

水稻幼苗期低温胁迫DNA甲基化特征分析

郭 慧, 李树杏, 甘 雨, 张宏伟, 郝留根, 杨占烈, 向关伦

(贵州省农业科学院水稻研究所, 贵阳 550006)

摘要: 为探索低温胁迫下幼苗期水稻全基因组DNA甲基化调控机制, 通过对3个耐冷性不同的水稻品种进行3~4℃低温处理试验, 利用全基因组DNA甲基化测序(WGBS, whole genome bisulfite sequencing)技术分析低温处理后全基因组DNA甲基化水平及模式变化。结果显示: 低温处理后, 日本晴和9311的胞嘧啶甲基化(mC)都表现下降, 而P427的mC值上升。针对启动子区和转录区发生甲基化的基因进行锚定, 发现启动子区锚定的基因数远高于转录区, 材料P427锚定的基因最多, 9311锚定的基因最少。GO、KEGG富集分析发现, 低温处理后P427差异甲基化基因主要富集在萜生物合成、淀粉和蔗糖代谢、苯丙烷类生物合成等代谢通路。结果表明: 基因启动子区甲基化对低温胁迫响应基因的调控作用更为重要, 甲基化调控基因表达不仅与甲基化程度有关, 与甲基化类型也可能存在一定的关系。P427可能通过萜生物合成、淀粉和蔗糖代谢等代谢通路及激素信号转导通路上的基因影响苗期水稻的耐冷性。本研究进一步加深了对水稻耐冷性响应机制的理解。

关键词: 水稻; DNA甲基化; 低温胁迫; 差异表达基因; 差异甲基化区域

Analysis of DNA Methylation Characteristics under Cold Stress at Rice Seedling Stage

GUO Hui, LI Shu-xing, GAN Yu, ZHANG Hong-wei, HAO Liu-gen, YANG Zhan-lie, XIANG Guan-lun

(Rice Research Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006)

Abstract: In order to explore the regulation mechanism of genome-wide DNA methylation at rice seedlings upon low temperature stress treatment, three rice genotypes showing levels of cold tolerance were treated at 3-4 °C, followed by determination of the genome-wide DNA methylation using whole genome bisulfite sequencing (WGBS). By analyzing the distribution of methylation-related genes in the promoter and genic body region of the three samples, it was found that the related genes were mainly distributed in the promoter region. The genotype P427 was found anchoring the highest number of genes, including 9223 genes in the promoter region, and 2906 genes in the body region. The genotype 9311 was found anchoring the fewest genes. GO and KEGG enrichment analysis revealed that the differentially methylated genes were mainly involved in metabolic pathways such as those of diterpene biosynthesis, starch and sucrose metabolism, β -alanine metabolism, and phenylpropane biosynthesis. These results indicated that the methylation in the promoters was important in the regulation of low temperature stress-responsive genes, and the transcriptional regulation was associated with the degree of methylation and the methylation types. The genotype P427 may affect the cold tolerance of rice through modulating the genes in metabolic pathways such as diterpene biosynthesis, starch and sucrose metabolism, and hormone signal transduction pathways. Collectively, these results provided better understanding of the methylation-based response mechanism of cold tolerance in rice

Key words: rice; DNA methylation; low temperature stress; differentially expressed gene; differentially methylated region

收稿日期: 2022-09-24 修回日期: 2022-11-16 网络出版日期: 2022-12-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220924001>

第一作者研究方向为水稻逆境生物学研究与品种选育, E-mail: nksgh2008@163.com

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合基础[2020]1Z020); 国家自然科学基金(32260525); 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2022]重点028; 黔科合支撑[2022]重点025)

Foundation projects: Guizhou Provincial Science and Technology Projects (QKHJC[2020]1Z020); National Natural Science Foundation of China (32260525); Guizhou Provincial Science and Technology Projects(QKHZC[2022]Z028; QKHZC[2022]Z025)

植物在整个生长发育过程都处于固着状态,不像动物可以通过移动来躲避不良环境,因此植物生长很容易受到外界环境变化的影响。植物在长期的演化过程中为了抵御生物或非生物胁迫,进化出多种有效自我保护机制,其中表观遗传在植物精细调控中起着非常重要的作用^[1]。表观遗传指在不改变DNA序列的前提下,通过DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、以及小RNA介导等方式对靶标基因表达进行精细调控^[2]。DNA甲基化是植物表观遗传修饰中最常见也是最重要的方式之一,DNA甲基化指在DNA甲基化转移酶的作用下,以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,在CpG二核苷酸胞嘧啶分子5'碳原子上添加一个甲基的化学修饰^[3]。植物DNA甲基化修饰在基因表达、细胞分化等过程中发挥着重要调节作用^[4-5]。植物DNA甲基化模式主要有3种形式,mCpG(mCG, methylated CG,即甲基化的CG序列)、mCpHpG(mCHG, methylated CHG,即甲基化的CHG序列)和mCpHpH(mCHH, methylated CHH,即甲基化的CHH序列),其中H代表A、T、C。植物DNA甲基化模式和水平有其时空特异性,在不同组织或不同发育时期表现不同^[6]。DNA甲基化参与了植物应答各种非生物逆境胁迫过程^[7],植物可以通过改变DNA甲基化水平或模式来对逆境响应基因表达与应答网络进行调控,可以显著增强当代或子代对逆境的适应性^[1]。

近年来研究表明,植物DNA甲基化状态改变与其响应非生物胁迫紧密相关,许多与DNA甲基化相关的基因被证明参与了应答非生物胁迫调控^[7]。即当植物遇到高温、低温、盐碱或干旱等非生物胁迫时,为了更好地适应环境变化,某些特定基因或整个基因组的DNA甲基化修饰会发生一定改变。一些研究者认为,DNA甲基化可抑制基因重组以维持基因组稳定性^[8]。通常情况下全基因组DNA甲基化水平升高和位点特异性的低甲基化,可以阻止基因向有害方面突变,同时促进胁迫应答相关基因表达,而这些低甲基化位点往往与胁迫应答基因表达上调有关^[9-10]。

本研究对3份不同耐冷性的水稻品种P427、日本晴和9311,在苗期(三叶期)进行低温处理。采用全基因组DNA甲基化测序(WGBS, whole genome bisulfite sequencing)技术,研究不同耐冷性水稻品种低温处理前后全基因组DNA甲基化水平和模式变化,以期探究水稻苗期低温胁迫的表观遗传调控机制。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

根据前期耐低温筛选试验结果,本试验选用P427(强耐低温型)、日本晴(简称Nip,中度耐低温型)、9311(低温敏感型)3个不同耐冷型水稻品种开展试验。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻苗期植株培养与取样 选取P427、日本晴和9311各100粒饱满种子进行催芽,从中筛选50粒发芽一致的芽谷播于塑料钵内,置于28℃/14h(光照)、25℃/10h(黑暗)的光照培养箱中光暗交替培养21d,生长至三叶期。分别选取5株生长一致的健壮秧苗,剪取3g,用液氮速冻后置于-80℃冰箱保存备用。剩余秧苗转移到3~4℃低温(14h光照/10h黑暗)光照培养室内处理3d后,然后采用上述方法取样保存备用。

1.2.2 苗期水稻全基因组DNA甲基化测序 DNA样品提取采用3次重复,检测合格后应用3次DNA的混样进行文库构建和WGBS分析,由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。后续数据整理分析采用Excel2016和DPS2.0软件进行。

2 结果与分析

2.1 全基因组甲基化测序数据分析

水稻基因组中DNA甲基化修饰方式有3种类型,即CG、CHG和CHH(H代表A、C或T)。测序结果显示,水稻全基因组甲基化类型以CG位点发生甲基化水平最高,平均为69.8%~76.15%。因此,在水稻基因组中CG位点甲基化可能是最主要的甲基化类型。其次是CHG位点甲基化,平均为34.74%~40.13%。最少的是CHH位点甲基化,平均仅5.51%~7.5%(表1)。

2.2 mCG、mCHG、mCHH甲基化水平

通常以mCG、mCHG、mCHH分别表示甲基化CG、甲基化CHG、甲基化CHH这3种类型的甲基化模式,因不同物种甚至同一物种不同部位或因时间、空间和不同处理方式而存在很大的差异。本研究统计了供试材料胞嘧啶位点上发生DNA甲基化的比例,结果发现P427冷胁迫的胞嘧啶DNA甲基化率(mC=17.06%)高于常温下的比例(15.57%),日本晴和9311冷胁迫后胞嘧啶DNA甲基化率总体下降(表2)。

表1 C位点甲基化状态的统计表

Table1 C-site methylation type statistics table

样本 Sample		C_covg mean	C (Mb)	CG (Mb)	CHG (Mb)	CHH (Mb)	Mean C (%)	Mean CG (%)	Mean CHG (%)	Mean CHH (%)
处理前	P427(MCP)	8.00	1303.9	250.8	202.4	850.7	25.69	76.15	39.57	7.50
BT	Nip(MCR)	11.30	1845.0	322.0	287.1	1235.9	21.83	70.23	34.91	6.17
	9311(MCJ)	7.40	1213.9	219.7	189.9	804.4	23.22	72.17	36.69	6.67
处理后	P427(MTEP)	10.70	1752.3	332.8	275.1	1144.3	24.08	73.75	36.84	6.56
AT	Nip(MTER)	10.70	1747.7	332.6	272.3	1142.7	25.33	75.76	40.13	7.12
	9311(MTEJ)	7.90	1284.6	222.0	200.4	862.2	21.19	69.80	34.74	5.51

MCP、MCR 和 MCJ 分别表示低温处理前的 P427、日本晴和 9311(对照);MTEP、MTER 和 MTEJ 分别表示低温处理后的 P427、日本晴和 9311,下同。C_covg mean: 基因组所有 C 位点的平均覆盖深度;C: 比对到基因组 C 位点上的碱基数;CG: 比对到基因组 CG 位点胞嘧啶上的碱基数;CHG: 比对到基因组 CHG 位点胞嘧啶上的碱基数;CHH: 比对到基因组 CHH 位点胞嘧啶上的碱基数;Mean C: 基因组所有 C 位点的平均甲基化水平;Mean CG: CG 位点的平均甲基化水平;Mean CHG: CHG 位点的平均甲基化水平;Mean CHH: CHH 位点的平均甲基化水平

MCP, MCR and MCJ represent P427, Nipponbare and 9311 (control) before low temperature treatment; MTEP, MTER and MTEJ represent P427, Nipponbare and 9311 after low temperature treatment, the same as below. C_covg mean: The average coverage depth of all C sites in the genome; C: The number of bases aligned to the genome C position; CG: The number of bases aligned to the cytosine in the CG region of the genome; CHG: The number of bases aligned to the cytosine in the CHG region of the genome; CHH: The number of bases aligned to the cytosine in the CHH region of the genome; Mean C: The average methylation level of all C sites in the genome; Mean CG: The average methylation level of the CG region; Mean CHG: The average methylation level of the CHG region; Mean CHH: Mean methylation level in the CHH region. BT: Before treatment; AT: After treatment

表2 C位点甲基化的序列类型统计表

Table 2 Statistical table of types of cytosine methylation

(%)

品种 Variety	样本 Sample	mC 比例 Ratio of mC	mCG 比例 Ratio of mCG	mCHG 比例 Ratio of mCHG	mCHH 比例 Ratio of mCHH
P427	MCP	15.57	33.29	24.34	8.03
	MTEP	17.06	37.67	27.43	8.24
Nip	MCR	19.30	41.70	30.82	9.66
	MTER	17.66	38.45	28.71	8.62
9311	MCJ	11.48	24.74	18.06	5.83
	MTEJ	11.31	25.02	18.27	5.44

mC 比例: 全基因组甲基化 C 位点占全部 C 位点个数的百分比; mCG 比例: CG 位点区域甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数百分比; mCHG 比例: CHG 位点区域甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数百分比; mCHH 比例: CHH 位点区域甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数百分比

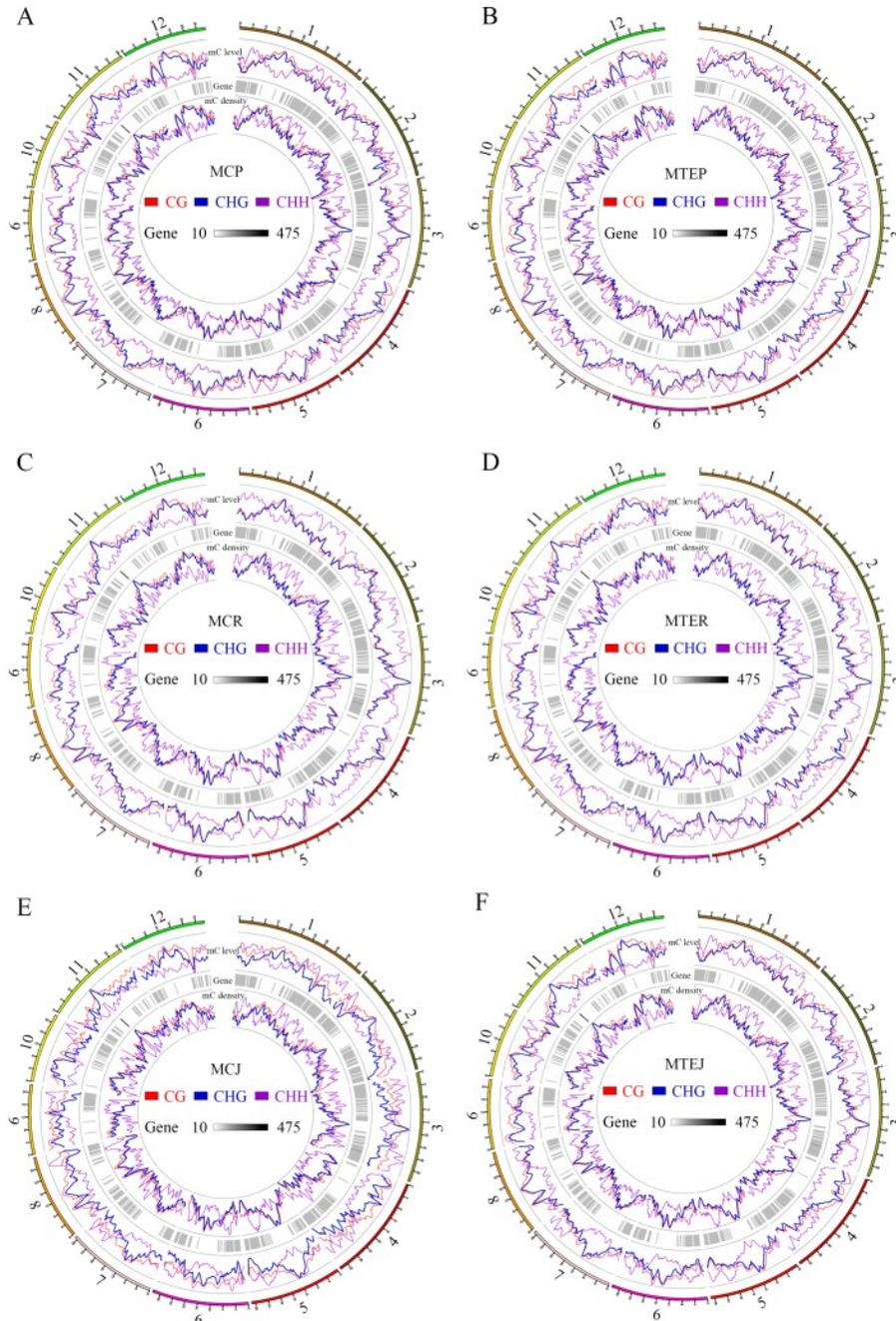
Ratio of mC: The percentage of methylated C sites in the whole genome to the total number of C sites; Ratio of mCG: The percentage of methylated C sites in the CG background region to the total number of C sites in the region; Ratio of mCHG: The percentage of methylated C sites in the CHG background region to the total number of C sites in this region; Ratio of mCHH: The percentage of methylated C sites in the CHH background region to the total number of C sites in the region

2.3 基因组中不同功能原件甲基化水平

不同样本(个体、组织、细胞等)间的 DNA 甲基化状态一般不相同,涉及的差异甲基化区域(DMR, differentially methylated region)可能在低温胁迫过程中发挥作用。经低温处理后,3个不同耐冷性水稻品种的12条染色体甲基化水平都发生了一定的差异变化,结果见图1。进一步探究这3个水稻品种经低温处理后,其基因组启动子区、内含子区、外显子区等功能性元件的DNA甲基化变化情况。结果显示,在3种序列下,mC在所有样品各功能元件中观察到的甲基化水平趋势一致,各个样品处理前后甲基化存在差异,但变化趋势一

致。总体来看,各样品在 Repeat 区域的 DNA 甲基化水平最高,其次是启动子区域,再次是内含子区域以及外显子和 3'UTR,在 5'UTR 区甲基化水平最低(图2)。

在 DNA 甲基化水平的基础上,对6个(处理前3个,处理后3个)样本进行聚类分析,结果显示每个品种的2个样本聚在了一起,而不同品种的甲基化水平出现了分离且距离较远(图3D~F),暗示在全基因组水平上,品种间存在较大的甲基化差异,且低温胁迫对品种的甲基化影响远低于品种间差异。2个粳稻品种先聚类在一起,说明亚种间的甲基化差异高于亚种内。

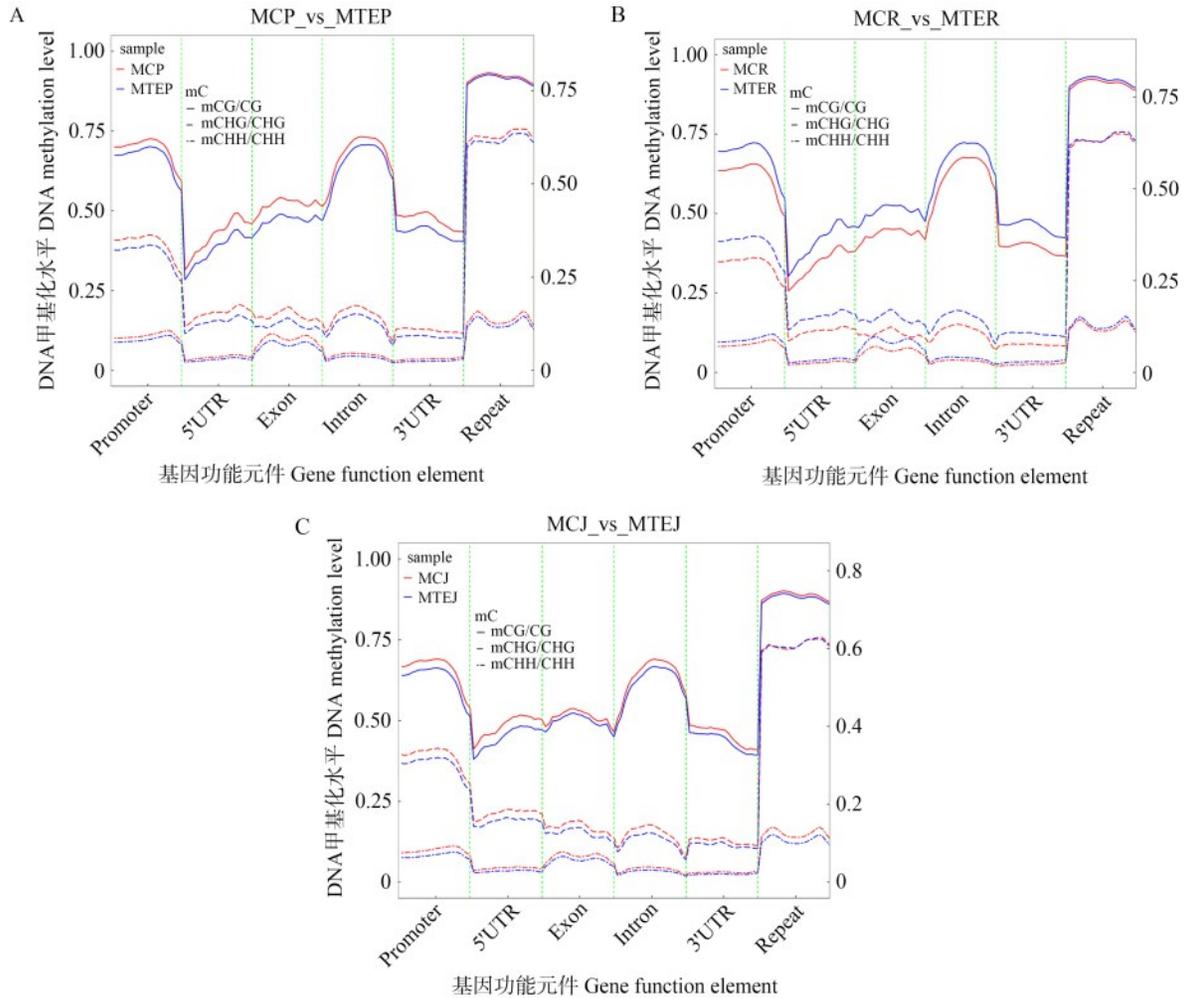


A、B:低温处理前后P427染色体甲基化水平 circos图; C、D:低温处理前后日本晴染色体甲基化水平 circos图;
 E、F:低温处理前后9311染色体甲基化水平 circos图
 A, B: The methylation level of P427 on chromosomes before and after low temperature treatment; C, D: The methylation levels of Nipponbare on chromosomes before and after low temperature treatment; E, F: The methylation levels of 9311 on chromosomes before and after low temperature treatment

图1 染色体甲基化水平 circos图
Fig.1 Circos diagram of chromosome methylation level

所有6个样本在Repeat区域都表现为高甲基化,推测这一区域的甲基化变化对低温诱导基因的表达调控贡献较小。其次mCG类型的甲基化主要集中在启动子区和内含子区,mCHG类型甲基化集中在启动子区,mCHH类型甲基化集中在启动子区和外显子区,且不同耐冷性品种在启动子区域甲基化表现出明显差异

(图3A~C)。因此,启动子区的甲基化变化对响应低温胁迫起到重要作用。同时本研究分析了3份不同耐冷性材料的不同序列下的甲基化分布,发现低温处理前后P427、日本晴和9311不同材料间其甲基化变化及程度都不同。另外,甲基化变化主要发生在CG和CHG序列,CHH序列的甲基化变化并不显著,结果见图4。



A-C: P427、日本晴、9311 低温处理前后不同基因元件甲基化水平示意图。MCP-vs-MTEP、MCR-vs-MTER 和 MCJ-vs-MTEJ, 分别表示 P427、日本晴和 9311 低温处理前后甲基化水平。mCG/CG、mCHG/CHG、mCHH/CHH 表示在不同基因功能区甲基化 CG、CHG、CHH 所占比例

A-C: Schematic diagrams of methylation levels of different gene elements before and after low temperature treatment of P427, Nipponbare, and 9311, respectively. MCP-vs-MTEP, MCR-vs-MTER and MCJ-vs-MTEJ represent the comparison of test materials P427, Nipponseol and 9311 before and after low temperature treatment, respectively. The methylation level of mCG/CG, mCHG/CHG and mCHH/CHH represent the proportion of CG, CHG and CHH methylated in different gene functional regions

图2 低温处理前后不同基因组元件甲基化水平分布趋势

Fig.2 Methylation levels of different genomic elements before and after low temperature treatment

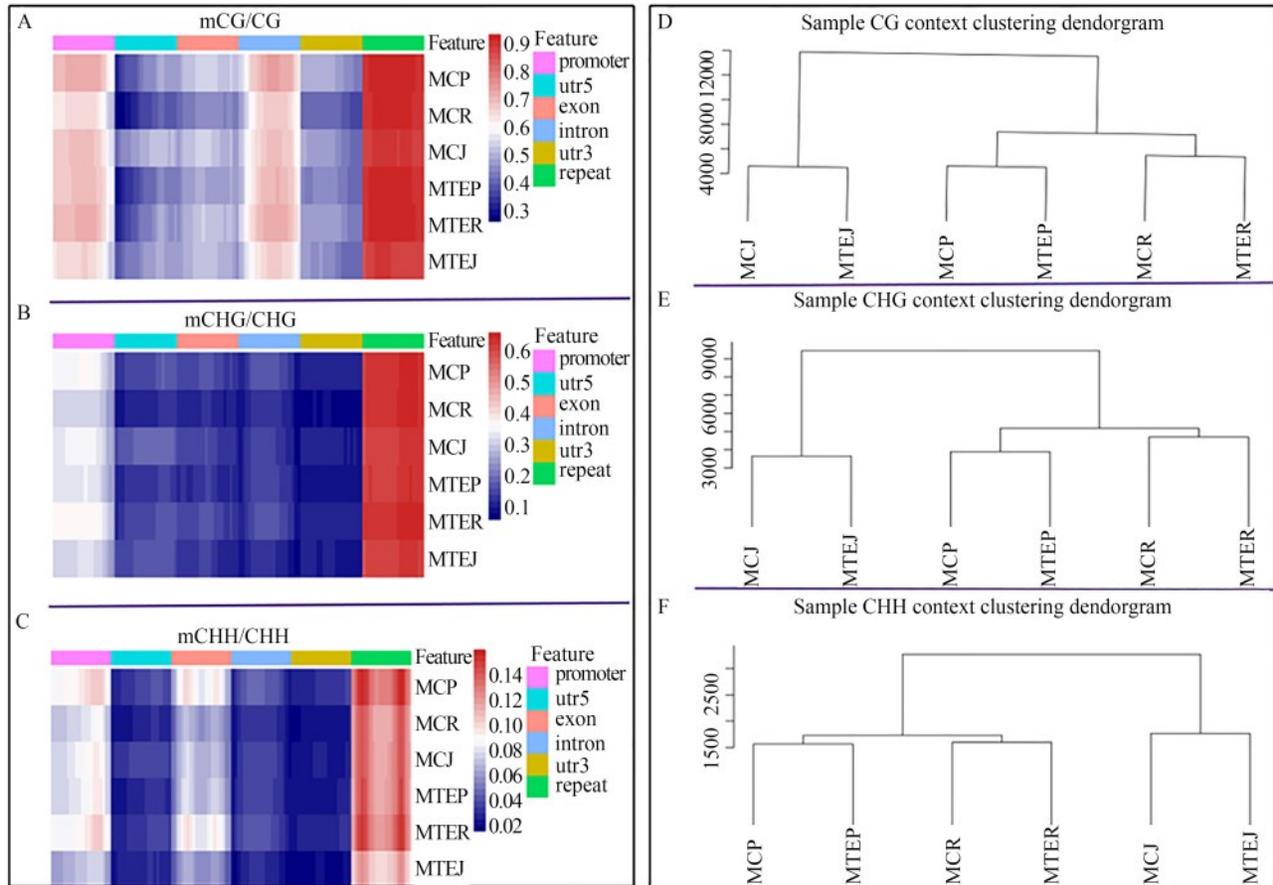
2.4 差异甲基化基因分析

根据3个品种基因启动子区和转录区甲基化变化的基因分布结果,显示3种甲基化序列下(CG/CHG/CHH)差异基因主要分布在启动子区(图5、表3)。其中P427锚定的基因最多,启动子区有9223个基因,CG_DMRgene>CHH_DMRgene>CHG_DMRgene;基因转录区有2906个基因,CHH_DMRgene>CG_DMRgene>CHG_DMRgene。日本晴中启动子区差异甲基化基因有7670个,CG_DMRgene>CHG_DMRgene>CHH_DMRgene;基因转录区有2324个基因,CG_DMRgene最少,CHH_DMRgene和CHG_DMRgene差异不大。9311中启动子区差异

甲基化基因有5303个,CHH_DMRgene>CG_DMRgene>CHG_DMRgene;基因转录区有1748个,CHH_DMRgene最多,CG_DMRgene和CHG_DMRgene相差不大。总之,3个品种锚定的差异甲基化基因主要分布在启动子区,并且甲基化类型存在显著差异,推测不同品种的耐冷性强弱不仅和锚定的基因数量有关,同时和甲基化类型也具有相关性。

2.5 DMR相关基因GO富集分析

DMR相关基因GO富集柱状图(分序列类型CG、CHG、CHH展示),可以直观地反映出在生物过程、分子功能和细胞组分富集的DMR相关基因的分布情况。



A: P427、日本晴和9311低温处理前后mCG/CG类型甲基化分布图; B: P427、日本晴和9311低温处理前后mCHG/CHG类型甲基化分布图; C: P427、日本晴和9311低温处理前后mCHH/CHH类型甲基化分布图; D: P427、日本晴和9311低温处理前后基于CG序列类型聚类图; E: P427、日本晴和9311低温处理前后基于CHG序列类型聚类图; F: P427、日本晴和9311低温处理前后基于CHH序列类型聚类图

A: The methylation distribution of mCG/CG types before and after low temperature treatment of P427, Nipponbare and 9311; B: Methylation distribution of mCHG/CHG types before and after low temperature treatment of P427, Nipponbare and 9311; C: P427, Nipponbare and 9311 before and after low temperature treatment of mCHH/CHH type methylation distribution map; D: Cluster map of CG sequence type before and after low temperature treatment of P427, Nipponbare and 9311; E: Cluster map of CHG sequence type before and after low temperature treatment of P427, Nipponbare and 9311; F: Cluster map of CHH sequence type before and after low temperature treatment of P427, Nipponbare and 9311

图3 水稻基因不同结构区的甲基化水平和6个样品的聚类

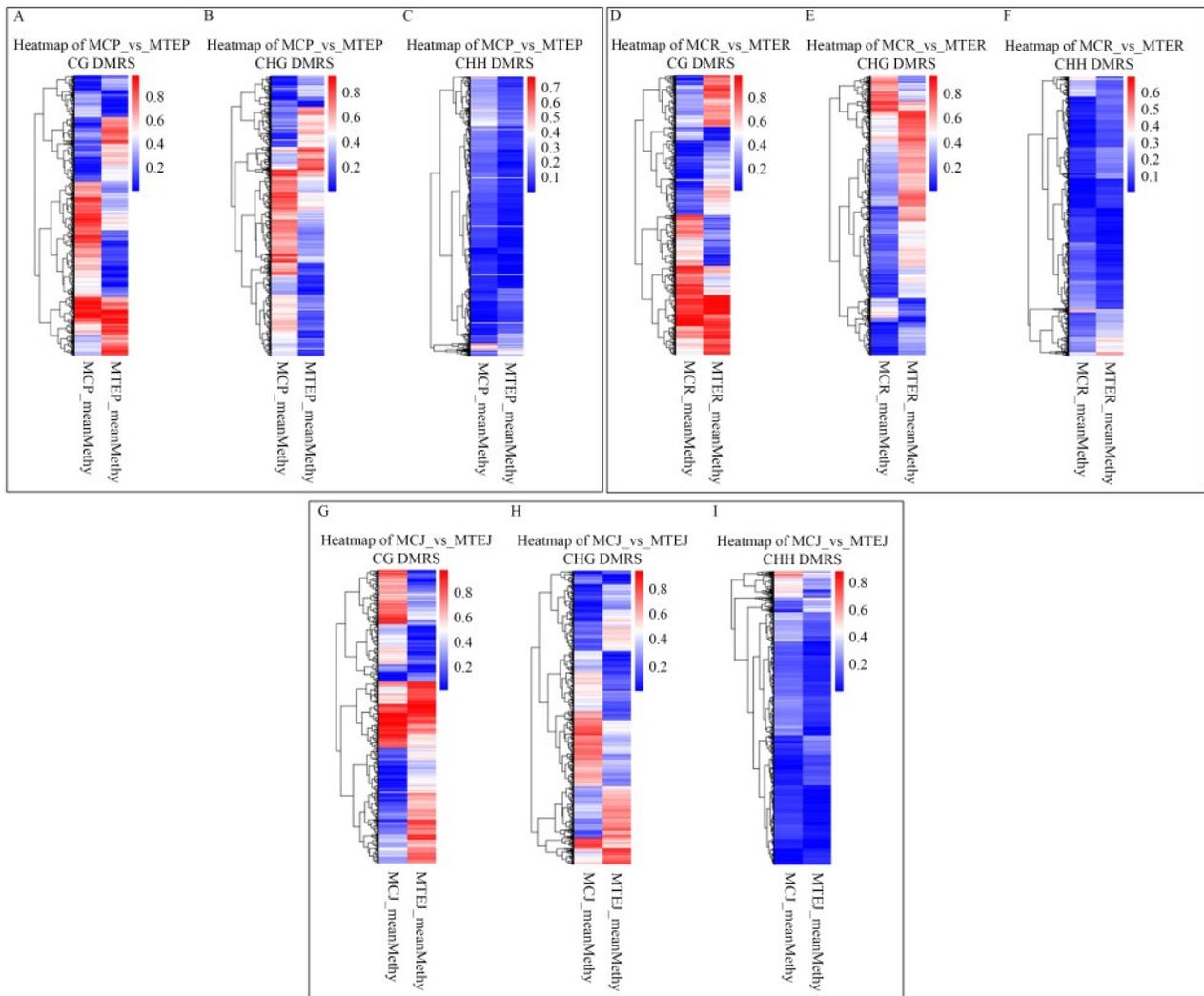
Fig.3 Levels of methylation in different structural regions of the gene and clustering of 6 samples

通过对P427、日本晴、9311这三份不同耐冷性水稻材料的所有DMR相关基因的GO富集分析,结果显示不论是强耐冷性材料P427,还是较耐冷性材料日本晴和冷敏感性材料9311,在CG、CHG、CHH 3种不同甲基化序列类型下,分别富集到的GO条目差异不大,暗示低温诱导的DMR相关基因的GO富集条目相对保守性较高。然而在3个供试品种中达到显著富集的GO条目差异很大,其中在CHG序列类型下P427和日本晴共同富集达到显著的条目有:细胞信号(GO:0007154)、蛋白质磷酸化(GO:0006468)等23个条目。而P427、日本晴和9311共同显著富集的仅有腺苷酸核糖核苷酸(GO:0032559)、腺苷酸核苷酸结合(GO:0030554)、离子结合(GO:0043167)等3个条目。

2.6 DMR相关基因KEGG富集分析

通过对3个不同耐冷性品种的差异甲基化基因进行KEGG富集分析,结果显示P427差异甲基化基因富集在108条Pathway通路上,其中CG类型有73条、CHG类型有70条、CHH类型有88条;另外,显著富集的通路有:二萜生物合成(PATH:00904)、淀粉和蔗糖代谢(PATH:00500)、氨基酸代谢(PATH:00460)等通路。日本晴差异甲基化基因富集在97条通路上,其中CG类型有67条、CHG类型有70条、CHH类型有83条;主要富集在二萜生物合成(PATH:00904)、 β -丙氨酸代谢(PATH:00410)、淀粉和蔗糖代谢(PATH:00500)等通路。9311差异甲基化基因富集在100条通路上,其中CG类型有56条、CHG类型有54条、CHH类型有77条;主要富集在

ABC转运蛋白(PATH:02010)、苯丙烷类生物合成(PATH:0094)、氨基酸代谢(PATH:0046)、生物素代谢(PATH:00780)等通路。



A-I: P427、日本晴和9311低温处理前后不同序列类型CG、CHG、CHH下的甲基化分布变化。不同颜色代表不同甲基化水平
A-I: The methylation distributions of P427, Nipponbare and 9311, CG, CHG, CHH sequences types after low temperature treatment.

Different colors indicate different methylation levels

图4 不同样本依据DMR的聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis diagram of different samples according to DMR

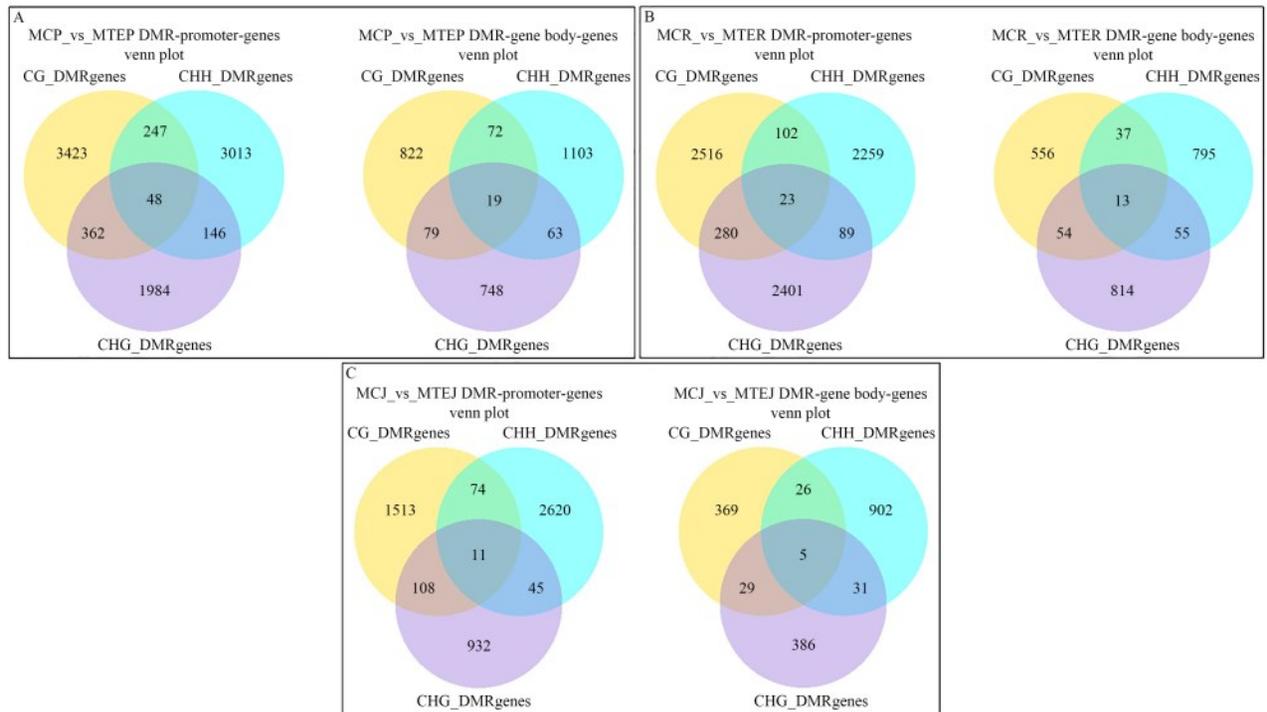
通过P427与日本晴比较分析,显示P427单独富集的KEGG通路有15条,蛋白质输出(PATH:03060)、二苯乙烯二芳庚烯和姜辣素的生物合成(PATH:00945)、非同源末端连接(PATH:03450)、核黄素代谢(PATH:00740)、鞘糖脂生物合成球状系列(PATH:00603)、鞘脂代谢(PATH:00600)、生物素代谢(PATH:0078)、维生素B6代谢(PATH:00750)、花生四烯酸代谢(PATH:0090)、亚油酸代谢(PATH:00591)、烟酸和烟酰胺代谢(PATH:00760)、鞘糖脂生物合成神经节系列(PATH:00604)、糖胺聚糖降解(PATH:00531)、类胡萝卜素生物合成(PATH:00906)、谷胱甘

肽代谢(PATH:00480)等。P427与9311比较分析,显示P427单独富集的KEGG通路也有15条(图6)。

本研究发现3个不同耐冷性水稻品种的3种甲基化类型(CG/CHG/CHH)共同富集的Pathway通路有20个,如mRNA监测途径(PATH:03015)、RNA降解(PATH:03018)、RNA转运(PATH:03013)、β-丙氨酸代谢(PATH:00410)、氨基酸的生物合成(PATH:01230)等,推测这些通路受低温胁迫调控影响。而丙氨酸/天冬氨酸和谷氨酸代谢(PATH:00250)、氮代谢(PATH:00910)、柠檬烯和蒎烯降解(PATH:00903)、叶酸一个碳库(PATH:00670)等仅

在 P427 和日本晴富集到的通路, 推测这些通路可能对增强水稻耐寒性有积极贡献。而蛋白质输出 (PATH:03060)、非同源末端连接 (PATH:03450)、核黄素代谢 (PATH:00740)、糖胺聚糖降解 (PATH:00531)、维生素 B6 代谢 (PATH:00750)、烟酸和烟酰胺代谢 (PATH:00760)、油菜素类固醇生物合成

(PATH:00905) 等 7 条通路只在品种 P427 中富集。一般植物逆境响应机制包括代谢途径改变或抗逆基因表达量改变。在水稻苗期受到低温胁迫时, 差异甲基化基因富集在以上通路, 这些代谢通路是否在增强水稻低温耐受性过程中起到了关键性作用, 还需要进一步的研究。



A~C: P427、日本晴和9311 启动子区和转录区差异甲基化基因分布图。图中数字表示启动子区和转录区 CG_DMR 基因、CHG_DMR 基因和 CHH_DMR 基因数目

A-C: The distribution of differentially methylated genes in the promoter and transcription regions of P427, Nipponbare and 9311. The figure shows the number of promoter region and transcription region CG_DMR gene, CHG_DMR gene and CHH_DMR gene

图5 甲基化水平变化基因分布

Fig.5 Methylation-related genes distribution

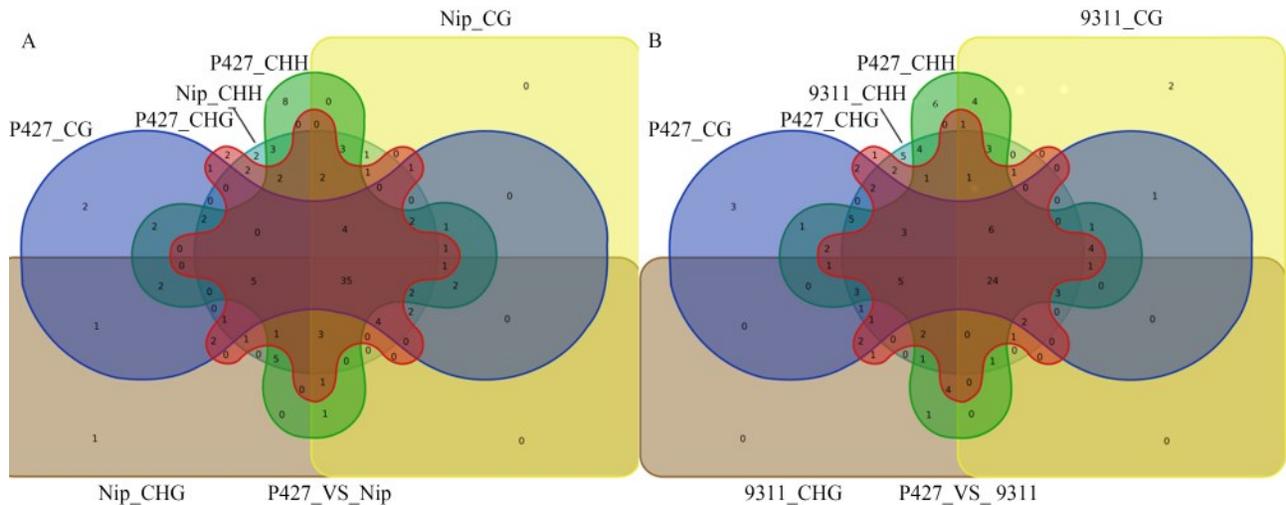
表 3 甲基化水平变化基因分布

Table 3 Methylation-related genes distribution

样本 Sample	锚定区域 Anchor area	CG_DMR 基因 CG_DMRgene	CG_DMR 基因比例 (%) CG_DMRgene ratio	CHG_DMR 基因 CHG_DMRgene	CHG_DMR 基因比例 (%) CHG_DMRgene ratio	CHH_DMR 基因 CHH_DMRgene	CHH_DMR 基因比例 (%) CHH_DMRgene ratio
P427	启动子	4080	44.24	2540	27.54	3545	38.44
	转录区	992	34.14	909	31.28	1257	43.26
Nip	启动子	2921	38.08	2793	36.42	2473	32.24
	转录区	660	28.40	936	40.28	900	38.73
9311	启动子	1706	32.17	1096	20.67	2750	51.86
	转录区	429	24.54	451	25.80	964	55.15

CG_DMR 基因、CHG_DMR 基因和 CHH_DMR 基因比例, 分别为启动子和转录区 CG_DMR 基因、CHG_DMR 基因和 CHH_DMR 基因数目, 占总甲基化基因数目的百分比。由于部分基因同时存在两种或 3 种类型的甲基化模式, 所以 CG、CHG、CHH 3 种类型甲基化基因总和大于实际总甲基化基因数

CG_DMR gene, CHG_DMR gene and CHH_DMR gene ratio were determined by the number of CG_DMR gene, CHG_DMR gene and CHH_DMR gene in promoter and transcription region, respectively, as percentage of the number of total methylated genes. Since some genes have two or three types of methylation patterns at the same time, the sum of the three types of methylated genes of CG, CHG and CHH is greater than the actual total number of methylated genes



A: P427 和日本晴差异甲基化基因富集通路的韦恩图; B: P427 和 9311 差异甲基化基因富集通路的韦恩图

A: Venn diagram of P427 and Nipponbare methylation differential gene enrichment pathways; B: Venn diagram of P427 and 9311 methylation differential gene enrichment pathways

图6 差异甲基化基因富集通路韦恩图

Fig.6 Venn diagram of enrichment pathway for differentially methylated genes

植物在受到低温胁迫时,可以通过积累渗透调节物质来降低膜脂的伤害,渗透调节物质主要包括脯氨酸,糖醇,甜菜碱等。研究显示将脯氨酸代谢或糖代谢相关酶基因导入植物中,能够使脯氨酸和糖类物质增加,从而增强植株对水分胁迫和盐胁迫的耐受性^[11]。本研究中通过对3个不同耐冷性水稻品种低温处理后发现,在耐低温品种P427的CG甲基化下,淀粉和蔗糖代谢(dosa00500)途径中有14个基因发生了甲基化变化(图7),其中8个基因甲基化水平呈上升趋势,6个基因发生甲基化下降。其中水稻蔗糖合成酶*SUS5*(*Os04g0309600*)甲基化上升。另外,果胶甲基酯酶*OsPME1*(*Os01g0788400*)是影响茉莉酸化合物含量的2个主效数量性状因子,而茉莉酸是一种广泛存在于植物中的生长调节物质,作为内源信号分子参与低温冷害、高温胁迫、盐胁迫、水分胁迫、病虫害以及机械伤害胁迫等抗逆反应^[12]。本研究中编码果胶甲基酯酶的基因*OsPME1*表现甲基化水平显著下降,暗示其在水稻苗期耐低温胁迫过程中可能起到了关键性作用。

3 讨论

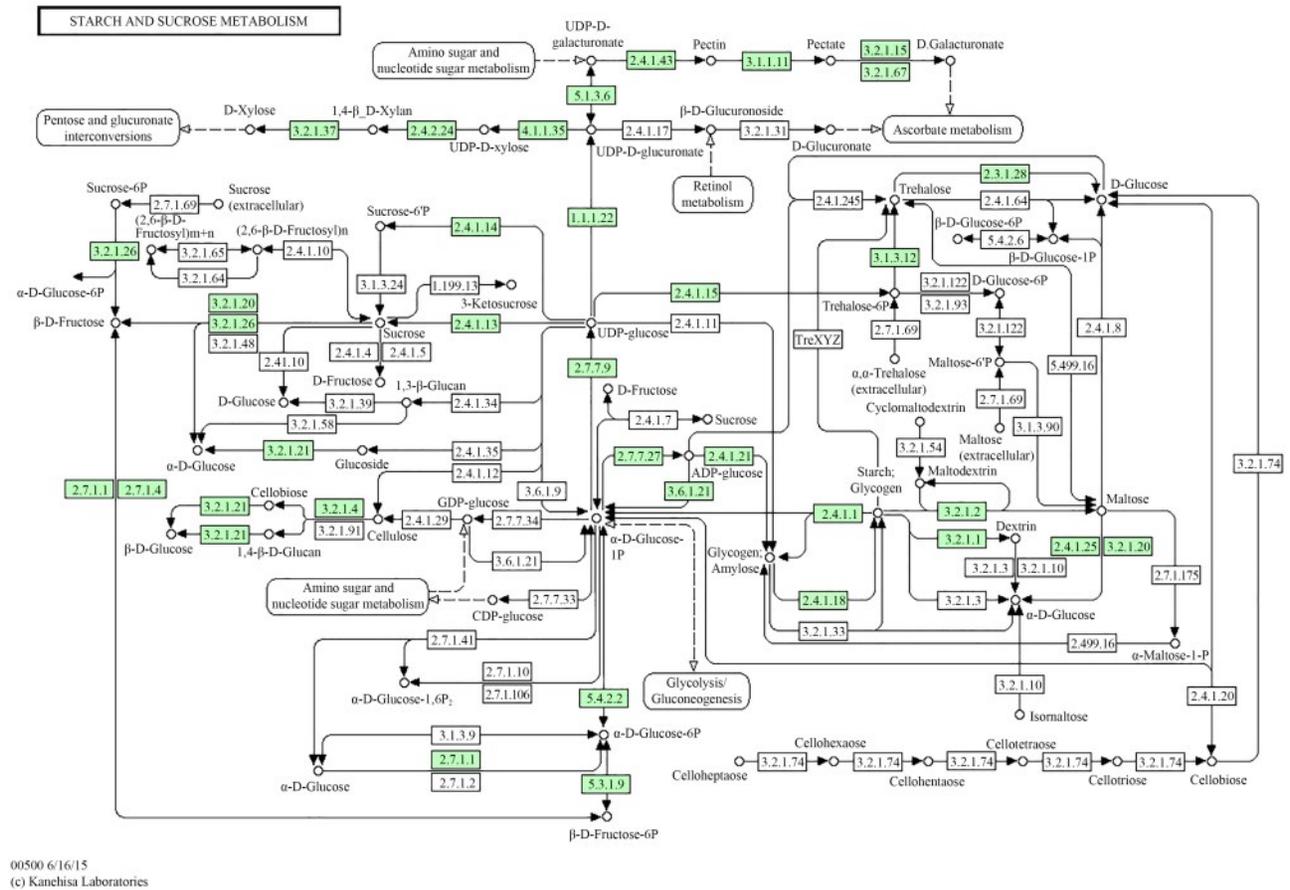
3.1 DNA甲基化在低温胁迫中的作用

植物在整个生长周期都处于固着状态,很容易受到生物或非生物胁迫的影响^[13]。植物通常通过基因变异重组获得适应环境的能力,但这一过程非常缓慢。而表观遗传修饰在植物适应生物或非生物胁迫过程发挥了重要作用。其中DNA甲基化是

最为常见的一种表观遗传调控方式。在植物响应高温、低温、干旱、盐碱、重金属等非生物胁迫过程中,通过全基因组或特定基因DNA甲基化水平变化,进而调控抗逆基因的表达以更好适应生存环境^[14]。本研究对3个不同耐冷性水稻品种进行全基因组DNA甲基化测序数据分析发现,强耐冷品种P427经低温诱导后DNA甲基化水平升高,而品种日本晴和9311 DNA甲基化水平略有下降且CG位点的甲基化是最主要的甲基化类型。Cathy等^[7]研究显示DNA甲基化可维持基因组稳定性并抑制基因重组。Alexander等^[9]研究认为,胁迫诱导基因甲基化水平升高可有效阻遏基因的有害突变。如铬胁迫诱导小萝卜发生DNA的从头甲基化^[15]。Dyachenko等^[16]研究发现盐胁迫条件下,耐盐植物冰日中花和小麦耐盐品种DNA都发生了超甲基化。这些从侧面解释了在低温胁迫下品种P427全基因组DNA甲基化升高的可能原因。另外,也有报道揭示系列胁迫可能引起全基因组DNA甲基化水平升高和位点特异性甲基化降低,而这些低甲基化位点往往与胁迫应答基因表达上调有关^[10,17]。玉米根系冷胁迫可通过降低核小体中心DNA甲基化水平,诱导*ZmM11*基因表达^[18]。烟草中高盐和冷害诱导*NtGDPL*基因编码序列DNA甲基化水平降低,基因表达量提高^[19]。因此,这些胁迫应答基因的转录可能受位点特异性DNA低甲基化的调控。此外,DNA甲基化在防御外源DNA侵袭和阻遏转座元件在基因组的移动方面也有重要作用,环境因子可通

过降低DNA 甲基化水平激活转座子,而胁迫激活转座可增加植物对低温胁迫的适应性^[20]。目前基因

甲基化模式与基因表达变化间的关系仍不清晰。



绿色表示下调基因

Green indicates down-regulated genes

图7 甲基化相关基因KEGG信号通路富集分析-淀粉和蔗糖代谢途径

Fig.7 Enrichment analysis of KEGG signaling pathway of methylation related genes-starch and sucrose metabolism pathways

3.2 低温诱导基因组中不同功能原件甲基化差异分析

遭受低温等逆境胁迫后,不同样本(组织、细胞、个体等)间的基因组甲基化变化也表现不同,相关差异甲基化区域(DMR)被认为可能参与基因的转录水平调控。本研究显示,3个品种在Repeat区域的DNA 甲基化水平都表现最高,且低温处理前后变化不明显,暗示这一区段DNA 甲基化的变化与耐低温性可能没有相关性。启动子区甲基化变化被认为对基因调控十分重要,Li等^[21]研究认为水稻孕穗期启动子区甲基化抑制基因表达,而编码区甲基化与基因表达成正相关。Akimoto等^[22]通过化学诱变获得水稻突变体 *line-2*,较其野生型在启动子区发生了去甲基化,突变基因 *Xa21G* 在 *line-2* 突变系中高表达可能是由于基因启动子区去甲基化影响。

李利红等^[23]通过 SO₂胁迫处理拟南芥后,发现 *NIT2* 基因编码区甲基化状态未变,启动子区 CG/CHG 位点发生甲基化,总胞嘧啶甲基化水平降低,基因 *NIT2* 表达水平上升。而本研究中经过低温处理后 P427、日本晴和 9311 的差异甲基化基因都主要分布在启动子区,启动子区差异甲基化基因是基因转录区的 3~4 倍,其中 P427 发生甲基化变化的基因最多,说明基因启动子区甲基化模式及变化与逆境胁迫响应基因表达存在重要关系。然而也有学者研究得到了不同的结果,Choi等^[19]通过铝离子处理烟草叶片基因 *NtGPD L*,基因启动子区甲基化状态没有发生变化,而编码区部分 CG 位点发生了去甲基化,基因表达量表现上升。Nicolas等^[18]研究发现玉米低温特异基因 *ZmM11* 在编码区发生去甲基化促进转录水平上调,进而基因 *ZmM11* 特异表达。所以

DNA甲基化对基因的表达调控是个复杂的生物学过程,仍需要开展深入细致的研究。

3.3 低温诱导差异甲基化基因分析

植物全基因组DNA甲基化的改变与植物响应非生物胁迫密切相关^[13]。本研究发现不同耐冷性水稻品种被锚定的差异甲基化基因主要分布在启动子区,且甲基化类型差异较大,提示启动子区基因甲基化可能对低温胁迫响应基因的调控作用更为重要,同时也暗示甲基化调控基因表达不仅与甲基化程度有关,而且与甲基化类型也存在某种关系。

在本研究中,经过GO富集分析发现差异甲基化基因主要富集在生物调节、发育过程、细胞连接、大分子复合物、抗氧化活性、催化活性、分子功能调节剂等GO条目。差异甲基化基因信号通路富集分析显示,主要富集在二萜生物合成、淀粉和蔗糖代谢、氨基酸代谢、肌醇磷酸代谢、 β -丙氨酸代谢、油菜素类固醇生物合成、苯丙烷类生物合成等代谢通路。暗示这些基因可能通过基因甲基化水平改变调控细胞间信号传导和耐低温胁迫基因的表达等过程影响水稻的耐冷性。

低温胁迫直接影响植物的淀粉合成以及糖代谢。可溶性糖作为一种重要的渗透调节物质,在植物体内积累对适应低温逆境起着重要的调节作用,利于增强植物的耐冷性^[24]。研究显示,低温胁迫及恢复生长对番茄蔗糖代谢和光合作用具有一定影响,淀粉、葡萄糖、果糖、蔗糖和总糖含量显著增加^[25]。茶树叶片对低温适应性反应显示,一定浓度的外源ABA能够提高叶片内可溶性糖的含量从而增强抗寒性^[26]。淀粉和糖类是光合作用的产物,也是植物生长发育的主要能量,而糖代谢和淀粉合成转运又受到ABA及Ca²⁺的影响。姜寒玉等^[27]研究认为适宜浓度的ABA及Ca²⁺处理可增强蔗糖代谢酶活性,促进蔗糖转化,提高碳水化合物含量从而增强幼苗的抗寒能力。

4 结论

基因启动子区甲基化对低温胁迫响应基因的调控作用更为重要,甲基化调控基因表达不仅与甲基化程度有关,与甲基化类型也可能存在一定的关系。P427差异甲基化基因主要富集到二萜生物合成、淀粉和蔗糖代谢等代谢通路及激素信号转导通路,这些通路上的基因可能通过基因甲基化水平或模式改变调控细胞间信号传导和耐低温胁迫基因的表达过程,进而影响水稻的耐冷性。

参考文献

- [1] 李青芝, 李成伟, 杨同文. DNA甲基化介导的植物逆境应答和胁迫记忆. 植物生理学报, 2014, 50(6): 725-734
Li Q Z, Li C W, Yang T W. Stress response and memory mediated by DNA methylation in plants. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(6): 725-734
- [2] Wang M, Qin L M, Xie C, Li W, Yuan J R, Kong L N, Yu W L, Xia G M, Liu S W. Induced and constitutive DNA methylation in a salinity-tolerant wheat introgression line. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(7): 1354-1365
- [3] Pranav P S, Garima P, Namisha S, Swati P, Mehanathan M, Manoj P. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(8): 1151-1159
- [4] 卓婉清, 腊红桂. 拟南芥DNA甲基化及去甲基化研究进展. 南方农业, 2015, 9(9): 129-133
Zhuo W Q, La H G. Research progress on DNA methylation and demethylation in Arabidopsis. *South China Agriculture*, 2015, 9(9): 129-133
- [5] Celia M, Liliana M. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: Somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(11): 3713-3725
- [6] Manoj K D, Parivartan V, Rahul S, Sanjana K. Epigenetic dynamics: Role of epimarks and underlying machinery in plants exposed to abiotic stress. *International Journal of Genomics*, 2014, 2014: 187146
- [7] Cathy M B, Avraham L A. Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): E981-E988
- [8] 潘丽娜. 表观遗传修饰调控非生物胁迫应答提高植物抗逆性. 遗传, 2013, 35(6): 745-751
Pan L N. Epigenetic regulation of abiotic stress response in plants to improve the stress tolerance. *Hereditas*, 2013, 35(6): 745-751
- [9] Alexander B, Palak K, Franz J Z, Yao Y L, Igor P, Igor K. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants: (virus-induced plant genome instability). *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(5): 1714-1725
- [10] Alex B, Igor K. Genetic and epigenetic effects of plant-pathogen interactions: An evolutionary perspective. *Molecular Plant*, 2011, 4(6): 1014-1023
- [11] 王华, 杨建峰. 植物抗寒基因工程研究进展. 现代农业科技, 2007, 23: 117-122
Wang H, Yang J F. Research progress in genetic engineering of plant cold resistance. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2007, 23: 117-122
- [12] 蔡克桐, 沈其文, 黄志谋, 耿协议. 茉莉酸对低温胁迫水稻幼苗的生理效应. 湖北农业科学, 2014, 53(15): 3512-3515
Cai K T, Shen Q W, Huang Z M, Geng X Y. Physiological effects of jasmonate (JA) on rice seedlings under low temperature. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(15): 3512-3515

- [13] 杜康兮, 沈文辉, 董爱武. 表观遗传调控植物响应非生物胁迫的研究进展. 植物学报, 2018, 53 (5):581-593
Du K X, Shen W H, Dong A W. Advances in epigenetic regulation of abiotic stress response in plants. Chinese Bulletin of Botany, 2018, 53 (5):581-593
- [14] 王敏, 王一峰. 表观遗传修饰在植物逆境胁迫响应中的应用. 生命科学, 2013(6): 34-39
Wang M, Wang Y F. Role of epigenetic modifications in plant stress response. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2013 (6) : 34-39
- [15] Massimo L, Fabrizio G, Serena I, Tiziana D F, Sandra C, Sergio S, Elisabetta A. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassic napus* L. Chemosphere, 2004, 54(8): 1049-1058
- [16] Dyachenko O V, Zakharchenko N S, Shevchuk T V, Bohnert H J, Cushman J C, Buryanov Y I. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of *Mesembryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress. Biochemistry Biokhimiia, 2006, 71(4): 570-575
- [17] Alex B, Todd B, Yao Y L, Andrey G, Andriy B, Yaroslav I, Jens H, Frederick M Jr, Igor K. Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. PLoS ONE, 2010, 5(3):e9514
- [18] Nicolas S, Mikako I, Yube Y, Nozomu K, Hiroshi S. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(40): 37741-37746
- [19] Choi C S, Sano H S. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase like protein in tobacco plants. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 277(5):589-600
- [20] Jiang N, Bao Z R, Zhang X Y, Hirohiko H, Sean R E, Susan R M, Susan R W. An active DNA transposon family in rice. Nature, 2003, 421(6919):163-167
- [21] Li X, Zhu J D, Hu F Y, Ge S, Ye M Z, Xiang H, Zhang G J, Zheng X M, Zhang H Y, Zhang S L, Li Q, Luo R B, Li Q, Yu C, Yu J, Sun J F, Zou X Y, Cao X F, Xie X F, Wang J, Wang W. Single-base resolution maps of cultivated and wild rice methylomes and regulatory roles of DNA methylation in plant gene expression. BMC Genomics, 2012, 13:300, 1471-1486
- [22] Akimoto K, Katakami H, Kim H J, Ogawa E, Sano H. Epigenetic inheritance in rice plants. Annals of Botany, 2007, 100(2): 205-217
- [23] 李利红, 仪慧兰, 王艺雯, 杨波. 二氧化硫胁迫诱导拟南芥 *NIT2* 基因 DNA 甲基化修饰. 农业环境科学学报, 2012(4): 685-690
Li L H, Yi H L, Wang Y W, Yang B. Sulfur dioxide induces DNA methylation alteration of a gene encoding nitrilase 2 protein in *Arabidopsis* plants. Journal of Agro-Environment Science, 2012(4): 685-690
- [24] 张怀山, 赵桂琴, 栗孟飞, 夏曾润, 王春梅. 中型狼尾草幼苗对 PEG 低温和盐胁迫的生理应答. 草业学报, 2014, 23(2): 180-188
Zhang H S, Zhao G Q, Li M F, Xia Z R, Wang C M. Physiological responses of *Pennisetum longissimum* var. *Intermedium* seedlings to PEG, low temperature and salt stress treatments. Acta Prticulturaesinica, 2014, 23(2): 180-188
- [25] 李苗苗, 冯雪, 邹春静. 外源 Ca^{2+} 对干旱胁迫下沙地云杉幼苗抗旱性生理指标的影响. 安徽林业科技, 2013, 39(1): 12-14
Li M M, Feng X, Zou C J. Effects of exogenous Ca^{2+} on the drought resistance-related physiological indexes of *Picea mongolica* seedlings under drought stress. Anhui Forestry Science and Technology, 2013, 39(1): 12-14
- [26] 张丽, 周欣, 蒋家月, 江昌俊, 朱政. 外源 ABA 对茶树抗寒生理指标的影响. 茶业通报, 2012, 34(2): 72-74
Zhan L, Zhou X, Jiang J Y, Jiang C J, Zhu Z. Effects of exogenous ABA on physiological indicators of cold resistance of tea tree. Journal of Tea Business, 2012, 34(2): 72-74
- [27] 姜寒玉, 王旺田, 雷天翔, 何百俊, 张金林. 外源 ABA 和 Ca^{2+} 对低温及低温恢复下赤霞珠幼苗蔗糖代谢的影响. 干旱地区农业研究, 2017, 35(2):127-133
Jiang H Y, Wang W T, Lei T X, He B J, Zhang J L. Effects of exogenous ABA and Ca^{2+} on sucrose metabolism in grape (*Vitisvinifera* L.) seedlings under low temperature treatment and recovery. Agricultural Research in the Arid Areas, 2017, 35(2):127-133