCA	GCTTCCGTCTCCCAGCAAACAT
6(SRF6)	ATGTCCACTTTTGGCTCGCAG	GGCATA CGCCCTGTGAGAAGTT
7(phytosulfokine receptor 2)	CACTGGCACTGGTAATGGTACTTGG	TATGCGTAACGGGAAGGGTAGATTT
8(Proton-coupled amino acid transporter 4)	TGCCACAGACAGCAAAAACCCA	AATGCCTTACGCTTTCAAGAGAACC
9(Transcript variant X2)	CATTTGCGGATGTTTTTCGGG	CAATCACACTGCTTTGCGGC

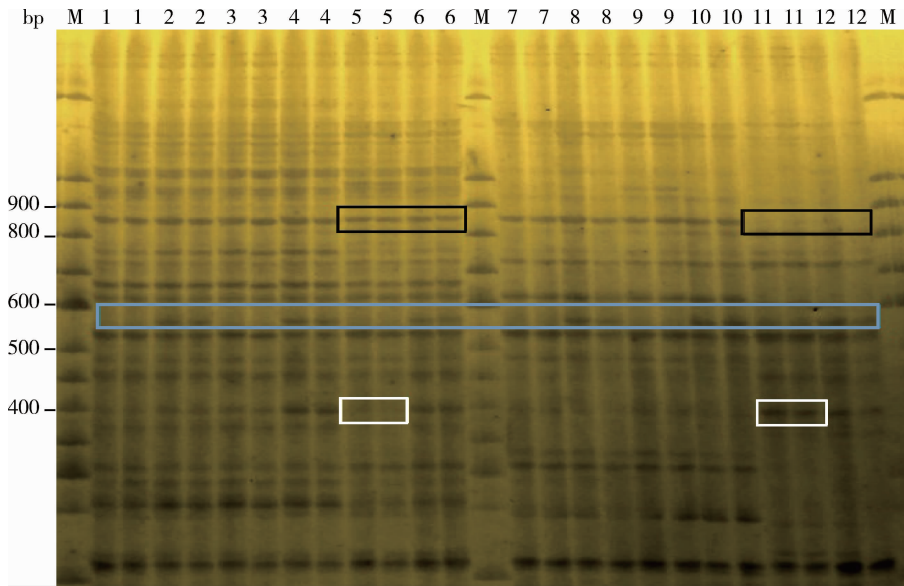
表3 UG93A和UG93B不同生长发育时期的MSAP分析

Table 3 MSAP analysis at the growth and development stages of UG93A and UG93B

MSAP 扩增带谱类型 MSAP band type	苗期叶片 Leaves at seedling stage		四分体期花药 Anthers at tetrad stage		双核期花药 Anthers at binucleate stage	
	UG93A	UG93B	UG93A	UG93B	UG93A	UG93B
	I型条带数/条	124	118	149	160	157
II型条带数/条	36	44	34	31	32	31
III型条带数/条	87	86	79	73	74	75
IV型条带数/条	40	39	25	23	24	34
甲基化条带总数/条* Total methylated bands	163	169	138	127	130	140
甲基化条带比率/%** Methylated ratio	56.79	58.89	48.08	44.25	45.30	48.78
全甲基化条带总数/条*** Total full methylated bands	127	125	104	96	98	109
全甲基化条带比率/%**** Full methylated ratio	44.25	43.55	36.24	33.22	34.15	37.98

注: \* 为甲基化条带总数=(II型+III型+IV型); \*\* 为甲基化条带比=(II型+III型+IV型)/(I型+II型+III型+IV型); \*\*\* 为全甲基化条带总数=(III型+IV型) \*\*\*\* 为全甲基化条带比=(III型+IV型)/(I型+II型+III型+IV型)。

Note: \* Indicate total methylated bands=(type II + type III + type IV); \*\* indicate methylated ratio=(type II + type III + type IV)/(type I + type II + type III + type IV); \*\*\* indicate total full methylated bands=(type III + type IV); \*\*\*\* indicate full methylated ratio=(type III + type IV)/(type I + type II + type III + type IV).



左边泳道 1—6 代表 *EcoR* I / *Msp* I 酶切, 右边泳道 7—12 代表 *EcoR* I / *Hpa* II 酶切。1 和 7, UG93A 苗期叶片; 2 和 8, UG93B 苗期叶片; 3 和 9, UG93A 四分体期花药; 4 和 10, UG93B 四分体期花药; 5 和 11, UG93A 双核期花药; 6 和 12, UG93B 双核期花药。蓝色方框中, UG93B 各个时期的材料用 *EcoR* I / *Hpa* II 和 *EcoR* I / *Msp* I 酶切都有带, 属于 I 型(无甲基化), UG93A 各个时期的材料用 *EcoR* I / *Hpa* II 和 *EcoR* I / *Msp* I 酶切都无带, 属于 IV 型(全甲基化); 白色方框中, *EcoR* I / *Hpa* II 酶切有带而 *EcoR* I / *Msp* I 酶切无带, 记为 II 型(半甲基化); 黑色方框中, *EcoR* I / *Hpa* II 酶切无带而 *EcoR* I / *Msp* I 酶切有带, 记为 III 型(全甲基化)。

The left lane 1—6 and right lane 7—12 represent digestion with *EcoR* I / *Msp* I and *EcoR* I / *Hpa* II respectively. The lane 1 and 7, 2 and 8 represented the seedling leaves, the lane 3 and 9, 4 and 10 represent tetrad stage anthers, the lane 5 and 11, 6 and 12 represent binucleate stage anthers of UG93A and UG93B respectively. In the blue frame the materials of UG93B were digested with *EcoR* I / *Hpa* II and *EcoR* I / *Msp* I belonging to type I (no methylation). UG93A with no bands, is fully methylated and named as type IV. MASP analysis presented in white frame digested with *EcoR* I / *Hpa* II have bands and digested with *EcoR* I / *Msp* I have no bands which indicate that there was semimethylation (type II). MASP analysis presented in black frame digested with *EcoR* I / *Hpa* II have no bands and digested with *EcoR* I / *Msp* I have bands indicate that there was full methylation (type III).

图 1 UG93A 和 UG93B 不同生长发育时期的 MSAP 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 The MSAP acrylamide gel analysis at growth and development stages of UG93A and UG93B

## 2.2 红麻基因组 DNA 甲基化变化规律分析

不育系 UG93A 苗期叶片的基因组 DNA 甲基化水平最高, 花药败育发生前的四分体时期次之, 败育发生后的双核期最低; 保持系 UG93B 同样是苗期叶片的甲基化程度最高, 但花药发育的双核期次之, 四分体时期最低。保持系 UG93B 的甲基化程度总体上高于不育系 UG93A, 但在决定败育与否的关键时期——四分体期, 保持系 UG93B 的甲基化程度低于不育系 UG93A。两者在全甲基化率上的对比上稍有不同, 即保持系 UG93B 苗期叶片的全甲基化率要稍低于不育系 UG93A, 其他 2 个时期的全甲基化情况与甲基化率相同。

## 2.3 MSAP 多态性片段的比对分析

对 67 个甲基化差异片段在红麻转录组测序自建数据库和 NCBI 中进行比对, 共比对出目的基因 27 个。许多基因参与了植物形态建成、生长发育、

基因表达等重要过程(表 4)。序列 1~11 的基因主要参与植物的转录调控; 序列 12~17 的基因主要参与植物的能量代谢; 序列 18~23 的基因主要参与植物抵抗干旱、低温和盐害等逆境应答, 以及提高植物的抗病性; 序列 24~27 的基因主要参与植物花器官的生长发育过程。

## 2.4 差异片段的 qRT-PCR 分析

DNA 甲基化往往影响基因的表达, 为了验证 DNA 甲基化对基因表达的影响, 选取 9 个与植物发育相关的、甲基化模式不同的差异片段进行 qRT-PCR 分析。序列 1(对应表 4 中的编号, 下同。)在不育系花药败育发生前的四分体时期无甲基化, 在败育后的双核期发生了甲基化。该基因为 GRAS 家族蛋白 24(又名 *SCL-13*), 主要参与植物的转录调控。qRT-PCR 结果发现, 败育后花药的表达量明显低于败育前(图 2(a))。序列 3、8 和 20 在保持系

表4 UG93A和UG93B不同生长发育时期MSAP多态性片段的比对分析

Table 4 MSAP Polymorphic fragments analysis at different growth and development stages of UG93A and UG93B

序列编号 Sequence number	甲基化差异片段比对结果 Comparisons of differentially methylated sequences	功能注释 Functional annotation
1	Protein family GRAS 24, <i>Arabidopsis thaliana</i> . (Q9MOM5.2)	GRAS家族蛋白24,主要参与植物的转录调控以及正向调节光敏色素感受红光信号 <sup>[16]</sup> 。
2	Zinc finger protein ZAT9, <i>Gossypium raimondii</i> . (XM012622415.1)	锌指蛋白ZAT9,参与植物形态建成、花粉发育、胚发育、胁迫反应等一些重要的调控过程 <sup>[17]</sup> 。
3	Zinc finger protein MAGPIE, <i>Arabidopsis thaliana</i> . (Q9ZWA6.1)	锌指蛋白MAGPIE,参与一些重要的调控过程,如:形态建成、花粉发育、胚发育、胁迫反应等 <sup>[17]</sup> 。
4	Proton-coupled amino acid transporter 4, <i>Gossypium raimondii</i> . (XR001130230.1)	质子耦合氨基酸转运蛋白PAT4,是植物代谢过程中关键的调控因子,对植物的生长和发育起十分重要的作用。
5	Receptor-like protein kinase, <i>Gossypium arboreum</i> . (XM017782544.1)	受体蛋白激酶,调控组织形成和器官发育,调控花粉自交不亲和,感受植物病原信号,参与抗逆性反应,参与胞内信号转导等 <sup>[18-19]</sup> 。
6	Protein pns1, <i>Aspergillus fumigatus</i> . (Q4WYG7.1)	PNS1蛋白,与病毒DNA的复制、基因转录调控、诱导细胞病理变化等多种生理生化过程直接相关 <sup>[20]</sup> 。
7	Transcription factor MYB59, <i>Gossypium arboreum</i> . (XM017781207.1)	转录因子MYB59,参与根系的发育,抑制光形态建成,促进暗形态建成 <sup>[21]</sup> 。
8	Transcript variant X1, <i>Gossypium raimondii</i> . (XM012609781.1)	转录变异体X1,参与细胞增殖及细胞周期活动的调节。
9	Transcript variant X2, <i>Gossypium raimondii</i> . (XM012609782.1)	转录变异体X2,参与细胞增殖及细胞周期活动的调节。
10	ncRNA sequence, <i>Gossypium raimondii</i> . (XR001127846.1)	非编码RNA序列,对RNA的碱基进行甲基化修饰 <sup>[22]</sup> 。
11	Chloroplast gene rps12, <i>Gossypium herbaceum</i> . (JF317353.1)	叶绿体RPS12,该基因可编码由85个氨基酸组成的蛋白质 <sup>[23]</sup> 。
12	Mitochondrion gene atp8, <i>Gossypium harknessii</i> . (JX536494.1)	线粒体ATP8,参与能量代谢。
13	Mitochondrion gene nad5, <i>Gossypium raimondii</i> . (KU317325.1)	线粒体nad5,编码NADH脱氢酶的第5个亚基。参与细胞物质代谢、能量合成、细胞DNA修复等多种生理活动 <sup>[24]</sup> 。
14	Mitochondrion gene nad5, <i>Gossypium barbadense</i> . (KP898249.1)	线粒体nad5,编码NADH脱氢酶的第5个亚基。参与细胞物质代谢、能量合成、细胞DNA修复等多种生理活动 <sup>[24]</sup> 。
15	Mandelonitrile lyase, <i>Gossypium hirsutum</i> . (XM016833317.1)	丙酮酸脱羧酶,细胞呼吸过程中具有重要作用的酶。
16	Aconitate hydratase, <i>Gossypium arboreum</i> . (XM017755176.1)	乌头酸水合酶,是一种含铁的非铁卟啉单体蛋白质,主要存在于植物胞浆和线粒体内。主要参与三羧酸循环和乙醇酸循环,维持细胞与组织内铁稳态,介导NO,在植物抗病信号转导中起作用。

表 4(续)

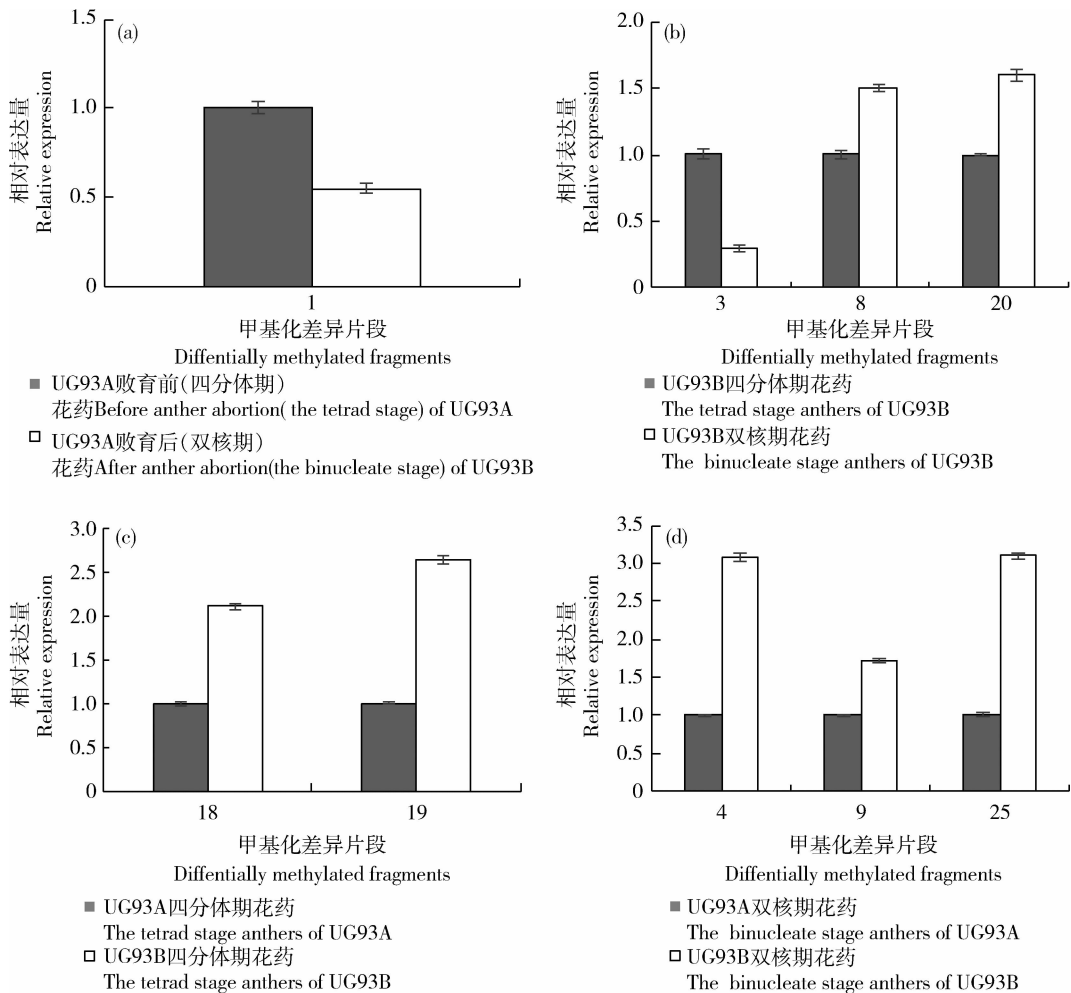
序列编号 Sequence number	甲基化差异片段比对结果 Comparisons of differentially methylated sequences	功能注释 Functional annotation
17	Hydroxy phenyl pyruvate reductase, <i>Gossypium hirsutum</i> . (XM016833539. 1)	羟基苯丙酮酸还原酶, 有助于异黄酮化合物的合成和积累。
18	Strubbelig-receptor Family 6, <i>Gossypium hirsutum</i> . (XM016823189. 1)	SRF6 基因, 参与对病原真菌的防御反应和植物应激过程 <sup>[25]</sup> 。
19	Cytochrome P450, <i>Gossypium hirsutum</i> . (XM016822399. 1)	细胞色素 P450, 参与生物合成途径和生物解毒途径 <sup>[26-27]</sup> 。
20	Alcohol dehydrogenase, <i>Arabidopsis thaliana</i> . (Q9SK86. 1)	乙醇脱氢酶, 在抵抗涝害、低氧、冷害、干旱和盐害等非生物胁迫过程中起着重要的作用, 还参与植物的生长发育过程 <sup>[28]</sup> 。
21	Peroxidase P7, <i>Gossypium arboreum</i> . (XM017747283. 1)	过氧化物酶 7, 植物抗逆过程中的关键酶之一 <sup>[29]</sup> 。
22	Heparanase-like protein 3, <i>Gossypium arboretum</i> . (XM017765540. 1)	乙酰肝素酶蛋白 HPSE3, 作为 HSPG 降解酶, 参与多种生理病理过程。
23	homeobox-leucine zipper protein HDG2, <i>Brassica napus</i> . (XM013860799. 1)	HDG2, 同源亮氨酸拉链蛋白, 与抵御盐胁迫、低温胁迫、干旱胁迫等逆境有关 <sup>[30]</sup> 。
24	Multicopper oxidase LPR1, <i>Gossypium arboreum</i> . (XM017776793. 1)	多铜氧化酶 LPR1, 以多种形式作用于植物的生长发育过程, 其中包括伤口愈合、木质素合成、色素合成、小孢子发育和花粉管生长等 <sup>[31]</sup> 。
25	Phytosulfokine receptor 2, <i>Zea mays</i> . (XM008653707. 1)	植物磺胺素受体 2, 促进导管分化和胚性细胞形成 <sup>[32]</sup> ; 调节花粉的群体效应等 <sup>[33]</sup> 。
26	Protein FAR1-related sequence 7, <i>Arabidopsis thaliana</i> . (Q9M8J3. 1)	蛋白 FAR1 相关序列 7, 调控组织形成和器官发育, 调控花粉自交不亲和, 感受植物病原信号, 参与抗逆性反应, 参与胞内信号转导等 <sup>[18-19]</sup> 。
27	Gibberellin biosynthesis-related protein GA20ox1, <i>Salvia miltiorrhiza</i> . (KT853079. 1)	GA20ox1, 赤霉素生物合成相关蛋白, 影响植物花器官的发育和花药的生长发育过程, 从而影响植株育性, 其突变体导致极度矮化及不育型 <sup>[34]</sup> 。

UG93B 花药发育的四分体时期无甲基化, 在双核期发生了甲基化。序列 3 是一种锌指蛋白基因 (MAGPIE), 参与植物形态建成以及花粉发育等过程的调控, 其在花药发育的四分体期的表达量是双核期的 3.3 倍; 序列 8 是一种转录变体, 参与细胞增殖及细胞周期活动的调节; 序列 20 是一种乙醇脱氢酶基因 (ADH), 在抵抗非生物胁迫过程中起着重要的作用, 还参与植物生长发育过程的调控<sup>[28]</sup>, 它们在四分体期的表达量明显比双核期低 (图 2(b))。序列 18 和 19 在不育系的各个时期都没有甲基化,

但在保持系中发生了甲基化。分别选取它们四分体时期的花药进行比较, 保持系的表达量比不育系分别高 2.1 和 2.7 倍。序列 18 为 SRF6 基因, 可能在对病原真菌的防御反应中起作用, 也参与植物的应激过程<sup>[25]</sup>; 序列 19 为细胞色素 P450 (图 2(c))。序列 4、9 和 25 在 UG93A 花药败育发生后的双核期无甲基化, 同时期保持系 UG93B 的花药发生了甲基化。UG93B 花药的表达量都显著高于 UG93A, 在序列 9 中高 1.7 倍, 序列 4 和 25 中均高 3 倍。序列 9 同序列 8 一样, 是一种转录变体; 序列 25 为植

物磺胺素受体 2 基因,主要促进导管分化和胚性细胞形成<sup>[32]</sup>,调节花粉的群体效应<sup>[33]</sup>;序列 4 为一种氨基

酸转运蛋白,是植物代谢过程中关键的调控因子,对植物的生长和发育起十分重要的作用(图 2(d))。



图中 1、3、8、20、18、19、4、9、25 对应表 4 中的基因序列编号。

The number 1, 3, 8, 20, 18, 19, 4, 9 and 25 in figure 2 corresponded to the sequence numbers in Table 4.

### 图 2 UG93A 和 UG93B 花药发育关键时期甲基化差异片段的 qRT-PCR 分析

Fig. 2 qRT-PCR analysis of the differentially methylated sequences at the critical period of anther development

## 3 讨论

甲基化与植物的发育密切相关,本研究发现在红麻生长发育过程中,甲基化整体趋势是前期(苗期)的程度最高,到发育后期(花药四分体期和双核期)较低,这与作物生长发育的规律相吻合,也与大多数其他作物的研究相一致。有关 DNA 甲基化对同核异质的不育系与保持系比较研究的报道并不多见,为探究甲基化调控红麻花药发育的机制,本研究重点选取在红麻花药发育的关键时期——四分体时期和双核期,比较其甲基化差异。结果表明不育系 UG93A 的花药在败育发生前的四分体期甲基化程

度比败育后的双核期高,而保持系 UG93B 花药在四分体期的甲基化程度低于双核期。且在四分体时期,不育系的甲基化程度总体上高于保持系。在红麻不育系和保持系生长发育过程中发生甲基化情况变化的基因主要参与如下代谢及调控过程:

1) 参与植物转录调控的相关基因: 主要包括 GRAS 家族蛋白 24 (又名 *SCL-13*) 基因、锌指蛋白 *ZAT9*、锌指蛋白基因 *MAGPIE*、质子耦合氨基酸转运蛋白基因 *PAT4*、受体蛋白激酶基因 (*RLKs*)、转录因子 *MYB59*、转录变异体 X1、转录变异体 X2 和线粒体 *RPS12* 基因等。例如 GRAS 家族蛋白 24 (*SCL-13*) 基因,参与植物的转录调控,同时参与正



向调节光敏色素感受红光信号<sup>[16]</sup>。李合生等<sup>[16]</sup>研究发现光敏核不育水稻(HPGMR)垦 585 育性转换是一个典型的光周期效应,也初步证明了光敏色素作为接受光周期处理的光受体参与了农垦 585 育性转换的调控。由此推测该基因在红麻不育系 UG93A 败育发生前的四分体期无甲基化、但在败育发生后的双核期出现了甲基化,这很可能是由于参与调节光敏色素的 *SCL-13* 的活性受到了甲基化作用的抑制,从而在红麻 UG93A 的败育过程中起到了作用。多种转录变异体发生了甲基化,它们参与细胞增殖及细胞周期活动的调节,过表达时可能干扰或阻碍了正常 DNA 复制的完成,使细胞在 S 期至 G2/M 期受阻,从而导致生殖发育的抑制。

2) 能量代谢的相关基因: 主要有线粒体 *ATP8* 基因、丙酮酸脱羧酶基因(*PDC*)、乌头酸水合酶基因(*AC02*)、羟苯丙酮酸还原酶基因(*HPPR*)、线粒体 *NAD5* 基因等。例如,线粒体 *ATP8* 基因,本课题组之前研究表明其 RNA 编辑方式、编辑频率、以及相对表达量的差异会影响到红麻 CMS 发生<sup>[6]</sup>。线粒体 *NAD5*, 编码 NADH 脱氢酶,参与细胞物质代谢、能量合成和细胞 DNA 修复等多种生理活动<sup>[24]</sup>。

3) 逆境反应相关基因: 主要有细胞色素 P450、乙醇脱氢酶(*ADH*)、过氧化物酶 P7、乙酰肝素酶 HPSE 蛋白 3、同源亮氨酸拉链蛋白 *HDG2*、*SRF6* 等基因。例如,*SRF* 基因家族在花器官形态,茎秆的高度和形状,叶子的形状和根毛的形成中有重要作用。其中 *SRF6* 基因可能在对病原真菌的防御反应中起作用,并且有些 *SRF* 基因的功能是可以互作的,几个 *SRF* 基因的异位表达会干扰其正常发育,可导致幼苗死亡或由于花粉发育异常导致雄性不育<sup>[25]</sup>。推测甲基化的改变使 *SRF6* 基因发生了异位表达。

4) 花发育相关基因: 包括多铜氧化酶 *LPR1*、赤霉素生物合成相关蛋白 *GA20ox1*、植物磺胺素受体 *PSK2* 等基因。例如,序列 25 中保持系 UG93B 的表达量为不育系 UG93A 的 3 倍多,推测是植物磺胺素受体 2 调控花粉的群体效应的功能,导致两者之间表达量的显著差异,从而在 UG93A 不育中也起到了一定的作用。

本研究的结果与 Xu 等<sup>[4]</sup>在水稻、Chen 等<sup>[8]</sup>和张艳花等<sup>[6]</sup>在玉米上的研究结果相一致,但郭俊尧<sup>[9]</sup>的研究结果则是新型 CMS 不育系亚棉 A 败育

前的甲基化水平明显低于败育时和败育后,这可能是不同物种甲基化趋势不尽相同,也说明甲基化调控植物雄性不育的机制是十分复杂的。本研究为从 DNA 甲基化的角度阐释红麻的发育以及 CMS 的机理提供了一定的理论基础,结合 qRT-PCR 结果,笔者推测由于 DNA 的甲基化引起相关基因表达水平的改变甚至基因的失活,从而使花药活性降低,最终导致不育的出现。

## 参考文献 References

- [1] Muhammad T, Jerzy P. DNA and histone methylation in plants [J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20(6): 244-251
- [2] Klose R J, Bird A P. Genomic DNA methylation mark and its mediators [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006, 31(2): 89-97
- [3] 吴豪, 徐虹, 刘振兰, 刘耀光. 植物细胞质雄性不育及其育性恢复的分子基础 [J]. *植物学通报*, 2007, 24(3): 399-413  
Wu H, Xu H, Liu Z L, Liu Y G. Cytoplasmic male sterility in plant and its molecular basis of fertility restoration [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, 24(3): 399-413 (in Chinese)
- [4] Xu P Z, Yan W Q, He J, Li, Y, Zhang H Y, Peng H, Wu X J. DNA methylation affected by male sterile cytoplasm in rice (*Oryza sativa* L) [J]. *Molecular Breeding*, 2013, 31(3): 719-727
- [5] Chen B, Zhang Y, Lu Y L, Wang J, Zhang S Z, Lan H, Rong T Z, Cao M J. DNA methylation analysis of sterile and fertile CMS-C hybrids and their parents in maize [J]. *Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 25(1): 3-11
- [6] 张艳花, 易洪杨, 房明, 荣廷昭, 曹墨菊. 玉米新选细胞质雄性不育系小孢子发育的细胞学观察及 DNA 甲基化分析 [J]. *遗传*, 2014, 30(10): 1021-1026  
Zhang Y H, Yi H Y, Fang M, Rong T Z, Cao M J. Cytological observation and DNA methylation analysis of two new cytoplasmic male sterile lines of maize during microspore genesis [J]. *Hereditas*, 2014, 30(10): 1021-1026 (in Chinese)
- [7] Lu Y L, Liu Y X, Wang J, Cao M J, Rong T Z. Variation and patterns of DNA methylation in maize C-type CMS lines and their maintainers [J]. *Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 19(1): 43-50
- [8] Wei M M, Song M Z, Fan S L, and Yu S X. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes during anther development in genetic male sterile and wild type cotton by digital gene-expression profiling [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(97): 1-16
- [9] 郭俊尧. 细胞质雄性不育系亚棉 A 小孢子败育过程的研究 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2013  
Guo J Y. Study on microspore abortion of *Cytoplasmic* male sterility line Yamian A [D]. Taigu, Shanxi Agricultural

- University, 2013 (in Chinese)
- [10] Mcclell M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(17):3640-3659
- [11] 陈鹏. 红麻细胞质雄性不育分子机理研究[D]. 南宁: 广西大学, 2010  
Chen P. Molecular mechanism of cytoplasmic male sterility in kenaf[D]. Nanning: Guangxi University, 2010 (in Chinese)
- [12] Chen P, Ran S M, Li R, Huang Z P, Qian J H, Yu M L, Zhou R Y. Transcriptome de novo assembly and differentially expressed genes related to cytoplasmic male sterility in kenaf (*Hibiscus camarinus* L.) [J]. *Molecular Breeding*, 2014, 34(4):1879-1891
- [13] 廖小芳. 红麻 UG93A 和 UG93B 线粒体基因组差异分析及 CMS 相关基因的发掘[D]. 南宁: 广西大学, 2015  
Liao X F. The differential analysis of mitochondrial genomes and identification of genes related to CMS in UG93A and UG93B of kenaf[D]. Nanning: Guangxi University, 2015 (in Chinese)
- [14] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 孙莉丽, 郭培国, 缪绅裕, 陈健辉. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法. 实验室研究与探索[J], 2009, 28(9):14-16  
Li R H, Xia Y S, Liu S Z, Sun L L, Guo P G, Liao S Y, Chen J H. The improved CTAB extraction plant DNA method[J]. *Research and Exploration in Laboratory*. 2009, 28(9):14-16 (in Chinese)
- [15] Zhao Y L, Yu S X, Ye W W, Wang H M, Wang J J and Fang B X. Study on DNA cytosine methylation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome and its implication for salt tolerance[J]. *Agricultural Science in China*, 2010, 9(6):783-791
- [16] 李合生, 肖诩华. 植物光敏色素的调节作用[J]. 植物杂志, 1991, (5)36-37  
Li H S, Xiao X H. The regulating effect of phytochrome[J]. *The Plant Journal*, 1991, (5)36-37 (in Chinese)
- [17] 韩莹琰, 张爱红, 范双喜, 曹家树. 十字花科植物 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指蛋白新基因 BeMF20 同源序列克隆与进化分析[J]. 核农学报, 2011, 25(5):916-921  
Han J Y, Zhang A H, Fan S X, Cao J S. Cloning and evolutionary analysis of homologous sequences of a novel gene encoding C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein in cruciferae [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2011, 25(5):916-921 (in Chinese)
- [18] 闫锋, 祝传书, 庞保平. 植物类受体蛋白激酶的研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(4):851-858  
Yan F, Zhu C S, Pang B P. The research progress of plant-based protein kinase receptor [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(4):851-858 (in Chinese)
- [19] 石翠翠, 高雷更, 惠颖, 胡京蕊, 路佳, 葛荣朝. 植物类受体蛋白激酶的研究进展[J]. 河北师范大学学报, 2010, 34(2):216-220  
Shi C C, Gao L G, Hui Y, Hu J R, Lu J, Ge R C. The research progress of plant-based protein kinase receptor [J]. *Hebei Normal University Journal*, 2010, 34(2):216-220 (in Chinese)
- [20] 李国辉, 胡朝阳, 唐琦, 王鹏. 细小病毒非结构蛋白 NS1 作用机制的研究进展[J]. 蚕业科学, 2012, 38(5):919-923  
Li G H, Hu Z Y, Tang Q, Wang P. Advances in functional mechanism of parvovirus non-structural protein NS1 [J]. *Science of Sericulture*, 2012, 38(5):919-923 (in Chinese)
- [21] 左然, 徐美玲, 柴国华, 周功克. 植物 MYB 转录因子功能及调控机制研究进展[J]. 生命科学, 2012, 10(10):1132-1140  
Zuo R, Xu M L, Chai G H, Zhou G K. Function and regulation mechanism of plant MYB transcription factors [J]. *Life Sciences*, 2012, 10(10):1132-1140 (in Chinese)
- [22] 焦晓明, 范云六, 王磊. 植物表观遗传中的 RNA 介导的 DNA 甲基化[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(6):7-13  
Jiao X M, Fan Y L, Wang L. DNA methylation mediated by RNA in plant epigenetic inheritance [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2009, 11(6):7-13 (in Chinese)
- [23] 张天豹, 陆许可, 阴祖军, 陈秀贵, 王德龙, 王帅, 王俊娟, 樊伟丽, 赵小洁, 王晓歌, 叶武威. 陆地棉线粒体耐盐基因 *rps12* 的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2015, 13(12):2681-2687  
Zhang T B, Lu X K, Yin Z J, Chen X G, Wang D L, Wang S, Wang J J, Fan W L, Zhao X J, Wang X G, Ye W W. Salinity resisted gene *rps12* cloning and its expression analysis on *Gossypium hirsutum* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(12):2681-2687 (in Chinese)
- [24] 冷翔, 谭艳平, 王春台, 刘学群. 水稻线粒体 *nad5* 基因超表达载体的构建和遗传转化[J]. 广东农业科学, 2012, 12(038):1-7  
Leng X, Tan Y P, Wang C T, Liu X Q. Construction and genetic transformation of over-expression vector of *nad5* genes in rice[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 12(38):1-7 (in Chinese)
- [25] Banu E, Karen Pfister, Georg H, David C, Angelika F, Klaus F X M, Kay S. Molecular characterisation of the STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY of genes encoding putative leucine-rich repeat receptor-like kinases in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 10(186):1471-2229
- [26] 冷欣夫, 邱星夫. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景 [M]. 北京: 科学出版社, 2001  
Leng X F, Qiu X F. The structure, Function and Application Prospect of Cytochrome P450 Enzyme System [M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [27] Ohkawa H, Imaishi H, Shiota N, Yamada T, Inui H, Ohkawa Y. Molecular mechanisms of herbicide resistance with special emphasis on cytochrome P450 monooxygenases [J]. *Plant Biotech*, 1998, 15(4):173
- [28] 张计育, 王刚, 黄胜男, 宣继平, 贾晓东, 郭忠仁. 乙醇脱氢酶基因家族在植物抵抗非生物胁迫过程中的作用研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(10):246-250

- Zhang J Y, Wang G, Huang S N, Xu, Xuan J P, Jia X D, Guo Z R. Functions of alcohol dehydrogenase family in abiotic stress responses in plants[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(10): 246-250 (in Chinese)
- [29] 马峙英, 刘叔倩, 王省芬, 张贵寅, 孙济中, 刘金兰. 过氧化物酶同工酶与棉花黄萎病抗性的相关研究[J]. *作物学报*, 2000, 26(4): 431-437
- Ma Z Y, Liu S Q, Wang S F, Zhang G Y, Sun J Z, Liu J L. Relationship between peroxidase isozymes and resistance to verticillium wilt in cotton[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(4): 431-437 (in Chinese)
- [30] 向建华, 李灵之, 陈信波. 植物非生物逆境相关锌指蛋白基因的研究进展[J]. *核农学报*, 2012, 26(4): 666-672
- Xiang J H, Li L Z, Chen X B. Progress in the study of abiotic stress-related zinc finger protein genes in plants [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2012, 26(4): 666-672 (in Chinese)
- [31] 李仙志, 陈起振, 曹家树. 植物多铜氧化酶及其亚家族成员 SKS 蛋白[J]. *植物细胞生物学学报*, 2011, 33(2): 167-172
- Li X Z, Chen Q Z, Cao J S. Plant multicopper oxidase and subfamily member SKS protein[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2011, 33(2): 167-172 (in Chinese)
- [32] Igasaki T, Akashi N, Ujinohara T, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Shinohara K. Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(12): 1412-1416
- [33] Chen Y F, Matsubayashi Y, Sakagami Y. Peptide growth factor phytosulfokine- $\alpha$  contributes to the pollen population effect[J]. *Planta*, 2000, 211(5): 752-755
- [34] 肖政. 荔波连蕊茶 GA20-氧化酶和 GA2-氧化酶基因调控株型的功能研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014
- Xiao Zheng. Function research of GA20-oxidase and GA2-oxidase genes from *Camellia lipoensis* on regulation of plant phenotype[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry Sciences, 2014 (in Chinese)

责任编辑：吕晓梅