

河八王杂交种 F₁、BC₁ 及其亲本 DNA 甲基化水平和模式变化

刘昔辉^{1,2} 桂意云¹ 张荣华¹ 李海碧¹ 韦金菊¹

周会¹ 杨荣仲¹ 张小秋¹ 李杨瑞^{1,2*}

(1. 广西农业科学院 甘蔗研究所/中国农业科学院甘蔗研究中心/广西甘蔗遗传改良重点实验室/
农业农村部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室, 南宁 530007;
2. 广西大学 农学院, 南宁 530004)

摘要 为分析河八王及后代基因组 DNA 甲基化水平和遗传模式变化,以河八王及其后代 F₁ 和 BC₁ 为材料,采用甲基化敏感扩增多态性技术 (Methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 结合毛细管电泳技术 (Capillary electrophoresis, CE) 分析亲本及后代基因组 DNA 甲基化水平和遗传模式变化规律。结果表明:母本 ‘GT05-3256’ 的 MSAP 比率是 59.6%, 父本 ‘GXN1’ 则是 60.5%, 其杂交种 F₁ 的 MSAP 比率是 56.4%~59.0%, 均低于双亲; BC₁ 的母本 ‘YC94-46’ 的 MSAP 比率是 59.4%, 父本 ‘T6-3’ 则是 59.0%, BC₁ MSAP 比率是 56.9%~69.8%, 整体平均为 62.8%, 平均值高于双亲。BC₁ 世代总甲基化水平略高于 F₁ 世代水平。F₁ 和 BC₁ 基因组 CCGG 位点发生甲基化的方式整体上以内部胞嘧啶双链甲基化为主。在 F₁ 和 BC₁ 中均检测到 70 种甲基化类型, 并进一步分为 A、B、C、D 和 E 等 5 大类, 其中 A 类是亲本向杂交种的甲基化遗传类型; B 类是去甲基化类型, 表示杂交种相应于其亲本的甲基化减弱; C 类是过或超甲基化类型, 表示杂交种相应于其亲本的甲基化增强; D 类是次甲基化类型, 杂交后代甲基化水平比双亲均要低; E 类为不定类型。结果显示, B、C、D、E 是杂交种的甲基化变异类型; F₁ 的甲基化遗传类型 (A 类) 比例明显低于 BC₁, 但变异类型 B、C、D、E 高于 BC₁; 杂交形成 F₁ 和 BC₁ 过程中, 基因组 DNA 普遍发生了超甲基化修饰。

关键词 甘蔗; 河八王; DNA 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性技术; 毛细管电泳技术

中图分类号 S566.1 **文章编号** 1007-4333(2019)09-0037-10 **文献标志码** A

DNA methylation levels and genetic patterns in *Narenga porphyrocoma* (Hance) hybrids F₁, BC₁ and their parental inbreds

LIU Xihui^{1,2}, GUI Yiyun¹, ZHANG Ronghua¹, LI Haibi¹, WEI Jinju¹, ZHOU Hui¹,

YANG Rongzhong¹, ZHANG Xiaoqi¹, LI Yangrui^{1,2*}

(1. Sugarcane Research Institute/Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement/Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement (Guangxi) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Sugarcane Research Center of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract In order to analyze the changes of DNA methylation level, the DNA methylation levels and genetic patterns in F₁, BC₁ and their parents were detected using methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) and capillary electrophoresis technology (CE). The results showed that: MSAP ratios in the maternal parent GT05-3256, paternal

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(31860350;31101195); 国家产业体系(CARS-170105); 广西创新团队专项(gjnytxgxcxtd-03-01); 广西创新驱动项目(AA17202042-6)和广西农科院基金项目(2018YT02;2018YM01)

第一作者: 刘昔辉, 副研究员, 主要从事甘蔗种质资源及养分利用研究, E-mail: liuxihui@gxaas.net

通讯作者: 李杨瑞, 教授, 主要从事甘蔗育种研究, E-mail: liyr@gxaas.net

parent GXN1 and in the hybrid F_1 were respectively 59.6%, 60.5% and 56.4%–59.0%, showing the MSAP ratio in F_1 was lower than that in the both parents; the MSAP ratios in the maternal parent YC94-46, paternal parent T6-3 and BC_1 were respectively 59.4%, 59.0% and 56.9%–69.8% in with the average of 62.8%, showing that the MASP ratio of BC_1 was higher than that in the both parents. The total methylation level in the BC_1 generation is slightly higher than that in the F_1 generation; the methylation of CCGG loci in sugarcane genome of the individuals in F_1 and BC_1 mainly occurred on the internal cytosine double-strand. A total of 70 different methylations were detected in the F_1 and BC_1 populations, and they were further divided into 5 types: type A, the methylation patterns in the hybrids were the same as their parents; type B, demethylation, the methylation in the hybrids was weakened compared to that in the parents; type C, hypermethylation, the methylation in the hybrids was enhanced corresponding to the parents; type D, hypomethylation, the degree of methylation in the hybrids was lower than that in the both parents; and type E, uncertain type. Among them, type A is the genetic transfer type from the parent to the hybrid, and types B, C, D and E are the methylation variants of the hybrids. The results showed that the rate of methylation type A in the F_1 individuals was significantly lower than that in the BC_1 while types B, C, D, and E were higher than those in the BC_1 . In conclusion, during the F_1 and BC_1 hybridization, the hypermethylation occurred in the whole genome.

Keywords sugarcane; *Narenga porphyrocoma* (Hance); DNA methylation; methylation sensitive amplification polymorphism; capillary electrophoresis

甲基化是真核细胞 DNA 修饰的方式之一,胞嘧啶 C-5 位修饰是最常见的一种甲基化方式,也是目前 DNA 甲基化研究的热点^[1]。DNA 甲基化具有重要的生物学意义,其在植物遗传中的作用主要体现在基因表达调控和维持基因组稳定性^[2]。甲基化敏感扩增多态性 (Methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP) 是被广泛用于检测作物基因组胞嘧啶甲基化程度和模式的技术^[3-4],在研究杂种与其亲本 DNA 甲基化变化方面受到众多学者的关注。Hepburn 等^[5]研究表明自交可以导致玉米后代 DNA 甲基化水平不断累积; Tsaftaris 等^[6]和刘天骄^[7]发现玉米 F_1 DNA 甲基化水平比亲本低,推断后代 DNA 甲基化的降低与杂种优势存在着较大关系;陈家慧等^[8]揭示不同甘蔗品种之间的甲基化模式存在差异;张楷歆^[9]发现大豆叶片内侧胞嘧啶全甲基化水平高于外侧胞嘧啶半甲基化水平,大多杂种 F_1 较亲本发生了甲基化降低的现象。

甘蔗是我国最重要的糖料作物,由于亲本遗传基础较狭窄,血缘异质性不大,现代甘蔗育种很难获得突破,因此各育种家非常重视利用野生资源进行甘蔗遗传改良^[10-11]。河八王是甘蔗的一个近缘属植物,具有抗旱、抗病和耐贫瘠等诸多优良性状。刘昔辉等^[12]利用不同甘蔗品种与河八王进行远缘杂交及回交,获得一些后代材料,但是关于河八王杂交利用中,其后代基因组变异的机理等仍不清楚,这限制了河八王资源的利用效率。本研究利用 MSAP 结

合荧光毛细管技术 (Capillary electrophoresis, CE) 解析河八王杂交种及其亲本 DNA 胞嘧啶甲基化模式和水平变化,阐明亲本及其杂交种中 DNA 甲基化的差异和遗传模式,旨在为探索甘蔗杂种优势的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为甘蔗栽培种与甘蔗近缘属河八王及其杂交种 F_1 和 BC_1 , 具体为: ‘桂糖 05-3256’ (‘GT05-3256’, ♀) × ‘广西河八王 1 号’ (‘GXN1’, ♂) 及其 F_1 杂交种 4 个 (‘T6-1’、‘T6-3’、‘T6-4’ 和 ‘T6-5’); 母本 ‘崖城 94-46’ (‘YC94-46’, ♀) × 父本 ‘F₁-T6-3’ (♂) 及其 BC_1 杂交种 7 个 (‘H4-4’、‘H4-11’、‘H4-13’、‘H4-27’、‘H4-29’、‘H4-43’、‘H4-47’)。材料由课题组前期基础工作中获得,种植于广西农业科学院甘蔗研究所内。材料间关系如图 1 所示。

1.2 基因组 DNA 提取

取苗期幼嫩叶片,采用 SDS 方法提取基因组 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度, 4 °C 保存。

1.3 MSAP-PCR 扩增

MSAP 分析根据赵志刚等^[3]和 Xiong 等^[13]建立的 MSAP 反应体系。该方法包括: 酶切、加接头、预扩增和选择扩增等步骤。所用接头和预扩增引物见表 1, 选择性扩增引物见表 2。

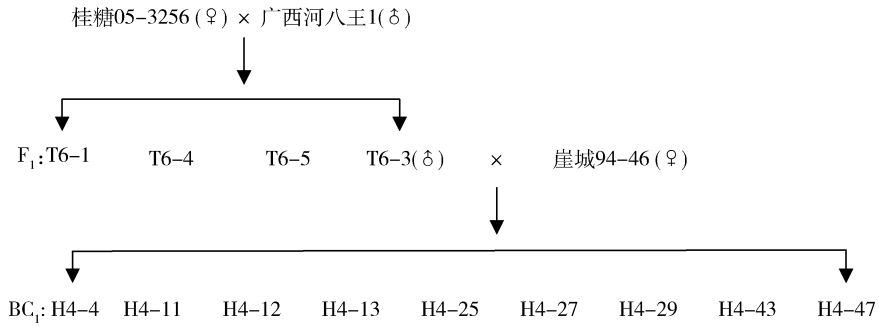


图 1 所用材料系谱关系图

Fig. 1 Genealogy diagram of materials

表 1 MSAP 所用接头、预扩增引物序列

Table 1 Sequence of adaptor and pre-amplification primers in MSAP

项目 List	引物名称 Primer	序列 Sequence
接头 Adaptor	EA-F	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	EA-R	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
	H/M-F	5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'
	H/M-R	5'-CGAGCAGGACTCATGA-3'
预扩增引物 Expected product	EcoR I	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'(E0)
	H/M I	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG-3'(H/M0)

表 2 MSAP 选择性扩增引物序列

Table 2 Selective amplification primers for MSAP

引物 Primer	EcoR I 选扩引物 +3 个选择性碱基 EcoR I primer +3 selective bases		H/M 选扩引物 Hpa II / Msp I 预扩引物 +3 个选择性碱基 H/M primer +3 selective bases	
	引物 Primer	引物 Primer	引物 Primer	引物 Primer
EA1	EA0+ AAC	H/M 1	H/M0+ TAA	
EA2	EA0+ AAC	H/M 2	H/M0+ TCC	
EA3	EA0+ AAG	H/M 3	H/M0+ TAA	
EA4	EA0+ AAG	H/M 4	H/M0+ TCC	
EA5	EA0+ AAC	H/M 5	H/M0+ TGG	
EA6	EA0+ AAC	H/M 6	H/M0+ TAC	
EA7	EA0+ AAC	H/M 7	H/M0+ ATA	
EA8	EA0+ AAC	H/M 8	H/M0+ TAG	
EA9	EA0+ AAC	H/M 9	H/M0+ TCG	
EA10	EA0+ AAG	H/M10	H/M0+ TGG	
EA11	EA0+ AAG	H/M 11	H/M0+ TAC	
EA12	EA0+ AAG	H/M 12	H/M0+ TAG	

1.4 毛细管电泳检测

选择扩增产物采用毛细管电泳技术进行分析,由上海生工生物工程技术有限公司完成。GS-500 LIZ 作为内参基因,由 15 条带有 LIZ 荧光素(橙色)标记的双链 DNA 片段组成,分子量大小分别是 50、75、100、139、150、160、200、250、300、340、350、400、450、490 和 500 bp。将 PCR 产物与内参混和均匀后,在测序仪 ABI3730XL 上进行检测。

1.5 条带统计与分析

量化处理电泳条带,有带记为 1,无带记为 0。

MSAP 分析中同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 分别与 *Eco*R I 组合进行双酶切,每个样品同时拥有两条泳带,其中第一条泳带采用 *Eco*R I/*Hpa* II 酶切,记为 H,第二条泳带采用 *Eco*R I/*Msp* I 酶切,记为 M。

根据 *Hpa* II 和 *Msp* I 对 CCGG 序列甲基化是否敏感(表 3),可将酶切结果 MSAP 条带类型分为 4 种^[7-8]:

I 类:H、M 都有带,无甲基化;

II 类:H 有带,M 无带,单链外甲基化;

III 类:H 无带,M 有带,双链内甲基化;

IV 类:H、M 均无带,双链外甲基化。

表 3 *Hpa* II 和 *Msp* I 对 CCGG 位点甲基化的敏感性差异

Table 3 Methylation sensitivity differences of *Hpa* II and *Msp* I to CCGG site

酶切位点 Digestion loci	I (无甲基化 No methylation)	II (双链甲基化 Double chain methylation)	III (单链甲基化 Single chain methylation)	IV (其他甲基化 Other methylation)	
	CCGG GGCC	C ^m CCGG GG ^m CC	^m CCGG GGCC	^m CCGG GGC ^m C	^m C ^m CCGG GG ^m C ^m C
<i>Hpa</i> II	1	0	1	0	0
<i>Msp</i> I	1	1	0	0	0

注:表中“1”代表可识别并酶切产生片段;“0”代表不可识别并酶切产生片段。下同。

Note:1 indicates recognizable enzyme cut fragments;0 indicates not recognizable enzyme cut fragments.

The same below.

1.6 甲基化遗传类型

据已有研究方法^[14-15]将甲基化模式类型归纳为分成 A、B、C、D 和 E 等 5 类甲基化类型,其中 A 类是亲本向杂交种的甲基化遗传类型,B、C、D、E 是杂交种的甲基化变异类型。

A 类:表示单态性条带,其中 A2 型是全甲基化类型,产生的 H/M 带型为 0,1,0,1,0,1;A3 型是半甲基化类型,产生的 H/M 带型为 1,0,1,0,1,0;A1 为不敏感甲基化类型。

B 类:为去甲基化类型。该类表示杂交种相对于其亲本的甲基化减弱。

C 类:为过或超甲基化类型。该类表示杂交种相对于其亲本的甲基化增强。

D 类:为次甲基化类型,杂交后代基因组 DNA 甲基化水平比双亲均要低,发生部分去甲基化现象。

E 类:为不定类型,即不能确定双亲和杂交后代甲基化变化。

2 结果与分析

2.1 杂交种 F₁、BC₁ 及其亲本的 DNA 甲基化水平

利用 12 对引物组合对 F₁、BC₁ 及其双亲进行基因组胞嘧啶甲基化分析,共检测位点数 1 421 个,所获得的扩增条带数范围在 548~643 条(表 4)。

F₁ 及其母本‘桂糖 05-3256’共扩增出条带 643 条,总甲基化带数 383,甲基化敏感扩增多态性比率即扩增总甲基化位点数的比率是 59.6%,全甲基化率和半甲基化率分别是 34.2%、25.3%;父本‘广西河八王 1’共扩增出条带 598 条,总甲基化带数 362 个,甲基化敏感扩增多态性比率是 60.5%,全甲基化率和半甲基化率分别是 31.8%和 28.8%;4 个 F₁ 杂交种甲基化敏感扩增多态性比率幅度在 56.4%~59.0%,平均为 57.5%,全甲基化(双链内甲基化)比率范围 30.5%~37.0%,平均为 33.1%,半甲基化(单链外甲基化)率范围 22.0%~27.5%,

平均为 24.4%。

BC₁ 及其母本‘崖城 94-46’共扩增出条带 638 条,总甲基化带数 379 个,甲基化敏感扩增多态性比率是 59.4%,全甲基化率和半甲基化率分别是 33.4%、26.0%;BC₁ 甲基化敏感扩增多态性比率幅度在 56.9%~69.8%,平均为 62.8%,而全甲基化(双链内甲基化)比率平均为 32.4%,半甲基化(单链外甲基化)率平均为 30.5%。

甘蔗与河八王的杂交 F₁ 代甲基化水平平均比双亲低。F₁ 全甲基化率高于半甲基化率,推测甘蔗发

生甲基化的方式主要是内部胞嘧啶双链甲基化;回交后代 BC₁ 中,甲基化敏感扩增多态性比率平均为 62.8%,高于双亲。BC₁ 全甲基化率平均 32.4%,高于半甲基化率均值 30.5%,整体上 BC₁ 仍以发生内部胞嘧啶双链甲基化为主,但差别没有 F₁ 大。本研究 BC₁ 世代的总甲基化水平略高于 F₁,说明有些基因在 F₁ 世代是表达的,到 BC₁ 世代则由于 DNA 甲基化而没有表达,这与甘蔗常规育种实际情况是吻合的,在 F₁ 代出现性状分离程度高于 BC₁ 代材料。

表 4 杂交种 F₁、BC₁ 及亲本的甲基化水平比较

Table 4 Methylation in F₁, BC₁ and parents

材料 Material	酶切条带类型 Types of digestion band				总扩增 位点 Total amplified loci	总扩增 带数 Total amplified bends	总甲基化 带数 Total methylated bends	甲基化敏感 扩增多态 性/% MSAP	全甲基化 率/% Total methylation rate	半甲基化 率/% Half methylation rate
	I	II	III	IV						
	3256	260	220	163						
GXN1	236	190	172	823	1 421	598	362	60.5	31.8	28.8
T6-1	282	203	166	770	1 421	651	369	56.7	31.2	25.5
T6-4	278	215	145	783	1 421	638	360	56.4	33.7	22.7
T6-5	237	172	155	857	1 421	564	327	58.0	30.5	27.5
T6-3	280	253	150	738	1 421	683	403	59.0	37.0	22.0
94-46	259	213	166	783	1 421	638	379	59.4	33.4	26.0
H4-4	273	160	201	787	1 421	634	361	56.9	25.2	31.7
H4-11	252	219	170	780	1 421	641	389	60.7	34.2	26.5
H4-13	226	222	150	823	1 421	598	372	62.2	37.1	25.1
H4-27	225	159	164	873	1 421	548	323	58.9	29.0	29.9
H4-29	222	164	229	806	1 421	615	393	63.9	26.7	37.2
H4-43	187	188	244	802	1 421	619	432	69.8	30.4	39.4
H4-47	196	264	142	819	1 421	602	406	67.4	43.9	23.6

注:3256 为母本‘GT05-3256’;GXN1 为父本‘广西河八王 1 号’;94-46 为母本‘YC94-46’;T6-1、T6-4、T6-5、T6-3 为 F₁ 材料;H4-4、H4-11、H4-12、H4-13、H4-25、H4-27、H4-29、H4-43、H4-47 为 BC₁ 材料。

总扩增带数 = I + II + III;扩增的总甲基化带数 = II + III;MSAP% = [(II + III) / (I + II + III)] * 100;全甲基化率% = [II / (I + II + III)] * 100;半甲基化率% = [III / (I + II + III)] * 100。

Note:3256 means female ‘GT05-3256’;GXN1 means male ‘GXN1’;94-46 means female ‘YC94-46’;T6-1, T6-4, T6-5, T6-3 means F₁; H4-4, H4-11, H4-12, H4-13, H4-25, H4-27, H4-29, H4-43 and H4-47 mean BC₁. Total amplified bends = I + II + III; Amplified total methylated bends = II + III; MSAP% = [(II + III) / (I + II + III)] * 100; Total methylation rate (%) = [II / (I + II + III)] * 100; Half methylation rate (%) = [III / (I + II + III)] * 100

2.2 亲本和后代 F₁、BC₁ 的甲基化类型遗传分析

在杂交种 F₁、BC₁ 及亲本中共检测到 70 种甲基化类型(表 5),将这些类型归纳成 A、B、C、D、E 等 5 类甲基化类型。结果表明,A 类为甲基化的遗传情况,F₁ 该类的比例是 5.73%~7.93%;B、C、D、E 等变异类型中,B 类比例范围是 27.12%~31.53%,C 类比例范围是 43.80%~53.94%,D 类比例范围是 10.60%~14.03%,E 类比例范围是 7.97%~11.28%。

BC₁ 中,A 类比例范围是 14.26%~28.64%,B 类比例范围是 13.71%~21.29%,C 类比例范围是 33.04%~47.28%,D 类比例范围是 7.49%~13.33%,E 类比例范围是 7.54%~9.51%。

可见,F₁ 的甲基化遗传类型(A 类)比例明显低于 BC₁,但变异类型 B、C、D、E 高于 BC₁,这表明 BC₁ 的亲本甲基化类型较多地遗传给了 BC₁ 中;双

亲杂交形成 F₁ 过程中,基因组 DNA 主要发生了 C 类超甲基化,后面发生甲基化的类型依次为 B>D>E。而在杂交形成 BC₁ 过程中,也是主要发生超甲基化,后面依次为 B>D>E。B 型去甲基化类型和 D 型次甲基化类型反映后代遗传过程中相对于亲本后代的甲基化程度降低,这两种类型中在 F₁ 中比例范围分别是 26.77%~30.7%和 7.82%~10.98%,而在 BC₁ 中的比例范围分别是 16.12%~25.43%和 8.69%~10.84%。超甲基化(C 型)反映后代遗传过程中相对于亲本后代的甲基化程度增加或保持亲本甲基化水平,这两种类型在 F₁ 中比例范围是 42.62%~52.91%,在 BC₁ 中的比例范围是 40.05%~52.54%,两个世代相差不大。E 类应为杂交过程中,基因组重组等原因,导致成为不同于双亲的特异甲基化类型,F₁ 中比例为 9.68%~10.98%,BC₁ 中比例为 8.70%~10.84%,两者相差不大。

表 5 杂交种 F₁ 与亲本间的甲基化类型及其位点数

Table 5 Methylation types and loci between hybrid F₁ and parents

类型 Type	甲基化类型 Methylation pattern						甲基化位点数 Methylation loci number			
	母本 Female		父本 Male		F ₁		T6-1	T6-4	T6-5	T6-3
	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>				
A1	1	1	1	1	1	1	52	49	39	44
A2	0	1	0	1	0	1	16	10	13	19
A3	1	0	1	0	1	0	11	4	7	10
总计 Total	单态性位点数 Number of monomorphic loci						79	63	59	73
	比例 Percent						7.93%	5.93%	5.73%	6.92%
B1	1	1	0	0	1	1	88	71	62	66
B2	0	1	0	0	0	1	47	43	42	54
B3	0	0	0	1	0	1	6	4	3	7
B4	0	0	1	1	1	1	4	8	8	12
B5	1	0	0	0	1	0	34	15	24	22
B6	0	1	0	1	1	1	2	13	5	4
B7	0	1	0	0	1	1	11	17	11	7
B8	0	1	1	0	1	1	8	0	3	5
B9	1	1	1	0	1	1	17	10	13	15
B10	1	0	1	1	1	1	6	5	4	8
B11	1	0	1	0	1	1	6	5	4	6
B12	1	0	0	0	1	1	17	14	20	21

表 5(续)

类型 Type	甲基化类型 Methylation pattern						甲基化位点数 Methylation loci number			
	母本 Female		父本 Male		F ₁		T6-1	T6-4	T6-5	T6-3
	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>				
B13	0	0	0	0	1	1	21	44	42	36
B14	0	0	1	0	1	1	5	5	10	6
B15	1	0	0	1	1	1	6	3	5	6
B16	0	0	0	1	0	1	5	6	3	4
B17	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
B18	1	1	1	0	1	1	0	2	0	0
B19	0	0	0	1	1	1	4	4	6	3
B20	0	0	1	0	1	0	7	8	6	13
B21	1	1	0	1	1	1	5	5	0	13
B22	0	0	1	0	1	0	8	1	4	3
B23	1	0	0	1	1	0	5	1	3	7
B24	0	1	0	0	1	1	0	1	1	3
B25	0	1	1	0	1	0	2	2	4	4
总计 Total	多态性位点数 Number of polymorphic loci						314	288	283	326
	比例 Percent						31.53%	27.12%	27.50%	30.90%
C1	0	0	1	1	0	0	100	104	105	99
C2	1	0	1	1	0	0	3	5	5	4
C3	1	1	1	1	0	1	3	6	7	7
C4	0	1	0	1	0	0	6	7	9	8
C5	0	1	0	0	0	0	77	75	84	70
C6	0	0	0	1	0	0	82	85	87	76
C7	1	1	1	1	1	0	6	3	5	5
C8	1	0	0	0	0	0	44	59	52	46
C9	1	1	0	0	0	0	25	34	52	39
C10	0	0	1	0	0	0	69	70	77	70
C11	1	1	1	1	0	0	0	5	10	6
C12	1	1	0	1	0	0	1	5	13	1
C13	1	0	1	0	0	1	6	4	2	3
C14	1	0	1	0	0	0	3	11	14	7
C15	0	1	1	0	0	0	6	11	6	2
C16	1	0	0	1	0	0	6	7	9	6
C17	0	1	1	1	0	0	4	8	5	5
C18	1	1	1	0	0	0	4	6	12	7

表5(续)

类型 Type	甲基化类型 Methylation pattern						甲基化位点数 Methylation loci number			
	母本 Female		父本 Male		F ₁		T6-1	T6-4	T6-5	T6-3
	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>				
C19	1	1	1	0	0	1	1	6	0	0
C20	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
总计 Total	多态性位点数 Number of polymorphic loci						447	512	555	462
	比例 Percent						44.88%	48.21%	53.94%	43.80%
D1	0	1	1	1	1	1	16	14	15	14
D2	1	1	0	1	1	1	12	9	8	6
D3	0	0	0	0	0	1	57	61	44	84
D4	0	0	0	0	1	0	35	55	27	36
D5	0	0	0	1	1	0	4	8	8	4
D6	0	1	0	0	1	0	5	4	3	4
D7	0	1	0	1	1	0	7	0	4	0
总计 Total	多态性位点数 Number of polymorphic loci						136	151	109	148
	比例 Percent						13.66%	14.22%	10.60%	14.03%
E1	1	1	0	0	0	1	15	18	12	19
E2	1	1	0	1	0	1	5	7	1	5
E3	0	1	1	1	0	1	7	2	3	6
E4	1	0	1	1	1	0	5	5	6	2
E5	1	1	1	0	1	0	5	5	4	4
E6	1	1	0	0	1	0	9	12	13	25
E7	1	1	0	1	1	0	9	4	5	5
E8	0	0	1	1	1	0	7	3	6	6
E9	0	0	1	1	0	1	15	10	8	13
E10	1	0	0	1	0	1	3	8	3	1
E11	0	1	1	1	1	0	5	5	8	5
E12	0	0	1	0	0	1	4	14	2	10
E13	0	0	1	1	1	0	1	3	0	0
E14	0	1	1	0	0	1	3	5	6	6
E15	1	0	0	0	0	1	6	10	5	12
总计 Total	多态性位点数 Number of polymorphic loci						99	111	82	119
	比例 Percent						9.95%	10.45%	7.97%	11.28%

3 讨论

已有研究表明,MSAP 技术是一种可用于大规模进行植物 DNA 甲基化水平变化研究的有效方法^[16-19]。本研究利用 MSAP 技术分析甘蔗远缘杂交及回交后的甘蔗基因组 CCGG 位点的甲基化情况,结果表明,在甘蔗与河八王远缘杂交后,F₁ 基因组和回交后代 BC₁ 基因组中分别有 56.4%~59.0%和 56.9%~69.8%的 CCGG 位点发生甲基化,大于其他作物发生甲基化大发生率,如高粱 41.8%~48.7%^[14]、玉米 18.07%~40.1%^[7,20]、水稻 28.6%~33.3%^[21]、棉花 20.0%~27.1%^[2] 和拟南芥 35%~43%^[13,16] 等的研究。但低于小麦远缘杂交后代 F₁ 的总甲基化水平(平均 86.2%)^[15]。甘蔗与河八王远缘杂交后,F₁、BC₁ 基因组 CCGG 位点发生高度甲基化的原因,本研究认为是与甘蔗本身复杂的异源多倍非整倍性遗传背景有关。对于本研究结果高于其他甘蔗研究中的基因组甲基化率^[8],本研究认为是不同甘蔗品种不同背景造成的,或是试验技术差异造成的。本研究中,杂交种 F₁、BC₁ 的 CCGG 位点发生双链甲基化比率高于单链甲基化率,与赵云雷^[2] 在棉花和陈家慧等^[8] 在其他甘蔗栽培种研究结果类似,即是基因组中 CCGG 位点的内部胞嘧啶甲基化产生频率高于外部胞嘧啶甲基化产生频率。

在甘蔗与河八王远缘杂交及后续回交过程中,F₁ 的甲基化遗传类型比例低于 BC₁,变异类型高于 BC₁,这表明甘蔗与河八王远缘杂交后,在 F₁ 形成过程中,F₁ 基因组变异较多,这可能与远缘杂交的两个亲本异质性较大有关,不同亲本核质融合时发生甲基化修饰类型的变化,来达到新基因组的稳定和正常表达。而后续回交形成 BC₁ 过程中,由于导入的新亲本是甘蔗,回交后代基因组得到“纯化”,甲基化修饰类型改变相应减少。在甘蔗育种实际工作中,甘蔗远缘杂交的 F₁ 群体会发生很大的性状分离,而在后续逐步回交中,后代群体的性状分离会越来越小。在甲基化类型中,F₁ 的超甲基化(C 型)比重最大,这表明 F₁ 相对于亲本,其甲基化程度增加或保持亲本甲基化的水平较高,本结果与小麦-黑麦远缘杂交后的结果类似^[21]。总体来说,F₁、BC₁ 两个世代的 DNA 甲基化水平和甲基化类型差异不是很明显,这可能是因为在杂交形成 F₁ 时,后代通过自身调节 DNA 甲基化来适应遗传距离较大的核质

融合带来的冲击,起到了缓冲作用;在回交后代基因组又多了一个缓冲过程,DNA 甲基化变化也趋于稳定。

参考文献 References

- [1] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(1): 6-21
- [2] 赵云雷. 棉花杂交种与亲本间 DNA 胞嘧啶甲基化及其基因差异表达分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007
Zhao Y L. Analysis of DNA methylation and differential gene expression between cotton hybrid and their parents[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [3] 赵志刚, 富贵, 邓昌蓉, 杜德志. 人工合成甘蓝型油菜早期世代基因组变异的 AFLP 和 MSAP 标记[J]. 作物学报, 2013, 39(7): 1231-1239
Zhao Z G, Fu G, Deng C R, Du D Z. AFLP and MSAP analysis on gene variation in early generations of artificially synthesized *Brassica napus* [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39(7): 1231-1239 (in Chinese)
- [4] 李增强, 史奇奇, 孔祥军, 汤丹峰, 廖小芬, 韦范, 何冰, 莫良玉, 周瑞阳, 陈鹏. 红麻不育系与保持系基因组 DNA 甲基化比较分析[J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(11): 17-27
Li Z Q, Shi Q Q, Kong X J, Tang D F, Liao X F, Wei F, He B, Mo L Y, Zhou R Y, Chen P. Comparative analysis on the kenaf (*Hibiscus cannabinus* L) genomic DNA methylation of its male sterility line and maintainer line [J]. *Journal of China Agricultural University*, 22(11): 17-27 (in Chinese)
- [5] Hepburn A G, Belanger F C, Mattheis J R. DNA methylation in plants[J]. *Developmental Genetics*, 1987, 8(5-6): 475-493
- [6] Tsafaris A S, Kafka M. Mechanisms of heterosis in crop plants [J]. *Journal of Crop Production*, 1997, 1(1): 95-111
- [7] 刘天骄. 玉米杂交种及其亲本 DNA 胞嘧啶甲基化模式和水平变化研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013
Liu T J. Research of DNA cytosine methylation patterns and levels in maize hybrid and their parents[D]. Changchun: Jilin University, 2013 (in Chinese)
- [8] 陈家慧, 杨荣仲, 周会. 不同甘蔗品种基因组 DNA 甲基化分析[J]. 农业研究与应用, 2015, 4(159): 11-16
Chen J H, Yang R Z, Zhou H. Analysis of DNA methylation in different sugarcane varieties [J]. *Agricultural Research and Application*, 2015, 4(159): 11-16 (in Chinese)
- [9] 张楷歆. 大豆叶片 DNA 甲基化遗传变异及其与杂种优势关系的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016
Zhang K X. The study of relationship between inheritance and variation of DNA methylation with heterosis in soybean leaf [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [10] 李杨瑞. 现代甘蔗学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010
Li Y R. *Modern Sugarcane Science* [M]. Beijing: China Agriculture

- Press, 2010, 61-125 (in Chinese)
- [11] 牛俊奇, 王震, 杨丽涛, 李杨瑞. 甘蔗蔗糖转运蛋白 *SoSUT2* 基因克隆和表达分析[J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(6): 32-40
Niu J Q, Wang Z, Yang L T, Li Y R. Cloning and expression analysis of sucrose transporter gene (*SoSUT2*) in sugarcane [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2017, 22(6): 32-40 (in Chinese)
- [12] 刘昔辉, 方锋学, 张荣华, 宋焕忠, 杨荣仲, 高铁静, 雷敬超, 罗霆, 段维兴, 张革民, 李杨瑞. 甘蔗与河八王属间杂种的 SSR 标记鉴定[J]. 西南农业学报, 2012, 25(1): 38-42
Liu X H, Fang F X, Zhang R H, Song H Z, Yang R Z, Gao Y J, Lei J C, Luo T, Duan W X, Zhang G M, Li Y R. Identification of progenies from sugarcane \times *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor by SSR marker[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 2012, 25(1): 38-42 (in Chinese)
- [13] Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45(1): 31-39
- [14] 仪治本, 孙毅, 牛天堂, 梁小红, 刘龙龙, 赵威军, 李炳林. 高粱基因组 DNA 胞嘧啶甲基化在杂交种和亲本间差异研究[J]. 作物学报, 2005, 31(9): 1138-1143
Yi Z B, Sun Y, Niu T T, Liang X H, Liu L L, Zhao W J, Li B L. Patterns of DNA cytosine methylation between hybrid and their parents in sorghum genome[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(9): 1138-1143 (in Chinese)
- [15] 黄豪永. 小麦-黑麦远缘杂交后代 DNA 甲基化的 MSAP 分析[D]. 成都: 四川农业大学, 2014
Huang H Y. DNA methylation-sensitive amplification polymorphism in interspecific hybrid between wheat and rye [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [16] Xiong L Z, Xu C G, Saghai M M A, Zhang Q F. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1999, 261(3): 439-446
- [17] Cervera M T, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater J M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(6): 543-552
- [18] Dong Z Y, Wang Y M, Zhang Z J, Shen Y, Lin X Y, Ou X F, Han F P, Liu B. Extent and pattern of DNA methylation alteration in rice lines derived from introgressive hybridization of rice and *Zizania latifolia* Griseb [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113(2): 196-205
- [19] Portis E, Acquadro A, Comino C, Lanteri S. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Plant Science*, 2003, 166(1): 169-178
- [20] 赵欣欣. 玉米亲本自交系及其杂交种的 DNA 甲基化水平和模式的遗传和变异研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2006
Zhao X X. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids [D]. Changchun: Dongbei Normal University, 2006 (in Chinese)
- [21] 吴绍华, 薛晶晶, 张红宇, 徐培洲, 吴先军. 双胚苗水稻单倍体及其杂交后代基因组 DNA 甲基化特异位点的分析及功能探讨[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(3): 249-255
Wu S H, Xue J J, Zhang H Y, Xu P Z, Wu X J. Analysis of special DNA methylated sites between haploid of twin-seeding and its hybrids in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(3): 249-255 (in Chinese)

责任编辑: 吕晓梅