

## 研究报告

### A Letter

# 利用 MSAP 分析 18 个芥蓝齐口期的表观遗传多样性

史卫东<sup>✉</sup>, 黄如葵<sup>✉</sup>, 陈振东<sup>✉</sup>, 罗海玲<sup>✉</sup>, 康红卫<sup>✉</sup>, 梁家作<sup>✉</sup>, 刘杏连<sup>✉</sup>

广西农科院蔬菜研究所, 南宁, 530007

✉ 通讯作者: shiwd@gxaas.net ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 47 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0047

收稿日期: 2011 年 12 月 12 日

接受日期: 2012 年 08 月 21 日

发表日期: 2012 年 11 月 05 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 5 期 505-512 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

史卫东等, 2012, 利用 MSAP 分析 18 个芥蓝齐口期的表观遗传多样性, 分子植物育种(online) Vol.10 No.47 pp.1346-1353 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0047)

引用格式(英文):

Shi et al., 2012, The Epigenetic Genetic Diversity of 18 Chinese Kales Analyzed by MSAP when Initiated Flowering, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.47 pp.1346-1353 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0047)

**摘要** 本研究利用 MSAP 检测 18 个芥蓝齐口期 DNA 甲基化水平, 分析了表观遗传多样性, 探讨 DNA 甲基化模式对齐口期的影响。结果表明, 18 个芥蓝齐口期平均为 50 d, 叶片数平均为 10 片, 齐口期和叶片数不相关(相关系数为 0.296); 变异系数分别为 21% 和 18%; 遗传距离分布在 0~40, 平均值为 12.227 6, 在 10.62 处分为 3 类。MSAP 分析表明, 5 对引物组合扩增得到 432 条多态性条带, 201 条片段表现出多态性, 多态性比率为 47%; Nei 遗传距离分布在 0.004~0.467, 平均值为 0.095 8, 表明遗传多样性水平较低; 在 0.04 处分为 3 类。Mantel 测验表明两种分析的遗传距离相关系数为 -0.136 6, 显示齐口期、叶片数与 DNA 甲基化多态性没有相关性。DNA 甲基化模式分析表明, 非甲基化片段为 110 条, 甲基化多态性片段为 322 条, 分为 3 种带型, 类型一为非甲基化带型(110 条), 类型二为甲基化带型(110 条), 类型三为半甲基化带型(152 条), 非甲基化片段和半甲基化片段在不同品种之间呈现多态性, 甲基化片段在不同品种之间呈现多态性与单态性相差不大, 显示 MSAP 多态性主要来源于非甲基化和半甲基化片段, 芥蓝甲基化模式以半甲基化为主。本文推测芥蓝 DNA 甲基化水平降低与在齐口期调控有关, MSAP 分析用于结构基因组研究, 还可以用于功能基因组研究。

**关键词** 芥蓝; 表观遗传多样性; MSAP 分析

## The Epigenetic Genetic Diversity of 18 Chinese Kales Analyzed by MSAP when Initiated Flowering

Shi Weidong<sup>✉</sup>, Huang Ruikui<sup>✉</sup>, Chen Zhendong<sup>✉</sup>, Luo Hailing<sup>✉</sup>, Kang Hongwei<sup>✉</sup>, Liang Jiazuo<sup>✉</sup>, Liu Xinglian<sup>✉</sup>

The Institute of Vegetable Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, 530007;

✉ Corresponding author, shiwd@gxaas.net; ✉ Authors

**Abstract** The DNA methylation level of 18 Chinese kale in the initial flowering stage was detected by MSAP in order to analyze the epigenetic genetic diversity and impact of DNA methylation. The phenotype results showed that average initial flowering time and leaf numbers was 50 days and 10 individually and there was no relationship (correlation coefficient was 0.296). Coefficient of variability was 21% and 18% individually. Genetic distance varied between 0~40 and average was 12.227 6. Three classes were grouped at genetic distance 10.62. 432 bands were amplified with 5 *EcoR* I + *Hpa* II and *EcoR* I + *Msp* I primer combinations in MSAP. 201 bands were polymorphic bands and polymorphism percentage was 47%. Nei's genetic distance varied 0.004~0.467 and average was 0.095 8 so one can conclude that genetic diversity was relatively low in Chinese kale. Three classes were grouped at genetic distance 0.04. Correlation coefficient was 0.136 6 between phenotype and MSAP genetic distance so there wasn't correlation between initial flowering time combined with leaf numbers and DNA methylation polymorphism. In DNA pattern analysis monomorphic methylation bands were 110 and polymorphic methylation bands were 322 of which three clusters was grouped. The first 110 was no methylation (*EcoR* I + *Msp* I / *EcoR* I + *Hpa* II). The second 110 was methylation bands digested with *EcoR* I + *Msp* I. The third 152 was hypomethylation band digested with *EcoR* I + *Hpa* II. The nomethylation and hypomethylation bands displayed more between varieties compared with less methylation bands mean the methylation polymorphism came from nomethylation and hypomethylation bands, hypomethylation was major methylation type in kales. As a result one can speculation DNA methylation decreased was related to initial flowering. The research also proved MSAP analysis can also be used functional genomics research except for structural genomics.

**Keywords** Chinese kale (*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* Bailey); Epigenetic genetic diversity; Methylation-sensitive AFLP markers (MSAP)

## 研究背景

芥蓝(*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* Bailey)是我国南方特产蔬菜,以秋冬生产为主,收获期是齐口期,即抽薹开花始期,此时植株正经历营养生长向生殖生长的转换,受温光环境因素影响很大,如低温利于春化作用诱导齐口期,而高温则阻滞生长、降低菜薹产量和品质等(关佩聪和梁承愈, 1989; 杨暹和杨运英, 2002; 刘厚诚等, 2003),因此,齐口期不但是生产上常用的品种分类标准,也是育种和种质资源鉴定的重要指标。

通过模式植物拟南芥的研究发现,春化诱导开花与微量的短暂的 DNA 甲基化水平降低相关(Burn et al., 1993; Finnegan et al., 1996; 1998; Sheldon et al., 2000),DNA 甲基化水平降低也能够诱导白菜、菜心、萝卜和青花菜等的抽薹开花(李梅兰等, 2002; 2003; 汪炳良等, 2005; 王薇等, 2008; 于锡宏等, 2008)。有研究认为 DNA 甲基化作为表观遗传的重要形式,参与春化途径调控并可能起着整合因子作用(Sheldon et al., 2000),也有研究认为 DNA 甲基化水平降低和春化作用是通过不同的调控途径诱导开花时间关键基因 *FLOWERING LOCUS C (FLC)* 下调表达的(Finnegan et al., 2005)。

检测甲基化的诸多方法中,MSAP (methylation sensitive amplified polymorphism)与 AFLP 原理相同,如两者均无需了解全基因组序列信息,采用长寡核苷酸随机引物进行 PCR 反应,利用聚丙烯酰胺凝胶进行产物分离,既保留 RFLP 的可靠性又保留 PCR 的精确性和高效性,成为多态性检测效率非常高的分子标记技术。不同之处是 MSAP 选用 *HpaII* 和 *MspI* 酶切 DNA,这对同裂酶能够检测基因组 DNA 上 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化状态(McClelland et al., 1994),结果 MSAP 既能象 AFLP 一样检测基因组 DNA 的序列差异,又能检测由非序列变化引起的表观遗传差异,演变成一种结构与功能相结合的分子标记,在十字花科植物研究上得到广泛应用,如拟南芥、白菜、油菜、萝卜的发育调控、种质资源鉴定、抗逆性或多倍化后代的甲基化分析(Cervera et al., 2002; 陆光远等, 2005, 科学通报, 50(24): 2750-2756; 齐心, 2006; 李象松等, 2010; Salmon et al., 2008),但在芥蓝种质资源鉴定上还没见报道。由于芥蓝种质资源狭窄,齐口期易受环境因素影响,常规的分子标记技术仅能检测出基因组结构变异,为此本研究利用 MSAP 检测 18 个芥蓝

DNA 甲基化水平,分析齐口期表观遗传多样性,探讨 DNA 甲基化对齐口期的影响,旨在为芥蓝育种和栽培生产提供理论依据。

## 1 结果分析

### 1.1 芥蓝齐口期分析

18 份芥蓝齐口期和叶片数的调查结果如下(表 1),齐口期最少为 35 d (澄海芥蓝菜和大丰芥蓝),最多的 75 d (正源澄海粗条芥蓝),多数品种为 40~60 d,平均为 50 d。齐口期叶片数最少的为 8 片(正源四季甜芥蓝,白花尖叶粗苔甜芥蓝,甜脆黄花尖叶芥蓝),最多的为 15 片(泰国芥蓝),平均叶片数为 10 片。齐口期和叶片数相关系数为 0.296,两者不相关,即叶片数不随齐口期变化。变异系数表示性状离散性特征,高值代表性状离散程度大,本研究中的齐口期为 21%,叶片数为 18%,表明齐口期变异程度大于叶片数。

根据 18 个芥蓝的齐口期和叶片数,利用 DPS 数据处理系统计算遗传距离,变化范围是 0~40,平均值为 12.227 6。正源澄海粗条芥蓝和澄海芥蓝菜的遗传距离最大(40),香港白花甜芥蓝和正源大笋黄花芥蓝、正源四季甜芥蓝和绿宝芥蓝,白花尖叶粗苔甜芥蓝和甜脆黄花尖叶芥蓝的遗传距离最小,表明几个品种亲缘关系最近。

利用欧式距离和类平均法进行聚类分析(图 1),在遗传距离 10.62 处分为 3 类,第一类是齐口期为 35~50 d 之间的品种,包括白花甜芥蓝、甜脆白花尖叶芥蓝、泰国中迟花粗茎尖叶芥蓝、香港白花甜芥蓝、正源大笋黄花芥蓝、中花芥蓝、顺宝芥蓝、白花尖叶粗苔甜芥蓝、甜脆黄花尖叶芥蓝、大丰芥蓝和澄海芥蓝菜。第二类是齐口期为 55~60 d 的品种,包括正源大笋香菇芥蓝、大芯四季香菇芥蓝 104、正源大笋迟花芥蓝、泰国芥蓝、正源四季甜芥蓝和绿宝芥蓝。第三类为齐口期 75 d 的正源澄海粗条芥蓝。

### 1.2 芥蓝 MSAP 分析

利用 5 对 MSAP 引物组合扩增 18 个芥蓝品种,一共得到 432 条带,平均每条引物 86 条,其中 201 条片段表现出多态性,推测芥蓝甲基化多态性比率为 47% (201/432),可见 MSAP 检测芥蓝种质资源遗传多样性的效率很高,芥蓝遗传多样性也较丰富(图 2)。

选用 *EcoR* I 和 *Msp* II 组合获得的多态性条带,

表 1 芥蓝品种及表型特性

Table 1 Variety of 18 Chinese kales and phenotype characters

编号 Code	品种 Variety	齐口期 Initial flowering time	叶片数 Leaf No.	编号 Code	品种 Variety	齐口期 Initial flowering time	叶片数 Leaf No.
1	白花甜芥蓝 White flower sweat kale	50	11	10	泰国芥蓝 Thailand kale	60	15
2	香港白花甜芥蓝 Hong Kong white flower sweat Kale	45	11	11	大芯四季香菇芥蓝 104 Thick stem annual kale 104	60	11
1	中花芥蓝 Med maturity kale	45	9	12	顺宝芥蓝 Shun Bao kale	40	10
2	正源大笋黄花芥蓝 Zhen Yuan yellow flower thick stem kale	45	11	13	绿宝芥蓝 Lv Bao Kale	55	8
3	正源大笋香菇芥蓝 Zhen Yuan thick stem sweat kale	60	12	14	大丰芥蓝 Da Feng kale	35	9
3	正源大笋迟花芥蓝 Zhen Yuan thick stem late maturity kale	60	9	15	白花尖叶粗苔甜芥蓝 White flower thin leaves thick stem kale	40	8
4	正源澄海粗条芥蓝 Zhen Yuan Chinghai thick stem kale	75	10	16	甜脆黄花尖叶芥蓝 Yellow flower thin leaves sweat kale	40	8
5	正源四季甜芥蓝 Zhen Yuan annual sweat kale	55	8	17	甜脆白花尖叶芥蓝 White Flower thin leaves thick stem kale	50	10
6	泰国中迟花粗茎尖叶芥蓝 Thailand thin leaves thick stem late maturity kale	50	9	18	澄海芥蓝菜 Cheng Hai kale	35	10

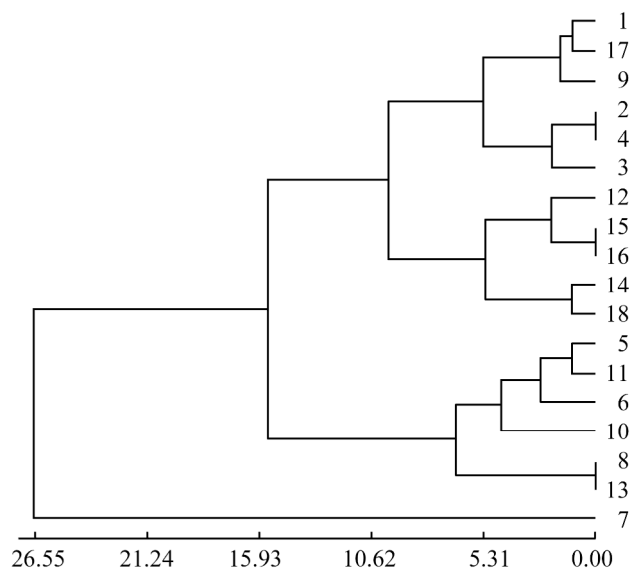


图 1 芥蓝齐口期表型聚类分析

注: 1~18 品种名称见表 1

Figure 1 The phenotype cluster of Chinese kales with flowering time

Note: 1~18 variety names were showed in table 1

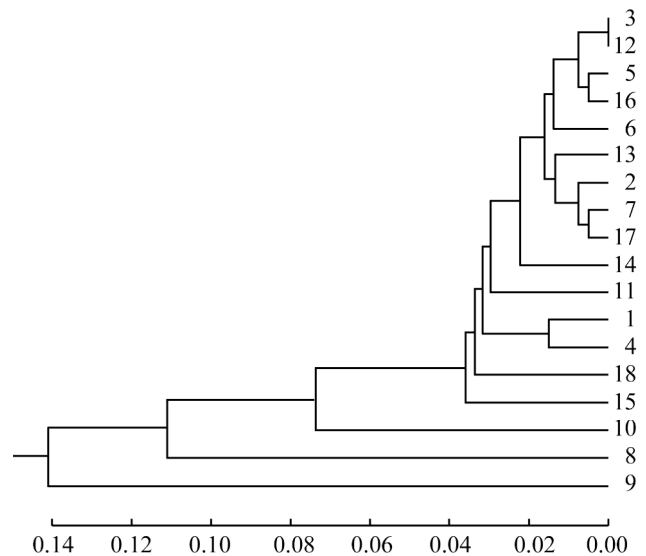


图 2 芥蓝 MSAP 聚类分析

注: 1~18 品种名称见表 1

Figure 2 The cluster of Chinese kales with MSAP

Note: 1~18 variety names were showed in table 1





利用 GenAlEx 6.4 软件计算 18 份品种的 Nei 遗传距离, 分布范围是 0.004~0.467, 平均值为 0.095 8, 表明遗传多样性水平较低。中花芥蓝和顺宝芥蓝的遗传距离最小(0.004), 泰国中迟花粗茎尖叶芥蓝与澄海芥蓝菜最大(0.467)。

按照 UPGMA 方法, 利用 Nei 遗传距离进行聚类分析, 在遗传距离 0.04 处, 可以将 18 份品种分为 3 类, 第一类中花芥蓝、顺宝芥蓝、正源大笋香菇芥蓝、甜脆黄花尖叶芥蓝、正源大笋迟花芥蓝、绿宝芥蓝、香港白花甜芥蓝、正源澄海粗条芥蓝、甜脆白花尖叶芥蓝、大丰芥蓝、大芯四季香菇芥蓝 104、白花甜芥蓝、正源大笋黄花芥蓝、澄海芥蓝菜、白花尖叶粗苔甜芥蓝。第二类为泰国芥蓝。第三类为正源四季甜芥蓝。第四类为泰国中迟花粗茎尖叶芥蓝(图 3)。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18  
H M H M H M H M H M H M H M H M H M M

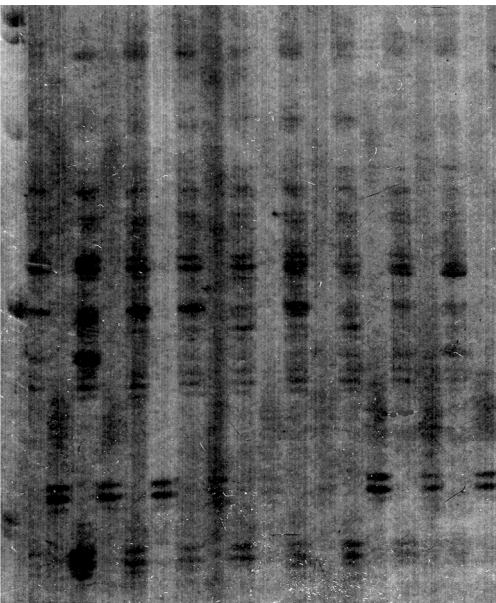


图 3 18 个芥蓝品种的 MSAP 电泳图

注: M: Marker; 1~18 品种见表 1; H,M: *EcoR* I +*Hpa* II 和 *EcoR* I +*Msp* I 酶切组合

Figure 3 MSAP electrophoresis of 18 Chinese kales

Note: M: Marker; 1~18: 1~18 variety names were showed in table 1; H,M: Combinations of *EcoR* I +*Hpa* II and *EcoR* I +*Msp* I

### 1.3 芥蓝齐口期和 MSAP 相关性检验

18 份芥蓝的 MSAP 与齐口期聚类分析结果不一致, 为验证两种分析的相关程度, 利用 mantel test 检验齐口期遗传距离和 MSAP 遗传距离相关性, 相

关系数为-0.136 6, 表明齐口期、叶片数和基因组 DNA 甲基化相关不显著。

### 1.4 芥蓝 DNA 甲基化模式分析

DNA 甲基化多态性片段可以归纳为 3 种带型(表 2), 类型一为两种内切酶均能酶切的带型(*EcoR* I +*Msp* I/*EcoR* I +*Hpa* II), 代表非甲基化; 类型二为 *EcoR* I +*Msp* I 酶切带型, 表示双链内胞嘧啶甲基化(M)。类型三为 *EcoR* I +*Hpa* II 酶切带型, 表示单链外部胞嘧啶的半甲基化(H)。本研究非甲基化片段为 110 条, 甲基化多态性片段为 322 条, 可分 3 种类型, 类型一的变化范围为 110 条(澄海芥蓝菜)~160 条(泰国中迟花粗茎尖叶芥蓝), 类型二为 63 条(澄海芥蓝菜)~172 条(泰国中迟花粗茎尖叶芥蓝), 类型三为 52 条(白花甜芥蓝)~116 条(香港白花甜芥蓝)。类型二平均数量为 110 条, 少于类型三的 152 条, 类型三为半甲基化类型。在不同品种之间, 78% (86/110)的非甲基化片段和 92% (141/152)的半甲基化片段呈现多态性, 而甲基化片段中, 多态性与单态性相差不大, 表明芥蓝较高的 MSAP 多态性主要来源于前两者, 甲基化模式以半甲基化为主。

## 2 讨论

作为南方地区的重要叶菜, 芥蓝形态性状丰富, 其中齐口期作为重要的商品和产量性状, 受环境(特别是低温)、生长发育规律、品种、播种期及矿质营养等的影响较大(关佩聪和梁承愈, 1989; 杨暹和杨运英, 2002; 张静和张鲁刚, 2008)。本研究 18 份芥蓝齐口期变异系数达 21%, 正是诸多影响因素的综合反映。聚类分析中除香港白花甜芥蓝、正源大笋黄花芥蓝、白花尖叶粗苔甜芥蓝和甜脆黄花尖叶芥蓝外, 其余 14 份芥蓝基本按照齐口期分类, 证明齐口期可以作为种质资源鉴定的可靠指标, 但香港白花甜芥蓝和正源大笋黄花芥蓝、白花尖叶粗苔甜芥蓝和甜脆黄花尖叶芥蓝具有非常小的遗传距离, 显示其亲缘关系紧密, 而黄花和白花芥蓝属于不同的栽培品种(刘海涛和关佩聪, 1997), 这又说明齐口期分类仍具有局限性, 不能反映出其它表型特征, 所以在利用表型研究遗传多样性时, 性状一定要丰富和典型, 才可能反映种质资源的真实特性。

高等植物 DNA 的甲基化比例变化很大 (Finnegan et al., 1996), 与拟南芥、甘蓝、油菜和萝卜等的 MSAP 分析相比, 本研究中 MSAP 检测的芥蓝甲基化比例为 47%, 低于芥蓝与萝卜四倍体

表 2 18 份芥蓝品种 MSAP 带型分析

Table 2 DNA methylation patterns of 18 Chinese kales

MSAP 类型 MSAP Type	多态性带数 Polymorphic bands		
	单态性带数 Monomorphic bands	多态性带数 Polymorphic bands	总数 Total
	非甲基化片段(类型一, <i>EcoR</i> I + <i>Msp</i> I/ <i>EcoR</i> I + <i>Hpa</i> II) Non methylation (First, <i>EcoR</i> I + <i>Msp</i> I/ <i>EcoR</i> I + <i>Hpa</i> II)	24	86
总甲基化片段 Total methylation			322
甲基化片段(类型二, <i>EcoR</i> I + <i>Msp</i> I) Methylation (Second, <i>EcoR</i> I + <i>Msp</i> I)	50	60	110
半甲基化片段(类型三, <i>EcoR</i> I + <i>Hpa</i> II) Hemimethylation (Third, <i>EcoR</i> I + <i>Hpa</i> II)	11	141	152
其他甲基化变化 Other	—	60	60

的 30.61%~33.10% (F4~F10) (李象松等, 2010)和甘蓝的 53.3%~60.7% (Salmon et al., 2008), 高于拟南芥的 24%~34% (Cervera et al., 2002)、油菜的 15% (陆光远等, 2005, 科学通报, 50(24): 2750-2756)和 5%~13.4% (柳李旺等, 2006, 江苏农业科学, 6: 203-206), 暗示同为十字花科植物, 尽管亲缘关系紧密, 但基因组甲基化水平在不同物种之间还是有差别的。MSAP 聚类分析发现品种间遗传距离也较小, 分布范围在 0.004~0.467 之间, 与 RAPD 和 SRAP 检测结果基本一致(陈文文等, 2011; 李桂花等, 2011), 即芥蓝遗传多样性水平较低, 即使本研究参试品种较少。两个泰国品种各具一类, 可能反映了品种来源的地理差异, 毕竟本研究的多数品种来源于中国并分在一组。

十字花科植物表型和分子标记分类常不一致, 将两种鉴定方法结合运用则是评价遗传多样性比较有效的方法(郭晶心等, 2002; 杨华等, 2006)。本文芥蓝齐口期、叶片数和 DNA 甲基化多态性不相关, 意味着仅根据一种鉴定来推测遗传多样性不十分理想。究其原因可能在于芥蓝起源且主要种植在南方地区, 遗传多样性受地域限制而较低(陈文文等, 2011; 李桂花等, 2011), 再次由于 MSAP 只检测 CCGG 位点甲基化水平, 即不能反映出其它类型甲基化变异, 检测出的甲基化水平偏低, 最后检测不出基因组序列变化, 所以出现两种分类不一致的现象。研究发现拟南芥表观遗传变异可占植株高度和开花时间表型变异 30% (Johannes et al., 2009), 而且

拟南芥不同生态型具有不同的甲基化调控机制, 使得亲缘关系紧密的拟南芥由于甲基化多态性不相关而不能归为一类(Cervera et al., 2002), 因而 DNA 甲基化与表型相关性可能无明显规律可循(Oliver et al., 2010), 在芥蓝与萝卜杂种上也存在这个现象(李象松等, 2010), 在水稻上与表型相关的表观标记更可能出现在亲缘关系紧密的品系中(Takata et al., 2005), 本文 MSAP 结果与已有分子标记研究相同, 也能够揭示地里信息, 仍不失为芥蓝种质研究的较好方法。

抽薹开花是一个受多基因和多途径调控的过程, DNA 甲基化参与春化作用调控(Michaels and Amasino, 1999; Sheldon et al., 2000)。本研究芥蓝 DNA 甲基化多态性主要来源于非甲基化片段和半甲基化片段, 甲基化模式以半甲基化为主, 说明在自然条件下的齐口期 DNA 甲基化水平降低, 与利用去甲基化试剂(5-aza)处理降低 DNA 甲基化水平取得的效果相同(Burn et al., 1993; Finnegan et al., 1998; 李梅兰等, 2002; 2003; 汪炳良等, 2005; 王薇等, 2008; 于锡宏等, 2008), 所以本文认为 DNA 甲基化水平降低与芥蓝齐口期调控有关, 但是否如油菜上去甲基化归因于春化作用的结论(Filek et al., 2006), 还有待后续实验证实, 研究也表明 MSAP 分子标记除了用于结构基因组研究, 还可以用于功能基因组研究。

### 3 材料与amp;方法

#### 3.1 参试品种及播期

试验于 2008 年秋季在广西农业科学院蔬菜中心蔬菜基地进行, 品种编号见表 1。直播。从每个品种选择 10 株记录齐口期和叶片数, 采集叶片用液氮冷冻于-70℃冰箱。

#### 3.2 DNA 提取

采用 CTAB 的方法: 取 2~3 g 叶片, 用液氮研碎, 加入 DNA 提取液(含 1.5%的 CTAB, 1%巯基乙醇), 65℃水浴 90 min, 加入氯仿:异戊醇(24:1), 抽提 2 次后, 加 RNA 酶 37℃温浴过夜, 苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)纯化, 样品 DNA 用 ddH<sub>2</sub>O 溶解和保存。

#### 3.3 MSAP 分析

参照 Xiong 等(1999)和陆光远等(2005, 科学通报, 50(24): 2750-2756)的方法。酶切连接一步法反应体系和步骤: 25 μL 反应体系: *Mse*I adaptor (50 pmol/μL) 1 μL, *Eco*R I adaptor (5 pmol/μL) 1 μL, T4 buffer 2.5 μL, T4 ligase 1.5 U, 100×BSA 0.25 μL, *Mse*I 3 U, *Eco*R I 3 U, DNA 2 μL, 双蒸水补足至 25 μL。将上面反应体系的 PCR 管在 37℃水浴锅中处理 10 h, 然后转到 70℃处理 15 min, 稀释 10 倍, 作为预扩增模板。预扩增体系: 10×buffer 2 μL, Mg<sub>2</sub>CL (25 mmol/L) 1.6 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL, *Taq* 酶 (2 U/μL) 0.5 μL, *Mse*I (50 ng/μL) 1 μL, *Eco*R I (50 ng/μL) 1 μL, DNA 3 μL, H<sub>2</sub>O 12.1 μL。反应条件: 94℃预变性 3'; 94℃变性 30", 56℃退火 30", 72℃延伸 1', 一共 25 份循环; 72℃延伸 7'; 4℃保存。预扩增引物序列参考 Salmon 等(2008)。选扩增体系: 10×buffer 2 μL, Mg<sub>2</sub>Cl (25 mmol/l) 1.6 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL, *Taq* 酶(2 U/μL) 0.5 μL, *Mse* I (50 ng/μL) 1 μL, *Eco*R I (50 ng/μL) 1 μL, DNA 3 μL, H<sub>2</sub>O 12.1 μL。反应条件: 94℃预变性 3'; 94℃变性 30", 65℃退火 30"每循环下降 0.7℃, 72℃延伸 1', 一共 23 份循环; 72℃延伸 7'; 4℃保存。6%聚丙烯酰胺胶电泳检测扩增产物, 银染法染色显影。

#### 3.4 数据分析

采用 DPS 数据处理系统对开花期和叶片数进行系统聚类分析。MSAP 分析参考 Salmon 等(2008), 记载选择性扩增反应的条带数, 清晰可见的条带设为 1, 肉眼不可见或模糊不清的条带设为 0, 将统计的条带记为数字矩阵, 利用 Excel 计算甲基化多态性比率和甲基化类型。利用 GenAlEx 6.4 软件计算 Nei

分子遗传距离和聚类分析, 利用 mantel 检验; 两种分析的遗传距离相关性。

#### 作者贡献

史卫东是本项目的实验设计、实验研究和数据分析的执行人, 完成论文写作与修改。李秋雯参与MSAP实验; 黄如葵、赵坤提供部分试验材料; 王益奎参与数据分析。全体作者都阅读并同意最终的文本。

#### 致谢

本研究获得广西农业科学院基本科研业务专项(2012JZ06和桂农科2012YT05)、广西作物遗传改良生物技术重点实验室开放课题子课题(桂科能0815011-6-1)资助。感谢评审人的评审意见和修改建议。

#### 参考文献

- Bossdorf O., Arcuri D., Richards C.L., and Pigliucci M., 2010, Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*, *Evolutionary Ecology*, 24(3): 541-553 <http://dx.doi.org/10.1007/s10682-010-9372-7>
- Burn J.E., Bagnall D.J., Metzger J.D., and Dennis E.S., 1993, DNA methylation, vernalization and the promotion of flowering, *Proc Natl Sci USA*, 90:287-291 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.1.287> PMID:11607346 PMCid:45645
- Cervera M.T., Ruiz-Garcia L., and Martinez-Zapater J.M., 2002, Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers, *Mol. Genet. Genomics*, 268(4): 543-552 <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-002-0772-4> PMID:12471452
- Chen W.W., Liu H.C., Chen R.Y., Song S.W., and Sun G.W., 2011, Genetic diversity analysis of Chinese Kale germplasm resources by RAPD markers, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 27(8): 150-155 (陈文文, 刘厚诚, 陈日远, 宋世威, 孙光闻, 2011, 基于RAPD标记的芥蓝种质资源遗传多样性分析, *中国农学通报*, 27(8): 150-155)
- Finnegan E.J., Genger R.K., Kovac K., Peacock W.J., and Dennis E.S., 1998, DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(10): 5824-5829 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.10.5824> PMID:9576969 PMCid:20464
- Finnegan E.J., Kovac K.A., Jaligot E., Sheldon C.C., Peacock W.J., and Dennis E.S., 2005, The down regulation of FLOWER-ING LOCUS C (FLC) expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms, *The Plant Journal*, 44(3): 420-432 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02541.x>



- PMid:16236152
- Finnegan E.J., Peacock W.J., and Dennis E.S., 1996, Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(16): 8449-8454 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.16.8449>  
PMid:8710891 PMCID:38691
- Guan P.C., and Liang C.Y., 1989, Flower bud differentiation of Chinese kale (*Brassica alboglabra* bailey) and its relation to cultivar, sowing time and vernalization, *Huanan Nongye Daxue Xuebao (Journal of South China Agricultural University)*, 10(2): 60-66 (关佩聪, 梁承愈, 1989, 芥兰花芽分化与品种播种期和春化条件关系, 华南农业大学学报, 10(2): 60-66)
- Guo J.X., Zhou N.Y., Ma R.C., and Cao Q., 2002, Genetic diversity in *Brassica rapa* revealed by AFLP molecular markers, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 10(2): 138-143 (郭晶心, 周乃元, 马荣才, 曹鸣庆, 2002, 白菜类蔬菜遗传多样性的AFLP分子标记研究, 农业生物技术学报, 10(2): 138-143)
- Johannes F., Porcher E., Teixeira F.K., Saliba-Colombani V., Simon M., Agier N., Bulski A., Albuissou J., Heredia F., Audigier P., Bouchez D., Dillmann C., Guerche P., Hospital F., and Colot V., 2009 Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits, *PLoS Genet.*, 5(6): e1000530 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000530>  
PMid:19557164 PMCID:2696037
- Li G.H., Chen H.C., Zhang Y., Guo F.Y., Li X.Y., Liu Z.X., and Zhang G.Q., 2011, SRAP analysis on genetic diversity of Chinese kale germplasm, *Redai Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Tropical Crops)*, 32(12): 2214-2220 (李桂花, 陈汉才, 张艳, 郭凤仪, 李向阳, 刘振翔, 张桂权, 2011, 芥蓝种质资源遗传多样性的SRAP分析, 热带作物学报, 32(12): 2214-2220)
- Li M.L., Wang Q.M., Zhu Z.J., and Zeng G.W., 2002, Studies on the changes of DNA methylation level, GA content and protein in non-heading Chinese cabbage during vernalization, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, (4): 353-357 (李梅兰, 汪俏梅, 朱祝军, 曾广文, 2002, 春化对白菜DNA甲基化、GA含量及蛋白质的影响, 园艺学报, (4): 353-357)
- Li M.L., Zeng G.W., and Zhu Z.J., 2003, Analysis of effects of 5-azacytidine on promoting flowering in non-heading Chinese cabbage, *Zhejiang Daxue Xuebao (Nongye Yu Shengmingkexue Ban) (Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science)*, 29(3): 287-290 (李梅兰, 曾广文, 朱祝军, 2003, 5-氮杂胞苷促进白菜开花的效应分析, 浙江大学学报(农业与生命科学版), 29(3): 287-290)
- Li X.S., Wei L.H., Li X.L., Wang Y.J., Wang B., Wu J.S., and Long H., 2010, Methylation variation of different generations of artificial *Raphanus Sativus* × *Brassica Alboglabra* allopolyploids analyzed with MSAP, *Huazhong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Huazhong Agricultural University)*, (10): 96-100 (李象松, 魏丽华, 李炫丽, 汪艳杰, 王冰, 吴江生, 龙鸿, 2010, 萝卜 × 芥蓝异源四倍体F4和F10世代DNA甲基化变异的MSAP分析, 华中农业大学学报, (1): 96-100)
- Liu H.C., Huang Q., Chen R.Y., and Liu Q., 2003, Color-formation of Chinese kale stalk under high temperature, *Zhongguo Shucai (China Vegetables)*, (6): 17-19 (刘厚诚, 黄琴, 陈日远, 刘晴, 2003, 高温条件下芥蓝菜薹色泽的形成, 中国蔬菜, (6): 17-19)
- Liu H.T., and Guan P.C., 1997, Taxonomic relation between yellow-flower Chinese kale and white-flower Chinese kale, *Huanan Nongye Daxue Xuebao (Journal of South China Agricultural University)*, (2): 16-19 (刘海涛, 关佩聪, 1997, 黄花芥蓝与白花芥蓝的分类学关系, 华南农业大学学报, (2): 16-19)
- McClelland M., Nelson M., and Raschke E., 1994, Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases, *Nucleic Acids Res.*, 22(17): 3640-3659
- Michaels S.D., and Amasino R.M., 1999, FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering, *The Plant Cell*, 11(5): 949-956
- Qi X., 2006, Studies on genomic DNA methylation pattern during heterosis in *Brassica napus*, Thesis for M.S., Chinese Academy of Agriculture Sciences, Supervisor: Zhang C.Y., pp. (齐心, 2006, 油菜杂种优势形成过程中基因组DNA甲基化模式研究, 硕士学位论文, 中国农业科学院研究生院, 导师: 张春义, pp.)
- Salmon A., Clotault J., Jenczewski E., Chable V., and Manzanera-Dauleux M.J., 2008, *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism, *Plant Science*, 174(1): 61-70 <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.09.012>
- Sheldon C.C., Finnegan E.J., Rouse D.J., Tadege M., Bagnall D.J., Helliwell C.A., Peacock W.J., and Dennis E.S., 2000, The control of flowering by vernalization, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3(5): 418-422  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00106-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00106-0)
- Takata M., Kishima Y., and Sano Y., 2005, DNA methylation polymorphisms in rice and wild rice strains: Detection of epigenetic markers, *Breeding Science*, 55(1): 57-63  
<http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.55.57>

- Wang B.L., Li S.F., Zeng G.W., and Deng J.Y., 2005, Effect of 5-azacytosine on flowering and DNA methylation level of stem apices in radish (*Raphanus sativus* L.), *He Nong-xuebao (Acta Agriculturae Nucleatae Sinica)*, 19(4): 265-268 (汪炳良, 李水凤, 曾广文, 邓剑英, 2005, 5-azaC对萝卜茎尖DNA甲基化和开花的影响, *核农学报*, 19(4): 265-268)
- Wang W., Xia G.Q., and Yao F.J., 2008, Inductive effects of vernalization and GA3 on flowering of Chinese cabbage, *Jilin Nongye Daxue Xuebao (Journal of Jilin Agricultural University)*, 30(1): 24-27 (王薇, 夏广清, 姚方杰, 2008, 春化和赤霉素处理对大白菜开花的诱导效应, *吉林农业大学学报*, 30(1): 24-27)
- Xiong L.Z., Xu C.G., Saghai-Marooif M.A., and Zhang Q., 1999, Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by methylation sensitive amplification polymorphism technique, *Mol. Gen. Genet.*, 261(3): 439-446 <http://dx.doi.org/10.1007/s004380050986> PMID:10323223
- Yang H., Liu Z.C., Chen H.R., Chen L., and Luo L.J., 2006, Genetic diversity analyses based on SSR markers of Brassica vegetable germplasm distributed in Shanghai, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 7(3): 264-269 (杨华, 刘灶长, 陈海荣, 陈亮, 罗利军, 2006, 上海地区芸薹属蔬菜遗传多样性研究, *植物遗传资源学报*, 7(3): 264-269)
- Yang X., and Yang Y.Y., 2002, The effects of temperature on flower bud differentiation, yield and quality formation in Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey), *Huanan Nongye Daxue Xuebao (Ziranhexue Ban) (Journal of South China Agricultural University (Natural Science Edition))*, (2): 5-7 (杨暹, 杨运英, 2002, 苗期温度对芥蓝花芽分化、产量与品质形成的影响, *华南农业大学学报(自然科学版)*, (2): 5-7)
- Yu X.H., Li D., and Jiang X.M., 2008, The effect of DNA demethylation on vernalization in Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck), *Zhongguo Shucai (China Vegetables)*, (10): 16-18 (于锡宏, 李丹, 蒋欣梅, 2008, DNA去甲基化试剂处理对青花菜春化作用的影响, *中国蔬菜*, (10): 16-18)
- Zhang J., and Zhang L.G., 2008, Diversity and cluster analysis of Chinese kale germplasm resources, *Xibei Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica)*, 17(4): 285-289 (张静, 张鲁刚, 芥蓝种质资源的多样性和聚类分析, *西北农业学报*, 17(4): 285-289)